



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física**

**“Detección de Endotoxinas: Bases para un Ensayo  
de Reconocimiento Molecular”**

**Graciela Inés Priano**

**Director de Tesis: Fernando Battaglini**

**Lugar de Trabajo: Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física**

**INQUIMAE**

**Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor  
de la Universidad de Buenos Aires**

**2006**



*“He procurado presentar las pruebas recogidas lo mejor que he sabido, y en mi opinión, resulta forzoso reconocer que el hombre, a pesar de las nobles cualidades que le adornan, de la compasión que muestra hacia los más menesterosos, de su bondad no sólo para con los otros hombres, sino también para con las criaturas más insignificantes, de su intelecto divino y de que ha llegado a elucidar los movimientos y constitución del sistema solar, a pesar de todo ello, digo, el hombre aún lleva impresa en su estructura corpórea, la huella indeleble de su humilde origen”*

**Charles Darwin**



## Resumen

Las endotoxinas, también conocidas como pirógenos, son constituyentes de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Ellas son responsables de inducir fiebre y la disfunción progresiva de distintos órganos cuando ingresan al torrente sanguíneo. Los métodos aceptados para su detección son métodos biológicos: el ensayo LAL, basado en la gelificación del lisado de amebocitos provenientes del cangrejo herradura y el ensayo en conejos.

En el presente trabajo, se estudió la interacción de las endotoxinas con una proteína de reconocimiento inmovilizada sobre dos superficies distintas con el propósito de desarrollar un ensayo competitivo amperométrico. El primer escalón en este trabajo fue realizar una detallada investigación acerca de este tipo de moléculas. Ellas son lipopolisacáridos que presentan ciertas características peculiares: la formación de agregados aún a muy bajas concentraciones, la alta variabilidad en su peso molecular y la dificultad para determinar su presencia por métodos analíticos convencionales. Fueron establecidos un método para su purificación y pautas para la manipulación y operatoria con este reactivo.

Fueron estudiadas dos configuraciones de electrodos modificados utilizando como elemento de reconocimiento una proteína recombinante, Endotoxin Neutralizing Protein (ENP), que reconoce específicamente una porción altamente conservada de este conjunto de moléculas. La construcción de los electrodos fue seguida por técnicas electroquímicas y elipsometría, mientras que su funcionamiento fue evaluado en un ensayo competitivo, utilizando como elemento generador de la señal, un lipopolisacárido modificado con HRP. Los electrodos construidos por interacción electrostática entre ENP y un polímero electroactivo permitieron detectar la presencia de endotoxinas en concentraciones tan bajas como  $0.2 \text{ EU mL}^{-1}$ . Los electrodos construidos por unión covalente de ENP a una matriz de carboximetil dextran mostraron un mayor rango dinámico pero también un mayor límite de detección.

Se presentó un modelo cinético para evaluar la respuesta electroquímica teniendo en cuenta los distintos métodos de inmovilización.

**Palabras clave:** LPS, lipopolisacáridos, pirógenos, endotoxinas, ensayo competitivo, ensayo amperométrico.



# “Detection of Endotoxins: Basis for a Molecular Recognition Assay”

## Abstract

Endotoxins, also referred to as pyrogens, are part of the cellular walls of gram negative bacteria, and are capable of inducing fever when entering into the blood stream. Current methods of detection involve either the use of amoebocytes from horseshoe crab that clots upon exposure to endotoxin, or a live assay on rabbits.

In this work the interaction of endotoxins with a recognition protein immobilized on different matrixes is studied with the aim to develop a competitive amperometric assay. The first step of this work was to understand the physicochemical characteristics of this type of molecules, which are lipopolysaccharides, since they present unique characteristics like formation of micelles, even at very low concentrations, high variability of its molecular weight, the presence of impurities and the difficult to determine its presence by analytical conventional methods.

Two configurations of modified electrodes were studied using a recombinant endotoxin neutralizing protein (ENP) as recognition element. Their construction was followed by electrochemical and elipsometric techniques and tested with a modified lipopolysaccharide with horseradish peroxidase in a competitive assay.

Modified electrodes constructed by electrostatic interaction of ENP and an electroactive polymer can detect the presence of endotoxins in concentrations as low as  $0.2 \text{ EU mL}^{-1}$ , bellow the limit imposed for water in injectable drugs in the American Pharmacopoeia. Modified electrodes constructed by covalent linking of ENP to a carboxymethyl dextran matrix bound to the electrode shows a better dynamic range but a higher detection limit.

A kinetic model for the electrochemical response taking into account the different immobilization methods is presented to understand the observed results.

**Keywords:** LPS, lipopolysaccharides, pyrogens, endotoxins, amperometric assay, competitive assay.



# Indice

<b>Capítulo 1- Estado Actual del Conocimiento y Objetivos</b>	<b>1</b>
1.1 Endotoxinas	1
1.1.1 Estructura Química	2
1.1.2 Estructura Supramolecular	5
1.1.3 Acción fisiológica de las endotoxinas	8
1.1.4 Ensayo de endotoxinas bacterianas (LAL Test)	11
1.1.5 Agentes anti-endotoxina	14
1.1.5.1 Anticuerpos antiendotoxina.	15
1.1.5.2 Macromoléculas y péptidos derivados	15
1.1.5.3 Moléculas pequeñas secuestrantes de LPS	18
1.1.6 Mecanismo de reconocimiento de LPS por ENP	21
1.2 Ensayos de Reconocimiento	24
1.2.1 Inmunoensayos	25
1.2.1.1. Ensayo inmunométrico o tipo sándwich.	26
1.2.1.2. Ensayo competitivo	28
1.2.2 Ensayos de reconocimiento no inmunológicos	29
1.3 Técnicas de inmovilización de proteínas	31
1.3.1 Unión covalente	32
1.3.2 Monocapas autoensambladas	33
1.3.3 Autoensamblado electrostático	35
1.3.4 Unión avidina- biotina	37
1.4 Transducción electroquímica	37
1.5 Peroxidasa de Rábano Picante (HRP)	40
1.5.1 Generalidades	40
1.5.2 Ciclo catalítico	41
1.6 Objetivos de la Tesis	43
1.7 Referencias	45
<b>Capítulo 2 – Técnicas utilizadas</b>	<b>51</b>
2.1 Elipsometría	51
2.1.1 Fundamento teórico	51
2.1.2 Instrumentación	54
2.2 Técnicas Electroquímicas	54
2.2.1 Fundamento teórico	54
2.2.1.1 Cronoamperometría	55
2.2.1.2 Voltametría cíclica	57
2.2.1.3 Reacción catalítica acoplada	62
2.2.2 Instrumentación	67
2.3 Ensayos competitivos	67
2.3.1 Curva de competencia	67

2.3.2 Factor o pendiente de Hill	69
2.3.3 Unión inespecífica	71
2.4 Referencias	72
<b>Capítulo 3 - Caracterización de los elementos del ensayo</b>	<b>75</b>
3.1 Purificación y caracterización de LPS	75
3.1.1 Introducción	75
3.1.2 Materiales y Métodos	76
3.1.3 Caracterización de LPS	79
3.1.3.1 Resultados	79
3.1.4 Purificación de LPS de <i>Salmonella minnesota</i>	80
3.1.4.1 Digestión enzimática	80
3.1.4.2 Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC)	81
3.1.4.3 Resultados	82
3.1.4.4 Sumario	87
3.2 Caracterización del conjugado LPS-HRP	88
3.2.1 Materiales y Métodos	88
3.2.2 Resultados	89
3.3 Síntesis de conjugados de LPS y Caracterización del conjugado de LPS-biotina	90
3.4 Caracterización de ENP - Evaluación de la habilidad de unión a LPS	93
3.4.1 Inhibición del ensayo LAL por parte de agentes de reconocimiento de LPS	93
3.4.2 Experimental	93
3.4.3 Resultados	94
3.5 Determinación electroquímica del coeficiente de difusión del mediador	95
3.5.1 Experimental	96
3.5.2 Resultados	96
3.6 Referencias	99
<b>Capítulo 4 – Configuración Covalente</b>	<b>101</b>
4.1. Introducción	101
4.2 Experimental	104
4.2.1. Construcción de los electrodos modificados	104
4.2.1.1 Materiales	104
4.2.1.2 Adsorción de cistamina (Au/Cys):	105
4.2.1.3 Modificación con carboximetildextran (Au/Cys/CMDex):	105
4.2.1.4 Modificación con ENP (Au/Cys/CMDex/ENP):	106
4.2.1.5 Modificación con Ferrocenoaldehído:	107
4.2.2. Seguimiento de la modificación	108
4.2.2.1 Instrumental	108
4.2.2.2 Medidas electroquímicas	108
4.2.2.3 Medidas elipsométricas	109
4.3 Resultados	111
4.4 Sumario	124

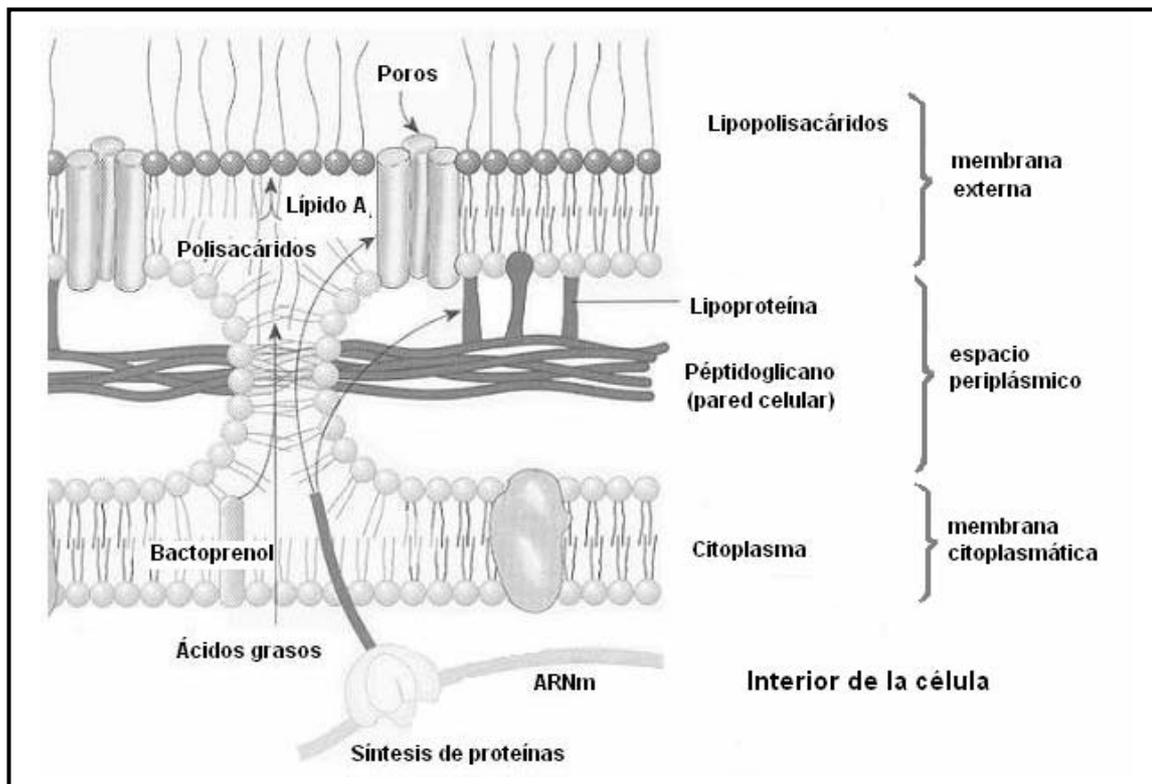
4.6 Referencias	125
<b>Capítulo 5 –Configuración Electrostática</b>	<b>127</b>
5.1 Introducción	127
5.2 Construcción de los electrodos modificados	129
5.2.1 Materiales	129
5.2.2 Adsorción del tiol (Au/MPS):	130
5.2.3 Adsorción de PAAOs (Au/MPS/PAAOs):	130
5.2.4 Adsorción de ENP (Au/MPS/PAAOs/ENP):	130
5.3 Resultados	130
5.4 Sumario	133
5.4 Referencias	134
<b>Capítulo 6 – Ensayos competitivos</b>	<b>135</b>
6.1 Introducción	135
6.2 Experimental	137
6.2.1 Adsorción de LPS-HRP	138
6.2.2 Adsorción de BSA	138
6.2.3 Ensayos competitivos.	139
6.3 Resultados	139
6.3.1 Configuración covalente	139
6.3.2 Configuración electrostática	148
6.4 Sumario	155
6.5 Referencias	156
<b>Capítulo 7 – Ensayo utilizando LPS-biotina: Estudios Preliminares</b>	<b>159</b>
7.1 Introducción	159
7.2 Experimental	161
7.2.1 Materiales y Métodos	161
7.2.2 Construcción de los electrodos	162
7.2.3 Adsorción de N-HRP	163
7.2.4 Ensayo competitivo	163
7.3 Resultados	163
7.4 Sumario	169
7.5 Referencias	170
<b>Capítulo 8 – Discusión y Conclusiones</b>	<b>171</b>
8.1 Discusión	171
8.2 Conclusiones	183
8.3 Referencias	186
<b>Apéndice</b>	<b>189</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>205</b>



## Capítulo 1- Estado Actual del Conocimiento y Objetivos

### 1.1 Endotoxinas

Las endotoxinas, también llamadas lipopolisacáridos (LPS), constituyen el 75% de la superficie de las bacterias Gram-negativas; una única célula de *Escherichia coli* contiene aproximadamente  $3.5 \times 10^6$  moléculas de LPS.<sup>1</sup> Estas moléculas están ancladas en la membrana externa de la célula, como puede observarse en la Figura 1.1, y son liberadas continuamente al medio circundante de las células bacterianas cuando se multiplica y también cuando la bacteria muere o se lisa. Son moléculas muy estables, resisten temperaturas extremas (180-220 °C) y medios muy ácidos ó básicos, en comparación con proteínas. Debido a su tamaño, pueden atravesar las membranas de los filtros de esterilización de fluidos (0.1-0.22  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 1.1:** Estructura de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Localización de los lipopolisacáridos (LPS) o endotoxinas. (Ref 2)

### **1.1.1 Estructura Química**

El nombre lipopolisacárido se debe a que poseen una región polisacárida y una región lipídica. La estructura del LPS fue elucidada en la década del 80 por diferentes grupos. Consiste de 3 diferentes partes desde el punto de vista químico. A modo de ejemplo, en la Figura 1.2a se presenta un esquema de la estructura química de un LPS completo y en la Figura 1.2b, la estructura química para el LPS de los distintos mutantes de *Salmonella minnesota*. Allí puede observarse una porción lipídica no polar, llamada LÍPIDO A, una porción central constituida por un oligosacárido, denominado CORE, y un heteropolisacárido que representa la superficie antigénica de la bacteria, llamado O-ANTÍGENO.

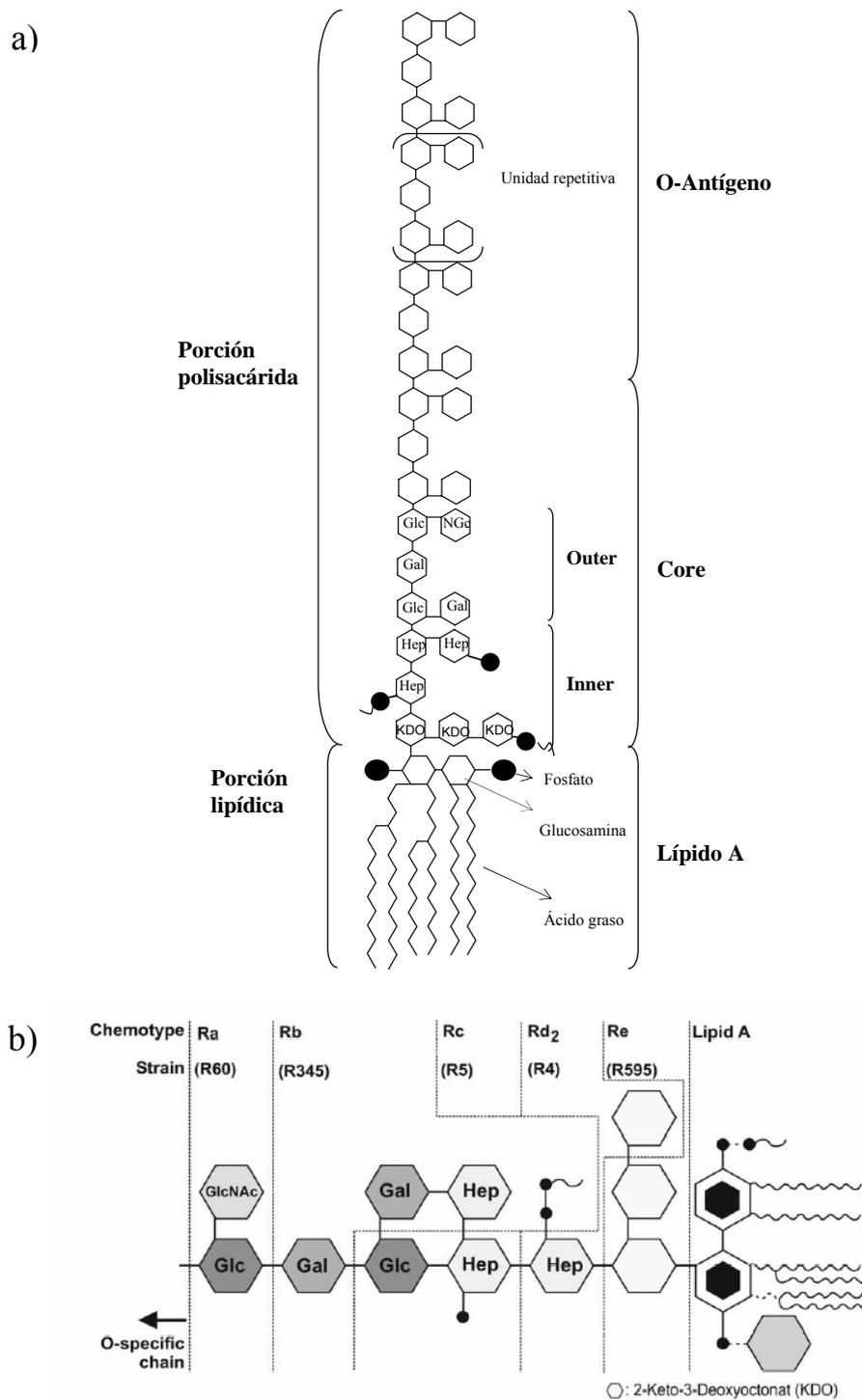
La parte más conservada del LPS es el Lípido A. Todos los efectos patológicos del LPS pueden inducirse solamente por esta región, es por eso que quedó establecido que el lípido A es la porción “tóxica” del LPS.<sup>3</sup>

El lípido A es un anfifilo formado por un disacárido de glucosamina difosforilado, por lo tanto, hidrofílico y negativamente cargado, unido a un dominio hidrofóbico de 6-7 cadenas con 12-16 carbonos cada una, vía un enlace amida o éster.<sup>4-6</sup> Esta parte hidrofóbica adopta la forma de arreglo hexagonal, resultando en una estructura más rígida comparada con el resto de la molécula. La figura 1.3 muestra la estructura química del lípido A para *Salmonella* y *E. coli*.

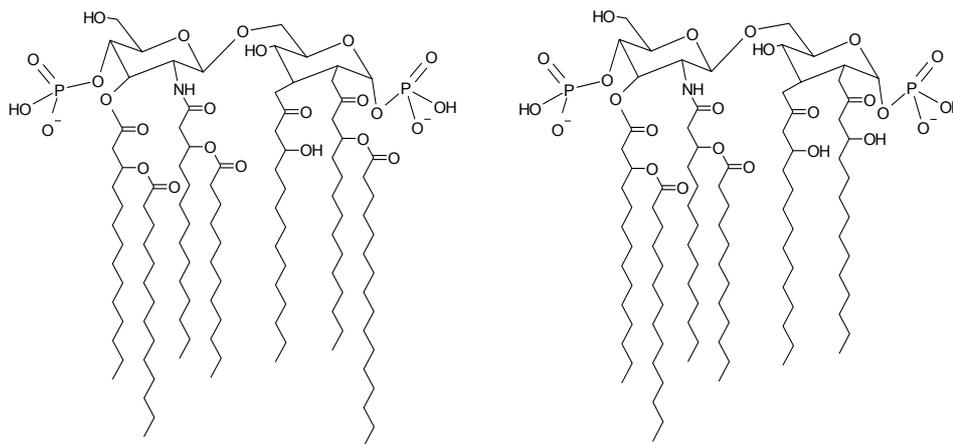
La zona central de la molécula, el core, está compuesta por hidratos de carbono presentando una estructura poco variable entre las distintas especies. La misma puede dividirse en dos regiones: una región interior y otra exterior.

La región interior, denominada inner core y vecina al lípido A, está formada por heptosas y ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO). Al igual que el lípido A, se encuentra parcialmente fosforilada ( $pK_1=1.3$  y  $pK_2=8.2$ ), por lo que las endotoxinas exhiben una carga neta negativa en solución a pH fisiológico.<sup>7</sup>

La región exterior, denominada outer core, está formada por hexosas y aminohexosas y presenta mayor diversidad entre LPSs de distintos orígenes.



**Figura 1.2:** Vista esquemática de la estructura química de a) LPS completo (smooth) b) varios mutantes de LPS de *S. minnesota*. La longitud de la porción oligosacárida disminuye en la secuencia Ra, Rb, Rc, Rd y Re. Las cepas correspondientes para *S. minnesota* son: R60, R345, R5, R4 y R595. (Ref 8)



**Figura 1.3:** Estructura química de Lípido A de *Salmonella* (izquierda) y *E. coli* (derecha). (Ref 4)

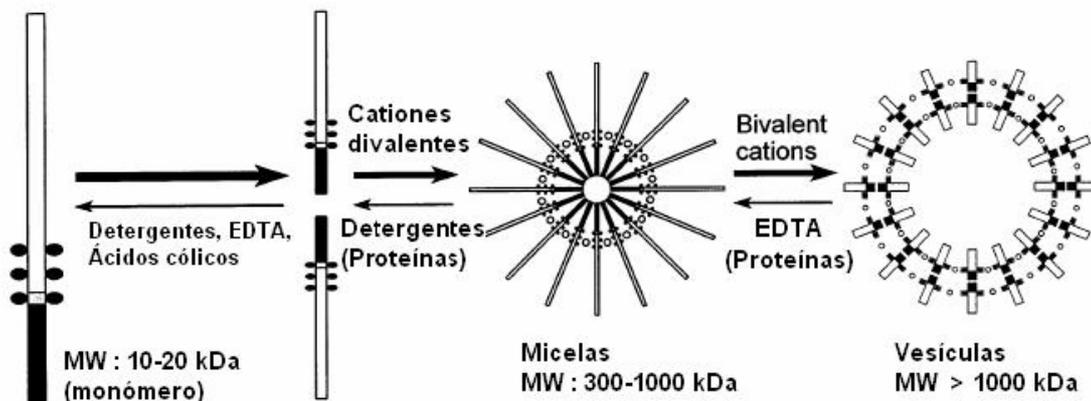
El O-antígeno está formado por una cadena de unidades repetitivas de un oligosacárido (3 a 8 monosacáridos), específicos y determinantes de la identidad serológica de la bacteria. Ésta es la porción más variable entre distintas especies y aún dentro de la misma especie. Puede cambiar el tipo de azúcar de una especie a otra o de un serotipo a otro y también puede cambiar el número de unidades repetidas dentro de una misma especie y serotipo, por lo que las muestras son altamente heterogéneas.<sup>9,10</sup> Una cierta microheterogeneidad surge también de sustituciones no estequiométricas. Por ejemplo, grupos fosfatos del lípido A y del core pueden estar sustituidos con arabinosa y etanolamina en distintas proporciones. También algunos sacáridos del O-antígeno pueden estar acetilados, sialilados o glicosilados<sup>10</sup> y como se describió anteriormente el número de unidades repetitivas puede variar. Todo esto causa cierta heterogeneidad de la población de endotoxina de cada bacteria, trayendo como consecuencia directa que no se pueda encontrar, aún dentro de la misma bacteria, una única estructura química.

La masa molar de un monómero de endotoxina, como la que se muestra en la Figura 1.2a, es de alrededor de 10 kDa (aunque también se ha llegado a estimar entre 15-20 kDa, dependiendo de la variabilidad del O-antígeno).<sup>7,11</sup> Estos monómeros forman agregados de alta estabilidad. Métodos analíticos, como Difracción de Rayos X, Espectroscopía de FTIR, RMN, Scattering, asistidos por técnicas de Modelado Molecular dieron una imagen un poco más detallada de cómo se organizan en tres dimensiones las endotoxinas.<sup>12,13</sup>

### 1.1.2 Estructura Supramolecular

Las endotoxinas se agregan en láminas, arreglos cúbicos y hexagonales invertidos, tales como micelas y vesículas que pueden alcanzar diámetros de hasta 0.1  $\mu\text{m}$  (Figura 1.4). Se propuso que la agregación está gobernada por interacciones no polares o hidrofóbicas entre las cadenas acílicas del lípido A y también por puentes entre los grupos fosfato, generados por cationes divalentes, como  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ .<sup>14</sup> Algunos resultados indicarían que los cationes divalentes agregan densidad en la región del inner core, colapsando el espacio fluido entre bicapas.<sup>15</sup>

Los monómeros deben ser explícitamente creados, a concentraciones por arriba de cierta Concentración Micelar Crítica (CMC), también denominada Concentración Crítica de Agregación (CAC), por el uso de detergentes tales como Tritón X-114, ácidos biliares ó cólicos como el deoxycolato, quelantes como el EDTA y también por sonicado.



**Figura 1.4:** Estructuras de endotoxinas monoméricas y agregados en soluciones acuosas de diferente composición. Los rectángulos blancos y negros representan sitios hidrofílicos y lipofílicos respectivamente. Los círculos negros representan a los grupos fosfato y los blancos a los cationes divalentes, tales como  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ . (Ref 7)

Las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos en general, asumen 2 principales estados ó fases, el gel ( $\beta$ ) y el líquido cristalino ( $\alpha$ ). Una transición entre las distintas fases o estados es acompañada por cambios en la geometría de la molécula involucrada y

por lo tanto tiene también un impacto en la estructura del ensamblado supramolecular.<sup>16</sup> El cambio reversible entre dichas fases puede inducirse con la temperatura. Dicha temperatura, la Temperatura de transición o Temperatura crítica, depende del tipo de “cabeza” hidrofílica (tamaño y carga) y del número, longitud y grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas.

Para el caso de LPS y lípido A, hay factores específicos que deben ser considerados. Estos factores se deben principalmente a la variación en la estructura química primaria, por ejemplo variaciones en la conformación y estado de carga de la “cabeza” hidrofílica, en el patrón de acilación y en la longitud de la cadena de carbohidratos (O-antígeno), aún dentro de la misma preparación, por lo tanto los valores macroscópicos medidos corresponden a un promedio de una mezcla microscópicamente heterogénea; según Shands,<sup>14</sup> “Esto representa el principal impedimento para el estudio de las propiedades fisicoquímicas del LPS”, encontrándose resultados parcialmente contradictorios en la literatura, tanto sobre estructura como sobre el comportamiento de las endotoxinas. Parece razonable asumir que el fuerte comportamiento liotrópico del LPS y lípido A son la principal razón para estas contradicciones. Otra razón pueden ser las técnicas empleadas, en el sentido de que con algunas se obtiene un valor promedio, como por ejemplo con FTIR, mientras que con otras, como ESR (Resonancia de Espín Electrónica), Espectroscopía de Polarización de la Fluorescencia ó Fluorescencia por Transferencia Resonante de Energía (FRET) se obtiene información de una porción en particular, por ejemplo del sitio en donde está unida la sonda en el caso de las técnicas fluorescentes.

Por tal motivo, la mayoría de los estudios fueron realizados sobre LPS Re, Lípido A ó LPS que no contienen el O-antígeno (Ver Figura 1.2 b), de modo de acotar la variabilidad.

Estos resultados no pueden ser extrapolados fácilmente a LPS que contiene la porción antigénica (smooth), dadas sus diferencias estructurales con la parte hidrofóbica del lípido A y del core. Estas diferencias producirán una gran influencia en la estructura supramolecular 3D de la endotoxina. Para más detalles acerca de parámetros fisicoquímicos y estructura tridimensional de LPS y Lípido A pueden consultarse las referencias 15, 17-21.

Si bien, estos estudios no convergen hacia un resultado uniforme, es evidente que las endotoxinas forman agregados como los mencionados en la Figura 1.4, dependiendo de la concentración, temperatura, fuerza iónica o polaridad del medio. En las referencias 8, 22-24 puede encontrarse una estimación de las Concentraciones Críticas de Agregación, como así también, una estimación del peso molecular de los monómeros para LPS provenientes de distintas cepas. Estos valores fueron obtenidos a partir de distintas técnicas como: Espectroscopía de Dispersión de Luz, Espectroscopía de Fluorescencia y Diálisis. En la tabla 1.1 se resumen dichos valores.<sup>22</sup>

Concentración Crítica de Agregación de LPS de distintos serotipos

LPS	MW	[LPS] / $\mu\text{g mL}^{-1}$ (* $\mu\text{M}$ )
<i>E.coli</i> O.128:B5	ND	32
<i>E.coli</i> O.111:B4	10.000	22
<i>E.coli</i> O.55:B5	ND	38
<i>E.coli</i> O.26:B6	ND	14
<i>S. minnesota wt</i>	~ 20.000	11
<i>S. minnesota Re 595</i>	2.500	4*
Lípido A <i>S. minnesota Re 595</i>	2.000	5*
<i>S.abortus equi</i>	5.000-10.000	10
<i>S.typhimurium</i>	7.000-80.000	14
<i>Se.marcescens</i>	ND	25

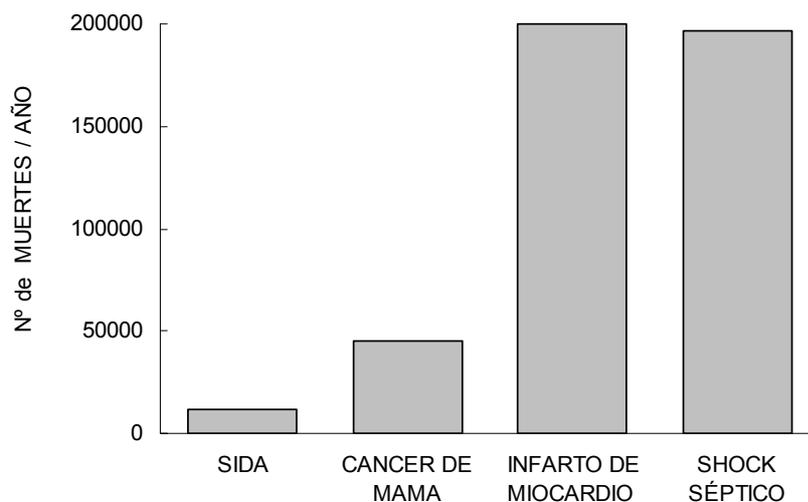
ND: no determinado

**TABLA 1.1:** Estimación de las Concentraciones Críticas Agregación y del peso molecular de los monómeros para LPS provenientes de distintas cepas. (Ref 22)

### 1.1.3 Acción fisiológica de las endotoxinas

Cuando un organismo reconoce a un potencial patógeno como extraño, un eficiente sistema de alerta dispara la respuesta inmune. Este mecanismo es activado para destruir al agente invasor, pero también puede, si es sobreestimulado iniciar una cascada de eventos fisiopatológicos denominado “shock séptico”.<sup>1</sup>

La estadística en la Figura 1.5, muestra que sólo en los Estados Unidos, el número de muertes anuales causadas por este cuadro clínico (aproximadamente 200.000) es comparable a las muertes causadas por infarto de miocardio y mayor que las muertes causadas por el SIDA.<sup>1,25</sup>



**Figura 1.5:** Mortalidad en Estados Unidos de América, estadística realizada por el Centro de Control de enfermedades en 1990, University of Kansas Medical Center.

En relación a este cuadro clínico, los efectos tóxicos de las bacterias Gram-negativas se deben principalmente a las endotoxinas no secretadas, y que por lo tanto pueden encontrarse circulando por el torrente sanguíneo.

La introducción de estos componentes bacterianos a la circulación sanguínea es causada por infecciones, frecuentemente infecciones hospitalarias, debido al excesivo uso de catéteres y otros dispositivos invasivos. Esto ocurre generalmente en pacientes

inmunodeprimidos por quimioterapias, por trasplantes, con enfermedades inflamatorias como así también en pacientes bajo tratamiento por quemaduras severas o traumas.

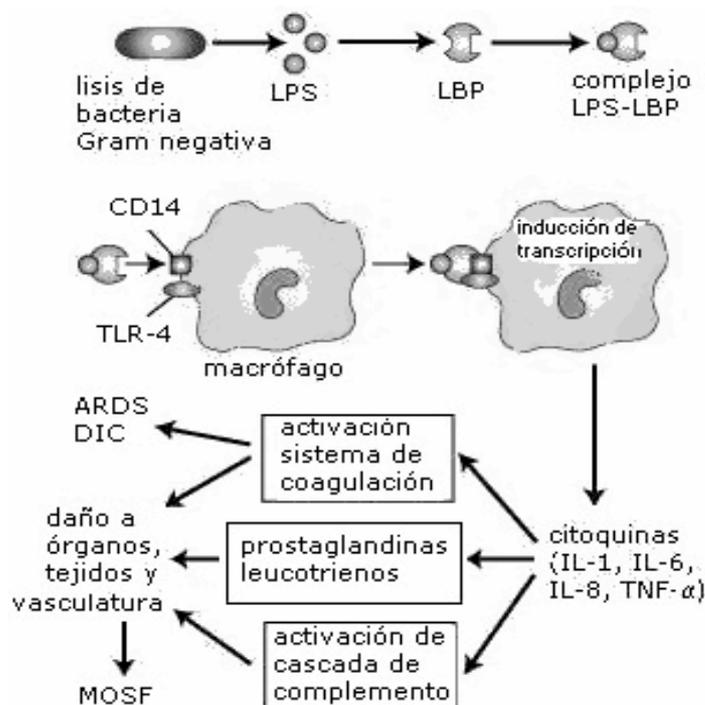
Si bien aún no hay un modelo bien establecido de cómo actúa el LPS en el organismo, algunos de los eventos involucrados en la respuesta inmune han sido claramente identificados.<sup>1,26</sup> Dos líneas de defensa del sistema inmune son activadas ante la presencia de LPS: una línea humoral (comprendida por el complemento, anticuerpos y proteínas de fase aguda) y una línea celular, en particular de células mononucleares (monocitos y macrófagos) y neutrófilos.

La sensible respuesta del sistema inmune al LPS requiere al menos de dos elementos bioquímicos: una proteína que lo reconoce, LPS-binding protein o LBP<sup>6,27-30</sup> y un receptor celular conocido como CD14.<sup>31,32</sup> LBP es producida y secretada por el hígado y se acumula en plasma en concentraciones 100 veces más altas que lo normal cuando LPS gatilla la respuesta inmune. LBP presenta una alta afinidad por LPS, es la encargada de disociar los agregados y transportarlos como complejo LPS-LBP que se une al CD14, anclado en la membrana de células precursoras de la serie blanca. Otro componente de la membrana celular, el TLR2, actúa como co-receptor e inductor de la producción de citoquinas. La activación generalizada de células del sistema inmune en respuesta a LPS resulta en la liberación exagerada de mediadores de la respuesta inflamatoria: citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6), prostaglandinas, interleuquinas y especies oxigenadas reactivas. Estos compuestos inducen vasodilatación y sobrerregulación de moléculas de adhesión, resultando en la liberación exagerada de neutrófilos y monocitos y en la activación de linfocitos, leucocitos y células del endotelio. Las citoquinas son los mediadores primarios de la cascada de eventos que ocurren luego de la endotoxemia. Mediadores secundarios, tales como prostaglandinas y leucotrienos liberados por los neutrófilos y óxido nítrico producido en grandes cantidades por monocitos y macrófagos, juegan también un importante rol debido a su potente acción local sobre la microvasculatura. Algunos vasos sanguíneos se contraen mientras que otros se dilatan resultando en una anormal distribución del flujo sanguíneo. Además de la estimulación de la coagulación por citoquinas, LPS puede interactuar directamente con el sistema de coagulación; puede activar la cascada de complemento y modificar varios pasos del sistema de coagulación. El cuadro clínico resultante es llamado Coagulación Intravascular Diseminada (DIC).

Las citoquinas pueden también activar células de distintos tejidos y órganos (leucocitos, cerebro e hígado), por lo tanto, una producción desmedida de citoquinas induce alteraciones metabólicas, hormonales y neuroendocrinológicas, que sumado a la anormal distribución del flujo sanguíneo, produce la disfunción de las células y la progresiva falla de distintos órganos importantes tales como cerebro, corazón, riñón, hígado y pulmón dando lugar a cuadros clínicos severos como el Síndrome de Falla Multiorgánico (MOSF) y el Síndrome de Distres Respiratorio Agudo (ARDS).

En la Figura 1.6 se representa un modelo lineal y simplificado de la cascada de eventos asociada con el shock séptico. Allí puede verse la secuencia de eventos moleculares, celulares y fisiológicos producida por las endotoxinas. Este modelo fue propuesto a mediados de la década del 90<sup>1,26</sup> y a partir de allí los esfuerzos se hallan abocados al desarrollo de nuevas terapias y drogas que permitan neutralizar los efectos tóxicos del LPS,<sup>25,26,33</sup> como así también que permitan la detoxificación o remoción de las endotoxinas de fluidos que serán incorporados vía intravenosa a pacientes.<sup>7,11</sup>

Se hace evidente entonces, la necesidad de tener un método sencillo y rápido que permita determinar la presencia de endotoxinas en dichos fluidos, previo a su administración.



**Figura 1.6:** Esquema simplificado de la cascada de eventos asociada al shock séptico.

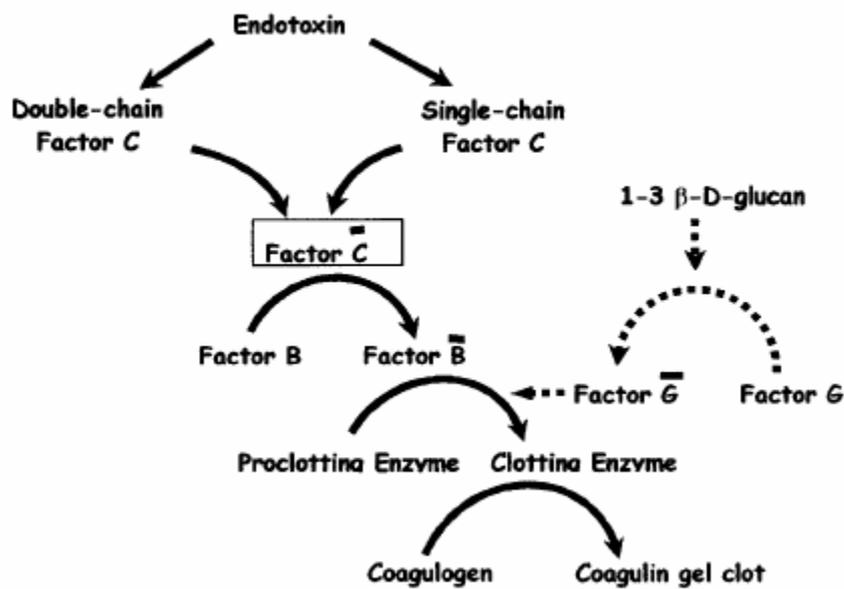
Debido a que igual masa de cualesquiera dos endotoxinas provenientes de distintas bacterias o cepas, o aún de diferentes métodos de extracción, no necesariamente poseen igual potencia en cuanto a su actividad biológica se refiere, fue necesario establecer una endotoxina estándar de referencia cuya potencia sea conocida en relación a sus efectos en humanos. Se define entonces la EU (unidad de endotoxina), establecida como la actividad de una endotoxina específica (EC-2), definida como la quinta parte de la cantidad de endotoxina de *E. coli* (EC-2) requerida para disparar una respuesta pirogénica cuando es inyectada en humanos y conejos, sobre la base de su peso expresado en kg.<sup>34</sup>

Regulaciones gubernamentales imponen límites a las concentraciones de endotoxinas permitidas para drogas inyectables, instrumentales médicos y quirúrgicos, baños de diálisis y alimentos. Por ejemplo, el valor límite establecido por las Farmacopeas Americana y Sueca, para drogas inyectables, es de 0.25 EU mL<sup>-1</sup>,<sup>35a</sup> mientras que el límite recomendado por la AAMI (Association for the Advancement of Medical Instrumentation), para baños de diálisis es de 2 EU mL<sup>-1</sup>.<sup>35b</sup>

#### **1.1.4 Ensayo de endotoxinas bacterianas (LAL Test)**

El método que se usa habitualmente para la detección de endotoxinas en agua es el ensayo LAL (del Lisado de Amebocitos del *Limulus Polyphemus*, comúnmente denominado cangrejo herradura o cacerola). Este método está aprobado por la Federal Drug Administration (FDA) para la determinación de endotoxinas en baños de diálisis, inyectables, sueros y dispositivos médicos.

Este cangrejo ha desarrollado un sistema de defensa contra las endotoxinas.<sup>36,37</sup> Un sistema enzimático, que involucra a los factores de coagulación C y B, presentes en las células de su hemolinfa, se activa en presencia de microorganismos Gram-negativos, produciendo una cascada de reacciones que culmina con la formación del gel (Figura 1.7). Este hecho ha dado origen al método de determinación conocido como de gel en tubo.



**Figura 1.7:** Reacción de coagulación en cascada en el lisado de amebocitos del cangrejo herradura. El Factor C, Factor B, Factor G y la Enzima Coagulable son componentes del reactivo: lisado de amebocitos del cangrejo herradura.

Se han desarrollado otros métodos, basados en el mismo principio: el turbidimétrico que hace uso de los cambios en la dispersión de luz que ocurren durante la formación del gel y el método cromogénico donde se agrega un sustrato peptídico cromogénico incoloro que reacciona con el coagulogeno, o enzima coagulable, liberada durante la cascada de coagulación del lisado de amebocitos del cangrejo herradura, cuando ésta ha sido activada con LPS presente en la muestra. El sustrato cromogénico, en su reacción con el coagulogeno libera p-nitroanilina de color amarillo, pudiéndose medir su absorbancia a 405 nm. Estos últimos métodos permiten estimaciones cuantitativas, mientras que el método de gel en tubo se emplea como ensayo límite o semicuantitativo.

El método tiene una importante variabilidad, requiere ensayos de confirmación de sensibilidad del lisado y de inhibición o intensificación. Muchas sustancias interfieren con la cascada de coagulación, causando falsos negativos o positivos. Tales interferencias son generalmente dependientes de la concentración y por lo tanto pueden ser evitadas por dilución de la muestra, sin embargo, esto causa una pérdida de sensibilidad. Por otra parte es costoso, no solo por el requerimiento de personal altamente entrenado para la realización del ensayo, sino también debido a los pasos que

se requieren para la preparación del reactivo, que involucra desde la captura del cangrejo hasta la purificación del lisado. Dado su carácter biológico, pueden encontrarse importantes fluctuaciones en la sensibilidad del mismo de lote a lote.

La ventaja del método es su sensibilidad y su límite de detección. Si bien el límite de detección depende del método y del instrumental utilizados, los proveedores aseguran que valores tan bajos como 0.03, 0.005 y 0.001 EU mL<sup>-1</sup> pueden detectarse con el método de gel en tubo, el cromogénico y el turbidimétrico, respectivamente. Sin embargo, para los dos últimos métodos, concentraciones no inferiores a 0.01 EU mL<sup>-1</sup> son las recomendadas en los protocolos para la construcción de la curva de calibración. (EU= unidad de endotoxina. Se estima que 1 EU equivale, dependiendo de la bacteria y del método de purificación, a aproximadamente a 1ng).

Dada su variabilidad, la FDA recomienda ante resultados dudosos, la realización del ensayo en conejos, que consiste de la administración en sangre de cierta cantidad de endotoxinas, dependiendo del peso del conejo, y el posterior seguimiento de la temperatura rectal.

Desarrollos en éste área han sido reportados en los últimos años. Un ensayo para la detección y cuantificación de endotoxinas basado en la técnica de polarización de la fluorescencia, fue recientemente presentado.<sup>38</sup> En dicho ensayo, una proteína que reconoce específicamente al LPS, endotoxin neutralizing protein (ENP), es marcada con un fluoróforo y la detección se lleva a cabo por registrar los cambios que ocurren en la polarización de la fluorescencia del fluoróforo covalentemente unido a ENP, cuando éste último se une a LPS. Este método es altamente dependiente de la temperatura y de la viscosidad del medio, además de no ser tan sensible como otras técnicas fluorescentes. Por otro lado, la técnica, no permite la construcción de un sensor donde la proteína se encuentre inmovilizada, puesto que bajo inmovilización, se pierde la difusión rotacional de la molécula, que es el cambio fisicoquímico registrado.

Por otra parte, Taylor et al<sup>39</sup> reportaron la utilización de un sensor óptico, basado en la técnica de SPR (Resonancia de Plasmones Superficiales), para la detección de pirógenos en agua ultrapura. Para ello inmovilizaron sobre la superficie, anticuerpos con afinidad para LPS. El uso de los anticuerpos anti-LPS es limitado debido a que ellos son capaces de reconocer la porción o-antigénica de LPS, la cual es extremadamente variable y serológicamente distinta aún para las distintas cepas de la misma especie de

organismos Gram-negativos. Otra alternativa fue presentada por Rangún y Basu<sup>40</sup> donde LPS es detectado empleando sensores de polidiacetileno, basado en el principio de la lengua electrónica. Estos autores, utilizando liposomas de diacetileno, reportaron la generación de un set de huellas digitales únicas para reconocer LPSs provenientes de distintas cepas, permitiendo su detección en concentraciones en el orden del mg mL<sup>-1</sup>.

### **1.1.5 Agentes anti-endotoxina**

Como se mencionó en la sección 1.1.3, los avances alcanzados en la elucidación del mecanismo de acción del LPS en el organismo de mamíferos ofrecen nuevas posibilidades tanto terapéuticas como preventivas, en el sentido de orientar los esfuerzos hacia el descubrimiento de agentes que permitan reconocerlo, unirse a él y neutralizar sus efectos tóxicos. El alcance es amplio: no solo se orienta hacia el ámbito clínico o farmacológico sino que también hacia el biotecnológico, buscándose resolver la problemática de detoxificación o remoción de endotoxinas en procesos tales como la producción de proteínas, anticuerpos y drogas en general. Una posibilidad adicional debe considerarse y es la del desarrollo de nuevos métodos que permitan la detección de bajas concentraciones de las mismas.

En el marco del diseño de nuevas estrategias preventivas y terapéuticas se incluye entre otras, el desarrollo o descubrimiento de: 1) Anticuerpos antiendotoxinas,<sup>25,33,41</sup> 2) Macromoléculas que reconocen LPS y fragmentos derivados de ellas. Generalmente estas macromoléculas son proteínas endógenas extracelulares, pertenecientes a vertebrados y otros organismos multicelulares, involucradas en el reconocimiento de las endotoxinas por el sistema inmune. 3) Moléculas pequeñas que actúan como agentes secuestrantes de LPS, que pueden dividirse en: péptidos endógenos y péptidos diseñados o polipéptidos. Dentro de los péptidos endógenos podemos destacar a la Polimixina B,<sup>1,7,25,42-47</sup> un péptido cíclico de origen microbiano considerado como el “estándar de oro”, rutinariamente utilizado para verificar si un determinado efecto biológico es debido a la presencia de LPS y como base para el diseño de nuevos péptidos antimicrobianos.

### 1.1.5.1 Anticuerpos anti-endotoxina

Anticuerpos poli y monoclonales anti-O-polisacárido (anti-LPS) mostraron ser altamente protectores en modelos experimentales donde animales fueron expuestos a bacterias homólogas.<sup>33</sup> Sin embargo, ellos mostraron ser específicos para esa bacteria y serotipo,<sup>7,25</sup> puesto que como se mencionó anteriormente, la porción polisacárida es extremadamente variable y serológicamente distinta para cada cepa de la misma especie de organismo Gram-negativo. Este motivo fue suficiente para que ellos no tuvieran una extensa aplicación.

Debido a que el Lípido A es un elemento estructural común a todas las endotoxinas y representa su centro endotóxicamente activo, este segmento del LPS fue considerado el objetivo ideal para la generación de anticuerpos que puedan reaccionar con muchos LPS serológicamente distintos. Estos anticuerpos anti-lípido A reaccionaron con una extensa variedad de lípidos A provenientes de bacterias de distinto origen, pero mostraron muy baja afinidad con LPS, o sea con lípido A conteniendo la porción polisacárida. ( $K_{\text{binding}} < 10^4 \text{ M}^{-1}$ ),<sup>25,41</sup> además de unirse inespecíficamente a un amplio rango de ligandos hidrofóbicos como por ejemplo a lipoproteínas.<sup>1,7</sup>

Otras estrategias inmunoterapéuticas incluyen el bloqueo de la unión del LPS al CD14 con anticuerpos anti-CD14 o anti-LBP.<sup>25</sup>

### 1.1.5.2 Macromoléculas y péptidos derivados

En los últimos 15 años se ha hecho hincapié en la identificación y caracterización de proteínas endógenas que se unen a LPS, producidas por varias células y tejidos de organismos multicelulares. Tal es el caso de LBP, mencionada anteriormente, de BPI<sup>1,48-49</sup> (Bactericidal/Permeability-Increasing Protein) y de CAP18<sup>50</sup> (Cationic Antimicrobial Protein 18), las tres proteínas solubles extracelulares encontradas en mamíferos. En artrópodos, las más extensamente estudiadas son: el LALF (Factor Limulus Anti-LPS) también llamado ENP (Endotoxin Neutralizing Protein)<sup>51,52</sup> y el Factor C, una serina proteasa receptora de LPS que está presente en la hemolinfa del cangrejo herradura y que constituye la base del ensayo LAL.<sup>53</sup> Algunos fragmentos de las proteínas mencionadas anteriormente han sido identificados; ellos han mostrado, en menor o mayor grado mantener su habilidad de unión al LPS.

#### **1.1.5.2.1 LBP**

LBP es una proteína del suero que se une al LPS y lo presenta como monómero a receptores celulares. Aumenta la actividad de LPS por dispersar los agregados y extraer el monómero, el cual es presentado al CD14, como se mostró en la Figura 1.6 BPI, en cambio, aumenta el tamaño del agregado y previene su interacción con otras moléculas, efectivamente neutralizándolo.<sup>30</sup>

#### **1.1.5.2.2 BPI**

BPI está localizada en los granulocitos de los neutrófilos y es una proteína catiónica de aproximadamente 55 kDa. Una propiedad notable de esta proteína es su selectiva citotoxicidad para bacterias Gram-negativas. Su acción comprende ciertas fases distinguibles. La unión de BPI dispara alteraciones inmediatas en la membrana externa bacterial, incrementa la permeabilidad de antibióticos como actinomycin D e inhibe el crecimiento de microbios susceptibles. Las características moleculares determinantes de su actividad específica y potente están presentes dentro del fragmento N-terminal de unos 25 kDa, la porción de la proteína comprendida entre los residuos 1-199. Esta porción aislada de BPI es un potente neutralizador de endotoxinas con indicación terapéutica en sepsis por meningococos. La potencia de neutralización de este fragmento, así como la de la proteína completa es similar para LPS smooth (que posee una larga cadena polisacárida u O- antígeno) y LPS de distintos mutantes (que no poseen el O-antígeno). Este fragmento N-terminal exhibe dos características estructurales: a) Un muy alto contenido de residuos básicos está concentrados en esta región (La carga neta es +17), b) Hidrofobicidad. La primera posibilita una fuerte atracción electrostática con los sitios aniónicos en la región del lípido A y core del LPS y la última facilita la interacción hidrofóbica con la región del lípido A.<sup>48-49</sup>

#### **1.1.5.2.3 CAP 18**

Es una proteína aislada originalmente de granulocitos de conejo y recientemente identificada en humanos. Está formada por 142 residuos y tiene un peso molecular aproximado de 18 kDa. La proteína está compuesta por dos dominios: una porción N-terminal cuya función no se conoce y un fragmento C-terminal (CAP 18<sub>106-142</sub>) que

presenta propiedades de unión a LPS. Este fragmento presenta también actividad bactericida contra bacterias Gram negativas y Gram positivas. Un fragmento, CAP 18<sub>106-137</sub>, fue también identificado y probó tener potente actividad anti-microbiana.<sup>50</sup>

#### **1.1.5.2.4 LALF ó ENP**

En 1982, fue identificado en los amebocitos de la hemolinfa del *Limulus*, un anticoagulante que inhibe la cascada de coagulación mediada por LPS. Debido a este efecto, se lo llamó Factor *Limulus* Anti-LPS (LALF). Resultados experimentales in vivo e in vitro indican que LALF se une y neutraliza LPS de numerosas y diferentes cepas de bacterias Gram-negativas.<sup>51</sup>

Este factor fue aislado y caracterizado. Es una proteína básica y pequeña que consta de una única cadena polipeptídica de 101 amino ácidos, con un peso molecular de aproximadamente 12 kDa.

Presumiblemente, la porción con forma de cuña anfifílica de su estructura, se une al LPS. Péptidos lineales de esta región se unen mas débilmente, pero si los péptidos que comprenden los residuos de la región central de la proteína (del 31 al 52) forman un ciclo por un enlace disulfuro, su habilidad de neutralización del LPS, aunque menor, alcanza a ser comparable a la de la proteína completa. La conformación de este lazo en el LALF se superpone bien con la de los fragmentos activos del LBP y BPI, con patrones similares de residuos básicos e hidrofóbicos.<sup>52</sup> Hoy puede obtenerse en su versión recombinante (rLALF).

#### **1.1.5.2.4 Factor C**

El Factor C, que activa la cascada de coagulación del lisado de amebocitos del *Limulus*, puede existir como cadena simple con una masa molecular estimada de 123 kDa o como doble cadena. Contiene una serie de dominios estructurales, 3 de los cuales, localizados en la porción N-terminal, exhiben una alta afinidad por el LPS. Estos dominios son llamados Sushi 1, Sushi 2 y Sushi 3. Se unen al LPS cooperativamente, con constantes de disociación del orden de  $10^{-12}$  M. y mostraron ser menos citotóxicos que Polimixina B. Los múltiples sitios de unión en estos dominios Sushi han sido subclonados y expresados. Cuatro péptidos derivados del Sushi 1 y Sushi 3 (S1, S3, S1d,

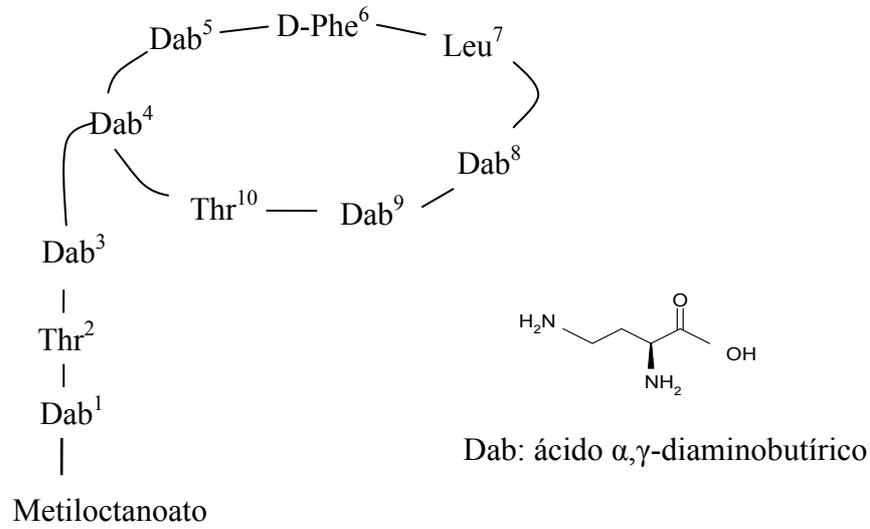
S3d) exhibieron capacidad para neutralizar los efectos tóxicos de LPS, con constantes de disociación del orden de  $10^{-6} - 10^{-7}$  M y baja citotoxicidad.<sup>53</sup>

### **1.1.5.3 Moléculas pequeñas secuestrantes de LPS**

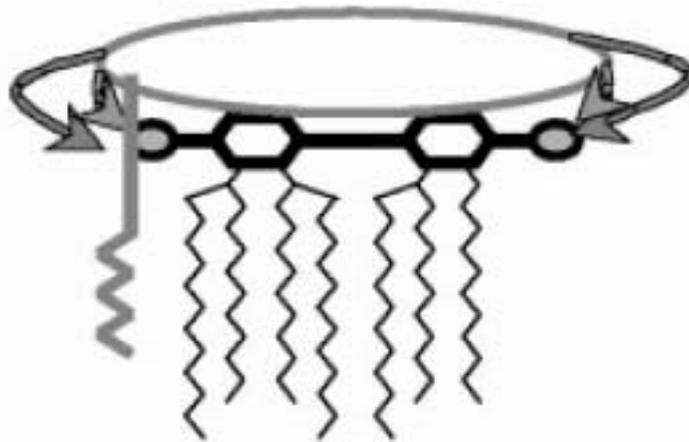
#### **1.1.5.3.1 Polimixina B.**

Dentro de los péptidos endógenos el más estudiado es Polimixina B (PMB), un antibiótico deca péptido cíclico aislado del *Bacillus polymyxa*, que estructuralmente es un anfifilo catiónico, como puede verse en el esquema de la Figura 1.8. Otra característica notable es que entre sus aminoácidos contiene  $\alpha,\gamma$ -ácido diaminobutírico (Dab), el cual no es un aminoácido esencial. PMB se une al lípido A y neutraliza su toxicidad *in vitro* y en modelos de endotoxemia en animales.<sup>42-47</sup> Si bien aparece en la Farmacopea Americana como antibiótico, se reconoce que es demasiado tóxico para uso parenteral. No obstante ello, PMB es ampliamente utilizado en la industria biotecnológica como ligando en columnas de afinidad<sup>7,11</sup> y a partir del 2000, se comercializa para uso clínico en cartuchos de hemoperfusión extracorporal, covalentemente inmovilizada via sus grupos  $\text{NH}_2$  a fibras de poliestireno. (“Toraymyxin”, Toray Industries Inc., Tokio).

La estructura de Polimixina B ha sido determinada en su forma libre y unida a Lípido A.<sup>45</sup> En el complejo Lípido A – PMB (Figura 1.9) los grupos carbonilo forman una superficie polar sobre una cara de la porción cíclica del péptido, la cual se encuentra sobre el backbone glicosídico hidrofílico del lípido A, y la parte lineal conteniendo la cadena hidrocarbonada del péptido, se ubica paralela a las cadenas acílicas del Lípido A, lo cual constituye la base de la interacción hidrofóbica entre el péptido y el LPS. Los grupos  $\gamma\text{-NH}_2$  de los residuos Dab apareados ( $\text{Dab}^3/\text{Dab}^4$  y  $\text{Dab}^7/\text{Dab}^8$ ) forman una unión iónica bidentada con los grupos fosfato del Lípido A.



**Figura 1.8:** Esquema de Polimixina B (PMB). La cadena de metiloctanoato unida a Dab<sup>1</sup> está orientada normal al plano de PMB.



**Figura 1.9:** Esquema del complejo Lipido A –PMB, (Lipido A en negro y PMB en gris) mostrando la porción hidrocarbonada de PMB ubicada paralela a la porción lipídica del lípido A, la porción anular de PMB sobrepuesta a la porción glicosídica de Lipido A y la formación de los puentes iónicos entre los pares de residuos Dab en PMB y fosfatos en el Lipido A.

Las propiedades de unión y neutralización del LPS no están limitadas a PMB. Las características estructurales de Polimixina B han permitido investigar cuáles son los mínimos y óptimos requerimientos necesarios para la unión a la porción del lípido A de LPS. A partir de estas investigaciones, una serie de péptidos que cumplen con esos requerimientos han sido sintetizados y evaluados en cuanto a su habilidad de unión y neutralización de LPS, como así también de su actividad antimicrobiana.

#### **1.1.5.3.2 Otros.**

La naturaleza anfifílica y aniónica del Lípido A le permite interactuar con una amplia variedad de compuestos policatiónicos hidrofóbicos de diversos tipos estructurales. Algunos péptidos antimicrobianos lineales,  $\alpha$  helicoidales [mellitin, efrapentin], como también cíclicos, hoja plegada  $\beta$  [gramicidin S, tyrocidin A] se unen al LPS atenuando la endotoxicidad en ensayos biológicos.<sup>25, 53</sup>

Copolímeros al azar de aminoácidos básicos e hidrofóbicos tales como poli (Lys, Trp), poli (Arg, Trp), poli (Orn, Leu) también mostraron propiedades de unión al LPS, pero con notable menor afinidad.

Por otra parte, algunos polímeros catiónicos fueron exitosamente empleados como ligandos selectivos en columnas cromatográficas y membranas de microfiltración para la remoción extracorporal de endotoxinas. Tal es el caso de PEI (polietilenimina), PLL (poli-L-lisina) y PLH (poli-L-histidina) inmovilizados dentro de polímeros hidrofílicos.<sup>7</sup> El principio de la interacción policatión- endotoxina es posiblemente el mismo que ocurre para la floculación de células o restos celulares. Inicialmente se forma un complejo policatión-polianión, luego se sustituyen las moléculas de agua y se forma finalmente el flóculo. Sobre la base que este proceso ocurre también entre los policationes inmovilizados y las endotoxinas, se puede facilitar la remoción continua de las endotoxinas de la solución, a través de la formación de éstos complejos. Cabe aclarar que éste proceso es altamente dependiente del pH y fuerza iónica.

En base a los resultados examinados, surge la hipótesis de que tanto la basicidad como la hidrofobicidad son atributos necesarios y suficientes para conferir a una molécula propiedades anti-endotóxicas. Parece ser importante que ambas regiones, la catiónica y la hidrofóbica, estén marcadamente separadas, pero una estructura secundaria

o un carácter conformacional no parecen ser críticos. Sin embargo la existencia de cierta estructura secundaria podría colaborar en el fortalecimiento de la unión a LPS, como ocurre en el caso de péptidos cíclicos, respecto a péptidos lineales.

### 1.1.6 Mecanismo de reconocimiento de LPS por ENP

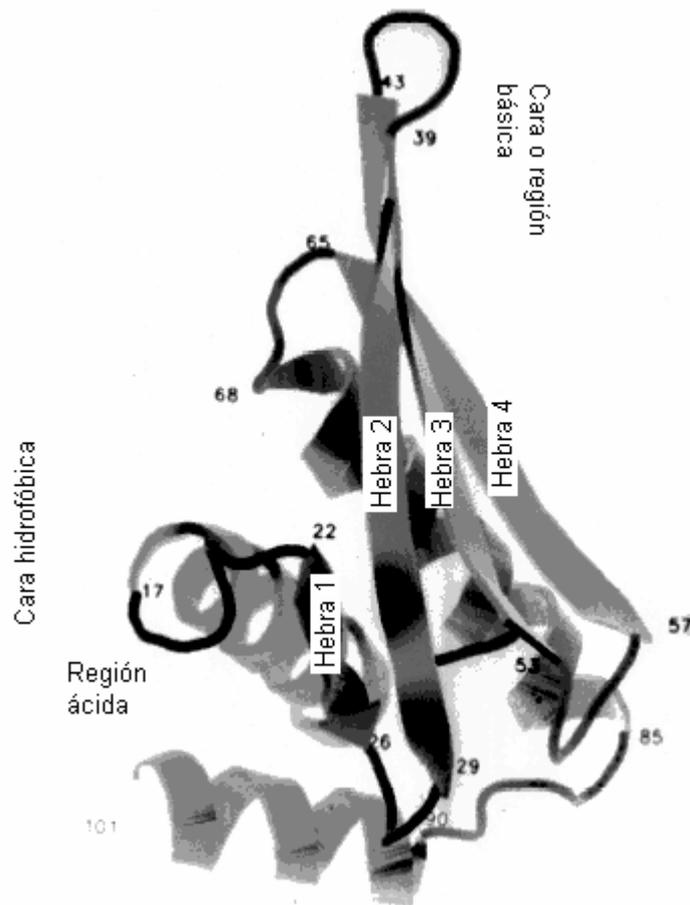
Como fue anteriormente mencionado, el factor limulus anti-LPS (LALF), también denominado ENP, es una proteína formada por 101 aminoácidos, de punto isoeléctrico 10.2 que se une y neutraliza a LPS. Ella exhibe un único dominio que consiste de 3  $\alpha$ -hélices empaquetadas frente a una hoja plegada  $\beta$  formada por 4 hebras. Las hebras 2 y 3 de la hoja plegada recorren el largo de la proteína formando un lazo anfifílico en forma de cuña. Estas hebras son conectadas por un puente disulfuro que cierra el ciclo (entre las cisteínas 31 y 52).<sup>52,54</sup> Se propone que este lazo involucra el sitio de unión al LPS.

La secuencia de aminoácidos para el LALF fue dilucidada y usada como base para la síntesis del gen clonado en *E. coli* y luego expresado como su forma recombinante (rENP o rLALF) en *Saccharomyces* y *Pichia pastoris* obteniéndose una proteína de 12.2 kDa con un punto isoeléctrico de 8.5 que neutraliza la actividad biológica de LPS. Esta proteína contiene 105 aminoácidos, puesto que adiciona, respecto de la proteína natural, la secuencia de aminoácidos Glu-Ala-Glu-Ala a su porción N-terminal.<sup>55</sup>

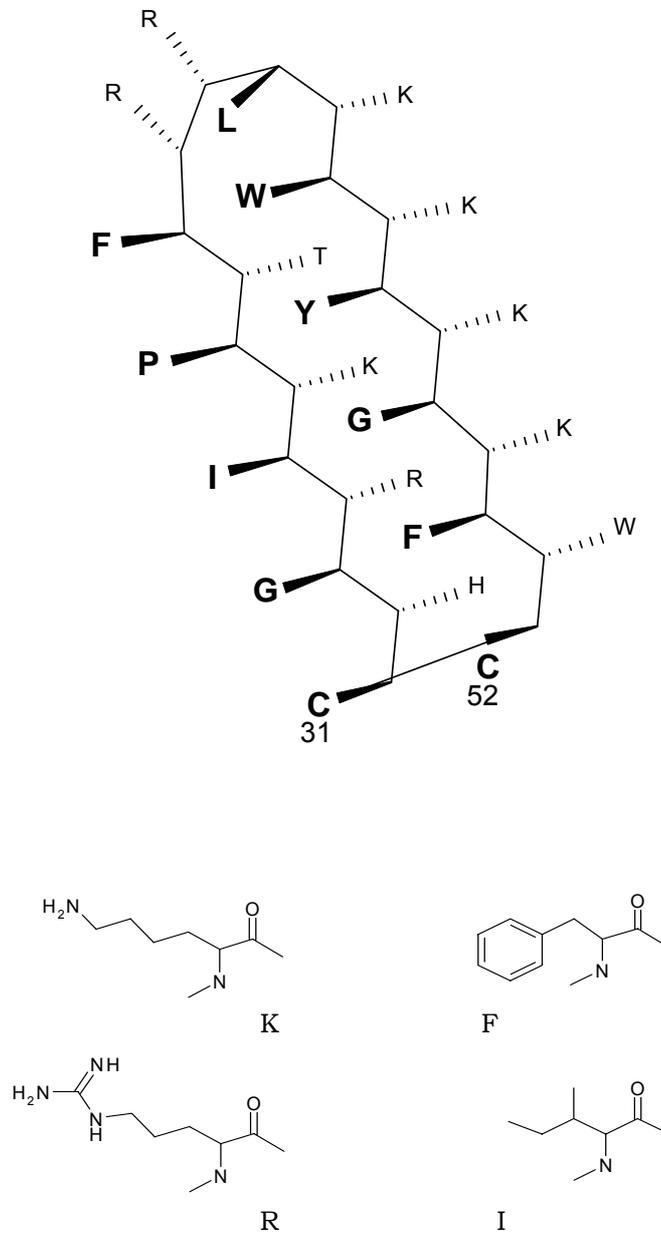
Estudios cristalográficos de rENP<sup>54</sup> revelaron que la molécula presenta forma de cuña, de aproximadamente 4 nm de largo y 2.8 nm de ancho en su base. La distribución de carga en la superficie es bipartita: En la Figura 1.10 A, donde con cintas se representa esquemáticamente la proteína, la región inferior a la izquierda contiene los 6 grupos ácidos y ningún grupo básico, mientras que la región superior a la derecha contiene solo grupos básicos. Por lo tanto, a pH neutro, la molécula actúa como un dipolo. La estructura del lazo formado por las hebras 2 y 3 de la hoja plegada  $\beta$  se representa esquemáticamente en la Figura 1.10 B. Para entender el efecto de este lazo en el reconocimiento y neutralización de lípido A puede considerarse que la cadena de aminoácidos que forma el lazo se encuentra contenida en el plano del papel, mientras que

los residuos apuntan perpendicularmente hacia fuera y dentro del plano. Los residuos K y R, cargados positivos, apuntan hacia el mismo lado, favoreciendo el acercamiento de LPS por fuerzas electrostáticas entre sus fosfatos y estos aminos.

Por otro lado, residuos como F e I (hidrofóbicos) quedan orientados fuera de dicho plano y contenidos en el interior de la proteína, postulándose que son los responsables de estabilizar el complejo por fuerzas de Van der Waals con las cadenas acílicas del LPS.



**Figura 1.10 A:** Representación esquemática de rENP. Las hélices se muestran como tirabuzones y las hebras se encuentran señaladas en el gráfico.



**Figura 1.10 B:** Vista esquemática del lazo de rENP. Las uniones sólidas indican los aminoácidos ubicados apuntando fuera del plano del diagrama y las uniones punteadas indican los aminoácidos ubicados dentro del plano. Abajo se muestran las fórmulas desarrolladas para los residuos K y R catiónicos y F e I hidrofóbicos.

## **1.2 Ensayos de Reconocimiento**

La interacción específica entre dos moléculas que desencadena un proceso determinado se la denomina *reconocimiento molecular*. El reconocimiento implica una complementariedad geométrica y de interacciones entre las partes involucradas. Esta idea es resumida por Emil Fischer con su aproximación “llave – cerradura” para describir las interacciones bioquímicas.<sup>56</sup>

Los biosensores hacen uso del mencionado reconocimiento molecular y pueden ser encuadrados dentro de la familia de los sensores moleculares. Consisten de una interfaz selectiva al analito, integrada con un transductor. Esta superficie específica al analito emplea biomoléculas o sitios de bioreconocimiento. Este elemento de bioreconocimiento es una proteína, macromolécula o complejo con sitios internos o superficiales, esenciales para el reconocimiento molecular del analito, inmovilizado en un soporte, que constituye el transductor. Englobados en el grupo de los biosensores, podemos diferenciar los denominados inmunosensores, que se caracterizan por presentar un anticuerpo como elemento biológico de reconocimiento. En la práctica, gran parte de los inmunosensores desarrollados no dan una respuesta directa ante la presencia del analito; precisan de una señal secundaria producida por un marcador radioactivo, un compuesto fluorescente o electroactivo, una enzima, que se encuentra unida covalentemente al analito o a un segundo anticuerpo, según sea el ensayo. En este último caso, en presencia del sustrato de la enzima se inicia un proceso que finaliza en la generación de una señal eléctrica procesable. Basados en el tipo de transductor se puede diseñar un ensayo óptico, electroquímico o radioactivo.

Los inmunoensayos son los ensayos de reconocimiento más ampliamente desarrollados y difundidos.

### 1.2.1 Inmunoensayos

Los inmunoensayos no son otra cosa que procedimientos de análisis basados en la reacción de un analito con anticuerpos que lo reconocen específicamente. Las principales características que se le atribuyen a este tipo de ensayos son su sensibilidad, selectividad, sencillez, rapidez y bajo costo. Estas características hicieron que los inmunoensayos se conviertan en una de las contribuciones tecnológicas más productivas a la medicina y la investigación en ciencias de la salud.

La amplia difusión de este tipo de ensayos se debe principalmente a las siguientes propiedades de los anticuerpos:

- su habilidad de unirse a una variedad extremadamente amplia de sustancias químicas, biomoléculas, células y virus.

- especificidad excepcional hacia la sustancia a la cual el anticuerpo se une. Esta gran especificidad permite la detección de bajas concentraciones de analito en presencia de otras sustancias relacionadas.

- la fuerza de unión entre el anticuerpo y el antígeno. Esta unión prevalece aún luego de las etapas de lavado, generación de la señal y procesamiento.

La fuerza de unión primaria que opera entre el anticuerpo y el antígeno es iónica (interacción de largo alcance), operando sobre distancias del orden de los 10 nm. Luego la exclusión del agua de hidratación permite la formación de enlaces hidrógeno y a una distancia de 0.5-0.15 nm, las fuerzas de Van der Waals (interacción de corto alcance) entre dipolos sobre átomos adyacentes se vuelven más importantes y fortalecen la unión. La fuerza de unión entre las dos especies puede ser descrita por su constante de equilibrio,  $K_{eq}$ . Valores de  $K_{eq}$  típicamente se encuentran en el rango de  $10^6 - 10^{12} M^{-1}$ .

El primer inmunoensayo fue descrito por Rosalyn Yalow y Solomon Berson en 1959 para el ensayo de insulina en suero humano,<sup>57</sup> desde ese entonces a la fecha, hubo un crecimiento exponencial, no solo en el rango de aplicaciones sino también en el número de nuevos e ingeniosos diseños aplicados.

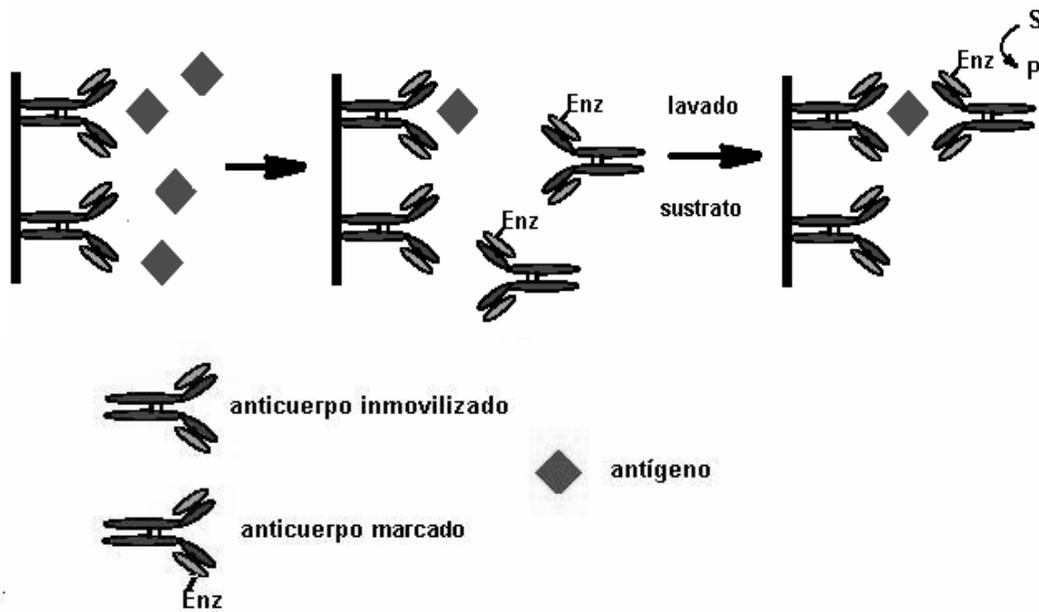
Dada la amplitud del concepto, el número de configuraciones que puede adoptar un inmunoensayo es ciertamente enorme, incluso una vez elegido el tipo de

inmunoensayo es posible elegir entre varios formatos, cada uno de los cuales con sus propias características de rapidez, sencillez y sensibilidad.

Queda fuera del alcance de esta introducción hacer una descripción detallada de los diferentes tipos de inmunoensayos, sin embargo se hará una breve descripción de los más comunes.

#### **1.2.1.1. Ensayo inmunométrico o tipo sándwich.**

El inmunoensayo más simple de entender es el diseño inmunométrico. Un anticuerpo inmovilizado sobre una superficie, captura al analito a determinar presente en la muestra, y un segundo anticuerpo es usado como base del sistema de generación de la señal. Este anticuerpo está marcado, por ejemplo, con un isótopo radioactivo. Después de la incubación para permitir que los anticuerpos se unan al analito, se lleva a cabo una etapa de lavado para eliminar el anticuerpo marcado no unido. El paso final del ensayo involucra el revelado del anticuerpo marcado, en este ejemplo, midiendo radioactividad. La señal en este tipo de ensayo es claramente proporcional a la concentración de analito en la muestra. Al componente marcado en el inmunoensayo se lo denomina marcador, al analito se lo llama antígeno y la eficiente remoción del marcador no unido, que es la etapa crítica del ensayo, se conoce como separación o lavado. Por último, el material al que el anticuerpo es irreversiblemente unido es denominado fase sólida. Debido a que los anticuerpos forman un sandwich alrededor del analito estos inmunoensayos son llamados comúnmente ensayos tipo sándwich. (Figura 1.11)



**Figura 1.11:** Esquema del ensayo tipo sándwich. El antígeno se encuentra unido simultáneamente a dos anticuerpos, uno inmovilizado sobre el soporte y el otro proveniente de la solución que contiene el marcador.

El ensayo puede utilizar como marcador, en lugar de un isótopo radioactivo, una enzima unida covalentemente al segundo anticuerpo. Este formato de ensayo se llama **ELISA** (enzyme-linked immunosorbent assay), lo cual implica que la señal obtenida ha de estar necesariamente generada por la acción de una enzima acoplada a una de las especies participantes de la reacción inmunoquímica, así como también que una de las citadas especies ha de estar inmovilizada en un soporte. Las enzimas empleadas en inmunoensayos deben cumplir una serie de criterios, entre los cuales cabe destacar:

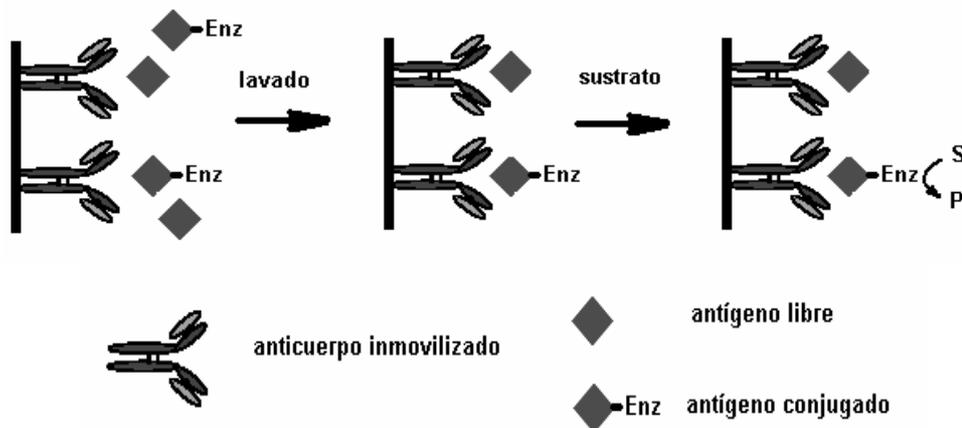
- Poseer una elevada actividad específica.
- Ser compatible con un amplio rango de medios de reacción y condiciones del ensayo (pH, fuerza iónica, etc.).
- Ser fácilmente conjugable.
- Poseer una baja unión inespecífica al anticuerpo y a la fase sólida.

Aunque un gran número de enzimas cumplen en mayor o menor medida estos requisitos y en consecuencia han sido utilizadas en inmunoensayos, la peroxidasa de rábano picante (HRP) y la fosfatasa alcalina, son las más comunes.

### 1.2.1.2. Ensayo competitivo

En el ensayo inmunométrico, el analito tiene que ser suficientemente grande como para poder unirse simultáneamente a 2 anticuerpos, además tiene que contener 2 sitios de reconocimiento distintos, lo cual no es siempre posible.

Surge entonces un nuevo formato, llamado **inmunoensayo competitivo** (Figura 1.12). En este nuevo formato, un único anticuerpo es utilizado y está presente en cantidad limitada. El marcador en este caso no es un segundo anticuerpo sino el analito marcado con un radioisótopo, un compuesto fluorescente o una enzima al que se denomina, **conjugado**. El conjugado, que es el que produce el proceso medible, debe conservar la capacidad de interacción con la biomolécula de reconocimiento.



**Figura 1.12:** Esquema del ensayo competitivo. El antígeno libre y el conjugado compiten por los sitios de los anticuerpos inmobilizados.

Los ensayos competitivos están ampliamente desarrollados en la bibliografía como un tipo especial de inmunoensayos.<sup>58</sup>

En este ensayo, el anticuerpo inmovilizado se pone en contacto simultáneamente con el conjugado y el analito, los cuales van a competir por los sitios de unión de los anticuerpos. Luego de una etapa de lavado, se mide la señal generada por el conjugado. Para altas concentraciones de analito se logra unir poco conjugado y la señal es muy baja, mientras que para muy bajas concentraciones de analito, una gran cantidad de conjugado está unido y la señal es máxima. La cantidad de conjugado que se une al anticuerpo inmovilizado, y por ende la señal, es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra.

Inmunoensayos competitivos han sido descritos para fenitoína, fenobarbital, digoxin, carbamazepina y tiroxina.<sup>60</sup>

### **1.2.2 Ensayos de reconocimiento no inmunológicos**

En los inmunoensayos, la característica fundamental es la bioafinidad, esto es, la unión del analito con el ligando, sin importar la naturaleza del ligando. Esto hace posible el reemplazo de los anticuerpos hasta ahora utilizados, por otras moléculas con alta afinidad por el analito. En la bibliografía pueden encontrarse ensayos que, basados en los mismos principios que el inmunoensayo, son completamente no inmunológicos.

En algunos casos, estos ensayos surgen debido a la necesidad de test multiespecies, que no pueden llevarse a cabo con anticuerpos debido a la ausencia de sitios antigénicos comunes para distintas especies no relacionadas, y por lo tanto emplean receptores específicos no inmunológicos. Ellos son denominados ELSA (enzyme-linked sorbent assay) cuando, como en el caso del ELISA, la señal obtenida ha sido generada por la acción de una enzima acoplada a una de las especies participantes del ensayo, y una de las especies intervinientes está inmovilizada en un soporte. Deegan et al<sup>61</sup> proponen un ensayo competitivo para la detección y cuantificación de CRP (Proteína C reactiva), una proteína de fase aguda cuyo nivel en plasma aumenta dramáticamente en respuesta a la inflamación o daño en los tejidos y disminuye rápidamente luego del tratamiento o recuperación. El ensayo está basado en la afinidad de CRP por fosfocolina.

Otro ejemplo interesante lo constituye un ensayo para la determinación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, basado en la unión específica de residuos  $\beta$ -lactámicos a proteínas receptoras específicas ( $\beta$ -lactam binding proteins), aisladas de la pared celular bacteriana.<sup>62</sup>

Ensayos de competencia son también oportunamente utilizados en estudio de receptores, por ejemplo en el diseño y desarrollo de nuevas drogas, a partir del surgimiento de una nueva e interesante propuesta, llamada química combinatoria. A través de ella cientos de productos pueden ser formados y ellos deben ser evaluados en cuanto a su afinidad con el receptor. El ensayo competitivo es el método más común de evaluación utilizado para tal fin.<sup>63,64,65</sup>

Por último, no se puede dejar de citar a los oligonucleótidos con afinidad por una molécula en particular, también llamados aptámeros, que emergen como una clase de moléculas muy prometedoras tendientes a reemplazar en el futuro a los anticuerpos, tanto en técnicas separativas como de diagnóstico. Los aptámeros son oligonucleótidos (ADN ó ARN) que pueden unirse con alta afinidad y especificidad a un extenso número de moléculas, tales como drogas, proteínas u otras moléculas orgánicas e inorgánicas.<sup>66,67</sup> Las constantes de afinidad se encuentran típicamente en el rango del micromolar a subpicomolar, comparable a la unión antígeno-anticuerpo. Un antecedente que demuestra que es posible utilizar ácidos nucleicos en reemplazo de anticuerpos, es el trabajo de M. Lee et al.<sup>68</sup> En este trabajo, se desarrolla un ensayo, que por medio de la unión con un aptámero de ADN, es capaz de determinar la concentración de trombina en plasma humano. El sistema de funcionamiento se basa en un ensayo de competencia entre la trombina natural y trombina marcada con fluoresceína (F-trombina). Trabajos más recientes, que utilizan un aptámero para darle especificidad a sensores, utilizando impedancia como método de transducción fueron reportados.<sup>69,70</sup>

Los aptámeros son generados por un proceso de selección in vitro denominado SELEX (Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial), que permite hallar secuencias de ácidos nucleicos con distinta afinidad para una molécula objetivo en particular.

Como se mencionó, muchos de estos ensayos de bioafinidad se realizan en fase heterogénea, involucrando la inmovilización de una de las especies participantes en un soporte sólido. El primer inmunoensayo en fase sólida fue desarrollado por Miles y

Hales en 1968.<sup>71</sup> Éste representó un gran avance, dado que la introducción de esta fase facilitó la separación de las especies unidas y no unidas. Si bien la introducción de una fase sólida garantiza mayor rapidez y sencillez al ensayo, también introduce cierta complejidad, particularmente en términos de la termodinámica de las interacciones.

### **1.3 Técnicas de inmovilización de proteínas**

Se entiende por inmovilización al proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de la molécula, por su unión a un soporte.<sup>72</sup>

Varios factores deben ser tenidos en cuenta en el proceso de inmovilización, sobre todo, cuando se trata de una biomolécula:

- uniones involucradas.
- mantenimiento de la actividad biológica de la biomolécula.
- accesibilidad del analito a la biomolécula.
- tipo de aplicación biotecnológica.
- especificidad de la interacción.
- orientación y ordenamiento de las moléculas en la estructura.
- estabilidad de la estructura en el medio de medición.

El método de inmovilización que se utilizará dependerá de la biomolécula a inmovilizar y del soporte elegido.

Queda fuera del alcance de esta tesis, desarrollar las numerosas técnicas de inmovilización de biomoléculas conocidas, sin embargo se realizará una descripción de aquellas utilizadas en el presente trabajo. Dos procesos de inmovilización han sido utilizados: la formación de uniones covalentes y el autoensamblado electrostático a partir de monocapas autoensambladas de alcanotioles sobre un soporte de oro.

### **1.3.1 Unión covalente**

La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas.<sup>72</sup> De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las proteínas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina, la histidina y en menor medida la metionina, el triptofano, la arginina y los ácidos aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente. Este método presenta las siguientes ventajas:

1. La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla;
2. La carga de proteína permanece constante después de la inmovilización;
3. Una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria.

Sin embargo la inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de inconvenientes:

- Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones proteína-soporte y su geometría, pudiendo distorsionar la estructura de la proteína y conducir a derivados inactivos.
- El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del sitio de reconocimiento.
- La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas proteínas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

Como se mencionó, la superficie o soporte tiene que estar funcionalizada. La inmovilización se produce, por lo tanto, por la unión covalente entre algún grupo

funcional de la biomolécula y un grupo funcional de la superficie del transductor (-NH<sub>2</sub>, -SH, -COOH) o con el grupo funcional de un polímero depositado sobre dicha superficie.

Entre los materiales que han sido extensamente utilizados como transductores o soportes se incluyen: polímeros hidroxílicos naturales, principalmente los polisacáridos de celulosa y agarosa; materiales proteicos, como el colágeno; polímeros sintéticos, tales como nylon y poliacrilamida; materiales inorgánicos, como sílica y carbón, y metales, como el oro, plata y platino.

Los metales nobles como oro y plata son frecuentemente utilizados como soportes en sistemas tanto electroquímicos como ópticos. Ellos deben ser previamente funcionalizados utilizando tioles. La fuerte unión entre el metal y el azufre del tiol genera una superficie metal-tiol (Au-S-R) que provee un film delgado y uniforme de grupos R. Como un ejemplo, dispositivos utilizados para Resonancia de Plasmones Superficiales, tales como BIAcore<sup>®</sup> (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden) y IASys<sup>®</sup> (Fisons, Uxbridge, UK) están contruidos con espejos de oro revestidos con un tiol-polisacárido (donde el polisacárido también está funcionalizado, por ejemplo, carboximetildextran) que sirve como intermediario para la inmovilización de la biomolécula utilizada para “capturar” al analito.

### **1.3.2 Monocapas autoensambladas**

Las monocapas autoensambladas (SAMs) son construcciones moleculares que se forman espontáneamente por la inmersión de un sustrato apropiado en una solución de un surfactante activo en un solvente orgánico

Ellas pueden ser preparadas usando diferentes tipos de moléculas y diferentes sustratos. Algunos ejemplos incluyen, monocapas de organosilanos sobre superficies hidroxiladas (SiO<sub>2</sub> sobre Si, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sobre Al, vidrio, etc.); alcanotioles sobre oro, plata y cobre; dialquil sulfuros y dialquil disulfuros sobre oro; alcoholes y aminas sobre platino, ácidos grasos sobre óxido de aluminio y plata.

Todos estos sistemas han sido analizados con gran detalle por A. Ulman.<sup>73</sup>

Uno de los métodos más exitosos es la formación de monocapas autoensambladas de alquiltiolatos sobre superficies de oro.

En 1983, Nuzzo y Allara<sup>74</sup> publicaron el primer trabajo en este área, mostrando por medio de elipsometría y FTIR, que dialquildisulfuros (RS-SR) forman espontáneamente sobre una superficie de oro, una monocapa orientada. El mecanismo de autoensamblado de monocapas de alcanotioles sobre una superficie de oro fue propuesto en 1996, por Poirier y Pylant.<sup>75</sup>

Las SAMs han sido caracterizadas utilizando un extenso número de técnicas de superficie. Las más frecuentemente usadas son: espectroscopia IR, elipsometría, ángulo de contacto, espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS), electroquímica y técnicas de mapeo como microscopía de efecto tunel (STM) o microscopía de fuerza atómica (AFM).

Los grupos funcionales terminales pueden ser susceptibles de posteriores modificaciones, de esta manera una gran variedad de grupos funcionales puede ser incorporada a la estructura del transductor y son estos grupos los que controlan las propiedades fisicoquímicas de la interfase electrodo / electrolito<sup>76</sup> y la accesibilidad de moléculas de solución a la superficie del electrodo.<sup>77,78</sup>

La reacción propuesta de quimisorción de tioles orgánicos sobre superficies de oro es la siguiente:



Medidas de FTIR superficial<sup>79</sup> y espectroscopía Raman<sup>80</sup> demostraron la pérdida del hidrógeno del tiol, ya que no se observa el modo de "estiramiento" de la banda S-H en la monocapa formada. Sin embargo, la evolución de H<sub>2</sub> propuesta por la reacción (1.1) no ha sido detectada ya que posiblemente el gas quede adsorbido sobre la superficie del metal.

Los átomos de azufre adsorbidos resisten oxidación, reducción y desorción en condiciones ambientales comunes. Las monocapas de tioles sobre electrodos son estables

en un amplio rango de potenciales; sin embargo, son desorbidos cuantitativamente a potenciales negativos y en electrolitos fuertemente alcalinos.<sup>81,82,83,84</sup>

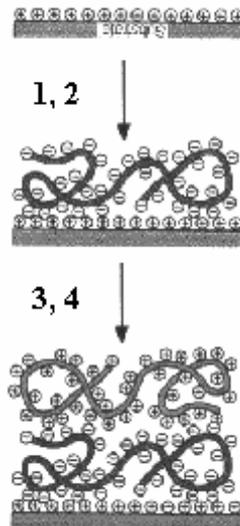
Debido a que el oro no posee un óxido superficial estable y tolera tratamientos químicos fuertes que remueven contaminantes orgánicos, es el sustrato ideal para realizar la adsorción de tioles.

Una vez funcionalizado el soporte de oro a través del tiol, para dar lugar a una monocapa autoensamblada, como se mencionó, ésta puede ser susceptible de posteriores modificaciones que involucren la incorporación de la biomolécula receptora.

### **1.3.3 Autoensamblado electrostático**

El autoensamblado electrostático se basa en la adsorción alternada de macromoléculas cargadas. Esta estrategia involucra la adsorción paso a paso de especies cargadas sobre un sustrato cargado, principalmente a través de interacciones electrostáticas con sobrecompensación de carga en cada ciclo de la adsorción, induciendo la adsorción de la próxima capa de macromoléculas opuestamente cargadas.

La Figura 1.13 esquematiza el principio para la construcción de estructuras empleando adsorciones electrostáticas. En este esquema, un sustrato sólido con una superficie con cargas fijas negativas es sumergido en una solución que contiene un polielectrolito (PE) catiónico (paso 1). Como consecuencia, el PE se adsorbe sobre el sustrato dejando un cierto número de grupos iónicos expuestos sobre la interfase con la solución, invirtiendo de esta manera la carga superficial e impidiendo la adsorción de más moléculas de PE. Luego de remover el excedente, mediante un lavado (paso 2), el sustrato es sumergido en una solución que contiene un PE aniónico (paso 3), de manera que una nueva capa es adsorbida, restaurando la carga original de la superficie. El excedente es nuevamente removido por un paso de lavado (paso 4).



**Figura 1.13:** Esquema de preparación del autoensamblado electrostático. Los pasos 1 y 3 representan la adsorción de polielectrolitos de carga opuesta. Los pasos 2 y 4 representan los lavados. Los contraiones fueron omitidos para mayor claridad. (Tesis doctoral A. Wolosiuk, UBA)

La cantidad de material adsorbido está determinado por el balance de todas las interacciones en el sistema. Las interacciones electrostáticas, claves en la adsorción de PEs son: la interacción entre el sustrato y segmentos del polímero (atractiva), que promueve la adsorción, y la interacción entre dichos segmentos del PE adyacentes (repulsiva), que se opone a la incorporación del material a la superficie.<sup>85,86</sup>

Debido a la importancia de las interacciones electrostáticas, la adsorción de PEs depende fuertemente de parámetros electrostáticos, tales como la carga de la superficie y del PE, del pH y de la fuerza iónica. Así, por ejemplo, si la adsorción se lleva a cabo desde una solución con alta fuerza iónica, las repulsiones entre los distintos segmentos del polímero son apantalladas, el polímero adopta una conformación de tipo “ovillo” y como consecuencia se adsorbe mayor cantidad de material.

### 1.3.4 Unión avidina- biotina

Otro recurso interesante es la modificación química de la biomolécula para incorporar grupos funcionales reactivos que no modifiquen la actividad biológica de la misma. Un ejemplo es la biotinización (incorporación de biotina) o avidinación (incorporación de avidina) de la biomolécula para luego inmovilizarla utilizando la unión avidina-biotina.<sup>87</sup>

La avidina es una proteína extraída de la clara de huevo. Posee un peso molecular de 66 kDa y consiste en un tetrámero glicoproteico compuesto por cuatro subunidades idénticas. Cada subunidad contiene un sitio de unión para biotina o vitamina H. La proteína es básica, con un pI de 10, lo cual hace que a pH fisiológico, la avidina posea una carga neta muy grande que favorece la existencia de interacciones electrostáticas inespecíficas entre la avidina y otras biomoléculas. Sus dimensiones son 4.0 \* 5.5 \* 6.0 nm.

La fuerza de interacción de avidina con biotina es de las más altas, no covalentes, que se conocen, exhibiendo una constante de disociación del orden de  $10^{-15}$  M a pH 7.

La única desventaja del uso de avidina es su tendencia a unirse inespecíficamente a componentes distintos a la biotina, debido a su alto pI y a su alto contenido de carbohidratos. Para minimizar esta adsorción inespecífica, puede utilizarse neutravidina, que tiene un pI neutro (6.3) por lo que se disminuyen las interacciones electrostáticas con otras biomoléculas, además de no estar glicosilada. Su peso molecular es de aproximadamente 60 kDa.

La unión avidina-biotina ha sido ampliamente utilizada para el diseño de ensamblados espacialmente ordenados y en inmunoensayos.

## 1.4 Transducción electroquímica

Como fue mencionado anteriormente para inmunoensayos, en ensayos de reconocimiento en general, habitualmente se utilizan marcadores, de manera tal de poder detectar la reacción entre el ligando y el receptor. Para tal fin pueden utilizarse distintos marcadores como radioisótopos, enzimas, fluoróforos, etc.

Se recordará también, que tanto los ensayos ELISA competitivos como no competitivos utilizan marcadores enzimáticos. Debido a la amplificación catalítica enzimática se obtienen límites de detección óptimos. En general, la reacción enzimática, es evaluada a través de métodos espectroscópicos. Típicamente, el progreso de la reacción enzimática es monitoreado a través de la velocidad de formación de producto o de desaparición de reactivo. Otra alternativa es la detección electroquímica. Si durante el proceso catalítico, se generan o se consumen especies electroquímicas como electrones, iones o compuestos con estados de oxidación variable, se puede realizar una detección de tipo conductimétrica, potenciométrica o amperométrica. En esta última técnica, la corriente que fluye es medida en respuesta al potencial aplicado.

La superficie del electrodo de trabajo representa, tanto el transductor para la detección enzimática, como el soporte inerte sobre el cual se inmovilizan las biomoléculas.

Los ensayos electroquímicos combinan la especificidad de la reacción de reconocimiento con la sensibilidad de la detección electroquímica<sup>88</sup> Generalmente se suele medir la respuesta de la oxidación o reducción del producto o sustrato.<sup>89,90</sup>

La mayor parte de los electrodos utilizados en ensayos de reconocimiento están basados en el uso de enzimas oxidoreductasas como marcadores. Estas enzimas contienen grupos redox que cambian durante la reacción bioquímica. Enzimas de este tipo son las oxidasas y las deshidrogenasas.

Las enzimas redox pueden ser clasificadas según la naturaleza del grupo prostético asociado; flavina, quinona, hemo o cobre. Dentro de las oxidasas, la peroxidasa de rábano picante (HRP) es de particular interés en el marco de esta tesis.

Muchas técnicas electroquímicas hacen uso de la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la catálisis de HRP inmovilizada, por ejemplo, para la construcción de sensores.<sup>91,92</sup>

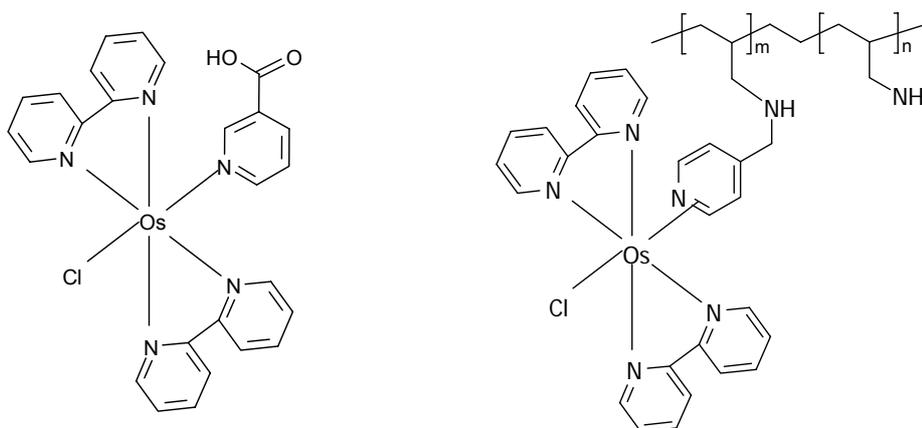
Para algunas enzimas, la transducción de la catálisis a una señal electroquímica puede involucrar la transferencia electrónica directa entre el electrodo y la enzima.<sup>93</sup> Sin embargo, para las enzimas en las que dicha transferencia ha sido observada, ella no es alcanzada con eficiencia, lo cual no es la situación ideal para un ensayo analítico.<sup>94</sup> En la mayoría de estas aplicaciones, la transferencia electrónica directa entre el centro redox de la enzima y el electrodo no es alcanzada por impedimento estérico. La señal del

electrodo debe, por lo tanto, depender de un cosustrato intermediario. Este intermediario es llamado mediador.

Los mediadores difusionales son moléculas que pueden transportar y transferir los electrones producidos o consumidos por la acción enzimática, entre el electrodo y el sitio redox de la enzima. Se puede de esta forma, revelar la actividad enzimática a través de la señal del mediador. Un gran número de sustancias puede ser utilizadas como mediadores en la construcción de electrodos enzimáticos, entre ellos los más populares son los mediadores basados en complejos metálicos (Os, Fe) y las quinonas.

Se han propuesto también sensores amperométricos basados en el uso de oxidoreductasas cableadas electroquímicamente, involucrando el uso de polímeros redox que comunican eficientemente al marcador enzimático con la superficie y propagan la carga hacia el electrodo. Los hidrogeles redox proveen una capa sobre el electrodo donde las biomoléculas de receptor pueden coinmovilizarse.<sup>95,96</sup>

En esta tesis se utilizó  $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{pyCOOH})\text{Cl}]^+$  como mediador redox soluble, y también un polímero redox, poli(alilamina) derivatizada con un complejo de osmio conteniendo ligandos piridínicos como mediador redox inmovilizado en el soporte (Figura 1.14). El polímero redox posee cadenas de PM > 12000 Dalton y una relación entre los grupos de osmio y las unidades de PAA de 1:8.<sup>97</sup> Ambos mediadores fueron sintetizados en nuestro laboratorio.



**Figura 1.14:** Estructura del complejo soluble  $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{pyCOOH})\text{Cl}]^+$  con bpy: biperidina y pyCOOH: ácido nicotínico (izquierda) y del polímero redox (derecha).

## **1.5 Peroxidasa de Rábano Picante (HRP)**

### **1.5.1 Generalidades<sup>98</sup>**

Las peroxidasas son enzimas extracelulares que pueden encontrarse en plantas, ellas participan en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular, la polimerización de componentes de la pared celular y la oxidación de metabolitos secundarios esenciales importantes para reacciones de defensa.

HRP contiene un único grupo prostético hemo (unidad hierro-porfirina), en el cual el centro del Fe está coordinado a un residuo histidina próximo y a una molécula de agua. Ambos, la histidina próxima y un residuo histidina distante situado dentro del entorno del enlace puente de H del ligando H<sub>2</sub>O cumplen un rol importante en la actividad catalítica.

Las peroxidasas catalizan la oxidación de un extenso número de sustratos orgánicos por peróxido de hidrógeno y por peróxidos orgánicos.

Está constituida por una única cadena polipeptídica, conteniendo 4 puentes disulfuro. El calcio es un constituyente endógeno de la molécula de peroxidasa y aparentemente es importante para la estabilidad estructural de la enzima. Si bien no participa en el mecanismo catalítico, su remoción causa una perturbación en la vecindad del hemo, lo cual produce una disminución de la actividad de la enzima.

Además de ser una hemoproteína, también es una glicoproteína; el contenido de carbohidratos alcanza al 17 % del peso molecular, en algunos casos. La composición de carbohidratos consiste de: galactosa, arabinosa, xilosa, fucosa, manosa, manosamina y galactosamina, dependiendo de la isoenzima.

En términos prácticos y para trabajos experimentales, existen 3 isoenzimas importantes: isoenzima A (ácida), isoenzima C (neutra o ligeramente básica) y otra isoenzima fuertemente básica. Esta última es llamada cianoperoxidasa debido a que es

aislada de las plantas como un complejo ciano-férrico. La mayoría de las preparaciones comerciales están constituidas por isoenzima C.

Su peso molecular es de aproximadamente 44 kDa, que incluye la cadena polipeptídica, el grupo hemo más  $\text{Ca}^{+2}$  y los carbohidratos.

Es estable por largos períodos de tiempo a temperatura ambiente, en un rango de pH de 5-10.

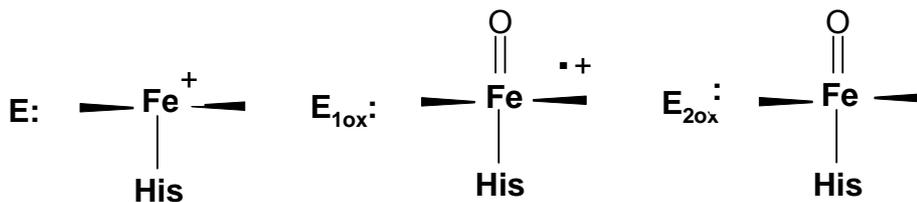
### 1.5.2 Ciclo catalítico

El ciclo catalítico para HRP se muestra en la Figura 1.15.<sup>99</sup>

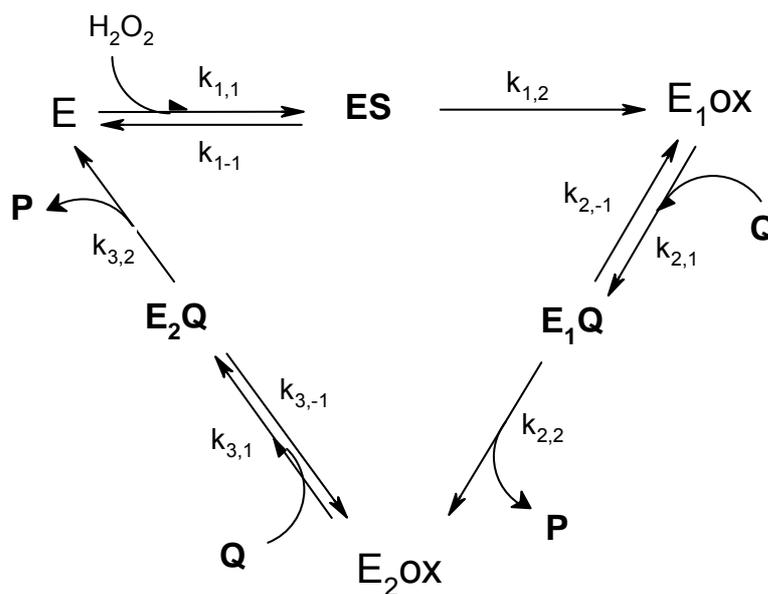
$E_{1ox}$  y  $E_{2ox}$  son los estados oxidados de la ferriperoxidasa nativa (E). A menudo  $E_{1ox}$  y  $E_{2ox}$  son llamados compuesto I y II, respectivamente.

El primer paso de la catálisis es una rápida transferencia de un átomo de O del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (sustrato de la enzima) al hemo (Fe III), formalmente una oxidación que involucra 2  $e^-$ , para formar el catión radical intermediario  $E_{1ox}$  ( $[\text{Fe}=\text{O}]^{\bullet+}$  (con un estado de oxidación formal para el Fe de +V) y agua. En ausencia de donores de  $e^-$  adecuados,  $E_{1ox}$  se descompone lentamente. En el segundo paso, el catión radical del compuesto I es reducido por el donador de  $e^-$ , Q, para dar el intermediario  $E_{2ox}$  (estado de oxidación formal del Fe: +IV) y el producto P. En el último paso, la enzima es regenerada a su forma nativa, E, por la reducción de  $E_{2ox}$  por una nueva molécula de Q (una reducción que involucra 1  $e^-$  y dos protones, obteniéndose nuevamente el producto P y agua.

a)



b)



**Figura 1.15:** a) Esquema de las estructuras para E, E<sub>1ox</sub> y E<sub>2ox</sub> b) Ciclo catalítico para HRP, donde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es el sustrato de la enzima, Q (donor de e<sup>-</sup>) es cosustrato y P es el producto.

El ciclo catalítico presentado aquí, es un ciclo simplificado. Más recientemente, otros autores proponen un mecanismo más complejo. El intermediario E<sub>2ox</sub>, en exceso de sustrato (por arriba de 2mM, dependiendo del donador de e<sup>-</sup>), puede dar lugar a un nuevo intermediario, E<sub>3</sub>, inactivo, resultando en inhibición de la enzima. E<sub>3</sub>, a su vez puede ser reducido a E<sub>1ox</sub> por ciertos donores de e<sup>-</sup> ó radicales, reestableciendo así el ciclo catalítico. Por lo tanto se requiere un preciso conocimiento de las relaciones entre las cantidades de sustrato, cosustrato y enzima presentes, para poder determinar cual es el paso limitante de todo el proceso. (Ver Apéndice)

## 1.6 Objetivos de la Tesis

En esta introducción hemos visto que LPS constituye una molécula altamente compleja, tanto desde el punto de vista de su estructura química como de su estructura supramolecular, y que no existe un patrón que permita predecir cual será el comportamiento fisico-químico de cada LPS proveniente de distintas cepas de bacterias Gram-negativas. Afortunadamente, la presencia del lípido A, reconocida como la porción “tóxica” del LPS, es altamente conservada entre las distintas cepas, lo cual permite cierta unificación. Hemos visto también que existen moléculas capaces de reconocer LPS. Un grupo importante de ellas, lo hacen a través de la unión específica al lípido A, por fuerzas tanto electrostáticas como por interacción hidrofóbica. La presencia de estos 2 tipos de interacciones es un requisito imprescindible para una alta afinidad entre las 2 especies. Estos hechos permiten pensar en la posibilidad de desarrollar un método ó ensayo para la detección y cuantificación de LPSs basado en dicho reconocimiento específico hacia el lípido A

El objetivo de la presente tesis es determinar la viabilidad del uso de técnicas basadas en el reconocimiento específico entre el lípido A y estas moléculas de reconocimiento para la determinación de endotoxinas. Para implementar este objetivo se desarrolló una metodología de trabajo teniendo en cuenta las características únicas de los lipopolisacáridos, remarcablemente diferentes a las proteínas y los ácidos nucleicos que han sido ampliamente estudiadas en sensores de bioafinidad.

Se pretende desarrollar un método con la suficiente sensibilidad para verificar el cumplimiento de normas relacionadas con los valores máximos permitidos de endotoxinas en agua y baños de diálisis.

Las características principales del método son las siguientes:

- El método propuesto estará basado en un ensayo de tipo competitivo que explote la unión específica y de alta afinidad entre LPS y ENP. Con

características similares a las de un inmunoensayo, donde se explota la unión antígeno-anticuerpo.

- El agente de reconocimiento, ENP, se encontrará inmovilizado sobre un sustrato sólido y se permitirá la competencia entre LPS y LPS marcado con la enzima peroxidasa de rábano picante, HRP, por el agente de reconocimiento.
- El sistema de transducción será de tipo electroquímico, en particular cronoamperométrico, basado en la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano picante (HRP).

En virtud del objetivo de este trabajo, una serie de cuestiones más básicas se plantean, que son imprescindibles para el desarrollo de esta tesis:

- Manipulación y técnicas de purificación de muestras de LPS.
- Inmovilización de ENP sobre un electrodo de oro. La superficie de oro, por ende, es utilizada como soporte sólido donde se inmoviliza el agente de reconocimiento y como elemento transductor del ensayo.
- Seguimiento de los distintos pasos involucrados en la construcción del electrodo modificado.
- Diseño de rutas sintéticas para la obtención de un conjugado.

Para llevar a cabo estas tareas, varias técnicas debieron ser implementadas, como: separaciones cromatográficas, ultrafiltración, electroforesis, LAL test, elipsometría, entre otras, las cuales no se habían utilizado con anterioridad en el laboratorio donde se desarrolló esta tesis dejando sentadas las bases para un estudio metodológico en el área.

## 1.7 Referencias

- 1- Amersfoort, E.; Van Berkel, T.; Kuiper, J.; *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 379-414.
- 2- Atlas, R. *Principles of Microbiology*, 2da. Ed.; 1997, Wm. C. Brown Publish., Dubuque, IA.
- 3- Takahashi, I.; Kotani, S.; Takada, H.; Tsujimoto, M.; Ogawa, T.; Shiba, T.; Kusumoto, S.; Yamomoto, M.; Hasegawa, A.; Kiso, M.; Nishijima, M.; Amano, F.; Akamatsu, Y.; Harada, K.; Tanaka, S.; Okamura, H.; Tamura, T. *Infect. Immun.* **1987**, *65*, 57-68.
- 4- Rietschel, E. T.; Kirikae, T.; Schade, U. F.; Ulmer, A. J.; Holst, O.; Brade, H.; Schmidt, G.; Mamat, U.; Gimmecke H-D.; Kusumoto, S.; Zahringer, U.; *Immunobiol.* **1993**, *187*, 169-190.
- 5- Zahringer, U.; Lindner, B.; Rietschel, E. T. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 211-276.
- 6- Taylor, A. H.; Heavner, G.; Nedelman, M.; Sherris, D.; Brunt, E.; Knight, D.; Ghrayeb; *J. J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 17934-17938.
- 7- Petsch, D.; Anspach, F. *J. Biotech.* **2000**, *76*, 97-119.
- 8- Brandenburg, K.; Andrä, Jörg.; Müller, M.; Koch, M.H.J.; Garidel, P. *Carbohydrate Research* **2003**, *338*, 2477-2489.
- 9- Novotny, A.; 1984 En: Rietschel, E.T. (Ed.), *Handbook of Endotoxin*, vol. 1. Elsevier, Amsterdam, 308-332.
- 10-Morrison, D.; Ryan, J. *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides*, vol. I – Molecular Biochemistry and Cellular Biology; 1992; CRC Press, USA.
- 11-Hirayama, C.; Sakata, M. *J. Chromatogr. B.* **2002**, *781*, 419-432.
- 12-Seydel, U.; Labischinski, H.; Kastowsky, M. *Immunobiol.* **1993**, *187*, 191-211.
- 13-Kastowsky, M., Gutberlet, T., Bradaczek, H. *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 4798-4806.
- 14-Shands, J.; Chun, P. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 1221-1226.
- 15-Snyder, S.; Kim, D.; Mc Intosh, T. *Biochemistry* **1999**, *38*, 10758-10767.

- 16-Morrison, D.; Ryan, J. *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides*, vol. I – Molecular Biochemistry and Cellular Biology; 1992; CRC Press, USA, Cap.9.
- 17-Labischinski, H., Barnickel, G., Bradaczek, H. *J. Bacteriol.* **1985**, *162*, 9-20.
- 18-Seydel, U.; Brandenburg, K.; Koch, M. H. J.; Rietschel, E. T. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *186*, 325-332.
- 19-Brandenburg, K.; Koch, M. H. J.; Seydel, U. *J. Struct. Biol.* **1990**, *105*, 11-21.
- 20-Kato, N.; Ohta, M.; Kido, N.; Ito, H.; Naito, S.; Hasegawa, T.; Watabe, T.; Sasaki, K.; *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 1516-1528.
- 21-Kastowsky, M; Gutberlet, T.; Bradaczek, H. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *217*, 771-779.
- 22-Aurell, C.; Wiström, A. *Biochem. Biophys. Research Com.* **1998**, *253*, 119-123.
- 23-Wiström, C. A.; Jones, G. M.; Tobias, P. S.; Sklar, L. A. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 988-997.
- 24-Santos, N.; Silva, A.; Castanho, M.; Martins-Silva, J.; Saldanha, C. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 96-100.
- 25-David, S. A. *J. Mol. Recognit.* **2001**, *14*, 370-387.
- 26-Chaby, R. *Drug Discovery Today* **1999**, *4*, 209-221.
- 27-Weiss, J.; Eslbach, P.; Oissca, I.; Oderberg, H. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 2664-2672.
- 28-Ried, C.; Wahl, C.; Miethke, T.; Wellnhofer, G.; Landgraf, C.; Schneider-Mergener, J.; Hoess; A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 28120-28127.
- 29-Tobias, P.; Soldau, K.; Ulevitch, R. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 10867-10871.
- 30-Tobias, P.; Soldau, K.; Iovine, N.; Eslbach, P.; Weiss, J. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 18682-18685.
- 31-Yu, B.; Wright, S. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4100-4105.
- 32-Thomas, C.; Kapoor, M.; Sharma, S; Bausinger, H.; Zyilan, U.; Lipsker, D.; Hanau, D.; Surolia, A. *FEBS Letters* **2002**, *531*, 184-188.

- 33- Rietschel, E. T.; Kirikae, T.; Schade, F. U.; Mamat, U.; Schmidt, G.; Loppnow, H.; Ulmer, A. J.; Zahringer, U.; Seydel, U.; Di Padova, F.; Schreier, M.; Brade, H. *The FASEB Journal* **1994**, *8*, 217-225.
- 34- Williams, K. L. *Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation*, 2<sup>a</sup> ed., 2001, Marcel Dekker, Inc., New York.
- 35- a) 2002-2003 U.S. Pharmacopoeia 26; 2001. b) Association for the Advancement of Medical Instrumentation: American National Standard; Water Treatment Equipment for Hemodialysis Applications. ANSI/AAMI RD62: 2001. Arlington, VA, 2001.
- 36- Iwanaga, S.; Kawabata, S.; Muta, T. *J. Biochem (Tokio)* **1998**, *123*, 1-15.
- 37- Iwanaga, S. *Curr. Op. Immun.* **2002**, *14*, 87-95.
- 38- Novitsky, T.; Ridge, R.; Sloyer, J. USP: 6171807B1.
- 39- Taylor, J. A.; Barrett, G.; Lorch, W.; Cullen, D. C. *Anal. Lett.* **2002**, *35*, 213-225.
- 40- Rangún, M.; Basu, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5038-5039.
- 41- Baumgartner, J. D.; Calandra, T. *Drugs* **1999**, *57*, 127-132.
- 42- Srimal, S.; Surolia, N.; Balasubramanian, S.; Surolia, A. *Biochem. J.* **1996**, *315*, 679-686.
- 43- Thomas, C.; Gangadhar, B.; Surolia, N.; Surolia, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12428-12434.
- 44- Thomas, C.; Surolia, N.; Surolia, A. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29624-29627.
- 45- Bruch, M.; Cajal, Y.; Koh, J.; Jain, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11993-12004.
- 46- Tsubery, H.; Ofek, I.; Cohen, S.; Fridkin, M. *Biochem.* **2000**, *39*, 11837-11844.
- 47- Yin, N.; Marshall, R.; Matheson, S.; Savage, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2426-2435.
- 48- Ooi, C.; Weiss, J.; Doerfler, M.; Elsbach, P. *J. Exp. Med.* **1991**, *174*, 649-655.
- 49- Wiese, A.; Brandenburg, K.; Lindner, B.; Schromm, A.; Carroll, S.; Rietschel, E.; Seydel, U. *Biochem.* **1997**, *36*, 10301-10310.

- 50- Chen, Ch.; Brock, R.; Luh, F.; Chou, P. J.; Larrick, J. W.; Huang, R. F.; Huang, T. H.; FEBS Letters 1995; 370, 46-52.
- 51- Warren, H. S.; Glennon, M. L.; Wainwright, N.; Amato, S. F.; Black, K. M.; Kirsch, S. J.; Riveau, G. R.; Whyte, R. I.; Zapol, W. M.; Novitsky, T. J. *Infect. Immun.* **1992**, 60, 2506-2513.
- 52- Ried, C.; Wahl, C.; Miethke, T.; Wellnhofer, G.; Landgraf, C.; Schneider-Mergener, J.; Hoess, A. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 28120-28127.
- 53- Ding, J. L.; Ho, B. *Drug Development Research* **2004**, 62, 317-335.
- 54- Hoess, A.; Watson, S.; Siber, G. R.; Liddington, R. *The EMBO Journal*, **1993**, 12, 3351-3356.
- 55- Wainwright, N; Novitsky, T. USP: 5747455.
- 56- Fischer, E.; *Ber. Dt. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985- 2993.
- 57- Yalow, R. S.; Berson, S. A. *Nature* **1959**, 184, 1648-1649.
- 58- Kellner, R.; Mermet, J. M.; Otto, M.; Widmer, H. M. *Analytical Chemistry-Chapter 7.9 Immunoassay*, Wiley – VCH. Weinheim. Berlin.
- 59- Wild, D. *The Immunoassay Handbook* - Chapter 1, Davies, C.; pages 3-40. Nature Publishing group, 2001, London.
- 60- Danielson, S. J.; Hilborn, D. A. “Single-layer and multilayer thin film immunoassays” en “*Principles and Practice of Immunoassays*” ed. Price, C. P.; Newman, D. J. 1997, Stockton Press, New York. Pag. 545-577.
- 61- Deegan, O.; Walshe, K.; Kavanagh, K.; Doyle, S. *Anal. Biochem.* **2003**, 312, 175-181.
- 62- Setford, S.; Van Es, R.; Blankwater, Y.; Kröger, S. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 398, 13-22.
- 63- Limbird, L.E. *Cell surface receptors: A Short Course on Theory and Methods*, Second Edition. Kluwer Academic Publishers, 1996.
- 64- Yamamura, H.I; Enna, S. J.; Kuhar, M. J. *Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis*, Raven Press, 1990.

- 65- Kenakin, T. *Pharmacologic Analysis of Drug Receptor Interaction* (2<sup>nd</sup> ed.) Raven Press, 1993.
- 66- Jayasena, S. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628-1650.
- 67- Tombelli, S. *Biosen. Bioelect.* **2005**, *20*, 2424-2434.
- 68- Lee, M.; Walt, R. *Anal. Biochem.* **2000**, *282*, 142-146.
- 69- Radi, A. E.; Acero Sanchez, J. L.; Baldrich, E.; O'Sullivan, C. K. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6320-6323.
- 70- Rodriguez, M. C.; Abdel-Nasser Kawde, A. N.; Wang, J. *Chem. Commun.* **2005**, *34*, 4267-4269.
- 71- Miles, L. E.; Hales, C. N. *Nature* **1968**, *219*, 186-189.
- 72- Arroyo, M. *Ars. Pharmaceutica* **1998**, *39*, 23-39.
- 73- Ulman, A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films* 1991, Academic Press, INC, New York.
- 74- Nuzzo, R. G.; Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481- 4483.
- 75- Poirier, G. Poirier, G. Poirier, G. E.; Pylant, E. D. *Science* **1996**, *272*, 5265,1145-1148.
- 76- Bain, C. D.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3665-3666.
- 77- Finklea, H. O.; Snider, D. A.; Fedyk, J.; Sabatani, E.; Gafni, Y.; Rubinstein, I. *Langmuir* **1993**, *9*, 3660-3667.
- 78- Finklea, H. O.; Avery, S.; Lynch, M.; Furtch, T. *Langmuir* **1987**, *3*, 409-413.
- 79- Nuzzo, R. G.; Dubois, H. L.; Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 558-569.
- 80- Bryant, M. A.; Pemberton, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *113*, 8284-8293.
- 81- Walczak, M. M.; Popenoe, D. D.; Deinhammer, R. S.; Lamp, B. D.; Chung, C.; Porter, M. D. *Langmuir* **1991**, *7*, 2687-2693.
- 82- Zhong, Ch.; Porter, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11616-11617.
- 83- Weisshaar, D.; Walczak, M.; Porter, M. *Langmuir* **1993**, *9*, 323-329.

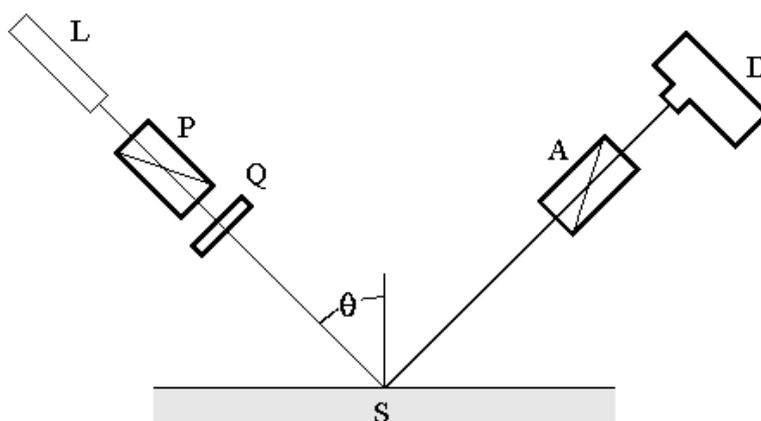
- 84- Yang, D. F.; Wilde, C. P.; Morin, M. *Langmuir* **1996**, *12*, 6570-6577.
- 85- Rojas, O. J.; Claesson, P. M.; Muller, D.; Neumann, R. D. *J. Colloid Interface Sci.*, **1998**, *205*, 77-88.
- 86- Hoogeveen, N. G.; Stuart Cohen, M. A.; Fler, G. J. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *182*, 133-145.
- 87- Hermanson, G. *Bioconjugate Techniques* Academic Press, 1996, Elsevier Science, San Diego, California, USA.
- 88- Foulds, N. C.; Frew, J. E.; Green, M. J. *Biosensors a Practical Approach – Immunolectrodes*, 1990, Cass A.E.G. (Ed) Oxford University Press.
- 89- Pemberton, R. M.; Hart, J. P.; Foulkes, J. A. *Electrochim. Acta* **1998**, *43* 3567-3574.
- 90- Yao, H.; Jenkins, A. J.; Pesce, A. J.; Hasall, H. B.; Heinemann, W. R. *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 1432-1434.
- 91- Xiao, Y.; Ju, H.; Chen, H. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *391*, 73-82.
- 92- Salinas, E.; Torriero, A. A. J.; Battaglini, F.; Sanz, M. I.; Olsina, R.; Raba, J. *Biosensor and Bioelectronics* **2005**, *21*, 313-321.
- 93- Tatsuma, T.; Ariyama, K.; Oyama, N. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *446*, 205-209.
- 94- Kellner, R.; Mermet, J. M.; Otto, M.; Widmer, H. M. *Analytical Chemistry- Chapter 7-8 Biosensors*, Wiley – VCH. Weinheim. Berlin.
- 95- Lu, B.; Iwuoha, E.; Smyth, M.; O’Kennedy, R. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *345*, 59-66.
- 96- Danilowicz, C.; Manrique, J. M. *Electrochem. Comm.* **1999**, *1*, 22-25.
- 97- Cortón, E.; Danilowicz, C.; Battaglini, F. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *445*, 89-94.
- 98- Everse, J.; Everse, K.; Grisham, M. “Peroxidases in Chemistry and Biology” Vol II, 1991, CRC Press, Inc., Boca Ratón, USA.
- 99- Dequaire, M; Limoges, B.; Moiroux, J.; Savéant, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 240-253.

## Capítulo 2 – Técnicas utilizadas

### 2.1 Elipsometría

#### 2.1.1 Fundamento teórico

Los procesos de adsorción o de formación de nuevas fases sobre una superficie producen cambios en la interfaz que, aún siendo pequeños, afectan sus propiedades en relación con la reflexión de la luz. La elipsometría es una técnica óptica que permite registrar los cambios en la polarización de la luz elípticamente polarizada, cuando ella es reflejada por una superficie. Si un haz de luz linealmente polarizada es reflejado por una superficie, usualmente las componentes perpendicular y paralela del vector campo eléctrico sufren cambios diferentes en amplitud y fase. Antes de incidir sobre la superficie, las componentes paralela y perpendicular están en fase y luego de la reflexión están desfasadas. La consecuencia de este fenómeno es que el vector campo eléctrico se mueve en espiral mientras la onda se propaga y la proyección en un plano de este movimiento es una elipse.



**Figura 2.1:** Esquema del elipsómetro: fuente de luz (L), polarizador (P), compensador (Q), muestra (S), analizador rotante (A) y detector (D).

Si la superficie es ópticamente modificada, por ejemplo por la adsorción de una proteína, se puede detectar el cambio en la polarización asociado. La diferencia en el estado de polarización entre la luz incidente y la reflejada es descrita por los parámetros medidos  $\Delta$  y  $\psi$ , denominados ángulos elipsométricos. Los ángulos elipsométricos están relacionados con el cociente de los coeficientes complejos de reflexión para la luz polarizada paralela,  $r_p$ , y perpendicular,  $r_s$ , al plano de incidencia de acuerdo con:

$$\rho = \tan \psi \exp(i\Delta) = r_p / r_s \quad (2.1)$$

donde  $\tan \psi$  representa la amplitud del cambio en  $\rho$  y  $\Delta$  el cambio de fase.

$r_p$  y  $r_s$  pueden, con la ayuda de la teoría de Maxwell, ser expresados como una función de la longitud de onda de la luz  $\lambda$ , del ángulo de incidencia  $\Phi_0$  y de las propiedades ópticas del sistema reflector.

$$r_p / r_s = f(\lambda, \Phi_0, \text{parámetros ópticos}) \quad (2.2)$$

En una reflexión en una interfase,  $r_p$  y  $r_s$  corresponden a los coeficientes de Fresnel de la interfase, los cuales dependen del ángulo de incidencia y de los índices de refracción complejo de las dos fases.<sup>1</sup> Recordaremos que el índice de refracción complejo,  $\hat{n}$ , se escribe normalmente como función de su parte real,  $n$  (índice de refracción) y su parte imaginaria,  $k$  (coeficiente de extinción),  $\hat{n} = n - ik$ .

Cuando un film es depositado en este sistema, (sustrato o superficie/ambiente) los coeficientes de reflexión y por lo tanto los ángulos elipsométricos, dependerán también de las variables que caracterizan al film ópticamente: su índice de refracción  $n_f$ , su coeficiente de extinción  $k_f$  y su espesor óptico  $d_f$ .<sup>2,3</sup>

Los parámetros elipsométricos  $\psi$  y  $\Delta$  medidos en este nuevo sistema sustrato-película-ambiente a una dada longitud de onda ( $\lambda$ ), reflejarán los cambios en el estado de polarización del haz de luz reflejada producidos por el efecto combinado de la película incorporada y el sustrato, lo que implica que contienen información de las propiedades

ópticas de ambos. Si las propiedades ópticas del sustrato son conocidas (por ejemplo a partir de experimentos con el sustrato desnudo), es posible obtener a partir de los datos experimentales, las constantes ópticas ( $n_f$  y  $k_f$ ), y el espesor ( $d_f$ ) de la película. La función que relaciona los parámetros  $\psi$  y  $\Delta$  con  $n_f$ ,  $k_f$  y  $d_f$  como así también con  $n_{sust}$ ,  $k_{sust}$ ,  $n_{amb}$  y  $k_{amb}$  es entonces:

$$\tan \psi \exp(i\Delta) = f(\lambda, \Phi_0, n_f, k_f, d_f, n_{sust}, k_{sust}, n_{amb}, k_{amb}) \quad (2.3)$$

Su forma explícita dependerá del modelo de película utilizado.<sup>4-7</sup>

El modelo más simple para un sistema sustrato-película-ambiente es el de película simple e isotrópica ubicada entre el sustrato y el ambiente. Modelos más complicados pueden involucrar películas anisotrópicas o un número mayor de capas ópticas entre el sustrato y el ambiente.

En esta tesis se utilizaron diferentes modelos para analizar los gráficos  $\psi - \Delta$ .

Se utilizaron programas de ajuste y simulaciones iterativas para modelos de película simple (CMDex y CMDex/ENP) y doble (CM-Dextran/ENP) isotrópicas para estudiar las propiedades ópticas de ambos sistemas sobre sustratos de oro modificados con un tiol como sustrato efectivo.<sup>4</sup>

La cantidad de material incorporado, CMDex ( $\Gamma_{dextran}$ ) en la película hidratada (medidas *in situ*) fue estimada a partir de los valores obtenidos para el espesor del film  $d_f$ , su índice de refracción  $n_f$  y el índice de refracción del ambiente (agua), asumiendo la linealidad en el incremento del índice de refracción  $dn/dc$ , de acuerdo con la fórmula derivada por De Feijter.<sup>8</sup>

$$\Gamma_{dextran} = d_f \times \frac{(n_f - n_{amb})}{\left(\frac{dn}{dc}\right)} \quad (2.4)$$

Para películas mixtas, CMDex/ ENP, el índice de refracción del film se asumió como una combinación lineal de los incrementos del índice de refracción de los componentes de concentración  $c_i$ , según:

$$n_f = n_{amb} + \sum \left( \frac{dn}{dc} \right)_i \frac{\Gamma_i}{d_i} \quad (2.5)$$

considerando  $n_{amb} = 1.331$  y valores de 0.15mL/g y 0.19mL/g para los incrementos en el índice de refracción de CMDex y ENP (proteínas) en agua, respectivamente.<sup>9</sup>

### **2.1.2 Instrumentación**

Se utilizó un elipsómetro marca Sentech modelo SE 400 de analizador rotante, equipado con un láser de gas He/Ne ( $\lambda = 632.8$  nm), 10 mW (máxima potencia de salida). Como sustratos se utilizaron obleas de Si provistas por Motorola a las cuales se depositaron 20 nm de Ti y 200 nm de Au.

Las medidas ex-situ se llevaron a cabo a ángulos múltiples de 70°, 65°, 60°, 55° y 50°, mientras que las medidas in-situ se llevaron a cabo con una celda comercial de teflon, cuyas ventanas permiten mediciones sólo a un ángulo fijo de 70°.

## **2.2 Técnicas Electroquímicas**

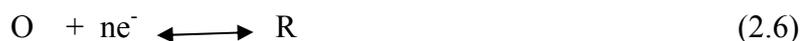
### **2.2.1 Fundamento teórico**

En esta tesis se utilizaron técnicas de potencial controlado. Estas técnicas requieren el uso de un potencióstato para fijar el potencial y medir la corriente, y de una celda electroquímica, en nuestro caso de 3 electrodos. En esta disposición, el potencial se fija entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, de manera tal que se

lleve a cabo la reacción electroquímica de interés; la corriente generada circula entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. Debido a las dimensiones de los electrodos utilizados en esta tesis, los modelos que se describen corresponden al caso de electrodo plano infinito y difusión semi-infinita. Una discusión más detallada puede encontrarse en la referencia 10.

### 2.2.1.1 Cronoamperometría

En este método el potencial se fija en un valor donde la especie de interés lleva a cabo una reacción redox en la superficie del electrodo. El potencial se mantiene constante durante el experimento y se registra la corriente en función del tiempo. Esta corriente será proporcional a la concentración de la especie que se reduce u oxida en la superficie del electrodo de trabajo, según la ecuación:



El valor de corriente así obtenido, para un electrodo estacionario dependerá del potencial aplicado y de la geometría del electrodo. El potencial aplicado podrá corresponder a una de las tres regiones (a) región controlada por la difusión, a altos sobrepotenciales, (b) región de control mixto (c) la región de Tafel a bajos sobrepotenciales donde la transferencia electrónica es el paso lento.

Si el potencial es llevado a un potencial tal que la corriente de reducción corresponda al límite difusional (caso a), dicho potencial iniciará una reducción muy rápida de todo O en la superficie electroquímica, y por lo tanto lleva a la reducción de todo O que difunde a la superficie desde el seno de la solución. Es efectivamente una forma de cambiar instantáneamente la concentración de O en la superficie desde su valor en el seno de la solución a cero. Por otra parte, los cambios en la concentración incluso a una distancia corta más allá de la superficie tienen lugar sólo debido a la difusión que resulta del gradiente de concentración creado por el cambio químico en la superficie. Si se analizan los perfiles de concentración para O a distintos tiempos luego de la aplicación del potencial, se observará que la difusión de O hacia la superficie decrece con t. Claramente, la respuesta será una variación donde la densidad de corriente decae con el

tiempo. La corriente observada será puramente faradaica, puesto que la corriente de carga de la doble capa decae prácticamente a cero.

Un tratamiento cuantitativo implica la resolución de las ecuaciones que describen el experimento. El cambio en la concentración de O con el tiempo, resultante de la difusión se describe por la segunda ley de Fick y las condiciones de contorno son:

- A  $t=0$ ,  $C_O(x,0) = C_o^*$
  - para  $t>0$ ,  $\lim_{x \rightarrow \infty} C_O(x,t) = C_o^*$
- $$C_O(0,t) = 0$$

donde  $C_o^*$  es la concentración de O en el seno de la solución. Las ecuaciones pueden ser resueltas aplicando la Transformada de Laplace a la expresión correspondiente a la segunda Ley de Fick, pudiéndose obtener las expresiones para el perfil de concentración de la especie O en función del tiempo y de la distancia. La dependencia de la corriente con el tiempo viene dada por:

$$i = nFAD_O \left( \frac{\partial C_O}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (2.7)$$

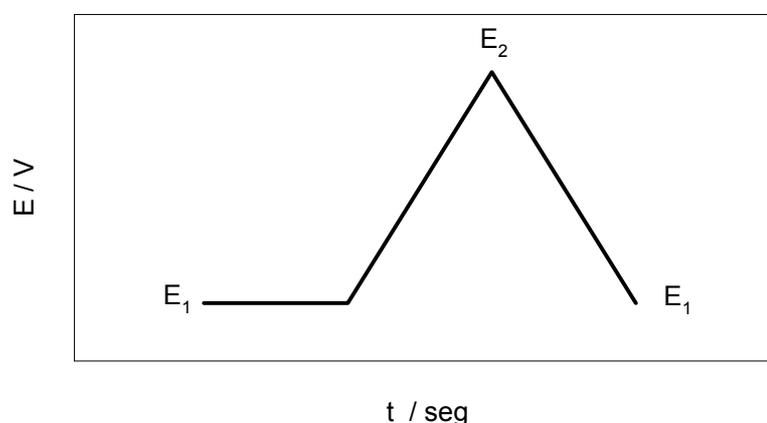
que lleva a la respuesta cronoamperométrica conocida como la ecuación de Cottrell

$$i = nFAC_o^* \left( \frac{D_O}{t\pi} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.8)$$

donde  $i$  es la intensidad de corriente,  $n$  el número de electrones intercambiados en la reacción,  $A$  es el área del electrodo,  $D_O$  es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva, en este caso O,  $F$  la constante de Faraday y  $t$  el tiempo.

### 2.2.1.2 Voltametría cíclica

En la voltametría cíclica, se aplica sobre el sistema una variación lineal del potencial, a partir de un potencial inicial  $E_1$ . En cada momento el potencial aplicado,  $E$ , responde a la ecuación:  $E = E_1 + v t$  donde  $v$  es la velocidad de variación del potencial con el tiempo,  $dE/dt$ . Esencialmente, se barre el potencial dentro de un rango donde se produce una reacción electródica antes de que se invierta el sentido de barrido, o sea hasta un potencial de retorno,  $E_2$ . (Figura 2.2).



**Figura 2.2:** Perturbación eléctrica durante una voltametría cíclica. En el gráfico, el potencial permanece constante por un periodo de tiempo antes de iniciar el barrido.

Se registra entonces la respuesta de intensidad de corriente del sistema en función del potencial aplicado, obteniéndose la curva intensidad-potencial o curva voltamétrica. La forma exacta de estas curvas depende del tipo de proceso que tiene lugar en el electrodo de trabajo. Los límites de potencial definen las reacciones electródicas que se permite que se produzcan y la velocidad de barrido de potencial define la escala de tiempo en la que se examina el proceso químico. Esta técnica suele utilizarse como técnica previa en cualquier estudio electroquímico pues da una primera información acerca del proceso de electrodo en estudio, pudiendo conocerse la reversibilidad del mismo, es decir, si la velocidad de transferencia electrónica de la reacción es tan rápida que el potencial del electrodo de trabajo cumple la ecuación de Nernst, y las etapas en las que se desarrolla.

El análisis de las curvas voltamétricas también permite observar si existen procesos acoplados a los de oxidación y reducción, por ejemplo procesos de adsorción, desorción o reacciones químicas acopladas.

Puesto que en esta tesis se trabajó con especies electroquímicas tanto en solución como inmovilizadas en la superficie del electrodo, se explicará la técnica para ambas situaciones.

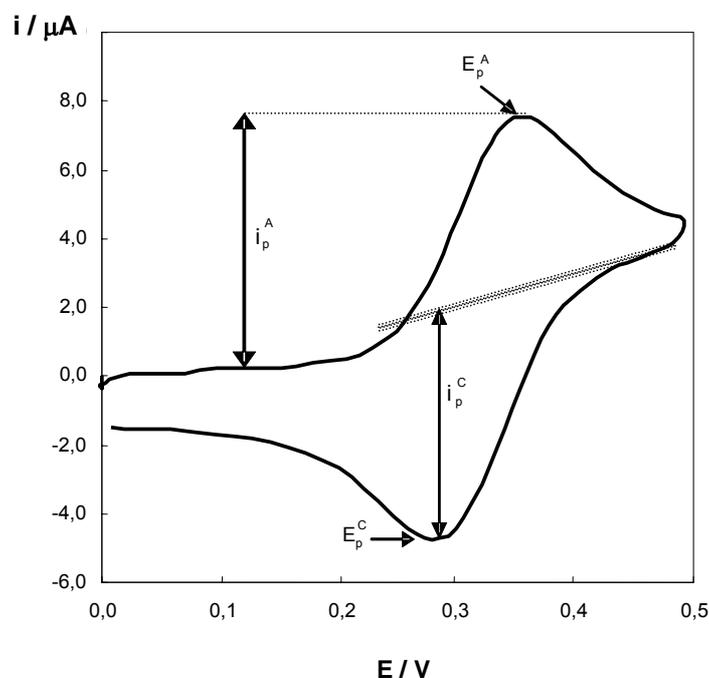
#### **2.2.1.2.1 Especie electroquímica en solución**

Para analizar la forma general de la curva  $i$ - $E$ , se considera la ecuación 2.6. La corriente depende del control cinético y difusional, observándose un crecimiento de la misma a medida que el sobrepotencial de la cupla aumenta, llegando a una corriente pico cuando la reacción comienza a estar controlada por difusión. Esta corriente pico es un parámetro característico de la voltametría.

En la Figura 2.3 se observa el voltagrama cíclico obtenido para una reacción reversible de transferencia de  $1 e^-$ , donde la especie electroquímica se encuentra en la solución. Si el potencial se barre a través del rango donde se produce la reacción de oxidación ( $R \rightarrow O$ ), inicialmente y como consecuencia del cambio en el potencial aplicado, la oxidación de  $R$  en la superficie se ve favorecida y por lo tanto la densidad de corriente anódica aumenta. Esta densidad de corriente continúa aumentando hasta que la concentración superficial llega a ser cero y por lo tanto la reacción pasa a estar controlada por difusión. Como la concentración superficial se mantiene en cero, y con el tiempo el flujo hacia la superficie disminuye, la densidad de corriente disminuye, y por consiguiente la respuesta presenta un pico. Para el barrido de vuelta, la reacción de transferencia electrónica en el electrodo es  $O \rightarrow R$ , por lo tanto la corriente cambiará su signo. La corriente catódica pasará de nuevo a través de un pico, en un proceso similar como el descrito anteriormente.

La respuesta de la voltametría cíclica para una reacción de transferencia electrónica de una especie en solución puede modelarse teniendo en cuenta la velocidad de reacción de la especie electroactiva en la superficie del electrodo, su difusión y las posibles reacciones acopladas en el seno de la solución.<sup>11</sup> El modelo predice que la forma de la curva es independiente de la velocidad de barrido de potencial para una especie

reversible. El análisis de la voltametría cíclica puede conducir a obtener parámetros termodinámicos y el coeficiente de difusión.



**Figura 2.3:** Voltametría cíclica típica para una especie electroactiva en solución

Para el caso de una especie que reacciona muy rápido con la superficie de un electrodo (caso reversible), el potencial formal para la cupla se encuentra a partir de:

$$E_{O/R}^{\circ} = \frac{(E_p^A + E_p^C)}{2} \quad (2.9)$$

donde  $E_p$  representa el potencial de la corriente pico y los supraíndices A y C a los procesos anódicos y catódicos, respectivamente.

Mientras que el coeficiente de difusión se puede determinar a partir de graficar la corriente pico,  $i_p$ , versus la raíz cuadrada de la velocidad de barrido,  $v$ , utilizando la ecuación de Randles-Sevcik, escrita a 298K,

$$i_p = 2.69 \cdot 10^5 n^{3/2} A D_R^{1/2} v^{1/2} C_R^* \quad (2.10)$$

donde la corriente de pico,  $i_p$  tiene la unidad Ampere (A), el área del electrodo,  $A$  ( $\text{cm}^2$ ), la concentración de la especie electroactiva en el seno de la solución,  $C_R^*$ , ( $\text{mol cm}^{-3}$ ), el coeficiente de difusión,  $D_R$  ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) y la velocidad de barrido de potencial,  $v$  ( $\text{V s}^{-1}$ ).

A partir de la forma del voltograma experimental se puede comprobar la reversibilidad del sistema.

Para una cupla reversible, se cumple que:

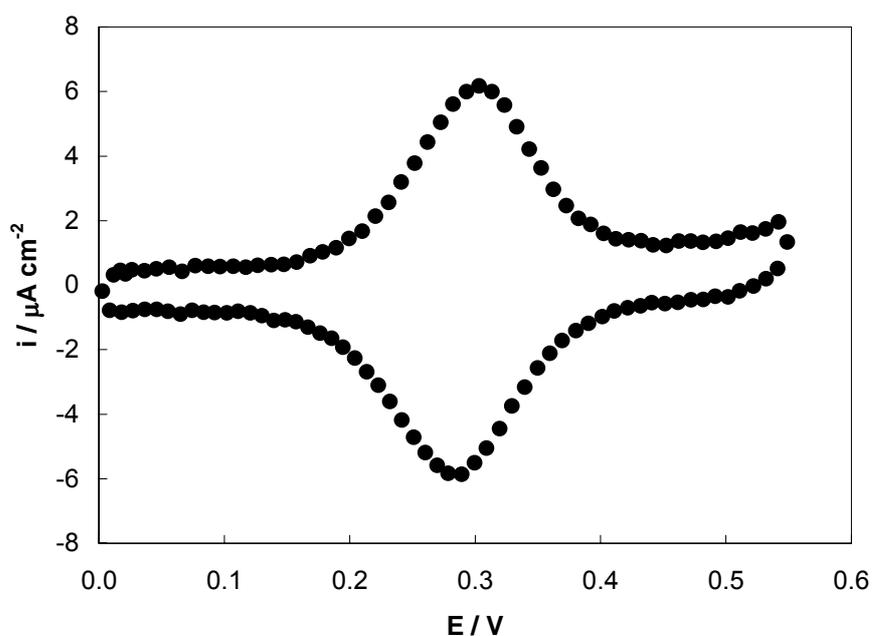
- $\Delta E_p = E_p^A - E_p^C = 59/n \text{ mV}$
- $-j_p^C = j_p^A$
- $j_p$  proporcional a  $v^{1/2}$
- $E_p$  independiente de  $v$

### **2.2.1.2.2 Especie electroquímica inmovilizada**

Las propiedades del voltograma de especies adsorbidas están determinadas por el número de sitios sobre la superficie electródica donde se produce la adsorción, por ejemplo el pico es simétrico cayendo la densidad de corriente a cero después del pico cuando el reactivo se consume totalmente (Figura 2.4), la densidad de corriente de pico es proporcional a la velocidad de barrido del potencial, la carga requerida para oxidar la capa adsorbida (es decir el área bajo el pico ya que el eje de potenciales es también de tiempo) es independiente de la velocidad de barrido de potencial y además la separación entre los picos de oxidación y reducción es 0 mV para un par con transferencia electrónica rápida, ya que la difusión no interviene en el proceso. Nuevamente, existen criterios de diagnóstico para voltogramas cíclicos para la transferencia electrónica de  $1e^-$  en una cupla reversible, donde O ó R se encuentran adsorbidos sobre la superficie del electrodo, ellos son:

- $\Delta E_p = 0 \text{ mV}$
- $-j_p^C = j_p^A$
- $j_p$  proporcional a  $v$
- $E_p$  independiente de  $v$
- $q_A = q_c$

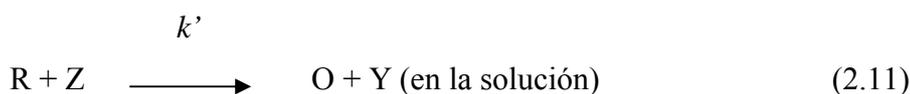
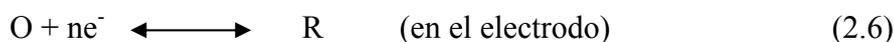
Teniendo en cuenta que el rango de potencial donde se observa una corriente faradaica corresponde a un determinado período de tiempo (el eje de potenciales se convierte en un eje de tiempo al considerarse la velocidad de barrido), la carga total intercambiada puede obtenerse por integración de la corriente en función del tiempo. En virtud de la ley de Faraday, es posible determinar la cantidad adsorbida de la especie electroactiva por simple integración del voltamograma. ( $\frac{Q}{nF}$  = moles de sustancia electroactiva depositada).



**Figura 2.4:** Voltamograma típico para una especie adsorbida sobre el electrodo, comportamiento reversible.

### **2.2.1.3 Reacción catalítica acoplada**

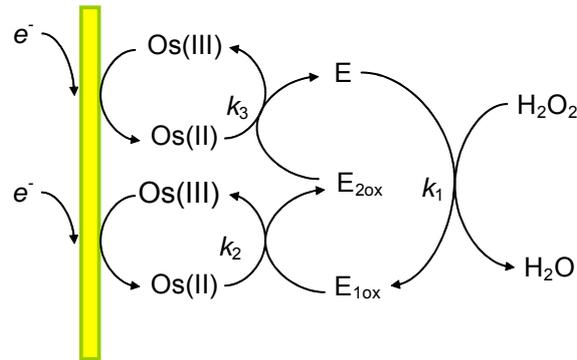
En este trabajo se utiliza peroxidasa de rábano picante (HRP) como marcador para llevar a cabo el ensayo de detección de LPS. Esta enzima no reacciona eficientemente de manera directa con la superficie de un electrodo<sup>12,13</sup> y por lo tanto un mediador redox debe ser utilizado. La situación que se presenta, en presencia del sustrato de la enzima, es la de una reacción catalítica acoplada a la reacción de electrodo, como lo muestra el siguiente esquema:



En esta situación, el producto de la reacción de electrodo, R, reacciona con una especie generalmente no electroactiva para regenerar O. El problema podría involucrar la consideración de una reacción de segundo orden y la difusión de la especie Z. En el tratamiento más sencillo, se asume que la concentración de Z se mantiene constante durante el experimento, y por lo tanto puede considerarse una reacción de pseudo primer orden.

El tratamiento teórico para el caso en que todas las especies están presentes en solución está ampliamente documentado.<sup>14,15</sup>

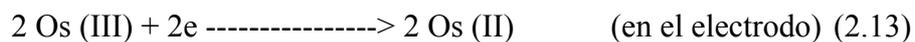
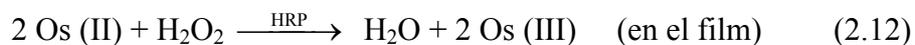
Para los experimentos desarrollados en esta tesis, Z corresponde a la enzima HRP y ésta se encuentra inmovilizada en el electrodo. El mediador puede estar presente en solución o inmovilizado. Un esquema del sistema en estudio se muestra en la Figura 2.5., donde se describe la catálisis enzimática de HRP acoplada a un electrodo, a través de la cupla reversible del mediador redox, Os(II)/Os(III).



**Figura 2.5:** Conexión del sistema enzimático de HRP con un electrodo

La forma reducida de la cupla, en este caso representada por el complejo de osmio (Os(II)), sirve como cosustrato de la enzima. Este mediador, como se mencionó, puede encontrarse en la solución o inmovilizado sobre la superficie del electrodo.

En el esquema, E representa a la enzima nativa,  $E_{1ox}$  y  $E_{2ox}$  son los estados oxidados de la enzima. El primer paso representa la oxidación de la enzima por el  $H_2O_2$ , para dar  $E_{1ox}$  y agua. En el segundo paso,  $E_{1ox}$  es reducido por Os(II) al intermediario  $E_{2ox}$  y en el último paso, la enzima es convertida a su forma nativa E, proceso que implica su reducción por otra molécula de Os(II). El Os(III) producido en estos procesos es reducido a Os(II) en el electrodo, generando una corriente. El ciclo catalítico puede resumirse con las siguientes ecuaciones:



La reacción (2.12) como se observa en el esquema, ocurre en una serie de pasos que involucran la reacción de la enzima con su sustrato y también la reacción de la enzima con el mediador.

Para el caso del mediador en solución se ha desarrollado un modelo el cual predice como será la corriente en función del potencial aplicado y las especies intervinientes.<sup>16-18</sup>

La aplicación de este modelo para predecir como será la corriente catalítica a un potencial donde el mediador se encuentre en su forma reducida, se encuentra desarrollada en el Apéndice, considerando el caso particular de la enzima HRP y el ciclo catalítico que se presenta en la Figura 2.5 y Figura A1 (Apéndice). Teniendo en cuenta, la velocidad de reacción entre la enzima y el mediador como paso limitante del proceso catalítico, la difusión del mediador y el espesor del film, donde se encuentra inmovilizada la enzima, se define el parámetro  $\alpha$ , donde  $\alpha = \frac{2k_3[E_T]}{D_{Os(II)}}$

$k_3$  es la constante de reacción del mediador con la enzima;  $[E_T]$ , la concentración de enzima total en el film;  $D_{Os(II)}$ , el coeficiente de difusión del mediador, en este caso el complejo de osmio en su forma reducida y  $l$  el espesor del film que contiene la enzima.

En el caso de una cronoamperometría, donde se aplica un potencial en el cual el mediador es plenamente reducido, una vez que el sistema llegue al estado estacionario se pueden estudiar dos casos particulares que describen el comportamiento de la corriente en función de las concentraciones de las especies involucradas. Uno es el caso donde la velocidad del proceso está controlada por la cinética de la reacción entre la enzima y el mediador. ( $\sqrt{\alpha} \ell$  tiende a cero). Por ejemplo, en el caso de una película delgada o baja concentración de enzima comparada a la del mediador, donde la corriente estará dada por:

$$i = \frac{F A k_3 [E_T] [Os(II)]^* l}{1 + \frac{[Os(II)]^*}{K_{3,M}}} = \frac{F A k_{3,2} [E_T] l}{1 + \frac{K_{3,M}}{[Os(II)]^*}} \quad (2.14)$$

Nótese que la corriente depende del espesor del film y de los parámetros del paso determinante del ciclo catalítico, la reacción de la enzima con el mediador, pero no de la difusión del mediador.

El otro caso se presenta cuando el control es difusional como ocurre en el caso de una película gruesa o alta concentración de enzima. Para esa situación, la expresión para la corriente será:

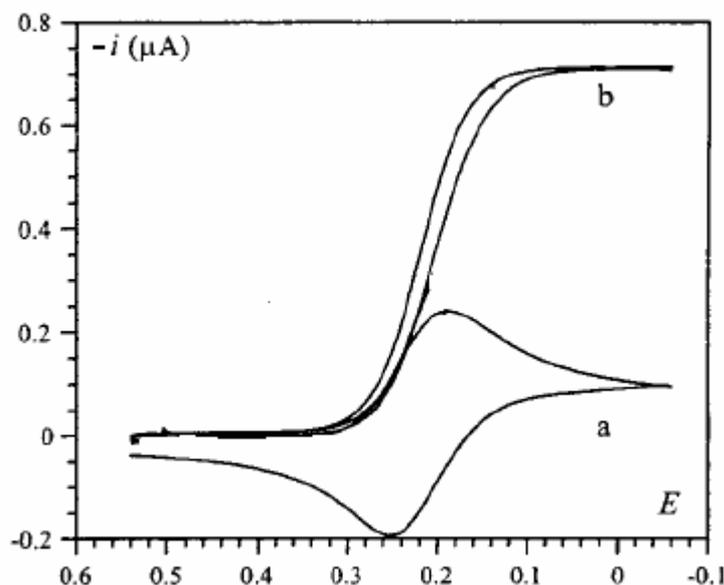
$$i = FAD_{Os(II)} \sqrt{\frac{4k_{3,2}[E_T]}{D_{Os(II)}} \left\{ [Os(II)]^* - \frac{k_{3,2}}{k_3} \ln \left( 1 + \frac{k_3}{k_{3,2}} [Os(II)]^* \right) \right\}} \quad (2.15)$$

Si además, la concentración de mediador es lo suficientemente baja de modo que la formación del complejo enzima-mediador no sea un paso limitante de la velocidad de reacción entre la enzima y el mediador, ( $\sqrt{\alpha'} \ell > 3$ ), la expresión 2.15 puede reducirse a:

$$i = FA \sqrt{2D_{Os(II)} k_3 [E_T]} [Os(II)]^* \quad (2.16)$$

En este caso la respuesta es similar a la que se obtendría para la enzima en solución.

Si los experimentos son realizados por voltametría cíclica se observa un plateau (Figura 2.6), y el valor de la corriente en el plateau es similar al obtenido por cronoamperometría, ya que ambos casos corresponden al mismo sistema que ha llegado al estado estacionario.



**Figura 2.6:** Voltagramas obtenidos a  $5 \text{ mV s}^{-1}$  en buffer fosfato pH=7.4 conteniendo a)  $20 \mu\text{M}$  Os (III) en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y enzima; y b)  $20 \mu\text{M}$  Os(III),  $0.2 \mu\text{M}$  HRP y  $0.2 \text{ mM}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (Ref 14)

En el gráfico  $i$ - $E$  (Figura 2.6) se observa la curva esperada para una cupla redox reversible en solución, ( $E_{1/2}$  aproximado  $0.25 \text{ V}$ ). También puede observarse como cambia esa curva al tener la reacción catalítica acoplada, obteniéndose la curva similar a una onda polarográfica, donde el valor de corriente para el plateau corresponde a la corriente catalítica límite. Una curva cronoamperométrica ( $i$ - $t$ ), a un potencial fijo aplicado de  $50 \text{ mV}$ , correspondiente a la región del plateau de la curva  $i$ - $E$ , permite observar el salto que se produce en la corriente al agregar  $\text{H}_2\text{O}_2$ , obteniéndose por este método, el mismo valor de corriente catalítica.

En el caso en que tanto el mediador como la enzima se encuentran inmovilizados, un modelo que describe la corriente en función de las concentraciones y el potencial aplicado fue desarrollado por Bartlett y Pratt.<sup>18,19</sup>

En particular, cuando el paso determinante es la reacción entre mediador y enzima, se tiene

$$i = \frac{2F A k_{3,2} [E_T] l}{1 + \frac{K_{3,M}}{C_{Os}}} \quad (2.17)$$

donde en este caso  $C_{Os}$  corresponde a la concentración del complejo de osmio en el film.

### 2.2.2 Instrumentación

Todas las técnicas electroquímicas fueron llevadas a cabo con un potenciostato marca TEQ 02. Se utilizaron celdas de vidrio convencionales de tres electrodos utilizando un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia, un contraelectrodo de platino y electrodos de oro macizo como electrodos de trabajo.

Los electrodos utilizados consistieron de láminas de oro planas de 1 cm<sup>2</sup> de área geométrica, las cuales previo a su modificación fueron sometidas a un minucioso proceso de limpieza: 1) 5 horas en solución saturada de permanganato de potasio en medio alcalino (KMnO<sub>4</sub> en 1 M NaOH) a 60°C. 2) 3 horas en solución piraña (1:3 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). **Esta solución es extremadamente corrosiva y reacciona violentamente con material orgánico, por lo que deben tomarse precauciones en su manipulación.** 3) Lavado con agua calidad MilliQ 4) Voltametría en una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.8 M a 0.05 V s<sup>-1</sup> desde 0 a +1.6 V vs Ag/AgCl.

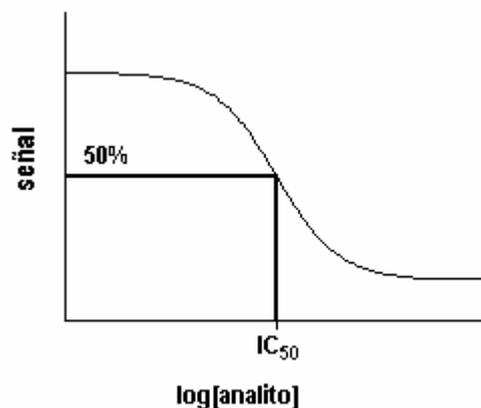
La superficie electroquímicamente activa fue calculada a partir de la carga obtenida por integración del pico de reducción del óxido de oro.<sup>20,21</sup>

## 2.3 Ensayos competitivos<sup>22,23,24</sup>

### 2.3.1 Curva de competencia

En un ensayo competitivo se mide la unión de una única concentración de analito marcado o conjugado en la presencia de varias concentraciones de analito libre o sin marcar. Típicamente la concentración de analito varía sobre varios órdenes de magnitud.

Las curvas que se obtienen, tienen forma sigmoidea y son denominadas curvas de competencia o curvas de dosis-respuesta. (Figura 2.7)



**Figura 2.7** Curva de dosis-respuesta estándar típica y representación gráfica de la  $IC_{50}$

En la curva se observan dos plateaus: el superior, a un valor igual al que corresponde al conjugado unido al receptor, en ausencia de su competidor, el analito y el inferior a un valor igual al correspondiente a la unión inespecífica. La concentración de analito que reduce la señal al 50% del valor de la asíntota superior (Figura 2.7) se denomina  $IC_{50\%}$  (Concentración Inhibitoria 50%) y constituye una estimación, tanto de la afinidad del anticuerpo ó receptor hacia el analito, como de la sensibilidad del método. Si el conjugado y el analito se unen ambos reversiblemente a un único sitio de unión, la unión en el equilibrio sigue la siguiente ecuación:

$$y = (A-D) / [1 + (x / C)^B] + D \quad (2.18)$$

donde A es el valor de la asíntota superior, B es la pendiente de la curva en el punto de inflexión, C es la concentración de analito en el punto de inflexión y D es el valor de la asíntota inferior. El parámetro C, en la práctica corresponde a la  $IC_{50}$ .

La  $IC_{50}$  puede estar influenciada por 3 factores teóricos:

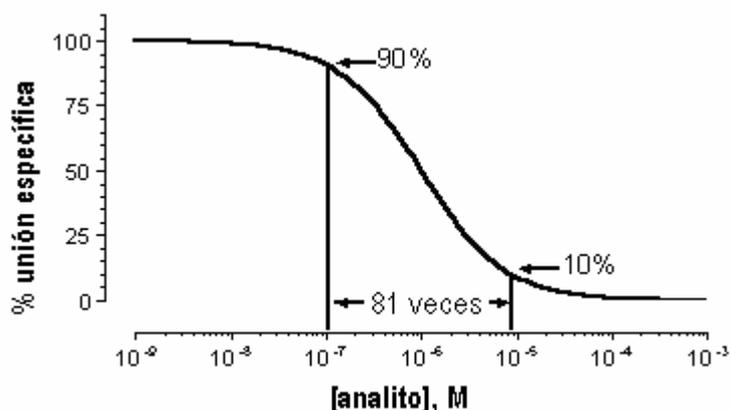
- La afinidad del receptor por el analito, reflejada en su constante de disociación,  $K_D$ . Si la afinidad es alta (por lo tanto  $K_D$  es pequeña), el valor de  $IC_{50}$  será bajo.

- La concentración de conjugado. Cuanto mayor sea la concentración de conjugado elegida, mayor concentración de analito se necesitará para que compitan por la unión.

- La afinidad del conjugado por el receptor. Se necesita más analito para competir con un conjugado que puede unirse fuertemente ( $K_D$  pequeña) que para uno que puede unirse más débilmente ( $K_D$  grande). En este último caso, se necesitará también una mayor concentración de conjugado para poder obtener una señal aceptable.

### 2.3.2 Factor o pendiente de Hill

Si el conjugado y el analito compiten por un único sitio de unión sobre cada receptor, la curva dosis-respuesta tendrá la forma determinada por la ley de acción de las masas. En este caso, la curva descenderá del 90% al 10% de unión específica sobre un incremento de 81 veces (casi 2 órdenes) en la concentración de analito, como puede verse en la Figura 2.8

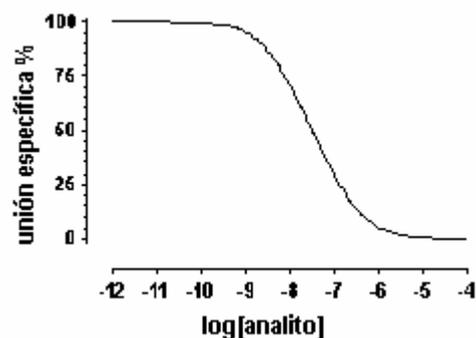


**Figura 2.8:** Curva de dosis-respuesta estándar y parámetros a tener en cuenta para la obtención del factor de Hill.

El factor de Hill está representado con la pendiente de la curva entre el 90 y 10% de unión específica. Una curva competitiva estándar que sigue la ley de acción de las masas tiene una pendiente de Hill de -1.0. Una curva con menor pendiente (factores de Hill del orden de -0.6 a -0.8), puede ser explicada por alguno de los siguientes ítems:

- Problemas en el ajuste de la curva. Cuando la curva no tiene claramente definidos alguno de los plateaus, es difícil establecer la pendiente y por lo tanto el factor de Hill pierde sentido.
- Receptores heterogéneos. El analito no se une a todos los receptores con igual afinidad, en este caso puede tratarse de una unión competitiva con 2 sitios.

Una unión competitiva con 2 sitios implica que: a) existen 2 clases distintas de receptores, b) el analito tiene afinidad distinta por los 2 sitios y c) el conjugado tiene una afinidad similar por ambos sitios. En dicho caso, sólo cuando las afinidades sean muy diferentes, la curva de competencia será visiblemente bifásica. La mayoría de las veces se verá una curva con menor pendiente. Por ejemplo, la figura 2.9 muestra el gráfico que se obtiene para la competencia por 2 sitios igualmente abundantes, con una diferencia en  $IC_{50}$  de 10. Si se observa detenidamente, puede verse que la pendiente está achatada (hay más de 2 órdenes de concentración de analito para ir de 90% a 10%), pero no pueden verse 2 componentes distintas.



**Figura 2.9:** Curva de competencia obtenida para una unión competitiva con 2 sitios, igualmente abundantes, con una diferencia en  $IC_{50}$  de un orden de magnitud.

El límite de detección del ensayo puede estimarse a partir del  $IC_{90}$  la concentración de analito que reduce la señal al 90% del valor de la asíntota máxima. (Figura 2.8).

### 2.3.3 Unión inespecífica

Además de unirse al anticuerpo o receptor, el conjugado puede unirse a otros sitios que se denominan sitios inespecíficos. La señal obtenida para la unión inespecífica puede obtenerse midiendo la unión del conjugado en la presencia de una concentración de analito tal que sature al receptor, lo que ocurre a altas concentraciones de analito en la curva de dosis-respuesta. En otras palabras, bajo esas condiciones, se asume que todos los receptores son ocupados por el analito, de manera tal que el conjugado solo puede unirse a los sitios inespecíficos.

Factores que afectan la calidad del ensayo:

- La constante de equilibrio
- La precisión en la medida de la señal
- El nivel de unión inespecífica. Si la unión inespecífica es elevada, se requerirá mayor cantidad de anticuerpo (o receptor) para aumentar el porcentaje de conjugado unido y así incrementar la relación señal/ruido.

La principal desventaja del ensayo competitivo es que la marcación del analito, para la obtención del conjugado puede cambiar o remover totalmente la capacidad de unión con el anticuerpo o receptor, particularmente si la conjugación involucra la región crítica o específica para la unión.

## 2.4 Referencias

- 1- Gottesfeld, S.; Kim, Y. T.; Redondo, A. en Recent Applications of Ellipsometry and Spectroellipsometry in Electrochemical Systems; *Physical Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*, Chapter 9, 1995, I. Rubinstein (Ed.), Marcel Dekker. New York.
- 2- Tiberg, F. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1996**, 92(4), 531-538.
- 3- Böhmer, M. R.; Koopal, L. K.; Janssen, R.; Lee, E. M.; Thomas, R. K.; Rennie, A. R. *Langmuir* **1992**, 8, 2228-2239.
- 4- Forzani, E.; Otero, M.; Perez, M.; Lopez Tejeilo, M.; Calvo, E. *Langmuir* **2002**, 18, 4020-4029.
- 5- Cuyspers, P.; Corsel, J.; Janssen, M.; Kop, J.; Hermens, W.; Coenraad Hemker, H. *J. Biol. Chem.* **1983**, 258 (4), 2426-2431.
- 6- Hook, F.; Kasemo, B.; Nylander, T.; Fant, C.; Sott, K.; Elwing, H. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5796-5804.
- 7- Elwing, H. *Biomaterials* **1998**, 19, 397-406.
- 8- De Feijter, J. A.; Benjamins, J.; Veer, F. A. *Biopolymers* **1978**, 17, 1759-1772.
- 9- Piehler, J.; Brecht, A.; Hehl, K.; Gauglitz, G. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, 13, 325-336.
- 10- Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods*, 2nd. Ed.; J. Wiley and Sons; New York, 2001.
- 11- Nicholson, R. S.; Shain, I. *Anal. Chem.* **1964**, 36, 706-723.
- 12- Hobara, D.; Uno, Y.; Kakiuchi, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, 3, 3437-3441.
- 13- Presnova, G.; Grigorenko, V.; Egorov, A.; Ruzgas, T.; Lindgren, A.; Gorton, L.; Borchers, T. *Faraday Discussions* **2000**, 116, 281 – 289.
- 14- Dequaire, M.; Limoges, B.; Moiroux, J.; Savéant, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 240-253.

- 15- Albery, W. J.; Bartlett, P. N.; Driscoll, B. J.; Lennox, R. B. *J. Electroanal. Chem.* **1992**, (1-2) 323, 77-102.
- 16- Bartlett, P. N.; Whitaker, R. G. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, 224, 27-35.
- 17- Bartlett, P. N.; Tebbutt, P.; Tyrrel, H. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 138-142.
- 18- Pratt, K. F. E. Tesis Doctoral, University of Southampton, U.K.; 1994.
- 19- Bartlett, P. N.; Pratt, K. F. E. *J. Electroanal. Chem.* **1995**, 397, 61-78.
- 20- Hoogvliet, J. C.; Dijkema, M.; Kamp, B.; Van Bennekom, W. P. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2016-2021.
- 21- Finklea, H. O.; Snider, D. A.; Fedyk, J. *Langmuir* **1990**, 6, 371-376.
- 22- Limbird, L. E. *Cell surface receptors: A Short Course on Theory and Methods*, (2<sup>nd</sup> ed.). Kluwer Academic Publishers, 1996.
- 23- Yamamura, H.I. *Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis*, Raven Press, 1990.
- 24- Kenakin, T. *Pharmacologic Analysis of Drug Receptor Interaction* (2<sup>nd</sup> ed.) Raven Press, 1993.



## Capítulo 3 - Caracterización de los elementos del ensayo

### 3.1 Purificación y caracterización de LPS

#### 3.1.1 Introducción

Los LPSs son extraídos de cultivos de células bacterianas Gram negativas por un procedimiento basado en una extracción con fenol - agua.<sup>1,2</sup> Este método hace uso de las siguientes propiedades: la solubilidad de las proteínas, pero no de LPS, en fenol; la solubilidad de LPS en un ambiente acuoso; la miscibilidad completa de fenol y agua a temperaturas alrededor de los 70 °C y la relativa facilidad con que pueden separarse el fenol y el agua por enfriamiento y centrifugación. Al enfriar a 5-10 °C, la mezcla se separa, siendo la capa superior acuosa la que contiene el LPS. Este procedimiento coextrae ácidos nucleicos, polisacáridos, algunas proteínas y ocasionalmente otros materiales de la pared celular bacteriana. Por tal motivo, puede encontrarse un importante contenido de estos contaminantes en las muestras comerciales de LPS.

Por otra parte, como se mencionó en la introducción, los lipopolisacáridos forman un grupo heterogéneo de moléculas. La variación se debe principalmente a modificaciones no estequiométricas de la región del lípido A y del core, y también a variaciones en el número de unidades repetitivas en el O-antígeno. Algunos métodos han sido utilizados para separar subclases de LPS obtenidos de cepas individuales, entre ellos se pueden mencionar: electroforesis en geles de poliacrilamida- dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE),<sup>3,4,5</sup> filtración en geles,<sup>6</sup> cromatografía líquida con resinas de intercambio aniónico<sup>7</sup> y cromatografía de interacción hidrofóbica.<sup>8</sup> Estos métodos son engorrosos, principalmente debido a la tendencia del LPS a formar agregados y a la dificultad de detectarlo e identificar las distintas subclases.

En esta tesis se utilizaron dos métodos para la purificación de LPS provisto por SIGMA proveniente de una extracción con fenol-agua: la digestión enzimática y la cromatografía líquida por exclusión de tamaño.

### **3.1.2 Materiales y Métodos**

Los LPS utilizados fueron de *Salmonella minnesota* (N° catálogo: L6261), *Salmonella minnesota* Re595 (Re mutante – N° catálogo: L9764) y de *Escherichia coli* O26-B6 (N° catálogo: L8274), todos provistos por SIGMA. *Salmonella minnesota* R60 (Ra) fue provisto por ListLab. **(Nota: LPS puede causar fiebre. Puede ser nocivo por inhalación, ingestión o en contacto con la piel. Deben ser empleadas buenas técnicas de laboratorio: se debe utilizar guardapolvo, guantes y anteojos de seguridad para su manipulación, trabajar en áreas ventiladas y evitar todo contacto con heridas expuestas).**

Ribonucleasa A y DNAsa I, ambas de páncreas bovino fueron provistas por SIGMA. Proteinasa K fue provista por Life Technologies. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

Sobre muestras de LPS liofilizadas, tanto comercial como purificado, se realizaron los siguientes ensayos:

#### *SDS-PAGE 17.5% con stacking y revelado con tinción de plata*

El sistema de electroforesis de Laemmli<sup>9</sup> para un gel separador (140 x 150 x 1.5mm) 17.5% fue usado en un aparato de electroforesis marca Hoefer modelo SE 400.

Las muestras de LPS disueltas en agua MilliQ fueron mezcladas en una proporción 2+1 con buffer muestra, conteniendo: 0.15 M buffer Tris-HCl, pH 6.8, 0.075% (p/v) azul de bromofenol, 15% (v/v) β-mercaptoetanol, 30% glicerol (v/v) y 6% SDS (p/v) y calentadas en un baño de agua a 100 °C durante 5 minutos. Volúmenes de 30-100 µL (conteniendo cada uno una masa de 10-50 µg de muestra) fueron sembrados y sujetos a electroforesis a corriente constante de 30 mA.

Luego, el LPS fue visualizado mediante la tinción con plata (altamente sensible para azúcares reductores, por lo tanto útil para revelar LPS y proteínas glicosiladas).

La tinción con plata fue descrita detalladamente por Tsai y Frasch.<sup>10</sup> Algunas modificaciones al protocolo fueron realizadas para asegurar el éxito del revelado.

Una vez corrido el gel, el LPS se fija al mismo, sumergiéndolo en **solución fijadora 1** (40% etanol y 5% ácido acético en agua MilliQ), toda la noche a temperatura ambiente. Se notará que el gel encoge.

Luego, la solución fijadora 1 se reemplaza por la **solución fijadora 2**, que produce la oxidación de los azúcares (40% etanol, 5% ácido acético y 0.7% (p/v) periodato de sodio). Pasados 5 minutos, el gel se lava exhaustivamente con suave agitación para retirar el exceso de periodato, con: a) 1 lavado con 40% etanol y 5% ácido acético b) 1 lavado con 40% etanol en agua c) 3 lavados de 15 minutos cada uno con 500 mL de agua MilliQ por lavado. Con estos lavados se observará que el gel retoma su tamaño. Una vez el gel ha sido lavado, se retira el agua y se vierte sobre él, la tintura de plata recién preparada, agitando durante 10 minutos, a oscuras.

Para la preparación de la **tintura de plata** se procede de la siguiente manera: 2,4 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  25% se agregan a 28 mL de 0.1 M NaOH. Luego, 5 mL de 20%  $\text{AgNO}_3$  se agregan a la solución anterior con agitación. Debe observarse transitoriamente la formación de un precipitado marrón que desaparece con la agitación, debido a la formación del complejo  $\text{Ag}(\text{NH}_3)^{+2}$ . Se lleva a un volumen final de 150 mL con el agregado de agua MilliQ.

Luego de la tinción con plata, se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con 500 mL de agua por lavado, a oscuras. Se retira el agua y se coloca el **revelador** (50 mg/L ácido cítrico y 0,5 mL/L de formaldehído 37%) que da lugar a la formación del espejo de plata sobre cada siembra que contenga azúcares reductores. El revelado del gel debe concluirse cuando las bandas adquieren la intensidad de color deseada o cuando el fondo claro del gel muestra los primeros signos de coloración. Las bandas en el gel adquieren un color marrón oscuro en alrededor de 5 minutos, alcanzada esa instancia, se toma una fotografía o se determinan las distancias de migración para cada banda.

*Cuantificación de proteínas.* El método utilizado fue el de Bradford,<sup>11</sup> utilizando un kit provisto por BioRad Laboratories, Inc.

*Cuantificación de ácidos nucleicos.* El contenido de ARN fue determinado por espectroscopia UV a partir de la medida de absorbancia a 260 nm. Las bases

nitrogenadas en los nucleótidos presentan una absorción máxima alrededor de los 260 nm (Tabla 3.1).<sup>12,13</sup> En base a estos coeficientes de absorción, la absorbancia a 260 nm en una cubeta de paso óptico de 1 cm, de una solución de 40 µg/mL (118 µM, considerando MW ≈ 340 Da/base) de ARN de simple hebra es igual a 1, lo que permite utilizar una técnica sencilla y no destructiva para su determinación.

Debido a que algunos contaminantes, como por ejemplo el solvente de extracción, pueden contribuir a la absorbancia medida, se recomienda también chequear la absorbancia a 240 nm. Las proteínas presentan un máximo de absorbancia a 280 nm, por lo que también pueden interferir en la determinación, dando lugar a la sobreestimación del contenido de ARN.

	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>U</b>	<b>ARN</b>	<b>ADN</b>
$\epsilon / \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$	13.4	7.9	8.1	6.1	8.2	8.5	7.6
$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	260.5	264.5	275	267	259.5	260	260

**Tabla 3.1:** Absorción UV de ácidos nucleicos

*Actividad endotóxica - Ensayo de endotoxinas bacterianas* mediante el ensayo LAL cromogénico cuantitativo – QCL-1000 provisto por CAMBREX BioScience Walkersville, Inc.

*Contenido de Ca<sup>+2</sup>/ Mg<sup>+2</sup>* Ensayo de dureza Duralarm, FMC Argentina. Se realizó sobre soluciones en concentración 1 mg/mL de LPS, LD del ensayo: 2 ppm / 0.0002%).

*Contenido de KDO (2-Keto-3-deoxyoctonate)*, utilizando un ensayo adaptado para muestras líquidas a partir del método descrito por Gerhardt.<sup>14</sup>

### 3.1.3 Caracterización de LPS

#### 3.1.3.1 Resultados

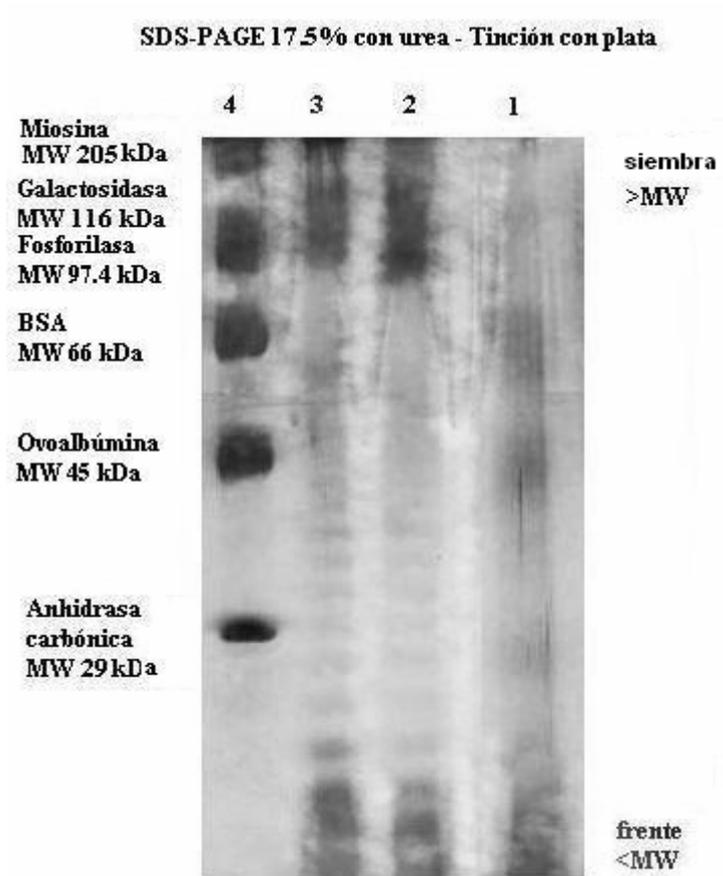
Los resultados de los ensayos anteriormente mencionados, sobre soluciones de LPS provenientes de *E. coli* 026:B6 y *S. minnesota*, pueden observarse en la Tabla 3.2 y la Figura 3.1.

En el gel de electroforesis de la Figura 3.1, la línea 1 corresponde a LPS de *E. coli*, las líneas 2 y 3 a LPS de *S. minnesota* y la línea 4 a markers de proteínas (miosina de conejo MW 205 kDa,  $\beta$  galactosidasa MW 116 kDa, fosforilasa MW 97.4 kDa, albúmina de suero bovino MW 66 kDa, ovoalbúmina MW 45 kDa y anhidrasa carbónica MW 29 kDa). Como puede observarse, por esta técnica y en estas condiciones electroforéticas, pueden ser detectados 10  $\mu$ g de ambos LPS. Con una siembra de 30  $\mu$ g puede apreciarse más nítidamente la característica separación de bandas de LPS de *S. minnesota*. Para LPS de *E. coli*, se observan manchas y las bandas no son tan definidas. El rango de pesos moleculares del gel, determinado por los markers, se encuentra entre 205 kDa y 10 kDa para proteínas globulares.

Muestra	Nº línea (SDS-PAGE)	ARN % p/p	Proteínas % p/p	KDO % (p/p)	Actividad endotóxica (EU/ng)	Ca <sup>+2</sup>
LPS de <i>E. coli</i> (SIGMA)	(1)	60	5	nd	2	(+)
LPS de <i>S. minnesota</i> (SIGMA)	(2 y 3)	40	3	0.9	1.5	(+)
LPS Ra	nd	0.4	1.6	1	0.7	(-)
LPS Re 595	nd	2	nd	nd	nd	nd

nd: no determinada.

**TABLA 3.2:** Resultados de los ensayos de caracterización realizados sobre LPS provenientes de distintas cepas. Números de línea corresponden a la Figura 3.1.



**Figura 3.1:** Detección de LPS por SDS-PAGE 17.5% con tinción de plata. Línea 1: LPS de *E.coli* 10 µg. Línea 2 y 3: LPS de *S. minnesota* 10 y 30 µg respectivamente. Línea 4 markers de proteínas en el rango 29 – 205 kDa. Condiciones especificadas en Materiales y Métodos.

### 3.1.4 Purificación de LPS de *Salmonella minnesota*

#### 3.1.4.1 Digestión enzimática

Enzimas tales como la ribonucleasa A y DNAsa, ambas hidrolasas, actúan hidrolizando los ácidos nucleicos produciendo oligonucleótidos que pueden ser fácilmente removidos posteriormente por diálisis. Por otro lado, la proteinasa K puede ser utilizada para hidrolizar y remover proteínas.

En vista de esto, el método para purificar por digestión enzimática LPS consistió de:

- Remoción de ácidos nucleicos por medio de digestión con ribonucleasa A y DNAsa.
- Remoción de proteínas con Proteinasa K.

LPS de *S. minnesota* (10 mg) fueron disueltos en 1 mL de buffer 0.1 M acético/acetato pH: 4.75 conteniendo 0.02% MgSO<sub>4</sub> y 0.4% cloroformo. Luego de solubilizar, se agregan 10 µL de ribonucleasa A (50 mg/mL en agua) y 20 µL DNAsa (1mg/mL en agua) y se incuba toda la noche a 37 °C. Se dializa (MWCO: 1.000) contra buffer 0.1 M TRIS pH 8 para intercambio del buffer. Una vez alcanzado el pH, se agregan 50 µL Proteinasa K (4 mg/mL). Se calienta durante 1 hora a 60 °C y luego se incuba hasta el día siguiente a 37 °C. Finalmente se dializa y se liofiliza.

Sobre la muestra liofilizada, disuelta en agua MilliQ se cuantifican proteínas y ácidos nucleicos, y se determina la actividad endotóxica, según se especifica en el apartado 3.1.2. En la Tabla 3.3 se observa la reducción en ARN del 40 al 12% debido al tratamiento.

#### **3.1.4.2 Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC)**

La muestra de LPS fue fraccionada a temperatura ambiente con una columna de Sephacryl HiPrep 16/60 (S-200 HR) de Amersham (Volumen de la columna, VC = 120 mL), que separa en el rango de MW: 5000-250000 para proteínas globulares y 1000-80000 para dextranos. A tal efecto se utilizó un sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) también de Amersham, modelo AKTA Explorer.

Como buffer de corrida se utilizó: 10 mM Buffer Tris, pH = 8.0 conteniendo 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.02% azida de sodio y 0.25% deoxicolato de sodio.

La columna fue equilibrada con 2 VC de buffer de corrida, luego, 10 a 30 mg de LPS disueltos en 1 mL de buffer fueron inyectados en la columna y eluidos isocráticamente con 1 VC, a un flujo de 0.5 mL/min. La elución se siguió, registrando la absorbancia a 260 nm, colectándose fracciones de 3 mL. Estas fracciones fueron

agrupadas de a 2 consecutivas (6 mL) y dializadas con el fin de remover el detergente y las sales. La diálisis se llevó a cabo con tubos MWCO: 3.500 contra buffer de corrida sin deoxicolato de sodio por 24 hs y luego contra agua MilliQ por otras 24 hs. Finalmente las fracciones fueron liofilizadas y sobre soluciones preparadas a partir de los liofilizados se realizaron ensayos de: SDS-PAGE 17.5% con tinción de plata, cuantificación de proteínas, cuantificación de ácidos nucleicos, ensayo de endotoxinas bacterianas, contenido de  $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$  y contenido de KDO (2-Keto-3-deoxyoctonate) según las especificaciones del apartado 3.1.2.

Luego de la separación, la columna debe lavarse con 0.5 VC de 0.2 M NaOH seguidos por al menos 2 VC de agua MilliQ y conservarse en etanol 20%. Lavados más rigurosos pueden realizarse con 0.25 VC de 0.5 M NaOH seguidos por 4 VC de agua MilliQ ó 0.5 VC de 30% isopropanol (para remover lípidos y proteínas muy hidrofóbicas) seguidos por 4 VC de agua MilliQ. Todas las soluciones deben ser previamente desgasadas.

### **3.1.4.3 Resultados**

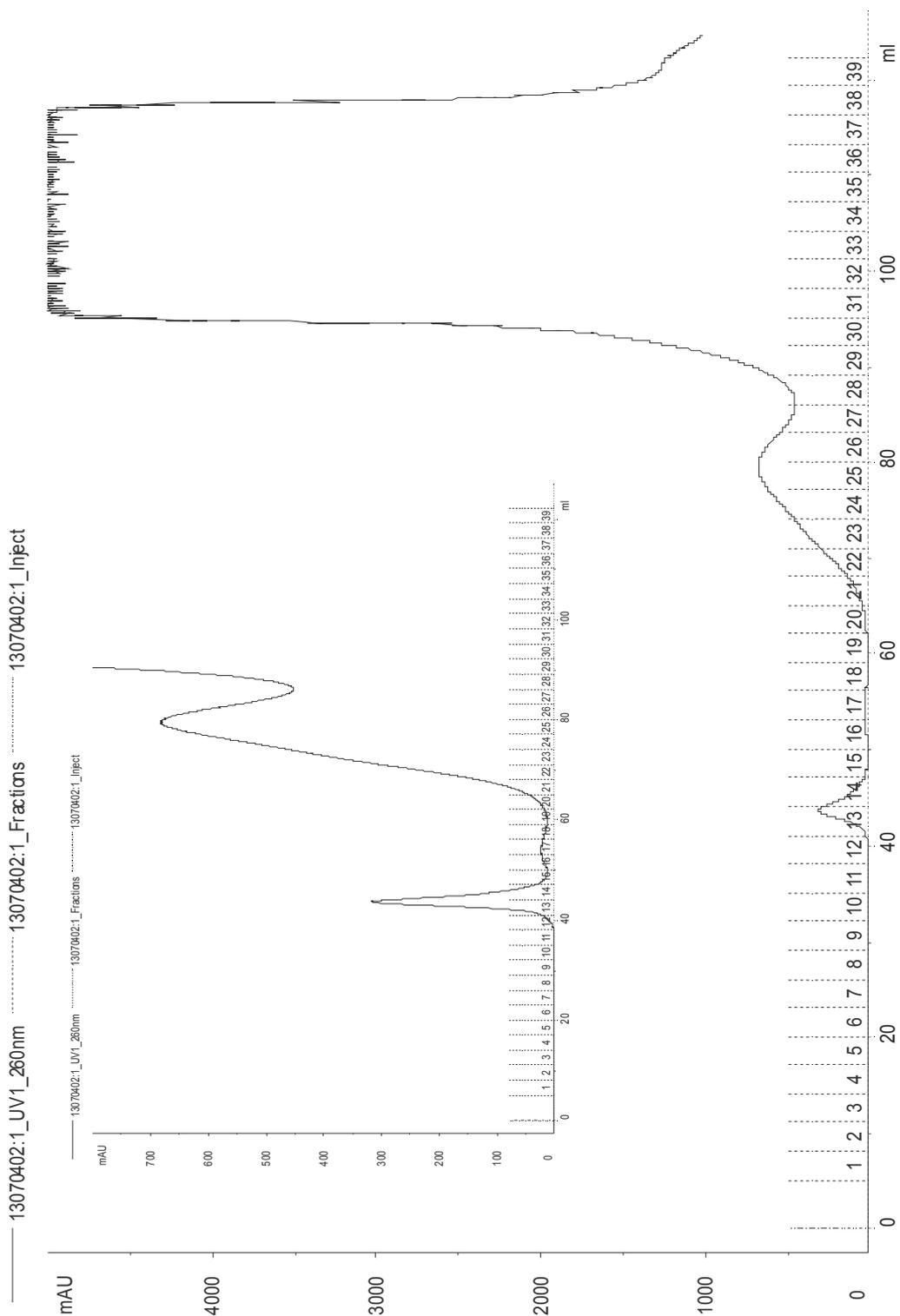
En la Tabla 3.3 pueden encontrarse los resultados de las determinaciones realizadas sobre las muestras purificadas por digestión enzimática.

Para la purificación por cromatografía se muestra a modo de ejemplo, un perfil de elución de la columna cromatográfica (Figura 3.2), donde se encuentra registrada la absorbancia a 260 nm. En el perfil se observan 4 regiones bien definidas, según su absorbancia. Estas regiones son:

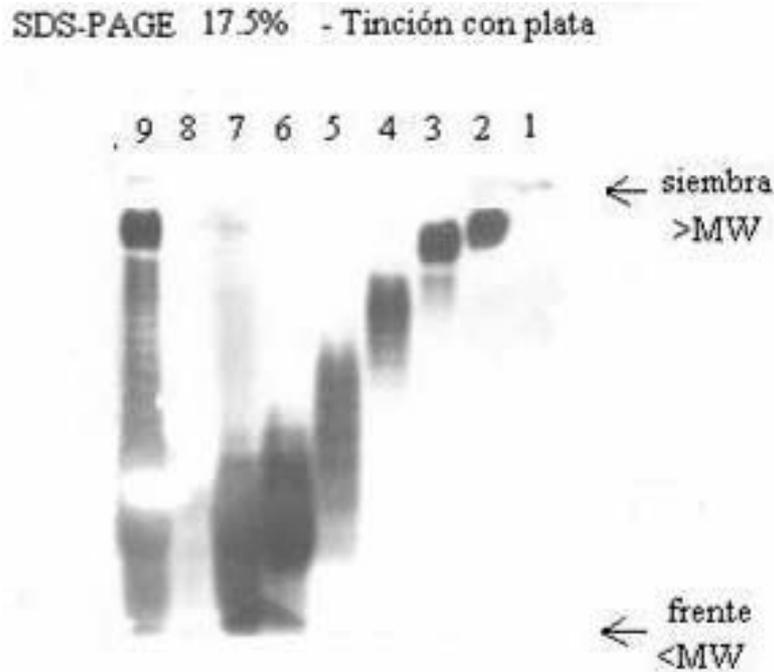
- 1) Fracciones 13-14  $A_{\text{max}260} \approx 300$  mAU
- 2) Fracciones 15-20  $A_{\text{max}260} \approx 0$  mAU
- 3) Fracciones 21-28  $A_{\text{max}260} \approx 700$  mAU
- 4) Fracciones 29-40  $A_{\text{max}260} > 5000$  mAU

Estas regiones indican contenido o no de ARN, pero no puede conocerse a partir de este perfil, la existencia de LPS. Por tal motivo, se realizó un posterior análisis de las fracciones, una vez dialisadas y liofilizadas.

La Figura 3.3 es una fotografía del gel de electroforesis correspondiente a LPS de *S. minnesota* sin purificar (crudo) y de distintas fracciones obtenidas a partir de la columna cromatográfica. En la figura, la línea 9 corresponde a la muestra de LPS sin purificar y la correlación entre línea y fracción es: línea 1 corresponde a las fracciones 13-14 (región 1), la línea 2 a las fracciones 15-16, la línea 3 a las fracciones 17-18 y la línea 4 a las fracciones 19-20 (todas éstas correspondientes a la región 2). Por último, la región 3 está representada por las líneas 5 a 8 correspondientes a las fracciones 21-22, 23-24, 25-26 y 27-28 respectivamente. La región 4 también fue analizada no pudiéndose detectar LPS en las condiciones empleadas para la electroforesis.

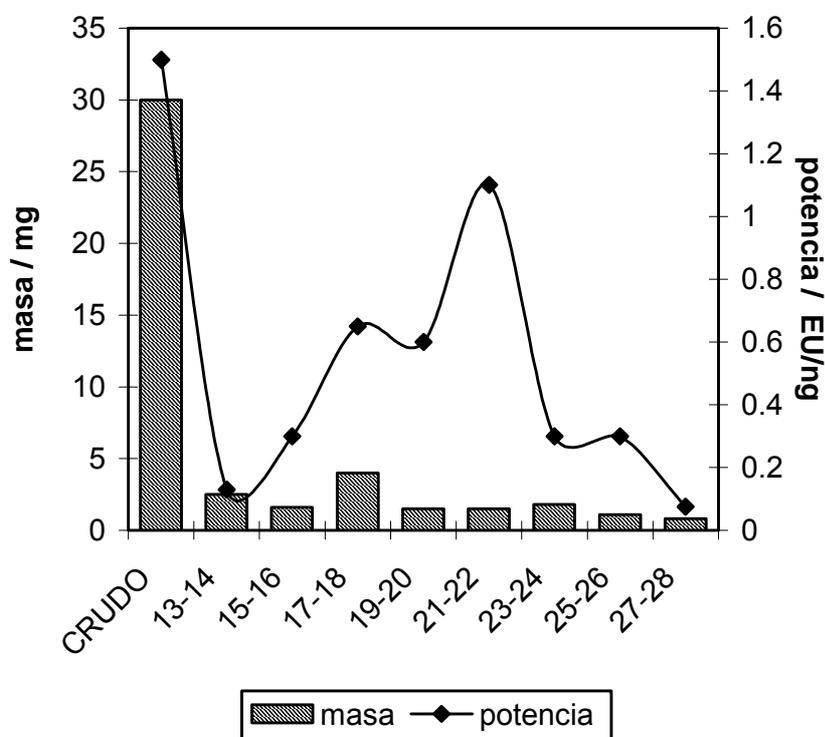


**Figura 3.2:** Perfil de elución de la columna cromatográfica en condiciones especificadas en Experimental. 1 mL de 30 mg mL<sup>-1</sup> LPS de *S. minnesota* en buffer de corrida fue inyectado en la columna. **Figura embebida:** Mismo perfil en escala ampliada.



**Figura 3.3:** Detección de LPS de *S. minnesota* por SDS-PAGE 17.5% con tinción de plata. Línea 1: fracciones 13-14 (región 1); línea 2: fracciones 15-16, línea 3: 17-18 y línea 4:19-20 (región 2); línea 5: fracciones 21-22, línea 6: 23-24, línea 7: 25-26 y línea 8: 27-28 (región 3); línea 9: LPS sin purificar (50 µg). Condiciones especificadas en Materiales y Métodos.

La masa recuperada para cada fracción y su correspondiente actividad endotóxica se muestran en la Figura 3.4, donde puede observarse que el LPS se encuentra casi igualmente distribuido a lo largo de las distintas fracciones, siendo la de mayor masa la fracción 17-18 y la de mayor actividad, la fracción 21-22. Las fracciones fueron también analizadas en cuanto a su contenido de ARN y proteínas. Para las fracciones 13 a 28, el contenido de ARN se encuentra entre el 2 y 5 %, mientras que la concentración de proteínas varía entre 2 y 3 %. La Tabla 3.3 resume los resultados de los distintos ensayos efectuados. Allí puede observarse que en las regiones 2 y 3 se concentra la mayor actividad endotóxica, siendo la región 2, la de menor contenido de ARN.



**Figura 3.4:** Las barras representan la masa inicial (CRUDO) y masa total recuperada en cada fracción y los rombos indican la potencia, determinada por el ensayo LAL. (La línea fue dibujada como guía).

Muestra	Nº línea (SDS-PAGE)	ARN % p/p	Proteínas % p/p	KDO % (p/p)	Actividad endotóxica (EU/ng)	Ca <sup>2+</sup>
LPS de <i>S. minnesota</i> (SIGMA)	(9)	40	3	0.9	1.5	(+)
LPS de <i>S. minnesota</i> (digestión)	nd	12	3	nd	0.3	(+)
13-14	(1)	3	2	0.2	0.05 - 0.2	nd
15-16	(2)	2	3	0.4	0.2 - 0.4	nd
17-18	(3)	2	3	1.1	0.5 - 0.8	(-)
19-20	(4)	2	2.5	0.7	0.4 – 0.7	(-)
21-22	(5)	2.5	2.5	nd	1.1	(-)
23-24	(6)	3	3	1.6	0.1 – 0.4	nd
25-26	(7)	5	2	1.1	0.1 – 0.4	nd
27-28	(8)	5	2	0.5	0.05 – 0.1	nd

nd: no determinada.

**TABLA 3.3:** Resultados de los ensayos de caracterización realizados sobre LPS de *S. minnesota* provisto por SIGMA, purificado por digestión enzimática y purificado por cromatografía de exclusión por tamaño. Números de línea corresponden a la Figura 3.3.

#### 3.1.4.4 Sumario

Como puede observarse en la Tabla 3.2, el LPS provisto por SIGMA, obtenido a partir de la extracción con fenol – agua tiene un alto contenido de ARN (entre 40 y 60% dependiendo de la bacteria). Dos métodos fueron probados para purificar las endotoxinas provistas: digestión enzimática y cromatografía por exclusión de tamaño.

En particular, los métodos fueron puestos a punto para LPS de *Salmonella minnesota* pero ellos pueden también utilizarse para la purificación de LPS de otras bacterias, como por ejemplo, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.<sup>15</sup> Si bien la digestión enzimática es un método sencillo que permitió reducir en más de un 50% el contenido de ARN, los reactivos así purificados aún contienen un alto porcentaje de esta impureza.

En la Figura 3.1, líneas 1, 2 y 3 y en la Figura 3.3, línea 9, puede observarse el perfil de migración característico del LPS, propio de una muestra polidispersa, y en particular en la Figura 3.3, puede apreciarse cómo a través de la cromatografía pueden separarse y obtenerse grupos acotados de LPS de distinto peso molecular.

Como puede observarse en la Tabla 3.3, la técnica cromatográfica permitió reducir considerablemente el contenido de ARN a valores de 2-5% dependiendo de la fracción. Las fracciones con actividad endotóxica, se encuentran dentro de las regiones 2 y 3 (fracciones 15 a 24) siendo las fracciones 17 a 22 potencialmente útiles debido a su bajo contenido de ARN y apreciable contenido de LPS (dado por el contenido de KDO y mayor actividad endotóxica.). En la Figura 3.4 puede observarse la cantidad de material obtenida para cada fracción. Fue recuperado el 82% de la endotoxina presente en la muestra original, a pesar de las sucesivas etapas de tratamiento realizadas.

## **3.2 Caracterización del conjugado LPS-HRP**

### **3.2.1 Materiales y Métodos**

LPS-HRP fue provisto por AlerCHEK, Inc (lote 115001 y lote 210403, 0.22 y 1,288 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Este conjugado fue sintetizado a partir de HRP4 (Biozyme) y LPS de *E. coli* O26-B6 (SIGMA), según las especificaciones del proveedor.

Las determinaciones de actividad de HRP y potencia endotóxica, como así también SDS-PAGE fueron llevadas a cabo en nuestro laboratorio con la finalidad de tener mejor caracterizado al conjugado.

La actividad de la peroxidasa del conjugado fue determinada espectrofotométricamente siguiendo el procedimiento descrito por Chance et al.<sup>16</sup>

El ensayo utiliza Pirogalol como agente reductor. La solución de enzima ( $\approx 0.4 - 0.7$  unidades  $\text{mL}^{-1}$ ) fue adicionada a 3 mL de un buffer 14 mM de fosfato de pH 6.0 que contenía pirogalol (0.5% p/v) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.027% p/p) como sustratos, todos expresados en concentración final. El incremento en absorbancia a 420nm debido a la oxidación del pirogalol por la enzima fue seguido a 20 °C en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A por aproximadamente 5 minutos. Una unidad de peroxidasa fue definida como la cantidad de enzima que produce 1 mg de purpurogalina a partir de pirogalol en 20 seg., a pH 6.0 y 20 °C.

Se eligió para la determinación de la potencia endotóxica del LPS-HRP, el ensayo LAL pero en la modalidad del gel en tubo, puesto que el conjugado presenta absorbancia a  $\lambda = 403$  nm (correspondiente a la banda Soret del grupo hemo), con lo cual podría interferir en el ensayo cromogénico.

Finalmente se corrieron geles de electroforesis (SDS-PAGE, 17.5%), según las especificaciones del apartado 3.1.2, para muestras conteniendo HRP (líneas 1 y 2), conjugado LPS-HRP (línea 3) y LPS de *E. coli* (línea 4). Los geles fueron revelados utilizando la tinción de plata, (Figura 3.5).

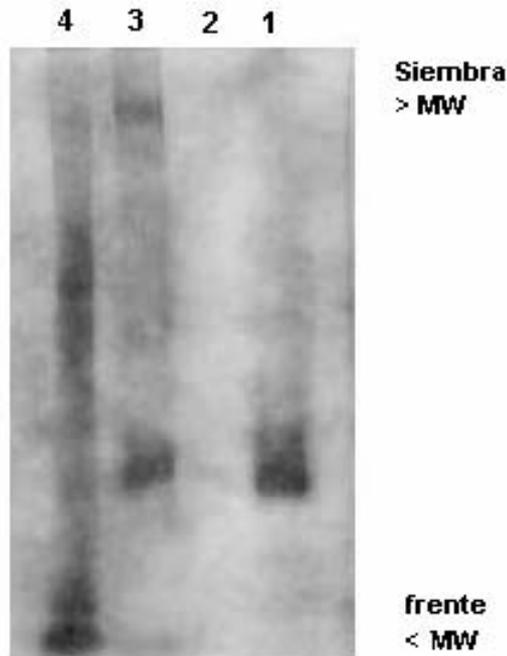
### 3.2.2 Resultados

La actividad de peroxidasa determinada para el conjugado fue de 255 unidades  $\text{mg}^{-1}$  (lote 115001) y 270 unidades  $\text{mg}^{-1}$  (lote 210403).

La actividad pirogénica determinada por el ensayo LAL dio un valor 0.012 EU  $\text{ng}^{-1}$ .

En los geles de poliacrilamida puede observarse que el conjugado comercial podría contener cantidades apreciables de HRP libre o bien HRP conjugado con LPS de bajo peso molecular (Figura 3.5, línea 3 comparada con línea 1). Es evidente la presencia de LPS en el conjugado, aunque no es nítida la presencia de LPS de bajo peso molecular, a valores menores que el de HRP (Figura 3.5, línea 3 comparada con línea 4).

**SDS-PAGE 17,5% - Tinción con plata**



**Figura 3.5:** SDS- PAGE del conjugado revelado con tintura de plata. Línea 1: HRP4 (Biozyme) 50 µg, línea 2: HRP4 (Biozyme) 10 µg, línea 3: conjugado LPS-HRP (AlerChek) 30 µg, línea 4: LPS de *E coli* 30 µg. Condiciones especificadas en Materiales y Métodos.

### **3.3 Síntesis de conjugados de LPS y Caracterización del conjugado de LPS-biotina**

Como fue mencionado en el Capítulo 1, la porción del lípido A, constituye la porción tóxica y de reconocimiento específico hacia otras moléculas del LPS, por lo tanto el método de conjugación más adecuado, que no altere estructural o conformacionalmente esa porción debería involucrar a una región más alejada, como lo es el core ó el O-antígeno. Ambas regiones están constituidas por hidratos de carbono,

por lo que es necesario formar especies reactivas para la posterior conjugación. La forma más común es a través de la oxidación de los –OH a aldehídos. Dos métodos fueron evaluados a tal fin: uno enzimático, con las enzimas neuraminidasa y  $\beta$ -galactosidasa y el otro, la oxidación con periodato. Ambos son métodos recomendados para generar grupos aldehído en carbohidratos y glicoproteínas.<sup>17</sup> El primero, ha sido evaluado para la obtención de conjugados de LPS con la enzima microperoxidasa y con picolina, sin mayor éxito. La enzima galactosa oxidasa (GO) oxida los residuos N-acetil-D-galactosa o D-galactosa terminales formando C-6 aldehídos. Cuando los residuos galactosa están penúltimos a los residuos de ácido siálico, otra enzima, la neuraminidasa, debe ser usada para remover el ácido siálico y exponer a la galactosa como residuo terminal. Por lo tanto, la acción combinada de ambas enzimas, genera el respectivo C-6-aldehído derivado de la galactosa que puede posteriormente ser conjugado con grupos amino o hidracida. El core oligosacárido de LPS posee residuos galactosa y de ácido siálico. Entre los inconvenientes surgidos, podemos mencionar: la ineficiencia de la reacción entre el LPS y la galactosa oxidasa. La galactosa oxidasa (GO) cataliza la reacción de alcoholes primarios a aldehídos,<sup>18</sup> según la reacción:



La liberación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede ser revelada con tiras para la detección de peróxido residual (LD: 1ppm). Para muestras conteniendo LPS y LPS Ra, ambos de *S. minnesota*, la liberación de peróxido de hidrógeno resultó por debajo del límite de detección, mientras que para muestras conteniendo galactosa en igual proporción, una concentración por encima de 10 ppm de peróxido pudo ser determinada, mostrando este experimento que la galactosa oxidasa no logra acceder a las galactosas del LPS para llevar a cabo la oxidación.

En el otro método, la oxidación con periodato, el periodato rompe las uniones C-C que poseen grupos hidroxilos adyacentes (dioles vecinales), oxidando los grupos –OH para formar aldehídos altamente reactivos. Variando la concentración y las condiciones de la reacción durante la oxidación, se puede obtener cierta especificidad en relación a que y cuántos residuos serán modificados.<sup>17</sup> Al igual que con el método enzimático, los

aldehídos así formados, pueden luego ser acoplados a moléculas conteniendo aminas por formación de la base de Schiff y aminación reductiva o alternativamente, ser conjugados a moléculas conteniendo el grupo hidracida para formar la unión hidrazona.

A través de la oxidación controlada con periodato de sodio, conjugados de LPS-dansyl, LPS-Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>py y LPS-biotina fueron obtenidos.<sup>19</sup>

En el caso particular del conjugado de LPS-biotina, la reacción fue llevada a cabo entre biotina-hidracida y LPS de *S.minnesota* purificado a través de cromatografía por exclusión de tamaño, fracción 19-20, potencia endotóxica: 0.4 EU ng<sup>-1</sup> (sección 3.1.4.3). Sólo una fracción fue utilizada, de manera de tener un rango acotado de peso molecular.

LPS fue disuelto en buffer 100 mM acético/acetato, pH 5 y sonicado durante 20 minutos. NaIO<sub>4</sub> fue posteriormente agregado y la oxidación se llevó a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción fue detenida mediante el agregado de etilenglicol. Luego de un proceso de diálisis, se agregó al LPS oxidado, la biotina-LC-hidracida (Pierce) y se incubó la mezcla de reacción, durante 2 horas a temperatura ambiente, con agitación y en oscuridad. Posteriormente, NaCNBH<sub>3</sub> fue agregado y la reacción de reducción se dejó proseguir por 40 minutos. Finalmente el LPS-biotina conjugado fue dializado y liofilizado.

Los resultados de la caracterización de LPS-biotina arrojaron una relación LPS: biotina de 1:1, considerando un peso molecular de 20 kDa (ó 5 x 10<sup>-5</sup> mmoles de biotina/mg de conjugado) determinada mediante el ensayo para cuantificación de biotina, EZ Biotin Quantitation Kit, provisto por Pierce, y una potencia endotóxica de 0.08 EU ng<sup>-1</sup> determinada por el ensayo LAL cromogénico.

### **3.4 Caracterización de ENP - Evaluación de la habilidad de unión a LPS**

#### **3.4.1 Inhibición del ensayo LAL por parte de agentes de reconocimiento de LPS**

El presente experimento fue diseñado para evaluar la habilidad de la proteína ENP de unirse a las endotoxinas. Para comparar, también fueron utilizados dos péptidos, Polimixina B y CAP18, cuya habilidad para unirse específicamente a lípido A es conocida.

Se utilizó el reactivo del ensayo LAL para determinar el LPS inicial y LPS libre, luego del agregado del péptido/proteína de reconocimiento. El experimento consiste en incubar una cantidad conocida de LPS con la proteína o péptido, por un determinado tiempo a una dada temperatura y luego mediante el ensayo LAL determinar la cantidad de endotoxina no inhibida o neutralizada. Cuando la proteína no es agregada, la señal de LAL es máxima y el porcentaje de inhibición es cero. A medida que la concentración de proteína es aumentada, la señal de LAL disminuye y por ende aumenta el porcentaje de inhibición, hasta alcanzar el 100%, valor en el que la señal resulta independiente de la concentración de péptido. El parámetro a comparar es la ENC<sub>50</sub> (concentración neutralizadora del 50% endotoxina) que representa experimentalmente la concentración de proteína ó péptido que reduce la señal al 50%. Un valor bajo de ENC<sub>50</sub> indica una alta potencia de neutralización de la proteína o péptido.

#### **3.4.2 Experimental**

El LPS de *S.minnesota* fue provisto por SIGMA y purificado en nuestro laboratorio por digestión enzimática (potencia endotóxica: 0.26 EU ng<sup>-1</sup>). rENP (versión recombinante de LALF) proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* fue provista y caracterizada por Seikagaku America de Associates of Cape Cod, Inc. (pI 8.5, MW= 12.2 kDa., 105 residuos aminoácidos y 90% de pureza, lote: 9-054). Sulfato de Polimixina B (Nº de catálogo: P1004) fue provista por SIGMA. CAP18 fue diseñado en

nuestro laboratorio a partir del trabajo reportado por Chen et al.<sup>20</sup> La síntesis y caracterización de CAP18 fue llevada a cabo por Global Peptides.

Agua apirógena fue obtenida en nuestro laboratorio por bidestilación de agua. Agua previamente destilada y pasada a través de un sistema de agua MilliQ fue posteriormente destilada y colectada en recipientes apirógenos de vidrio. El material de vidrio puede considerarse apirógeno luego de ser sometido durante 5 hs. a 180 °C y 2 hs. a 220 °C.

Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

Todas las muestras contienen la misma concentración de LPS de potencia conocida, mientras que la concentración de proteína ó péptido varía de muestra a muestra.

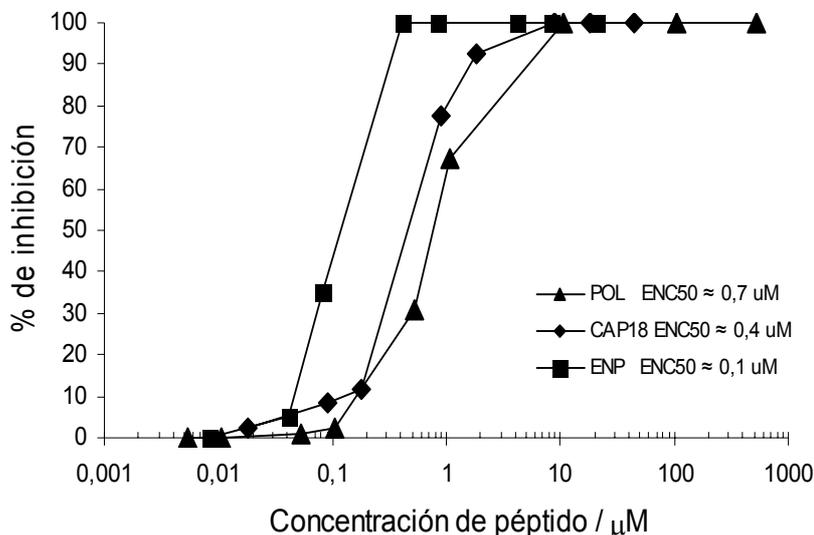
250 µL de solución de LPS (6.5 EU mL<sup>-1</sup> finales) fueron incubados durante 60 minutos a 37 °C con igual volumen de proteína ó péptido a distintas concentraciones, ambos reactivos disueltos en 20 mM buffer Tris-HCl, pH 7.4 y 0.1 M NaCl preparado con agua apirógena. Luego de la incubación el contenido de LPS no inhibido fue determinado mediante el ensayo LAL cinético cuantitativo – Pyrogent-5000, utilizando un lector Kinetic-QCL y el software WinKQCL, todo provisto por BioWhittaker, CAMBREX.

Los valores obtenidos representan la media de dos experimentos independientes.

### **3.4.3 Resultados**

La Figura 3.6 muestra las curvas de inhibición del ensayo LAL para las tres moléculas. Como se mencionó en el Capítulo 1, estas moléculas pueden inhibir o neutralizar al LPS, que es el que induce la cascada de reacciones.

Los valores obtenidos de ENC<sub>50</sub> dan una idea del rango de concentraciones en las que esta unión puede ocurrir en solución. Dichos valores determinados son Polimixina B (0.7 µM), CAP18 (0.4 µM) y ENP (0.1 µM). Para las tres moléculas, la ENC<sub>50</sub> se encuentra por debajo del micromolar, sin embargo ENP muestra una mayor potencia de inhibición o neutralización.



**Figura 3.6:** Ensayo de inhibición de LAL – Unión de CAP18, polimixina B y ENP a LPS determinada por el ensayo de LAL, método cinético. Abajo, a la derecha,  $ENC_{50}$  determinada para los 3 péptidos.

### 3.5 Determinación electroquímica del coeficiente de difusión del mediador

El complejo de Os,  $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{pyCOOH})\text{Cl}]^+$ , utilizado como mediador soluble en los experimentos presentados en el Capítulo 6 y 7, fue caracterizado en relación a su coeficiente de difusión.

Como fue comentado en el Capítulo 2, el análisis de la voltametría cíclica puede conducir a la obtención de este parámetro<sup>21</sup>, según la ecuación. 2.10.

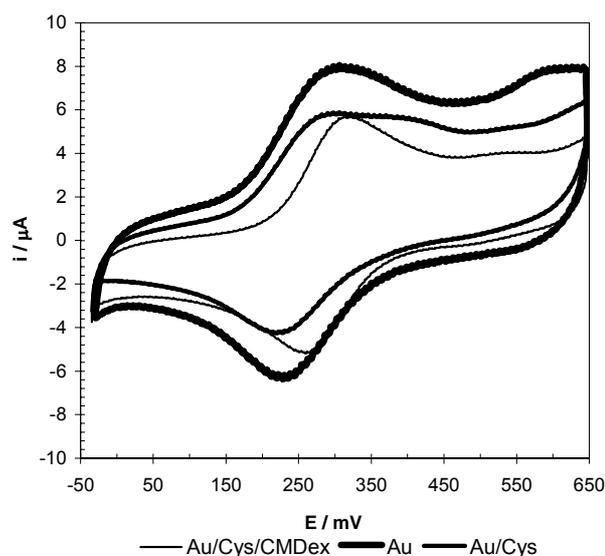
Determinando la corriente de pico a distintas velocidades de barrido, un gráfico de  $i_p$  versus  $\nu^{1/2}$  permite calcular de la pendiente, el coeficiente de difusión de la especie electroactiva.

### 3.5.1 Experimental

Como electrodos de trabajo, fueron utilizadas láminas planas de oro de 1 cm<sup>2</sup> tratadas según el protocolo descrito en 2.2.2 y láminas planas de oro modificadas Au/Cys/CMDex/ENP/LPS-HRP (10 µg/mL) según el procedimiento detallado en el Capítulo 4. Estos electrodos fueron sumergidos en la celda electroquímica conteniendo 40 µM [Os(bpy)<sub>2</sub>(pyCOOH)Cl]<sup>+</sup> (MW 731g/mol) en 50 mM buffer Tris-HCl y 0,2 M de KNO<sub>3</sub> como electrolito soporte. El potencial fue ciclado entre 0 y 600 mV vs Ag/AgCl a distintas velocidades de barrido, entre 2 y 100 mV s<sup>-1</sup>.

### 3.5.2 Resultados

La Figura 3.7 muestra las voltametrías cíclicas obtenidas para electrodos de oro desnudo (Au), oro modificado con cistamina (Au/Cys) y oro modificado con CMDextran a través de cistamina (Au/Cys/CMDex). En dicha figura, puede observarse la reversibilidad de la cupla Os(II)/Os(III) para los distintos electrodos, en base a los criterios detallados en 2.2.1.2.1. La cupla presenta un comportamiento reversible como lo demuestra la separación de los picos anódico y catódico para cada voltagrama (entre 59-75 mV) y la relación entre estos picos es prácticamente igual a uno.



**Figura 3.7:** Voltametría cíclica para electrodo de Au y electrodos modificados Au/Cys y Au/Cys/CMDex, según el procedimiento detallado en el Capítulo 4., [Os(II)] = 0.1mM en 50 mM buffer Tris, pH 7.3 y 0.2 M KNO<sub>3</sub>. Velocidad de barrido: 25 mV s<sup>-1</sup>

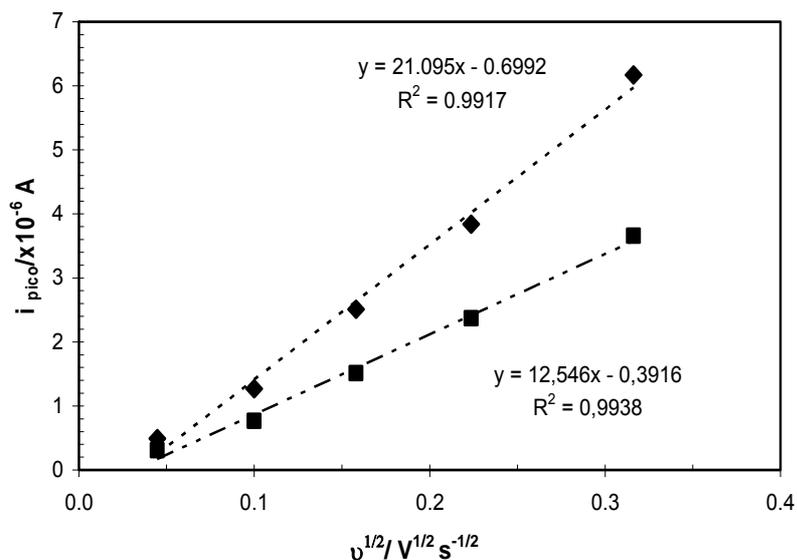
Las corrientes de pico obtenidas a distintas velocidades de barrido para electrodos de oro desnudo y modificado Au/Cys/CMDex/ENP/LPS-HRP se muestran en la Tabla 3.4 y 3.5 respectivamente. La Figura 3.8 que corresponde a los gráficos  $i_p - \nu^{1/2}$  construidos a partir de dichos datos, permite calcular los coeficientes de difusión del complejo de Os para ambos tipos de electrodos.

$i_{\text{pico}} / \mu\text{A}$	$\nu^{1/2} / \text{V}^{1/2} \text{s}^{-1/2}$	$\nu / \text{V s}^{-1}$
0.5	0.045	0.002
1.3	0.100	0.01
2.5	0.158	0.025
3.8	0.224	0.05
6.2	0.316	0.1

**Tabla 3.4:** Corrientes de pico obtenidas a 2, 10, 25, 50 y 100  $\text{mV s}^{-1}$  para un electrodo de oro.  $[\text{Os(II)}] = 40 \mu\text{M}$  en 50 mM buffer Tris, pH 7.3 y 0.2 M  $\text{KNO}_3$

$i_{\text{pico}} / \mu\text{A}$	$\nu^{1/2} / \text{V}^{1/2} \text{s}^{-1/2}$	$\nu / \text{V s}^{-1}$
0.3	0.045	0.002
0.8	0.100	0.01
1.5	0.158	0.025
2.4	0.224	0.05
3.7	0.316	0.1

**Tabla 3.5:** Corrientes de pico obtenidas a 2, 10, 25, 50 y 100  $\text{mV s}^{-1}$  para un electrodo de oro modificado según se explica en el Capítulo 4, Au/Cys/CMDex/ENP/LPS-HRP (10  $\mu\text{g/mL}$ ).  $[\text{Os(II)}] = 40 \mu\text{M}$  en 50 mM buffer Tris, pH 7.3 y 0.2 M  $\text{KNO}_3$ .



**Figura 3.8:** Corriente de pico en función de la velocidad de barrido. Rombos: electrodo de oro; cuadrados: electrodo de oro modificado (Au/Cys/CMDex/ENP/LPS-HRP).

El coeficiente de difusión determinado resultó  $3.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  cuando el electrodo está descubierto y  $1.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  cuando ha sido modificado con el hidrogel, la proteína y ha sido sometido al proceso de adsorción del conjugado. Como puede notarse, la modificación produce una disminución del coeficiente al tercio de su valor. Una disminución del parámetro podría atribuirse a que los distintos componentes inmovilizados obstaculicen el libre acceso del mediador a la superficie del metal.

### 3.6 Referencias

- 1- Westphal, O.; Jann, K. *Methods Carbohydr. Chem.* **1965**, 5, 83-91.
- 2- Evans, T. *Methods in Molecular Medicine*; 36, Septic Shock Methods and Protocols.
- 3- Goldman, R.; Leive, L. *Eur. J. Biochem.* **1980**, 107, 145-153.
- 4- Hitchcock, P.; Brown, T. *J. Bacteriol.* **1983**, 154, 269-277.
- 5- Palva, E.; Mäkela, P. *Eur. J. Biochem.* **1980**, 107, 137-143.
- 6- Morrison, D.; Leive, L. *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 2911-2919.
- 7- Somlyo, B.; Kovats, E.; Keler, T.; Nowotny, A. *J. Chrom.* **1990**, 525, 329-338.
- 8- Fischer, W. *J. Microbiol. Meth.* **1996**, 25, 129-144.
- 9- Laemmli, U. K. *Nature* **1970**, 227, 680-685.
- 10- Tsai, C-M.; Frasch, C.E. *Anal. Biochem.* **1982**, 19, 115-119.
- 11- Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.
- 12- [www.protocol\\_online.org](http://www.protocol_online.org).
- 13- Bergethon, P. “*The Physical Basis of Biochemistry*” 1998, Springer-Verlag, New Cork, pp 254-256.
- 14- Gerhardt, P. “*Methods for general and molecular bacteriology*” 1994 American Society for Microbiology, Washington D.C. Pág. 522.
- 15- Peterson, A. A.; Mc Groarty, E. *J. Bacteriol.* **1985**, 162, 738-745.
- 16- Chance, B.; Maehly, A. C. *Methods in Enzymology* **1955**, II, 773-775.
- 17- Hermanson, G. “*Bioconjugate Techniques*” Academic Press, 1996, Elsevier Science, San Diego, California, USA, sección 4.4
- 18- Whittaker, M. M.; Ballou, D. P.; Whittaker, J. W. *Biochem.* **1998**, 37, 8426-8436.
- 19- Tesis doctoral de Diego Pallarola, UBA, en curso.

20- Chen, Ch.; Brock, R.; Luh, F.; Chou, P. J.; Larrick, J. W.; Huang, R. F.; Huang, T. H. *FEBS Letters* **1995**, *370*, 46-52.

21- Bard, A.J.; Faulkner, L.R. *Electrochemical Methods*, 2nd. Ed.; J. Wiley and Sons; New York, 2001.

## Capítulo 4 – Configuración Covalente

### 4.1. Introducción

En este capítulo se describe la construcción de electrodos modificados diseñados para el desarrollo del ensayo competitivo amperométrico para la detección de endotoxinas, de acuerdo a lo que en esta tesis se denomina configuración covalente. Para la construcción de dichos electrodos, la proteína ENP (Endotoxin Neutralizing Protein) fue unida covalentemente a una matriz de CMDex (carboximetil dextran) inmovilizada, también covalentemente, sobre una superficie de oro.

La utilidad de diversos polímeros para reducir las uniones inespecíficas de proteínas a superficies ha sido probada. Entre estos polímeros se encuentran el polietilenoóxido<sup>1,2</sup> el polietilenglicol<sup>3,4,5,6</sup> y el dextran.<sup>7,8,9</sup> En particular, el dextran es utilizado como matriz de inmovilización de proteínas en columnas para cromatografía de afinidad. Una capa de dextran sobre la superficie del transductor puede resultar adecuada no solo para disminuir la unión inespecífica sino también para inmovilizar la proteína en una matriz tridimensional, aumentando así la capacidad de unión sobre el transductor, como lo muestran los trabajos de Jönsson y Malmqvist<sup>10</sup> y de Polzius et al.<sup>11</sup>

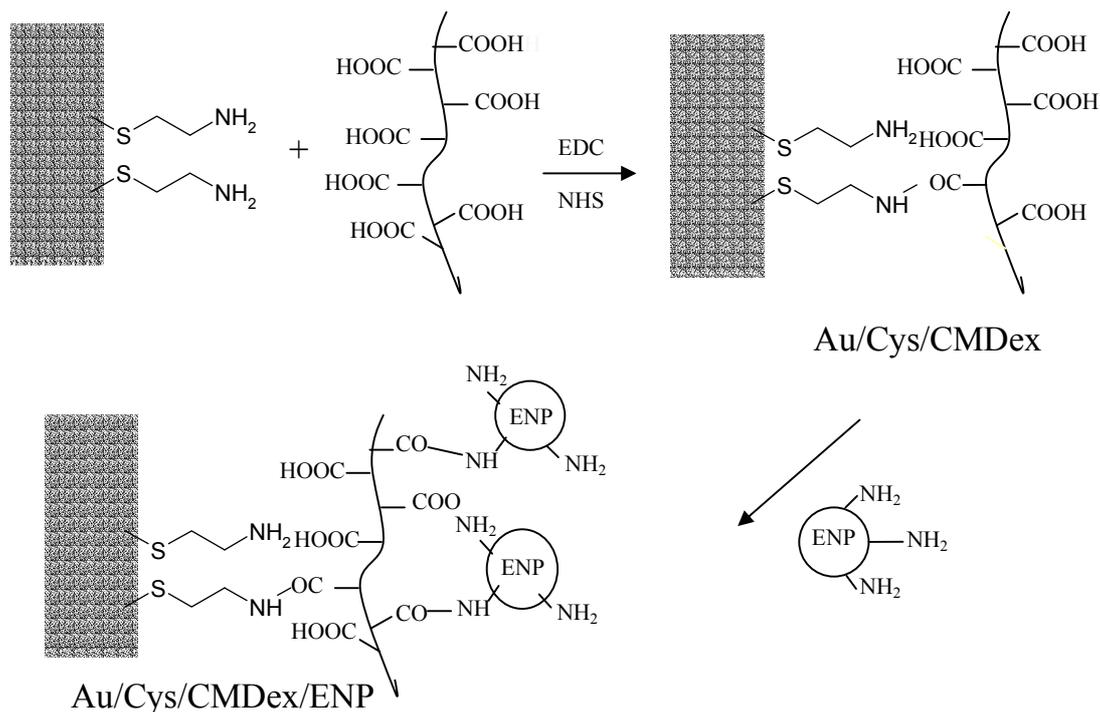
La modificación de superficies con CMDextran para transductores utilizados en SPR (Surface Plasmon Resonance) fue introducida en los comienzos de la década del 90 por Löfås y Johnsson,<sup>12,13,14,15</sup> e incorporada por BIACORE, una empresa dedicada al desarrollo de sistemas para el análisis de interacciones de proteínas y biomoléculas en general, en su sensor CM5.<sup>16</sup>

En base a lo mencionado, la incorporación de una película de CMDex a la superficie del electrodo permitiría obtener un recubrimiento hidrofílico que evite o minimice la adsorción inespecífica tanto del conjugado, como de proteínas que eventualmente pudieran encontrarse en la muestra y un medio soporte donde se pueda unir covalentemente la proteína.

Si bien, como se expresó anteriormente, superficies modificadas con CMDex son utilizadas como transductores en SPR<sup>17,18</sup> y QCM,<sup>19</sup> en el transcurso de esta tesis, no se encontraron antecedentes donde ellas hayan sido utilizadas en técnicas electroquímicas.

Los electrodos fueron caracterizados mediante el uso de técnicas electroquímicas y de elipsometría, permitiendo realizar un seguimiento de la construcción de los mismos, con el objetivo de controlar cada paso de la modificación y estimar la cantidad de material incorporado.

Para la construcción de los electrodos se modificaron láminas planas de oro con un tiol que contiene grupos amino, para proveer una superficie adecuada para la posterior incorporación de CMDex, que contiene grupos carboxilato, mediante la formación de un enlace amida a través de la reacción con una carbodiimida, EDC, y NHS,<sup>20,21</sup> según se describe en el apartado 4.2.1.3. Posteriormente, utilizando la misma reacción, previa activación de los grupos carboxilato sobre la superficie del electrodo, se incorporó la proteína de reconocimiento. En la Figura 4.1 puede observarse el esquema de modificación de los electrodos.



**Figura 4.1:** Configuración covalente - construcción de electrodos modificados mediante unión covalente. CMDex se inmoviliza mediante un enlace amida a la superficie de un electrodo de oro modificado con cistamina y ENP se une mediante la misma reacción a CMDex.

De esta manera, pudieron construirse estructuras que luego se pusieron en contacto con el conjugado LPS-HRP, en experimentos de adsorción y en contacto con soluciones conteniendo LPS y el conjugado LPS-HRP, en experimentos de competencia.

Con técnicas electroquímicas, se estudió la incorporación de cistamina y de CMDex. Como un método para evaluar la cobertura de cistamina sobre los electrodos se utilizó el propuesto por Walczak et al,<sup>22</sup> basado en la desorción reductiva de tioles a pH básico, según la siguiente reacción:



El resultado se comparó con el obtenido a partir de la modificación de los electrodos Au/Cys con ferrocenocarboxialdehído. La incorporación del grupo ferroceno al electrodo ocurre a través de la formación de la base de Schiff, entre los grupos amino

de la superficie y los grupos aldehído del ferrocenoaldehído, y la posterior reducción a amina secundaria,<sup>21,23</sup> según se describe en el apartado 4.2.1.5.

Para un rendimiento de la reacción de modificación del 100%, la cantidad de moles de ferroceno incorporados es equivalente a la cantidad de moles de cistamina sobre el electrodo. Con este método no sólo pudo estimarse la cantidad de cistamina incorporada, sino que también, de manera indirecta, la cantidad de CMDextran. En este caso, electrodos modificados con CMDex (Au/Cys/CMDex) fueron posteriormente modificados con ferrocenocarboxialdehído y la cobertura de ferroceno obtenida fue comparada con el valor obtenido para electrodos modificados Au/Cys, obteniéndose la cobertura de CMDex por diferencia.

Los electrodos fueron también caracterizados por elipsometría. A través de las medidas elipsométricas se pudo realizar un seguimiento de la incorporación de CMDextran en electrodos modificados Au/Cys/CMDex y de ENP en electrodos modificados Au/Cys/CMDex/ENP y estimar la cobertura de cada uno de estos componentes.

Los electrodos fueron utilizados en experimentos de adsorción del conjugado, con la finalidad de determinar las condiciones a utilizar en el ensayo competitivo y finalmente mediante el uso de amperometría se estudió la utilidad de este diseño de electrodos, al que denominamos configuración covalente, en un ensayo de tipo competitivo (Capítulo 6).

## **4.2 Experimental**

### **4.2.1. Construcción de los electrodos modificados**

#### **4.2.1.1 Materiales**

N-hidroxisuccinimida (NHS), Cloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), ácido 1,4-piperazinedietanosulfónico (PIPES), ácido N-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) y etanolamina fueron provistos por SIGMA. Carboximetildextran (CMDex, MW  $\approx$  24200 Da,  $\approx$  66 mol carboxilato/mol de

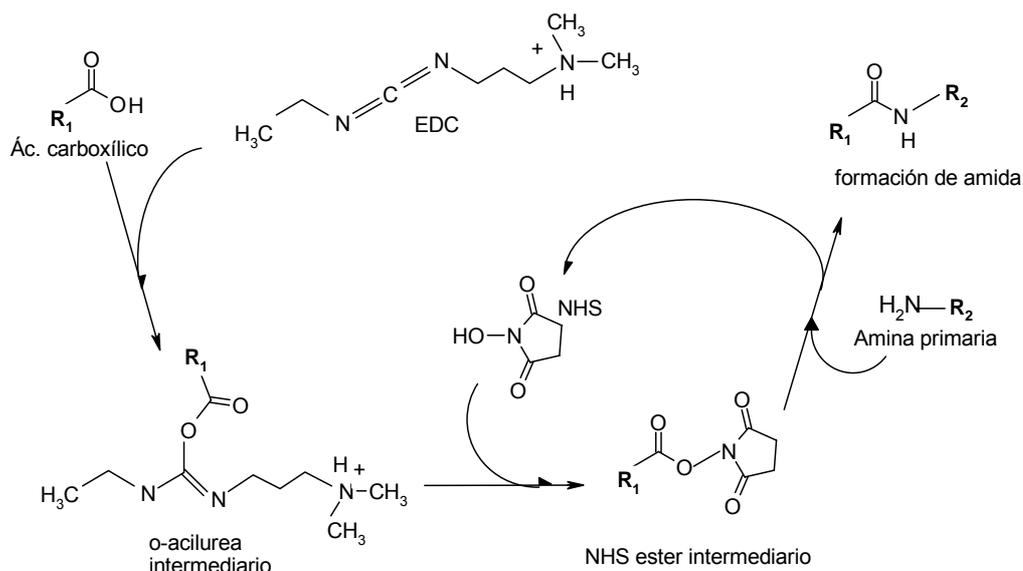
polímero) fue provisto por Fluka. Diclorhidrato de cistamina, ferrocenocarboxialdehído y ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico (MOPS) fueron provistos por SIGMA, borocianohidruro de sodio fue provisto por Fluka y tris(hidroximetil) aminometano (TRIS) por Carlo Erba.

Agua apirógena fue obtenida en nuestro laboratorio por bidestilación de agua. Agua previamente destilada y pasada a través de un sistema de purificación de agua MilliQ fue posteriormente destilada y colectada en recipientes apirógenos de vidrio. El material de vidrio puede considerarse apirógeno luego de ser sometido durante 5 horas a 180 °C y 2 horas a 220 °C. El agua así obtenida en nuestro laboratorio, fue analizada mediante el ensayo LAL; valores por debajo de 0.01 UE mL<sup>-1</sup> fueron rutinariamente obtenidos.

Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

**4.2.1.2 Adsorción de cistamina (Au/Cys):** láminas de Au de 1 cm<sup>2</sup> limpias, según el procedimiento descrito en 2.2.2, se sumergen durante 2 horas en una solución 20 mM cistamina en (9:1) etanol absoluto: agua MilliQ. Posteriormente, se enjuagan primero con etanol absoluto y luego con agua MilliQ y se secan con flujo de nitrógeno. Para la modificación, fueron utilizadas soluciones preparadas el mismo día.

**4.2.1.3 Modificación con carboximetildextran (Au/Cys/CMDex):** CMDex fue unido a cistamina a través de la formación de un enlace amida, con la utilización de EDC en presencia de NHS, según el esquema de reacciones presentado en la Figura 4.2.



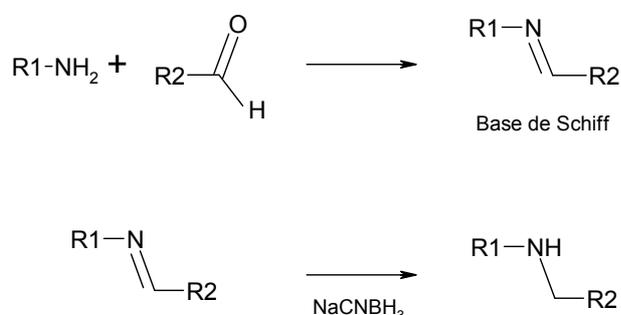
**Figura 4.2:** Formación de un enlace amida a partir de un ácido carboxílico y una amina primaria, con la utilización de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) e hidroxisuccinimida (NHS). La formación del ester de NHS intermediario incrementa la eficiencia de la reacción con EDC.

10 mg mL<sup>-1</sup> de CMDex fueron disueltos en 10 mM buffer PIPES pH 6.5, conteniendo 150 mM EDC y 27 mM NHS, con agitación durante 30 minutos para activar los grupos carboxilato presentes en el CMDex. Luego, los electrodos Au/Cys fueron sumergidos y mantenidos en dicha solución toda la noche, a temperatura ambiente y con agitación. Cuando ninguna posterior modificación fue llevada a cabo, los electrodos modificados con CMDex (Au/Cys/CMDex) fueron sumergidos en una solución 1 M etanolamina para bloquear los grupos carboxilato activados, enjuagados con una solución 1 M NaCl y finalmente con agua apirógena.

**4.2.1.4 Modificación con ENP (Au/Cys/CMDex/ENP):** La incorporación de ENP a los electrodos fue realizada con un procedimiento similar al precedente. Los electrodos Au/Cys/CMDex fueron inmersos en una solución 100 mM EDC y 10 mM NHS en 10 mM buffer PIPES por 30 minutos con la finalidad de activar los grupos carboxilato. Luego, fueron enjuagados con agua apirógena y sumergidos en una solución 0.8  $\mu$ M ENP en 10 mM buffer HEPES pH 8, a menos que otra condición sea especificada. Finalmente los electrodos fueron sumergidos en una solución 1 M

etanolamina para bloquear los grupos carboxilato activados y enjuagados con agua apirógena.

**4.2.1.5 Modificación con Ferrocenoaldehído:** El grupo ferroceno fue incorporado a los electrodos mediante la reacción de los grupos amino de la cistamina sobre la superficie del electrodo con los grupos aldehído del ferrocenocarboxialdehído. Esta condensación da lugar a la formación de la base de Schiff, que es inmediatamente reducida con el cianoborohidruro de sodio a una amina secundaria. El esquema de reacciones se muestra en la Figura 4.3.<sup>21</sup> El acoplamiento de grupos amino con grupos aldehído es altamente eficiente, prácticamente del 100%, cuando un exceso de aldehído es utilizado.<sup>23</sup>



**Figura 4.3:** Reacción entre una amina primaria y un aldehído para dar lugar a la base de Schiff. Posterior reducción a amina secundaria con cianoborohidruro de sodio.

Electrodos modificados con cistamina (Au/Cys) y con cistamina y CMDex (Au/Cys/CMDex) fueron incubados en una solución saturada de ferrocenocarboxialdehído en 25 mM buffer MOPS, pH 7.0, conteniendo 10 mg mL<sup>-1</sup> cianoborohidruro de sodio. Se dejó reaccionar durante toda la noche a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente, los electrodos fueron enjuagados vigorosamente con agua MilliQ.

## **4.2.2. Seguimiento de la modificación**

### **4.2.2.1 Instrumental**

Las especificaciones de los equipos utilizados para las medidas elipsométricas y electroquímicas se encuentran detalladas en las secciones 2.1.2 y 2.2.2, respectivamente.

### **4.2.2.2 Medidas electroquímicas**

#### **4.2.2.2.1 Desorción reductiva de la cistamina**

Electrodos modificados con cistamina (Au/Cys) fueron enjuagados con etanol absoluto y agua MilliQ y secados con flujo de nitrógeno.

Se registraron las voltametrías cíclicas obtenidas cuando el potencial aplicado se barrió entre -0.2 V y -1.2 V vs Ag/AgCl a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Como electrolito se utilizó una solución 0.5 M de hidróxido de potasio previamente desaireada con flujo de nitrógeno (burbujeando durante 15 minutos). El experimento se realizó por quintuplicado.

Los electrodos fueron normalizados considerando el factor de rugosidad. Para el cálculo de rugosidad, se utilizó la carga obtenida por integración del pico de reducción debido a la desorción del óxido de oro, en la región cercana a 0.95 V vs Ag/AgCl. Los valores reportados en la bibliografía para dicha desorción desde espejos de oro limpio son los siguientes:  $400\text{-}482 \mu\text{C cm}^{-2}$ ,<sup>24</sup>  $450\text{-}500 \mu\text{C cm}^{-2}$ <sup>25</sup> y  $386 \mu\text{C cm}^{-2}$ .<sup>26</sup> Asumiendo un valor promedio de  $450 \mu\text{C cm}^{-2}$ , se obtuvieron para los electrodos utilizados, factores de rugosidad entre 1.2 y 1.6.

#### **4.2.2.2.2 Evaluación electroquímica de la modificación de electrodos Au/Cys y Au/Cys/CMDex con ferrocenocarboxialdehído.**

La presencia del grupo ferroceno fue determinada por voltametría cíclica. Los electrodos fueron sumergidos en la celda electroquímica conteniendo 50 mM buffer Tris y 0.2 M  $\text{KNO}_3$  y el potencial fue ciclado entre 0 y +0.6 V versus Ag/AgCl a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Blancos del experimento fueron preparados exponiendo los electrodos a una solución

saturada de ferrocenocarboxialdehído en el mismo buffer, en ausencia de cianoborohidruro de sodio. El experimento se realizó por quintuplicado, y los electrodos fueron normalizados considerando el factor de rugosidad, como se detalló en la sección 4.2.2.2.1.

#### 4.2.2.3 Medidas elipsométricas

Los parámetros elipsométricos fueron colectados luego de cada paso de modificación y tiempo, entre 5 y 10 veces. Todos los pasos de modificación fueron llevados a cabo teniendo en cuenta el sistema de alineación, evitando cualquier variación en la posición del sustrato. Como los componentes del film no absorben a la longitud de onda de trabajo, se asumió  $k=0$ .

Los valores de espesor e índice de refracción se obtuvieron a partir de simulaciones con modelos de película simple y doble isotrópica y/o con ajustes no lineales con programas comerciales de SENTECH.

Las medidas *Ex-situ* (bajo aire) se llevaron a cabo a ángulos múltiples de 70°, 65°, 60°, 55° y 50°. Para evaluar el efecto del tiempo de reacción, sustratos tiolados (Au/Cys) fueron modificados con CMDex a diferentes tiempos: 15, 30, 60, 120, 180 y 1200 minutos. También, una película gruesa de CMDex fue obtenida por evaporación del solvente para estimar su índice de refracción; posteriormente este valor fue incluido en el archivo semilla para el proceso de ajuste. Previamente a la medición, los sustratos modificados fueron secados bajo flujo de N<sub>2</sub> durante 1.5 minutos. La cobertura de CMDex fue estimada a partir del índice de refracción y del espesor óptico de la película, considerando un valor de 1.56 g cm<sup>-3</sup> para la densidad del dextran, para el valor del índice de refracción obtenido.<sup>27,28</sup>

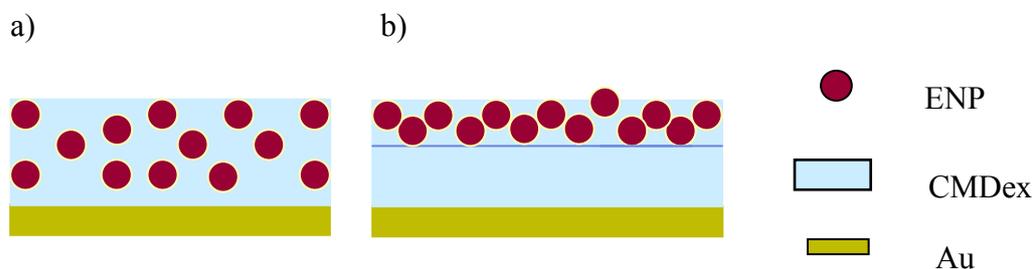
Las medidas *In-situ* (bajo agua) fueron llevadas a cabo luego de la modificación covalente con CMDex (20 horas), y luego de la modificación con ENP a distintos tiempos: 1, 2, 3 y 18 horas. Los sustratos fueron modificados dentro de la celda de medición y luego enjuagados con abundante agua MilliQ. Fueron registrados los parámetros elipsométricos una vez que se alcanzó constancia en los mismos (usualmente 15-20 minutos).

## Modelos

Para describir la incorporación y distribución de ENP dentro de la película de CMDex, se propusieron dos modelos simplificados, un modelo de película simple y un modelo de película doble, ambas isotrópicas.

En el modelo de película simple, las moléculas de ENP se encuentran aleatoriamente distribuidas en la totalidad de la película de CMDex, obteniéndose una película proteína-hidrogel con  $d_{ENP} = d_{CMDex} = d_f$  para cada tiempo de modificación. (Figura 4.4.a)

En el modelo de dos películas isotrópicas, el espesor de la película que contiene la proteína es distinto del espesor de la película de CMDex, de manera que ésta última es dividida en dos capas isotrópicas, una que contiene solo CMDex y otra que contiene a la proteína aleatoriamente distribuida dentro del hidrogel que conforma el CMDex (Figura 4.4.b)



**Figura 4.4:** Representación esquemática de los modelos propuestos para la incorporación de ENP dentro del hidrogel de CMDex. a) modelo de película simple b) modelo de película doble.

El contenido de CMDex en la película hidratada fue estimado a partir de considerar un valor de  $n_{amb} = 1.331$  y de  $dn/dc = 0.15 \text{ mL g}^{-1}$  para dextranos en agua<sup>7,29</sup> y por aplicación de la ecuación 2.4, derivada por De Feijter.<sup>30</sup>

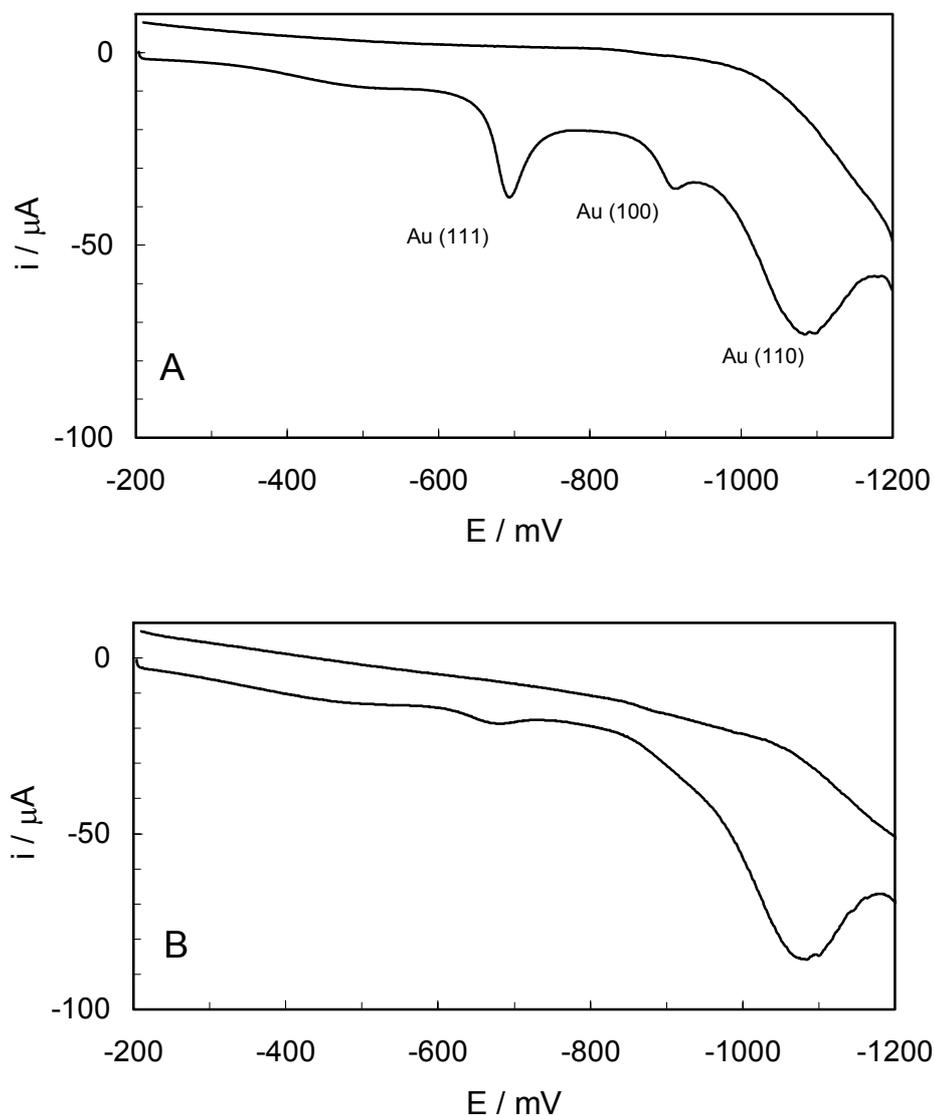
El contenido de ENP en la película hidratada fue estimado a partir de considerar un valor de  $n_{amb} = 1.331$  y de  $dn/dc = 0.19 \text{ mL g}^{-1}$  (proteínas en agua) y por aplicación de la ecuación 2.5, para el modelo de película simple. Para el modelo de película doble

fueron considerados los mismos valores y la aplicación de ambas ecuaciones, suponiendo que no existe pérdida de masa (CMDex) al incorporar la proteína.

### 4.3 Resultados

La Figura 4.5.A corresponde al voltograma obtenido en las condiciones que se detallan en 4.2.2.2.1. En dicha figura, pueden observarse tres picos debidos a la desorción reductiva de la cistamina autoensamblada a un electrodo de oro policristalino, mostrando gran similitud con el comportamiento reportado para cisteína y cistamina por El-Deab et al.<sup>31</sup> Estos picos se asignan a la desorción del tiol desde distintos dominios (o sitios) del oro, los dominios Au (111), Au (100) y Au (110).<sup>31</sup> La aparición de estos múltiples picos en la desorción reductiva del tiol se debe a que el tiol presenta distinta fuerza de unión, una velocidad de crecimiento distinta y una competencia en la quimisorción con cada dominio en la superficie del Au policristalino. Se asigna al dominio Au (110) el pico de reducción en la zona de los -1100mV, al dominio Au (100) el pico a -1000mV (ambos superpuestos) y al dominio Au (111), el pico a -700mV.

La figura 4.5.A es el voltograma correspondiente al primer barrido y 4.5.B al tercero. En este último puede apreciarse la desorción completa de la cistamina desde el dominio Au (111).



**Figura 4.5:** Desorción reductiva de cistamina desde oro policristalino en 0.5 M KOH. (A) primer y (B) tercer barrido. Velocidad de barrido:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

La integración de los picos de la curva  $i - E$  (Figura 4.5.A) y la aplicación de la ley de Faraday ( $\frac{Q}{nF} = \text{moles de sustancia electroactiva depositada}$ ) permite obtener el cubrimiento superficial de cistamina. Para esta estimación sólo fue considerado el primer barrido, pues puede ser que el tiol se readsorba sobre los distintos dominios del Au.<sup>32</sup> Los valores obtenidos fueron:

$$Q \text{ promedio} = 55 \mu\text{C cm}^{-2}$$

$$\text{Cobertura de cistamina} = (5.7 \pm 0.3) \times 10^{-10} \text{ moles cm}^{-2}$$

En otro experimento, electrodos modificados Au/Cys y Au/Cys/CMDex se hicieron reaccionar con un exceso de ferrocenocarboxialdehído, en presencia y en ausencia de cianoborohidruro. La incorporación del grupo ferroceno a los electrodos pudo observarse a través de voltametría cíclica.

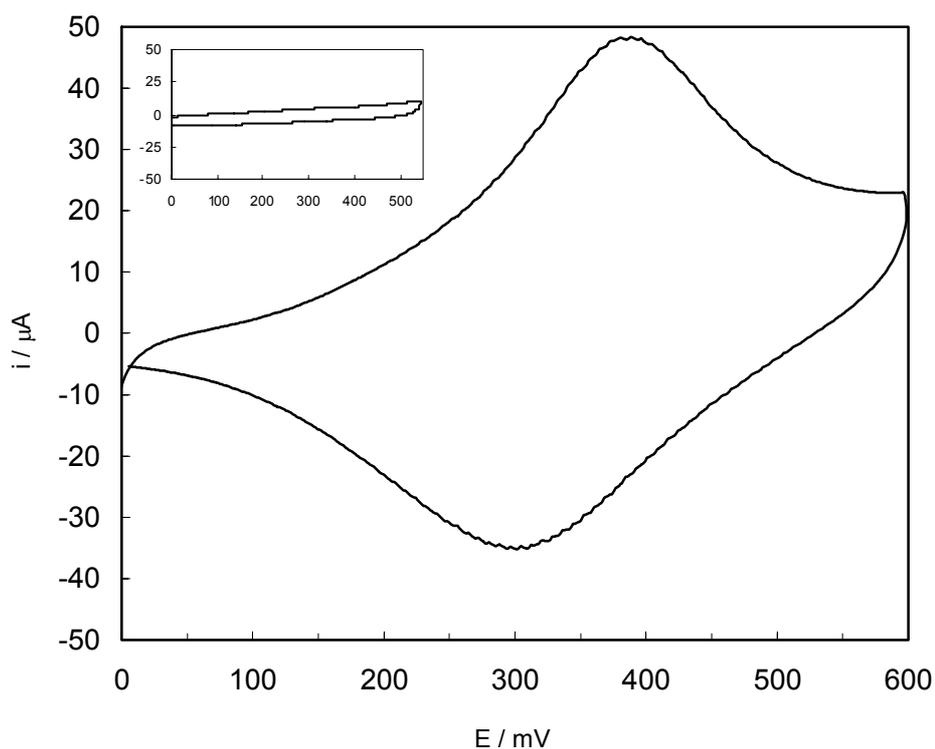
El voltagrama mostrado en la Figura 4.6 es el obtenido para un electrodo modificado Au/Cys y el de la Figura 4.7 el correspondiente a un electrodo modificado Au/Cys/CMDex, ambos, luego de ser expuestos a la solución de ferrocenocarboxialdehído, luego de 15 ciclos a una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Las figuras embebidas muestran los blancos de electrodos modificados incubados con ferrocenocarboxialdehído en ausencia de cianoborohidruro. En los dos voltagramas (Figura 4.6 y 4.7) puede observarse la cupla del ferroceno en la región de los 300 mV vs Ag/AgCl, siendo menor la carga obtenida y por lo tanto la cobertura cuando el electrodo tiene al CMDex incorporado (Figura 4.7).

Claramente se aprecia que el proceso es cuasirreversible ( $\Delta E = 80 \text{ mV}$  para electrodos Au/Cys y  $125 \text{ mV}$  para electrodos Au/Cys/CMDex). Se observa también que la sustancia electroactiva ha sido incorporada al electrodo; más notorio en el proceso de reducción, que presenta la forma de campana, típica de una especie adsorbida.

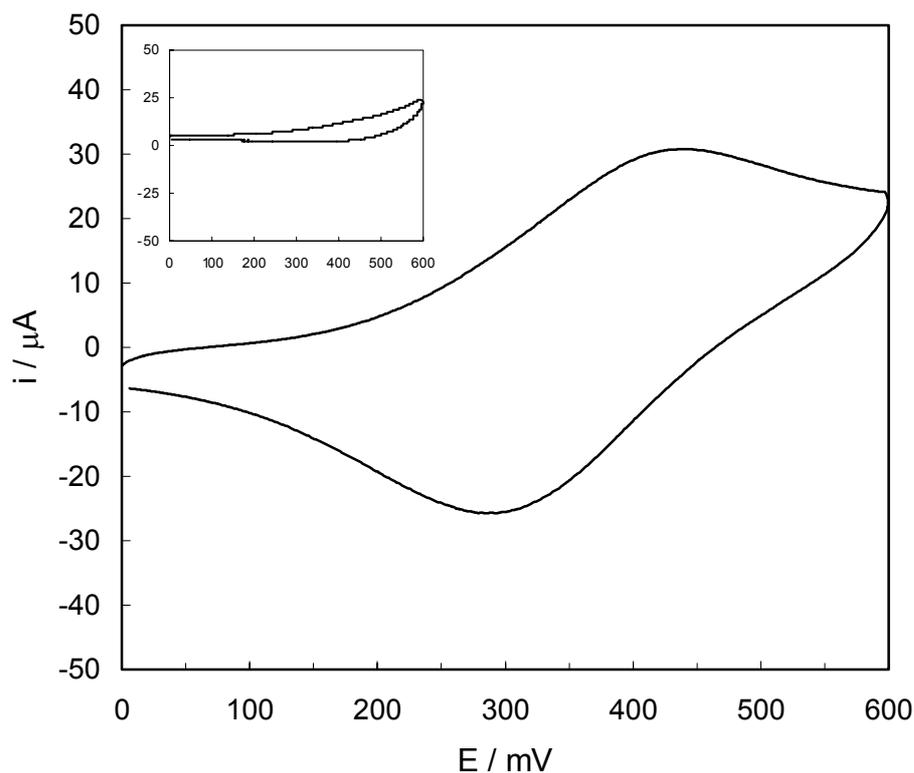
En la Figura 4.7, la separación de los picos de oxidación y reducción es mayor, probablemente debido a la conjunción de un proceso electroquímico más lento y otro proceso acoplado que se observa también a 600 mV en el voltagrama correspondiente al blanco.

Para ambos blancos (Figuras embebidas, en las Figuras 4.6 y 4.7), las corrientes obtenidas son despreciables y no se observa la cupla del ferroceno. En ausencia de cianoborohidruro de sodio, la incorporación del ferroceno no tiene lugar, mostrando que la incorporación es debida a una reacción química y no a un proceso de adsorción físico.

Más aún, el ferrocenocarboxialdehído a pH 7, presenta un potencial formal redox de la cupla ferroceno/ferriceno,  $E^{\circ} \approx 510$  mV, mientras que para el producto de la reacción, como puede observarse en los voltagramas, se encuentra a  $\approx 380$  mV, ambos vs Ag/AgCl.; un valor similar al obtenido por E. J. Calvo et al, para la misma reacción con poli(alilamina).<sup>33</sup>



**Figura 4.6:** Voltagrama de un electrodo Au/Cys modificado con ferrocenocarboxialdehído, luego de 15 ciclos. **Figura embebida:** blanco del experimento, electrodo modificado Au/Cys incubado en solución saturada de ferrocenocarboxialdehído en ausencia de cianoborohidruro. Primer barrido.



**Figura 4.7:** Voltagrama de un electrodo modificado Au/Cys/CMDex modificado con ferrocenocarboxialdehído luego de 15 ciclos. **Figura embebida:** blanco del experimento, electrodo modificado Au/Cys/CMDex incubado en solución saturada de ferrocenocarboxialdehído en ausencia de cianoborohidruro. Primer barrido.

Los valores de carga y cobertura de ferroceno obtenidos se muestran en la Tabla 4.1. Por diferencia entre estos valores fue posible estimar la cantidad de grupos carboxilato del CMDex unidos a la cistamina sobre el electrodo.

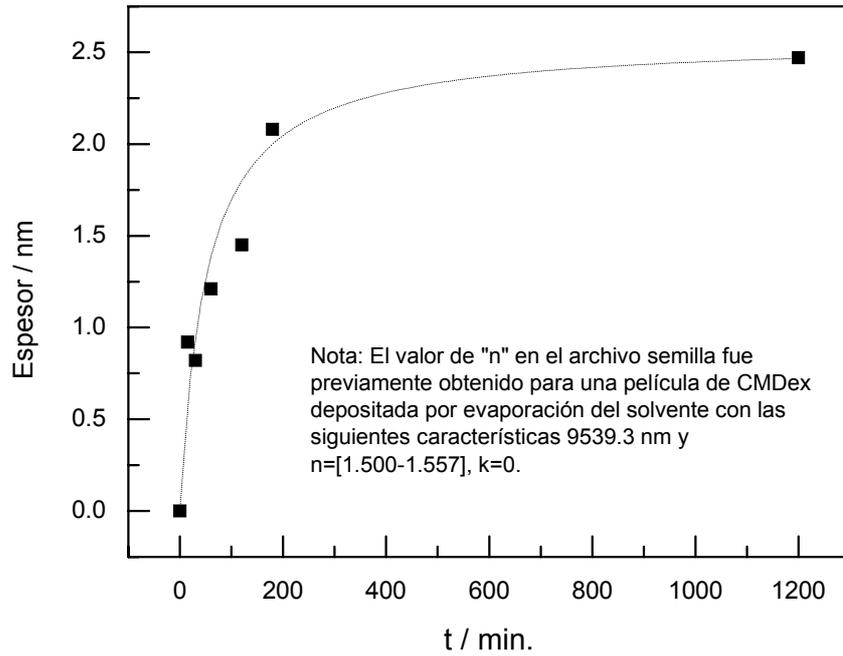
	$Q_{Fc} / \mu C cm^{-2}$	$\Gamma_{Fc} / pmol cm^{-2}$
Au/Cys	$78 \pm 4$	$810 \pm 40$
Au/Cys/CMDex	$39 \pm 6$	$400 \pm 60$

**Tabla 4.1:** Carga y cobertura del grupo ferroceno incorporado a electrodos modificados Au/Cys y Au/Cys/CMDex.

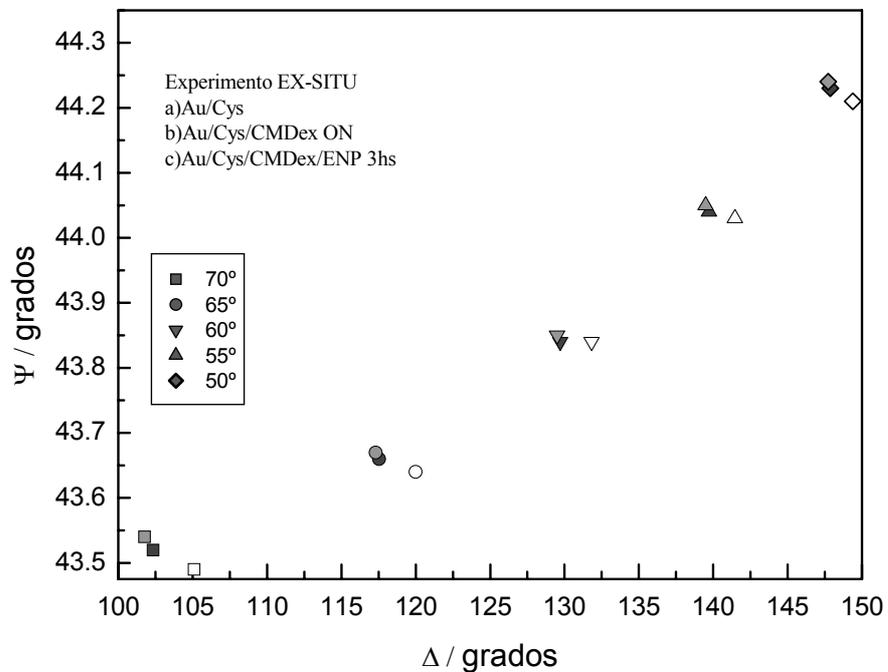
Estimación de COO- del CMDex unidos a Cys = <b>410 ± 100 pmol cm<sup>-2</sup></b>
---

Los estudios elipsométricos confirmaron que tanto CMDex como ENP fueron incorporados a los electrodos modificados. Un análisis del efecto del tiempo de reacción para la incorporación de CMDex a electrodos modificados, Au/Cys, considerados como sustratos efectivos,<sup>34</sup> permite determinar que a aproximadamente 200 minutos el 80 % de la reacción fue alcanzada. (Figura 4.8), valores reportados en la literatura indican tiempos más largos (6 a 8 horas) para completar la reacción.<sup>20</sup> En dicha figura se representan los valores obtenidos para el espesor del film en función del tiempo de modificación para un experimento realizado en condiciones ambientales, luego de secar los electrodos con una corriente de nitrógeno. No obstante el hecho de que a 200 minutos la reacción resultó casi completa, tiempos más largos fueron utilizados posteriormente, únicamente por razones de comodidad en el diseño de los experimentos. El índice de refracción y el espesor óptico del film, obtenidos a través del ajuste de los parámetros elipsométricos, luego de la modificación con CMDex (1200 minutos), resultaron ser:  $1.535 \pm 0.003$  y  $2.2 \pm 0.4$  nm., respectivamente. (los valores son un promedio de tres experimentos independientes). A partir de estos parámetros se calculó una densidad superficial de  $3.5 \pm 0.3$  ng mm<sup>-2</sup>.

Electrodos Au/Cys/CMDex (1200 minutos) fueron posteriormente modificados con ENP (3 hs) y un experimento ex situ también fue llevado a cabo para este sistema. Los parámetros elipsométricos luego de cada paso de la modificación fueron registrados, los valores obtenidos se muestran en la Figura 4.9. En dicha figura, se representan: en blanco, los valores correspondientes al sustrato efectivo, en negro los correspondientes al sustrato modificado con CMDex y en gris, los valores obtenidos para los electrodos modificados con CMDex y posteriormente con la proteína, para los distintos ángulos de incidencia. Puede observarse un cambio en los parámetros elipsométricos,  $\Psi$  y  $\Delta$ , debido a la incorporación de CMDex y ENP. Si bien se observó que el índice de refracción se incrementó al incorporar ENP, la asignación de su valor resultó incierta, distintos valores de n pueden ser asumidos con el mismo error.



**Figura 4.8:** Incorporación de CMDex en función del tiempo. Medidas ex situ a ángulos múltiples. Ajuste con modelo de película simple homogénea, asumiendo  $k = 0$ .



**Figura 4.9:** Variación de los parámetros elipsométricos a ángulos múltiples en un experimento ex situ. En blanco: sustrato efectivo, negro: sustrato Au/Cys modificado con CMDex (1200 minutos) y gris: luego de la modificación con ENP.

Las propiedades de un film de CMDex bajo un medio acuoso, medidas in situ, también fueron determinadas. Los valores obtenidos fueron:  $1.340 \pm 0.002$  para el índice de refracción y  $71 \pm 9$  nm para el espesor. El contenido de CMDex estimado a partir de estos valores fue de  $4.3 \pm 1.1$  ng mm<sup>-2</sup>. En la Tabla 4.2, se resumen las propiedades de una película de CMDex en ambos medios y de una película gruesa del mismo material obtenida por medio de depositar gotas de una solución concentrada y luego evaporar el solvente. El valor obtenido para el índice de refracción de esta película fue introducido en el archivo semilla para realizar el ajuste de las medidas realizadas ex situ. La variación que se produjo en los valores de n y d al cambiar el medio en el que está inmerso el film, indican una alta hidratación del mismo en soluciones acuosas, que es acorde con las características hidrofílicas del polímero.

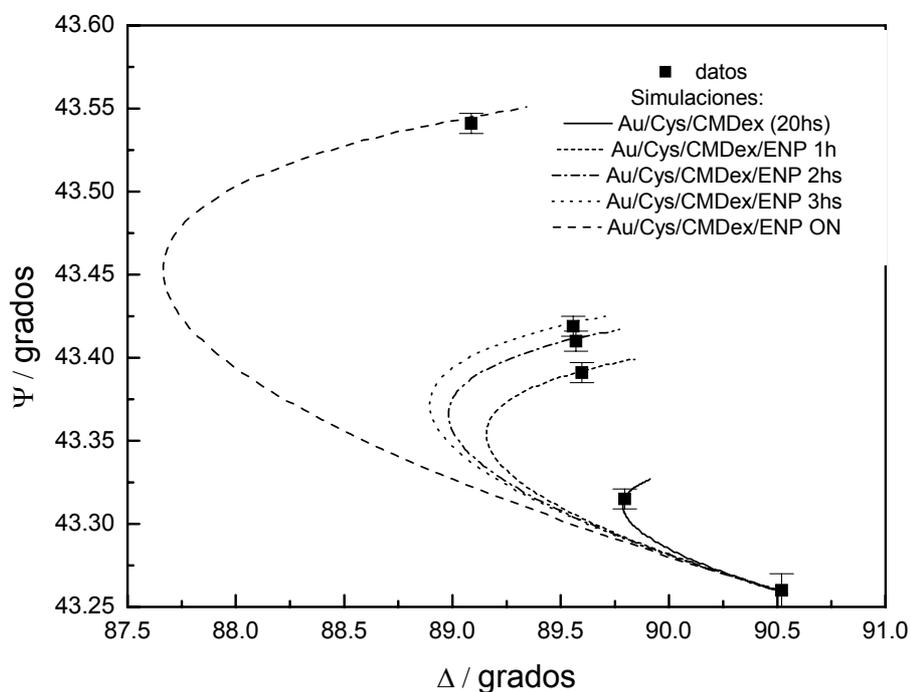
CMDex	n	Espesor / nm	$\Gamma$ / ng mm <sup>-2</sup>	$\Gamma$ / pmoles cm <sup>-2</sup>
Evaporación del SV	1.50 – 1.56	9539.3		
Ex situ	$1.535 \pm 0.002$	$2.2 \pm 0.4$	$3.5 \pm 0.3$	$15 \pm 1$
In situ	$1.340 \pm 0.002$	$71 \pm 9$	$4.3 \pm 1.1$	$18 \pm 5$

**TABLA 4.2:** Resumen de la propiedades de películas de CM-dextran bajo condiciones atmosféricas (ex-situ) y bajo agua (in-situ).

También, se llevaron a cabo experimentos de elipsometría in situ, para el sistema Au/Cys/CMDex(20hs)/ENP, donde el sustrato efectivo es primero modificado con CMDex en una reacción llevada a cabo durante 20 horas y luego la proteína es incorporada a través de la reacción covalente. Las medidas fueron realizadas para el sustrato efectivo, luego de la modificación con CMDex y a diferentes tiempos de reacción del sistema Au/Cys/CMDex con la proteína. Estos tiempos fueron: 1, 2, 3 hs y 18 hs.

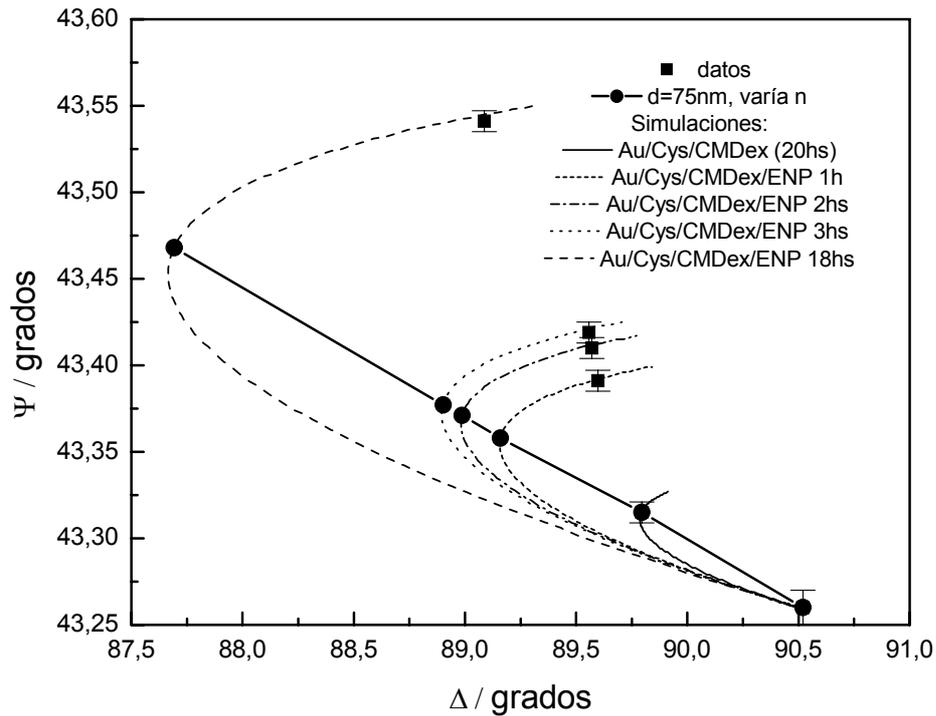
Los resultados obtenidos son el promedio de tres experimentos independientes.

En la Figura 4.10 se observa, para un experimento, como varían los ángulos elipsométricos a medida que el material (CMDex ó ENP) es incorporado. Los datos experimentales están representados por los cuadrados y las barras de error corresponden al error instrumental. En la misma figura, pueden observarse también las curvas correspondientes a las simulaciones. Cada curva simulada corresponde a un modelo donde el índice de refracción del film es constante,  $k=0$  y el espesor óptico del mismo va variando. Por lo tanto, las distintas curvas están representando distintos índices de refracción, cuyo valor aumenta en este gráfico, desde 1.339 (– línea completa) hasta 1.364 (-- línea cortada). Cada curva simulada une dos datos experimentales: el sustrato efectivo y otro dato correspondiente a un paso de modificación. Con las restricciones impuestas, coherentes con el sistema:  $k=0$  y  $n$  entre 1.331 ( $H_2O$ ) y 1.50 (proteínas), existe una única elipse que pase por los dos puntos. Se muestra entonces, a través de este gráfico que la incorporación de la proteína al film de CMDex sobre el sustrato, produce un aumento en el índice de refracción. Un modelo de película simple isotrópica donde el índice de refracción del film se mantenga constante y su espesor óptico aumente a medida que la proteína se incorpora, como sucedería, por ejemplo, con el crecimiento de un óxido, no es compatible con los datos experimentales obtenidos.



**Figura 4.10:** Gráfico de los parámetros elipsométricos,  $\Psi$  y  $\Delta$ , durante cada paso de modificación de un sustrato efectivo Au/Cys. Se incluyen simulaciones correspondientes a  $k=0$ ,  $n=1.339$ ,  $1.346$ ,  $1.348$ ,  $1.349$  y  $1.364$ .

La Figura 4.11, es la misma Figura 4.10 a la que se le ha incorporado sobre cada curva simulada, puntos correspondientes a un mismo espesor, en este caso  $d = 75\text{nm}$  (círculos negros, también simulados). La línea recta que une estos puntos representa la simulación obtenida para un modelo de película simple isotrópica donde el índice de refracción del film aumenta, mientras que el espesor se mantiene constante, a medida que la proteína se incorpora dentro del film. El objetivo de este gráfico es mostrar que los datos experimentales, tampoco son congruentes con este modelo.



**Figura 4.11:** Gráfico de los parámetros elipsométricos,  $\Psi$  y  $\Delta$ , durante cada paso de modificación de un sustrato efectivo Au/Cys. La línea recta que une los círculos corresponde a la simulación correspondiente al modelo de película simple isotrópica con  $k=0$ ,  $d=75$  nm y  $n$  variando desde  $n=1.339$  a  $1.364$ , a medida que el material se incorpora dentro del film.

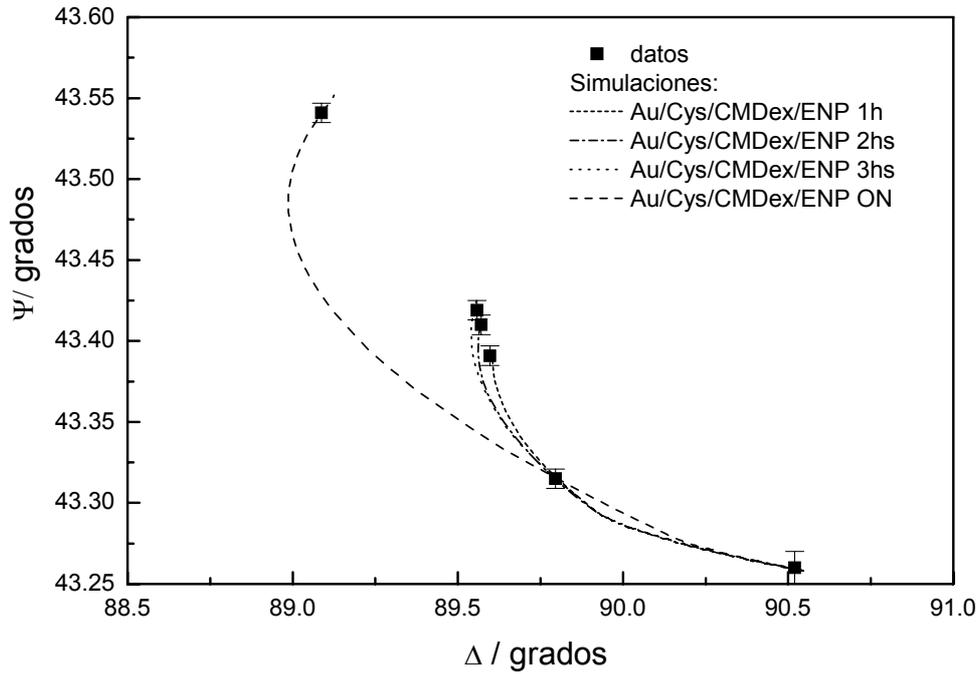
Los datos experimentales son congruentes con la simulación correspondiente a un modelo de película simple isotrópica donde tanto el espesor como el índice de refracción aumentan a medida que la proteína se incorpora dentro del film. Los valores obtenidos a partir de esta simulación, se pueden observar en la Tabla 4.3.

	<b>n</b>	<b>d / nm</b>
CMDex	1.340 ± 0.002	71 ± 9
ENP 1h	1.347 ± 0.002	107 ± 4
ENP 2hs	1.348 ± 0.002	110 ± 3
ENP 3hs	1.349 ± 0.002	111 ± 3
ENP 18hs	1.364 ± 0.003	113 ± 2

**Tabla 4.3:** Modelo de película simple isotrópica. Valores de índice de refracción y espesor obtenidos por simulación y corroborados por ajuste de los datos experimentales, para medidas in situ. Los valores son un promedio de tres experimentos independientes.

Un modelo bicapa, esto es, donde el film de CMDex se divide en dos películas isotrópicas, una que contiene sólo CMDex y otra donde la proteína es incorporada, fue también evaluado y simulado. Los datos experimentales para el mismo experimento considerado anteriormente, se corresponden con la simulación de un modelo que supone una película interna de CMDex solo, con un índice de refracción cercano al obtenido para el modelo de película simple, y con un espesor de 56 nm, que se mantiene casi constante y una película externa más compacta debido a la incorporación de la proteína, con un índice de refracción que varía entre 1.450 y 1.500 y un espesor que varía entre 11 y 20 nm. En la figura 4.12 se muestran los datos experimentales (cuadrados) y las curvas simuladas, en este caso correspondientes al modelo bicapa. Cada curva simulada une tres datos experimentales: el sustrato efectivo, el sustrato modificado con CMDex y el dato correspondiente a la posterior modificación con la proteína.

Los valores obtenidos para el índice de refracción y el espesor de las dos capas, manteniendo fijo el índice de refracción de la película interna se muestran en la Tabla 4.4. En la Tabla 4.5, se resumen las densidades superficiales estimadas para cada tiempo de reacción, para cada uno los modelos propuestos. Como puede observarse en dicha tabla ambos modelos estiman una cobertura similar.



**Figura 4.12:** Gráfico de los parámetros elipsométricos,  $\Psi$  y  $\Delta$ , durante cada paso de modificación de un sustrato efectivo Au/Cys. Se incluyen curvas simuladas para el modelo de película doble isotrópica, cuyos parámetros  $n$  y  $d$  se muestran en la Tabla 4.4.

	$n_{\text{int}}$	$d_{\text{int}}/\text{nm}$	$n_{\text{ext}}$	$d_{\text{ext}}/\text{nm}$
ENP 1h	$1.339 \pm 0.001$	$56 \pm 7$	$1.450 \pm 0.002$	$11 \pm 1$
ENP 2hs	$1.339 \pm 0.001$	$55 \pm 7$	$1.450 \pm 0.002$	$13 \pm 1$
ENP 3hs	$1.339 \pm 0.001$	$55 \pm 7$	$1.462 \pm 0.002$	$13 \pm 1$
ENP ON	$1.337 \pm 0.002$	$49 \pm 7$	$1.500 \pm 0.003$	$20 \pm 3$

**Tabla 4.4:** Modelo de película doble isotrópica (bicapa). Valores de índice de refracción y espesor obtenidos por simulación y corroborados por ajuste de los datos experimentales, para medidas in situ. Los valores son un promedio de tres experimentos independientes.

t / h	Película simple		Bicapa	
	$\Gamma/\text{ng mm}^{-2}$	$\Gamma/\text{pmol cm}^{-2}$	$\Gamma/\text{ng mm}^{-2}$	$\Gamma/\text{pmol cm}^{-2}$
1	$5.7 \pm 2.0$	$46 \pm 16$	$5.4 \pm 1.4$	$44 \pm 11$
2	$6.5 \pm 2.0$	$53 \pm 17$	$6.6 \pm 1.4$	$54 \pm 12$
3	$7.1 \pm 2.0$	$59 \pm 17$	$7.4 \pm 1.5$	$61 \pm 12$
18	$16.3 \pm 2.7$	$133 \pm 22$	$17.2 \pm 2.9$	$141 \pm 24$

**Tabla 4.5:** Valores de densidad superficial de ENP estimados para el modelo de película simple y película doble isotrópicas, a partir de los resultados de las Tablas 4.3 y 4.4.

## 4.4 Sumario

En este Capítulo se ha establecido una técnica para la construcción de un electrodo modificado con ENP a través de uniones covalentes y posteriormente estos electrodos se han caracterizado. Los resultados indican que más de una monocapa de la proteína de reconocimiento fue incorporada. En los Capítulos 6 y 7 se presentarán resultados sobre su implementación como plataforma de reconocimiento para la determinación de LPS.

## 4.6 Referencias

- 1- Prime, K.; Whitesides, G. *Science* **1991**, *252*, 1164-1167 y *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714-10721.
- 2- Jung, L.; Nelson, K.; Campbell, C.; Stayton, P.; Yee, S.; Perez-Luna, V.; Lopez, G. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1999**, *54*, 137-144.
- 3- Pale-Grosdemange, C.; Simon, E.; Prime, K.; Whitesides, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 12-20.
- 4- Seigel, R.; Harder, P.; Dahint, R.; Gruñes, M.; Josse, F.; Mrksich, M.; Whitesides, G. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3321-3328.
- 5- Jo, S.; Park, K. *Biomaterials* **2000**, *21*, 605-616.
- 6- Ostuni, E.; Chapman, R. G.; Holmlin, R. E.; Takayama, S.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2001**, *17*, 5605-5620.
- 7- Piehler, J.; Brecht, A.; Hehl, K.; Gauglitz, G. *Colloids and Surfaces B* **1999**, *13*, 325-336.
- 8- Vermette, P.; Gengenbach, T.; Divisekera, U.; Kambouris, P.; Griesser, H.; Meagher, L. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *259*, 13-26.
- 9- Akkoyun, A.; Billitewski, U. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 655-664.
- 10- Jönsson, U.; Malmqvist, M. *Adv. Biosensors* **1992**, *2*, 291-336.
- 11- Polzius, R.; Schneider, T.; Bier, F.; Bilitewski, U.; Koschinski, W. *Biosens. Bioelectr.* **1996**, *11*, 503-514.
- 12- Bergström, J.; Löfas, S.; Johnsson, B. US Patent N°5436161, 1995 y EP 0589 867 B1, 1996.
- 13- Löfas, S.; Johnsson, B. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, *21*, 1526-1528.
- 14- Johnsson, B.; Löfas, S.; Lindqvist, G. *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 268-277.
- 15- Löfas, S. *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 829-834.
- 16- Malmqvist, M.; Karlsson, R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 378-383.

- 17- Sigal, G.; Bagdad, C.; Barberis, A.; Strominger, J.; Whitesides, G. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 490-497.
- 18- Gershon, P.; Khilko, S. *Journal Immunological Methods* **1995**, *183*, 65-76.
- 19- Lu, H.; Chen, H.; Lin, Y.; Lin, J. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 116-124.
- 20- Sehgal, D.; Vijay, I. *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 87-91.
- 21- Hermanson, G. *Bioconjugate Techniques* Academic Press, 1996, Elsevier Science, San Diego, California, USA.
- 22- Walczak, M. M.; Popenoe, D. D.; Deinhammer, R. S.; Lamp, B. D.; Chung, C.; Porter, M. D. *Langmuir* **1991**, *7*, 2687-2693.
- 23- Jentoft, N.; Dearborn, D. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 4359-4365.
- 24- Hoogvliet, J. C.; Dijkma, M.; Kamp, B.; Van Bennekom, W. P. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2016-2021.
- 25- Finklea, H. O.; Snider, D. A.; Fedyk, J. *Langmuir* **1990**, *6*, 371-376.
- 26- Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods*, 2nd. Ed.; J. Wiley and Sons; New York, 2001.
- 27- Elender, G.; Kühner, M.; Sackmann E. *Biosens. Bioelect.* **1996**, *11*, 565-577.
- 28- Lide, D.R. *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press Inc., Boca Raton, 1994.
- 29- *Polymer Handbook*, 1989, 3rd edn, Wiley-Interscience, New York.
- 30- De Feijter, J. A.; Benjamins, J.; Veer, F. A. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1759-1772.
- 31- El-Deab, M.; Ohsaza, T. *Electrochimica Acta* **2004**, *49*, 2189-2194.
- 32- Yang, D.; Wilde, C.; Morin, M. *Langmuir* **1996**, *12*, 6570-6577.
- 33- Calvo, E. J.; Danilowicz, C.; Diaz, L. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *369*, 279-282.
- 34- Forzani, E.; Otero, M.; Perez, M.; Lopez Teijelo, M.; Calvo, E. J. *Langmuir* **2002**, *18*, 4020-4029.

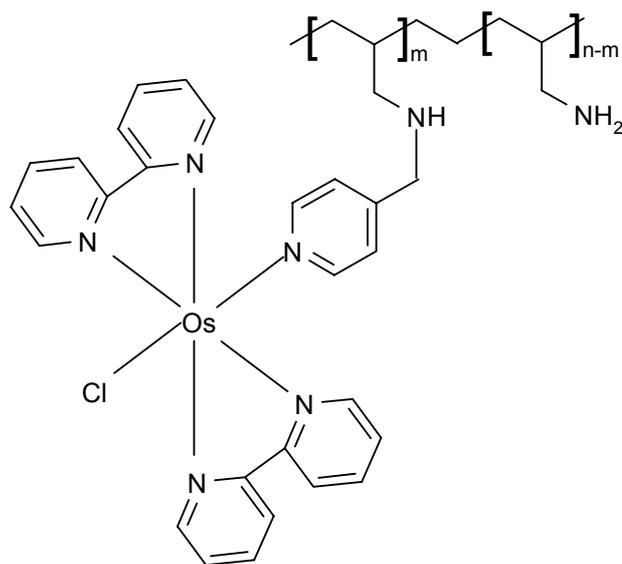
## Capítulo 5 – Configuración Electroestática

### 5.1 Introducción

La construcción de films conteniendo biomoléculas y polímeros redox sobre la superficie de electrodos ha dado origen a la aparición de una nueva generación de biosensores amperométricos.<sup>1,2,3</sup>

En base a esos resultados, se han propuesto inmunosensores amperométricos basados en el uso de enzimas oxidoreductasas cableadas electroquímicamente involucrando el uso de estos polímeros que comunican eficientemente al marcador enzimático con la superficie, propagando la carga hacia el electrodo a través de sus sitios redox. Lu et al.<sup>4</sup> reportaron resultados de un inmunosensor amperométrico utilizando un polímero redox adsorbido conjuntamente con un anticuerpo. El polímero redox utilizado fue  $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{PVP})_{10}\text{Cl}]\text{Cl}$ , donde PVP es poli-4-(vinilpiridina), coimmobilizado con el anticuerpo antiHRP o antibiotina sobre la superficie del electrodo por entrecruzamiento con glutaraldehído. Cuando el antígeno, en este caso HRP o biotina-HRP conjugados, es unido al anticuerpo sobre la superficie sensora, ocurre el proceso de transferencia electrónica entre el electrodo y el centro redox de la enzima.

Una propuesta alternativa fue presentada por Danilowicz et al.<sup>5</sup> empleando bioelectrodos formados por autoensamblado capa por capa, de poli(alilamina) derivatizada con un complejo de osmio, PAAOs (Esquema 5.1) e inmunoglobulina tipo G antibiotina (IgG-ab) sobre una superficie de oro. En este trabajo, la mediación redox al sitio activo de la enzima conjugada al antígeno biotina (biotina-HRP) fue utilizada para evaluar la reacción antígeno-anticuerpo. Asimismo, la configuración fue empleada en un ensayo competitivo, mostrando que menor cantidad de biotina conjugada está unida al anticuerpo cuando la concentración de biotina sin conjugar en la solución es incrementada.



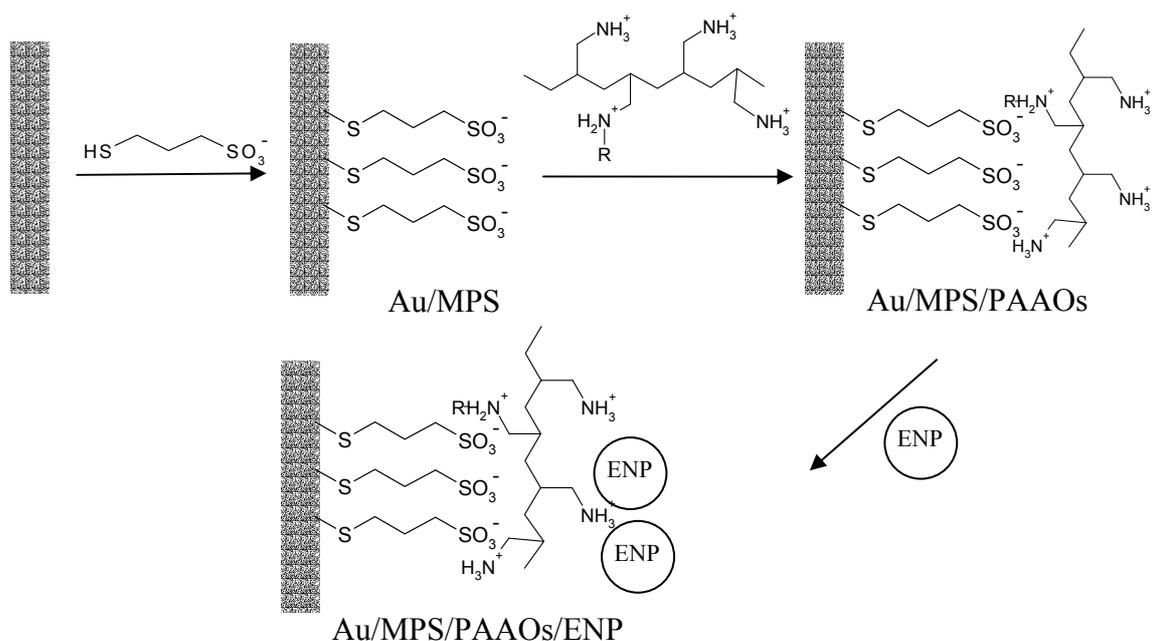
**Esquema 5.1:** Estructura de PAAOs

Teniendo en cuenta estos antecedentes y con el objetivo de simplificar la construcción del sensor y el ensayo, respecto a la configuración presentada anteriormente, se presenta un diseño donde los componentes del ensayo, mediador y agente de reconocimiento, se incorporan por autoensamblado sobre el transductor.

PAAOs, (Esquema 5.1), sintetizado en nuestro laboratorio según la referencia 2, fue utilizado como mediador redox no difusional. La presencia del polímero de osmio en la estructura tiene las siguientes funciones: facilitar la adsorción de la enzima electrostáticamente y también por interacciones hidrofóbicas, propagar la carga conectando la enzima al electrodo y mediar la reducción de la enzima en un proceso bimolecular entre los sitios del Os(II) en el polímero y el grupo prostético de la enzima, que en este trabajo es el grupo hemo de la peroxidasa.

Para la construcción de los electrodos, una monocapa de mercaptopropano sulfonato (MPS) fue adsorbida sobre la superficie de oro de manera de proveer una superficie con cargas negativas, adecuada para la adsorción del polímero redox en un segundo paso de adsorción. Este segundo paso revierte el exceso de cargas negativas

sobre la superficie en un exceso de cargas positivas generado por los grupos  $\text{NH}_3^+$  en la poli(alilamina). Una completa superficie bioactiva pudo ser obtenida luego de la incorporación de la proteína ENP, en el tercer paso de adsorción, como se muestra en la Figura 5.1.



**Figura 5.1:** Configuración electrostática - construcción de electrodos modificados por interacción electrostática entre el tiol (MPS) cargado negativamente y el polímero redox (PAAOs) con cargas positivas. Posteriormente la proteína es incorporada por adsorción, en un proceso que involucra tanto fuerzas hidrofóbicas como interacción electrostática. En el esquema, R representa al complejo de osmio.

## 5.2 Construcción de los electrodos modificados

### 5.2.1 Materiales

3-mercaptopropil sulfonato (MPS) fue provisto por Aldrich,  $\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClpyCH}_2\text{NH}$ poli(alilamina) (PAAOs) fue sintetizado en nuestro laboratorio, según lo describieron Cortón et al. Tris(hidroximetil) aminometano (TRIS) fue provisto por Carlo Erba. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

**5.2.2 Adsorción del tiol (Au/MPS):** Electrodo de oro de 1 cm<sup>2</sup> limpio, según el procedimiento descrito en 2.2.2., fueron inmersos en una solución 20 mM de MPS en 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 30 minutos. Luego, fueron enjuagados minuciosamente con agua MilliQ. Las soluciones fueron preparadas y utilizadas inmediatamente para evitar la oxidación del tiol en aire.

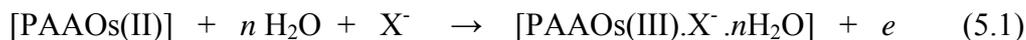
**5.2.3 Adsorción de PAAOs (Au/MPS/PAAOs):** Los electrodos modificados con el tiol fueron inmediatamente sumergidos en una solución acuosa del polímero de osmio (0.4 % p/v) durante 10 minutos y luego fueron enjuagados con agua MilliQ.

**5.2.4 Adsorción de ENP (Au/MPS/PAAOs/ENP):** La proteína fue adsorbida sobre el electrodo modificado con el polímero de osmio desde una solución 50 mM buffer Tris-HCl, pH 8.5. Debido a que la proteína fue incorporada desde soluciones cuyo pH es cercano al pI de la misma, también fuerzas hidrofóbicas deben participar en el proceso de adsorción.

## **5.3 Resultados**

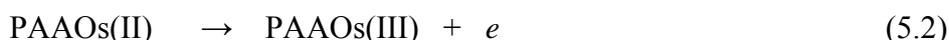
Una de las ventajas de esta configuración es la facilidad con que se realiza su construcción. Las distintas reacciones de adsorción (Figura 5.1) se producen en forma rápida y tan solo es necesario disolver el reactivo correspondiente en las condiciones adecuadas para promover la adsorción.

Los dos primeros pasos de la reacción fueron ampliamente estudiados.<sup>6-8</sup> Por técnicas electroquímicas, a través de la oxidación y reducción de los sitios de osmio en el polímero, la adsorción del mismo sobre la superficie tiolada puede ser fácilmente monitoreada. Una voltametría cíclica puede revelar la presencia de dichos sitios redox en el electrodo. El proceso electroquímico que ocurre dentro del film puede ser representado por:



donde X representa un anión de la solución que puede ser incorporado dentro de la película de polímero. La oxidación del Os(II) produce un desequilibrio de cargas y por eso el intercambio iónico entre la película y la solución se lleva a cabo a través de la entrada de aniones a la película o a través de la salida de cationes, simultáneamente al intercambio de solvente, para mantener la electroneutralidad de la película, como pudo observarse en multicapas autoensambladas de PAAOs<sup>8,9</sup> y para hidrogeles entrecruzados de PAAOs y glucosa oxidasa.<sup>10</sup>

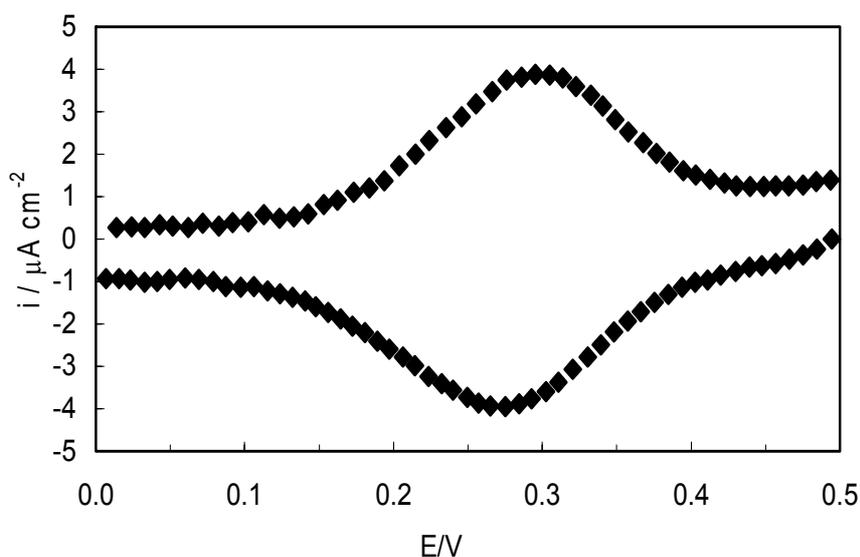
La voltametría cíclica o la cronoamperometría solo tienen en cuenta el intercambio de electrones en el circuito externo, por lo que no aportan información sobre dicho intercambio iónico y de agua, reduciendo la ecuación (5.1) a



La Figura 5.2 muestra el voltagrama obtenido, para una bicapa autoensamblada de PAAOs/ENP sobre un electrodo de oro. El voltagrama, para la oxidación de PAAOs(II) y la reducción de PAAOs(III) es típico de una especie electroactiva confinada a la superficie. Los picos catódico y anódico simétricos corresponden a un comportamiento de voltametría cíclica en capa delgada con un potencial formal redox para la cupla PAAOs(II)/ PAAOs(III),  $E^{\circ} = 0.28 \text{ V vs Ag/AgCl}$ ,  $\Delta E_p = 20 \text{ mV}$  y ancho a media altura,  $\text{FWHH} = 140 \text{ mV}$ , lo cual indicaría que existen interacciones repulsivas entre los sitios redox. La dependencia lineal de la corriente de pico con la velocidad de barrido indica un número constante de sitios redox accesibles. La integración de las curvas de corriente en función del potencial permite calcular, por aplicación de la ley de Faraday, el cubrimiento superficial de sitios redox. De dicha integración, luego de sustraer la corriente capacitiva, una carga aproximada  $8 \mu\text{C cm}^{-2}$  pudo ser obtenida, lo que da una cobertura de osmio de  $8 \times 10^{-11} \text{ moles cm}^{-2}$ . Puesto que la relación entre los grupos de Os y las unidades de monómero de PAA es de 1 a 8,<sup>2</sup> una cobertura de  $0.7 \text{ nmol cm}^{-2}$  de polímero puede ser estimada. Estos resultados concuerdan con los

reportados por Hodak et al<sup>11</sup> para electrodos autoensamblados utilizando polialiamina conteniendo un derivado de ferroceno como centro redox.

Asumiendo un espesor de 5 nm para la bicapa PAAOs/ENP, considerando un diámetro promedio de 3.2 nm para la proteína y una dimensión molecular para PAAOs de 1.8 nm,<sup>7</sup> puede estimarse una concentración aproximada promedio de sitios de Os en el film de 0.17 M.



**Figura 5.2:** Voltametría cíclica de una bicapa PAAOs/ENP autoensamblada, en 50 mM buffer Tris, 0.2 M KNO<sub>3</sub>, pH 7.5 a 50 mV s<sup>-1</sup>.  $E^{\circ} = 0.28$  V,  $\Delta E_p = 20$  mV, FWHH = 140 mV y  $Q = 10.3$   $\mu\text{C cm}^{-2}$

Los electrodos modificados mediante una bicapa autoensamblada de PAAOs/ENP sobre electrodos de oro fueron utilizados en experimentos de adsorción del conjugado y mediante el uso de amperometría, se estudió la utilidad de este diseño de electrodos, al que denominamos configuración electrostática, en un ensayo de tipo competitivo (Capítulo 6).

En estos experimentos, los electrodos modificados se exponen a soluciones de distintas concentraciones del conjugado, LPS-HRP, en experimentos de adsorción y a

soluciones conteniendo diferentes cantidades de LPS y una concentración fija del conjugado, para la obtención de la curva de calibración del ensayo competitivo.

En ambas situaciones, la enzima HRP, incorporada al electrodo a través del conjugado, en presencia de su sustrato y con el cosustrato inmovilizado en la superficie, da lugar al siguiente ciclo catalítico:



Siendo la corriente observada directamente proporcional a la concentración de LPS-HRP en la superficie del electrodo e inversamente proporcional a la concentración de LPS.

## 5.4 Sumario

Los electrodos modificados mediante una bicapa autoensamblada de PAAOs/ENP muestran tener un comportamiento reversible y estable. En el próximo capítulo se presentan resultados sobre experimentos de adsorción del conjugado. Mediante el uso de amperometría, se estudió la utilidad de este diseño de electrodos, al que denominamos configuración electrostática, en un ensayo de tipo competitivo.

## **5.4 Referencias**

- 1- Gregg, B. A.; Heller, A. *Anal. Chem.*, **1990**, *62*, 258-263.
- 2- Cortón, E.; Danilowicz, C.; Battaglini, F. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *445*, 89-94.
- 3- Doherty, A. P.; Stanley, M. A.; Vos, J. G. *Analyst*, **1995**, *120*, 2371-2376.
- 4- Lu, B.; Iwuoha, E.; Smyth, M.; O’Kennedy, R. *Analytica Chimica Acta* **1997**, *345*, 59-66.
- 5- Danilowicz, C.; Manrique, J. M. *Electrochemistry Communications* **1999**, *1*, 22-25.
- 6- Calvo, E. J.; Etchenique, R.; Pietrasanta, L.; Wolosiuk, A.; Danilowicz, C. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1161-1168.
- 7- Forzani, E. S.; Otero, M.; Pérez, M.; Lopez Tejeilo, M.; Calvo, E. J. *Langmuir* **2002**, *18*, 4020-4029.
- 8- Calvo, E. J.; Wolosiuk, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8490-8497.
- 9- Grumelli, D.; Wolosiuk, A.; Forzani, E.; Planes, G.; Barbero, C.; Calvo, E. J. *Chem. Comm.* **2003**, *24*, 3014-3015.
- 10- Calvo, E. J.; Etchenique, R. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8944-8950.
- 11- Hodak, J.; Etchenique, R.; Calvo, E. J.; Singhal, P.; Bartlett, P. *Langmuir* **1997**, *13*, 2708-2716.

## Capítulo 6 – Ensayos competitivos

### 6.1 Introducción

Debido a que la interacción específica entre la biomolécula incorporada a la superficie del transductor, ENP y el analito, LPS, no produce ningún cambio físico-químico significativo, se hace necesario utilizar un ensayo que permita determinar al analito en forma indirecta. La alternativa que se presenta en este capítulo es un ensayo de tipo competitivo enzimático, donde las moléculas de ENP inmovilizadas en el electrodo interactúan específicamente tanto con los lipopolisacáridos presentes en la muestra, como con aquellos que han sido introducidos y previamente conjugados con peroxidasa. De esta manera, es el conjugado el componente del sistema que produce una señal posible de ser detectada.

En este ensayo, la superficie donde se encuentra ENP inmovilizada se pone en contacto simultáneamente con el LPS conjugado y LPS presente en la muestra, los cuales van a competir por los sitios de unión de ENP. Luego de una etapa de lavado, se mide la señal generada por el conjugado. La respuesta esperada a distintas concentraciones de LPS está representada por la curva de calibración o curva de dosis-respuesta. Para altas concentraciones de LPS, se espera que una escasa o nula cantidad de conjugado se una a dichos sitios y la señal caiga a cero, mientras que para muy bajas concentraciones de LPS, una gran cantidad de conjugado esté unido y la señal sea máxima. La cantidad de conjugado unido, y por ende la señal, resultará inversamente proporcional a la concentración de LPS en la muestra. LPS puede ser, de esta forma, cuantificado por su capacidad de inhibir la unión del conjugado al ENP inmovilizado en el transductor.

Los factores más importantes que determinan las características del ensayo, su sensibilidad y su límite de detección, son: la afinidad hacia el agente de reconocimiento tanto del LPS como del LPS conjugado, el número de sitios específicos y el nivel de unión inespecífica. Para obtener una máxima sensibilidad, la cantidad de sitios específicos debe disminuirse tanto como sea posible, la cantidad de conjugado utilizada

debe ser menor pero cercana a la concentración límite o de saturación y la unión inespecífica debe ser mínima.

Se han propuesto un gran número de esquemas y modelos teóricos para describir la adsorción de biomoléculas, principalmente proteínas, sobre diferentes tipos de superficies sólidas.<sup>1,2</sup> Estos modelos están basados principalmente en el modelo desarrollado por Langmuir, con algunas modificaciones. Sin embargo, hay evidencias de que el proceso de adsorción es más complejo, incluye un cierto número de etapas, que la interacción proteína-superficie es heterogénea y además se han observado interacciones entre proteínas y en algunos casos formación de multicapas.<sup>3-5</sup> Muchos de los estudios muestran que la interacción con la superficie incluye al menos dos pasos: la adsorción propiamente dicha de la proteína y luego una serie de cambios conformacionales y/o de reorientación. También se han sugerido modelos más complejos de 3 o más pasos,<sup>6,7</sup> más cercanos a la realidad, pero no se han desarrollado aún descripciones cuantitativas.

Sin tener en cuenta estas complejidades, se podría considerar un modelo sencillo de adsorción, como el modelo de adsorción de Langmuir, y conociendo la cobertura de ENP, a partir de las dimensiones de la proteína resultantes del estudio cristalográfico<sup>8</sup> o bien a partir de los resultados obtenidos por elipsometría, y la constante de disociación para el LPS conjugado, se podría estimar la concentración de saturación del conjugado y establecer a priori, las óptimas concentraciones a utilizar para alcanzar la máxima sensibilidad del ensayo.<sup>9</sup>

En el caso del sistema en estudio, aún un tratamiento teórico sencillo no resulta aplicable para realizar dicha estimación. Entre los factores a tener en cuenta se pueden enumerar: el LPS, y probablemente LPS-HRP, forma micelas a relativamente bajas concentraciones, del orden de 11-14  $\mu\text{g/mL}$ ; el desconocimiento de parámetros importantes y necesarios, tales como las constantes de disociación del complejo formado entre la molécula de reconocimiento y las distintas formas de LPS; y el peso molecular del LPS, que es una distribución y no un número acotado en ambos casos. Una alternativa experimental para la determinación de la concentración óptima de conjugado, muy utilizada en el diseño de inmunoensayos competitivos, es la construcción de lo que se llama un “tablero de titulación”.<sup>10</sup> El tablero se construye a partir de experimentos de adsorción del conjugado a distintas concentraciones de conjugado y de la molécula de reconocimiento.

En este capítulo se describe la evaluación de electrodos modificados con ENP, cuya construcción se describió en los Capítulos 4 y 5, en relación a su utilidad para un ensayo competitivo enzimático.

En primer lugar, para establecer las concentraciones de ENP y LPS conjugado a utilizar en el ensayo competitivo, se realizaron experimentos de adsorción del conjugado a distintas concentraciones de conjugado y sobre electrodos modificados con ENP preparados a partir de soluciones de distinta concentración de la proteína. De esta manera se construyó el tablero de titulación. Una vez definidas dichas concentraciones, el ensayo competitivo fue llevado a cabo. A tal efecto, los electrodos modificados según las dos configuraciones diseñadas, fueron expuestos a soluciones de concentración fija de conjugado y concentración variable de LPS, y la respuesta, la corriente catalítica dada por la enzima HRP, en presencia de su sustrato, fue graficada en función de la concentración de LPS, obteniéndose, para ambos diseños, la curva de calibración.

## 6.2 Experimental

Las especificaciones instrumentales se encuentran detalladas en la sección 2.2.2.

Los electrodos fueron preparados según lo especificado en la sección 4.2.1 para la configuración covalente y 5.2 para la configuración electrostática.

Las medidas cronoamperométricas fueron llevadas a cabo manteniendo el potencial del electrodo de trabajo fijo a 50 mV vs Ag/AgCl. Los electrodos de trabajo fueron medidos inmediatamente luego de su preparación. Para todos los ensayos descriptos abajo, los electrodos fueron enjuagados exhaustivamente e introducidos en la celda electroquímica conteniendo 50 mM buffer Tris, pH 7.5, 0.2 M KNO<sub>3</sub>. En el caso de electrodos modificados Au/Cys/CMDex/ENP, [Os(bpy)<sub>2</sub>(pyCOOH)Cl]<sup>+</sup> fue agregado de manera de obtener una concentración final de 40 μM. El electrodo modificado fue conectado al potenciostato, dejado equilibrar con la solución y luego se agregó peróxido de hidrógeno para obtener una concentración final de 1 mM; inmediatamente un cambio en el valor de la corriente fue observado, que alcanzó un valor constante, debido a la corriente catalítica catódica producida, la cual fue proporcional a la concentración superficial del conjugado con la enzima. Para electrodos Au/Cys/CMDex/ENP (Capítulo

4), las señales obtenidas fueron normalizadas por el área geométrica, puesto que para experimentos que involucran especies electroquímicas en solución, y tiempos del orden de los minutos, el factor de rugosidad no tiene efecto.<sup>11</sup>

Para electrodos modificados, según la configuración electrostática, Au/MPS/PAAOs/ENP (Capítulo 5), las corrientes fueron normalizadas mediante el siguiente procedimiento: para cada *j*ésimo electrodo, la corriente de pico para la oxidación del osmio incorporado al electrodo por adsorción de PAAOs,  $i_{pj}$ , fue establecida por voltametría cíclica a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  en  $0.2 \text{ M KNO}_3$ ,  $50 \text{ mM}$  buffer Tris (pH 7.5). A partir de estos experimentos, un valor promedio,  $\bar{i}_p$ , fue obtenido. Luego, la corriente obtenida para cada electrodo fue normalizada por el factor  $i_{pj} / \bar{i}_p$ . Fue utilizado este criterio debido a que la reducción de la enzima es llevada a cabo a través del mediador inmovilizado. La corriente de pico promedio para la oxidación del osmio fue calculada a partir de considerar los valores obtenidos para 35 electrodos modificados, ( $\bar{i}_p = 3.5 \pm 0.3 \mu\text{A cm}^{-2}$ ).

Las corrientes informadas son un promedio de dos experimentos independientes, a menos que otra condición sea especificada.

### **6.2.1 Adsorción de LPS-HRP**

La adsorción del conjugado fue llevada a cabo desde soluciones conteniendo concentraciones variables de LPS-HRP en  $20\text{mM}$  buffer Tris,  $0.15 \text{ M NaCl}$  (pH 7.5) (configuración covalente) y  $50 \text{ mM}$  buffer Tris, (pH 7.5) (configuración electrostática) por 60 minutos. Los electrodos fueron posteriormente enjuagados con buffer y luego con agua apirógena, a menos que otra condición sea especificada. Cada electrodo modificado fue utilizado únicamente para una determinada concentración de conjugado.

### **6.2.2 Adsorción de BSA**

En aquellos experimentos donde se indica, previamente a la adsorción de LPS-HRP, los electrodos modificados fueron sumergidos durante 10 minutos en soluciones de

BSA (albúmina de suero bovino) en 50 mM buffer Tris, pH 7.5 o pH 8.5 si ENP fue previamente adsorbido.

### 6.2.3 Ensayos competitivos.

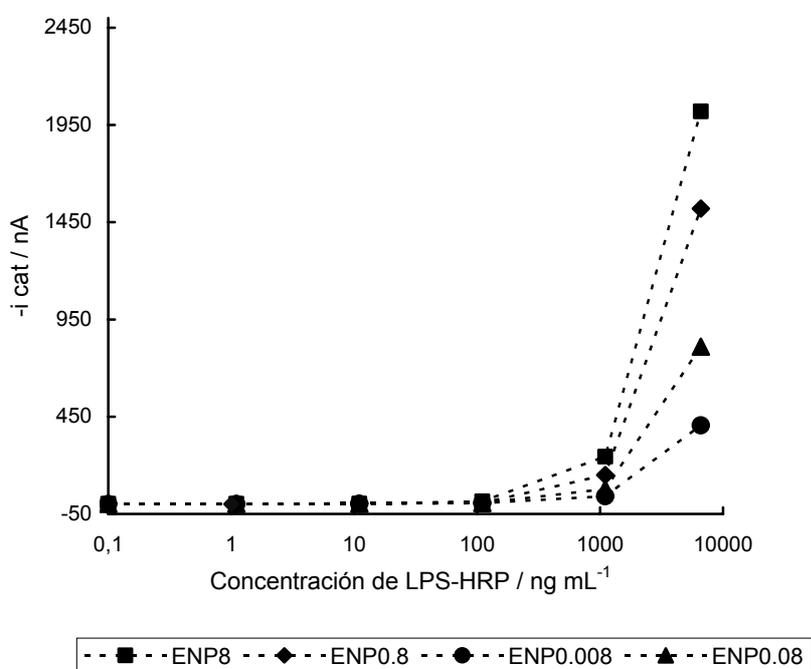
El ensayo competitivo fue llevado a cabo por inmersión de los electrodos modificados en soluciones conteniendo concentraciones variables de LPS de *S. minnesota* (actividad endotóxica: 1.5 EU ng<sup>-1</sup>) y concentración fija de conjugado, de 10 µg mL<sup>-1</sup>, preparadas en 20 mM buffer Tris, 0.15 M NaCl (pH 7.5), durante 60 minutos, para electrodos modificados Au/Cys/CMDex/ENP. Para electrodos modificados según la configuración electrostática, el ensayo se realizó utilizando soluciones de concentración variable de LPS de *E. coli* O26-B6 (2 EU ng<sup>-1</sup>) y concentración fija de conjugado, de 6.6 µg mL<sup>-1</sup>, preparadas en 50 mM buffer Tris (pH 7.5), durante 60 minutos. Luego de la incubación, los electrodos fueron enjuagados exhaustivamente con el mismo buffer y luego con agua apirógena, a menos que otra condición sea especificada. Cada electrodo modificado fue utilizado únicamente para una determinada concentración de LPS.

## 6.3 Resultados

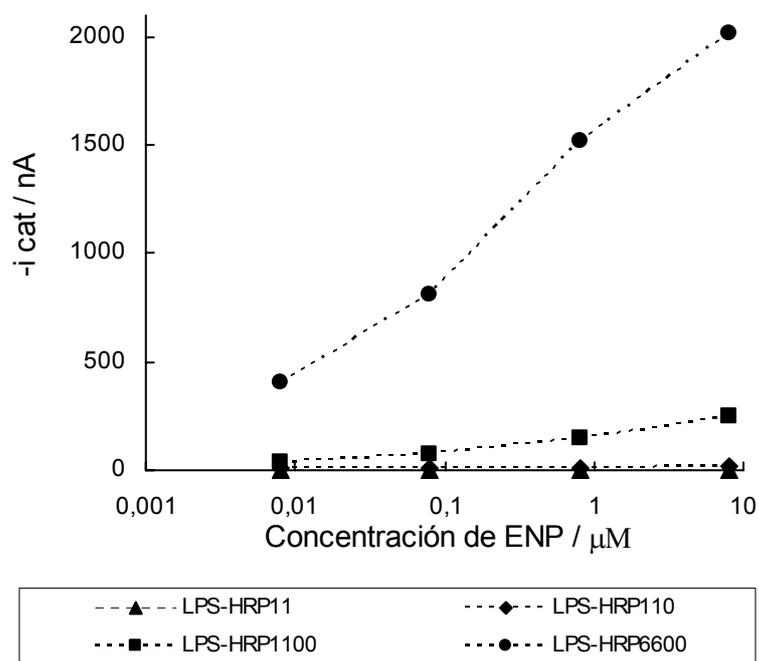
### 6.3.1 Configuración covalente

La exposición de electrodos Au/Cys/CMDex/ENP a concentraciones crecientes de LPS-HRP, resulta en un incremento de la señal amperométrica, para todas las concentraciones de ENP utilizadas, como puede observarse en la Figura 6.1. Las Figuras 6.1 y 6.2 muestran el resultado de un experimento en el cual soluciones de distinta concentración de ENP (entre 8 nM y 8 µM) fueron utilizadas para su inmovilización en el electrodo, la corriente catalítica fue graficada en función de la concentración de LPS-HRP para las distintas concentraciones de ENP (Figura 6.1) y en función de la concentración utilizada de ENP, para las distintas concentraciones de conjugado (Figura 6.2). En la primera, puede observarse que aún a las más bajas concentraciones de ENP consideradas, el cambio en la corriente es pronunciado, cuando la concentración de

conjugado se aumenta de 1000 a 10000 ng mL<sup>-1</sup>. Un cambio en la concentración, por debajo de 1000 ng mL<sup>-1</sup> no produce una respuesta fácilmente medible. Por otro lado, la Figura 6.2 muestra que concentraciones de ENP en el rango de 0.08 – 8 μM producen una respuesta apreciable, sólo cuando la concentración de conjugado está por arriba de 1000 ng mL<sup>-1</sup>. Considerando que el ensayo requiere un número limitado de sitios disponibles para la competencia, se escogió 0.08 μM como concentración de ENP para la modificación de los electrodos. Para la concentración de conjugado, se escogió 10000 ng mL<sup>-1</sup>, que si bien no alcanza el valor de saturación del electrodo, es la concentración más alta posible, por debajo de la concentración micelar crítica.



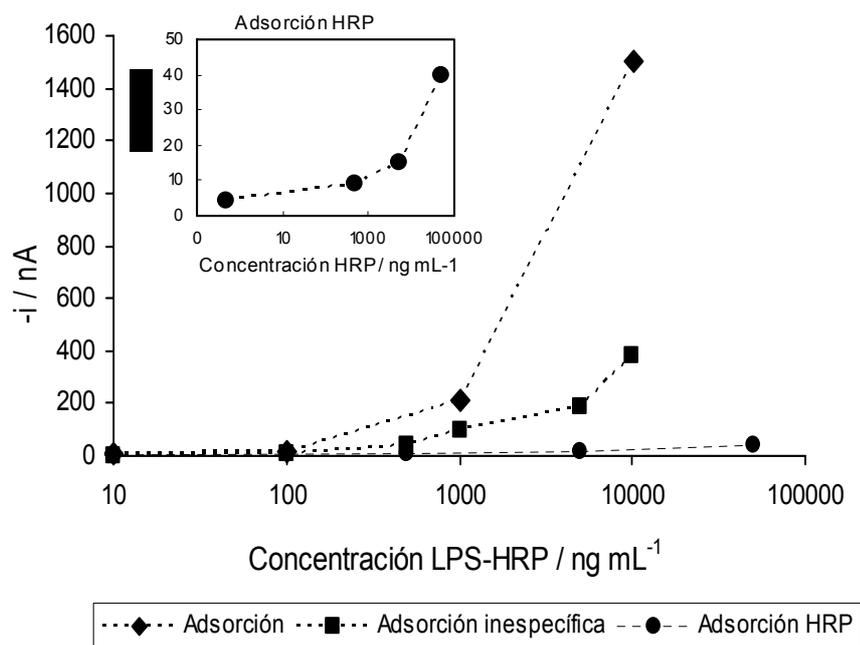
**Figura 6.1:** Tablero de titulación para distintas concentraciones de ENP y de conjugado, LPS-HRP. Actividad de la enzima, expresada como corriente catalítica, en función de la concentración de LPS-HRP, en electrodos con ENP inmovilizada a partir de soluciones (●) 0.008, (▲) 0.080 (◆) 0.8 y (■) 8 μM. La construcción de los electrodos y la adsorción del conjugado fueron llevadas a cabo según se describe en las secciones 4.2.1.2-5 y 6.2.1 respectivamente. Los electrodos, luego de la adsorción del conjugado fueron lavados por inmersión (10') en una solución 20 mM buffer TRIS pH 7.5, 0.15 M NaCl y 0.1% Tritón X-100.



**Figura 6.2:** Tablero de titulación para distintas concentraciones de ENP y de conjugado, LPS-HRP. Actividad de la enzima, expresada como corriente catalítica, en función de la concentración de ENP, para concentraciones de LPS-HRP ( $\blacktriangle$ ) 11 ng/mL, ( $\blacklozenge$ ) 110 ng/mL, ( $\blacksquare$ ) 1100 ng/mL y ( $\bullet$ ) 6600 ng/mL. Los electrodos, luego de la adsorción del conjugado fueron lavados por inmersión (10') en una solución 20 mM buffer TRIS pH 7.5, 0.15 M NaCl y 0.1% Tritón X-100.

Para evaluar la adsorción inespecífica de LPS-HRP sobre las estructuras diseñadas, electrodos Au/Cys/CMDex/ENP (80 nm) fueron incubados previamente en una solución, sonicada previamente, de  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  LPS en 10 mM buffer PIPES, 0.15 M NaCl y 0.01 M EDTA, durante 60 minutos, de manera de saturar los sitios de ENP presentes en el electrodo. Luego, estos electrodos fueron incubados en soluciones conteniendo  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  LPS y concentración variable de LPS-HRP, en el mismo buffer sin EDTA, puesto que la actividad de la enzima es dependiente de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$ . La respuesta del sistema debida a la adsorción inespecífica del conjugado, de esta forma evaluada, (Figura 6.3, cuadrados), se comparó con la respuesta obtenida para un electrodo de características similares pero donde los sitios específicos no fueron bloqueados previamente con LPS, representada por rombos en la misma figura. Cabe aclarar que en estos experimentos los enjuagues fueron realizados con buffer sin tritón;

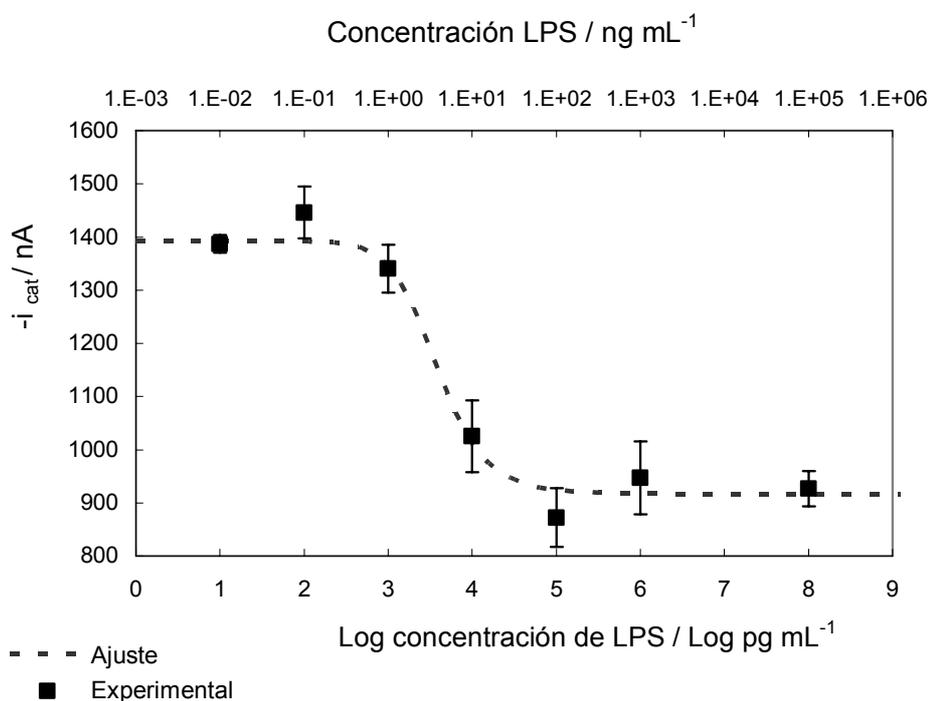
la respuesta presenta la misma tendencia que la observada en la Figura 6.1 y el sistema presenta una muy buena respuesta para una concentración de conjugado de  $10000 \text{ ng mL}^{-1}$ . La contribución debido a la adsorción inespecífica de LPS-HRP, para dicha concentración, es del orden del 25% de la respuesta total (específica + inespecífica). Para determinar si la adsorción inespecífica es en parte debida a la presencia de HRP libre, o bien, si se produce a través del HRP en el conjugado, electrodos modificados como se mencionó anteriormente fueron incubados en soluciones de HRP de distinta concentración. Concentraciones de HRP entre  $5$  y  $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  son las que resultan comparables con la concentración máxima de conjugado utilizada en los ensayos, en base a la actividad enzimática de ambos reactivos. Como puede observarse en la Figura 6.3, HRP no se adsorbe apreciablemente sobre los electrodos.



**Figura 6.3:** Adsorción de LPS-HRP sobre electrodos Au/Cys/CMDex/ENP (◆), con ENP bloqueado según se detalla en el texto (■) y blanco del experimento correspondiente a la adsorción de HRP ( $230 \text{ U mg}^{-1}$ ) (●). En la figura embebida, esta última curva en escala ampliada. Luego de la adsorción del conjugado, los electrodos fueron enjuagados con buffer 20 mM buffer TRIS pH 7.5, 0.15 M NaCl.

La Figura 6.4 muestra la curva de calibración logarítmica, de corriente catalítica a potencial constante en función de la concentración de LPS, resultado del ensayo competitivo entre LPS y LPS-HRP, para una concentración fija de LPS-HRP de 10000 ng mL<sup>-1</sup>. Se puede observar que la respuesta a LPS presenta la típica forma sigmoide, característica de esta clase de ensayos según lo explicado en el Capítulo 2. La curva experimental de  $-i_{\text{cat}}$  en función del logaritmo de la concentración de LPS fue ajustada con la ecuación (2.18).

Debido a la competencia entre LPS y LPS conjugado por los sitios en los electrodos, a mayor concentración de LPS, se observa menor señal de corriente y viceversa. A cero dosis o bajas concentraciones de LPS, la señal observada es máxima debido a que todo el conjugado se encuentra unido a los sitios disponibles sobre el electrodo, la cantidad de LPS no es suficiente para que la competencia tenga lugar. Para concentraciones menores que 1 ng mL<sup>-1</sup>, las variaciones en la señal se encuentran dentro del error experimental. A medida que la concentración de LPS aumenta, se establece la competencia entre LPS y LPS conjugado por esos sitios y la señal disminuye. Finalmente, a altas concentraciones del analito, el conjugado es “casi” completamente desplazado. La señal no cae a cero sino que se mantiene en lo que correspondería a la señal inespecífica (por encima de los 100 ng mL<sup>-1</sup>). Como puede apreciarse, el ensayo funciona aceptablemente en un rango de 2 órdenes de magnitud, entre 1-100 ng mL<sup>-1</sup>. La sensibilidad del ensayo, expresada como la concentración de LPS que redujo la señal del ensayo al 50% del máximo valor (IC<sub>50%</sub>) fue de 3.8 ng mL<sup>-1</sup> y el límite de detección, calculado como la concentración de LPS que redujo la señal al 90% del máximo (IC<sub>90%</sub>), fue de 1 ng mL<sup>-1</sup>.

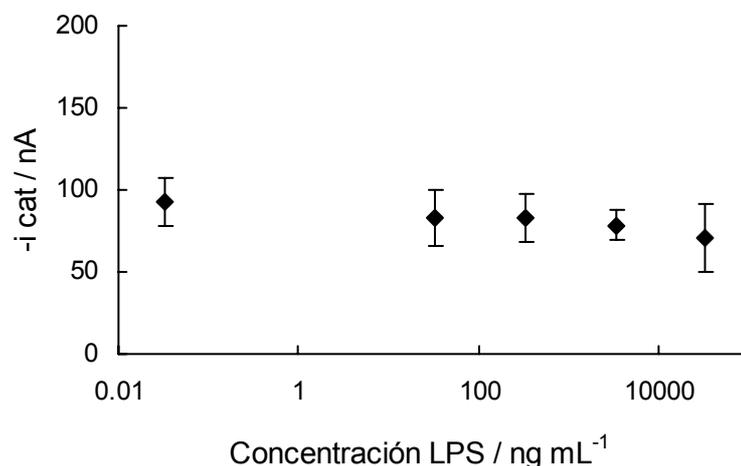


**Figura 6.4:** Curva de competencia. Ensayo competitivo llevado a cabo entre LPS-HRP (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y concentración variable de LPS. Luego de la adsorción del conjugado, los electrodos fueron enjuagados con buffer. Ecuación de ajuste:  $Y=(A-D) / [1+(x / C)^B] +D$ , con A= asíntota máxima, B= pendiente en la inflexión, C=  $IC_{50\%}$  y D= asíntota mínima. Parámetros del ajuste: A= 1392, B= 12.4, C= 3.58 y D= 917,  $\chi^2=0.5$ . Los valores experimentales para la asíntota máxima y mínima, 1420 y 900, respectivamente, se utilizaron como valores iniciales para el ajuste. ( $IC_{90\%}$ = límite de detección  $\approx 1\text{ng/mL}$ ). Las corrientes informadas son un promedio de tres experimentos independientes.

Se hizo mención anteriormente, a la relevancia de una etapa de lavado en los ensayos que involucran una fase sólida, cuyo objetivo es eliminar o reducir el conjugado no unido específicamente a dicha fase. Entre los recursos conocidos para evitar esta adsorción inespecífica, el de práctica común en inmunoensayos, es el agregado de detergentes y/o sales a las soluciones de analito y conjugado, utilizadas para el ensayo competitivo. Otra alternativa, es el lavado con estos agentes, luego de la incubación. Ambos recursos fueron utilizados.

Cuando los electrodos Au/Cys/CMDex/ENP (80 nM) fueron **incubados** en soluciones conteniendo 10000  $\text{ng mL}^{-1}$  LPS-HRP y concentración variable de LPS en 20

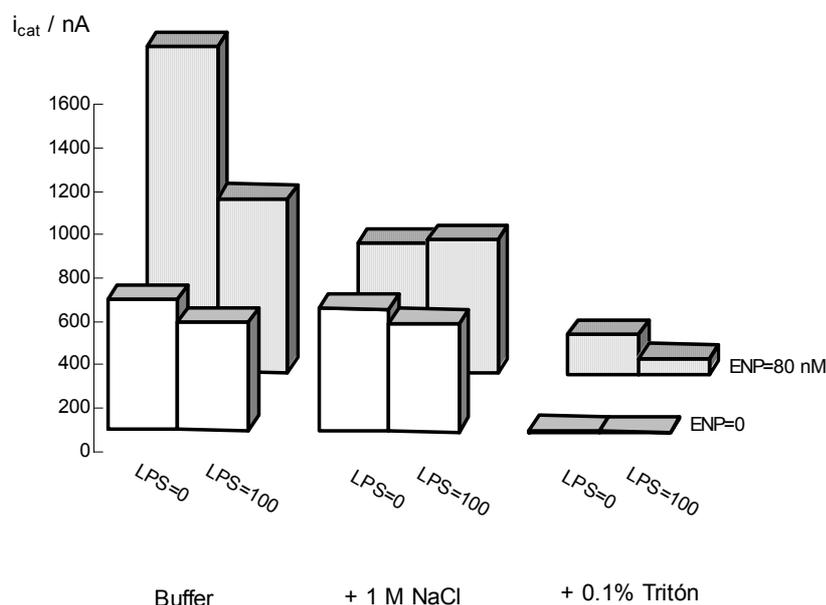
mM buffer TRIS pH 7.5, 0.15 M NaCl conteniendo además 0.1% Tritón X-100, un detergente iónico, la corriente catalítica obtenida fue baja para todas las concentraciones ensayadas (en el rango: 0-40000 ng mL<sup>-1</sup>), como se muestra en la Figura 6.5. Más aún, en dicho rango, la señal no es sensible a cambios en la concentración, lo cual hace pensar que el conjugado no se está uniendo al electrodo. Un ensayo de LAL de muestras conteniendo cantidades apreciables de LPS disuelto en dicho buffer arrojó valores menores que 0.01 EU mL<sup>-1</sup>, con porcentajes de recuperación que muestran que existe inhibición del agregado patrón que se utiliza para el ensayo. Estos resultados indican que existe cierta interacción entre el LPS y el detergente que impide que el LPS pueda ser reconocido por el reactivo de LAL. Un fenómeno similar podría ocurrir con los electrodos.



**Figura 6.5:** Curva de competencia. Ensayo competitivo llevado a cabo entre LPS-HRP (10 µg mL<sup>-1</sup>) y concentración variable de LPS. Los electrodos fueron **incubados** en dichas soluciones conteniendo además 0.1% Tritón X-100.

Electrodos Au/Cys/CMDex/ENP (80 nM) y Au/Cys/CMDex incubados con soluciones conteniendo 10000 ng mL<sup>-1</sup> LPS-HRP, en ausencia y con 100 ng mL<sup>-1</sup> LPS (dos puntos correspondientes a la curva de calibración) fueron, luego del paso de incubación, **lavados** por inmersión durante 30 minutos y con agitación, con las siguientes soluciones: a) 20 mM buffer TRIS pH 7.5, 0.15 M NaCl b) el mismo buffer con 1 M NaCl y c) el mismo buffer con 0.1% Tritón X-100. Resulta claro de los resultados presentados en la Figura 6.6, que este detergente logra luego de 30 minutos y en estas

condiciones desorber todo el conjugado de la matriz, como puede inferirse de las corrientes obtenidas con electrodos que no contienen ENP. Por otra parte, en el caso de electrodos modificados con la proteína de reconocimiento, la respuesta obtenida luego del lavado con tritón, en las condiciones mencionadas, si bien de valores absolutos más bajos, parece presentar similar tendencia que la obtenida en las condiciones de la Figura 6.4 (enjuagados con buffer). Para descartar que la disminución en la corriente catalítica pueda deberse al bloqueo del electrodo por adsorción del detergente, se realizó una voltametría cíclica del complejo de Os en solución, utilizando como electrodo de trabajo, un electrodo modificado que había sido lavado con la solución de tritón, en las condiciones previamente detalladas, el perfil y los valores de  $i_{\text{pico}}$  obtenidos para la cupla Os(II)/Os(III) resultaron similares a los obtenidos con un electrodo de iguales características que no fue sometido a dicho proceso de lavado. La brusca disminución en los valores de corriente catalítica indicaría una desorción del conjugado no sólo de sitios de la matriz sino también desde los sitios específicos.



**Figura 6.6:** Efecto del lavado con distintas soluciones. Electrodo modificado Au/Cys/CMDex (columnas blancas) y Au/Cys/CMDex/ENP (columnas moteadas) fueron sumergidos en soluciones de LPS-HRP (10  $\mu\text{g/mL}$ ) en ausencia (LPS=0) y conteniendo LPS, 100 ng/mL (LPS=100). Luego de 60 minutos de incubación, fueron lavados por inmersión durante 30 minutos y con agitación, con buffer (20 mM TRIS pH 7.5, 0.15M NaCl), buffer + 1M NaCl ó buffer + 0.1% Tritón X-100.

Como puede leerse en el trabajo de Petsch et al,<sup>12</sup> las endotoxinas pueden interactuar con detergentes, la familia del tritón entre ellos, a través de interacciones no polares entre las cadenas alquílicas del lípido A y la porción hidrofóbica del detergente. Más aún, por arriba de la CMC del detergente, las endotoxinas pueden ser acomodadas en la estructura micelar del detergente y son consecuentemente separadas de la fase acuosa. Este fenómeno fue explotado como un método de separación de endotoxinas de soluciones de plásmidos de DNA y de proteínas hidrofílicas tales como troponina I, mioglobina e isoenzimas de la creatina quinasa. En base a estos hechos, podría pensarse que cuando los electrodos modificados fueron incubados en soluciones conteniendo tritón X-100, la porción del lípido A, tanto del LPS como del LPS-HRP no estaba expuesta y libre para su unión con ENP, en los tiempos en que se llevó a cabo la incubación, de allí la falta de respuesta de los electrodos. En el caso de los lavados, debido a que la incubación se llevó a cabo en ausencia del detergente, tanto LPS como LPS-HRP pudieron ser incorporados al electrodo y luego desorbidos por acción del detergente, en primera instancia, de la matriz, cuya interacción es más débil y luego de los sitios específicos, en un proceso altamente dependiente de la concentración del detergente y del tiempo. En conclusión, podría pensarse en estas soluciones como la base para un protocolo de regeneración del electrodo o bien, con más recaudos experimentales (en cuanto a tiempo de lavado y concentración de detergente), como un método para mejorar la señal, eliminando la adsorción inespecífica.

En relación al lavado con alta concentración salina (y por ende alta fuerza iónica), éste no parece tener efecto sobre el conjugado adsorbido sobre la matriz y si sobre la interacción de LPS con ENP. Experimentalmente, lo que se observa es que el aumento de la fuerza iónica no ejerce prácticamente ningún efecto sobre la desorción de LPS, obsérvese los valores obtenidos para buffer y para buffer más 1 M NaCl en electrodos libres de ENP. Mientras que en presencia de ENP, el enjuague con 1 M NaCl parece afectar la unión específica LPS-ENP, si bien, los resultados obtenidos en fase homogénea por Ridge et al<sup>13</sup> muestran que el complejo formado, LPS-ENP y Lípido A-ENP no puede disociarse por un incremento en la fuerza iónica, hasta 3.3 M NaCl. Los resultados acá mostrados podrían atribuirse a un proceso de desnaturalización de la proteína debido al incremento de la fuerza iónica, siendo necesario el uso de otras técnicas experimentales para corroborar dicha hipótesis

### **6.3.2 Configuración electrostática**

Al igual que lo realizado para electrodos modificados según la configuración covalente, para esta nueva configuración de electrodos modificados, ensayos de adsorción de LPS-HRP, utilizando distintas concentraciones de ENP fueron llevados a cabo. Asimismo, para evaluar la adsorción del conjugado sobre una matriz positivamente cargada, como la poli(aliamina), electrodos modificados que no contengan ENP, Au/MPS/PAAOs, ENP = 0, también fueron incorporados a los ensayos de adsorción.

La Tabla 6.1 muestra el resultado de estos ensayos, en el cual varias concentraciones de ENP (0, 0.1 y 1  $\mu\text{M}$ ) fueron utilizadas para su inmovilización en el electrodo; pueden observarse los valores obtenidos para la corriente catalítica en función de la concentración de LPS-HRP para las distintas concentraciones de ENP. La tabla puede ser analizada en base al mismo criterio empleado para las Figuras 6.1 y 6.2, para la elección de las concentraciones a utilizar en un ensayo competitivo. Para las concentraciones de ENP en el rango analizado, una clara respuesta puede ser obtenida, sólo cuando la concentración de conjugado es mayor que 11  $\text{ng mL}^{-1}$ ; a esa concentración y por debajo de dicho valor, LPS-HRP no forma un complejo estable con el electrodo modificado. A 110  $\text{ng mL}^{-1}$  se produce una importante diferencia entre los electrodos que contienen ENP y los que no, obteniéndose en los primeros una señal mucho mayor, sugiriendo la incorporación de la proteína al electrodo. A concentraciones mayores o igual que 1100  $\text{ng mL}^{-1}$ , los electrodos conteniendo ENP exhiben mayores corrientes, como así también los electrodos que no contienen la proteína. La alta señal obtenida para ENP = 0 sugiere cierta interacción entre el conjugado y la matriz, lo que trae como consecuencia una importante adsorción inespecífica.

De igual forma que para la configuración covalente, para determinar si la adsorción inespecífica es debida a la presencia de HRP libre, o bien, si se produce a través del HRP en el conjugado, electrodos modificados Au/MPS/PAAOs y Au/MPS/PAAOs/ENP fueron incubados en 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  HRP, variando el tiempo de incubación entre 10 y 60 minutos. En ningún caso, luego del agregado del sustrato, se observa la catálisis, sugiriendo que es el LPS, más que la enzima, el determinante de la

adsorción. La adsorción inespecífica del conjugado sobre los sitios del polímero puede ser explicada en términos de la interacción entre los grupos amino presentes en la cadena polimérica de la PAAOs con los lipopolisacáridos, como fue descrito para compuestos similares por varios autores. La adsorción de LPS sobre matrices poliméricas conteniendo grupos aminos intercalados en la cadena alifática ha sido reportada. Compuestos tales como polilisina, polihistidina, poliarginina, pentamidina, clorhexidina, entre otros, mostraron una alta capacidad de retención de lipopolisacáridos, postulándose que en la interacción participan fuerzas hidrofóbicas entre la región lipídica del LPS y la cadena alifática en los polímeros, como así también, la atracción electrostática entre los grupos fosfato del lípido A, negativamente cargados y las cargas positivas de los amino protonados contenidos en la matriz polimérica.<sup>14-17</sup>

LPS-HRP /ng mL <sup>-1</sup>	-i / nA		
	[ENP] = 0μM	[ENP] = 0.1μM	[ENP] = 1μM
1.1	6	7	8
11	8	8	10
110	11	65	50
1110	630	830	1110
11000	1190	1820	3097

**Tabla 6.1:** Corriente catalítica obtenida por adsorción de LPS-HRP sobre electrodos modificados Au/MPS/PAAOs y Au/MPS/PAAOs/ENP a partir de soluciones 0.1 y 1 μM ENP. La modificación de los electrodos y la adsorción del conjugado se llevaron a cabo según se explica en las secciones 5.2 y 6.2.1, respectivamente.

Una detallada inspección de la tabla puede sugerir que una concentración de conjugado de 110 ng mL<sup>-1</sup> permitiría obtener una respuesta detectable, con un bajo valor de adsorción del conjugado sobre la matriz (adsorción inespecífica), sin embargo esta concentración está bastante alejada de la concentración de saturación, que no fue alcanzada aún a 11000 ng mL<sup>-1</sup>. Si la concentración de conjugado es mucho menor que la concentración necesaria para la saturación, un gran número de sitios sobre el electrodo,

no ocupados por el conjugado, quedarán disponibles para el analito, desplazando la curva de competencia hacia valores más altos de concentración de analito. Tanto el límite de detección como la sensibilidad del ensayo se verán afectados.

Ensayos competitivos efectuados con electrodos modificados a partir de soluciones conteniendo 0.1 y 0.5 de  $\mu\text{M}$  ENP y utilizando una solución de conjugado entre 110 y 1100  $\text{ng mL}^{-1}$  no mostraron una clara tendencia, la respuesta no fue sensible al cambio de concentración de LPS; el mismo resultado fue obtenido aún cuando la concentración de conjugado fue elevada a 6600  $\text{ng mL}^{-1}$ .

La evaluación y reducción de la inespecificidad no es un tema sencillo de abordar. Una estrategia, que fue aplicada anteriormente para la configuración covalente, consiste en bloquear previamente los sitios específicos sobre la superficie y luego comparar la respuesta (adsorción inespecífica) con la obtenida para electrodos donde los sitios no fueron bloqueados (adsorción específica + inespecífica). Esta alternativa no resulta aplicable cuando la proteína de reconocimiento no se encuentra fuertemente unida a la superficie, puesto que la previa incubación con una alta concentración del analito puede conducir a la desorción de la proteína, lo que dificulta la evaluación.

Otra estrategia para reducir la inespecificidad, tal vez la más utilizada en inmunoensayos, es la de adsorber gelatina, caseína o albúmina de suero bovino (BSA) sobre la superficie previo a la reacción de la misma con el conjugado. Esta alternativa tiende a reducir la adsorción inespecífica porque la misma molécula al adsorberse bloquea sitios sobre la superficie. BSA fue depositada sobre el electrodo modificado con PAAOs desde una solución 50 mM buffer Tris a un pH 7.5 (Un pH mayor al punto isoeléctrico de la proteína,  $\text{pI} = 4.8$ ). En esas condiciones, la proteína se encuentra negativamente cargada y por lo tanto la adsorción de BSA está modulada preferencialmente por interacción electrostática sobre el film catiónico constituido por la poli(alilamina). De esta forma se logra bloquear el exceso de cargas positivas sobre el film del polímero. Como puede observarse en la Tabla 6.2, la adsorción de BSA previa a la adsorción del conjugado, sobre electrodos modificados Au/MPS/PAAOs produjo una disminución de la corriente catalítica, (pero no de la corriente de pico de oxidación del Os), producto de la disminución de la adsorción del conjugado sobre la matriz del polímero. Para concentraciones de BSA mayores a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , la gran disminución en

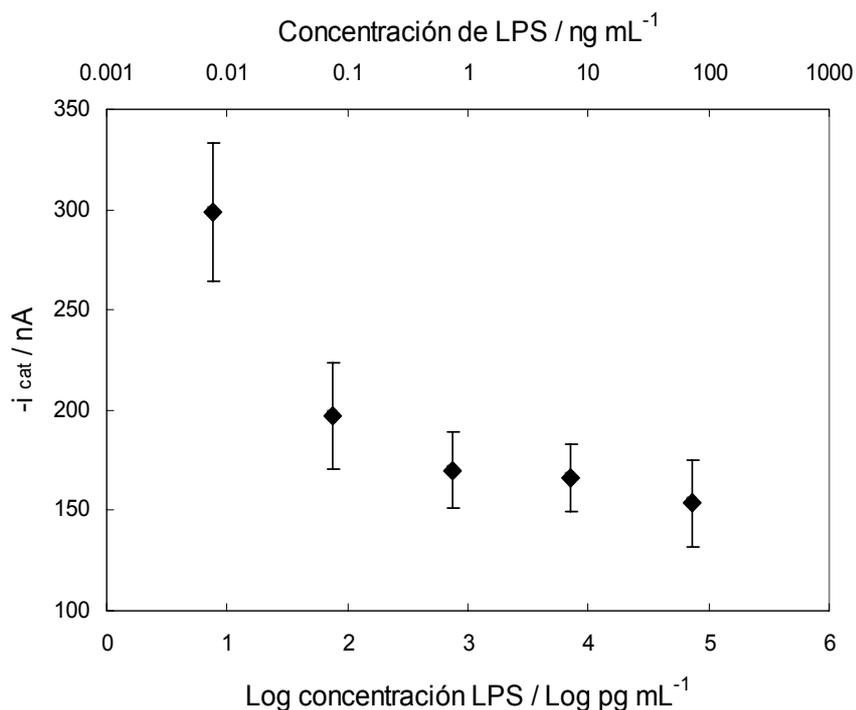
la respuesta catalítica puede también estar relacionada con un bloqueo de la transferencia electrónica entre LPS-HRP y el polímero de osmio, como se explicará más adelante.

BSA / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Electrodos modificados
	Au/MPS/PAAOs/BSA
	nA
0	1070
10	177
100	70
1000	20

**Tabla 6.2:** Corriente catalítica obtenida luego de la adsorción de  $6.6 \mu\text{g mL}^{-1}$  LPS-HRP sobre electrodos modificados con diferentes concentraciones de BSA.

En vista de estos resultados, se decidió emplear esta estrategia de incorporar BSA a los electrodos y evaluar la respuesta de un ensayo competitivo.

Un ensayo competitivo fue llevado a cabo, utilizando electrodos modificados Au/MPS/PAAOs/ENP/BSA, donde ENP y BSA fueron incorporadas al electrodo a partir de soluciones  $0.5 \mu\text{M}$  y  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente. A tal efecto, los electrodos fueron expuestos a soluciones de concentración fija de conjugado ( $6.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y concentración variable de LPS. La respuesta, la corriente catalítica dada por la enzima HRP, en presencia de su sustrato, fue graficada en función de la concentración de LPS, obteniéndose la curva de calibración (Figura 6.7).

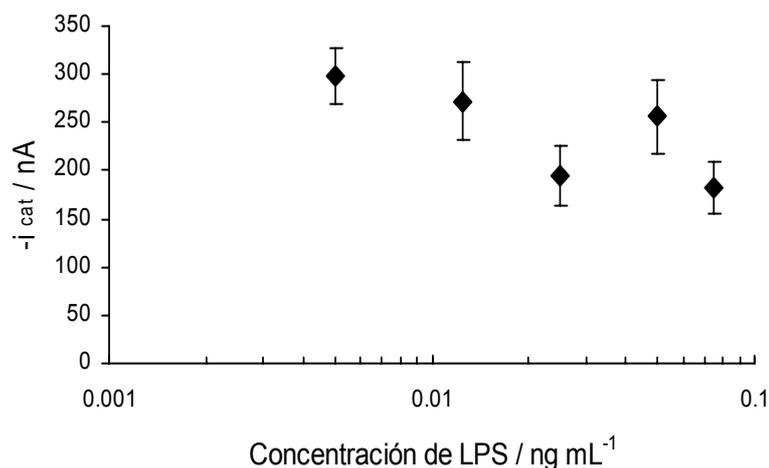


**Figura 6.7:** Curva de competencia. Ensayo competitivo llevado a cabo entre LPS-HRP(6.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y concentración variable de LPS. Las corrientes informadas son un promedio de dos experimentos independientes.

Una importante disminución en la señal pudo ser observada entre muestras sin LPS y muestras que contienen  $0.1 \text{ ng mL}^{-1}$  del analito. Una muestra conteniendo  $0.01 \text{ ng mL}^{-1}$ , puede ser considerada según el LAL Test y la actividad endotóxica del LPS utilizado en este experimento, como una muestra que no contiene pirógenos.

Para concentraciones de LPS mayores que  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ , la señal se mantiene constante, tornándose menos sensible al cambio en la concentración, lo cual representa una limitación al ensayo. Si bien el ensayo no permite la cuantificación de endotoxinas, puede ser utilizado como una alarma permitiendo detectar muestras con un contenido de LPS que sobrepasa los  $0.1 \text{ ng mL}^{-1}$ . Teniendo en cuenta la pirogenicidad del LPS utilizado en este ensayo, el ensayo permite diferenciar soluciones que contienen más de  $0.2 \text{ EU mL}^{-1}$  de muestras libres de pirógenos. Este valor se encuentra por debajo del límite de endotoxinas establecido por la Farmacopea Americana para agua en drogas inyectables, que es de  $0.25 \text{ EU mL}^{-1}$ .<sup>18</sup>

Para el rango de concentraciones de LPS entre 0.01 y 0.1 ng mL<sup>-1</sup>, la respuesta obtenida no muestra un marcado cambio, aunque sí una tendencia, como puede observarse en la Figura 6.8.



**Figura 6.8:** Curva de competencia. Ensayo competitivo llevado a cabo entre LPS-HRP (6.6 μg mL<sup>-1</sup>) y concentración variable de LPS, sólo en el rango de bajas concentraciones de LPS. Las corrientes informadas son un promedio de dos experimentos independientes.

Un electrodo modificado con lisozima (Lis), una proteína de características similares a la proteína de reconocimiento (pI = 10 y MW = 14.400), fue incorporada por adsorción en lugar de ENP, previamente a la adsorción de BSA.

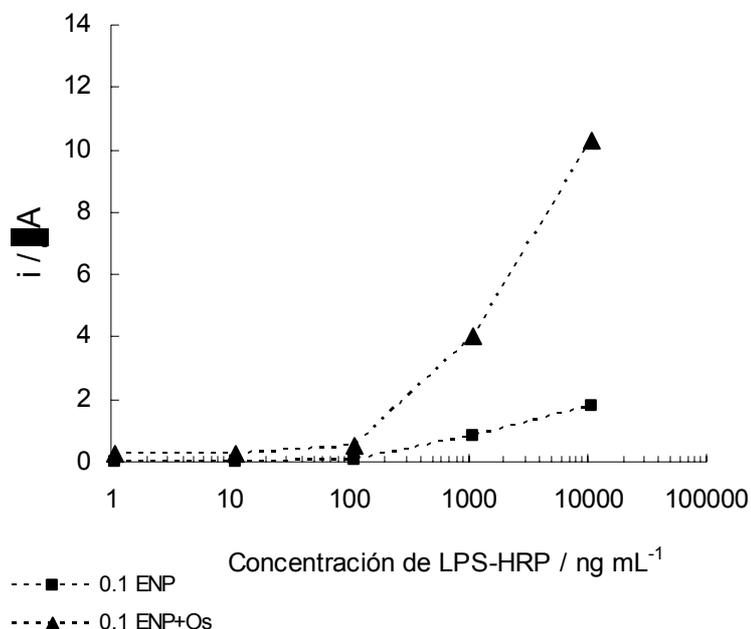
Este electrodo, Au/MPS/PAAOs/Lis/BSA, fue incubado en una solución conteniendo 6.6 μg mL<sup>-1</sup> LPS-HRP. Esta estrategia fue utilizada como una forma de evaluar la adsorción inespecífica. Un valor de corriente catalítica de 110 ± 15 nA, ligeramente inferior a los valores obtenidos para electrodos modificados con ENP e incubados con altas concentraciones de LPS, fue obtenido.

Algunos autores han reportado que las densidades de corriente obtenidas en la práctica para electrodos enzimáticos, que involucran a la enzima eléctricamente cableada con un mediador redox integrado, son mucho menores que lo predicho teóricamente considerando la cantidad de enzima incorporada al electrodo y el turnover de la misma, así por ejemplo, J. Hodak et al<sup>19</sup> reportaron que para un polímero similar, de

poli(alilamina) modificado con ferroceno, solo una pequeña fracción de la enzima activa, glucosa oxidasa, incorporada al electrodo fue eléctricamente conectada al polímero de ferroceno; sin embargo, una mayor cantidad de enzima pudo ser oxidada por el mediador soluble, ferroceno sulfonato, cuando éste fue agregado a la solución. Una gran cantidad de la enzima inmovilizada se encontraba, por lo tanto, inaccesible para el mediador integrado al electrodo, atribuyéndole este hecho a: efectos conformacionales dentro del film y a requerimientos de una óptima ubicación de los grupos ferroceno del mediador con respecto al sitio activo de la enzima. Si bien este último requerimiento no parece ser tan importante en el caso de HRP, puesto que su sitio activo se encuentra más expuesto, sobre la superficie de la enzima, podría ser relevante cuando se trata de un conjugado de dicha enzima con LPS, una molécula anfífilica y de elevado peso molecular.

Los electrodos modificados a partir de soluciones 0.1  $\mu\text{M}$  ENP utilizados en la Tabla 6.1 fueron posteriormente utilizados en un experimento donde 100  $\mu\text{M}$  del mediador soluble  $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{pyCOOH})\text{Cl}]^+$  fue agregado al buffer electrolítico conteniendo 1 mM de peróxido de hidrógeno. En la Figura 6.9, se muestra el efecto producido; un aumento de la corriente catalítica para cada electrodo conteniendo LPS-HRP, en un factor entre 5 y 6 fue observado. Debido a que la concentración de mediador soluble es mucho menor que la concentración de osmio incorporada al film a través de la PAAOs, (estimada en 0.17 M, según se mostró en el Capítulo 5), considerando que la corriente catalítica no debería estar limitada por la concentración del osmio, puesto que el valor obtenido para la concentración superficial de Os está en exceso comparado con la concentración superficial máxima posible de ENP (25 pmoles  $\text{cm}^{-2}$  para una monocapa) y por ende con la concentración superficial de enzima que puede unirse a la superficie (en forma específica), podemos concluir que el incremento en la corriente catalítica luego del agregado del mediador soluble, muestra que no todas las moléculas de enzima se encuentran adecuadamente conectadas por la PAAOs; el mediador soluble puede llegar más fácilmente a la enzima y aumentar la eficiencia del proceso de transferencia electrónica. Un factor similar fue encontrado cuando electrodos modificados Au/MPS/PAAOs/BSA (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) fueron expuestos a soluciones 6.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de LPS-HRP y luego la corriente catalítica fue registrada. Sin embargo, cuando la concentración de BSA se incrementó (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  o superior), factores superiores a 12 fueron

observados, mostrando que a esas concentraciones BSA puede interferir aún más en la transferencia electrónica entre HRP y el mediador, ambos incorporados al electrodo.<sup>20,21</sup>



**Figura 6.9:** Efecto del agregado del mediador soluble sobre electrodos modificados Au/MPS/PAAOs/ENP (0.1  $\mu\text{M}$ ). La respuesta debido al agregado de  $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{pyCOOH})\text{Cl}]^+$  en una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  a la solución de electrolito conteniendo 1 mM de peróxido de hidrógeno está indicada con triángulos. Los cuadrados indican la respuesta del electrodo sin el complejo de osmio en solución

## 6.4 Sumario

En ambas configuraciones se observa que para electrodos tratados con ENP la respuesta a LPS-HRP es mayor que en aquellos que no contienen la proteína. Los ensayos competitivos muestran respuestas correspondientes a distintos rangos de concentración según la configuración, presentando la configuración covalente un comportamiento más parecido al ideal. Las posibles explicaciones a este comportamiento se discutirán en el Capítulo 8.

## 6.5 Referencias

- 1- Andrade, J. D.; Hlady, V. L. "Protein Adsorption and Materials Biocompatibility: A Tutorial Review and Suggested Hypotheses" *Adv. Polymer Sci.* **1986**, 79, 1-63.
- 2- Ivarsson, B.; Lundstrom, I.; "Physical Characterization of Protein Adsorption on Metal and Metaloxide Surfaces" *CRC Crit. Rev. Biocompat.* **1986**, 2, 1-96.
- 3- Lundstrom, I.; Ivarsson, B.; Jonsson, U.; Elwing, H. *Polymer Surfaces and Interfaces*, W. J. Feast, H. S. Munro, eds., p. 201, John Wiley & Sons Ltd., 1987.
- 4- V. I. Sevastianov. "Role of protein adsorption in blood compatibility of polymers," *CRC Crit. Rev. Biocompat.* **1988**, 4, 109-154.
- 5- G. A. Bornzin, I. F. Miller. *J. Colloid Interface Sci.* **1982**, 86, 539-558.
- 6- Iordanskii, A. L.; Polishchuk, A. Y.; Zaikov, G. E. *JMS-Rev. Macromol. Chem. Phys.* **1983**, 23, 33-59.
- 7- Soderquist, M. E.; Walton, A. G. *J. Colloid. Interface Sci.* **1980**, 5, 386-397.
- 8- Hoess, A.; Watson, S.; Siber, G. R.; Liddington, R. *The EMBO Journal* **1993**, 12, 3351-3356.
- 9- Eddowes, M. *J. Biosensors* **1987/88**, 3, 1-15.
- 10- Engvall, E. *Methods in Enzymology* **1980**, 70, 419-439.
- 11- Bard, A.; Faulkner, L. "*Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*", 2001, 2<sup>a</sup> ed.; John Wiley & Sons, Inc. New York, pp 166-168.
- 12- Petsch, D.; Anspach, F. B. *Journal of Biotechnology* **2000**, 76, 97-119.
- 13- Ridge, R. J; Paus, E. J.; Novitsky, T. J.; Ketchum, P. A. *Journal of Endotoxin Research* **2000**, 6, 17-23.
- 14- David, S.A. *J. Mol. Recognit.* **2001**, 14, 370-387.
- 15- Larrick, J. W.; Hirata, M.; Balist, R. F.; Lee, J., Zhong, J.; Wright, S. C. *Infect. Immun.* **1995**, 63, 1291-1297.

- 16- Selsted, M. E.; Brown, D. M.; DeLange, R. J.; Harwig, S. S.; Lehrer, R. I. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 4579-4584.
- 17- David, S.; Pérez, L.; Infante, M. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 357-360.
- 18- 2002-2003, U.S. Pharmacopoeia 26; 2001.
- 19- Hodak, J.; Etchenique, R.; Calvo, E. J.; Singhal, P.; Bartlett, P. *Langmuir* **1997**, *13*, 2708-2716.
- 20- Cortón, E.; Battaglini, F. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *511*, 1-7.
- 21- Cortón, E.; Battaglini, F. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *511*, 8-12.



## **Capítulo 7 – Ensayo utilizando LPS-biotina: Estudios Preliminares**

### **7.1 Introducción**

En los sistemas hasta aquí desarrollados, una serie de mejoras pueden ser realizadas, dirigidas a optimizar la calidad del ensayo.

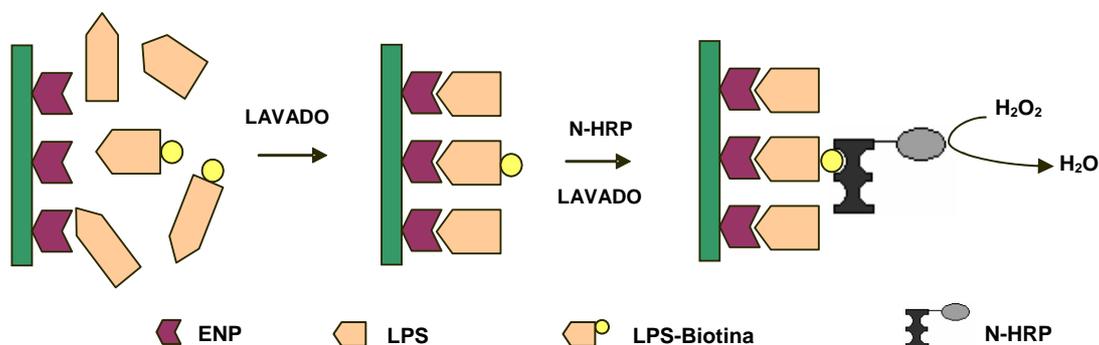
Una de ellas es la obtención de un conjugado con mayor actividad endotóxica. Los resultados presentados en el Capítulo 3 muestran que la actividad pirogénica del conjugado de LPS-HRP utilizado para los ensayos es baja ( $0.012 \text{ EU ng}^{-1}$ ), comparada con los valores típicos encontrados para LPS ( $1 \text{ EU ng}^{-1}$ ). Una consecuencia inmediata de este hecho es que mayores concentraciones del conjugado serán requeridas en orden a obtener un balanceado ensayo competitivo de LPS versus LPS-HRP. Tal incremento en la concentración del conjugado produce un corrimiento del sistema hacia un rango de concentraciones en el cual la adsorción inespecífica del mismo resulta importante, como pudo observarse en los capítulos precedentes.

Dada la complejidad de la molécula, la síntesis de un conjugado de LPS no es un tema sencillo de abordar. Como ya fue descrito anteriormente, los LPS en solución no constituyen una muestra homogénea y en las concentraciones requeridas para la síntesis, se forman agregados de alto peso molecular. Por otra parte, polisacáridos de alto peso molecular presentan una estructura ovillada en solución, por lo cual, reacciones que fácilmente son llevadas a cabo con monómeros no son fácilmente implementables en polímeros.<sup>1</sup> Como primera etapa en la síntesis de conjugados de LPS, la unión covalente de marcadores (probes) de bajo peso molecular a la porción O-antigénica del LPS ha sido considerada y llevada a cabo. El objetivo planteado es más ambicioso que para el caso de los conjugados comercialmente disponibles, ya que en dichos casos, solo un porcentaje de LPS se encuentra conjugado, según lo informado en los catálogos (Sigma, Molecular Probes). Nuestra situación es diferente, puesto que es necesario que todas las moléculas estén marcadas, para no perder sensibilidad en el ensayo.

El método de conjugación a través de las enzimas neuraminidasa y galactosidasa, utilizado y recomendado para la síntesis de un conjugado fluorescente de LPS<sup>2</sup> fue experimentado sin mayor éxito, como se detalla en el Capítulo 3. Sin embargo, mediante la oxidación controlada con periodato de sodio,<sup>3</sup> aldehídos reactivos pudieron ser generados sobre la porción azucarada del LPS que luego fueron acoplados a los marcadores a través de sus grupos nucleofílicos. De esta forma pudieron ser obtenidos distintos conjugados de LPS, ya sea conteniendo complejos de coordinación, moléculas fluorescentes o biotinizados.

En este capítulo, el conjugado de LPS-biotina, cuya síntesis y caracterización fue descrita en el Capítulo 3, fue utilizado en un nuevo ensayo competitivo. El ensayo, a diferencia de los anteriormente desarrollados, hace uso de la interacción neutravidina-biotina; el diseño del mismo se muestra en la Figura 7.1.

Electrodos modificados Au/Cys/CMDex/ENP, cuya construcción fue explicada en el Capítulo 4, son incubados con concentraciones variables de LPS y a concentración fija del conjugado LPS-biotina para dar lugar a la competencia por los sitios en la superficie modificada. Luego de la etapa de incubación y un cuidadoso enjuague de los electrodos prosigue un paso de “revelado”, donde el conjugado de neutravidina-peroxidasa (N-HRP) se une a través de la unión biotina-neutravidina, a los sitios conteniendo LPS-biotina sobre el electrodo. El conjugado de N-HRP sirve así como un revelador del conjugado de LPS-biotina que participa de la competencia. La señal, la corriente catalítica generada a través de la enzima HRP, será directamente proporcional a la cantidad de conjugado LPS-biotina incorporado al electrodo e inversamente proporcional al analito en la muestra.



**Figura 7.1:** Ensayo competitivo entre LPS y LPS-biotina, involucrando N-HRP como elemento generador de la señal.

## 7.2 Experimental

### 7.2.1 Materiales y Métodos

LPS R60 (Ra) de *S. minnesota* (MW estimado en 4200 Da, potencia endotóxica=0.7 EU ng<sup>-1</sup>) fue provisto por ListLab. Lisozima de clara de huevo de gallina y biotina-NHS fueron provistos por SIGMA, biotina-LC-hidracida y Neutravidina-HRP (relación N/HRP =1, actividad de HRP =120 U mg<sup>-1</sup>, determinada por espectrofotometría siguiendo el procedimiento descrito por Chance et al <sup>4</sup> detallado en la sección 3.2.1) fueron provistos por Pierce. Lisozima-biotina fue sintetizada en nuestro laboratorio, mediante una conjugación, mediada por EDC, entre biotina-NHS y lisozima (relación biotina/lisozima = 1, determinada mediante el ensayo para cuantificación de biotina, EZ Biotin Quantitation Kit, provisto por Pierce.

Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Las especificaciones instrumentales se encuentran detalladas en la sección 2.2.2

Las medidas cronoamperométricas fueron llevadas a cabo manteniendo el potencial del electrodo de trabajo fijo a 50 mV vs Ag/AgCl. Los electrodos de trabajo fueron medidos inmediatamente luego de su preparación. Para todos los ensayos, los electrodos fueron enjuagados exhaustivamente e introducidos en la celda electroquímica

conteniendo 50 mM buffer Tris, pH 7.5, 0.2 M KNO<sub>3</sub> y 40 μM [Os(bpy)<sub>2</sub>(pyCOOH)Cl]<sup>+</sup>. El electrodo de trabajo fue conectado al potenciostato, dejado equilibrar con la solución y luego se agregó peróxido de hidrógeno para obtener una concentración final de 1 mM. Las señales obtenidas fueron normalizadas por el área geométrica.<sup>5</sup>

Las corrientes informadas son un promedio de dos experimentos, a menos que otra condición sea especificada.

### **7.2.2 Construcción de los electrodos**

**Au/Cys, Au/Cys/CMDex y Au/Cys/CMDex/ENP.** Fueron construidos según se detalla en las secciones 4.2.1.2, 4.2.1.3 y 4.2.1.4. En el caso de los electrodos Au/Cys/CMDex/ENP, la proteína de reconocimiento fue incorporada a partir de soluciones de concentración 0.8 μM ENP en 10 mM buffer HEPES, pH 8.

**Au/Cys/CMDex/lis y Au/Cys/CMDex/lis-biot.** La incorporación de lisozima y lisozima-biotina a los electrodos fue realizada con un procedimiento similar al utilizado para la construcción de electrodos Au/Cys/CMDex/ENP. Los electrodos Au/Cys/CMDex fueron inmersos en una solución 100 mM EDC y 50 mM NHS en 10 mM buffer PIPES pH 6.5, por 30 minutos con la finalidad de activar los grupos carboxilato. Luego, fueron enjuagados con agua apirógena y sumergidos en una solución 0.08, 0.8, 8 y 80 μM lisozima ó lisozima-biotina en 10 mM buffer HEPES, pH 8. Finalmente los electrodos fueron sumergidos en una solución 1 M etanolamina para bloquear los grupos carboxilato activados y enjuagados con agua apirógena.

**Au/Cys/CMDex/biot.** Los electrodos Au/Cys/CMDex fueron inmersos en una solución 100 mM EDC y 50 mM NHS en 10 mM buffer PIPES pH 6.5, por 30 minutos con la finalidad de activar los grupos carboxilato. Luego, fueron enjuagados con agua apirógena y sumergidos en una solución 0.08, 0.8, 8 y 80 μM biotina-LC-hidracida en 10 mM buffer PIPES, pH 7. Finalmente los electrodos fueron sumergidos en una solución 1 M etanolamina para bloquear los grupos carboxilato activados y enjuagados con agua apirógena.

### 7.2.3 Adsorción de N-HRP

La adsorción del conjugado conteniendo la enzima HRP sobre los distintos electrodos fue llevada a cabo por inmersión de los mismos en soluciones  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  N-HRP en 20 mM buffer Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4 durante 120 minutos. Luego de la incubación fueron enjuagados con abundante agua MilliQ.

Otros tiempos de incubación fueron evaluados, pero los resultados obtenidos fueron menos precisos.

### 7.2.4 Ensayo competitivo

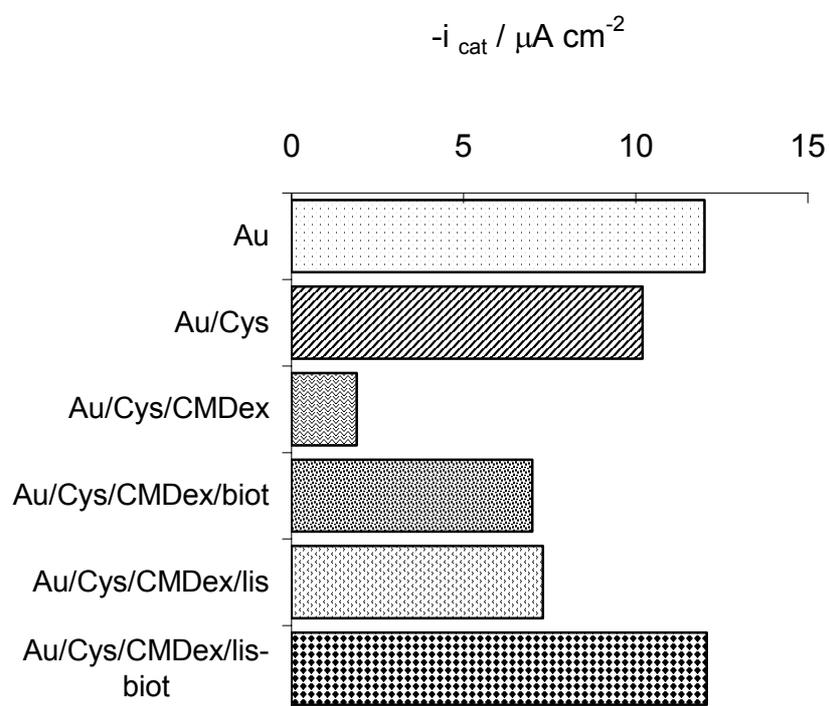
El ensayo competitivo fue llevado a cabo por inmersión de los electrodos Au/Cys/CMDex/ENP ( $0.8 \mu\text{M}$ ) en soluciones conteniendo concentración variable de LPS Ra de *S. minnesota* y concentración fija de conjugado, de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , preparadas en 20 mM buffer Tris, 0.15 M NaCl (pH 7.4), durante 60 minutos. Luego de la incubación, los electrodos fueron enjuagados exhaustivamente con el mismo buffer y luego con agua apirógena, e incubados separadamente en una solución  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  N-HRP en 20 mM buffer Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4 durante 120 minutos. Cada electrodo modificado fue utilizado únicamente para una determinada concentración de LPS.

## 7.3 Resultados

En una etapa previa al ensayo competitivo, se evaluó la adsorción del nuevo componente del ensayo, N-HRP. La adsorción de N-HRP fue valorada sobre distintas superficies, todas ellas relacionadas con las etapas de construcción del sensor: electrodos de oro limpio (Au), electrodos de oro modificados con cistamina (Au/Cys), modificados con CMDex (Au/Cys/CMDex) y electrodos modificados con lisozima (Au/Cys/CMDex/lis), a través de la unión covalente. También electrodos modificados covalentemente con la contraparte específica, biotina (Au/Cys/CMDex/biot) y lisozima-biotina (Au/Cys/CMDex/lis-biot), fueron evaluados. Como en experimentos previos, la proteína lisozima fue utilizada por su semejanza con la proteína de reconocimiento específico, ENP, en relación a su punto isoeléctrico y su tamaño. Lisozima contiene 6

residuos lisina, mientras que ENP contiene 7, por lo tanto es de esperar un comportamiento similar en cuanto a su incorporación a la matriz de CMDex. Como en estos experimentos lo que se quiere determinar es la especificidad de la unión biotina-neutravidina y no la de la unión ENP-LPS, por razones de disponibilidad y costo, lisozima fue utilizada en reemplazo de ENP.

Algunas conclusiones puede extraerse del cuadro de resultados presentado en la Figura 7.2.



**Figura 7.2:** Adsorción de N-HRP sobre distintas superficies. Electrodo de oro limpio (Au) y oro sucesivamente modificados con: cistamina (Au/Cys), carboximetil dextran (Au/Cys/CMDex), biotina (Au/Cys/CMDex/biot) y lisozima (Au/Cys/CMDex/lis), o lisozima-biotina (Au/Cys/CMDex/lis-biot), fueron incubados en soluciones  $25 \mu g mL^{-1}$  de N-HRP durante 2 horas a temperatura ambiente, para permitir la incorporación de dicho conjugado a los electrodos. La incorporación de biotina, lisozima y lisozima-biotina fue llevada a cabo a partir de soluciones  $80 \mu M$ .

a) Una comparación entre electrodos de oro limpio (Au) y oro modificado con cistamina (Au/Cys) con electrodos que contienen una superficie expuesta de dextran (Au/Cys/CMDex) nos permite corroborar lo expresado anteriormente acerca de la

utilidad de este polímero para disminuir la adsorción inespecífica de proteínas, además de proveer una superficie adecuada para inmovilizar covalentemente la proteína. Las corrientes obtenidas para electrodos que contienen el dextran son aproximadamente 4 veces menores. La incorporación de un film de CMDex sobre el electrodo disminuye la hidrofobicidad de la superficie, reduciendo las interacciones con la proteína.

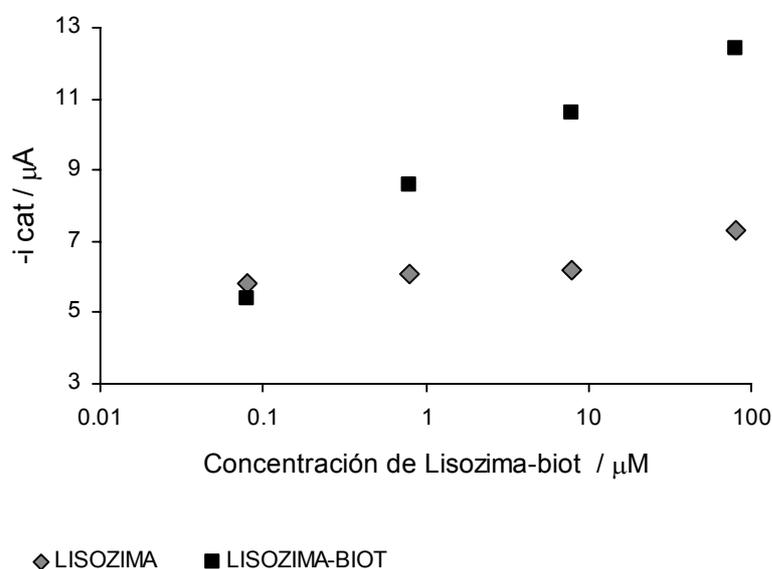
b) La incorporación de biotina en estos electrodos, como era de esperar, eleva los valores obtenidos para la corriente catalítica debido a la incorporación de una componente específica en el electrodo, como puede concluirse de la comparación de electrodos Au/Cys/CMDex y Au/Cys/CMDex/biot.

c) La incorporación de una proteína como la lisozima a la superficie, aumenta la hidrofobicidad de la misma; consecuentemente el conjugado, N-HRP, tiene ahora una superficie más proclive para interactuar. Los valores de corriente catalítica obtenidos para electrodos modificados con lisozima (Au/Cys/CMDex/Lis) son superiores a los obtenidos con electrodos modificados que no contienen dicha proteína (Au/Cys/CMDex).

d) Valores de corriente aún más altos que los obtenidos para electrodos modificados con biotina, se encontraron para electrodos donde la componente específica es incorporada a través de la lisozima. Los motivos no pueden dilucidarse a través de estos experimentos, pero una razón podría ser que la biotina incorporada a través de la proteína, probablemente presente en una capa más externa del film, como se vio en los experimentos de elipsometría (modelo bicapa), quede más expuesta y libre para interactuar con la neutravidina, mientras que cuando la biotina, una molécula pequeña, es unida directamente a la matriz quede inmersa en el film y por ende la neutravidina no encuentre un fácil acceso. Otro detalle que no puede obviarse y podría también colaborar a los más altos valores obtenidos, es que la unión inespecífica para electrodos modificados con lisozima es considerablemente mayor.

La Figura 7.3 muestra el resultado de experimentos de adsorción del conjugado N-HRP sobre electrodos modificados con lisozima-biotina, Au/Cys/CMDex/Lis-biot en los cuales soluciones de distinta concentración de lisozima-biotina fueron utilizadas para su inmovilización en el electrodo. La corriente catalítica fue graficada en función de las concentraciones de lisozima-biotina utilizadas (relación molar biotina/lisozima = 1).

Estos gráficos permiten determinar la concentración de la solución a utilizar para incorporar ENP a los electrodos que permita optimizar la relación señal /señal inespecífica (asumiendo una relación ENP:LPS = 1:1 y LPS:biotina = 1:1 como fue determinada), como así también permiten estimar el orden del valor máximo para la corriente (cuando la unión biotina-neutravidina se lleva a cabo a través del conjugado LPS-biotina unido al electrodo, para bajas concentraciones de LPS, simulado a través de lisozima-biotina unida covalentemente al electrodo- curva Lisozima-biot) y mínimo (valor de la unión inespecífica – curva Lisozima) para la señal, en un futuro ensayo competitivo.



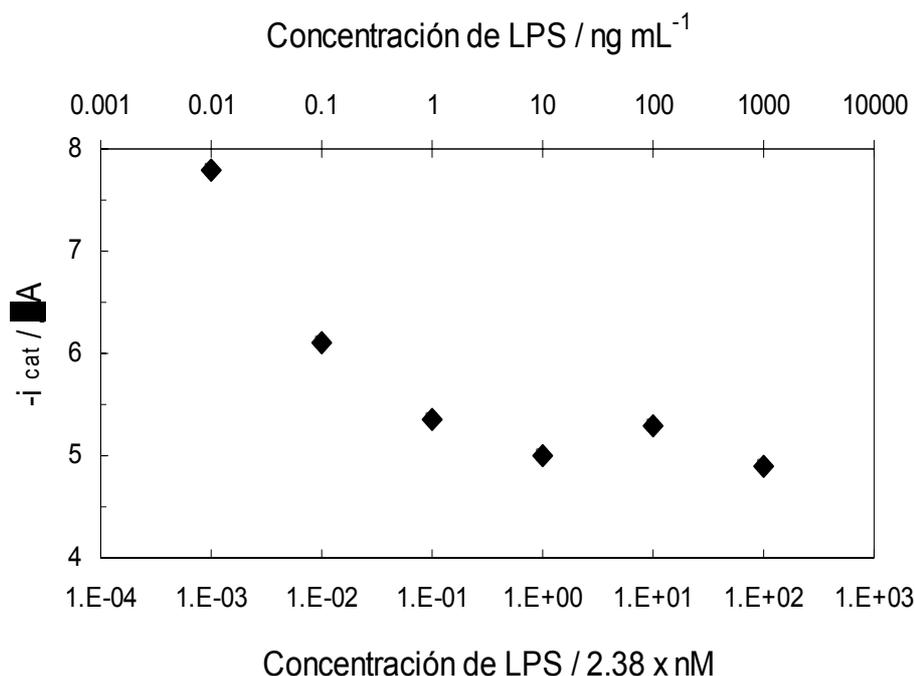
**Figura 7.3:** Curvas de adsorción de N-HRP ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $t = 2\text{hs}$ ) sobre electrodos modificados Au/Cys/CMDex/Lis y Au/Cys/CMDex/Lisozima-biotina, preparados a partir de soluciones de distinta concentración de lisozima y lisozima-biotina (0.08, 0.8, 8 y 80  $\mu\text{M}$ ).

Como puede observarse de las curvas de la Figura 7.3, de las concentraciones evaluadas, para una concentración igual o mayor a 0.8  $\mu\text{M}$ , las componentes específica e inespecífica del ensayo pueden ser diferenciadas. De la misma manera que en el diseño de los ensayos anteriores, se elige la mínima concentración puesto que esto asegura un menor número de sitios sobre el electrodo. En base a estos estudios, soluciones de concentración 0.8  $\mu\text{M}$  ENP serán utilizadas para la modificación de los electrodos Au/Cys/CMDex/ENP que se utilizarán en un ensayo competitivo.

Una vez escogida la concentración de ENP, se realizó la evaluación de la respuesta máxima y mínima para el ensayo presentado en la Figura 7.1. Electrodo modificado Au/Cys/CMDex/ENP (0.8  $\mu\text{M}$ ) fueron incubados con 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  del conjugado de LPS-biotina durante 60 minutos a temperatura ambiente; luego de un cuidadoso enjuague, ellos fueron expuestos a soluciones de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  N-HRP para permitir el revelado del conjugado de LPS unido al electrodo. Un valor de corriente de 7.8  $\mu\text{A cm}^{-2}$  fue observada para la máxima señal, de esta forma determinada.

Para evaluar la inespecificidad del ensayo (como señal de N-HRP inespecíficamente unida al electrodo), el mismo procedimiento pero en ausencia del conjugado de LPS-biotina fue llevado a cabo. En este caso, la corriente observada fue de 3.5  $\mu\text{A cm}^{-2}$ . Estos valores son cercanos a los estimados a través del sistema lisozima-biotina/lisozima.

La Figura 7.4 muestra la curva de calibración logarítmica, de corriente catalítica a potencial constante en función de la concentración de LPS, resultado del ensayo competitivo entre LPS y LPS-biotina, donde la presencia del conjugado, LPS-biotina se pone de manifiesto con la utilización de N-HRP, según la Figura 7.1.



**Figura 7.4:** Curva de competencia. Ensayo competitivo llevado a cabo entre LPS-biotina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y concentración variable de LPS. Luego, la presencia de LPS-biotina en los electrodos es revelada por la incorporación de N-HRP, según se detalla en la sección 7.2.4. Cada concentración de LPS fue ensayada por duplicado.

Puede observarse que a mayor concentración de LPS, una menor señal es obtenida. La disminución de la señal resulta importante entre muestras que contienen  $0.01 \text{ ng mL}^{-1}$  (el equivalente a  $0.007 \text{ EU mL}^{-1}$ , que dada la potencia del LPS utilizado en este ensayo, puede considerarse una solución libre de pirógenos) y muestras que contienen  $0.1 \text{ ng mL}^{-1}$  de LPS. Para concentraciones de LPS mayores a  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ , la señal se mantiene constante, resultando el ensayo menos sensible al cambio en la concentración.

## 7.4 Sumario

El ensayo muestra una tendencia similar a la que se observa en el caso del autoensamblado, donde un conjugado de LPS-HRP fue utilizado. La adsorción inespecífica es alta y el ensayo no presenta la típica respuesta sigmoidea de un ensayo competitivo como se vio en el caso de la configuración covalente. Si bien puede observarse una tendencia, su uso como alarma deberá ser validado con un estudio estadístico más exhaustivo.

## **7.5 Referencias**

- 1- Varela, O. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **2003**, 58, 307-369.
- 2- Triantafilou, K.; Triantafilou, M.; Fernandez, N. *Cytometry* **2000**, 41, 316-320.
- 3- Hermanson, G. “*Bioconjugate Techniques*” Academic Press, 1996, Elsevier Science, San Diego, California, USA.
- 4- Chance, B.; Maehly, A. C. *Methods in Enzymology* **1955**, II, 773-775.
- 5- Bard, A.; Faulkner, L. “*Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*”, 2001, 2<sup>a</sup> ed.; John Wiley & Sons, Inc. New York, pp 166-168.

## Capítulo 8 – Discusión y Conclusiones

### 8.1 Discusión

Los dos métodos aceptados por la Federal Drug Administration (FDA), para la determinación de endotoxinas son métodos biológicos. El ensayo en conejos, además del inconveniente que ocasiona el manejo de animales, no permite una valoración cuantitativa, en parte porque las bacterias Gram Negativas son habitantes normales de los intestinos del conejo, por lo que el animal puede desarrollar diferentes grados de inmunidad a una indeterminada variedad de lipopolisacáridos y por otro lado, porque la respuesta del conejo puede ser inconstante debido al stress.<sup>1</sup> En conclusión, no sólo no permite la cuantificación de la endotoxina, sino que además la metodología debe estar muy bien estandarizada si se desean obtener resultados confiables y reproducibles. En el caso del LAL, el método es también biológico debido a que utiliza el hemolinfa extraído del cangrejo herradura, especie cuyos ancestros están presentes en la Tierra desde la era Paleozoica y por lo cual cierta preocupación sobre su peligro de extinción ha tomado estado público en los últimos años.<sup>2</sup> Asimismo, existen otras desventajas que sugieren la necesidad de un método alternativo. Requiere condiciones específicas como una temperatura acotada (36-38 °C) y un estrecho rango de pH (6-8), ensayos de confirmación de sensibilidad del lisado, controles positivos (“spike” o agregado patrón de endotoxina) y controles negativos (agua apirógena) puesto que hay drogas que inhiben o intensifican la reacción.<sup>3</sup>

La intención de este trabajo fue la de utilizar los avances realizados en el conocimiento a nivel molecular de las características fisicoquímicas de los lipopolisacáridos y de su interacción con otras moléculas, de manera de desarrollar un método de detección que no involucre animales o parte de ellos.

Diversos aspectos debieron ser analizados para el desarrollo del ensayo aquí presentado:

- Las características fisicoquímicas del conjunto de moléculas agrupado bajo el nombre de endotoxinas.

- Como reconocerlas selectivamente.
- Como construir una plataforma específica para el ensayo.
- Como producir una señal fácilmente identificable.

A diferencia de otras moléculas de interés biológico que deben detectarse en bajas concentraciones, el objetivo propuesto es determinar una parte de la molécula, el Lípido A, que es común a todas las endotoxinas, las cuales pueden presentarse en un amplio rango de pesos moleculares y en diferentes grados de asociación. La idea sugerida tiende a posibilitar la determinación del conjunto de endotoxinas y no de una endotoxina particular proveniente de una determinada cepa bacteriana, como ocurre en el caso de inmunoensayos que involucran anticuerpos anti-LPS.

Otra característica a tener en cuenta, es el hecho de que estas moléculas están formadas por lípidos e hidratos de carbono; ambos componentes no pueden ser determinados fácilmente por técnicas analíticas convencionales.

Por otra parte, como fue mencionado previamente, el reconocimiento de Lípido A a través de anticuerpos anti-lípido A no presenta la sensibilidad adecuada para el ensayo que se pretendía desarrollar, por lo tanto otro tipo de reacción selectiva debió ser utilizada.

En los últimos quince años se ha producido un gran avance en el estudio a nivel molecular de las interacciones entre LPS y proteínas pertenecientes al sistema inmune de distintos organismos, con la idea de encontrar una solución farmacológica o terapéuticamente viable para la endotoxemia. Como se ha mencionado en el Capítulo 1, varias de estas moléculas tienen una alta afinidad con distintos LPS y particularmente con el lípido A. En particular, el Factor C, no sólo tiene una alta afinidad, sino que produce una cascada de reacciones que puede considerarse como un efecto amplificador para su uso en un sensor. De hecho, es una de las proteínas contenidas en los amebocitos del cangrejo herradura, motivo por el cual un lisado de estas células es utilizado en la determinación de endotoxinas con un límite de detección realmente bajo.

Las distintas proteínas que reconocen específicamente al Lípido A tienen ciertas características en común: basicidad e hidrofobicidad parecen ser atributos necesarios para conferirles la afinidad. En general son policationes anfifílicas que poseen una clara

demarcación entre la porción positivamente cargada y la no polar. Entre ellas se encuentra ENP (Endotoxin Neutralizing Protein), proteína que fue utilizada en este trabajo. Su elección se debió a varios factores: su capacidad de unirse y neutralizar los efectos tóxicos de LPS derivado de diferentes cepas de bacterias Gram-negativas, como lo muestran los ensayos de actividad biológica realizados *in vivo* e *in vitro*;<sup>4</sup> existe una versión recombinante a partir de *Saccharomyces cerevisiae*; la proteína es altamente estable: liofilizada puede ser almacenada a -20 °C por tiempo indefinido y en solución puede mantenerse entre 2 y 8 °C por un mes. La desventaja encontrada para su utilización es que la reacción con LPS no produce cambios que puedan ser monitoreados por técnicas convencionales utilizadas en biosensores, por lo que la construcción de un ensayo directo no es trivial.

Debido a las características de la interacción entre LPS y la proteína de reconocimiento, se planteó el desarrollo de un ensayo competitivo donde la muestra compite con un LPS marcado apropiadamente. A partir de este objetivo los siguientes temas debieron evaluarse: qué tipo de transducción utilizar, cuál es la marcación apropiada, la matriz donde producir el ensayo de manera de mantener la alta afinidad del sistema y evitar reacciones no deseadas, como por ejemplo la unión inespecífica de los elementos del ensayo a la matriz y el método de inmovilización del agente de reconocimiento (ENP) de acuerdo a la matriz elegida.

Por la experiencia del grupo de trabajo, se decidió utilizar un método de detección amperométrico. Las ventajas de la técnica están ampliamente difundidas: su elevada sensibilidad, la rápida respuesta que produce, y lo simple y económico de la instrumentación requerida. Como método de marcación, en base a la técnica de transducción utilizada, se eligió en primera instancia un LPS marcado con peroxidasa de rábano picante, ya que la velocidad de reacción de esta enzima con su sustrato y distintos mediadores redox produce un efecto amplificador que afecta favorablemente el límite de detección, además de encontrarse comercialmente disponible. Como pudo observarse, dicho conjugado de LPS (LPS-HRP) mostró una baja potencia endotóxica (Capítulo 3). La baja potencia endotóxica del conjugado podría ser explicada si se considera que dado el tamaño de HRP, un importante cambio en la estructura del LPS podría producirse, con la consecuente disminución de la afinidad con la molécula de reconocimiento. Experimentalmente, la baja potencia endotóxica del conjugado, resultó en la necesidad de

utilizar concentraciones relativamente altas del mismo en los ensayos competitivos, lo cual trajo como consecuencia una importante señal inespecífica.

Este hecho originó la idea de sintetizar un conjugado en nuestro laboratorio, de manera de tener un control más estricto sobre este componente del ensayo.

Para la síntesis de dicho conjugado, se realizó una revisión de los métodos comúnmente utilizados. La literatura científica presenta numerosos trabajos acerca de la conjugación de proteínas, por lo cual la modificación de grupos funcionales, como amino, carboxilato y tiol, está ampliamente reportada. En el caso de hidratos de carbonos la información presente es más acotada y se refiere principalmente a la oxidación con periodato de grupos hidroxilo vecinos. Otra alternativa utilizada en esta tesis fue la oxidación enzimática de los alcoholes primarios presentes en la galactosa, a través de la enzima galactosa oxidasa. Como fue detallado en la sección 3.3, la enzima funciona con muy buen rendimiento en monosacáridos, pero en un polímero, particularmente con LPS, el rendimiento de la reacción es prácticamente nulo. Mejores resultados fueron obtenidos por oxidación con periodato, permitiendo luego marcar el LPS con biotina-hidracina, para la obtención del conjugado LPS-biotina. Esta estrategia tiene la ventaja de utilizar una molécula pequeña como marcador, que a su vez presenta el grupo funcional hidracina, el cual es más versátil que el grupo amino ante la elección de las condiciones de trabajo. El conjugado obtenido presentó una mayor potencia endotóxica que el conjugado comercial LPS-HRP (0.08 vs 0.012 EU ng<sup>-1</sup>), pero aumenta el número de pasos a realizar en el ensayo, debido a la necesidad de detectar posteriormente a la biotina.

Otro paso crítico es la efectiva inmovilización de la molécula de reconocimiento. El procedimiento a seguir debe permitir que la molécula retenga su actividad biológica y estabilidad. Muchas veces es necesario para obtener una fracción importante de moléculas activas, inmovilizar la molécula con su sitio de reconocimiento expuesto hacia la solución puesto que la superficie de la matriz puede impedir estéricamente que el analito, especialmente cuando es de gran tamaño, alcance el sitio de reconocimiento.

Por lo tanto, como será discutido posteriormente, la presencia de dicha molécula no asegura su funcionalidad. Dos métodos fueron utilizados en esta tesis: la unión covalente a la matriz a través de los amino expuestos de la proteína y la adsorción

controlada por interacción electrostática y fuerzas de Van der Waals a una matriz con características claramente distintas a la anterior

Para el primer caso (configuración covalente), una matriz de carboximetil dextran (CMDex) unida covalentemente al electrodo de oro a través de cistamina fue utilizada. Si bien se ha reportado la utilización de sustratos de estas características en sensores, no se encontró en la literatura estudios que avalen su uso en técnicas electroquímicas.

A partir de la modificación de oro con CMDex, Lofas y Johnson<sup>5</sup> desarrollaron un método para mejorar el número de elementos de reconocimiento unidos a la superficie y evitar la adsorción no específica en sensores basados en la técnica de resonancia de plasmones superficiales (SPR). La incorporación de este polímero al transductor provee una superficie en la cual los biocomponentes presentes en una muestra no se fijan apreciablemente a la superficie por adsorción inespecífica. En el Capítulo 7, la Figura 7.2 se puede utilizar para ejemplificar cómo la presencia de CMDex disminuye la adsorción inespecífica de proteínas, en este caso neutravidina marcada con HRP.

Técnicas electroquímicas y elipsométricas fueron utilizadas para el seguimiento de los distintos pasos realizados para la construcción de esta plataforma de reconocimiento. El valor de cobertura de cistamina estimado electroquímicamente mediante la reacción con ferrocenocarboxialdehído, dio una cobertura de ferroceno y por lo tanto de cistamina de  $810 \pm 40$  pmoles.  $\text{cm}^{-2}$ , que coincide con el obtenido por Wirde et al.<sup>6</sup> Este resultado concuerda también con los valores obtenidos por Zhong et al.<sup>7</sup> para butanotiol, butilsulfuro y etanotiol sobre Au(111), El-Deab et al.<sup>8</sup> para cisteína y cistamina, y Weisshaar et al.<sup>9</sup> para mercaptoetanol y mercaptoacético, todos tioles de cadena corta. Estos trabajos estiman una cobertura de 800 a 900 pmoles. $\text{cm}^{-2}$ .

Alternativamente, con la misma finalidad, se probó de desorber electroquímicamente el tiol a pH fuertemente alcalino. La desorción reductiva del tiol a ese pH, de dominios tales como Au(110), Au(100), Au(311) y Au(210) del Au policristalino se superpone con la corriente de evolución de hidrógeno debido a que los tioles son reductivamente removidos a potenciales más negativos que sobre el Au(111) ( $E = -0.7$  V)<sup>10</sup>. En nuestro caso se utilizaron electrodos de oro policristalinos, y como era de esperar, la superposición del proceso reductivo a partir de los distintos dominios resultó importante. Esta superposición dificulta la determinación gráfica de la carga y

podría ser que los picos provenientes de dominios que desorben a los potenciales más negativos queden ocultos dentro de la onda de evolución de H, motivo por el cual la carga calculada y por ende la cobertura de cistamina ( $570 \text{ pmol cm}^{-2}$ ) podría resultar subestimada.

Como fue mencionado, la finalidad de incorporar CMDex al electrodo fue introducir una matriz hidrofílica que evite la adsorción no específica y que además permita anclar a ENP, por lo tanto, es necesario asegurar que en la matriz, una importante cantidad de grupos carboxilato del CMDex queden disponibles para la posterior incorporación de la proteína (ENP) a través de un enlace covalente. Los siguientes cálculos permiten mostrar que dicho objetivo pudo ser alcanzado. La adsorción de cistamina sobre electrodos de oro y la reacción entre grupos amino y aldehído en presencia de cianoborohidruro son procesos bien establecidos. La diferencia observada entre las corrientes o cargas debido a la incorporación del grupo ferroceno para electrodos sin y con CMDex, permite estimar la cantidad de CMDex unido al electrodo. Una carga de  $78 \text{ } \mu\text{C cm}^{-2}$ , equivalente a  $810 \text{ pmol cm}^{-2}$ , fue obtenida debido a la presencia del grupo ferroceno unido a electrodos Au/Cys. Luego de la adición de CMDex al electrodo (Au/Cys/CMDex), la carga debida a la presencia del grupo ferroceno disminuyó a  $39 \text{ } \mu\text{C cm}^{-2}$  ( $400 \text{ pmol cm}^{-2}$ ). Esto indica que  $400 \text{ pmol cm}^{-2}$  grupos amino quedaron disponibles luego de la modificación con CMDex, para reaccionar con el ferroceno aldehído, lo cual es lo mismo que decir que  $410 \text{ pmol cm}^{-2}$  grupos carboxilato del CMDex están unidos a la cistamina.

Interesa conocer cuántos grupos carboxilato, a través de los cuales será unida la proteína de reconocimiento, permanecen libres en la superficie del electrodo. Se estimó por elipsometría que la concentración superficial de CMDex fue de  $18 \text{ pmol cm}^{-2}$ , por lo tanto,  $1188 \text{ pmol cm}^{-2}$  de carboxilatos están presentes, considerando que CMDex contiene aproximadamente 66 moles de carboxilato por mol de polímero. Si como se mencionó anteriormente, 410 han reaccionado con la cistamina en la superficie del electrodo, aún hay  $778 \text{ pmol cm}^{-2}$  libres y disponibles para reaccionar con ENP.

El seguimiento de la modificación de los electrodos fue complementado por medidas elipsométricas. Se observó el cambio en los parámetros elipsométricos para cada paso de modificación de los electrodos, pudiéndose estimar la cobertura tanto de CMDex como de la proteína.

Au/Cys/CMDex fue estudiado en dos condiciones diferentes, en aire ("ex-situ") y en solución ("in-situ").

Los resultados obtenidos bajo estas dos condiciones permitieron estimar valores similares para la concentración superficial de este material y la gran diferencia obtenida para el índice de refracción y el espesor en ambos ambientes, permitió mostrar la propiedad de hidrogel que adquiere el film, con un alto contenido de agua en su interior.

El experimento "in-situ" demuestra la existencia de una capa de 71 nm de espesor, indicando una expansión del CMDex covalente unido hacia la solución. El modo en el cual el dextran y sus derivados se pueden unir a una superficie fue estudiado previamente por Piehler et al.<sup>11</sup> Si se considera la forma de la molécula como una cinta, ésta puede unirse a una superficie lateralmente (configuración paralela) o por uno de sus extremos (configuración perpendicular). Estudios previos demuestran que CMDex adopta la configuración perpendicular produciendo películas con un espesor que van en un rango de 80 a 190 nm. Estos valores dependen de las condiciones de reacción: la concentración inicial de CMDex y del tiempo de la misma, pero también de las repulsiones inter e intramoleculares que se pueden esperar de los grupos carboxilato, las cuales se cargan negativamente por encima de pH 5. Los resultados presentados aquí indicarían que las moléculas de CMDex se unen a la superficie en una configuración perpendicular, extendida y con un alto contenido de agua, facilitando así la posterior incorporación de la proteína.

Para la incorporación de la proteína fueron propuestos dos modelos, ambos en concordancia con los datos experimentales: un modelo de película simple y otro de película doble. Ambos modelos fueron propuestos como modelos extremos por su simplicidad, sin embargo, no se puede descartar la idea de que la situación real pueda corresponderse con un modelo mucho más complejo, donde exista un gradiente en la concentración de ENP a través del film desde la superficie del sustrato hacia la interfase con la solución, esto es, un film de CMDex extendido hacia la solución, con grupos funcionales carboxilatos a diferentes distancias de la superficie de anclaje, y en algunos de ellos ENP es incorporada, encontrándose en la región más cercana al electrodo una menor proporción de ENP. Modelos similares han sido propuestos y los resultados obtenidos dependen principalmente del largo de la cadena polimérica del dextran.<sup>12</sup> Los dos modelos propuestos en esta tesis, estiman coberturas similares de la proteína

incorporada, sin embargo, por medio de estos experimentos y esta técnica, no es posible elegir o dar preferencia a un modelo por sobre el otro.

En el capítulo 1, la estructura cristalográfica de ENP<sup>13</sup> fue presentada. En base a esos estudios, la forma de la proteína puede ser aproximada a la de un cono de 4 nm de altura por 2.8 nm de diámetro en la base. Considerando las 2 situaciones extremas, de mayor y menor cobertura: con la base del cono apoyada sobre la superficie (similar a un empaquetamiento cerrado de esferas donde la densidad superficial es  $\frac{1}{2\sqrt{3}Nr^2}$ ) o con el cono volcado sobre la superficie (ocupando la misma superficie que un rectángulo), cubrimientos de 25 y 15 pmoles cm<sup>-2</sup> respectivamente pueden ser estimados para una monocapa, menos de la mitad del valor estimado por elipsometría ( $\approx 50$  pmoles cm<sup>-2</sup>). Si tenemos en cuenta además que la proteína contiene sus grupos amino, a través de los cuales se une a la superficie, orientados en el extremo cercano al vértice sobre una de sus caras laterales, como se describió en el Capítulo 1, una situación más cercana a la del cono volcado o intermedia debe ser considerada. Por lo tanto, la técnica de elipsometría estima que más de una monocapa de proteína pudo ser incorporada, lo que corrobora el hecho de que la estructura tridimensional del hidrogel de dextran permite una mayor carga de proteína, aumentando la capacidad de incorporación de la misma sobre el transductor.

La otra configuración (configuración electrostática) utiliza un polímero electroactivo de polialilamina como matriz donde incorporar a la proteína. Entre los principales motivos por los cuales esta configuración fue elegida se pueden mencionar: la construcción de los electrodos es muy sencilla y el sistema obtenido (Au/MPS/PAAOs) está ampliamente estudiado, por otra parte el tener el mediador redox integrado a la superficie del electrodo permite una significativa simplificación del desarrollo a nivel experimental, un reactivo menos debe ser agregado a la solución de medición, descontando la ventaja, tanto económica como operativa, de disminuir el consumo de dicho reactivo, que es sintetizado en nuestro laboratorio.

Si bien esta configuración permite trabajar con una alta concentración de Os, puesto que esta especie se concentra en la matriz, esta ventaja no es tal, puesto que existe una ineficiente conexión entre los sitios de Os y las moléculas de enzima como fue reportado previamente <sup>14,15</sup> y también observado en esta tesis. Por ejemplo, en el

Capítulo 6 sección 6.3.2, se mostró que si bien la cantidad de sitios de Os en el film está en exceso comparada con la máxima cobertura de enzima (80 vs 25 pmoles  $\text{cm}^{-2}$ ), indicando que la corriente catalítica no debería estar limitada por la concentración de osmio, un importante incremento en la misma se observó cuando el mediador fue agregado a la solución, en una concentración despreciable respecto a la que se encuentra en el film.

El diferente comportamiento del sistema LPS-ENP frente a un ensayo competitivo, observado en las dos configuraciones utilizadas (Capítulo 6) cuando un mismo conjugado es utilizado (LPS-HRP), puede ser analizado considerando la estructura tridimensional de ENP y los procedimientos de inmovilización utilizados en cada caso para fijar dicha molécula al electrodo.

Como fue detallado en el capítulo 1, la estructura cristalográfica de ENP muestra que la proteína contiene un dominio, al que llamamos lazo de reconocimiento, formado por las hebras 2 y 3 unidas por un puente disulfuro entre los residuos Cys 31 y Cys 52. Este dominio contiene una serie alternada de residuos positivamente cargados e hidrofóbicos que, en virtud de su conformación, apuntan en direcciones opuestas, formando un lazo anfifílico positivamente cargado a pH neutro. (Figura 1.10A-B págs. 24-25). La unión específica de LPS a este lazo, se postula se origina con un primer acercamiento de tipo electrostático, entre los fosfatos del lípido A y los aminos en el lazo, para formar el complejo y la posterior estabilización del mismo, por fuerzas de Van der Waals entre las cadenas lipídicas del LPS y la porción hidrofóbica de la proteína, según lo descrito por Surolia et al<sup>16,17</sup> para las interacciones del lípido A con distintos péptidos.

La distinta posición que adquiere el lazo debido al proceso de inmovilización puede ayudar a explicar los distintos límites de detección observados en los dos ensayos. En el caso del electrodo de Au/MPS/PAAOs/ENP, la proteína es fijada por adsorción a través de una combinación de fuerzas electrostáticas y de Van der Waals a la cadena lineal de la poli(alilamina), principalmente estas últimas, dado el pH a partir del cual se promovió la adsorción, dejando el extremo de la proteína cargado positivamente expuesto hacia la solución y disponible para la formación del complejo con LPS. En cambio, cuando la proteína covalentemente se une a CMDex, como en Au/Cys/CMDex/ENP, se forman enlaces amida a partir de los grupos amino de los

residuos de lisina de la proteína, la mayoría de ellos en el lazo antedicho. Por lo tanto, parte de la carga positiva se pierde. Es considerable esperar que este efecto afecte en cierto grado la afinidad de la proteína por el lípido A.

Como se mencionó anteriormente, si bien la proteína se encuentra presente en el film, como fue concluido de los estudios elipsométricos, su funcionalidad puede estar disminuida por efecto del método de inmovilización, lo que explicaría que se requiera una mayor concentración de LPS para desplazar al conjugado en el ensayo competitivo, cuando se utiliza esta configuración respecto a la configuración electrostática. Para confirmar esta hipótesis más estudios deben realizarse, por ejemplo, la inmovilización de ENP al electrodo puede llevarse a cabo a través de otros grupos funcionales presentes en la proteína, como grupos carboxilatos de los residuos aspártico y glutámico, que si bien se encuentran en menor número, ellos están alejados del lazo de reconocimiento.

En el Apéndice fue presentado un modelo para la catálisis enzimática de HRP y su conexión con un mediador redox cuando la enzima está inmovilizada en un film y el mediador se encuentra en solución. Debido a la complejidad de este proceso acoplado, la resolución de la ecuación resultante que lo describe no es trivial, pero ciertas consideraciones experimentales permiten simplificarla y resolverla. El tratamiento realizado considera que: a) la concentración de sustrato es mucho mayor que la de mediador, por lo que es la reacción enzima-mediador la que controla la velocidad del proceso global y b) la concentración de sustrato es tal que se trabaja en condiciones no inhibitorias de la actividad de la enzima. Bajo esas condiciones, dos situaciones límite (donde el Os es consumido completamente dentro del film o donde su concentración se mantiene prácticamente constante e igual a la del seno de la solución) pueden ser reconocidas, y la corriente obtenida por cronoamperometría puede ser predicha, en base a las concentraciones de peróxido de hidrógeno, mediador y enzima adsorbida, y la constante de velocidad para la reacción entre la enzima y el mediador.

Las concentraciones de sustrato, mediador y el espesor del film utilizados para la configuración covalente, conducen a la aplicación del caso I del Apéndice (ó Capítulo 2, ecuación 2.14)

Para esta configuración, la adsorción de LPS-HRP sobre el electrodo Au/Cys/CMDex/ENP produjo una corriente máxima de  $1,4 \mu\text{A cm}^{-2}$ . Teniendo en cuenta la concentración de mediador y las constantes de velocidad del paso limitante (Apéndice,

Tabla 1), a partir de la ecuación 2.14 puede predecirse una cobertura de  $0.08 \text{ pmol cm}^{-2}$  de enzima. Este valor podría estar subestimado, ya que hemos considerado que el valor de la constante de velocidad no es afectado por la inmovilización.

Limoges y colaboradores<sup>18</sup> establecieron que aproximadamente 75% de la enzima permanece activa una vez inmovilizada; en el mismo trabajo, se informa un recubrimiento de  $3.8 \text{ pmol cm}^{-2}$  para una monocapa de Neutravidina-HRP, 50 veces mayor que el obtenido en este trabajo. Este resultado sugiere una baja afinidad del conjugado LPS-HRP por la superficie.

Si bien en este trabajo la saturación de la superficie por el conjugado no pudo ser alcanzada, los valores obtenidos sugieren que menos de una monocapa de enzima pudo depositarse en el film.

Algunos factores que pueden influir en la cantidad de LPS-HRP que puede ser incorporado al electrodo son: Por un lado, problemas estéricos debido al tamaño de este conjugado en particular. Santos et al<sup>19</sup> estudiaron por light scattering el diámetro hidrodinámico de soluciones de LPS de *E. coli* 026:B6, el utilizado para la síntesis de nuestro conjugado comercial. Ellos definen 3 regiones en función de la concentración de LPS, por debajo de la CMC ( $13\text{-}15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) el diámetro hidrodinámico obtenido es de 119 nm. Un cálculo de la cobertura para una monocapa, considerándola como un empaquetamiento compacto de esferas, conduce a un valor de  $0.02 \text{ pmoles cm}^{-2}$ , bastante más cercano al obtenido. Cabe aclarar que los resultados de la publicación de referencia están en discusión y que no se cuenta con información acerca del comportamiento de este LPS cuando está conjugado con HRP. Otro factor, muy probablemente relacionado con el anterior, es la baja actividad endotóxica del conjugado, determinada en fase homogénea a través del ensayo LAL.

Algo que se hace evidente con estos resultados, es que si bien el CMDex es una plataforma conveniente para la construcción de un sensor a partir de uniones covalentes puesto que, como se mostró, permite una carga de la proteína mayor a la de una monocapa, difícilmente esta ventaja pueda ser explotada, debido al tamaño del conjugado y también de la muestra, lo cual va a depender de cada LPS en particular.

Lo planteado en el párrafo anterior no implica que esta matriz deba ser descartada, en primer lugar, debido a que la otra ventaja que ella presenta, la baja

adsorción de biomoléculas, tales como proteínas, es un aspecto importante en el desarrollo de la plataforma, sobretodo desde el punto de vista de evitar interferencias y en segundo término, porque las corrientes obtenidas, si bien son mas bajas que lo deseado, no representan un inconveniente. Nano ó pico amperes pueden ser medidos con relativa facilidad y sin un alto costo.

La aplicación de un modelo teórico para la estimación de la cobertura de enzima, dadas las máximas corrientes obtenidas para la configuración electrostática, donde el mediador se encuentra también inmovilizado en el film (Capítulo 2, ecuación 2.17) presenta una complejidad adicional. Ya algunos autores muestran que los valores de corriente catalítica experimentales distan, en más de un orden de magnitud, del valor predicho por el modelo. La razón para esta diferencia está principalmente fundamentada en la ineficiente transferencia electrónica entre el mediador y la enzima, lo cual puede ser comprendido en términos de una muy baja concentración efectiva de mediador o una muy desfavorable constante de velocidad para la reacción enzima-mediador. Si bien este efecto fue observado en esta tesis, no fue evaluado cuantitativamente, motivo por el cual carece de sentido el uso del modelo para la obtención de la cobertura de enzima.

El ensayo utilizando LPS-biotina utiliza un electrodo construido en forma covalente y el mediador redox en solución. Si bien el procedimiento por el cual se lleva a cabo el ensayo es, en estos aspectos, similar al presentado en la sección 6.3.1, conviene destacar algunas diferencias. Este conjugado presenta una mejor actividad endotóxica que su antecesor, por otro lado, para la obtención de la señal debe realizarse un paso más que es el agregado de N-HRP, la cual dada su elevada constante de afinidad podría llegar a desorber al conjugado de la superficie. Experimentalmente se observó que la corriente obtenida a bajas concentraciones de LPS y con el electrodo saturado con N-HRP fue mayor que en el caso de LPS-HRP (7.8 vs 1.4  $\mu\text{A}$ ); a altas concentraciones de LPS, la corriente residual también fue mayor (5 vs 0.9  $\mu\text{A}$ ). El rango dinámico de respuesta fue ligeramente diferente para el ensayo con LPS-biotina que para LPS-HRP, mientras que la variación entre valores extremos fue de 2.8  $\mu\text{A}$  para el primero y 0.5  $\mu\text{A}$  para el segundo. Este aumento en la amplitud de la curva sugiere que el LPS-biotina o bien tiene una mayor afinidad por la molécula de reconocimiento, o debido a su menor tamaño puede acceder a un mayor número de sitios de unión en la superficie. También se observa una mayor corriente debido a la unión inespecífica de NHRP, como se mostró en el Capítulo

7 (Figura 7.1). Considerando que los estudios de este sistema son preliminares, no puede avanzarse en un análisis más detallado.

El comportamiento observado a altas concentraciones de LPS en los ensayos competitivos puede ser explicado en función de la complejidad que presenta el LPS a concentraciones por arriba de su concentración micelar crítica (11 y 14  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para LPS de *S. minnesota* y *E. coli*, respectivamente). La agregación del analito con el conjugado podría conducir a una pérdida completa de su habilidad para la competencia.

Por último, para tratar el tema de posibles interferencias, se vuelve a hacer hincapié en la necesidad de un conjugado con mayor afinidad. Cualquier otra molécula que tenga mayor afinidad que el conjugado por los sitios sobre la superficie podría desplazarlo. Para el caso de la configuración electrostática, la poli(alilamina) contiene una cadena lineal hidrofóbica combinada con cargas positivas. Esta estructura genera una advertencia a posibles interferencias como proteínas. Sin embargo, si la técnica se orienta a la determinación de endotoxinas en soluciones acuosas altamente puras que contienen principalmente iones inorgánicos, interferencias y falsos positivos debido a otros agentes contaminantes de origen biológico (proteínas, carbohidratos, etc.) serán despreciables. Para el dextran, la otra matriz utilizada en este trabajo, como fue mencionado en reiteradas ocasiones, está ampliamente difundida su capacidad para prevenir la adsorción no específica; por lo tanto en este sistema la presencia de la otra especie biológica no debe interferir con la señal producida por LPS.

## **8.2 Conclusiones**

Esta tesis se inicia con la idea de poder dar respuestas a una necesidad concreta y real de la industria que es la búsqueda de un método alternativo al actualmente utilizado (ensayo LAL) para la detección de endotoxinas. Un método más automatizado, que dependa menos de la calificación del operador, utilizando reactivos que no involucren la captura de un animal que no se puede criar en cautiverio, como es el caso del cangrejo herradura.

El objetivo, así planteado, se podría calificar de ambicioso considerando los distintos temas que abarca. Por tal motivo, el trabajo aquí presentado, más que pretender establecer un método definitivo intenta aportar datos que pueden contribuir a un mejor entendimiento del sistema y servir de base para posteriores desarrollos sustentados en similares principios.

El principio de mayor relevancia al cual se hace referencia, es la utilización de un agente de reconocimiento específico para una porción común a todas las endotoxinas, inmovilizado en una superficie, como la base fundamental para el desarrollo de un sensor.

En este trabajo se exploró exitosamente esta posibilidad usando esta estrategia química de reconocimiento a través de un ensayo competitivo. Una versión recombinante de una proteína antimicrobiana (ENP) presente en el sistema inmune del cangrejo herradura fue incorporado a un electrodo. El ensayo fue realizado entre una concentración fija de un conjugado (LPS-HRP) y LPS presente en la muestra permitiendo la detección de la endotoxina en niveles bajos con un análisis más simple que el actualmente en uso.

Dos estrategias, basadas en distintos métodos de inmovilización de esta proteína de reconocimiento específico, fueron probadas a través de este tipo de ensayo. Los resultados muestran que con la configuración electrostática, puede detectarse la presencia de endotoxinas en concentraciones de  $0.2 \text{ EU mL}^{-1}$ , una concentración que está por debajo del límite de 0.25 establecido por la Farmacopea Americana para inyectables. Alternativamente, la configuración covalente muestra un rango de utilidad más amplio pero un límite de detección mayor ( $1.5 \text{ EU mL}^{-1}$ ).

Sin embargo y como fue anticipado en la discusión, varios temas deben ser tratados. Dos cuestiones pueden ser encaradas conjuntamente para mejorar la respuesta; el aumento en la afinidad del conjugado y la disminución de la adsorción inespecífica. Una mejora en la especificidad puede ser alcanzada por un cambio en la orientación de la proteína, sin descartar el empleo de otros agentes de reconocimiento, como por ejemplo el CAP-18, presentado también en esta tesis. Por otro lado, la aceptación del desarrollo propuesto requiere de un análisis estadístico más sólido, que contemple la utilización de LPS provenientes de diversas fuentes y finalmente una validación de los ensayos que correlacione con los métodos aceptados.

En esta tesis se estableció una metodología para inmovilizar CMDex sobre un electrodo de oro, probándose con técnicas elipsométricas y electroquímicas su incorporación. No se encontraron antecedentes donde este sistema sea utilizado para métodos electroquímicos ni estudios fisicoquímicos del mismo. La utilización de esta plataforma en técnicas electroquímicas con sistemas conocidos podría ser llevada a cabo y comparada con resultados obtenidos por otras técnicas donde su utilidad ya está establecida, como SPR y QCM. De la misma manera, puede resultar interesante estudiar los electrodos diseñados en este trabajo con dichas técnicas donde la respuesta es directamente proporcional a la concentración de la muestra.

Fue puesta a punto una técnica para la purificación de LPS. Este trabajo fue encarado con la finalidad de obtener un reactivo puro, en un rango acotado de peso molecular y caracterizado para la posterior utilización en la síntesis de un conjugado.

Finalmente, se realizó un análisis teórico del comportamiento de la enzima HRP inmovilizada dentro de un film sobre la superficie de un electrodo, cuando se utiliza un mediador en solución y en su forma reducida, para transferir la carga de la enzima al electrodo. Este análisis permite una mejor comprensión acerca de cuales son las variables a manejar para optimizar el ensayo. Una conclusión que puede extraerse, es que una concentración alta de mediador (en el orden de  $10^{-4}$  M para una concentración de sustrato como la utilizada en este trabajo) asegura que la corriente dependa únicamente de la concentración de enzima y no se vea afectada por ligeros cambios en la concentración del mediador ó del peróxido de hidrógeno.

Los resultados presentados en esta tesis han sido parcialmente publicados en el siguiente artículo: “Use of an Antimicrobial Protein for Endotoxin Detection in a Competitive Electrochemical Assay”. Priano, G.; Battaglini, F. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4976-4984 y en la patente de invención: “Dispositivo Sensor y Método para la Detección de Pirógenos en Muestras Líquidas” Acta Nro.P040103540, **2004**.

### **8.3 Referencias**

- 1- Williams, K. L. The Rabbit Pyrogen Test en “*Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation*”, 2ª ed., 2001, Marcel Dekker, Inc., New York.
- 2- Gorman, J. *Decrease in Crabs Raises Concerns*, New York Times, 27 de Mayo de 2002.
- 3- USP BET (Bacterial Endotoxins Test) <85> **1993** y actualización de **2003**
- 4- a) Warren, H. S.; Glennon, M. L.; Wainwright, N.; Amato, S. F.; Black, K. M.; Kirsch, S. J.; Riveau, G. R.; Whyte, R. I.; Zapol, W. M.; Novitsky, T. J. *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 2506-2513. b) Ried, C.; Wahl, C.; Miethke, T.; Wellenhofer, G.; Landgraf, C.; Schneider-Mergener, J.; Hoess, A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 28120-28127. c) Bannerman, D.; Fitzpatrick, M.; Anderson, D.; Bhattarcharjee, A.; Novitsky, T.; Hasday, J.; Cross, A.; Goldblum, S. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 1400-1407.
- 5- Löfas, S.; Johnsson, B. *J Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, *21*, 1526-1528.
- 6- Wirde, M.; Gelius, U. *Langmuir* **1999**, *15*, 6370-6378.
- 7- Zhong, Ch.; Porter, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11616-11617.
- 8- El-Deab, M. Ohsaza, T. *Electrochimica Acta* **2004**, *49*, 2189-2194.
- 9- Weisshaar, D.; Walczak, M.; Porter, M. *Langmuir* **1993**, *9*, 323-329.
- 10- Yang, D.; Wilde, C.; Morin, M. *Langmuir* **1996**, *12*, 6570-6577.
- 11- Piehler, J.; Brecht, A.; Hehl, K.; Gauglitz, G. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, *13*, 325-336.
- 12- Stenberg, E.; Persson, B.; Roos, H.; Urbaniczky, C. *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *143*, 513-526.
- 13- Hoess, A.; Watson, S.; Siber, G. R.; Liddington, R. *The EMBO Journal*, **1993**, *12*, 3351-3356.
- 14- Hodak, J.; Etchenique, R.; Calvo, E. J.; Singhal, P.; Bartlett, P. *Langmuir* **1997**, *13*, 2708-2716.

- 15- Calvente, J. J.; Narváez, A.; Domínguez, E.; Andreu, R. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 6629-6643.
- 16- Thomas, C. J.; Gangadhar, B. P.; Surolia, N.; Surolia, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12428-12434.
- 17- Thomas, C. J.; Surolia, N.; Surolia, A. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35701–35706.
- 18- Limoges, B.; Saveant, J. M.; Yazidi, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9192-9203.
- 19- Santos, N.; Silva, A.; Castanho, M.; Martins-Silva, J.; Saldanha, C. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 96-100.



## Apéndice

### Modelo de la respuesta amperométrica

La idea de modelar el comportamiento de la enzima HRP inmovilizada dentro de un film uniforme sobre la superficie del electrodo tiene el objeto de investigar los efectos de la inmovilización sobre la cinética enzimática o para optimizar la performance de dispositivos basados en esta enzima inmovilizada. Para ello es necesario resolver las ecuaciones resultantes de los procesos acoplados de difusión y reacción. Debido a la cinética enzimática de tipo Michaelis-Menten, estas ecuaciones son no lineales. En la presente sección se realizará un tratamiento analítico aproximado basado en la identificación de situaciones límites en las cuales la ecuación que describe el proceso puede ser simplificada y resuelta.

Se considerará la situación en la cual la enzima se encuentra inmovilizada en un film de espesor,  $\ell$ , en la superficie de un electrodo. Para simplificar el procedimiento se excluirá el efecto del transporte de masa en la solución fuera del film y se considerará el efecto conjunto de difusión y partición de las especies dentro del film (así, para el mediador soluble se considerará el coeficiente de difusión obtenido experimentalmente cuando el electrodo se encuentra modificado con la enzima incorporada dentro del film y para el agua oxigenada, debido a las características del film y el tamaño de la molécula dicho efecto se considera despreciable).

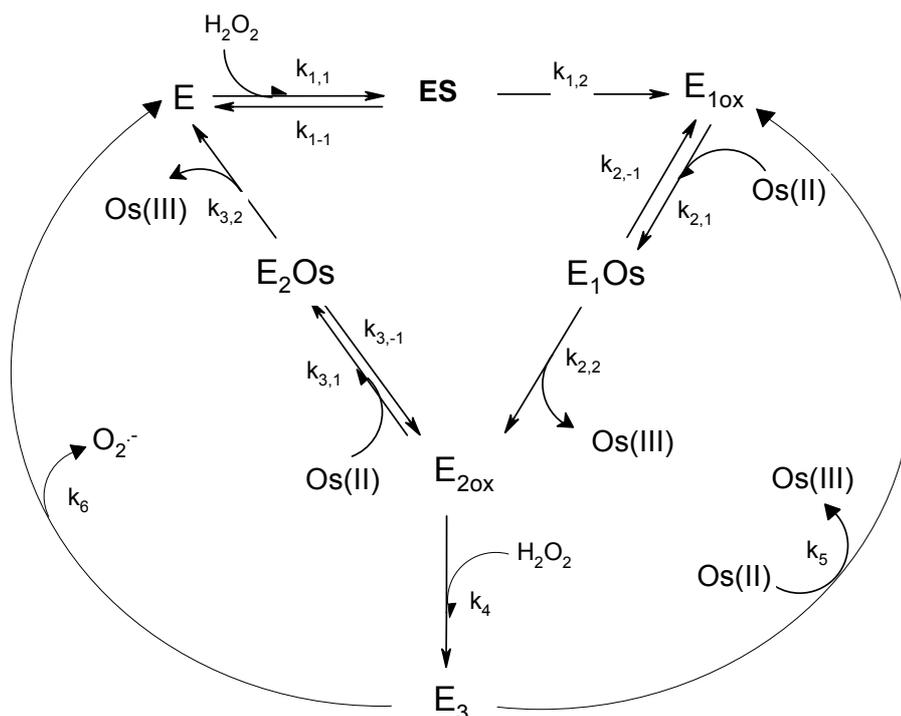
Las distintas formas de la enzima alcanzan el estado estacionario en la escala de tiempo de los experimentos, por lo que el tratamiento estará restringido a la descripción del comportamiento en el estado estacionario y está basado en tratamientos desarrollados previamente.<sup>1-4</sup>

#### El modelo

La Figura 1 muestra el esquema cinético para la enzima redox HRP en presencia de su sustrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de un complejo de Os(II) como cosustrato. En el esquema, E,  $\text{E}_{1\text{ox}}$  y  $\text{E}_{2\text{ox}}$  representan a la enzima nativa y en los estados de oxidación, comúnmente denominados compuestos I y II, respectivamente;  $\text{E}_1\text{Os}$  y  $\text{E}_2\text{Os}$  son las especies

intermediarias en ambas reacciones. Os(II) es el mediador en su forma reducida y Os(III) el mediador en su forma oxidada.

La enzima puede ser inhibida por exceso de sustrato. La ruta para la inactivación de HRP por exceso de  $H_2O_2$  involucra la formación de oxiperoxidasa, normalmente designado como compuesto III ó  $E_3$ . En presencia de  $H_2O_2$ , la formación de  $E_3$  ocurre con una constante de velocidad  $k_4$ , con valores en el rango de  $16 - 40 M^{-1} s^{-1}$ , dependiendo del pH y la temperatura.<sup>5,6</sup>  $E_3$  puede ser convertido a E por descomposición espontánea, rindiendo el ion superóxido con una constante de velocidad  $k_6$ .<sup>7,8</sup> Por otro lado,  $E_3$  puede ser reducido a  $E_{1ox}$  por algunos donores de electrones. Así, por ejemplo, el complejo de Os utilizado como cosustrato en la presente tesis puede reducir  $E_3$  a  $E_{1ox}$  restableciendo el ciclo catalítico de HRP,<sup>4</sup> como se muestra en la Figura A1.

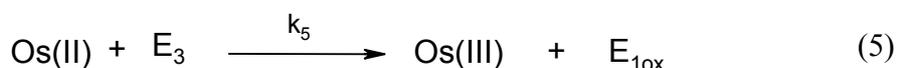
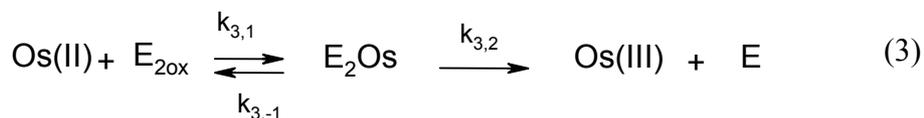
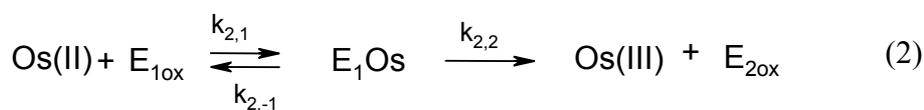
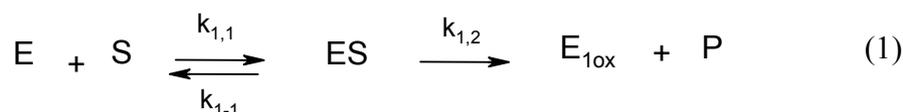


**Figura A1:** Ciclo catalítico de la enzima HRP.

La enzima E se encuentra inmovilizada de modo tal que su concentración es uniforme a través del espesor  $l$  del film. El mediador, que se encuentra presente en la

solución en su forma reducida, es libre para difundir con un coeficiente de difusión  $D_{Os(II)}$ .

Las reacciones que ocurren dentro del film pueden ser escritas como:



mientras que en el electrodo ocurre:



donde  $k_{1,1}$ ;  $k_{1,-1}$  y  $k_{1,2}$  son las constantes de velocidad que describen la reacción entre la enzima y el sustrato.  $k_{2,1}$ ;  $k_{2,2}$ ;  $k_{2,-1}$ ;  $k_{3,1}$ ;  $k_{3,2}$  y  $k_{3,-1}$  son las constantes de velocidad que describen las reacciones que ocurren entre la enzima y el mediador.  $k_4$  es la constante de velocidad para la reacción de inhibición y  $k_5$  y  $k_6$  para las reacciones de reconversión de  $E_3$  a una especie activa de la enzima. La cinética de la enzima HRP con su sustrato  $H_2O_2$  ha sido estudiada extensamente. Ésta sigue un comportamiento de tipo Michaelis-Menten con un  $K_{1,M} = (k_{1,-1} + k_{1,2})/k_{1,1} = 128 \mu M$  y  $k_1 = k_{1,1} \times k_{1,2} / (k_{1,-1} + k_{1,2}) = 1.7 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$  <sup>9-11</sup> (Tabla 1).

Por otra parte, Dequaire et al reportaron que la reducción de  $E_{1ox}$  (reacción  $E_{1ox}/E_{2ox}$ ) es mucho más rápida que la reducción de  $E_{2ox}$  (reacción  $E_{2ox}/E$ ). En dicho trabajo se utilizó un complejo de osmio piridínico  $[Os(bpy)_2pyCl]^+$  como donador de electrones.

De acuerdo con el esquema de reacciones anterior, la ecuación resultante de los procesos acoplados de difusión y reacción del mediador dentro del film resulta:

$$\begin{aligned} \frac{\partial [Os(II)]}{\partial t} = D_{Os(II)} \frac{\partial^2 [Os(II)]}{\partial x^2} - k_{2,1} [Os(II)] [E_{1ox}] + k_{2,-1} [E_1Os] - k_{3,1} [Os(II)] [E_{2ox}] + \\ + k_{3,-1} [E_2Os] - k_5 [Os(II)] [E_3] \end{aligned} \quad (7)$$

En el estado estacionario para las distintas formas de la enzima  $\frac{\partial [E_x]}{\partial t} = 0$ , de modo que:

$$\frac{\partial [E_3]}{\partial t} = 0 = k_4 [S] [E_{2ox}] - k_5 [Os(II)] [E_3] - k_6 [E_3] \quad (8)$$

$$\frac{\partial [E_2Os]}{\partial t} = 0 = k_{3,1} [E_{2ox}] [Os(II)] - k_{3,-1} [E_2Os] - k_{3,2} [E_2Os] \quad (9)$$

$$\frac{\partial [E_1Os]}{\partial t} = 0 = k_{2,1} [E_{1ox}] [Os(II)] - k_{2,-1} [E_1Os] - k_{2,2} [E_1Os] \quad (10)$$

$$\frac{\partial [E_{2ox}]}{\partial t} = 0 = k_{2,2} [E_1Os] + k_{3,-1} [E_2Os] - k_{3,1} [E_{2ox}] [Os(II)] - k_4 [E_{2ox}] [S] \quad (11)$$

$$\frac{\partial [E_{1ox}]}{\partial t} = 0 = k_{2,-1} [E_1Os] + k_{1,2} [ES] - k_{2,1} [E_{1ox}] [Os(II)] + k_5 [E_3] [Os(II)] \quad (12)$$

$$\frac{\partial [E]}{\partial t} = 0 = k_6 [E_3] + k_{3,2} [E_2Os] + k_{1,-1} [ES] - k_{1,1} [E] [S] \quad (13)$$

$$\frac{\partial [ES]}{\partial t} = 0 = k_{1,1} [E] [S] - k_{1,-1} [ES] - k_{1,2} [ES] \quad (14)$$

Estas ecuaciones pueden ser reordenadas de manera que cada concentración quede expresada como una función de  $[E_{2ox}]$ , obteniéndose:

$$[E] = \frac{\left( k_3 [E_{2ox}] [Os(II)] + \frac{k_6 k_4 [S] [E_{2ox}]}{k_6 + k_5 [Os(II)]} \right)}{k_1 [S]} \quad (15)$$

$$[ES] = \frac{\left( k_3 [E_{2ox}] [Os(II)] + \frac{k_6 k_4 [S] [E_{2ox}]}{k_6 + k_5 [Os(II)]} \right)}{k_{1,2}} \quad (16)$$

$$[E_{1ox}] = \frac{(k_3 [E_{2ox}] [Os(II)] + k_4 [S] [E_{2ox}])}{k_2 [Os(II)]} \quad (17)$$

$$[E_1 Os] = \frac{(k_3 [E_{2ox}] [Os(II)] + k_4 [S] [E_{2ox}])}{k_{2,2}} \quad (18)$$

$$[E_2 Os] = \frac{k_3 [E_{2ox}] [Os(II)]}{k_{3,2}} \quad (19)$$

$$[E_3] = \frac{k_4 [S] [E_{2ox}]}{k_6 + k_5 [Os(II)]} \quad (20)$$

con  $k_2 = \frac{k_{2,1} k_{2,2}}{k_{2,-1} + k_{2,2}} = \frac{k_{2,2}}{K_{2,M}}$  y  $k_3 = \frac{k_{3,1} k_{3,2}}{k_{3,-1} + k_{3,2}} = \frac{k_{3,2}}{K_{3,M}}$

De modo que reemplazando (17) a (19) en (7) se obtiene:

$$\frac{\partial [(Os(II))]}{\partial t} = D_{Os(II)} \frac{\partial^2 [Os(II)]}{\partial x^2} - 2k_3 [Os(II)] [E_{2ox}] - k_4 [E_{2ox}] [S] - k_5 [Os(II)] [E_3]$$

Considerando (20), se puede escribir  $[E_3]$  en función de  $[E_{2ox}]$  y sacando factor común se obtiene la siguiente expresión general, que tiene en cuenta todas las reacciones de la enzima y que el estado estacionario ha sido alcanzado para las distintas formas de la misma:

$$\frac{\partial [(Os(II))]}{\partial t} = D_{Os(II)} \frac{\partial^2 [Os(II)]}{\partial x^2} - \{2k_3 [Os(II)] + k_4 [S] \left( 1 + \frac{k_5 [Os(II)]}{k_5 [Os(II)] + k_6} \right) \} [E_{2ox}] \quad (21)$$

Por lo tanto, la ecuación (7) puede escribirse en función de las concentraciones de complejo de osmio, sustrato y de la enzima en uno de sus estados de oxidación.

Teniendo en cuenta los valores para las distintas constantes de velocidad reportadas en la literatura,<sup>4,12</sup> que se muestran en la Tabla 1 y las concentraciones de

sustrato y mediador utilizadas en este trabajo, puede estimarse que la generación de Os(III) debido a la reacción con E<sub>3</sub> contribuye mínimamente, por lo que la ecuación (21) se reduce a:

$$\frac{\partial[(Os(II))]}{\partial t} = D_{Os(II)} \frac{\partial^2[Os(II)]}{\partial x^2} - 2k_3 [Os(II)] [E_{2ox}] \quad (22)$$

y las ecuaciones (15) a (18) pueden aproximarse a

$$[E] = \frac{k_3 [E_{2ox}] [Os(II)]}{k_1 [S]} \quad (23)$$

$$[ES] = \frac{k_3 [E_{2ox}] [Os(II)]}{k_{1,2}} \quad (24)$$

$$[E_{1ox}] = \frac{k_3 [E_{2ox}]}{k_2} \quad (25)$$

$$[E_1 Os] = \frac{k_3 [E_{2ox}] [Os(II)]}{k_{2,2}} \quad (26)$$

La concentración total de enzima es igual a la suma de todas las formas presentes

$$[E_T] = [E] + [ES] + [E_{1ox}] + [E_1 Os] + [E_{2ox}] + [E_2 Os] + [E_3] \quad (27)$$

Utilizando las ecuaciones (19), (20) y (23) a (26) la concentración total de enzima puede expresarse como:

$$[E_T] = k_3 [E_{2ox}] \left( \frac{[Os(II)]}{k_1 [S]} + \frac{[Os(II)]}{k_{1,2}} + \frac{1}{k_2} + \frac{[Os(II)]}{k_{2,2}} + \frac{1}{k_3} + \frac{[Os(II)]}{k_{3,2}} + \frac{1}{k_3} \cdot x \frac{k_4 [S]}{k_5 [Os(II)] + k_6} \right) \quad (28)$$

que reemplazando en (22) permite obtener (29)

$$\frac{\partial[(Os(II))]}{\partial t} = D_{Os(II)} \frac{\partial^2[Os(II)]}{\partial x^2} - \frac{2[E_T][Os(II)]}{\left( \frac{[Os(II)]}{k_1 [S]} + \frac{[Os(II)]}{k_{1,2}} + \frac{1}{k_2} + \frac{[Os(II)]}{k_{2,2}} + \frac{1}{k_3} + \frac{[Os(II)]}{k_{3,2}} + \frac{1}{k_3} \cdot x \frac{k_4 [S]}{k_5 [Os(II)] + k_6} \right)}$$

Dado que la conversión de  $E_{2ox}$  a  $E_3$  es despreciable en las condiciones utilizadas en esta tesis, ( $E_3$  representa menos del 10% de la enzima total en las condiciones especificadas) la expresión (29) se reduce a:

$$\frac{\partial[(Os(II))]}{\partial t} = D_{Os(II)} \frac{\partial^2[Os(II)]}{\partial x^2} - \frac{2[E_T]}{\left( \frac{1}{k_1[S]} + \frac{1}{k_{1,2}} + \frac{1}{k_2[Os(II)]} + \frac{1}{k_{2,2}} + \frac{1}{k_3[Os(II)]} + \frac{1}{k_{3,2}} \right)} \quad (30)$$

Esta ecuación general considera los procesos acoplados de difusión y reacción, en el estado estacionario, para todas las especies de la enzima involucradas y en condiciones no inhibitorias de la actividad enzimática.

Cuando se mide la respuesta amperométrica de electrodos en estado estacionario, es de práctica común mantener el electrodo a potenciales suficientemente reductores, de modo tal que el mediador esté enteramente en su forma reducida en la superficie del electrodo. Sin embargo, si se deseara, es posible incorporar la dependencia con el potencial en el modelo. A tal efecto, suponiendo comportamiento reversible de la cupla, tal que se cumpla la ecuación de Nerst, se tiene

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Os(III)]_0}{[Os(II)]_0}$$

$$\text{Llamando } a = \frac{[Os(II)]}{[Os]_T} = \frac{[Os(II)]}{[Os(II)] + [Os(III)]}$$

$$\text{y } \varepsilon = (E - E^0) \frac{nF}{RT}$$

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{1 - a_\varepsilon}{a_\varepsilon}, \quad \varepsilon = \ln \frac{1 - a_\varepsilon}{a_\varepsilon} \quad \text{y} \quad a_\varepsilon = \frac{1}{1 + e^\varepsilon}$$

La situación de considerar mantener el electrodo a potenciales suficientemente reductores, como es nuestro caso ( $E_{fijo}$  a 0.05 V), corresponde a considerar un alto sobrepotencial donde  $a_\varepsilon \approx 1$ .

Consideraremos a partir de ahora solamente la respuesta en el estado estacionario, en dicho estado:

$$\frac{\partial[Os(II)]}{\partial t} = 0 \quad (31)$$

Dos situaciones pueden considerarse según cual sea la reacción que determine la velocidad del proceso completo:

- Cinética limitada por la reacción enzima-mediador.
- Cinética limitada por la reacción enzima-sustrato.

Dado que en la presente tesis, las concentraciones de sustrato y mediador utilizadas (1mM y 40 $\mu$ M respectivamente) corresponden a la primera situación, se considerará para el presente desarrollo solo el caso en donde la reacción de la enzima con el mediador es el paso determinante de la velocidad del proceso. Esta situación se cumple para concentraciones de sustrato suficientemente altas. Además, se considerará que la reacción E/E<sub>1ox</sub> es rápida comparada con E<sub>1ox</sub>/E<sub>2ox</sub> <sup>4</sup> por lo que este último es el paso que limita la velocidad del ciclo catalítico completo.

Matemáticamente, equivale a decir que:

$$\frac{k_{1,2}[S]}{K_{1,M} + [S]} \gg \frac{k_{3,2}[Os(II)]}{K_{3,M} + [Os(II)]} \quad \text{y} \quad \frac{k_{2,2}[Os(II)]}{K_{2,M} + [Os(II)]} \gg \frac{k_{3,2}[Os(II)]}{K_{3,M} + [Os(II)]}$$

donde en la primer desigualdad, el término de la izquierda corresponde a la reacción de la enzima con el sustrato y en la segunda desigualdad corresponde a la reacción E/E<sub>1ox</sub> de la enzima con el mediador. En ambas desigualdades, el término de la derecha corresponde a la reacción E<sub>1ox</sub>/E<sub>2ox</sub> de la enzima con el mediador.

Las condiciones anteriores pueden ser reescritas, obteniéndose:

$$\frac{1}{k_1[S]} + \frac{1}{k_{1,2}} \ll \frac{1}{k_3[Os(II)]} + \frac{1}{k_{3,2}} \quad (32)$$

$$y \quad \frac{1}{k_2[Os(II)]} + \frac{1}{k_{2,2}} \ll \frac{1}{k_3[Os(II)]} + \frac{1}{k_{3,2}} \quad (33)$$

Aplicando la condición de estado estacionario (31) y las condiciones (32) y (33) en la ecuación general (30)

$$\frac{\partial[Os(II)]}{\partial t} = D_{Os(II)} \frac{\partial^2[Os(II)]}{\partial x^2} - \frac{2k_3[E_T][Os(II)]}{1 + \frac{k_3[Os(II)]}{k_{3,2}}} = 0 \quad (34)$$

se obtiene la siguiente ecuación diferencial 3

$$\frac{\partial^2[Os(II)]}{\partial x^2} = \frac{2k_3[E_T][Os(II)]}{D_{Os(II)} \left( 1 + \frac{k_3[Os(II)]}{k_{3,2}} \right)} \quad (35)$$

Para la resolución de la ecuación (35), se define

$$\alpha = \frac{2k_3[E_T]}{D_{Os(II)}} \quad (36) \quad y \quad \beta = \frac{k_3}{k_{3,2}} = \frac{1}{K_{3,M}} \quad (37)$$

Reemplazando (36) y (37) en (35) da

$$\frac{\partial^2[Os(II)]}{\partial x^2} = \frac{\alpha[Os(II)]}{1 + \beta[Os(II)]} \quad (38)$$

cuya resolución <sup>13</sup> conduce a

$$\frac{d[Os(II)]}{dx} = \pm \sqrt{\frac{2\alpha}{\beta^2} \{ \beta[Os(II)] - \ln(1 + \beta[Os(II)]) \}} + C \quad (39)$$

Como Os(II) es aportado desde el seno de la solución y regenerado en la superficie del electrodo de manera que en la superficie del electrodo  $[Os(II)]_{x=0} = [Os]^*$ , en

el estado estacionario en algún  $x$  entre  $0$  y  $l$  ( $x = \mu$ ), se producirá un mínimo en la concentración de Os(II), de modo que:

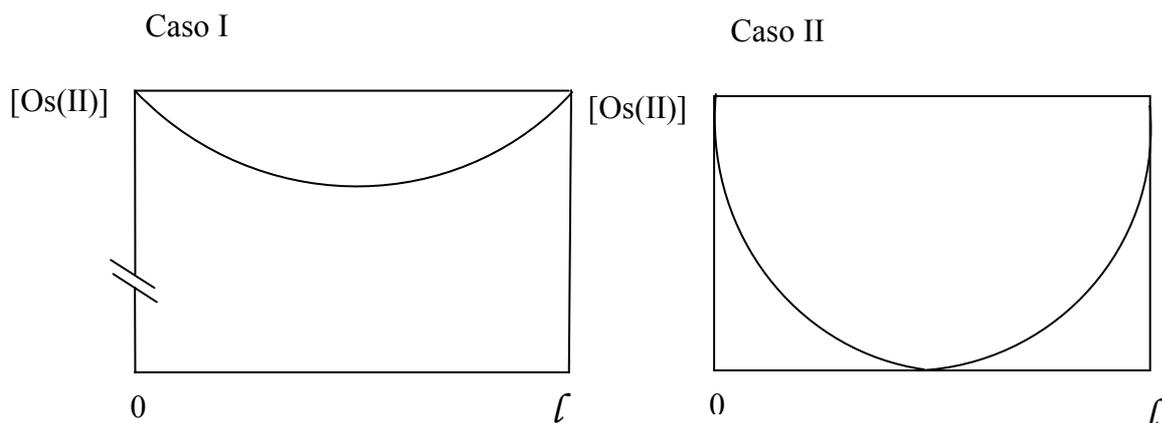
$$\text{Para } x = \mu, \quad v = \left. \frac{d[Os(II)]}{dx} \right|_{x=\mu} = 0 \quad \text{y} \quad [Os(II)]_{x=\mu} = [Os(II)]_{\mu}$$

Por lo tanto (39) puede evaluarse en  $\mu$  para obtener  $C$ .

$$\frac{d[Os(II)]}{dx} = \pm \sqrt{\frac{2\alpha}{\beta^2} \left\{ \beta([Os(II)] - [Os(II)]_{\mu}) - \ln \left( \frac{1 + \beta[Os(II)]}{1 + \beta[Os(II)]_{\mu}} \right) \right\}} \quad (40)$$

Debido a que valor de  $[Os(II)]_{\mu}$  no es conocido, la ecuación no puede resolverse analíticamente, sin embargo para obtener la expresión de la corriente medida, dos casos extremos pueden ser considerados (Figura A2).

- Caso I – Control cinético, donde  $[Os(II)]_{\mu} \cong [Os(II)]^*$
- Caso II – Control difusional, donde  $[Os(II)]_{\mu} \cong 0$



**Figura A2:** Perfiles de concentración de Os(II) en el film

Caso I

Este caso físicamente representa una situación en la que el film es delgado o la concentración de enzima es relativamente baja. El consumo de Os(II) dentro del film será bajo y por lo tanto el proceso estará limitado por la generación de Os(III) en el ciclo catalítico. La concentración de Os(II) se mantiene casi constante a lo largo del film, en un valor similar al del seno de la solución. (Figura A2).

La ecuación (40) puede reordenarse dando la siguiente expresión:

$$\frac{d[Os(II)]}{dx} = \pm \sqrt{\frac{2\alpha}{\beta^2} \left\{ \beta([Os(II)] - [Os(II)]_{\mu}) - \ln \left( 1 + \frac{\beta([Os(II)] - [Os(II)]_{\mu})}{1 + \beta[Os(II)]_{\mu}} \right) \right\}} \quad (41)$$

si  $\frac{\beta([Os(II)] - [Os(II)]_{\mu})}{1 + \beta[Os(II)]_{\mu}} \ll 1$  ó  $\beta([Os(II)] - [Os(II)]_{\mu}) \ll 1 + \beta[Os(II)]_{\mu}$

que se cumple dado que  $[Os(II)]_{\mu} \leq [Os(II)] \leq [Os(II)]^*$  y la condición impuesta,  $[Os(II)]_{\mu} \cong [Os(II)]^*$ ,

$$\ln \left( 1 + \frac{\beta([Os(II)] - [Os(II)]_{\mu})}{1 + \beta[Os(II)]_{\mu}} \right) \cong \frac{\beta([Os(II)] - [Os(II)]_{\mu})}{1 + \beta[Os(II)]_{\mu}}$$

Por lo tanto, reemplazando esta aproximación en (41), operando y reordenando se obtiene:

$$\frac{d[Os(II)]}{dx} = \sqrt{\frac{2\alpha}{\beta} \left( 1 - \frac{1}{1 + \beta[Os(II)]_{\mu}} \right)} \sqrt{[Os(II)] - [Os(II)]_{\mu}} \quad (42)$$

cuya integración da el siguiente resultado:

$$[Os(II)] = \frac{(x + C_1)^2 \alpha}{2\beta} \left( 1 - \frac{1}{1 + \beta [Os(II)]_\mu} \right) + [Os(II)]_\mu \quad (43)$$

Para evaluar  $C_1$ , consideremos las condiciones de borde para la situación bajo estudio.

- En la superficie del electrodo,  $x = 0$ , y a altos sobrepotenciales como es nuestra situación,

$$[Os(II)]_{x=0} = [Os(II)]^* \quad (44)$$

- En  $x = l$ , con  $l$  el espesor del film,

$$[Os(II)]_{x=l} = [Os(II)]^* \quad (45)$$

La utilización de estas condiciones en la ecuación (43) permite evaluar  $C_1$ , obteniéndose:

$$C_1 = -\frac{l}{2} \quad (46)$$

Reemplazando (46) en (43) se obtiene la ecuación que describe como varía la concentración de Os(II) en función de  $x$ , para este caso particular

$$[Os(II)] = \frac{\left(x - \frac{l}{2}\right)^2 \alpha}{2\beta} \left( 1 - \frac{1}{1 + \beta [Os(II)]_\mu} \right) + [Os(II)]_\mu \quad (47)$$

La corriente medida en el electrodo está relacionada con el flujo de mediador reaccionando en la interfase electrodo-film a través de:

$$i = n F A j_0 \quad (48)$$

con 
$$j_0 = D_{Os(III)} \frac{d[Os(III)]}{dx} \Big|_{x=0} = -D_{Os(II)} \frac{d[Os(II)]}{dx} \Big|_{x=0}$$

Con la ecuación (47) evaluada en  $x = 0$ , reemplazando en (42) y considerando la condición de que  $[Os(II)]_{\mu} \cong [Os(II)]^*$ , se obtiene:

$$\frac{d[Os(II)]}{dx}\Big|_{x=0} = \frac{\alpha}{\beta} \frac{l}{2} \left( 1 - \frac{1}{1 + \beta [Os(II)]^*} \right) \quad (49)$$

Finalmente, reemplazando  $\alpha$  y  $\beta$  según se definió en (36) y (37) respectivamente y sustituyendo en la ecuación (48), se obtiene la siguiente expresión para la corriente

$$i = \frac{F A k_3 [E_T] [Os(II)]^* l}{1 + \frac{[Os(II)]^*}{K_{3,M}}} = \frac{F A k_{3,2} [E_T] l}{1 + \frac{K_{3,M}}{[Os(II)]^*}} \quad (50)$$

En este caso, el control del proceso es cinético ya sea porque la enzima está inmovilizada en un film delgado, hay alta concentración de mediador y/o baja concentración de enzima, como puede deducirse de la ecuación (47).

Dicha ecuación especializada en  $x = 0$ , permite mostrar que para que  $[Os(II)]_{\mu} \cong [Os(II)]^*$ ,  $\sqrt{\alpha'} l \ll 1$ ,

$$\text{siendo} \quad \alpha' = \frac{2k_3' [E_T]}{D_{Os(II)}} \quad \text{y} \quad k_3' = \frac{k_{3,2}}{K_{3,M} + [Os(II)]^*}$$

$\alpha'$  es un indicador de cual es el proceso que controla la velocidad.

### Caso II

En este caso, el mediador entra al film desde el seno de la solución, es rápidamente consumido y la corriente observada es proporcional al mediador electroquímicamente regenerado. En otras palabras, el proceso está controlado por el transporte de masa del mediador, éste tiene tiempo suficiente para reaccionar con la enzima y ser regenerado en el electrodo antes de escapar del film, como se observa en el perfil de concentraciones representado en la Figura A2, Caso II. Este caso corresponde a una situación en la que el film es grueso y/o hay alta concentración de enzima en el film.

En este caso, como  $[Os(II)]_{\mu} \approx 0$  y  $[Os(II)]_{x=0} = [Os(II)]^*$ , si  $[Os]_{\mu} \ll [Os(II)]^*$ , el flujo del mediador en  $x=0$ , puede evaluarse directamente en la ecuación (40), obteniéndose:

$$\left( \frac{d[Os(II)]}{dx} \right)_{x=0} = \pm \sqrt{\frac{2\alpha}{\beta^2} \{ \beta [Os(II)]^* - \ln(1 + \beta [Os(II)]^*) \}} \quad (51)$$

utilizando ecs. (36), (37) y (48), la corriente va ser igual a:

$$i = FAD_{Os(II)} \sqrt{\frac{4k_{3,2}[E_T]}{D_{Os(II)}} \left\{ [Os(II)]^* - \frac{k_{3,2}}{k_3} \ln \left( 1 + \frac{k_3}{k_{3,2}} [Os(II)]^* \right) \right\}} \quad (52)$$

Si  $[Os]_{\mu} \approx [Os(II)]^*$ , la ecuación (52) es aplicable si  $[Os(II)]_{\mu} = 0$ .

En el caso que  $[Os(II)]^* \ll K_{3,M}$  puede utilizarse la siguiente aproximación:

$$\ln \left( 1 + \frac{k_3}{k_{3,2}} [Os(II)]^* \right) \cong \frac{k_3}{k_{3,2}} [Os(II)]^* - \frac{1}{2} \left( \frac{k_3}{k_{3,2}} [Os(II)]^* \right)^2 \quad (53)$$

Reemplazando en (52) y reordenando

$$i = FA \sqrt{2D_{Os(II)} k_3 [E_T]} [Os(II)]^* \quad (54)$$

que es la típica expresión de la corriente catalítica para un sistema saturado por sustrato y donde la formación del complejo enzima-mediador no es un paso limitante de la velocidad de reacción<sup>1-3</sup>.

Para la aplicación de la ecuación (54), las condiciones no son tan sencillas de deducir. Por un lado, como se mencionó,  $[Os(II)]^* \ll K_{3,M} = 20 \mu M$ , pero también  $\alpha \cdot l$  tiene que ser suficientemente grande de modo de asegurar que el paso que controla la velocidad del proceso sea la difusión del mediador y no la reacción con la enzima. En particular, se puede probar que tiene que cumplirse que  $\sqrt{\alpha} \cdot l \geq 3$ . También, cabe destacar que a medida que la concentración del mediador baja, los términos

correspondientes a la inhibición adquieren mayor importancia y el valor de la corriente observada comenzará a desviarse del predicho por el modelo.

Reacción	Constantes cinéticas
$E + H_2O_2 / E_{1ox}$	$k_1=1.7 \times 10^7, k_{1,2}= 2.2 \times 10^3, K_{1,M}= 128$
$E_{1ox}/E_{2ox}$	$k_2= 2 \times 10^8$
$E_{2ox}/E$	$k_3= 1.4 \times 10^7, k_{3,2}= 2.8 \times 10^2, K_{3,M}= 20$
$E_{2ox} + H_2O_2 / E_3$	$k_4= 30 *$
$E_3/E_{1ox}$	$k_5= 2.1 \times 10^3 *$
$E_3/E$	$k_6= 1 \times 10^{-2} *$

**TABLA 1:** Constantes cinéticas para el ciclo catalítico de la enzima HRP, utilizando el mediador y la enzima en solución ó (\*) el mediador en solución y la enzima inmovilizada en la superficie del electrodo. Las constantes de velocidad de primer orden están expresadas en  $s^{-1}$  y las constantes de velocidad bimoleculares en  $M^{-1} s^{-1}$ .  $K_{1,M}$  y  $K_{3,M}$  en  $\mu M$

## Referencias

- 1- Bartlett, P. N.; Whitaker, R.G. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *224*, 27-35.
- 2- Bartlett, P.N.; Tebbutt, P.; Tyrrel, H. *Anal. Chem.* **1992**, *64*,138-142.
- 3- Pratt, K.F.E. Tesis Doctoral, University of Southampton, U.K.; 1994.
- 4- Dequaire, M. ; Limoges, B. ; Moiroux, J.; Savéant J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 240-253.
- 5- Noble, R. W.; Gibson, Q. H. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 2409-2413.
- 6- Adediran, S. A.; Lambeir, A. M. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *186*, 571-576.
- 7- Nakajima, R; Yamazaki, I. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 2576- 2581.

- 8- Rodríguez,-Lopez, J. N.; Smith, A. T.; Thorneley, R. N. F. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 389-395.
- 9- Wang, W.; Noël, S., Desmadril, M.; Gueguen, J.; Michon, T. *Biochem. J.* **1999** *340*, 329-336.
- 10- Rodriguez-Lopez, J. N.; Smith, A. T.; Thorneley, R. N. F. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4023-4030.
- 11- Rodríguez-López, J. N.; Gilabert, M. A.; Tudela, J.; Thorneley, R. N. F.; García-Cánovas, F. *Biochem.* **2000**, *39*, 13201-13209
- 12- Limoges, B.; Savéant, J. M.; Yazidi, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9192-9203.

13- La ecuación (38) tiene la forma  $\frac{\partial^2 y}{\partial x^2} = \frac{\alpha y}{1 + \beta y}$  Si se define  $v = \frac{\partial y}{\partial x}$ ,

$$\frac{\partial^2 y}{\partial x^2} = \frac{\partial v}{\partial x} = \frac{\partial v}{\partial y} \times \frac{\partial y}{\partial x} = \frac{\partial v}{\partial y} \times v = \frac{\alpha y}{1 + \beta y}, \text{ luego } v dv = \frac{\alpha y}{1 + \beta y} dy, \text{ que integrando}$$

$$\text{da } \frac{dy}{dx} = v = \pm \sqrt{\frac{2\alpha}{\beta^2} [\beta y - \ln(1 + \beta y)]} + C$$

## **Agradecimientos**

Agradezco al Dr. Battaglini y a todos los que formaron y forman parte del grupo de trabajo por su colaboración y por el excelente clima de trabajo.

Agradezco a los doctores Ernesto Calvo y Erica Forzani por su ayuda en las mediciones elipsométricas.

Agradezco al personal del DQIAyQF-INQUIMAE.

Agradezco a Fresenius Medical Care Argentina y al Dr. Yagupsky por haber confiado en este proyecto.

Agradezco a Dios y a mis padres....

Y finalmente agradezco muy especialmente y dedico esta Tesis a  
Marcelo, Rosario y Marcos.