



**Estudio químico y electroquímico del perfil redox del
estrés oxidativo para las especies antioxidantes y oxidantes:
GSH/GSSG y Superóxido en muestras sintéticas y biológicas.**

Tesis doctoral sometida en la
Universidad de Guanajuato
Campus Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas

Que para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de
Guanajuato, presenta:

Patricia María Olmos Moya
Autor

Supervisada por:

Dra. Sophie Griveau
Dra. Silvia Gutiérrez Granados
Dra. Minerva López Alfaro

Julio 2018

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Este manuscrito ha sido leído y aprobado por el comité evaluador constituido por:

Dr. ÁVILA RODRÍGUEZ Mario
(UGTO)

Dr. ALPUCHE-AVILÉS Mario
(UNR)

Dra. GALICIA LUIS Laura
(UAMI)

Dra. LÓPEZ JUAREZ Silvia
(UGTO)

Dr. JIMÉNEZ CRUZ Gustavo
(UGTO)

Dr. BEDIQUI Fethi
(ENSCP)

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Certifico la originalidad de esta tesis, cuyo contenido es única y exclusivamente producto de mi trabajo. Estos resultados no han sido plagiados ni utilizados para otros fines.

M. C. OLMOS MOYA Patricia María

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

El presente trabajo representa una tesis doctoral supervisada conjuntamente entre la Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité y la Universidad de Guanajuato. La investigación se llevo a cabo en los laboratorios de Chimie ParisTech-PSL Research University, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS), 75005 Paris, France., The Department of Chemistry, University of Nevada, Reno, Nevada, 89557, USA., y los laboratorios del Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato.

Esta tesis ha sido dirigida por un grupo multidisciplinario integrado por Sophie Griveau, Fethi Bedioui, Mario Alpuche-Avilés, Silvia Gutiérrez Granados y Minerva Martínez Alfaro.

La inquietud del presente trabajo de investigación, nace en el momento en que nos planteamos la cuestión de cómo comprobar nuestra teoría con respecto al análisis del estrés oxidativo en organismos vivos empleando técnicas electroquímicas, ya que normalmente suelen utilizarse metodologías analíticas bastantes sofisticadas. El reto consistía en realizar tanto la detección de especies antioxidantes como de especies oxidantes en fluidos biológicos provenientes de modelos biológicos (ratas Wistar y líneas celulares) intoxicados con plomo. La toxicidad inducida por plomo es reconocida por promover efectos de estrés oxidativo, en donde se desencadenan alteraciones en la homeostasis de sistemas antioxidantes, y al mismo tiempo se estimula la sobre producción de especies oxidantes a nivel celular y tisular. Bajo este precepto, nos enfocamos en realizar el diseño, la construcción y calibración de un sensor electroquímico que nos permitiera determinar las especies antioxidantes por una parte, y por otra parte el diseño, construcción y calibración de un biosensor que permitiera la determinación de especies oxidantes. El monitoreo de ambos oxidantes y antioxidantes permitiría un mejor estudio y asociación del padecimiento de estrés oxidativo inducido por plomo sobre los modelo biológico.

Dentro de este contexto, en el Capítulo I abordamos todo el tema referente al estrés oxidativo a nivel celular. La importancia de su estudio, la evolución cronológica de las investigaciones científicas en el tema y en específico se describe la inducción del estrés oxidativo por intoxicación con plomo. La participación de sistemas antioxidantes, su organización y capacidad para contrarrestar los efectos oxidantes también son descritas dentro de este apartado. La generación de especies reactivas de oxígeno y las reacciones en cadena que éstos provocan sobre biomoléculas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos) se mencionan brevemente. Finalmente se presenta de manera general los principales biomarcadores relacionados al padecimiento del estrés oxidativo y las principales metodologías de análisis para la determinación del mismo.

El segundo capítulo corresponde a todo el trabajo de investigación realizado para el estudio de especies antioxidantes. Se demuestra la cuantificación electroquímica simultánea de glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH) como biomarcadores del estrés oxidativo, en fluidos biológicos. La detección se realizó mediante el desarrollo de un electrodo de carbono modificado y se aplicó al análisis en fluidos biológicos de organismos modelo bajo estrés oxidativo causado por la intoxicación con plomo. Un composito de materiales nanoestructurados a base de ftalocianina de cobalto (CoPc) y nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con grupos carboxilo (MWCNT_f) se desarrolló para modificar electrodos de carbono vítreo (GCE) para la detección de glutatión reducido y oxidado. Los resultados obtenidos muestran que el uso combinado de CoPc y MWCNT_f da como resultado una actividad electrocatalítica tanto para la

oxidación de GSH y la reducción de GSSG, lo que permite la detección simultánea de ambas especies. También se estudió la posible interferencia del ácido ascórbico, la cisteína, el ácido glutámico y la glucosa, los resultados obtenidos muestran efectos limitados de estas especies. Finalmente, el electrodo híbrido se utilizó para la determinación de GSH y GSSG en muestras de orina y plasma de ratas Wistar intoxicadas o no por plomo. Ambas formas de glutatión se detectaron en estas matrices biológicas complejas sin ningún pretratamiento. Nuestros resultados describen el papel de GSH y GSSG como marcadores de estrés oxidativo en organismos vivos bajo intoxicación por plomo.

Después de obtener buenos resultados durante el estudio de especies antioxidantes, continuamos con la investigación para la determinación de especies oxidantes. Al respecto, en el tercer capítulo un biosensor electroquímico sensitivo y selectivo para la detección del anión-radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) usando enzima superóxido dismutasa (SOD) fue construido mediante el método de fisorción enzimática sobre electrodos de platino (Pt) modificados con el polímero conductor poli (3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT). En este caso se ha puesto especial interés en optimizar todas las condiciones y funciones del biosensor para su aplicación en muestras reales. Después de la caracterización electroquímica se estableció la configuración adecuada del biosensor (*Pt/PEDOT/(SOD 0.1% - ASB 2% - GA 2.5%)*). Gracias al efecto sinérgico que integra la eficaz electroconductividad y permosselectividad atribuida al PEDOT y la especificidad y selectividad de SOD para la detección de superóxido es posible obtener buenos parámetros analíticos de alta sensibilidad para $O_2^{\bullet-}$ y límite de detección, estos datos sugieren la aplicación del biosensor para la detección y cuantificación de $O_2^{\bullet-}$ *in vitro e in vivo*. Como perspectiva se considera la continuación de este trabajo para el monitoreo de $O_2^{\bullet-}$ en muestras biológicas empleando el biosensor. De igual manera actualmente se trabaja en el escalamiento de estos biosensores, empleando ultramicroelectrodos.

Las conclusiones globales de esta investigación se presentan en la última sección de este manuscrito.

Al final del manuscrito también se presenta la publicación obtenida como producto de este trabajo y aquellos trabajos que están en proceso de someterse para su publicación.

SUMMARY

The present work represents a doctoral thesis supervised jointly by the Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité and the University of Guanajuato. The research was carried out in the laboratories of Chimie ParisTech-PSL Research University, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS), 75005 Paris, France., The Department of Chemistry, University of Nevada, Reno, Nevada, 89557, USA., And the laboratories of the Department of Chemistry, Division of Natural and Exact Sciences of the University of Guanajuato.

This thesis has been directed by a multidisciplinary group composed of Sophie Griveau, Fethi Bedioui, Mario Alpuche-Avilés, Silvia Gutiérrez Granados and Minerva Martínez Alfaro.

The concern of the present research work was born at the time we raised the question of how to test our theory regarding the analysis of oxidative stress in living organisms using electrochemical techniques, since usually quite sophisticated analytical methodologies are used. The challenge was to perform both the detection of antioxidant species and oxidant species in biological fluids from biological models (Wistar rats and cell lines) intoxicated with lead. Lead-induced toxicity is recognized for promoting oxidative stress effects, where alterations in the homeostasis of antioxidant systems are triggered, and at the same time the overproduction of oxidizing species at the cellular and tissue levels is stimulated. Under this precept, we focused on the design, construction and calibration of an electrochemical sensor that would allow us to determine the antioxidant species on the one hand, and on the other hand the design, construction and calibration of a biosensor that would allow the determination of oxidizing species. . The monitoring of both oxidants and antioxidants would allow a better study and association of the oxidative stress induced by lead on the biological model.

Within this context, in Chapter I, we addressed the whole topic of oxidative stress at the cellular level. The importance of its study, the chronological evolution of scientific research on the subject and specifically describes the induction of oxidative stress due to lead poisoning. The participation of antioxidant systems, their organization and ability to counteract the oxidizing effects are also described within this section. The generation of reactive oxygen species and the chain reactions that these cause on biomolecules (lipids, proteins, nucleic acids) are mentioned briefly. Finally, the main biomarkers related to the suffering of oxidative stress and the main methodologies of analysis for its determination are presented in a general manner. The possible interference of ascorbic acid, cysteine, glutamic acid and glucose was also studied, the results obtained show limited effects of these species. Finally, the hybrid electrode was used for the determination of GSH and GSSG in urine and plasma samples from Wistar rats intoxicated or not by lead. Both forms of glutathione were detected in these complex biological matrices without any pretreatment. Our results describe the role of GSH and GSSG as markers of oxidative stress in living organisms under lead poisoning.

After obtaining good results during the study of antioxidant species, we continue with the investigation for the determination of oxidizing species. In this regard, in the third chapter a sensitive and selective electrochemical biosensor for the detection of the anion-radical superoxide ($O_2^{\bullet -}$) using enzyme superoxide dismutase (SOD) was constructed by the method of enzymatic physisorption on platinum electrodes (Pt) modified with the conductive polymer poly (3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT). In this case, special interest has been placed on optimizing all the conditions and functions of the biosensor for its application in real samples. After the electrochemical characterization, the appropriate configuration of the biosensor was established (Pt / PEDOT / (SOD 0.1% - ASB 2% - GA 2.5%)). Thanks to the synergistic effect that integrates the effective electroconductivity and permoselectivity attributed to the PEDOT and the specificity and selectivity of SOD for the detection of superoxide, it is possible to obtain good analytical parameters of high sensitivity for $O_2^{\bullet -}$ and limit of detection, these data suggest the application of the biosensor for the detection and quantification $O_2^{\bullet -}$ *in vitro* and *in vivo*. As a perspective we consider the continuation of this

work for the monitoring of O_2^- in biological samples using the biosensor. In the same way, we are currently working on the scaling of these biosensors, using ultramicroelectrodes.

The overall findings of this research are presented in the last section of this manuscript.

At the end of the manuscript is also presented the publication obtained as a product of this work and those works that are in the process of being submitted for publication.

LISTA DE CONTENIDO

CERTIFICADO DE APROVACIÓN.....	i
DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	v
SUMMARY.....	vii
LISTA DE CONTENIDO.....	ix
ACRONIMOS Y SIMBOLOS.....	xiii
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	xv
CAPITULO I. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	1
1. FENÓMENO DE ESTRÉS OXIDATIVO	1
1.1. Relevancia cronológica del estrés oxidativo.....	1
1.1.1. Estudios pioneros del estrés oxidativo.....	1
1.1.2. Desbalance redox y el estrés oxidativo.....	2
1.1.3. Estrés oxidativo, respuesta genética y homeostasis celular.....	4
2. CLASIFICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO.....	5
3. OXIDACIÓN DE SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	7
3.1. Generación y reactividad de ROS en organismos vivos.....	7
3.1.1. Producción celular de ROS primarias.....	8
3.1.2. Sobreproducción y reactividad de ROS.....	9
3.2. Regulación redox. Control y eliminación de ROS.....	11
3.2.1. Sistemas antioxidantes de alto peso molecular (HMWA).....	11
3.2.2. Sistemas antioxidantes de bajo peso molecular (LMWA).....	13
3.2.3. Poder antioxidante del Glutatión.....	14
4. ESTADO REDOX BIOLÓGICO.....	15
5. DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO.....	17
5.1. Daño oxidativo sobre bases de ADN.....	17
5.2. Peroxidación lipídica.....	18
5.3. Alteraciones homeostáticas de sistemas antioxidantes.....	18
5.4. Señalización redox y transducción de sistemas antioxidantes.....	20
5.5. Biomarcadores de importancia clínica y toxicológica relacionados al estrés oxidativo.....	21
6. ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR METALES.....	22
6.1. Toxicidad con plomo.....	23
6.2. Plomo, toxicidad y estrés oxidativo.....	23
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES.....	28
CAPITULO II. Especiación electroquímica simultánea de glutatión oxidado y reducido. Perfil redox del estrés oxidativo en fluidos biológicos con un electrodo de carbono modificado.....	29
1. INTRODUCCIÓN Y ESTADO DEL ARTE.....	30
1.1. Glutatión, funciones biológicas y metabolismo.....	30
1.2. Métodos analíticos para la determinación de glutatión reducido y glutatión oxidado.....	31

1.2.1.	<i>Métodos espectrofotométricos</i>	31
1.2.2.	<i>Métodos espectrofluorométricos</i>	32
1.2.3.	<i>Métodos espectroscópicos de resonancia magnético nuclear</i>	32
1.2.4.	<i>Métodos con un paso de separación</i>	32
1.2.4.1.	<i>Métodos cromatográficos de alta resolución</i>	32
1.2.4.2.	<i>Introducción de un cromóforo</i>	33
1.2.4.3.	<i>Introducción de un fluoróforo</i>	34
1.2.4.4.	<i>Derivatización por espectrometría de masas</i>	34
1.2.4.5.	<i>Métodos de electroforesis capilar</i>	34
1.2.5.	<i>Métodos de análisis sin paso de separación ni derivatización</i>	36
1.2.5.1.	<i>Métodos electroquímicos</i>	36
1.3.	Nanotubos de carbono (CNT)	38
1.4.	Nanocompositos híbridos de CNT-(MPcs/MPyPs)	40
1.4.1.	<i>Métodos de preparación</i>	40
1.4.2.	<i>Caracterización física de nanocompositos de CNT-(MPcs/MPyPs)</i>	41
1.4.3.	<i>Caracterización electroquímica de de CNT-(MPcs/MPyPs)</i>	42
1.4.4.	<i>Nanocompositos híbridos de CNT-MPcs y su aplicación para la detección de tioles –SH y disulfuros S-S</i>	43
2.	OBJETIVOS	46
3.	CONDICIONES EXPERIMENTALES	46
3.1.	Reactivos	46
3.2.	Purificación y funcionalización de MWCNT	46
3.3.	Experimentos electroquímicos	47
3.4.	Preparación del electrodomodificado de CoPc/MWCNT_f/GC	47
3.5.	Caracterización de la película nanoestructurada CoPc-MWCNT_f	47
3.6.	Proceso de intoxicación de ratas Wistar como modelo biológico	47
3.7.	Determinación espectrofotométrica de GSH	48
3.8.	Cuantificación de plomo en sangre de ratas Wistar	48
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1.	Caracterización electroquímica del electrodo híbrido CoPc/MWCNT_f/GC	48
4.2.	Caracterización física del electrodo híbrido CoPc/MWCNT_f/GC	49
4.2.1.	<i>Perfilometría del nanocomposito CoPc-MWCNT_f adsorbido</i>	49
4.2.2.	<i>Análisis microscópico y elemental del nanocomposito CoPc-MWCNT_f</i>	50
4.3.	Comportamiento electroquímico del electrodo CoPc/MWCNT_f/GC en presencia de GSH y GSSG	51
4.4.	Detección y cuantificación de GSH y GSSG	52
4.5.	Estudio de la viabilidad para la detección simultánea de GSH y GSSG en muestras Biológicas	54
4.6.	Estudio de interferentes	55
4.7.	Ensayo espectrofotométrico para la detección de G-SH usando N-etilmaleimida	56
4.8.	Análisis simultáneo de GSH y GSSG en muestras de plasma y orina de ratas Wistar como matrices biológicas y su asociación con la toxicidad con plomo	58
4.9.	Análisis de Pb en sangre por espectrofotometría de absorción atómica	60

5.	CONCLUSIONES PARCIALES.....	62
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
CAPITULO III. Biosensor amperométrico de alta respuesta enzimática a base de PEDOT y Superóxido Dismutasa. Para la detección selectiva y sensitiva del radical-anión Superóxido.....		
		66
1.	INTRODUCCIÓN Y ESTADO DEL ARTE.....	67
1.1.	Principales características del Superóxido en sistemas biológicos.....	67
1.2.	Generación de superóxido.....	67
1.2.1.	Generación química de superóxido.....	67
1.2.2.	Generación biológica de superóxido.....	68
1.3.	Métodos de detección del superóxido.....	68
1.3.1.	Métodos espectrofotométricos.....	68
1.3.1.1.	UV-visible.....	68
1.3.1.2.	Reducción de NTB.....	69
1.3.1.3.	Reducción de Citocromo c.....	70
1.3.1.4.	Resonancia de spin electrón y trampa de spin.....	71
1.3.2.	Métodos no espectrofotométricos.....	71
1.3.2.1.	Métodos electroquímicos.....	71
1.3.2.1.1.	Sensores electroquímicos.....	71
1.3.2.1.2.	Biosensores por inmovilización de enzimas.....	72
1.4.	Biopolímero electroconductor poli(3,4-etilendiotixiofeno) (PEDOT) como soporte para la inmovilización de enzimas.....	73
1.5.	Inmovilización enzimática sobre polímeros biocompatibles.....	75
1.5.1.	Superóxido dismutasa.....	75
1.5.2.	Cross-linker para inmovilización de enzimas.....	76
1.5.2.1.	Glutaraldehido como cross-linker de proteínas y enzimas.....	77
2.	OBJETIVOS.....	79
3.	CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	79
3.1.	Reactivos y soluciones.....	79
3.2.	Instrumentación.....	80
3.3.	Preparación y caracterización de los electrodos modificados PEDOT/ITO.....	80
3.4.	Preparación de los electrodos modificados PEDOT/Pt y el biosensores.....	80
3.5.	Caracterización electroquímica.....	81
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
4.1.	Electropolimerización de EDOT sobre sustratos de platino.....	81
4.2.	Caracterización electroquímica de los electrodos modificados PEDOT/Pt.....	82
4.3.	Caracterización microscópica de la película de PEDOT sobre ITO.....	84
4.4.	Recubrimiento superficial de PEDOT y su función como capa permselectiva al paso de H ₂ O ₂ y barrera al paso de interferentes redox.....	85
4.4.1.	Efecto del recubrimiento de PEDOT/Pt como capa permselectiva para H ₂ O ₂	85
4.4.2.	Estudio de interferentes.....	87
4.5.	Generación química, caracterización y cuantificación espectroscópica de superóxido.....	89
4.5.1.	Caracterización espectroscópica de KO ₂ como fuente generadora de superóxido.....	89
4.5.2.	Caracterización espectroscópica del reactivo XTT.....	90

4.5.3. Detección espectroscópica de $O_2^{\bullet-}$ usando el sistema KO_2/XTT	91
4.6. Desempeño del biosensor SOD/PEDOT/Pt para la detección electroquímica de $O_2^{\bullet-}$	94
4.6.1. Actividad enzimática de la SOD inmovilizada sobre PEDOT/Pt.....	94
4.6.2. Caracterización electroquímica del biosensor SOD/PEDOT/Pt para el análisis de $O_2^{\bullet-}$	95
4.6.3. Estudio electroquímico de la estabilidad del biosensor.....	97
5. CONCLUSIONES PARCIALES.....	98
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
CONCLUSIONES GENERALES.....	102
PERSPECTIVAS.....	103
ANEXO I. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	104
i. Cuantificación de ROS.....	104
ii. Cuantificación de metabolitos como productos de peroxidación.....	104
iii. Detección y cuantificación de residuos proteicos oxidados.....	105
iv. Detección y cuantificación de niveles de antioxidantes y sus metabolitos.....	106
v. Determinación de la actividad enzimática atioxidante.....	106
vi. Analisis del perfil antioxidante redox.....	106
vii. Referencias bibliográficas.....	107
ANEXO II. INTOXICACIÓN AGUDA DE RATAS WISTAR CON PLOMO Y SU ASOCIACIÓN AL PADECIMIENTO DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	109
i. Generación de tumores en ratas Wistar por efecto del estrés oxidativo inducido con plomo.....	109
ii. Asociación entre el estado redox y el padecimiento de tumores en ratas Winstar intoxicadas con plomo.....	110
iii. Referencias bibliográficas.....	111
ARTICULO PUBLICADO	

ACRONIMO	SIGNIFICADO
OS	Especie oxidativa
AS	Especie antioxidante
ROS	Especies reactivas de oxígeno
-SH	Tiol
S-S	Disulfuro
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
SOD	Superóxido dismutasa
GST	Glutación transferasa
GSH	Glutación reducido
LOS	Estrés oxidativo de baja intensidad
IOS	Estrés oxidativo intermedio
HOS	Estrés oxidativo de alta intensidad
UV	Ultravioleta
IR	Infrarojo
GPx	Glutación peroxidasa
RSS	Especies reactivas de azufre
RCS	Especies carbonil reactivas
RSeS	Especies reactivas de selenio
LMWA	Atioxidantes de bajo peso molecular
HMWA	Antioxidantes de alto peso molecular
GR	Glutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
CAT	Catalasa
AA	Ácido ascórbico
UA	Ácido úrico
ARN	Ácido rriboucléico
ADN	Ácido desoxirriboucléico
MDA	Malondialdehido
tGSH	Glutación total
DTNB	ácido 5,5'-Dithio-bis-2 nitrobezoico
NEM	N-etilmalehimida
HQS	Zn(II)-8-hidroxiquinolin sulfónico
OPA	Orto-ftalaldehido
LoD	Límite de detección
LoQ	Límite de cuantificación
BODIPY	difluoroboradiazia-s-indaceno
RMN	Resonancia mágenetico nuclear
PRESS	Espectroscopía de punto resuelto
PBS	Boffer de fosfatos
FD	Detector de fluorescencia
ECD	Detector electroquímico
MS	Espectroscopía de masas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
CE	Electroforesis capilar
LIF	Fluorescencia inducida por laser
GCE	Electrodo de carbón vitrio
MPyPs	Metaloporfirinas
MPcs	Metaloftalocianinas
CNT	Nanotubos de carbono

SWNTC	Nanotubos de carbono de pared simple
MWNTC	Nanotubos de multipared
TEM	Microscopía de transmisión de electrones
SEM	Microscopía de barrido de electrones
IRS	Espectroscopía de infrarojo
DMF	Dimetilformamida
AFM	Microscopía de fuerza atómica
VC	Voltametría cíclica
OPG	Grafito pilórico
EIS	Espectroscopía de impedancia electroquímica
NTB	Nitro blue tetrazolium
DMSO	dimetilsulfóxido
XTT	ácido 3'-{1-[(fenilamino)-carbonil]-3,4-tetrazolium}-bis(4-metoxi-6-nitro)bezenosulfónico
Cyt c	Citocromo c
ESR	Resonancia de spin electrón
BMPO	óxido-5-tert-butoxicarbonil-5-metil-1-pirrolin
EDOT	3,4-etilendioxitiofeno
PEDOT	poli(3,4-etilendioxitiofeno)
NaSS	Estireno sulfonato de sodio
ITO	Oxido de estaño dopado con indio
SCE	Electrodo de calomel saturado
PEI	Polietilenimida
GO	Glioxal
GA	Glutaraldehido
ECH	epiclorohidrin
Lys	Lisina
BSA	Albumina sérica de bovino
XA	Xantina
DC	Dienos conjugados
DNP	Dinitrofenilhidracina
GC	Cromatografía de gases

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

CAPITULO I.

Figura 1.1. Cronología para los avances en la investigación científica del estrés oxidativo ¹	2
Figura 1.2. Mantenimiento de la homeostasis redox celular ⁹	3
Figura 1.3. Sistemas de señalización que operan durante la respuesta al estrés oxidativo en animales ¹	4
Figura 1.4. Proceso aeróbico a nivel celular bajo condiciones fisiológicas normales. Mecanismo de captura de oxígeno y producción de $O_2^{\cdot-}$ ³	8
Figura 1.5. Mecanismo endógeno y exógeno de sobreproducción de $O_2^{\cdot-}$ y su acción como radical precursor de ROS primarias ³	10
Figura 1.6. Representación esquemática del mecanismo de acción que llevan a cabo los antioxidantes para la captura de especies oxidantes ⁴²	13
Figura 1.7. Esquema representativo para la síntesis de glutatión y sus actividad redox como sistema antioxidante en la detoxificación de H_2O_2 evitando daños celulares.....	14
Figura 1.8. El esquema muestra el comportamiento dinámico para las diferentes etapas descritas para el estrés oxidativo.....	16
Figura 1.9. Reacción de la base guanina con un radical hidroxil.....	18
Figura 1.10. Producción de ROS y el proceso de peroxidación lipídica ⁵⁵	19
Figura 1.11. Esquema general de las rutas metabólicas correspondientes al estrés oxidativo: ROS; sistemas antioxidantes; y señalización-transducción genética y a su asociación con la producción de sistemas antioxidantes y sus metabolitos.....	21
Figura 1.12. Biomarcadores de estrés oxidativo con importancia clínica y toxicológica.....	22
Figura 1.13. Mecanismo de acción para el consumo y daño al ADN por plomo ⁵⁵	24

CAPITULO II.

Figura 2.1. Estructura del glutatión reducido y glutatión oxidado ⁶	30
Figura 2.2. (a) Imagen de la estructura tridimensional de SWNTC y MWNTC, (b) espectros IR ⁵⁹⁻⁶¹ para cuatro muestras de MWNTC funcionalizados por oxidación bajo condiciones de acides extrema, (c) imagen TEM ^{54, 61} de MWNTC nativos (A) y MWNTC funcionalizados (B).....	39
Figura 2.3. (a) Estructura de la ftalocianina de cobalto (II) no sustituida, (b) ilustración de un nanotubo SWCNT modificado con un complejo macrocíclico que puede ser una MPc ⁶³	40
Figura 2.4. Imagen SEM (a) MWCNT _f ⁴¹ , (b) FeT4MPyP / MWCNT _f ⁴¹ , (c) (FeT4MPyP-CoTsPc) /	41

MWCNT_f⁴², (d) CoPc(II) / MWCNT_f^{65, 66}

Figura 2.5. (A) CVs de (a) MWCNT/BPPGE, (b) poli-Co(II)/MWCNT/BPPGE, (c) poli-Co(II)/BPPGE y (d) BPPGE en 10 ⁻³ M Fe (CN) ₆ ³⁻	42
Figura 2.6. CVs de GSH en buffer PBS, pH 7.4 a concentraciones de 1mM (curva 1), 2mM (curva 2), 3 mM (curva 3), 4 mM (curva 4), 5 mM (curva 5) e un electrodo modificado CoPc/OPG. Velocidad de barrido 100 mV/s. la curva 6 es obtenida en ausencia de GSH. (B) Curva de calibración para GSH, (C) curva de calibración para GSSG ⁴⁶	44
Figura 2.7. Curvas analíticas para la electrooxidación de GSH en buffer de fosfatos pH 7.4 en un rango de concentración de 0.005 a 5 mM. Salto de potencial (E) = 0.002 V, frecuencia (f) = 80 Hz y amplitud (a) = 0.03 V. Inserto se muestran los voltamogramas de onda cuadrada.	45
Figura 2.8. Voltamperogramas cíclicos registrados en un electrodo híbrido <i>CoPc-MWCNT_f/GC</i> para diferentes concentraciones de <i>CoPc</i> (1, 5, 10, 50 mmol L ⁻¹) en una solución de buffer de fosfatos pH 7.4. Velocidad de barrido de 100 mV s ⁻¹	49
Figura 2.9. Perfilometría del electrodo GC modificado con <i>CoPc-MWCNT_f/GC</i> (a) antes y (b) después de los estudios electroquímicos.....	50
Figura 2.10. (A) Imagen SEM del compuesto CoPc-MWCNT. (B) Diagrama de contraste de fase para el mapeo de Co (C) Análisis EDS del compuesto CoPC-MWCNT y la composición de los elementos detectados sobre el electrodo modificado.....	51
Figure 2.11. Voltamperogramas lineales del electrodo modificado <i>CoPc / MWCNT / GC</i> en buffer PBS pH 7.4. (A) glutatión GSH 3 mM, (B) GSSG 3 mM y (C) voltamperograma cíclico para la mezcla de ambos GSH y GSSG 3 mM. Velocidad de barrido 100 mV s ⁻¹ . Todos los estudios fueron realizados bajo atmosfera de nitrógeno.....	52
Figura 2.12. A) Análisis por voltamperometría de pulso diferencial con un electrodo <i>CoPc/MWCNT_f/GC</i> en presencia de una mezcla a concentraciones crecientes de GSH (0.5 mM, 1 mM, 3 mM, 5 mM y 7 mM) y GSSG (150 μM, 500 μM, 1 mM, 2 mM, 3 mM) en solución sintética, B) GSH y C) GSSG son las curvas de calibración correspondientes para cada especie de glutatión.....	53
Figure 2.13. Estudio de los principales analitos interferentes: ácido ascórbico y cisteína en el análisis electroquímico del GSH y GSSG usando el electrodo modificado <i>CoPc-MWCNT_f/GC</i>	55
Figura 2.14. Espectro UV-vis para el comportamiento <i>quenching de absorción</i> sobre NEM en presencia de GSH a una λ = 301 nm. La mezcla de la reacción contiene 3.5 mM de NEM en buffer PBS 0.1 M, pH 7.4 con adición de concentraciones conocidas de GSH en un rango de 100 a 500 μM.....	57
Figura 2.15. Niveles de plomo en sangre de ratas Wistar intoxicadas con AaPb (grupo toxic) y no intoxicadas (control). Inserto se muestra la curva de calibración correspondiente.....	61

CAPITULO III.

Figura 3.1. Esquema representativo de los métodos de detección para O ₂ ^{•-} ¹⁰	69
Figura 3.2. Reacción de reducción univalente de XTT generando como producto su respectivo formazan, en presencia del radical-anión superóxido ²⁹	70
Figura 3.3. (A) esquema general de las reacciones electroquímicas en la interfase de un biosensor a base de una multicapa de teflón donde se encuentra inmovilizada SOD, para la detección de O ₂ ^{•-} ⁴² ; (B) estructura supramolecular que conforma el biosensor a base de Citocromo c para la detección de O ₂ ^{•-} ⁴⁴	72
Figura 3.4. (a) perfil de electropolimerización de EDOT en agua-etanol, electrolito	

LiClO ₄ · 3H ₂ O-PSSNa. Velocidad de barrido 100 mV s ⁻¹ . (b) esquema del posible mecanismo de polimerización electroquímica de EDOT. (c) micrografías AFM de películas poliméricas sobre ITO. (d) imagen SEM para un recubrimiento de PEDOT sobre ITO. ^{47, 57, 59, 60}	74
Figura 3.5. (a) estructura terciaria de CuZnSOD, inserto se muestra la estructura de rayos X de la misma enzima en donde se muestran los residuos de aminoácidos (Histidina y Aspartato) enlazados al Cu(II) y Zn(II). En este caso el sitio activo de SOD es el ión metálico de Cu (zona punteada). (b) diagrama esquemático del ciclo catalítico para CuZnSOD ⁶⁵	76
Figura 3.6. (I) reacción de glutaraldehído con enzimas bajo condiciones neutras o ligeramente ácidas. (II) reacciones de glutaraldehído bajo condiciones básicas ⁶⁸	77
Figura 3.7. Inmovilización de enzima <i>via</i> copolimerización con glutaraldehído ⁶⁹	78
Figura 3.8. Preparación de crosslinked usando BSA como proteína rica en residuos de Lys y una enzima modelo. El enlace cruzado es promovido por el glutaraldehído ⁷¹	78
Figura 3.9. Voltamogramas cíclicos de la electropolimerización de PEDOT sobre GCE (inserto sobre platino) en solución 10 mM EDOT en 0.1 M NaSS. Barrido de potencial de -0.6 a 1.2 V, velocidad de barrido 50 mVs ⁻¹ , por 10 ciclos	82
Figura 3.10. (a) voltamogramas cíclicos para los electrodos de Pt y PEDOT/Pt en presencia de 5 mM Fe(CN) ₆ en PBS pH 7.4; velocidad de barrido 50 mV/s. (b) esquema que representa el mecanismo de carga y descarga para el polímero PEDOT	83
Figura 3.11. (a) Voltamperogramas cíclicos de las películas de PEDOT sobre platino en buffer PBS 0.01M, pH 7.4, a diferentes velocidades de barrido de potencial (de 20 a 200 mVs ⁻¹). (b) Gráficas de $\log I_p$ vs $\log de v$ para los electrodos modificado PEDOT/Pt en presencia de 5mM Fe(CN) ₆ en PBS pH 7.4 a diferentes velocidad de barrido	83
Figura 3.12. (a) fotografía del ITO modificado con PEDOT (izquierda) y del ITO sin modificación superficial (derecha). (b) imágenes SEM del recubrimiento de PEDOT sobre ITO, se muestra un “close up” sobre el polímero desde 20 μm hasta 20 nm. (c) imágenes de AFM de 50 μm x 50 μm en 2D y 3D. También se muestra el perfil para el espesor de la película	84
Figura 3.13. (a) esquema representtivo para la función del recubrimiento de <i>PEDOT</i> como capa permoselectiva para el paso del H ₂ O ₂ . (b) respuesta amperométrica del electrodo modificado <i>PEDOT/Pt</i> para adiciones sucesivas de H ₂ O ₂ desde una concentración inicial 0.5 μM hasta 37.5 μM. potencial aplicado -0.30 V vs SCE en PBS 0.01 M, pH 7.4, inserto se encuentra el gráfico de la curva de calibración correspondiente	86
Figura 3.14. (a) Estudio electroquímico de posibles compuestos interferentes tales como ácido úrico (UA), ácido ascórbico (AA), xantina (XA) y superóxido de potasio (KO ₂) en la determinación final de anión radical superóxido. (b) Respuesta amperométrica para la evaluación de la influencia electroactiva de los interfentes	87
Figura 3.15. (a) Espectros de absorción UV-vis de KO ₂ a una concentración inicial de 0.175 mM a una concentración final de 3.5 mM en buffer PBS, pH 7.4; (b) curva de calibración experimental que corresponde al ensayo UV-vis considerando un rango de concentración de 0.5 a 10 mM de KO ₂	89
Figura 3.16. Espectro de UV-vis para concentraciones crecientes de XTT desde 5 μM hasta 300 μM en buffer de fosfatos PBS 0.01 M, pH 7.4	91
Figura 3.17. Ensayo espectrofotométrico para la influencia de la concentración de O ₂ ^{•-} sobre la reducción de XTT. La mezcla de reacción contiene XTT 100 μM con adición sucesiva de alícuotas de 100 μL de KO ₂ 20 mM	92
Figura 3.18. Curva de calibración para superóxido correspondiente al ensayo espectrofotométrico para la reacción de reducción de XTT por adición continua de O ₂ ^{•-} desde una concentración 1.25 a 6.04 mM en buffer de fosfatos PBS 0.01 M, pH 7.4	93

Figura 3.19. (a) Típica respuesta amperométrica para la reacción $H_2O_2 + catalasa$ a $-0.30 V$ vs SCE en buffer PBS 0.01 M, pH 7.4. Las flechas naranjas representan la adición secuencial de 0.09, 0.175, 0.263, 0.350, 0.438 μM de $O_2^{\cdot-}$. La fuente de producción de superóxido fue KO_2 en NaOH, pH 12.3. La flecha azul indica la inyección de 200 μL de 0.1% catalasa. (b) Respuesta amperométrica del electrodo modificado ($GA 2.5\%_BSA 2\%$)/PEDOT/Pt en presencia de buffer PBS 0.01 M, pH 7.4 y KO_2 : 0.175, 0.35, 0.7, 0.875 μM a $-0.30 V$ vs SCE en PBS 0.01 M, pH 7.4.....	94
Figura 3.20. (a) Esquema representativo de la configuración final para el biosensor ($SOD 0.1\%_BAS 2\%_GA 2.5\%$)/PEDOT/Pt. (b) Respuesta amperométrica del biosensor SOD/PEDOT/Pt para la adición sucesiva de $O_2^{\cdot-}$ desde una concentración inicial de 0.175 μM hasta 2.8 μM . Potencial aplicado $-0.30 V$ vs SCE en PBS 0.01M, pH 7.4; inserta se encuentra la curva de calibración correspondiente.....	96
Figura 3.21. Mediciones electroquímicas con el biosensor ($SOD 0.1\%_BAS 2\%_GA 2.5\%$)/PEDOT/Pt en un rango de concentración (0.175,0.35,0.7,0.875,1.05,1.225,1.4,1.575) μM de $O_2^{\cdot-}$. Estudio de la estabilidad después de 8,12 y 28 días de la primera medición. La fuente de producción de peróxido fue a partir del sistema $KO_2/NaOH$ pH 12.3.....	97

ANEXO I.

Figura A1. Clasificación básica de los métodos usados para determinar estrés oxidativo ²	104
--	-----

ANEXO II.

Figura AII-1. (I) Niveles de plomo en sangre de ratas Wistar intoxicadas con AaPb (grupo toxic) y no intoxicadas (control). Inserto se muestra la curva de calibración correspondiente Fotografías de ratas Wistar (II-i) inyección intraperitoneal de AcPb; (II-ii) inflamación del abdomen bajo; (II-iii) tumor en el abdomen bajo.....	109
Figura AII-2. El esquema muestra el comportamiento dinámico para las diferentes etapas descritas para el estrés oxidativo. El estado redox asociado a ratas Wistar intoxicadas con plomo se explica en función a la fluctuación de los niveles de ROS y antioxidantes bajo estrés oxidativo agudo (i) y crónico (ii).....	111

TABLAS

CAPITULO I

Tabla 1.1. Se muestran los principales grados de intensidad para el estrés oxidativo, algunos de los factores que lo detonan, las rutas de señalamiento específico y finalmente las respuestas fisiológicas que se expresa.....	6
Tabla 1.2. Principales ROS primarias y las especies oxidantes secundarias a partir de las primarias a la constante de velocidad indicada.....	11

CAPITULO II.

Tabla 2.1. Resumen de algunos métodos HPLC para la determinación de GSH y GSSG.....	35
Tabla 2.2. Resumen de algunos métodos CE para la determinación de GSH y GSSG.....	35
Tabla 2.3. Resumen de los métodos electroquímicos que han sido utilizados para la detección y cuantificación de GSH y GSSG.....	37
Tabla 2.4. Parámetros analíticos para la detección simultánea de GSH y GSSG en PBS, Orina, y Plasma usando DPV.....	55
Tabla 2.5. Se muestra el grupo de experimentos para la detección y cuantificación de GSH en plasma y orina, utilizando como método alternativo el ensayo espectralfotométrico con NEM.....	58
Tabla 2.6. Valores de concentración para GSH y GSSG \pm SD obtenidos por el método electroanalítico propuesto. También la variación en la relación GSH/GSSG en plasma y orina de ratas Wistar fue analizada pre- y post-intoxicación con plomo.....	60

CAPITULO III.

Tabla 3.1. Se presentan algunos de los últimos ejemplos de sensores electroquímicos utilizados para la determinación de $O_2^{\bullet -}$	72
Tabla 3.2. Se muestra la secuencia de valores calculados para determinar la concentración real del superóxido que reacciona para reducir al XTT.....	93
Tabla 3.3. Comparación de los parámetros analíticos reportados para biosensores a base de SOD sobre materiales nanoestructurados. Datos reportados desde 2009 a la fecha.....	97

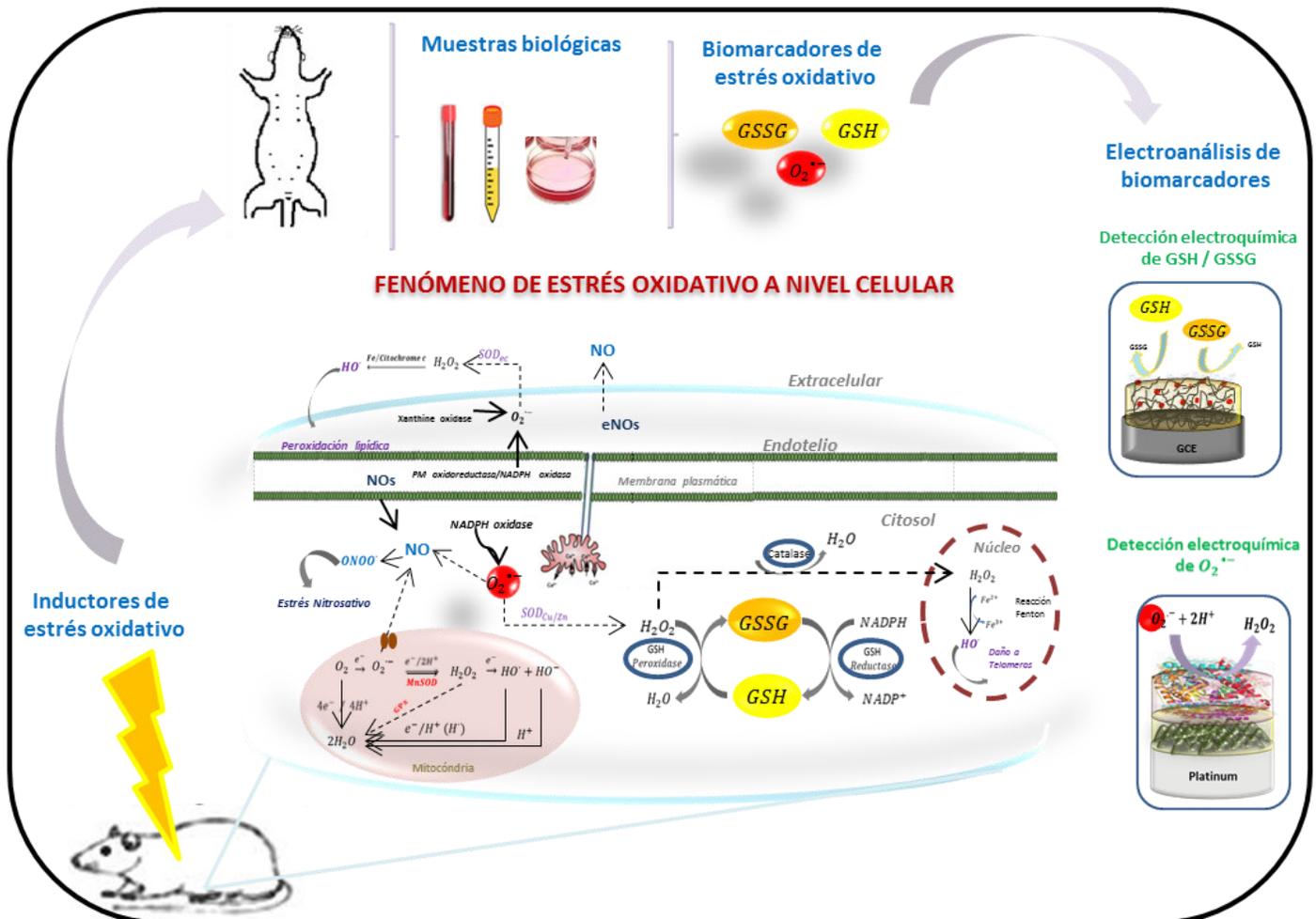
ANEXO II.

Tabla A-II. Se muestran los principales grados de intensidad para el estrés oxidativo, algunos de los factores que lo detonan, las rutas de señalamiento específico y finalmente las respuestas fisiológicas que se expresa.....	110
---	-----

CAPITULO I

FUNDAMENTO TEÓRICO

Oxidación de sistemas biológicos: fenómeno de estrés oxidativo y su inducción por intoxicación con plomo, antioxidantes, reacciones redox y métodos para su determinación.



1. FENÓMENO DE ESTRÉS OXIDATIVO.

De manera general el estrés oxidativo aborda y considera por una parte la existencia de especies oxidantes (OS por sus siglas en inglés, Oxidative Species) endógenas y exógenas, y por otra los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos a nivel celular. De esta manera surge el interés por realizar trabajos de investigación en diferentes disciplinas como la química, biología celular y ciencias de la salud que permitan dar seguimiento al fenómeno del estrés oxidativo y su respuesta en cuanto a la expresión de especies oxidantes (OS) y especies antioxidantes (AS por sus siglas en inglés, Antioxidant Species) ¹.

1.1. Relevancia cronológica del estrés oxidativo.

A lo largo de estos últimos 35 años se han reportado numerosas publicaciones científicas en donde se detalla el avance del conocimiento que ha permitido la comprensión del estrés oxidativo (figura 1.1). Este compilado de investigaciones indica la evolución con respecto a las rutas de investigación interesadas en comprender el fenómeno del estrés oxidativo en organismos vivos ².

Trabajos pioneros entre 1935 y 1990 comenzaron a realizar estudios metabólicos (metaboloma redox) con la finalidad de monitorear productos generados por la oxidación de macromoléculas y asociar los resultados obtenidos al daño oxidativo provocado ^{3,4}. En esta época el interés principal era evidenciar el desbalance redox que al parecer ocurría bajo este padecimiento.

Años posteriores a finales de los 90s inicios del 2000 se implementó una novedosa línea de investigación denominada proteómica, la cual fue adoptada por diversos grupos de investigación para acoplarla al estudio del estrés oxidativo (proteoma redox) y por medio de la evaluación proteómica en organismos vivos obtener información sobre los daños oxidativos ^{5,6}.

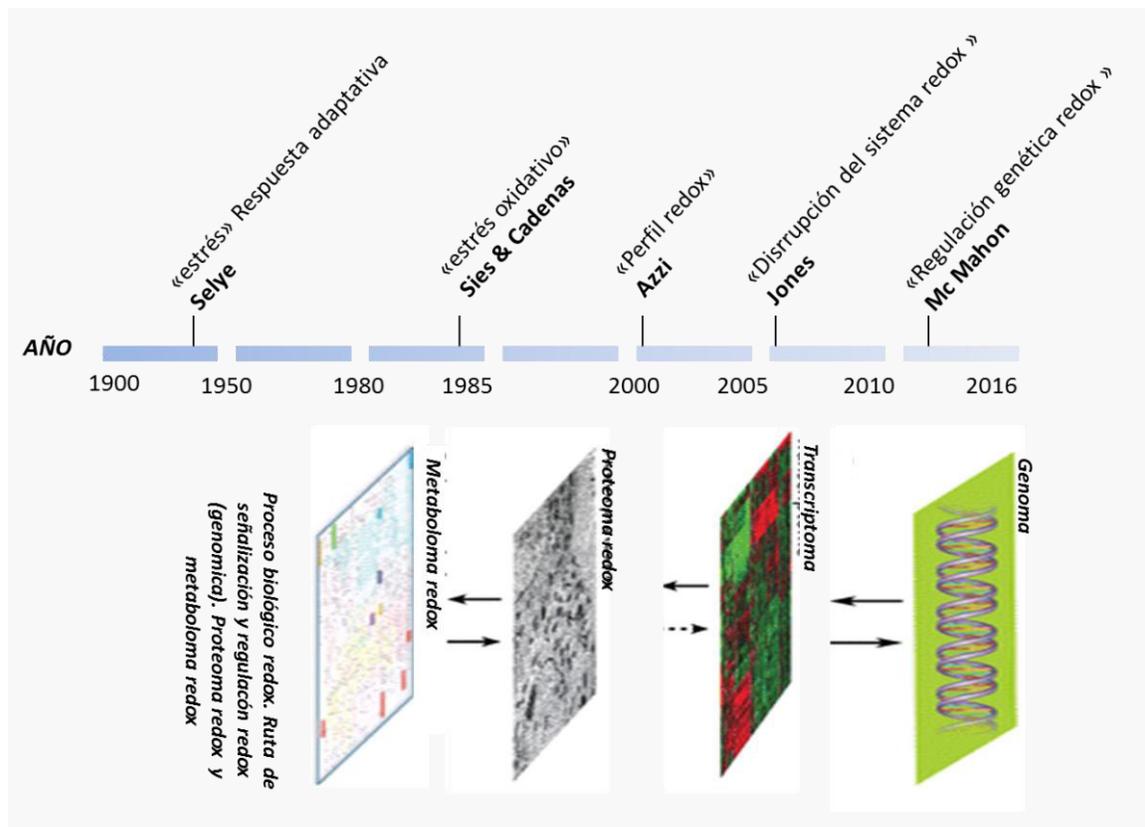
Estudios más recientes (2006 a la fecha) han sido dirigidos en términos de la genética y la biología molecular (genómica y regulación redox). Lo cual ha permitido obtener resultados favorables y complementarios que describen de mejor manera el fenómeno del estrés oxidativo ⁷.

1.1.1. Estudios pioneros del estrés oxidativo.

Históricamente el concepto de estrés oxidativo ha pasado por varias etapas con respecto al tiempo. En 1936 Hans Selye indicó que el término de “estrés” está asociado a la respuesta de adaptación de los organismos vivos a diferentes estímulos que provocan una alteración fisiopatológica local y/o sistémica. Con

CAPITULO I. FUNDAMENTO TEÓRICO
Fenómeno de estrés oxidativo

base en ensayos biológicos Selye describe que el *síndrome general de adaptación* consiste en tres etapas que incluyen la primera como la reacción de alarma, seguida por un periodo prolongado de resistencia y una etapa terminal de exahustación y muerte ⁸.



1.1.2. Desbalance redox y el estrés oxidativo.

Pero es hasta 1985 cuando Sies y Cadenas establecen el término de “estres oxidativo” de acuerdo con sus estudios bioquímicos en donde indican que el daño oxidativo que sufren las células y tejidos cuando son expuestos a condiciones oxidativas de diversa naturaleza están acompañadas por una elevada producción de especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés, ROS_Reactive Oxygen Species) y un aparente decremento de especies antioxidante (AS) ^{3,4}. Dicho desbalance sugiere que un aumento en ROS implica la muerte celular y el incremento en AS permite lograr la homeostasis celular del organismo y su supervivencia ⁹.

En la figura 1.2 se muestra el esquema dinámico de la biología redox, el cual es mantenido mediante el flujo metabólico y la retroalimentación redox. Donde los ROS generan un estado relativamente oxidado debido a la inducción externa, dicho estado de oxidación es contrarrestado por la acción de mecanismos antioxidantes. El proceso en general se refiere al mantenimiento de la homeostasis redox celular.

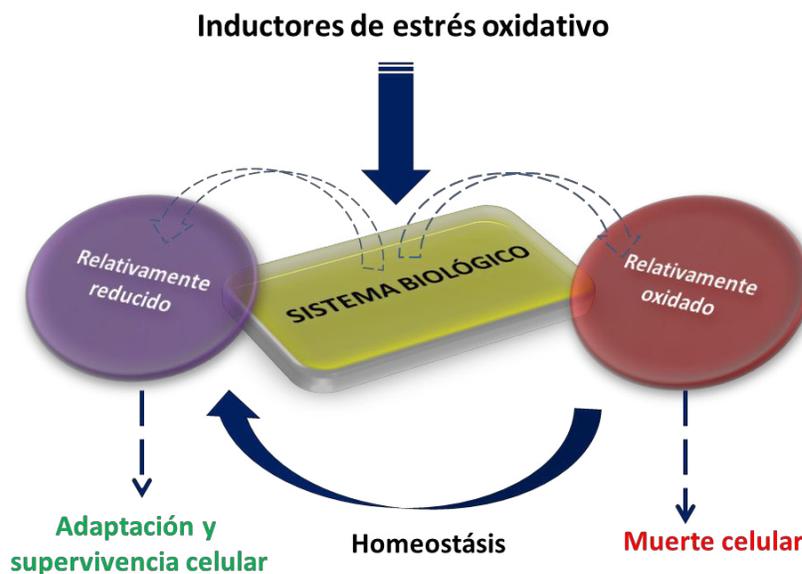


Figura 1.2. Mantenimiento de la homeostasis redox celular ⁹.

En 2004 Azzi y colaboradores sugieren que el estrés oxidativo debe de ser estudiado como un “perfil redox” en términos de oxidantes, prooxidantes, antioxidantes y sistemas antioxidantes a nivel celular ^{5 7}. Jones y colaboradores (2006) consideran que la definición de estrés oxidativo como el desbalance entre especies oxidantes y antioxidantes endógenas y exógenas a nivel celular y tisular no es del todo adecuada. Así pues, publican su trabajo de investigación donde evalúan los niveles de metabolitos de antioxidantes en plasma de humanos y concluyen que dicho concepto de estrés oxidativo no puede ser definido como un simple desbalance entre ambas especies. Ya que en principio se esperarí que para el sistema antioxidante gobernado por el par redox *tiol (-SH) disulfuro (S-S)* presente en Glutación, Cisteína, y otras proteínas tioladas la concentración de grupos -SH fuera menor debido a su agotamiento en función de su reacción con los oxidantes y por el contrario surgiera el incremento de metabolitos (S-S) como productos de estas reacciones; sin embargo no es así, de alguna manera se logra la homeostasis redox en donde participan más de un sistema de antioxidantes. Por lo cual sugieren que el concepto de estrés oxidativo debe de ser redefinido como: *una disrupción del sistema redox*, si se quiere implementar a nivel de bioquímica clínica, considerando que la

respuesta a ciertos estímulos tóxicos y fisiológicos en cada organismo es diferente y no un patrón común en donde debe incrementar el nivel de oxidantes y disminuir el de antioxidantes ⁶.

1.1.3. Estrés oxidativo, respuesta genética y homeostasis celular.

En la última década la investigación sobre el estrés oxidativo ha sido dirigida en términos de la genómica a fin de entender los mecanismos de homeostasis y adaptación celular que a su vez permitan elucidar la regulación genética y su impacto en las funciones antioxidantes a nivel celular ^{10 11 12}. Trabajos recientes con ayuda de la biología molecular muestran las diferentes rutas de señalización genética que permiten entender la transducción, síntesis y reparación de algunas proteínas con actividad antioxidante celular ⁹.

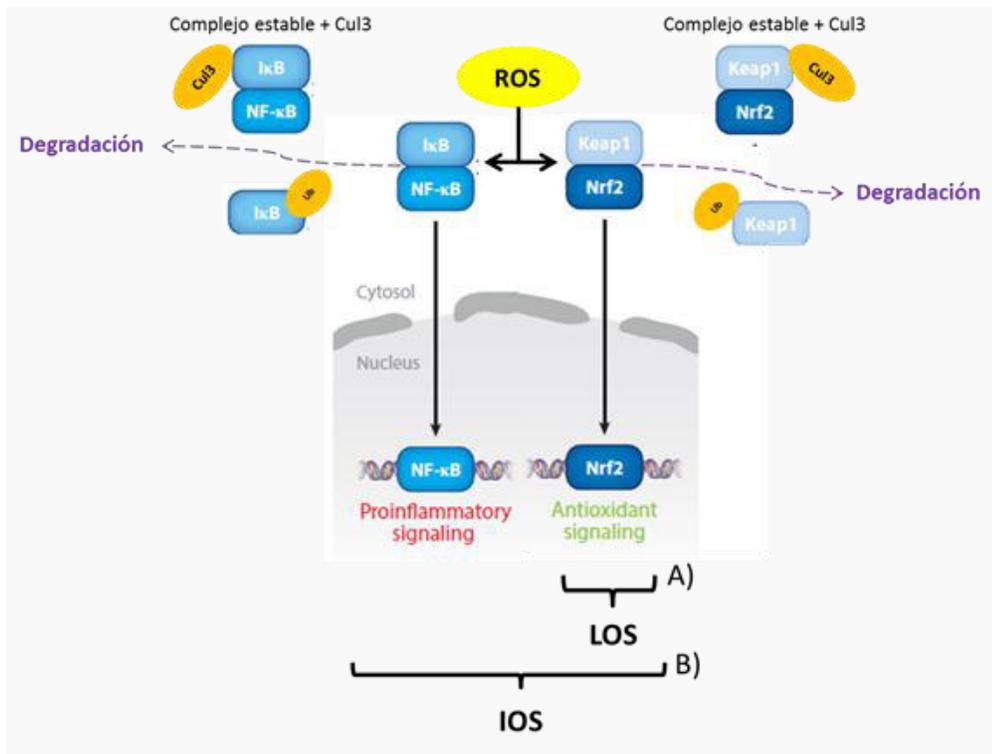


Figura 1.3. Sistemas de señalización que operan durante la respuesta al estrés oxidativo en animales. Bajo condiciones normales el factor de transcripción Nrf2 se enlaza a Keap1, este complejo estable interactúa con el otro complejo Cul3 para promover la ubiquitinación y posterior degradación de Nrf2/ Keap1. Por el contrario cuando se induce estrés oxidativo (LOS), las ROS oxidan a Keap1 evitando su enlace con Nrf2 y este difunde hacia el núcleo en donde se une a elementos de respuesta antioxidante (A). Una ruta muy similar se presenta durante la expresión de estrés oxidativo (IOS), en donde además de promover la activación del mecanismo antioxidante también promueve la respuesta antiinflamatoria (B) ¹.

Al parecer el sistema responsable de la adaptación al estrés oxidativo es atribuido a una serie de reacciones las cuales comienzan por la señalización y activación de los sistema Nrf2/Keap1 y NF-kB, AP-1, los cuales dependen de la sobreproducción de ROS. El factor Nrf2 es un factor de transcripción cuya estructura proteica encierra un secuencia de leucinas las cuales operan de manera armónica con la proteína Keap1^{13 14}. Bajo condiciones normales cuando Nrf2 interactúa con Keap1 se adapta consecutivamente un sustrato E3 a la ubiquitina ligasa para formar el complejo Cul3, esta ubiquitinación de Nrf2/Keap1 promueve su degradación por el proteosoma lo que resulta en la suspensión de la actividad transcripcional. Por el contrario cuando incrementan los niveles de ROS los grupos -SH de la proteína Keap1 son oxidados haciendo imposible su interacción con Nrf2, debido a esto el factor de transducción es movido hacia el núcleo en donde es acumulado y consecutivamente hace interacción con los llamados elementos de respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en inglés, Antioxidant Response Element) los cuales son promotores de genes que codifican las proteínas y enzimas de defensa¹⁵. Esta regulación genética codifica para la síntesis de enzimas antioxidantes (SOD, catalasa, peroxidasa, GST-transferasa), o enzimas como la gama-glutamincistein sintetasa precursor principal para la biosíntesis de glutation (GSH) (figura 1.3 inciso A).

Con respecto al sistema NF-kB, AP-1, se menciona que su mecanismo de acción comienza cuando los niveles de oxidantes ya no pueden ser controlados a pesar de la activación extraordinaria de los sistemas de defensa antioxidante celular. Esto desencadena rutas de señalización para sistemas de defensa antioxidante, pero también rutas de señalización proinflamatoria (Figura 1.3 inciso B)^{1 13 16}.

Estos estudios han sido corroborados mediante la activación de la expresión de ciertos genes que actúan durante el proceso de homeostasis en ratones sometidos a estrés oxidativo. Lo cual consiste en administrar ciertas drogas etiquetadoras que actúan como impulsores de aquellos genes que dan inicio a la respuesta del mecanismo de defensa celular y contrarrestar las lesiones causadas por el daño oxidativo¹⁷. Por el contrario dicho grupo de genes pueden ser inhibidos durante el padecimiento de estrés oxidativo, lo que implica la disrupción en sus funciones y por ende en los procedimientos subsecuentes¹.

2. CLASIFICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO.

Después de transcurridas casi cuatro décadas dada la primera definición de estrés oxidativo se propone su clasificación^{16,18} (tabla 1) como: estrés oxidativo de baja intensidad (LOS por sus siglas en inglés, Low Oxidative Stress), estrés oxidativo de intensidad intermedia (IOS por sus siglas en inglés, Intermediate Oxidative Stress) y estrés oxidativo de alta intensidad (HOS por sus siglas en inglés, High Oxidative Stress).

CAPITULO I. FUNDAMENTO TEÓRICO
Fenómeno de estrés oxidativo

La intensidad del estrés oxidativo, dependerá de la dosis de intoxicación con xenobioticos, drogas, metales pesados y/o del tiempo de perturbación con radiaciones UV por mencionar algunos factores.

Dentro de esta clasificación el tipo de estrés oxidativo de baja intensidad (LOS) ha sido estudiado ampliamente, éste se reconoce por generar una serie de reacciones etiquetadoras que inducen de cierto modo a la acción compleja del mecanismo de defensa antioxidante (enzimática y no enzimática) para lograr mantener la homeostasis del organismo en general. En este caso el sistema responsable de la adaptación al estrés oxidativo es atribuido a la señalización y activación del sistema Nrf2/Keap1 debido al incremento de ROS^{13 15}. La respuesta de los organismos al estrés oxidativo de intensidad intermedia está coordinado por tres sistemas reguladores: NF-kB, AP-1 y MAP quinasas. Estos sistemas también regulan la expresión del mecanismo de defensa celular antioxidante, además estimulan la expresión de ciertos genes de la inflamación y reprogramación general de la función celular. Al respecto la apoptosis y necrosis son la única evidencia asociada al estrés oxidativo de alta intensidad (HOS)^{16,16}.

En la tabla 1.1 (corregida de la original¹⁶) Se muestra la clasificación del estrés oxidativo en animales, los factores que lo detonan y la respuesta fisiológica que se expresa en cada caso. El estrés oxidativo de baja intensidad es regulado por el sistema Nrf2/Keap1 que codifica para la respuesta del mecanismo antioxidante enzimático y no enzimático. El estrés oxidativo de intensidad intermedia además de regular la respuesta del mecanismo de defensa induce a la secreción de proteínas proinflamatorias, este tipo de estrés está regulado por tres principales quinasas NF-kB, AP-1 y MAP. Finalmente el estrés oxidativo de alta intensidad desencadena una serie de reacciones en cascada (no descifradas hasta el momento) que provocan la apoptosis, necrosis y muerte celular¹⁶.

Tabla 1.1. Se muestran los principales grados de intensidad para el estrés oxidativo, algunos de los factores que lo detonan, las rutas de señalamiento específico y finalmente las respuestas fisiológicas que se expresa.

Factores de inducción	Intensidad de estrés oxidativo	Ruta de señalización	Activación molecular	Efecto fisiológico
Dieta	Baja	Nrf2/Keap1	Mecanismo antioxidante	Respuesta adaptativa
Shock físico	Intermedia	NF-kB, AP1,MAP quinasas	Mecanismo antioxidante y proteínas de inflamación	Respuesta combinada: Adaptación vs Daño celular
Fármacos				
Drogas	Alta	Desconocida ?	Desconocida ?	Necrosis y Apoptosis
Metales pesados				
Radiaciones UV e IR				

Uno de los estudios que hace referencia a la asociación de cierto tipo de estrés oxidativo es el trabajo de Yan L.J. y colaboradores, quienes hacen la correlación entre sus resultados mediante el análisis de productos de la peroxidación y oxidación de proteínas para un grupo de diversas patologías asociadas al envejecimiento y el estrés oxidativo de baja intensidad, el cual permite la supervivencia y adaptación del organismo ¹⁹. A su vez Pickering y colaboradores reportan su trabajo experimental realizado para la evaluación del estrés oxidativo provocado en modelos biológicos: cultivos de células de mamíferos y moscas *Drosophila melanogaster*; en el cual concluyen que ambos organismos presentaron cierta adaptación, manteniendo su homeostasis general después de haber sido sometidos a lesiones fisiológicas y ambientales agudas (más de 12 horas para las células y más de 7 días para las moscas). Por lo que clasificaron su sistema como una respuesta del organismo a un tipo de estrés moderado o gradual que al final permitió mantener con vida por un periodo de tiempo a ambos modelos biológicos ²⁰.

3. OXIDACIÓN DE SISTEMAS BIOLÓGICOS.

Desde tiempos anteriores hasta la fecha las perspectivas con respecto a la investigación del estrés oxidativo han ido principalmente en dirección al estudio de la producción y metabolismo de las especies reactivas de oxígeno. Su interacción con biomoléculas y el daño que desencadenan a nivel celular. Otro de los puntos que abordan este tipo de investigaciones va relacionado con la interacción de ROS y los sistemas antioxidantes responsables de mantener la homeostasis celular del organismo (punto que se abordará en la siguiente sección). El interés surgió en 1950 cuando por primera vez se demostró la presencia de radicales libres en sistemas biológicos ²¹ y que debido a su reactividad seguramente tendrían alguna influencia en el desarrollo de procesos patológicos dentro de sistemas biológicos ²².

Si bien los trabajos pioneros han sido enfocados al estudio de la reactividad y metabolismo de los ROS, surge una segunda línea de investigación sobre las especies reactivas con potencial efecto oxidante y su función como etiquetas de señalización genética que permite la activación del mecanismo de defensa celular antioxidante ^{23 24}. Ahora es absolutamente claro que los ROS tienen una activa participación en diversos procesos y ellos no pueden ser considerados únicamente como un agente dañino, sino que también pueden contribuir en funciones positivas para el organismo ¹⁶.

3.1. Generación y reactividad de ROS en organismos vivos.

El campo de investigación de ROS en sistemas biológicos ha sido abordado por diferentes disciplinas entre ellas química, farmacología y genética por mencionar algunas, sin embargo suele ser bastante

CAPITULO I. FUNDAMENTO TEÓRICO
Fenómeno de estrés oxidativo

complicado debido a diversas razones ²⁵ como por ejemplo: (i) la baja concentración de estas especies atribuido a su estabilidad mínima y alta reactividad; (ii) la gran diversidad de reacciones en las que participan; (iii) la dependencia del estado fisiológico del organismo; y (iv) la dificultad para su análisis.

3.1.1. Producción celular de ROS primarias.

En organismos vivos aeróbicos normalmente más del 90 % del oxígeno consumido es reducido directamente vía un mecanismo de transferencia de cuatro electrones para producir agua, este proceso ocurre dentro de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria con la participación de enzimas como la Citocromo *c* ^{26 27}. El otro 10% del oxígeno consumido es reducido vía un electrón de transferencia para producir anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) el cual es reducido por segunda vez al mismo tiempo de que interactúa con dos protones para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ^{28 29}.

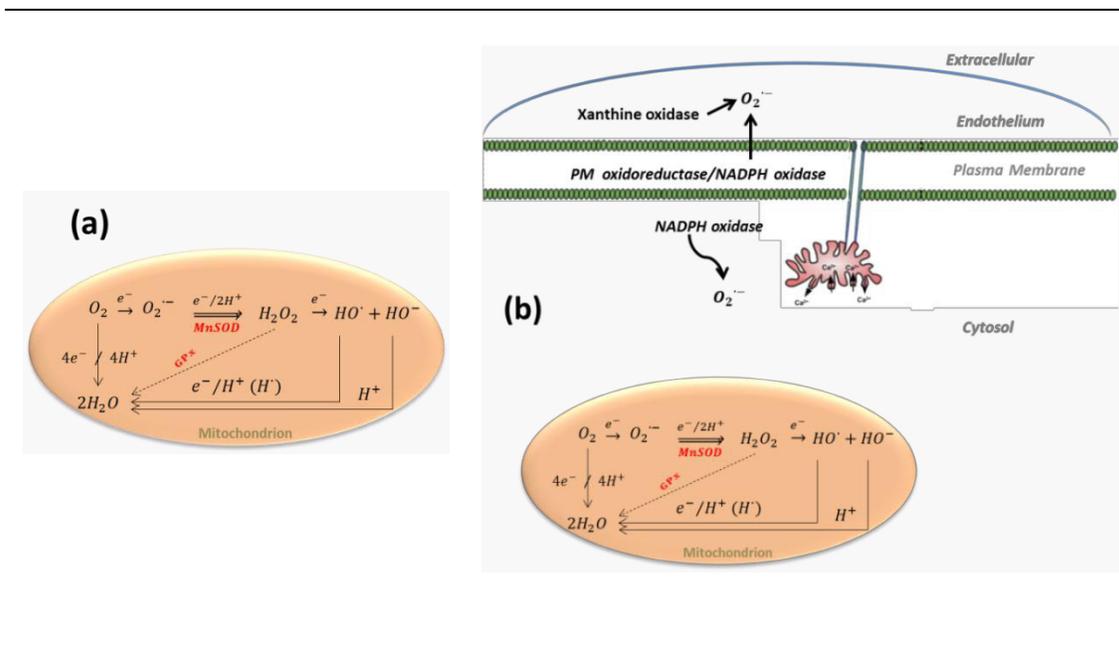


Figura 1.4. Proceso aeróbico a nivel celular bajo condiciones fisiológicas normales. Mecanismo de captura de oxígeno y producción de $O_2^{\cdot-}$. (a) En la mitocondria, dentro de la cadena de transporte de electrones. (b) Además de la función mitocondrial a nivel del citosol y el endotelio existe la intervención de enzimas Xantina y NADH quienes muestran la capacidad producir $O_2^{\cdot-}$ ³.

Otra de las rutas se lleva a cabo por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD, por sus siglas en inglés, Superoxide Dismutase) quien dismuta la molécula de superóxido para generar una molécula de

peróxido de hidrógeno y una de oxígeno ³⁰. Aunque el (H_2O_2) no es un radical libre, si es una especie altamente reactiva el cual está incluido dentro del grupo de ROS. El H_2O_2 puede ser dismutado por la acción de la enzima Glutación reductasa (por sus siglas en inglés, GPx_Peroxide Gluthation) para generar una molécula de agua y una de oxígeno; o bien por la siguiente ruta en donde acepta un electrón más y se fragmenta para producir radical hidroxil (HO^\cdot) y anión hidroxil (HO^-), el radical HO^\cdot acepta un electrón y un protón lo que resulta en la formación de una molécula de agua (Figura 1.4a) ^{8 31}. Este proceso ocurre cuando los organismos vivos se encuentran en su estado fisiológico normal.

Sin embargo aunque menos común, existen otras fuentes de producción celular de $O_2^{\cdot-}$ como principal agente precursor de las demás especies oxidantes (H_2O_2 , HO^\cdot , HO^-) esto es posible por medio de su dismutación espontánea o enzimática. Diversas oxidasas están involucradas en la producción del anión-radical entre las cuales se encuentran la Xantina oxidasa (la cual realiza el proceso de producción de $O_2^{\cdot-}$ entre el endotelio y el medio extracelular) y la NAPH oxidasa (quien realiza su función para generar el mismo superóxido dentro de la membrana plasmática y el citosol celular) (Figura 1.4b). La actividad de estas enzimas se ve potencializada cuando el organismo padece de estrés oxidativo ^{5,16} pero también cuando hay presencia de hipoxia ³².

3.1.2. Sobreproducción y reactividad de ROS.

La sobreproducción ROS primarias ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^\cdot) tienen su origen por síntesis enzimática, inducción ambiental o por reacciones químicas de una especie activa con otras moléculas endógenas ². Las altas concentraciones de ROS primarias provocan fenómenos de estrés oxidativo que comienza con la elevada secreción de $O_2^{\cdot-}$ cuya disposición aumenta y reacciona principalmente con el monóxido de nitrógeno (NO) para producir rápidamente peroxinitrito ($k = 6.7 \times 10^9 \text{ L M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). El peroxinitrito ($ONOO^-$) es por si mismo un potencial agente oxidante capaz de oxidar, nitrar e hidroxilar proteínas y enzimas desencadenando a su vez procesos de estrés nitrosativo ³³.

Otra ruta que sigue el exceso de anión-radical superoxido es su continua dismutación por la SOD presente en el citosol y en la región extracelular cuyo H_2O_2 producido genera radical HO^\cdot (por medio de reacciones fenton) el cual es considerado el agente oxidante más severo con gran capacidad de provocar reacciones en cadena de peroxidación lipídica y oxidación de telómeros ³⁴ (Figura 1.5).

El incremento de ROS y su alta reactividad promueven la formación de agentes oxidantes de segunda generación entre ellas especies reactivas de nitrógeno ^{35 36} especies reactivas de azufre (RSS, por sus siglas en

inglés_Reactive Sulfur Species) las cuales son formadas in vivo bajo condiciones de estrés oxidativo ^{37 38} especies carbonil reactivas (RCS) que incluyen varias formas de aldehídos generados metabólicamente y carbonilos excitados electrónicamente ⁴. Finalmente, varias especies reactivas de selenio (RSeS) incluyen compuestos de bajo peso molecular como los residuos de selenocisteína y selenometionina en proteínas ¹⁸.

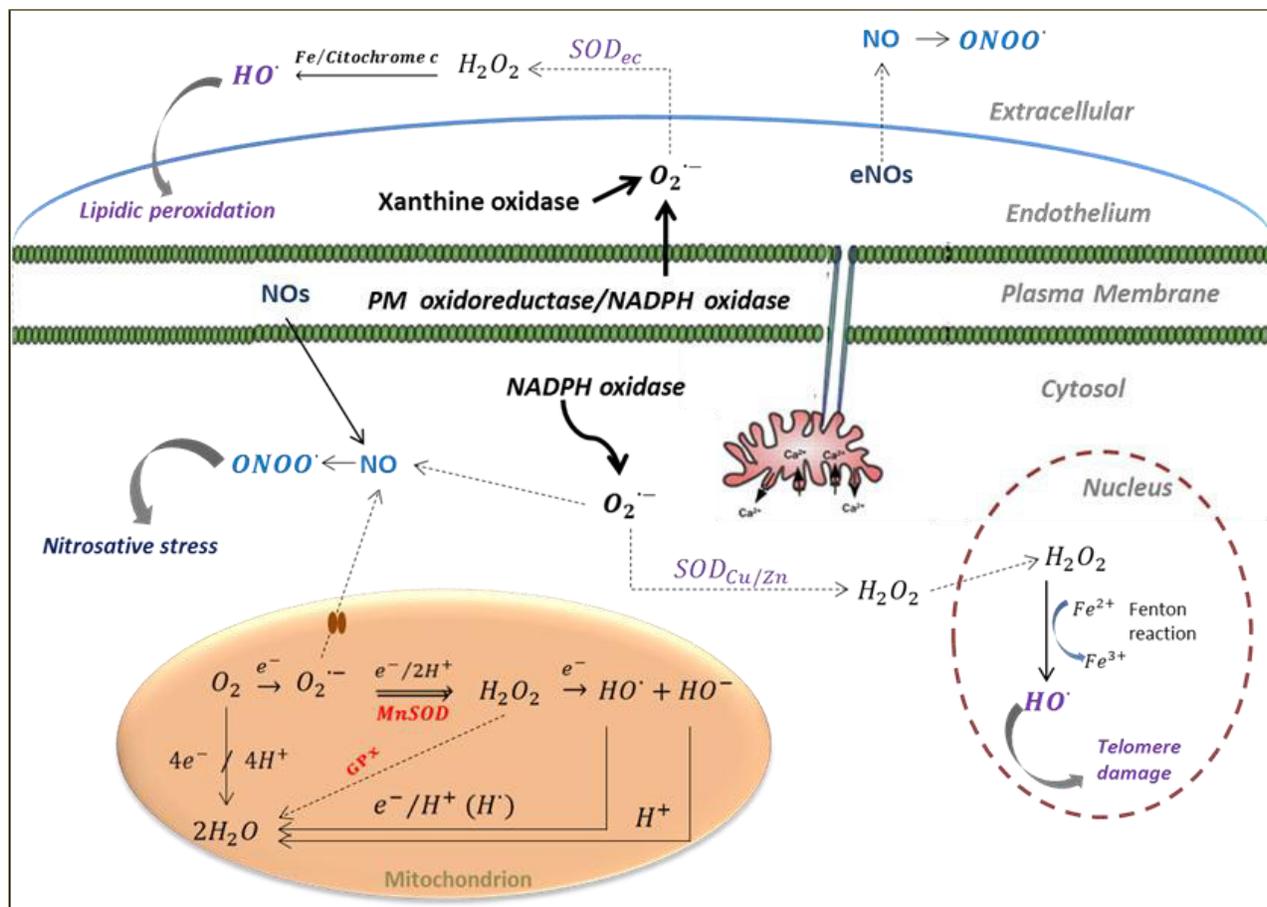


Figura 1.5. Mecanismo endógeno y exógeno de sobreproducción de $O_2^{\cdot -}$ y su acción como radical precursor de ROS primarias ³.

En la tabla 1.2 se muestra un resumen de ROS primarias y su reactividad química donde es posible apreciar la diferencia hasta de 11 órdenes de magnitud entre ellas. Dentro de la misma tabla se presentan las especies secundarias generadas a partir de la reacción de las primeras con biomoléculas como lípidos y proteínas.

Tabla 1.2. Principales ROS primarias y las especies oxidantes secundarias a partir de las primarias a la constante de velocidad indicada.

Oxidante primarios	Constante de velocidad (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	Oxidantes secundarios		
Radical hidroxil (HO [·])	7 x 10 ⁹	NRS	RSS	RCS
Oxígeno molecular singlete	2 x 10 ⁷	NO [·]	RSO ⁻	Acetaldehído
Ácido peroxinitroso (ONOOH)	2 x 10 ³	NO ₂ [·]	RSO ₂ ⁻	Acroleína
Anión-radical superóxido	<0.3	NO ₂ ⁻	RSO ₃ ⁻	Metilgloxal
Peroxil (HOO [·])	<5 x 10 ¹	NO ⁻	H ₂ S	4-hidroxi-nonenal
Peroxinitrito (ONOO ⁻)	2 x 10 ⁻¹	O ₂ NOO ⁻	RSSH	
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	2 x 10 ⁻²	ONOOCO ₂ ⁻		

3.2. Regulación redox. Control y eliminación de ROS.

La protección celular después de efectos dañinos propiciados por oxidantes reactivos implica algunos mecanismos de defensa entre los cuales se integra el proceso de prevención, intercepción y reparación.

Los organismos vivos tienen la capacidad de mantener los niveles adecuados de ROS por una parte controlando su producción celular, pero también por medio de la acción de mecanismos antioxidantes que operan para eliminar o minimizar los efectos producidos por las especies reactivas.

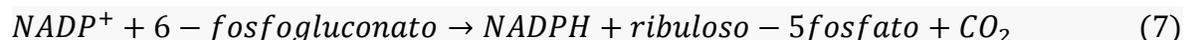
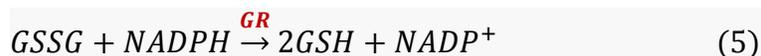
Estos sistemas antioxidantes son clasificados de manera general en dos grupos: i) antioxidantes de bajo peso molecular (por sus siglas en inglés, LMWA_Low Molecular Weight Antioxidant) y ii) antioxidantes de alto peso molecular (por sus siglas en inglés HMWA_High Molecular Weight Antioxidant).

3.2.1. Sistemas antioxidantes de alto peso molecular (HMWA).

El primer mecanismo antioxidante que actúa para contrarrestar el exceso de ROS son los antioxidantes de alto peso molecular (enzimas). La actividad enzimática para el control de ROS ocurre por una serie de reacciones que comienza por la interacción de la SOD³⁹ con el superóxido (ecuación 1) quien es dismutado para producir peróxido de hidrogeno y oxígeno. En seguida el H₂O₂ es dismutado por la Catalasa (ecuación 2) para producir agua y oxígeno; pero también suele ser reducido por la glutatión peroxidasa (por sus siglas en inglés GPx_Peroxidase Gluthation) la cual es oxidada formando enlaces disulfuro y a su vez generando como

CAPITULO I. FUNDAMENTO TEÓRICO
Fenómeno de estrés oxidativo

producto moléculas de agua (ecuación 3), estas enzimas también permiten la reducción de peroxilípidos (ecuación 4). Ciertamente la GPx requiere de GSH de tal manera que es necesario mantener una producción constante de éste, lo cual es posible con ayuda de la enzima glutatión reductasa (por sus siglas en inglés, GR_Reductase Gluthation) que en presencia de NADPH hace posible la reducción de GSSG (ecuación 5). A su vez la NADPH se mantiene por medio de la reducción de NADP⁺ gracias a reacciones catalizadas por algunas enzimas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-gluconato deshidrogenasa (ecuaciones 6 y 7) ¹.



La primera etapa de neutralización de ROS mediante el sistema antioxidante HMWA opera principalmente con superóxido (\dot{O}_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), pero no con el radical hidroxil ($HO\cdot$). Actualmente no hay un sistema enzimático conocido para eliminar el radical hidroxil formado lo cual está probablemente relacionado con su alta reactividad. De tal manera que para controlar el exceso de $HO\cdot$ es necesaria la intervención del mecanismo antioxidante LMWA para proteger al organismo de sus efectos dañinos¹⁶.

3.2.2. *Sistemas antioxidantes de bajo peso molecular (LMWA).*

El grupo de antioxidantes de bajo peso molecular contiene numerosos compuestos capaces de prevenir el daño oxidativo por su interacción directa e indirecta con ROS. Estos compuestos son conocidos como antioxidantes-capturadores o LMWA. El grupo de antioxidantes de bajo peso molecular incluye compuestos químicos tales como vitamina C (AA por sus siglas en inglés, Ascorbic Acid) y E (Tocofenol), carotenoides, antiocianinas, fenoles, ácido úrico (UA por sus siglas en inglés, Uracic Acid) y glutatión GSH^{5 40 41}.

Naturalmente las células pueden regular la secreción y concentración de algunos LMWA, entre estos: dipeptidos de histidina⁴², glutatión⁴³ y bilirrubina⁴⁴. Otros como el ácido úrico suele ser un producto de deshecho celular⁴⁵.

El proceso directo de captura posee algunas ventajas sobre los grupos de antioxidantes enzimáticos. Ya que los capturadores-antioxidantes son moléculas pequeñas, las cuales pueden penetrar la membrana plasmática y localizarse en la proximidad más cercana donde son producidos los ROS. Dicho proceso puede proceder únicamente si la concentración de los LMWA es suficientemente alta para competir contra los niveles altos de oxidantes⁴⁶.

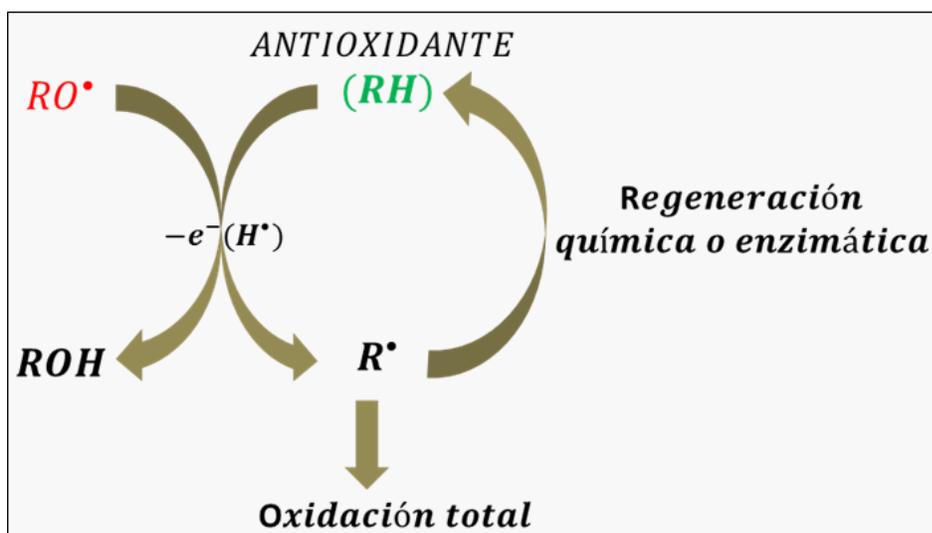


Figura 1.6. Representación esquemática del mecanismo de acción que llevan a cabo los antioxidantes para la captura de especies oxidantes⁴².

Los capturadores presentan un mecanismo general de actividad, en donde reaccionan directamente con el radical al cual le dona un electrón; esta reacción resulta en la conversión del LMWA en un radical. El radical antioxidante puede ser conducido hacia su oxidación total o ser regenerado a su forma reducida

antioxidante por mecanismos enzimáticos o por la acción de otro agente antioxidante LMWA (figura 1.6). Por ejemplo, el radical ascorbil puede ser reciclado a su forma reducida (ácido ascórbico) por el glutatión. Este último pasa a ser un radical el cual a su vez puede recibir también electrones desde otro donador como NADH ⁴².

3.2.3. Poder antioxidante del Glutatión.

Dentro de la gama de antioxidantes LMWA el glutatión (GSH) representa el antioxidante-capturador endógeno principal. GSH es sintetizado en el citosol celular a partir de los aminoácidos glutamato y cisteína con la intervención de la enzima γ -glutamil cistein sintasa ⁸. Posteriormente se incorpora la glicina que actúa como cofactor de la enzima Glutatión sintetasa para generar GSH ⁴⁷. Normalmente el GSH está presente en organismos vivos (humanos, animales) en concentraciones altas dentro del rango milimolar ⁴². La participación del GSH como sistema de defensa antioxidante es amplia, va desde su actividad como cofactor para la enzima Peroxidasa, en este caso sirve como un antioxidante indirecto donando los electrones necesarios para la descomposición de H_2O_2 , evitando de esta manera la producción de radicales $HO\cdot$.

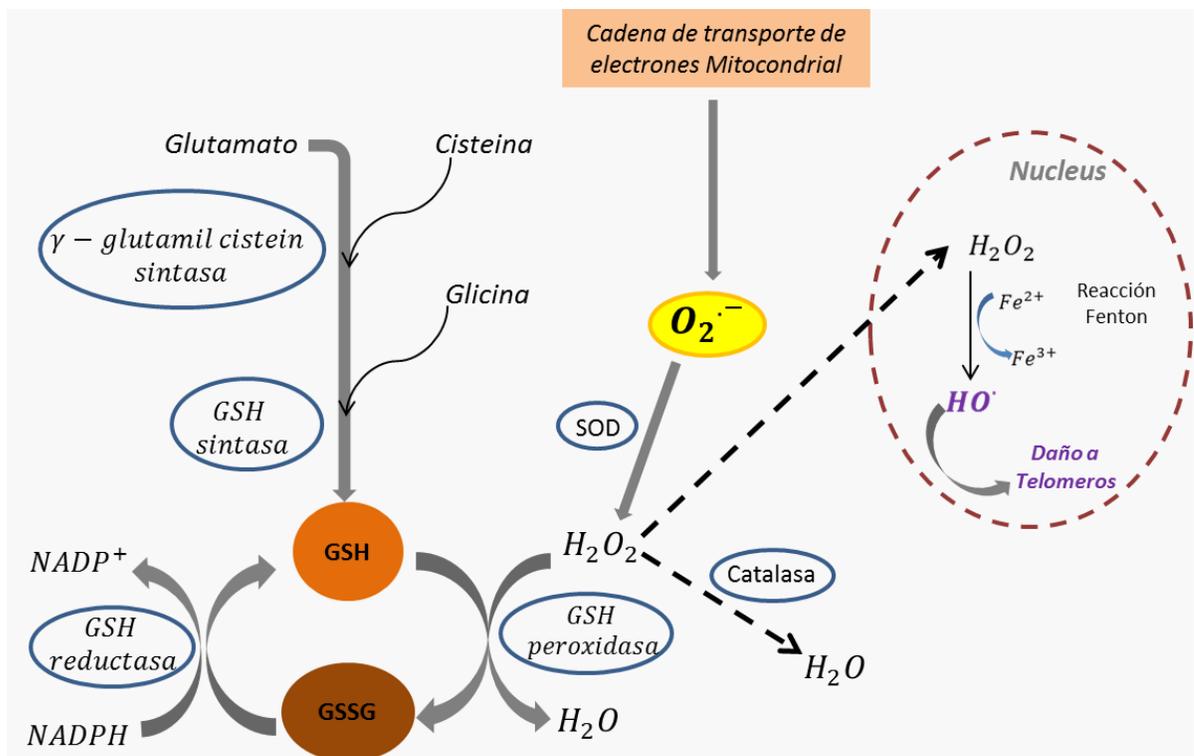


Figura 1.7. Esquema representativo para la síntesis de glutatión y sus actividad redox como sistema antioxidante en la detoxificación de H_2O_2 evitando daños celulares.

De esta reacción se obtiene por una parte glutatión disulfuro (GSSG) como producto de la oxidación de GSH y por la otra parte moléculas de agua como producto de la oxidación de H_2O_2 . Consecutivamente el GSSG es otra vez reducido a GSH por acción de la NADPH y la Glutatión reductasa (GR), preservándose de esta manera la adecuada homeostasis de la relación GSH/GSSG (Figura 1.7) ⁵.

El glutatión también está involucrado en muchas otras rutas bioquímicas y funciones celulares como la prevención de la oxidación de grupos -SH en proteínas ⁴⁸ y el transporte de iones metálicos evitando su participación en la reacción de Haber-Weiss o reacción de Fenton ²².

Además de sus funciones bioquímicas estos pueden capturar ROS directamente, interactuando con especies oxidantes como ROO^{\bullet} , RO^{\bullet} y O_2^{\bullet} . La reacción con ROS genera un radical glutatión (GS^{\bullet}) el cual puede ser regenerado a su forma reducida por mecanismos enzimáticos o químicos ⁴⁸.

4. ESTADO REDOX BIOLÓGICO.

Los procesos de generación y eliminación de ROS han sido mencionados y descritos brevemente. Al respecto es posible comprender que los organismos vivos poseen un sistema con capacidad de regular y mantener niveles bajos de ROS ². Sin embargo bajo ciertas circunstancias este balance redox puede ser perturbado lo cual provoca severos efectos entre los principales: la oxidación de macromoléculas (fosfolípidos, azúcares, proteínas, ARN y ADN).

El estado redox es asociado a las diferentes etapas de estrés oxidativo ^{16 38 40}. Estas diferentes etapas pueden ser descritas en función de la variación de los niveles de especies oxidantes (ROS) y reductoras (LMWA y HMWA). Bajo condiciones fisiológicas normales el organismo muestra la capacidad de mantener los niveles de ROS dentro de cierto rango definido (“nivel fisiológico normal”), lo cual indica que la actividad de los sistemas de producción y eliminación de dichas especies se encuentra en adecuado funcionamiento (Figura 1.8a).

Pero, cuando el organismo vivo padece de fisiopatologías o trastornos biológicos que generan estrés oxidativo, se observa un incremento significativo en los niveles de ROS, este evento suele llamarse “estrés oxidativo agudo” donde es posible observar el gran incremento en la producción de las especies reactivas dentro de un periodo de tiempo. En este caso los sistemas de defensa antioxidante son capaces de hacer frente adecuadamente para controlar la cantidad de ROS y mantener los niveles dentro del rango de una fisiología normal (Figura 1.8b). Probablemente esto es atribuido al incremento en la producción y expresión de sistemas

antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos ^{13, 49} y con ello finalmente evitar complicaciones severas. Entre los efectos registrados por este padecimiento se mencionan algunas lesiones en tejidos ^{50 51}.

En otros casos la capacidad celular requiere de más tiempo para neutralizar la sobreproducción de ROS. Este tipo de comportamiento se presenta generalmente cuando se padece de “estrés oxidativo crónico” (Figura 1.8c) en donde la homeostasis del organismo se ve alterada lo que implica aletargar un poco más su estabilidad fisiológica. El daño celular y tisular se muestra más grave debido a la exposición de los componentes celulares con las especies oxidantes durante un periodo mayor de tiempo lo que provoca la formación de tumores ^{12 52} y enfermedades cardiovasculares ⁵³ por mencionar algunos. Sin embargo en este tipo de eventos se refleja el mismo comportamiento de los sistemas antioxidantes que para el fenómeno agudo, es decir los niveles de producción y acción de antioxidantes muestran picos elevados en su concentración.

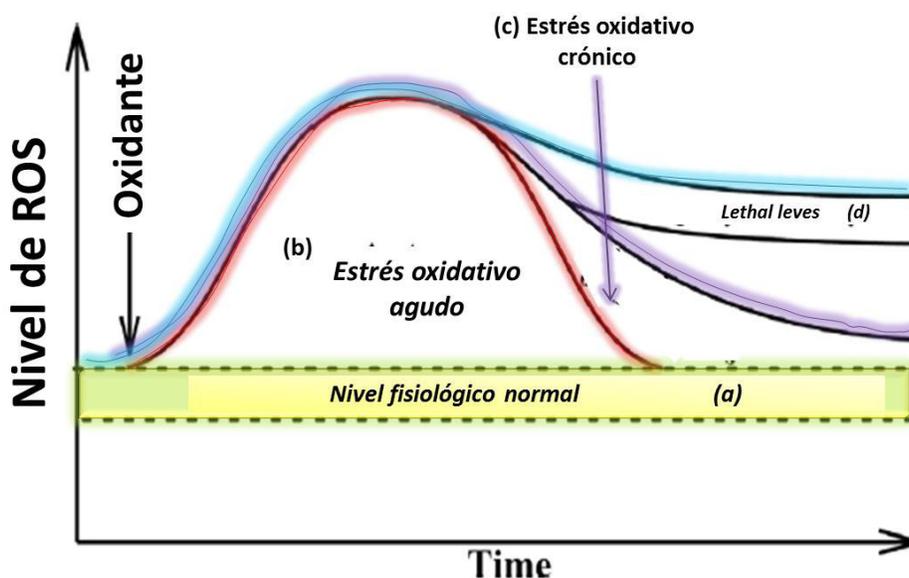


Figura 1.8. El esquema muestra el comportamiento dinámico para las diferentes etapas descritas para el estrés oxidativo. El estado redox se explica en función a la fluctuación de los niveles de ROS y antioxidantes para sistemas biológicos control y aquellos bajo estrés oxidativo en etapa aguda, crónica o letal ¹⁶.

Finalmente un escenario más se establece para describir el evento de “estrés oxidativo letal” (Figura 1.8d) en el cual la actividad celular antioxidante no responde eficientemente para lograr restablecer su homeostasis y en este caso no se logra neutralizar los altos niveles de ROS, de tal modo que se muestra una

constante sobreproducción de los mismos por tiempos prolongados y ello provoca daños tan severos como la muerte celular evidente ⁴⁵.

Los organismos vivos suelen hacer frente a cada uno de los eventos mencionados dependiendo de su capacidad de expresión antioxidante para contrarrestar los efectos oxidativos. Estos sistemas usualmente operan con respecto a la expresión de genes específicos que codifiquen para la síntesis de agentes antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos ^{13 16}.

Estas situaciones deben ser investigadas cuidadosamente a fin de entender las causas del estrés oxidativo y sus efectos fisiológicos en los organismos vivos. Esto es posible por medio de estudios químicos y biológicos para la determinación de ROS y/o los productos que estos generan y que pueden ser determinados como metabolitos posibles de detectar y cuantificar con técnicas analíticas adecuadas ⁵⁴. De igual manera es posible realizar el análisis de especies antioxidantes y sus metabolitos. Todo ello con la finalidad de asociar los valores de cada una de las especies participantes (ROS/ANTIOXIDANTES) con el fenómeno de estrés oxidativo en alguna de sus etapas.

5. DETERMINACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO.

La determinación del estrés oxidativo puede llevarse a cabo considerando el proceso metabólico del estado redox biológico. A partir de la producción de ROS y los sucesos o reacciones de peroxidación sobre biomoléculas para generar cierto tipo de metabolitos hidroxilados estables que sirven como marcadores biológicos ^{8 42}. En este caso las especies oxidantes tienen efecto sobre lípidos, proteínas, telómeros de ADN y LMWA.

El análisis de ROS se puede hacer de mediante la cuantificación directa de especies como $O_2^{\bullet-}$ o HOO^{\bullet} por ejemplo.

5.1. Daño oxidativo sobre bases de ADN.

Como se ha mencionado durante el padecimiento del estrés oxidativo los niveles de radical HO^{\bullet} aumentan, lo que desencadena toda una serie de reacciones oxidativas. Debido a la alta reactividad del radical hidroxil (tiempo de vida menor a 1ns en soluciones acuosas) este reacciona inmediatamente enlazándose a las bases de las cadenas de DNA ^{55 56}.

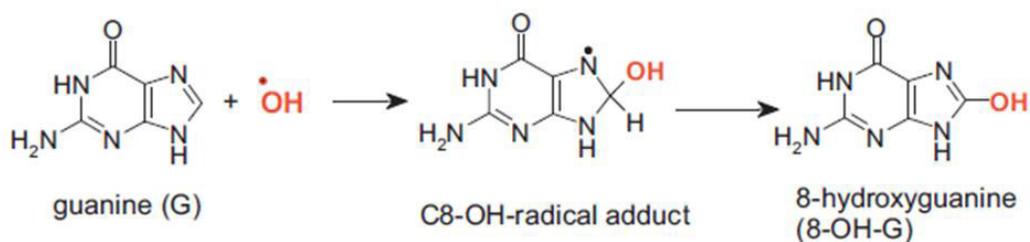


Figura 1.9. Reacción de la base guanina con un radical hidroxil.

Actualmente se han identificado más de 100 metabolitos de DNA oxidado, los cuales permiten hacer una determinación indirecta de ROS y su asociación con el daño oxidativo provocado. El metabolito más conocido y estudiado en muestras biológicas es la 8-hidroxi-guanina (8-OH-G) (Figura 1.9) ⁵⁷. El análisis de ADN extraído a partir de biopsias de colon, revelan un incremento significativo en los niveles de 8-OH-G, 2-hidroxi-adenina y 8-hidroxi-adenina ⁵⁸.

5.2. Peroxidación lipídica.

Otro indicador del padecimiento de estrés oxidativo es la peroxidación lipídica, la cual resulta en la formación de radicales peroxil ($\text{ROO}\cdot$). Este radical formado participa en una reacción de ciclación para generar endoperoxidos (precursor de malondialdehído) y dar como producto final malondialdehído (MDA) ⁸. Otro de los productos de la peroxidación lipídica es el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). A su vez el MDA reacciona con las bases de DNA (guanina, adenina y citosina) para formar aductos M_1G , M_1A , y M_1C respectivamente ⁵⁶. Niveles elevados de aducto M_1G en muestras de tejido se han reportado ⁵⁵.

En la figura 1.10 se muestra el mecanismo de reacción que refleja el proceso de peroxidación, el cual da inicio con la sobreproducción de superóxido para generar peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrogeno es un reactivo de Fenton capaz de producir radicales hidroxil. Este radical citotóxico actúa sobre las cadenas de ADN dañando esta molécula. Posteriormente reacciona sobre lípidos, de los cuales abstraen un hidrogeno para generar radicales de lípido ($\text{L}\cdot$) los cuales en presencia de oxígeno producen otro tipo de radicales llamados peroxilípidos ($\text{LO}\cdot$, $\text{LOO}\cdot$). Los peroxilípidos promueven otro mecanismo de reacción para producir metabolitos estables.

5.3. Alteración homeostática de sistemas antioxidantes.

La otra ruta de evaluación para el daño oxidativo es aquella que se lleva a cabo en función de las especies antioxidantes (enzimas y LMWA) y los cambios que sufren debido a su reacción con diversas

CAPITULO I. FUNDAMENTO TEÓRICO
Fenómeno de estrés oxidativo

especies ROS ^{1 16}. La actividad enzimática suele ser un indicador que refleja la inhibición y/o activación de la función redox en enzimas, tales como la SOD quien contribuye al control de ROS y GR quien permite la regeneración de otros antioxidantes importantes como GSH.

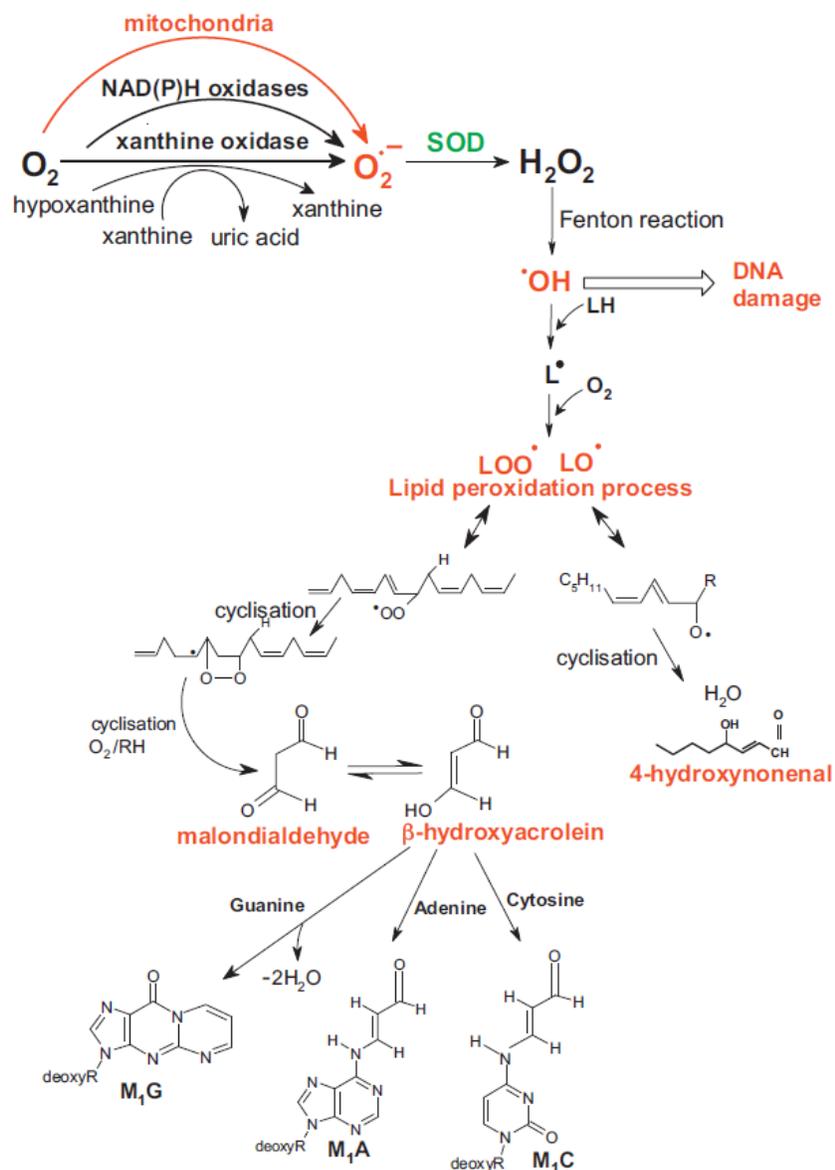


Figura 1.10. Producción de ROS y el proceso de peroxidación lipídica ⁵⁵.

La determinación del perfil redox en base a las especies LMWA puede ser asociado al daño oxidativo. Este tipo de estudios consiste en realizar el análisis particular de alguna de las cuplas redox presentes en una muestra biológica. Existe aproximadamente una docena de LMWA (p.e. vitamina E, ácido ascórbico y úrico,

GSH) y estos antioxidantes pueden ser cuantificados individualmente. Durante su proceso de acción como mecanismo de defensa los LMWA producen metabolitos que también suelen ser cuantificados de manera individual. Por ejemplo, el ataque de ROS sobre el ácido úrico conduce a la producción de alantoina ⁴² y sobre el ácido ascórbico causa la producción de ascorbato. La variación en los niveles de cada uno de los antioxidantes y sus productos de oxidación correspondiente determina el valor de su relación redox. La relación redox de las cuplas antioxidantes GSH/GSSG, NADH/NAD⁺ y ácido ascórbico/ascorbato es el termino más utilizado para indicar el padecimiento de estrés oxidativo ⁸.

5.4. Señalización redox y transducción genética de sistemas antioxidantes.

El incremento en los niveles de ROS genera al mismo tiempo aumento en la concentración de H_2O_2 el cual sirve como una molécula de señalización que provoca la estimulación de complejos enzimáticos Nrf2/Keap1. Estos sistemas de cofactores Nrf2/Keap1 a su vez se integran al ADN para inducir la transducción genética y síntesis de sistemas de defensa antioxidante ^{59 60}. De tal manera que la acción de estos proceso genético puede ser evaluado indirectamente por medio de la cuantificación de los sistemas antioxidantes antes, durante y después de la inducción de estrés oxidativo ⁶¹. De acuerdo con los avances genéticos y la biología molecular es posible monitorear otro tipo de marcadores que no son producto de la fase metabólica redox. Algunas de las investigaciones recientes consisten en realizar protocolos *on-off* principalmente de genes codificadores para el mecanismo de defensa celular antioxidante y por medio de estas secuencias hacer la comparación con los resultados obtenidos en aquellos organismos vivos que padecen de daño oxidativo ⁶².

En la figura 1.11 se muestra un esquema general de las rutas metabólicas que llevan a cabo tanto las especies oxidantes (ROS) como promotores de peroxidación de macromoléculas y los principales metabolitos producidos por estas reacciones. Con respecto a las especies antioxidantes, básicamente se presenta el bloque del sistema enzimático y los principales LMWAs quienes generan a su vez metabolitos como producto de su oxidación. Finalmente se muestra la participación de la señalización y transducción genética y su asociación con la actividad de los sistemas antioxidantes.

Diferentes metodologías de análisis químico se han implementado para realizar la detección y cuantificación de biomarcadores como MDA, proteínas carboxiladas, 8-OH-dG y GSH por mencionar algunos; con la finalidad de interpretar las diferentes rutas metabólicas del estrés oxidativo, tanto de oxidación

de macromoléculas como de alteraciones de los sistemas antioxidantes. En el **Anexo I** se mencionan las principales metodologías para la determinación de estrés oxidativo.

5.5. Biomarcadores de importancia clínica y toxicológica relacionados al estrés oxidativo.

Numerosos biomarcadores de estrés oxidativo son reconocidos⁶³ y la relevancia clínica, toxicológica y farmacológica de estos biomarcadores ha sido examinada⁶⁴. Entre los principales biomarcadores se incluyen las proteínas carboxiladas y AGEs; 3-nitrotirosina; lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL); otros productos de oxidación lipídica como 4-hidroxi-nonenal y malondialdehido (MDA); F2-isoprostanos⁶⁵ productos de oxidación de ADN/ARN como 8-oxiguanina, proteínas tioladas, y metionina sulfoxido; entre otros.

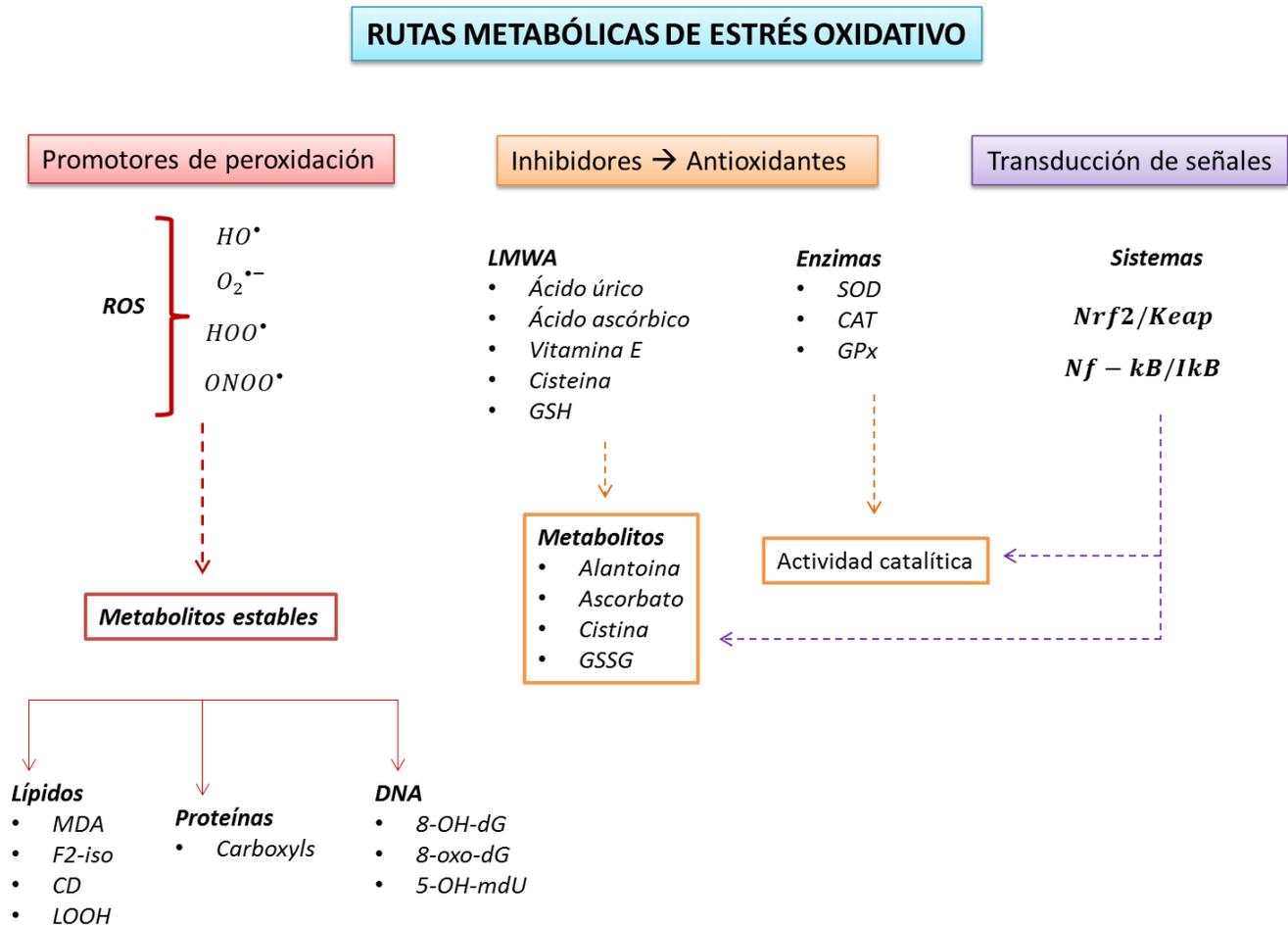


Figura 1.11. Esquema general de las rutas metabólicas correspondientes al estrés oxidativo: ROS; sistemas antioxidantes; y señalización-transducción genética y a su asociación con la producción de sistemas antioxidantes y sus metabolitos

CAPITULO I. FUNDAMENTO TEÓRICO
Fenómeno de estrés oxidativo

La figura 1.12 indica la asociación de diversos biomarcadores con algunas fisiopatologías que resultan debido al padecimiento de estrés oxidativo en humanos y animales ⁶⁴. Por ejemplo es posible considerar los niveles de telómeros oxidados que se han encontrado principalmente en padecimientos de cáncer ^{66 67}. Con respecto a la relación de cuplas redox como GSH/GSSG y cisteína/cistina han sido determinadas en plasma y sus niveles son asociados a un número mayor de enfermedades las cuales van desde la insuficiencia renal crónica, cáncer y enfermedades cardiovasculares ⁶⁸.

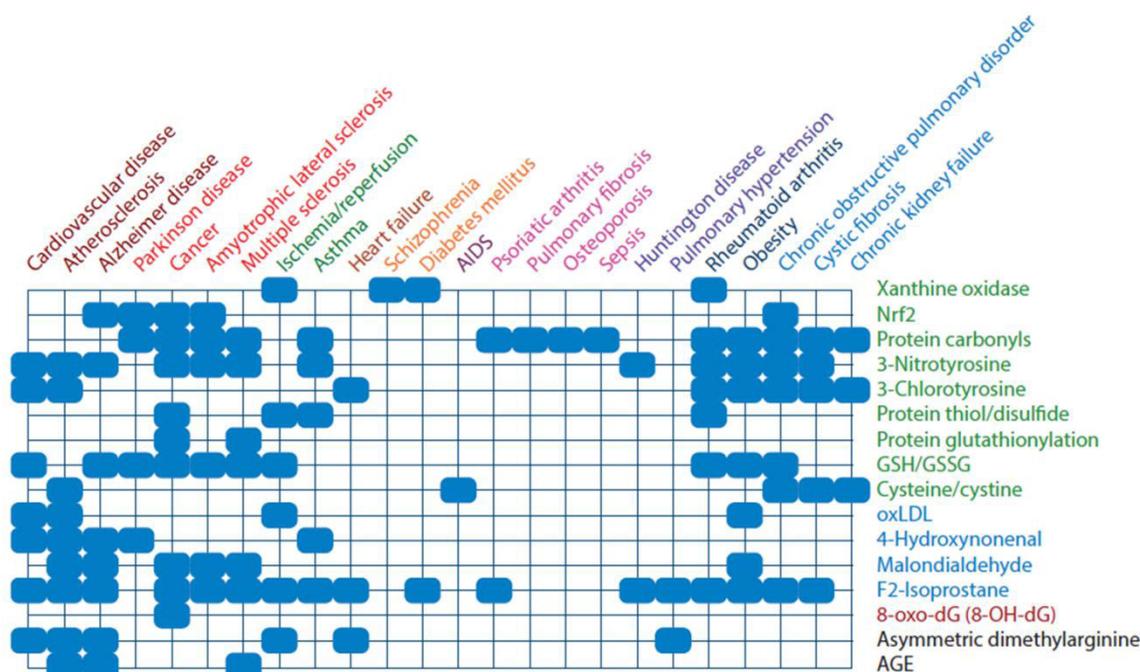


Figura 1.12. Biomarcadores de estrés oxidativo con importancia clínica y toxicológica. Metabolitos de proteínas (verde), lípidos (azul), y ADN (rojo) fueron analizados y asociados a ciertas enfermedades. AGE, productos finales de glicación avanzada; GSH glutatión; GSSG glutatión disulfuro; Nrf2, factor nuclear F2; oxLDL, lipoproteínas de baja densidad oxidadas. Datos obtenidos de la referencia ¹.

6. ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR METALES.

Estudios específicos han mostrado la actividad y participación de metales (Fe, Co, Cr, Cu, Pb) en reacciones cíclicas redox para producir radicales reactivos en sistemas biológicos ⁵⁵. La disrupción en la homeostasis de iones metálicos provoca estrés oxidativo, desencadenando daño al DNA, peroxidación lipídica, modificación de proteínas y otros efectos, todos estos síntomas asociados a numerosas enfermedades cardiovasculares, diabetes, arterosclerosis y cáncer.

6.1. Toxicidad con plomo.

La exposición ocupacional o medioambiental de metales pesados como el plomo significa un problema sumamente importante, ya que se reconoce la alta toxicidad que dicho metal induce. El plomo altera los procesos fisiológicos del organismo por inducción de estrés oxidativo y desplazamiento ocupacional (imitación) de cationes divalentes ⁶⁹. Los metales pesados como el plomo son considerados por presentar estados de oxidación biológicamente activos, de tal manera que son involucrados en ciclos redox y esto a su vez contribuye con la producción de especies reactivas que alteran la homeostasis de los organismos vivos ⁷⁰.

La toxicidad con plomo es diagnosticada generalmente evaluando los niveles del metal en sangre. En humanos los niveles de 10 µg/dl (equivalente a 0.48 µmol/L) o mayores son considerados tóxicos, y esto resulta en padecimientos de patologías neurológicas, pérdida del conocimiento e hipertensión entre otros ⁷¹.

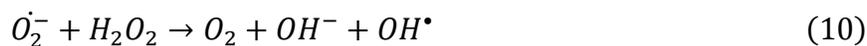
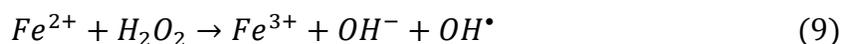
6.2. Plomo, toxicidad y estrés oxidativo.

De manera similar a otros metales de persistencia toxicológica como el cobalto, cobre, arsénico y cadmio, el plomo daña los componentes celulares debido a la inducción del metal para provocar estrés oxidativo. El efecto patogenético del plomo es multifactorial, este va desde la interrupción de la actividad enzimática, hasta la absorción de minerales esenciales para el organismo ⁷¹.

El daño oxidativo inducido por plomo comprende dos mecanismos ⁵⁵. El primero de ellos involucra la formación directa de ROS por medio de la reacción Haber-Weiss y Fenton, incluyendo superóxido, radical hidroxil e hidroxiperoxidos; y el segundo mecanismo consiste en el desequilibrio de los sistemas antioxidantes.

La reacción de Haber-Weiss y Fenton es el principal mecanismo en el que intervienen y participan de alguna manera los metales pesados. Al parecer en este caso los cationes metálicos de plomo realizan una acción semejante a la del hierro, el cual actúa como catalizador de la reacción Haber-Weiss y Fenton para generar radicales HO^{\bullet} ^{7 55}. Dicho mecanismo de reacción en organismos vivos depende de la reducción de cationes metálicos (M^{n+}) debido a su interacción con radicales $O_2^{\bullet-}$ (ecuación 8), consecutivamente el metal reducido interactúa con moléculas de H_2O_2 y es nuevamente oxidado (ecuación 9) lo cual genera como productos anión OH^- y radical OH^{\bullet} bien conocido como el agente radical citotóxico más potente ¹².

CAPITULO I. FUNDAMENTO TEÓRICO
Fenómeno de estrés oxidativo



Reacción neta

Ambos mecanismos actúan de manera simultánea; por una parte surge el incremento de ROS y de manera paralela por otra parte se estimula la producción y alteración en los niveles de antioxidantes LMWA y enzimas antioxidantes⁷². El ácido ascórbico, glutatión y cisteína actúan como agentes quelantes directamente sobre el plomo, este proceso lo desempeñan de manera dual, es decir intra y extracelularmente (Figura 1.13)⁷³. Los organismo expuestos al plomo presentan una alteración significativa en los niveles de estos antioxidantes LMWA con respecto a los grupos control.

Con respecto a la actividad enzimática, el grupo de enzimas que sufren alteraciones metabólicas por toxicidad con plomo, incluye a glutatión reductasa (GR), Catalasa, SOD y GPx, para las cuales se ha observado ciertas tendencias de niveles elevados o reprimidos en muestras sanguíneas⁵⁵.

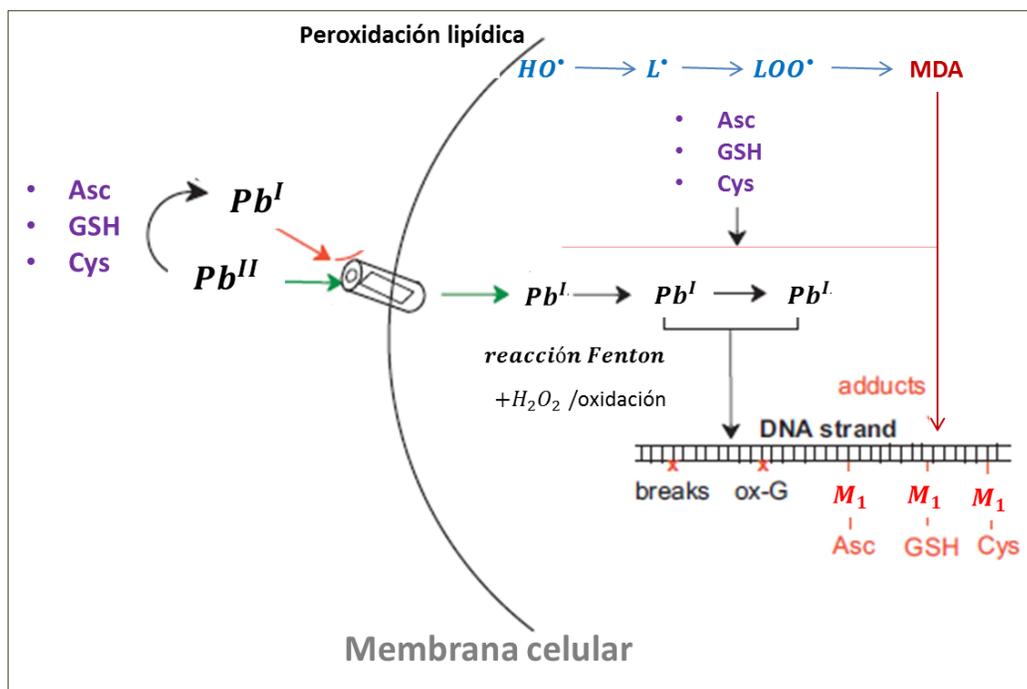


Figura 1.13. Mecanismo de acción para el consumo y daño al ADN por plomo⁵⁵.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D. P. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 86 **2017**, 86, 715-748.
- (2) Sies, H. *Redox Biology* **2017**, 11, 613-619.
- (3) Cadenas, E.; Sies, H. *Advances in Enzyme Regulation* **1984**, 23, 217-237.
- (4) Sies, H. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1986**, 25, 1058-1071.
- (5) Azzi, A.; Davies, K. J. A.; Kelly, F. *Febs Letters* **2004**, 558, 3-6.
- (6) Jones, D. P. *Antioxidants & Redox Signaling* **2006**, 8, 1865-1879.
- (7) Sies, H. *Redox Biology* **2015**, 4, 180-183.
- (8) Selye, H. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* **1998**, 10, 230-231.
- (9) Ursini, F.; Maiorino, M.; Forman, H. J. *Redox Biology* **2016**, 8, 205-215.
- (10) Sekhar, K. R.; Spitz, D. R.; Harris, S.; Nguyen, T. T.; Meredith, M. J.; Holt, J. T.; Guis, D.; Marnett, L. J.; Summar, M. L.; Freeman, M. L. *Free Radical Biology and Medicine* **2002**, 32, 650-662.
- (11) McEwen, B. S. *Special Issue: Advances in Meditation Research* **2016**, 1373, 56-64.
- (12) Leinonen, H. M.; Kansanen, E.; Polonen, P.; Heinaniemi, M.; Levonen, A. L. *Redox and Cancer, Pt A* **2014**, 122, 281-320.
- (13) Lushchak, V. I. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **2011**, 153, 175-190.
- (14) Ronchi, J. A.; Vercesi, A. E.; Castilho, R. F. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **2011**, 43, 709-715.
- (15) Zhuang, C. L.; Miao, Z. Y.; Sheng, C. Q.; Zhang, W. N. *Current Medicinal Chemistry* **2014**, 21, 1861-1870.
- (16) Kowaltowski, A. J.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E. *Febs Letters* **2001**, 495, 12-15.
- (17) Kwak, M. K.; Wakabayashi, N.; Itoh, K.; Motohashi, H.; Yamamoto, M.; Kensler, T. W. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 8135-8145.
- (18) Labunskyy, V. M.; Hatfield, D. L.; Gladyshev, V. N. *Physiological Reviews* **2014**, 94, 739-777.
- (19) Yan, L. J. *Redox Biology* **2014**, 2, 165-169.
- (20) Pickering, A. M.; Vojtovich, L.; Tower, J.; Davies, K. J. A. *Free Radical Biology and Medicine* **2013**, 55, 109-118.
- (21) Harman, D. *Age* **1980**, 3, 100-102.
- (22) Harman, D. *Age* **1980**, 3, 64-73.
- (23) Tartaglia, L. A.; Storz, G.; Ames, B. N. *Journal of Molecular Biology* **1989**, 210, 709-719.
- (24) Scandalios, J. G. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2005**, 38, 995-1014.
- (25) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1986**, 246, 501-514.
- (26) Ott, M.; Gogvadze, V.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. *Apoptosis* **2007**, 12, 913-922.
- (27) Skulachev, V. P. *Journal of Alzheimers Disease* **2012**, 28, 283-289.
- (28) Bleier, L.; Wittig, I.; Heide, H.; Steger, M.; Brandt, U.; Drose, S. *Free Radical Biology and Medicine* **2015**, 78, 1-10.
- (29) Murphy, M. P. *Biochemical Journal* **2009**, 417, 1-13.
- (30) Goncalves, R. L. S.; Quinlan, C. L.; Perevoshchikova, I. V.; Hey-Mogensen, M.; Brand, M. D. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, 290, 209-227.
- (31) Mailloux, R. J. *Redox Biology* **2015**, 4, 381-398.
- (32) Griguer, C. E.; Oliva, C. R.; Kelley, E. E.; Giles, G. I.; Lancaster, J. R.; Gillespie, G. Y. *Cancer Research* **2006**, 66, 2257-2263.
- (33) Li, J. F.; Huang, F. L.; Huang, K. P. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 3098-3105.
- (34) Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A.; Freeman, B. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1990**, 87, 1620-1624.

- (35) Ferrari, C. K. B.; Souto, P. C. S.; Franca, E. L.; Honorio-Franca, A. C. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* **2011**, 59, 441-448.
- (36) Radi, R. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, 288, 26464-26472.
- (37) Finkel, T.; Holbrook, N. J. *Nature* **2000**, 408, 239-247.
- (38) Poole, L. B. *Free Radical Biology and Medicine* **2015**, 80, 148-157.
- (39) McCord, J. M. *Current Contents/Life Sciences* **1981**, 17-17.
- (40) Lushchak, O. V.; Nykorak, N. Z.; Ohdate, T.; Inoue, Y.; Lushchak, V. I. *Biochemistry-Moscow* **2009**, 74, 445-451.
- (41) Uys, J. D.; Mulholland, P. J.; Townsend, D. M. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2014**, 68, 799-807.
- (42) Nyska, A.; Kohen, R. *Toxicologic Pathology* **2002**, 30, 620-650.
- (43) Halliwell, B.; Kaur, H. *Free Radical Research* **1997**, 27, 239-+.
- (44) Stocker, R.; Yamamoto, Y.; McDonagh, A. F.; Glazer, A. N.; Ames, B. N. *Science* **1987**, 235, 1043-1046.
- (45) Ames, B. N.; Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, 90, 7915-7922.
- (46) Kohen, R.; Gati, I. *Toxicology* **2000**, 148, 149-157.
- (47) Halliwell, B. *Nutrition Reviews* **1997**, 55, S44-S49.
- (48) Barhoumi, R.; Bowen, J. A.; Stein, L. S.; Echols, J.; Burghardt, R. C. *Cytometry* **1993**, 14, 747-756.
- (49) Demple, B. *Annual Review of Genetics* **1991**, 25, 315-337.
- (50) Lushchak, V. I.; Bagnyukova, T. V.; Husak, V. V.; Luzhna, L. I.; Lushchak, O. V.; Storey, K. B. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2005**, 37, 1670-1680.
- (51) Zara, S.; De Colli, M.; Rapino, M.; Di Valerio, V.; Marconi, G. D.; Cataldi, A.; Macchi, V.; De Caro, R.; Porzionato, A. *Histochemistry and Cell Biology* **2013**, 140, 575-583.
- (52) Townsend, D. M.; Lushchak, V. I.; Cooper, A. J. L. *Redox and Cancer, Pt A* **2014**, 122, 177-198.
- (53) Mei, Y.; Thompson, M. D.; Cohen, R. A.; Tong, X. Y. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **2015**, 1852, 243-251.
- (54) Giussani, D. A.; Niu, Y. G.; Herrera, E. A.; Richter, H. G.; Camm, E. J.; Thakor, A. S.; Kane, A. D.; Hansell, J. A.; Brain, K. L.; Skeffington, K. L.; Itani, N.; Wooding, F. B. P.; Cross, C. M.; Allison, B. J. *Advances in Fetal and Neonatal Physiology* **2014**, 814, 77-87.
- (55) Jomova, K.; Valko, M. *Toxicology* **2011**, 283, 65-87.
- (56) Marnett, L. J. *Carcinogenesis* **2000**, 21, 361-370.
- (57) Jaruga, P.; Coskun, E.; Kimbrough, K.; Jacob, A.; Johnson, W. E.; Dizdaroglu, M. *Environmental Toxicology* **2017**, 32, 2144-2153.
- (58) Skrzydlewska, E.; Sulkowski, S.; Koda, M.; Zalewski, B.; Kanczuga-Koda, L.; Sulkowska, M. *World Journal of Gastroenterology* **2005**, 11, 403-406.
- (59) Halvey, P. J.; Hansen, J. M.; Johnson, J. M.; Go, Y. M.; Samali, A.; Jones, D. P. *Antioxidants & Redox Signaling* **2007**, 9, 807-816.
- (60) Zambrano, S.; De Toma, I.; Piffer, A.; Bianchi, M. E.; Agresti, A. *Elife* **2016**, 5.
- (61) Klotz, L. O.; Sanchez-Ramos, C.; Prieto-Arroyo, I.; Urbanek, P.; Steinbrenner, H.; Monsalve, M. *Redox Biology* **2015**, 6, 51-72.
- (62) Flohe, L. *Free Radical Research* **2016**, 50, 126-142.
- (63) Griffiths, H. R.; Moller, L.; Bartosz, G.; Bast, A.; Bertoni-Freddari, C.; Collins, A.; Cooke, M.; Coolen, S.; Haenen, G.; Hoberg, A. M.; Loft, S.; Lunec, J.; Olinski, R.; Parry, J.; Pompella, A.; Poulsen, H.; Verhagen, H.; Astley, S. B. *Molecular Aspects of Medicine* **2002**, 23, 101-208.
- (64) Frijhoff, J.; Winyard, P. G.; Zarkovic, N.; Davies, S. S.; Stocker, R.; Cheng, D.; Knight, A. R.; Taylor, E. L.; Oettrich, J.; Ruskovska, T.; Gasparovic, A. C.; Cuadrado, A.; Weber, D.; Poulsen, H. E.; Grune, T.; Schmidt, H.; Ghezzi, P. *Antioxidants & Redox Signaling* **2015**, 23, 1144-1170.

CAPITULO I. FUNDAMENTO TEÓRICO
Fenómeno de estrés oxidativo

- (65) van't Erve, T. J.; Lih, F. B.; Jelsema, C.; Deterding, L. J.; Eling, T. E.; Mason, R. P.; Kadiiska, M. B. *Free Radical Biology and Medicine* **2016**, *95*, 65-73.
- (66) von Zglinicki, T. *Trends in Biochemical Sciences* **2002**, *27*, 339-344.
- (67) Collins, A. R. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2014**, *1840*, 794-800.
- (68) Hoang, S.; Girerd, X.; Giral, P. *Circulation* **2016**, *133*, E666-E666.
- (69) Reczek, C. R.; Chandel, N. S. *Current Opinion in Cell Biology* **2015**, *33*, 8-13.
- (70) Forman, H. J.; Maiorino, M.; Ursini, F. *Biochemistry* **2010**, *49*, 835-842.
- (71) Patrick, L. *Alternative Medicine Review* **2006**, *11*, 2-22.
- (72) Gurer, H.; Ercal, N. *Free Radical Biology and Medicine* **2000**, *29*, 927-945.
- (73) Hunaiti, A. A.; Soud, M. *Science of the Total Environment* **2000**, *248*, 45-50.

JUSTIFICACIÓN.

Debido a la complejidad del tema que engloba el fenómeno del estrés oxidativo, numerosos estudios se han realizado a lo largo de casi setenta años. Actualmente se encuentran herramientas importantes como la genómica, la proteómica y metabolómica que permiten comprender más a detalle los procesos del estrés oxidativo a nivel celular. Hoy en día ya se sabe bastante sobre el on/off de aquellos genes involucrados en el daño de oxidación celular y su asociación con ciertas enfermedades crónico degenerativa. Los estudios genéticos y de biología molecular van muy de la mano con la proteómica, ya que por medio de esta es posible evidenciar la expresión o inhibición de los genes para producir aquellas proteínas esenciales involucradas antes, durante y después del proceso de estrés oxidativo. La metabolómica es otra de las herramientas indispensables, la cual es de gran utilidad cuando se requiere de efectuar el análisis de metabolitos y biomarcadores asociados al estrés oxidativo. Dentro de este contexto existen diversos biomarcadores, entre los cuales se encuentran el sistema antioxidante conformado por el glutatión reducido (GSH) y el glutatión oxidado (GSSG), para ambas especies del glutatión se han implementado algunas metodologías de análisis químico entre las que destacan el uso de cromatografía de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC/MS-MS) como principal técnica vanguardista para el análisis, pero esta suele ser bastante compleja, costosa y poco accesible. Otro de los biomarcadores es el anión-radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el cual es una especie oxidante difícil de analizar debido a su característica vida media muy corta, entre otras. Para el análisis de $O_2^{\bullet-}$ se han presentado diversas metodologías entre las cuales se emplea la espectrometría de resonancia de spin electron (ERS), siendo ésta la más apropiada según el caso. Sin embargo esta también suele ser una técnica bastante robusta, costosa y poco accesible.

Mencionado lo anterior y dentro del área de la metabolómica, existe otras alternativas de análisis que pueden ser empleadas satisfactoriamente para la determinación de especies como GSH, GSSG y $O_2^{\bullet-}$. Gracias a las propiedades electroquímicas de ambas especies oxidantes y antioxidantes es posible su detección y cuantificación por medio de técnicas electroanalíticas. La ventaja de estos métodos de electroanálisis es que permiten el análisis sencillo, accesible y poco costoso en comparación con otros métodos analíticos.

HIPOTESIS

La intoxicación de modelos biológicos (ratas Wistar y líneas celulares) con Plomo desencadena el fenómeno de estrés oxidativo a nivel celular. Diversos biomarcadores asociados al estrés oxidativo como el Glutati6n en su estado reducido (GSH) y oxidado (GSSG) pueden ser detectados y cuantificados con t6cnicas electroqu6micas, esto es posible con ayuda de sensores espec6ficos y selectivos para estas especies antioxidantes. El an6n-radical super6xido ($O_2^{\bullet-}$) es otra de las especies asociadas con el estr6s oxidativo y que de igual manera puede ser monitoreado con t6cnicas electroqu6micas a base de biosensores altamente selectivos y sensitivos. La optimizaci6n adecuada del m6todo electroanal6tico permitir6 realizar las mediciones de ambas especies oxidantes y atioxidanes en fluidos biol6gicos.

OBJETIVOS

Objetivo general

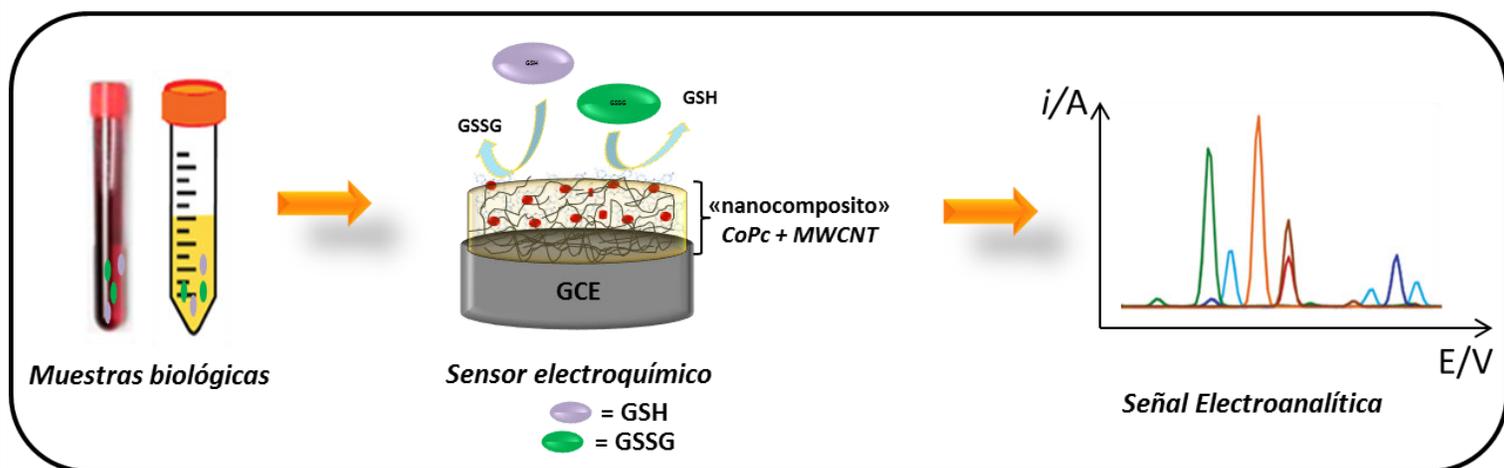
Desarrollo y aplicaci6n de metodolog6as electroanal6ticas sencillas para la detecci6n y cuantificaci6n de especies antioxidantes (GSH y GSSG) y oxidantes ($O_2^{\bullet-}$) en fluidos biol6gicos de organismos vivos antes y despu6s de su intoxicados con plomo.

Objetivos particulares

- Dise1o, construcci6n y caracterizaci6n f6sica y electroqu6mica de un sensor electroqu6mico a base de Ftalocianinas de cobalto y Nanotubos de carbono para la detecci6n y cuantificaci6n de GSH y GSSG.
 - Calibraci6n del sensor electroqu6mico en soluciones sint6ticas de GSH y GSSG a pH fisiol6gico.
 - Estudio electroqu6mico frente a posibles especies interferentes.
 - Intoxicaci6n de ratas Wistar con acetato de plomo para inducir estr6s oxidativo en estos organismos.
 - Aplicaci6n del sensor electroqu6mico para la determinaci6n de GSH y GSSG en plasma y orina de ratas Wistar antes y despu6s de su intoxicaci6n con plomo.
- Implementaci6n de un m6todo espectrofotom6trico alternativo para la validaci6n del m6todo electroanal6tico propuesto para el an6lisis de GSH y GSSG.
- Dise1o, construcci6n y caracterizaci6n f6sica y electroqu6mica de un biosensor electroqu6mico a base de Super6xido dismutasa y PEDOT para la detecci6n de $O_2^{\bullet-}$.
 - Calibraci6n del biosensor electroqu6mico en soluciones sint6ticas de $O_2^{\bullet-}$ a pH fisiol6gico.
 - Estudio electroqu6mico frente a posibles especies interferentes.
 - Optimizaci6n de los par6metros anal6ticos para la determinaci6n de $O_2^{\bullet-}$ *in vitro* e *in vivo*.
- Implementaci6n de un m6todo espectrofotom6trico alternativo para la validaci6n del m6todo electroanal6tico propuesto para el an6lisis de $O_2^{\bullet-}$.

CAPITULO II

Especiación electroquímica simultánea de glutatión reducido y oxidado. Perfil redox de estrés oxidativo en fluidos biológicos con un electrodo de carbono modificado.



1. INTRODUCCIÓN Y ESTADO DEL ARTE

1.1. Glutatión, funciones biológicas y metabolismo.

El mecanismo de defensa celular antioxidante está gobernado significativamente in vivo por el glutatión reducido (GSH), el cual continuamente es oxidado, generando glutatión disulfuro (GS-SG). Por lo tanto, en células sanas más del 90% del glutatión se encuentra en su forma reducida ^{1 2}. Se han reportado evidencias que indican que la exposición al plomo causa ciertas patologías entre las que se incluyen el daño renal y disfunciones neurológicas por mencionar algunas, en humanos y en ratas Wistar ³. Existe una asociación entre el grado de disfunción del tejido y la bioacumulación intracelular de Pb, esto genera el proceso de toxicidad y desencadena la manifestación del estrés oxidativo ROS y con ello la estimulación de la actividad de antioxidantes como el GSH. De tal manera que las especies de glutatión GSH y GSSG (Figura 2.1) han sido establecidas como biomarcadores de estrés oxidativo ^{4,1}. La concentración de Glutatión en el organismo está asociada con condiciones severas ⁵ y puede ser relevante en diagnósticos clínicos.

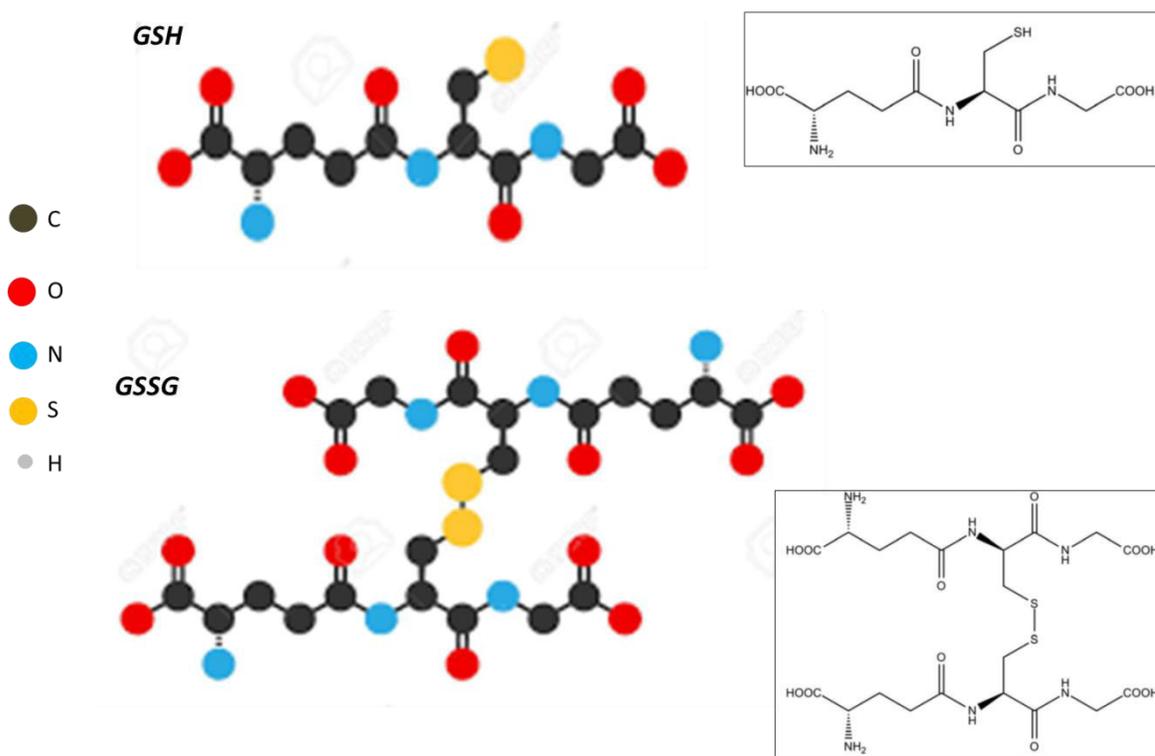


Figura 2.1. Estructura del glutatión reducido y glutatión oxidado ⁶.

La relación GSH/GSSG no se encuentra en equilibrio bajo estrés oxidativo⁷, por lo tanto, la detección de GSH y GSSG es crítica para entender las funciones fisiológicas y el desarrollo de un diagnóstico clínico^{4 8}. A lo largo de varios años se han desarrollado numerosos métodos, enzimáticos, espectrofotométricos, fluorométricos y electroquímicos para la cuantificación de GSH, GSSG y GSH total (tGSH) en muestras biológicas^{9, 10}.

1.2. Métodos analíticos para la determinación de glutatión y glutatión disulfuro.

El cambio en la concentración de GSH, GSSG y su relación molar (conocido como homeostasis o estado redox) es un importante indicador de la funcionalidad celular y su asociación con el estrés oxidativo. La variación en la concentración de GSH, GSSG y su relación dependerá del fluido biológico analizado y el método de análisis empleado^{6 11}. Dentro de este contexto y como ejemplo Bola Sadashiva y colaboradores¹² realizan el análisis de la concentración de GSH en suero y su implicación en cáncer cervical, cuyos resultados reportan, para la muestra control aproximadamente 196 μM de GSH y para la muestra cancerosa 152 μM de GSH. Por otra parte, Tsai y colaboradores¹³ realizaron el estudio de la variación en la concentración de GSH, GSSG y su relación en pacientes con cáncer de pecho, al respecto reportan un decremento en la relación GSH/GSSG en muestras de sangre, en tejido canceroso el nivel de GSH incrementa hasta 8 unidades y el GSSG también incrementa hasta en 3 unidades.

A continuación se hace mención brevemente de las diversas y principales metodologías de análisis empleadas para la determinación de GSH y GSSG en muestras biológicas.

1.2.1. Métodos espectrofotométricos.

Desde 1969 Tietze publicó su clásico método espectrofotométrico, donde hace referencia al uso de la enzima GR como recicladora de GSH. Este ensayo espectrofotométrico se realiza en presencia de DNTB y GR, con la incorporación sucesiva de NADPH a la mezcla de la reacción, la cual da inicio a la reducción progresiva de GSSG a GSH, el cual en turno reacciona con DTNB y este a su vez es reducido para generar un producto colorido conocido como 5-tionitrobenzoato. El viraje de color es monitoreado a 412 nm y el valor de la absorbancia registrada es proporcional a la concentración de glutatión total (tGSH). El GSSG es determinado vía el bloqueo de GSH con NEM en una muestra separada¹¹.

Este es un método todavía aplicado y conocido comercialmente como el reactivo de Ellman's (ácido 5,5'-Dithio-bis-2 nitrobenzoico) (DTNB), principal reactivo utilizado dentro de los Kits empleados para la determinación de tGSH en muestras biológicas ¹⁴.

1.2.2. *Métodos espectrofluorométricos.*

Los métodos espectrofluorométricos han sido desarrollados para el análisis de GSH, GSSG y compuestos relacionados en diferentes matrices. Wang y colaboradores midieron GSH en suero de sangre humana con un sistema fluorescente que consiste en el uso de ácido Zn(II)-8-hidroxiquinolin sulfónico (HQS) ¹¹. El uso de orto-ftalaldehido (OPA) junto con nanoparticulas 1-pirenometilamina permite el incremento en las señales de fluorescencia, lo cual impacta en la obtención de mejores LoD que con el uso únicamente de OPA ¹⁵. Novedosos estudios hacen uso de pruebas fluorescentes a base de rodamina ¹⁶, ya que muchas de estas reaccionan con todos los tioles funcionales en la célula. Los difluoroboradiazia-s-indaceno BODIPY son otro tipo de fluoroforos ampliamente usados ¹⁷.

1.2.3. *Métodos espectroscópicos de resonancia magnético nuclear.*

La RMN es una técnica que permite la determinación prácticamente solo de GSH. Trabesinger y colaboradores implementaron en 1999 un método pionero para la detección de GSH en cerebro humano. Ellos utilizaron RMN H¹ en combinación con espectroscopía de punto resuelto (por sus siglas en inglés, PRESS_Piont-Resolved Spectroscopy) y estimaron la concentración de GSH (2-5 nM) en el lóbulo frontal de 12 voluntarios sanos ¹⁸. En 2006 se realizó un estudio para la evaluación de GSH y GSSG *in vitro* e *in vivo* utilizando RMN H¹-PRESS. En este caso se preparó una mezcla equimolar de GSH y GSSG en PBS, en concentraciones similares a las que existen *in vivo*. Los resultados muestran una señal positiva para GSH, mientras que las señales para GSSG son inciertas pues se muestra un multiplete de señales invertidas. Las concentraciones de GSH en el lóbulo parietal de voluntarios sanos fue de 1.9 ± 0.37 mM, y no se detectó señal para GSSG ¹¹.

1.2.4. *Métodos con un paso de separación.*

1.2.4.1. *Métodos de cromatografía líquida de alta resolución.*

Las metodologías de análisis más empleadas para la determinación de GSH, GSSG y compuestos relacionados hacen uso indispensable de HPLC¹⁹. Los sistemas de detección utilizados pueden ser de

absorbancia UV, flouorescencia (FD), electroquímicos (ECD) y espectrometría de masas (MS, MS/MS) entre los más comunes.

Este tipo de métodos requieren indispensablemente de la derivatización de las especies a analizar. La derivatización de GSH y GSSG se realiza por medio de la integración de agentes de derivatización apropiados, según sea el detector a utilizar.

1.2.4.2. Introducción de un cromóforo.

El FDNB es un agente de derivatización para grupos aminos, este reactivo tiene la ventaja de permitir la evaluación simultánea de GSH y GSSG en una sola corrida. Generalmente el FDNB es empleado en ensayos con HPLC-UV para la detección de GSH y GSSG. En este tipo de estudio también ha sido empleado NEM para enmascarar GSH y prevenir su autooxidación²⁰, enseguida el exceso de NEM debe ser removido para evitar su reacción con grupos amino y para evitar al mismo tiempo su acción interferente durante la derivatización de GSSG con FDNB, a continuación se realiza la detección simultánea y sensitiva de ambas especies de glutatión con detector UV²¹.

Rossi y colaboradores reportaron niveles similares de GSH y GSSG en comparación con los reportados con el método de Tietze (1161 ± 151 y 3.51 ± 2.09 μM , respectivamente) como método de validación; pero en el método de Rossi se emplea HPLC-UV, utilizando derivatización con FDNB y enmascaramiento de tioles con NEM (1199 ± 201 y 3.99 ± 2.04 μM para GSH y GSSG, respectivamente)²¹. La principal desventaja del ensayo original fue la insatisfactoria especificidad y selectividad, y en el ensayo que se realiza con la intención de aislar el GSSG, es completamente necesaria la eliminación del exceso de NEM para evitar por una parte la inhibición de GR y su reacción con grupos amino²², lo cual provoca una considerable disminución en la funcionalidad de la técnica. Más recientemente los ensayos basados en el mismo principio hacen uso de sulfonato-1-metil-2-vinilpiridinio trifluorometano (M2VP) sulfonato-1-metil-4-vinilpiridinio trifluorometano (M4VP) como agentes enmascarantes que ofrecen grandes ventajas sobre NEM, ya que ellos no inhiben GR y no reaccionan con grupos amino. Evitando de esta manera el paso de la extracción, disminuyendo al mismo tiempo el tiempo de preparación de la muestra, lo cual permite realizar ensayos sobre platos de microtitulación para la detección de GSSG en sangre, e incluso un sistema de análisis de inyección secuencial automatizado optimizado para la determinación de GSSG en tejido de hígado de rata¹⁴.

1.2.4.3. Introducción de un fluoroforo.

El detector de fluorescencia permite obtener límites de detección mucho más bajos que los registrados con absorbancia UV. Los reactivos más empleados forman aductos con GSH con suficiente campo de fluorescencia para permitir las mediciones de GSH en rangos de concentración hasta picomolar. Sin embargo, el reactivo ideal no debe de ser fluorescente en su forma noreactiva y reaccionar rápida y específicamente con GSH y otros tioles para formar productos estables. Los fluoroforos como OPA¹⁵ y BODIPY¹⁷ reaccionan con los grupos tiol para generar productos en su forma estable. Los fluoroforos que reaccionan con el grupo tiol es el más selectivo y además previene la formación de artefactos debido a la autooxidación de GSH durante la preparación de la muestra y el análisis, pero no hace posible la detección de GSSG. Reactivos etiquetadores de grupos aminos permiten la determinación fluorométrica simultánea de GSH y GSSG, incluso si es menos selectivo²³.

1.2.4.4. Derivatización por espectrofotometría de masas.

La espectrometría de masas con acoplamiento de columnas para la elusión del analito (HPLC-MS/MS) es utilizada para la detección de GSH y GSSG²⁴. Novedosas técnicas se han implementado para incrementar la separación y medición de tioles con MS, entre las que se incluyen la adsorción de péptidos cargados positivamente sobre la superficie de nanopartículas cargadas negativamente, el procedimiento continua con un paso de microextracción micelar reversa para la determinación de péptidos que contienen grupos tiol²⁵. En este caso las micelas fueron formadas por el surfactante catiónico cloruro de metiltrioctilamonio.

En la tabla 2.1 se presenta el resumen de algunas publicaciones que hacen uso de HPLC con acoplamiento de diferentes tipos de detectores para la determinación de GSH y GSSG en muestras biológicas.

1.2.4.5. Métodos de electroforesis capilar.

Aunque menos común que HPLC, los métodos de electroforesis capilar (por sus siglas en inglés, CE_Capillary Electrophoresis) es la segunda técnica empleada para la separación y análisis de analitos. Entre las principales ventajas de CE se incluye la corta duración de análisis, pequeñas cantidades de muestra, eficiente separación, fácil automatización y amplia aplicabilidad^{26 27}.

Para la separación y determinación de GSH, GSSG y compuestos similares, se ha hecho uso de la electroforesis capilar acoplada a diferentes detectores, entre los que se mencionan, absorbancia UV, FD,

fluorescencia inducida por laser (por sus siglas en inglés, LIF_Laser Induced Fluorescence), ECD y MS ²⁸. A continuación en la tabla 2.2 se presenta un resumen de algunos trabajos publicados para la determinación de GSH y GSSG en muestras biológicas, utilizando CE.

Tabla 2.1. Resumen de algunos métodos HPLC para la determinación de GSH y GSSG.

Detector	Matriz	Analitos	Etiqueta	LoD		Ref.
				GSH	GSSG	
UV 355 nm	Sangre humana	GSH,GSSG	FDNB	0.5 µM	0.5 µM	21
FD Ex/Em: 350/420 nm	Sangre humana, plasma y hepatocitos de rata	GSH, GSSG	OPA, NEM	14 fmol	5.6 fmol	29
FD Ex/Em: 330/376 nm	Hígado, pulmón, cerebro de rata	GSSG	NPM	N.R.	2.5 nM	30
FD (para GSH) Ex/Em: 390/478 nm ECD (para GSSG)	Plasma humana	GSH, GSSG	MBB (para GSH)	1.4 nm	8.0 nm	31
ECD	Standars y orina de cerdo	GSH, GSSG	-----	50 nm	N.R.	32
ESI-MS	Plasma y eritrocitos de conejo	GSH	NEM, ² H	N.R.	N.R.	33
ESI-MS/MS	Orina humana	GSH, GSSG, Cys	FEM,FMEA	N.R.	N.R.	34

*N.R.: no reportado.

Tabla 2.2. Resumen de algunos métodos CE para la determinación de GSH y GSSG.

Detector	Matriz	Analitos	Etiqueta	LoD		Ref.
				GSH	GSSG	
UV 200 nm	Hígado de rata	GSH, GSSG	-----	0.75 µM	0.25 µM	35
LIF Ex/Em: N.R.	Plasma humano	GSH,HCys, Cys	5-IAF	N.R.	N.R.	36
ECD	Sangre humana y cerebro de rata	GSH,HCys,Cys	-----	2.58 µM	N.R.	11

*N.R.: no reportado

1.2.5. Métodos de análisis sin paso de separación ni derivatización.

1.2.5.1. Métodos electroquímicos.

Sin duda alguna es necesario establecer metodologías de análisis para GSH y GSSG, en las cuales no sea prácticamente necesario hacer uso de pasos como la separación, derivatización y pre-concentración de las especies. Pues como se ha mencionado, estas manipulaciones de la muestras comprometen la estabilidad de los analitos, en particular del GSH quien sufre de autooxidación y esto a su vez provoca errores de medición para ambas especies GSH y GSSG. Estos requisitos son en principios idealmente adecuados para la detección electroquímica, ya que las técnicas de electroanálisis permiten realizar la detección directa de ambas especies GSH y GSSG ⁶.

Para ambos GSG y GSSG la detección electroquímica directa requiere de altos sobrepotencial, cuando se hace uso de electrodos metálicos o de materiales de carbón sin ninguna modificación superficial. Además de la consecuente pasivación que ocurre en la superficie del electrodo y que se refleja en la pobre señal electroanalítica registrada ⁶. Por tal motivo, grupos de investigación especialista en el área han propuesto e implementado diferentes métodos de modificación superficial sobre diversos materiales sustratos (electrodos) con la finalidad de obtener electrodos modificados, también conocidos como sensores químicos o biosensores, con alta funcionalidad para la detección y cuantificación de GSH y GSSG (Tabla 2.3). Las configuraciones de modificación superficial más comunes que se han reportado en la literatura, corresponden al uso de quinonas o catecoles, enzimas y el uso de películas electrocatalicas, las cuales pueden incorporar ambos (quinonas o enzimas) como co-factor en la película. El objetivo de todas estas modificaciones es incrementar las señales electroanalíticas para la oxidación de GSH y reducción de GSSG en la superficie del electrodo; sin embargo, lo hacen por medios claramente diferentes ⁶.

Como se observa en la tabla 2.3, las estrategias desde de la selección del material sustrato, la modificación superficial y la técnica de electroanálisis elegidas dependerá de las necesidades del estudio. Al respecto, aunque la mayoría de los estudios se han llevado a cabo a pH cercano al fisiológico, prácticamente la detección de GSH y GSSG se ha realizados en soluciones sintéticas. Solamente un trabajo de investigación ha reportado la funcionalidad de un sensor electroquímico a base de ftalocianinas de cobalto y metaloporfirinas de hierro adsorbidas sobre nanotubos (*CoTsPc-FeT4MPyP/MWCNT/GCE*) para la detección únicamente de GSH en muestras de eritrocitos de humano ³⁷. Otro de los trabajos pionero muestra la capacidad de un sensor

electroquímico con una configuración de modificación superficial muy sencilla a base de ftalocianinas de cobalto (*CoPC/OPG*) para la detección de ambas especies GSH y GSSG a pH fisiológico ³⁸.

Tabla 2.3. Resumen de los métodos electroquímicos que han sido utilizados para la detección y cuantificación de GSH y GSSG.

Configuraciones utilizadas para la detección de GSH						
Matriz	Método	Electrodo modificado	E_{det}	pH	LoD	Ref.
PBS	CV-FIA	HRP/GCE	-0.15 V vs. Ag/AgCl	7.0	0.3 nM	³⁹
PBS	DPV	2-7-bis(ferroceniletil)fluoren-9-one	+0.41 V vs. Ag/AgCl	7.0	0.51 μM	⁴⁰
PBS	DPV	TiO ₂ -ferroceno/CPE	+0.33 V vs. Ag/AgCl	7.0	98 nM	⁴¹
PBS	SWV	Gupos nitrofenil/BPPG	-0.1 V vs. SCE	7.0	8.1 μM	⁴²
PBS	SWV	FeT4MPyP/MWCNT/BPPG	-0.025 V vs. Ag/AgCl	7.4	0.5 μM	⁴³
Eritrocitos de humano	SWV	CoTsPc-FeT4MPyP/MWCNT/GCE	0.0 V vs. Ag/AgCl	7.4	0.03 μM	³⁷
PBS	AMP	MWCNT/GCE	-0.30 V vs. Ag/AgCl	6.0	3.3 μM	⁴⁴
PBS	AMP	OMC/GCE	+0.15 V vs. Ag/AgCl	7.2	0.09 μM	⁴⁵
Configuración utilizada para la detección de GSSG						
PBS	CV-AMP	CDE	0.1 V vs. (Cu wire)	7.4	0.08 ppm	⁴⁶
Configuración utilizada para la detección de ambos GSH y GSSG						
					Sensitividad [μA μmol ⁻¹]	
					GSH	GSSG
PBS	CA	CoPc/OPG	E _{GSH} = 0.2 V vs. SCE E _{GSSG} = -1 V vs. SCE	7.4	23	11.5 ³⁸

Los electrodos modificados con metaloftalocianinas han sido ampliamente desarrollados para la oxidación electroquímica de una variedad de tioles con relevancia biológica ⁴⁷⁻⁴⁸. Ellos también han sido reportados por su substancial actividad electrocatalítica para la electroreducción de disulfuros GSSG a pH fisiológico ⁴⁹. El efecto electrocatalítico promovido por las ftalocianinas de cobalto puede ser incrementado y mejorado por la incorporación con nanotubos de carbón ⁵⁰. La principal contribución de los nanotubos de carbón en estudios de electroanálisis atribuido a su eficiencia en la transferencia de carga y el aumento en el área electroactiva de tal manera que las señales se mejoran significativamente ⁵¹.

1.3. Nanotubos de carbono.

Dentro de los nanomateriales con especial interés para su uso en la fabricación de sensores electroquímicos se encuentran los nanotubos de carbono (por sus siglas en inglés, CNT_Carbon Nanotubes) debido a sus propiedades electrocatalíticas y capacidad para facilitar la transferencia de carga. Los nanotubos poseen alta estabilidad térmica, química, enorme elasticidad, alta resistencia mecánica y muy buena conductividad eléctrica^{52, 53}. Los CNT de carbono están compuestos por carbonos de hibridación sp^2 , los que les permite interactuar con moléculas deficientes de electrones, formando un complejo donador-aceptor por medio de interacciones π - π ⁵⁴.

Dependiendo del número de paredes que los conforman, los nanotubos de carbono se clasifican en simple (por sus siglas en inglés, SWNTC_Single Walled Carbon Nanotubes) y de pared múltiple (por sus siglas en inglés, MWNTC_Multiwalled Carbon Nanotubes). Los SWNTC consisten en un solo hueco con un diámetro entre 0.4 y 2 nm; y los MWNTC se componen de múltiples tubos concéntricos separados 0.34 nm y poseen un diámetro que varía entre 2-100 nm (Figura 2.2a)⁵⁵. Una característica de los nanotubos de carbono es su tendencia a formar agregados insolubles en disoluciones acuosas o disolventes polares. Esta baja solubilidad se debe a su composición estructural, si bien en las puntas contiene especies oxigenadas hidrofílicas, en realidad las paredes son hidrofóbicas. Esta hidrofobicidad se atribuye a las fuertes interacciones de van der Waals, las cuales originan una alta polarización de los electrones π en las paredes de grafito que los conforman.

Los tratamientos oxidativos con ácidos es una de las principales metodologías empleadas para provocar la solubilidad y funcionalización de CNT⁵⁶. Estos métodos consisten en someter a los CNT en ácidos concentrados bajo sonificación y en reflujo durante tiempos relativamente prolongados⁵⁷. Como resultado, la reactividad, conductividad y solubilidad de los CNT incrementa después de haberles realizado este pre-tratamiento fuertemente oxidante. Este resultado es atribuido a que las puntas de los nanotubos se abren, exponiendo grupos funcionales oxigenados tales como quinonas, hidroxilos y ácidos carboxílicos en su superficie, generando de esta manera los nombrados CNT funcionalizados (CNT_f), con alta capacidad de solubilizarse en soluciones acuosas⁵⁸. Además de favorecida la solubilidad de los CNT_f , estos son capaces de interactuar y formar con mayor facilidad enlaces con otras especies químicas, moléculas y biomoléculas. Con estas características los CNT_f son útiles para la preparación de compositos esenciales para la fabricación de sensores y biosensores electroquímicos.

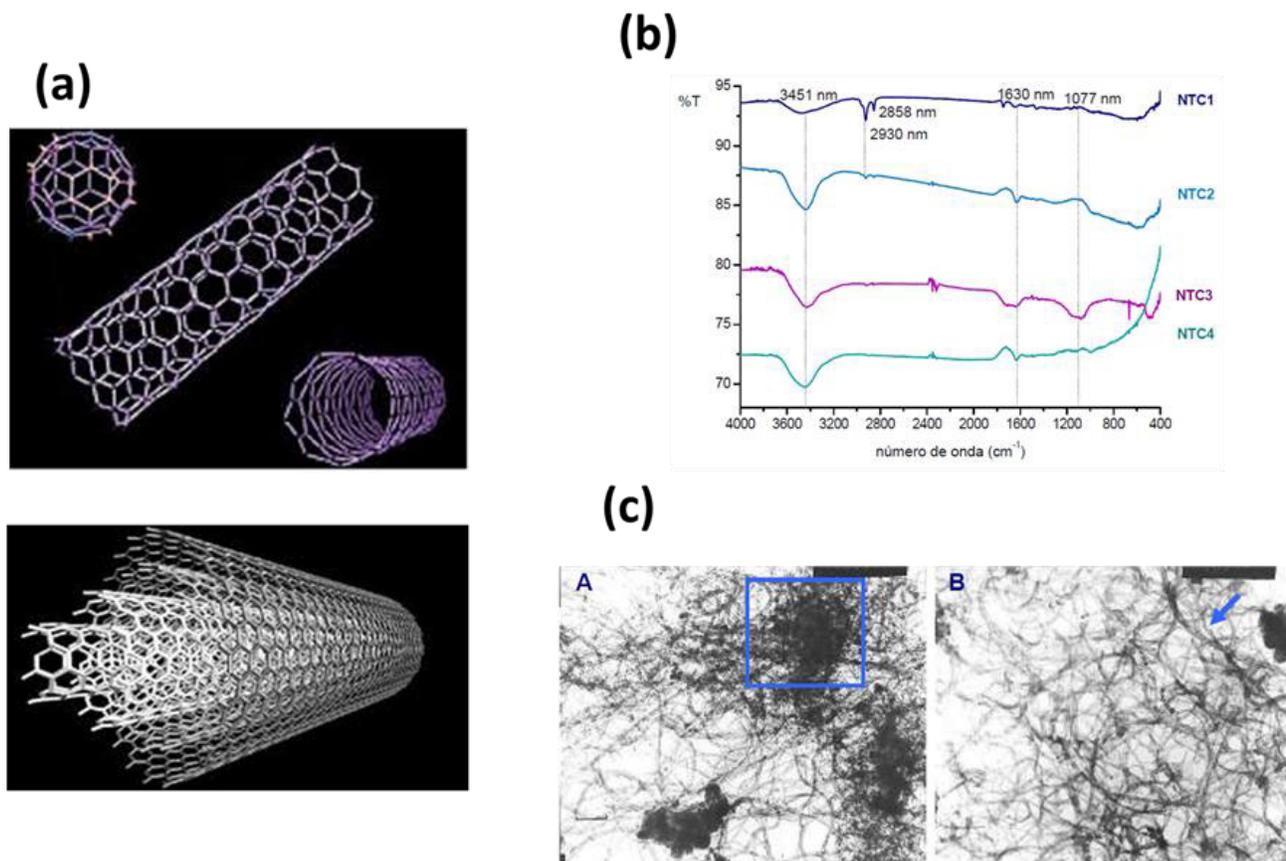


Figura 2.2. (a) Imagen de la estructura tridimensional de SWNTC y MWNTC, (b) espectros IR ⁵⁹⁻⁶¹ para cuatro muestras de MWNTC funcionalizados por oxidación bajo condiciones de acides extrema, (c) imagen TEM ^{54, 61} de MWNTC nativos (A) y MWNTC funcionalizados (B).

Diversos métodos de caracterización para CNT_f han sido implementados, entre los cuales se encuentran TEM, electroquímicos, SEM, difracción de neutrón, difracción de rayos-X y espectroscopia Raman-Infrarojo⁵⁹. En la figura 2.2(b) se observa el espectro infrarrojo de cuatro muestras de CNT_f. La funcionalización rompe la simetría de los nanotubos, lo que aumenta la generación de dipolos eléctricos inducidos y favorece señales con mayor intensidad. En todas las muestras se observan, aunque de mayor o menor intensidad, las siguientes señales: a 3451 cm^{-1} que se asocia a la presencia del grupo -OH. La señal de 1630 cm^{-1} que se debe a la interacción de C=O debido a la introducción de un grupo carbonilo o carboxilo ⁶⁰. A 1077 cm^{-1} se muestra otra señal, la cual se atribuye al grupo C-O.

La técnica de TEM permite obtener imágenes donde se puede apreciar la forma y estructura física de estos materiales nanoestructurados. En la figura 2.2(c) se presentan las imágenes TEM para una muestra de

CNT, de la cual el fabricante reporta un diámetro de 15 ± 5 nm y longitud entre 5 a 20 μm . La imagen (A) corresponde a los nanotubos nativos y la imagen (B) a los nanotubos funcionalizados^{54, 61}. De estas imágenes cabe destacar por una parte que la funcionalización de los nanotubos promueve la dispersión de los mismos y por la otra que efectivamente las dimensiones reportadas por los fabricantes son correctas.

1.4. Nanocompositos híbridos de CNT-(MPcs /MPyPs).

Complejos metálicos macrocíclicos tales como las metalofalocianinas (MPcs), metaloporfirinas (MPyPs) y compuestos relacionados son bien conocidos como mediadores de transferencia de carga para una gran variedad de reacciones. Las MPcs y MPyPs pueden ser confinadas por simple adsorción sobre grafito y carbono, lo cual abre la posibilidad de preparar y usar materiales nanoestructurados híbridos del tipo CNT-MPc/MPyP. Esta combinación de CNT con ftalocianinas ha sido dirigida con el propósito de generar nanocompositos con posible aplicación en el campo de la activación electrocatalítica y electroanálisis⁶².

1.4.1. Métodos de preparación

Hay una gran variedad de métodos para obtener compositos nanoestructurados a base de CNT y MPcs, incluyendo la adsorción directa, funcionalización y más procedimientos sofisticados. Entre las principales MPcs se encuentra la $\text{Co}^{\text{II}}\text{Pc}$ del tipo no sustituidas (figura 2.3a), estos complejos planares no se enlazan covalentemente a los CNT_f , por el contrario generalmente se adsorben a estos por interacciones π - π . En la figura 2.3b se ilustra el ataque de MPcs (M = Ni, Fe, Cu, Co) no sustituidas sobre un SWCNT⁶³, en este caso la adsorción se lleva a cabo por interacciones π - π en lugar de interacciones covalentes entre el SWCNT y MPcs.

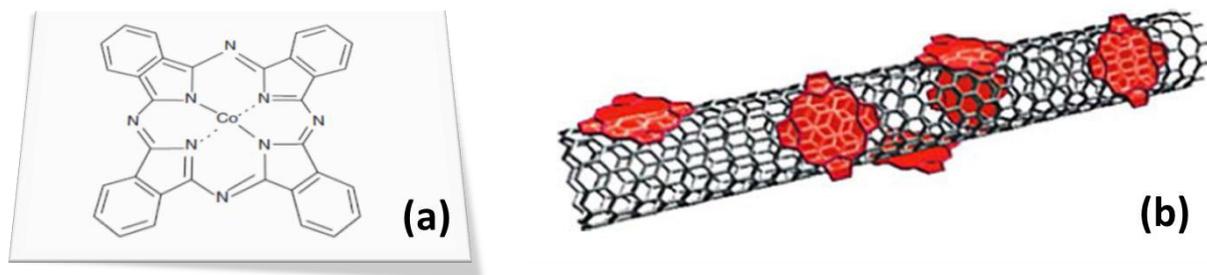


Figura 2.3. (a) Estructura de la ftalocianina de cobalto (II) no sustituida, (b) ilustración de un nanotubo SWCNT modificado con un complejo macrocíclico que puede ser una MPc⁶³.

Este método es atractivo porque puede ser extendido a otras ftalocianinas macrocíclicas. El ataque es tan fuerte que se generan nanotubos modificados que no sufren alteraciones posteriores, es decir, las MPCs ancladas en el nanocomposito no son removidas posteriormente ⁵⁴. Finalmente se obtienen dispersiones estables de CNT_f -CoPc en DMF, las cuales son inmovilizadas sobre GCE formando compositos nanoestructurados mediante fisorción promovida principalmente por interacciones π - π entre el nanocomposito y el material sustrato de carbón ⁶⁴.

1.4.2. Caracterización física de nanocompositos de CNT -(MPCs / MPyP)

Las técnicas por elección para la caracterización de compositos híbridos nanoestructurados del tipo CNT_f -MPCs son AFM, SEM y electroquímica. La figura 2.4 muestra algunos ejemplos significativos de imágenes reportadas en la literatura. En ellas se muestra como estas técnicas brindan una clara visión superficial y morfológica de los materiales. Las imágenes SEM para los $MWCNT_f$ sin modificar (figura 2.4a) y los modificados con FeT4MPyP (figura 4b), de las cuales es posibles hacer una comparación entre ambas imágenes y destacar que existe una mayor voluminosidad en la imagen b, atribuido a la distribución del complejo quienes reflejan una forma de pequeñas protuberancias sobre los nanotubos. En este caso no se detecta ningún tipo de agregaciones de FeT4MPyP, lo que indica una buena dispersión en la superficie ⁴³.

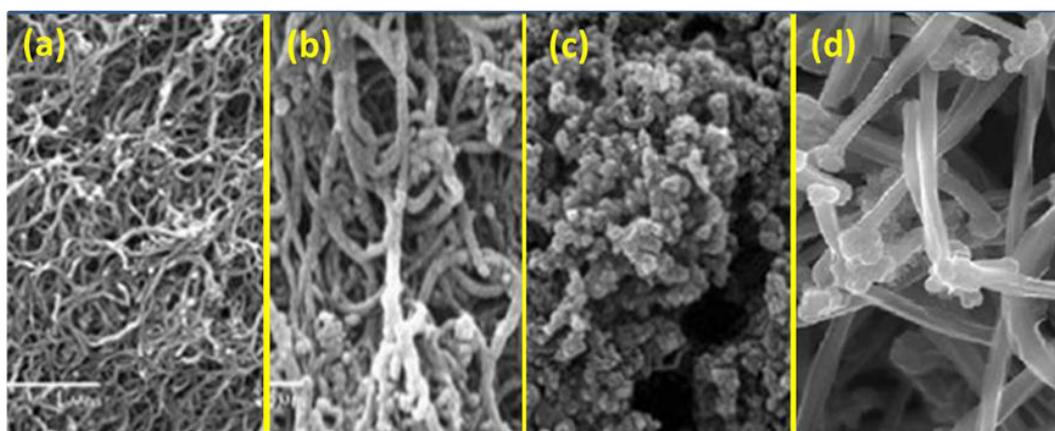


Figura 2.4. Imagen SEM (a) $MWCNT_f$ ⁴¹, (b) $FeT4MPyP / MWCNT_f$ ⁴¹, (c) $(FeT4MPyP-CoTsPc) / MWCNT_f$ ⁴², (d) $CoPc(II) / MWCNT_f$ ^{65, 66}.

En otro estudio relacionado, se reporta la imagen SEM (figura 2.4c) para un nanocomposito que consiste en la combinación de una CoTsPc y una FeT4MPyP sobre $MWCNT_f$. Como era de esperarse, el volumen de la película formada por el nanocomposito muestra mucho mayor volumen, dando a notar la mayor cantidad de

complejos inmovilizados sobre los MWCNT_f. En este caso prácticamente son saturados los nanotubos con los complejos metálicos, sin embargo no se muestra formación de agregados³⁷. Un último ejemplo se muestra en la figura 4d, donde la imagen SEM muestra la estructura nanoestructurada de CoPc^(II)/MWCNT_f ensamblada sobre electrodos GC. Se aprecia claramente la buena distribución del nanocomposito y se observa también que la CoPc^(II) es preferentemente adsorbida en las puntas de los nanotubos, formando pequeñas protuberancias voluminosas en estos sitios. Este proceso de adsorción es acorde al hecho de que las CoPc^(II) interactúan covalentemente con los nanotubos vía la formación de enlaces amido^{65 66}.

1.4.3. Caracterización electroquímica de nanocompositos de CNT-(MPcs / MPyPs.)

El comportamiento electroquímico de los compositos nanoestructurados a base de CNT-MPcs son usualmente examinados con técnicas electroquímicas. Mediante voltamperometría cíclica es posible evaluar su capacidad electrocatalítica. Un ejemplo del efecto electrocatalítico se muestra en la serie de CVs (figura 2.5A) para electrodos con la siguiente configuración: MWCNT/BPPG (a), poly-Co(II)/MWCNT/BPPG (b), poly-Co(II)/BPPG (c), BPPG sin modificar (d) en presencia de Fe (CN)₆³⁻ como sonda redox. Al respecto se observa que el potencial para Fe (CN)₆³⁻/ Fe (CN)₆⁴⁻ es desplazado hacia valores menos anódicos por efecto del nanocomposito, ya que para d se registra un E = 0.147 V, en c el E = 0.117 V, y para a y b el sobrepotencial disminuye aún más, hasta 0.097V en ambos casos.

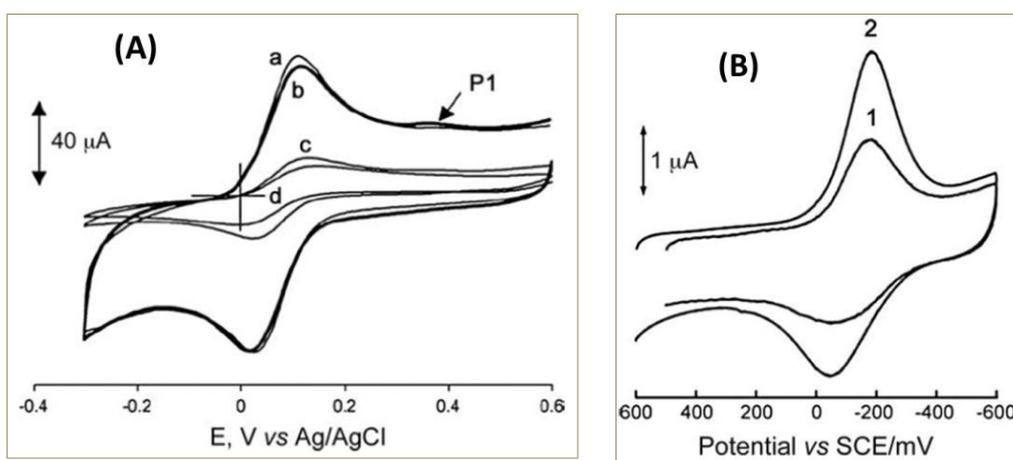


Figura 2.5. (A) CVs de (a) MWCNT/BPPGE, (b) poli-Co(II)/MWCNT/BPPGE, (c) poli-Co(II)/BPPGE y (d) BPPGE en 10^{-3} M Fe (CN)₆³⁻. El pico etiquetado como P1 es observado únicamente en presencia de Co(II)Pc. Velocidad de barrido 25 mV/s⁶⁷. (B) CVs de una película de Fe(III)Pc (1) y Fe(III)Pc/SWCNT (2) sobre GCE en una mezcla de 0.1 M HClO₄ y 0.1 M NaCl₄. Velocidad de barrido 0.1 V/s⁶³.

Además de que la intensidad de corriente de pico se ve mejorada y aumentada. Dentro de la misma figura se remarca un pico nombrado P1 a $E = 0.5$ V el cual aparece únicamente en la presencia de $\text{Co}^{\text{II}}\text{Pc}$, de tal manera que la señal esta directamente vinculada al proceso redox de la cupla $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$. En este particular estudio solamente se observa el pico de oxidación del cobalto ⁶⁷. En otros estudios similares también se reporta la presencia de esta señal redox para la cupla al mismo potencial (*vs.* Ag/AgCl) sobre GC ⁶³. Al parecer la presencia e intensidad de la señal para $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$ depende del pH de la solución ⁶⁸.

Voltametría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica (por sus siglas en inglés, EIS_Electrochemical Impedance Spectroscopy) también han sido utilizadas para evaluar las propiedades electroquímicas de la $\text{Co}^{\text{II}}\text{TAPc}$, para la cual se reporta alta estabilidad y buena organización superficial de la dispersión $\text{Co}^{\text{II}}/\text{SWCNTs}$, ello es atribuido a la fuerte adsorción por las interacciones π - π entre el complejo y las paredes de los SWCNTs. En el mismo estudio se registra una buena constante de transferencia de carga ($6 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$) promovida por el nanocomposito en la superficie ⁶⁹.

La figura 2.5B presenta un par de CVs que corresponden a la caracterización de la película $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Pc}/\text{SWCNT}$ sobre GC en una solución 0.1 M HClO_4 y 0.1 M NaCl_4 . A partir de estas curvas se hace la comparación entre el electrodo GC modificado únicamente con el complejo (CV 1) y aquel modificado con la dispersión (CV 2). En ambos electrodos se observa el proceso redox de la cupla $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ a -0.12 V *vs.* SCE. Mediante este estudio se obtiene la estimación de los sitios activos redox que en el caso de la $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Pc}$ adsorbida fue de $3.2 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ y para la dispersión $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Pc}/\text{SWCNT}$ se reporta de $6.5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. Estas diferencia pueden ser atribuidas a los aparentes cambios del área superficial activa determinada por la presencia de los CNTs ⁶³.

1.4.4. Nanocompositos híbridos CNT-MPcs y su aplicación para la detección de tioles -SH y disulfuros S-S.

El desarrollo de electrodos modificados a base de nanocompositos *CNT-MPcs* ha destacado interesantemente en química analítica. Las *MPcs* particularmente muestran un desempeño especialmente para la oxidación de tioles en soluciones ácidas y alcalinas ^{70,50,52}. Al respecto se han reportados electrodos modificados con recubrimiento de ftalocianinas de cobalto (CoPc) adsorbidas cuya capacidad catalítica tiene efecto sobre la electrooxidación de L-cisteína, 2-mercaptoetanol, L-glutatión ^{71,49,72} en soluciones acuosas alcalinas. Sin embargo, de acuerdo con esto resultados se continuaron las investigaciones, pero con la

intensión de llegar hasta la aplicación de este tipo de sensores químicos para la detección de glutatión en sistemas biológicos. Entre los trabajos pioneros se demostró la actividad electrocatalítica de electrodos modificados únicamente con la adsorción $\text{Co}^{\text{(II)}}\text{Pc}$ sobre sustratos de grafito pilórico (OPG) para la electrooxidación de L-glutatión GSH y electroreducción de su correspondiente disulfuro GSSG a pH fisiológico en soluciones sintéticas ⁴⁶. Como resultados generales en la figura 2.6A se muestra una serie de CVs obtenidos para la calibración del electrodo $\text{Co}^{\text{(II)}}\text{Pc}/\text{OPG}$ a concentraciones crecientes de GSH (de 1 mM a 5mM). Las curvas muestran el proceso redox a $E = 0.6 \text{ V/SCE}$ que corresponde a la cupla de $\text{Co}^{\text{(I)}}/\text{Co}^{\text{(II)}}$ de la ftalocianina adsorbida, posteriormente hacia potenciales más anódicos se presenta el pico de oxidación de GSH a $E = 0.0 \text{ V}$. Al invertir el barrido de potencial en sentido catódico se promueve la reducción del GSSG a $E = -0.92 \text{ V}$.

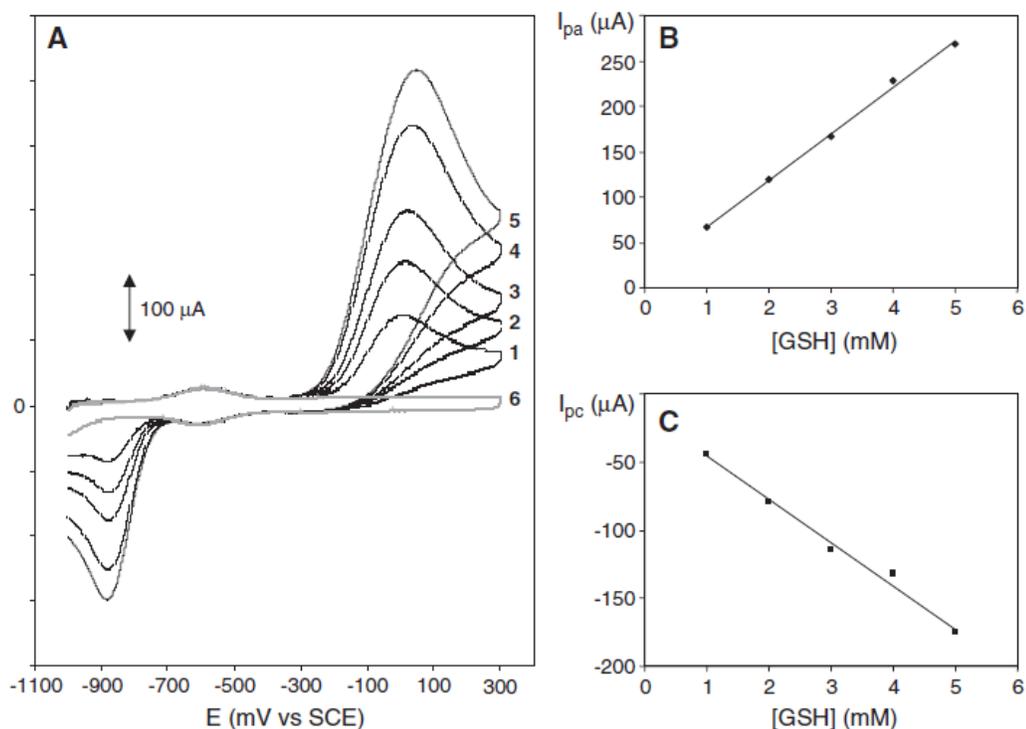


Figura 2.6. CVs de GSH en buffer PBS, pH 7.4 a concentraciones de 1mM (curva 1), 2mM (curva 2), 3 mM (curva 3), 4 mM (curva 4), 5 mM (curva 5) e un electrodo modificado CoPc/OPG . Velocidad de barrido 100 mV/s. la curva 6 es obtenida en ausencia de GSH. (B) Curva de calibración para GSH, (C) curva de calibración para GSSG ⁴⁶.

Dentro de la misma figura, los insertos presentan las curvas de calibración para ambas especies GSH y GSSG (figura 2.6B y 2.6C respectivamente). En este estudio también se evaluó la funcionalidad del electrodo $\text{Co}^{\text{(II)}}\text{Pc}/\text{OPG}$ en presencia de GSSG únicamente. Para lo cual se realizó la calibración a concentraciones crecientes de GSSG (de 0.4 mM a 1.2 mM), donde se observa una buena tendencia lineal, lo que indica que el

electrodo puede ser empleado para el análisis secuencial de ambas especies partiendo de GSSG en solución. La estabilidad de la película se evaluó empleando voltametría de disco rotatorio, cuyos resultados muestran la permanencia del material en la superficie después de realizados varios experimentos. En cuanto a la reproducibilidad y sensibilidad, esta se evaluó con amperometría y se confirma la utilidad del método electroanalítico para posteriores aplicaciones en sistemas biológicos⁴⁶.

Posteriormente después de varios estudios de investigación en este contexto, se publica otro trabajo en donde se reporta la aplicación de un sensor electroquímico cuya configuración consiste en un nanocomposito a base de una combinación de dos complejos: una ftalocianina (CoTsPc) y una porfirina (FeT4MPyP) adsorbidos sobre MWCNT_f⁴².

El sensor fue utilizado para la detección únicamente de GSH con voltametría de onda cuadrada como se presenta en la figura 2.7, en este caso la respuesta lineal se presenta en un rango de 0.005 a 5 mM, con una sensibilidad de 1570 mA.mM⁻¹. El límite de detección fue de 0.03 μM y considerando estos valores como buenos parámetros analíticos, los autores probaron el desempeño del sensor para la determinación de GSH en muestras de eritrocitos obteniendo datos relevantes los cuales fueron corroborados con métodos analíticos alternos descritos en la literatura³⁷.

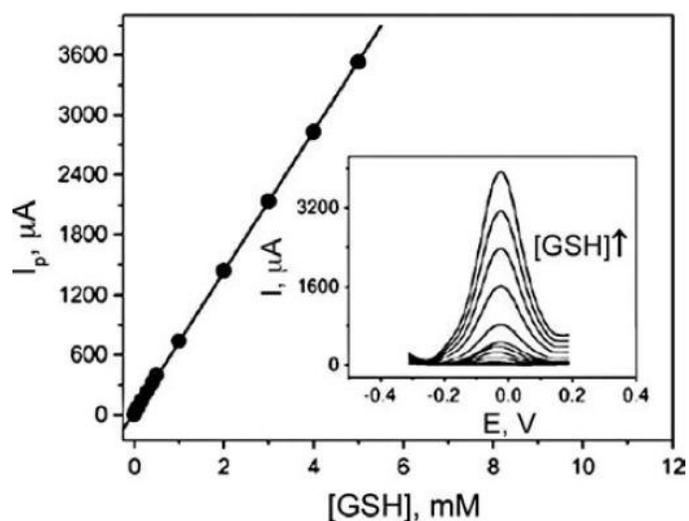


Figura 2.7. Curvas analíticas para la electrooxidación de GSH en buffer de fosfatos pH 7.4 en un rango de concentración de 0.005 a 5 mM. Salto de potencial (E) = 0.002 V, frecuencia (f) = 80 Hz y amplitud (a) = 0.03 V. Inserto se muestran los voltamogramas de onda cuadrada⁴².

2. OBJETIVOS

En base a lo anteriormente expuesto, en esta sección se presenta un método electroquímico para medir simultáneamente la relación de glutatión reducido y oxidado en soluciones sintéticas y en muestras reales de organismos modelo bajo estrés oxidativo causado por intoxicación con Pb. Para tal efecto el estudio consistió en la fabricación y caracterización física y electroquímica de un composito nanoestructurado a base de CoPc-MWCNT_f adsorbida sobre sustratos de GCE. Enseguida fue evaluado el comportamiento del electrodo híbrido frente a la detección de GSH y GSSG en muestras sintéticas por voltametría cíclica y voltametría de pulso diferencial. Finalmente, el sensor electroquímico CoPc-MWCNT_f-GCE fue usado para la determinación de GSH y GSSG en muestras reales (plasma y orina) de rata Winstar intoxicada o no por plomo. El comportamiento del sensor desarrollado fue comparado con un ensayo espectrofotométrico para GSH.

3. CONDICIONES EXPERIMENTALES

3.1. Reactivos.

Ftalocianina de cobalto (II), glutatión reducido (GSH) γ -L-Glutamyl-L-Cysteinyl-glycine, L-glutatión oxidado, L- ácido ascórbico, L- cysteina, L- ácido glutámico, D (+) – glucosa, Glycina, nanotubos de carbono de multipared de diametro 1-5 μ m de longitud y 15 ± 5 nm de diametro, N-etilmaleimida (NEM) todos productos de grado analítico fueron adquiridos de Sigma Aldrich. Acetato de plomo (I) trihidratado de grado analítico, fue adquirido de EMSURE. Sales de KCl and NaCl de Karal y KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , HNO_3 , DMF, and $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ adquiridos de J. T. Baker.

3.2. Purificación y funcionalización de MWCNT.

100 mg de MWCNT fueron adicionados a 10 mL de HNO_3 16 M y sonicados durante una hora. Posteriormente la suspensión se mantuvo a reflujo por 12 horas con constante agitación manteniendo una temperatura de 80°C ; enseguida la dispersión se lava vigorosamente con agua hasta alcanzar la neutralización del liquido ácido. Los MWCNT fueron centrifugados a 4500 rpm durante 15 minutos para remover la mayor cantidad de líquido e inmediatamente se ponen a secar en un horno a 70°C por 7 horas. Estos nanotubos de carbono fueron nombrados como MWCNT_f.

3.3. Experimentos electroquímicos.

Los estudios electroquímicos fueron llevados a cabo con un potenciostato/galvanostato Epsilon EC o un Electrochemical Workstation (CH Instrument, Austin TX) CHI 660. Una celda convencional de tres electrodos fue empleada. Carbon vitrio (diameter = 3 mm) fue usado como electrodo de trabajo, como electrode auxiliary un alambre de platino y Ag/AgCl (3 M KCl) como electrodo de referencia. A menos de que se indique lo contrario, los experimentos electroquímicos han sido realizados bajo atmosfera inerte y en una solución de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4.

3.4. Preparación del electrodo modificado.

Una solución 1 mmol L^{-1} de CoPc fue preparada en dimetilformamida (DMF). 1 mL de esta solución fue transferida a un tubo Ependorf, el cual contiene 1 mg of MWCNT_f, esta mezcla fue sonicada por 30 minutos. De manera paralela, el GCE fue pulido con alumina de tamaño decreciente: 1, 0.3 and 0.05 μm y finalmente el electrodo es enjuagado con suficiente agua y sonicado en etanol por 5 minutos. Los electrodos fueron caracterizados por CV en 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ dentro de un rango de potencial de -0.2 to 0.7 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s para un obtener un perfil de CV para GCE limpio. Los electrodos fueron modificados colocando 10 μL de la suspension sobre la superficie del substrato GCE, posteriormente se seca en un horno a 80°C por 10 minutos hasta permitir la formación del nanocomposito CoPc/MWCNT_f sobre la superficie de GCE.

3.5. Caracterización de la película de Nanocomposito.

La morfología y composición del nanocomposito CoPc/ MWCNT_f sobre la superficie del GCE fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido con un Hitachi model S-4700 tipo II equipado con un Oxford instrument y un detector EDXS. El espesor de las películas fue evaluado con un Stylus Profilometer Model D-100 (KLA Tecnor).

3.6. Proceso de intoxicación de ratas como modelo biológico. .

Tres ratas Winstar fueron intoxicadas oralmente por dos semanas con una dosis de 50 mg/kg de acetato de plomo. En la segunda semana de tratamiento se tomaron 15 mL de una muestra de orina de cada rata e inmediatamente la muestra fue desoxigenada, sellada y centrifugada a 5000 rpm/10 min. Posteriormente, las muestras fueron refrigeradas a 4°C antes de realizar la determinación del glutatión. Muestras de sangre también fueron tomadas en tubos con EDTA, la muestra fue centrifugada a 3500 rpm por

10 min para separar el plasma; las muestras fueron desoxigenadas y refrigeradas a 4°C antes de continuar con la determinación de glutatión ⁷³.

3.7. Determinación espectrofométrica de GSH.

Se usa un procedimiento característico de quenching rápido entre grupos tiol libres y el reactivo N-etilmaleimida (NEM) ⁷⁴. Aproximadamente 15 mL de orina y 5 mL de sangre fueron obtenidos antes y después de la intoxicación con plomo y fueron colocadas en un tubo (con EDTA en el caso de la sangre), inmediatamente fueron centrifugadas a 3500 rpm for 10 min; enseguida se tomaron 10 mL y 5 mL de orina y plasma respectivamente y fueron mezclados rápidamente con el reactivo NEM 35 mM (v/v). Se permitió la reacción durante ~ 7 minutos y posteriormente las muestras se sometieron a un segundo proceso de centrifugación a 3500 rpm por 5 min. Se realizó la curva de calibración en soluciones sintéticas para concentraciones conocidas de 0.1 a 0.5 mM.

3.8. Cuantificación de plomo en sangre.

Los experimentos fueron realizados con animales (ratas Wistar) de peso promedio 210 ± 37 g, éstos se dividieron en dos grupos: control y tratados con plomo (intoxicado). El grupo tratado con plomo ($n = 3$) recibió $50 \text{ mg}_{\text{PbAc}}/\text{kg}_{\text{corporal}}$ de RW de dosis intraperitoneal durante un periodo de dos semanas. La solución de PbAc fue preparada diariamente a partir de los reactivos originales para obtener la concentración deseada. El grupo control ($n = 2$) prescindió de la administración de PbAc, pero, recibió la misma dieta, administración de agua y entorno general. Para el grupo de ratas tratadas elegimos la ruta intraperitoneal de exposición a PbAc promoviendo así la intoxicación aguda en los animales ⁷⁵. Un espectrofotómetro de absorción atómica AAS Perkin-Elmer modelo AAnalyst 200 fue utilizado para realizar las determinaciones de plomo en sangre.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización electroquímica del electrodo híbrido CoPc/MWCNT_f/GC.

La optimización de los electrodos modificados es particularmente importante para la elaboración de sensores electroquímicos. Suspensiones de WCNT_f (1 mg mL^{-1})-CoPc fueron preparadas a diferentes concentraciones de metaloftalocianina (1, 5, 10, 50 mM) para producir compositos nanoestructurados de diferente composición. Este estudio está dirigido a analizar la correlación entre las concentraciones de CoPc y

la cantidad de sitios activos de caracterizaciones electroquímicas en solución de buffer de foafatos (PBS, pH 7.4).

El comportamiento electroquímico del electrode nanocomposito obtenido electroquímicamente evaluado por voltamperometría cíclica es ilustrado en la Figura 2.8. Los voltamperogramas cíclicos exhiben un pico caracteristico para una cupla redox, localizado a -0.60 V vs. Ag/AgCl 1M KCl, el cual es asignado al proceso reversible de $\text{Co}^{(II)}/\text{Co}^{(I)}$ de la ftalocianina adsorbida. Este potencial corresponde al potencial formal aparente que ha sido reportado para la misma CoPc en soluciones acuosas básicas y neutras ⁴⁸. Este pico presenta un proceso reversible únicamente para concentraciones 1, 5 and 10 mM del complejo (en suspensión). A concentraciones mayores, notablemente a 10 mM, los valores de corriente de pico son similares a los obtenidos a 5 mM. Por encima de 10 mM un decremento significativo en la corriente de pico es observado, probablemente debido a la formación de cristales de CoPc precipitados desde la suspensión sobre la superficie de GCE provocando una precipitación no homogénea del complejo. Otros picos menos definidos (-0.170 V) y de menor intensidad tambien fueron observados, los cuales pueden ser atribidos a ciertos cambios en la capacitancia de la doble capa en esta región de potencial debido a la presencia de precipitados de CoPc.

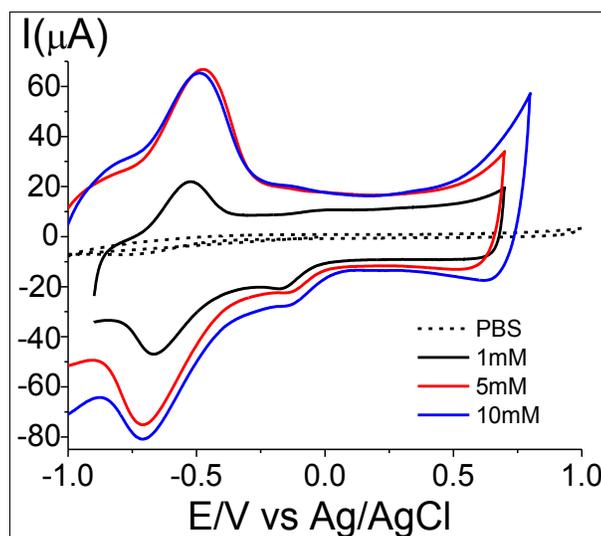


Figure 2.8. Voltamperogramas cíclicos registrados en un electrode híbrido $\text{CoPc-MWCNT}_f/\text{GC}$ para diferentes concentraciones de CoPc (1, 5, 10, 50 mmol L^{-1}) en una solución de buffer de fosfatos pH 7.4. Velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} .

El uso de una dispersion de CoPc 1 mM fue considerado como óptimo para dar continuación al estudio. A partir de la intensidad de corriente del pico anódico (Figure 2.8), la cantidad del recubrimiento

aparente de los sitios electroactivos de CoPc se estimó en $\Gamma = 3.33 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ (considerando el área geométrica del electrodo).

4.2. Caracterización física del electrodo híbrido CoPc/MWCNT_f/GC.

4.2.1. Perfilometría del nanocomposito CoPc/MWCNT_f adsorbido.

En la figura 2.9 se muestra el resultado de la perfilometría del electrodo *CoPc/MWCNT_f/GC* antes y después de su caracterización electroquímica en presencia de GSH.

Con base en estos resultados, el valor medio del espesor de la película se registró de 2.2 y 1.7 μm , respectivamente. Debido a que el cambio en el espesor es mínimo, uno puede concluir que la nanoestructura adsorbida es estable durante las mediciones electroquímicas manipuladas con el electrodo.

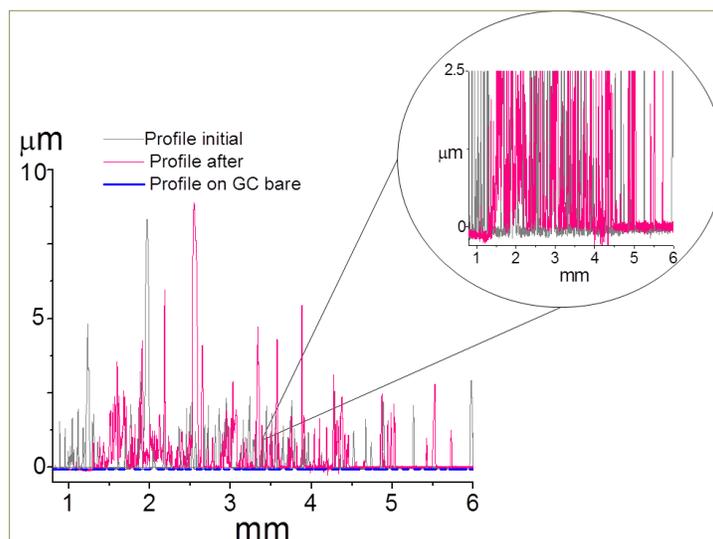


Figura 2.9. Perfilometría del electrodo GC modificado con *CoPc-MWCNT_f/GC* (a) antes y (b) después de los estudios electroquímicos.

4.2.2. Análisis microscópico y elemental del nanocomposito CoPc/MWCNT_f.

La figura 2.10A muestra la imagen SEM del nanocomposito *CoPc/MWCNT_f*, donde es posible apreciar el recubrimiento poroso formado sobre la superficie del carbono vitrio. El mapeo EDS (Figura 2.10B)

muestra que si bien hay algunas áreas con alto contenido de Co (puntos brillantes en la imagen de contraste), existe una distribución homogénea sobre la película, lo que indica una buena dispersión de CoPc sobre la superficie. El espectro de energía de dispersion de rayos-X (figura 10C) muestra que la composición elemental está constituida por átomos de C (0.280 keV), O (0.527 keV), Co (0.790, 6.90 keV), Mo (2.30, 2.80 keV), and Fe (6.37 keV). Estos últimos dos elementos son considerados como impurezas generadas durante la síntesis de los *MWCNT* y que no fueron removidas durante la funcionalización de los *MWCNT*⁴⁷.

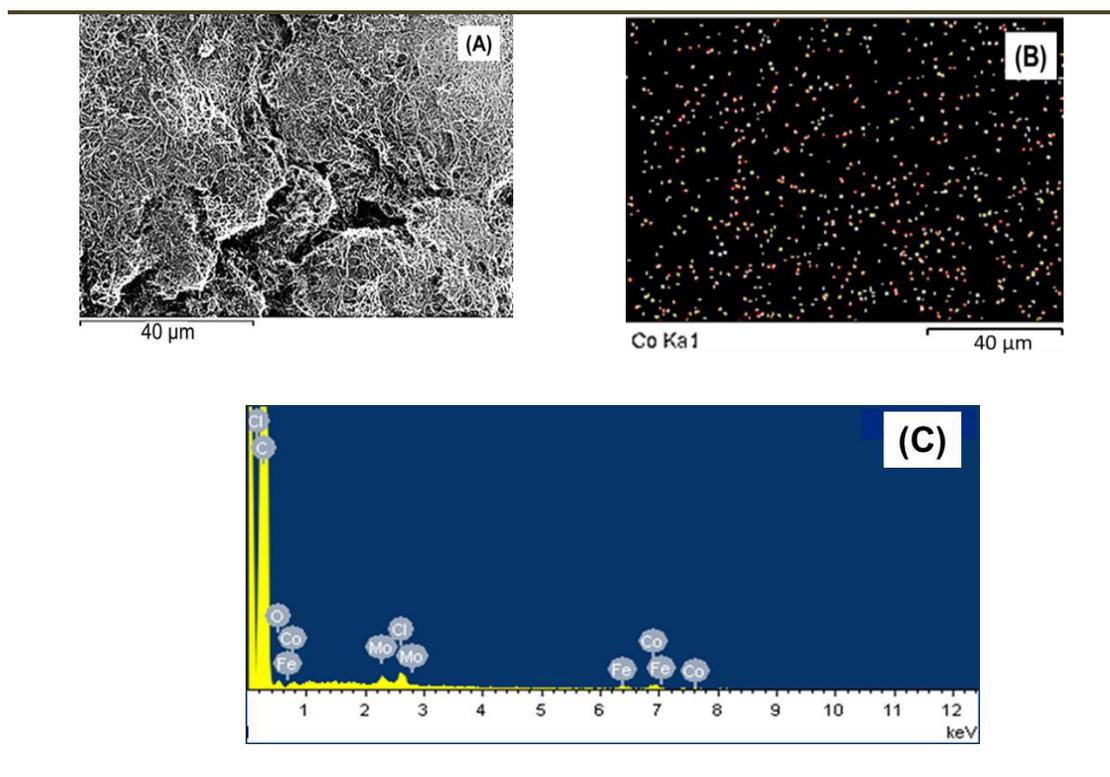


Figura 2.10. (A) Imagen SEM del compuesto CoPc-MWCNT. (B) Diagrama de contraste de fase para el mapeo de Co (C) Análisis EDS del compuesto CoPC-MWCNT y la composición de los elementos detectados sobre el electrodo modificado.

4.3. Comportamiento electroquímico del electrodo CoPc/MWCNT_f/GC en presencia de GSH y GSSG.

En la figura 2.11 el barrido voltamperométrico directo obtenido con el electrode modificado *CoP*/*MWCNT*_f/*GC* en presencia de GSH 3 mM (Figura 2.11A) y GSSG 3mM (Figura 2.11B) y el voltamperograma cíclico en la presencia de la mezcla equimolar de ambas especies de glutatión (Figura 2.11C).

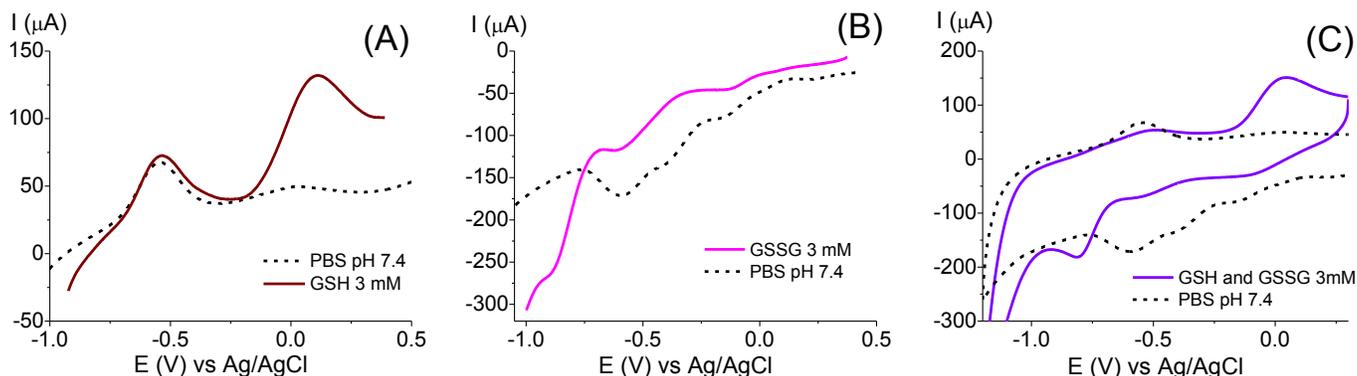


Figure 2.11. Voltamperogramas lineales del electrode modificado *CoPc / MWCNT / GC* en buffer PBS pH 7.4. (A) glutatión GSH 3 mM, (B) GSSG 3 mM y (C) voltamperograma cíclico para la mezcla de ambos GSH y GSSG 3 mM. Velocidad de barrido 100 mV s^{-1} . Todos los estudios fueron realizados bajo atmosfera de nitrógeno.

Para GSH en solución desaeurada de PBS (pH 7.4), se realizó el barrido de potencial en sentido positivo desde -1.2 V a 0.4 V vs Ag/AgCl (1 M KCl), en este caso se aprecia claramente un pico bien definido a 0.110 V . Este pico es asignado a la oxidación electrocatalítica de GSH⁷⁰ en el electrodo modificado.

El comportamiento electroquímico en una solución de GSSG muestra un pico de reducción que se observa a -0.8 V , el cual es atribuido a la reducción electrocatalítica de GSSG en el electrodo modificado con el nanocomposito. Cabe mencionar que los CVs registrados en ausencia de GSH y GSSG únicamente presenta el proceso redox relacionado con la cupla $\text{Co}^{(\text{II})}/\text{Co}^{(\text{I})}\text{Pc}$. Para posteriores investigaciones de GSH y GSSG en muestras biológicas, los experimentos fueron realizados con la mezcla de ambas (GSH/GSSG) considerando que en realidad es de esta manera como se encuentran en las muestras de fluidos biológicos.

La Figura 2.11C muestra el voltamperograma cíclico para el electrodo nanocomposito en una solución equimolar de GSH y GSSG (3 mmol L^{-1}). Los picos voltamperométricos para la oxidación de GSH y la reducción de GSSG muestran de manera clara a $+0.1 \text{ V}$ and -0.8 V , respectivamente.

4.4. Detección y cuantificación de GSH y GSSG.

La figura 2.12 muestra la detección simultánea de GSH y GSSG a diferentes concentraciones por DPV. En ambos casos un incremento en la intensidad de corriente de pico en función de la concentración es observado. El pico a -0.10 V corresponde a la oxidación de GSH y el pico a -0.72 V corresponde a la reducción de GSSG. El pico relacionado al proceso redox de la cupla $\text{Co}^{(\text{II})}/\text{Co}^{(\text{I})}$ aparece a 0.5 V y es

desplazado hacia dirección positiva en presencia de GSH. La intensidad de este pico decrece cuando la concentración de GSH/GSSG incrementa.

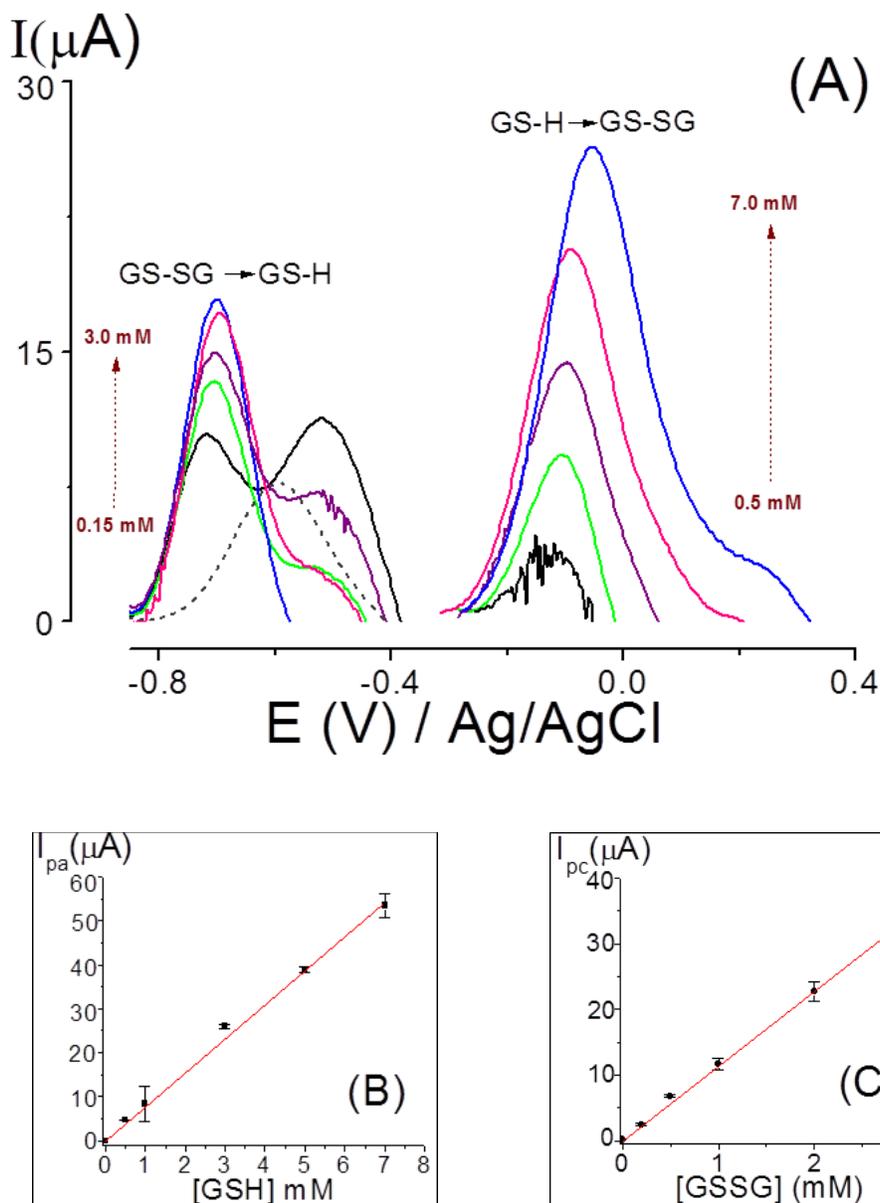


Figura 2.12. A) Análisis por voltamperometría de pulso diferencial con un electrode $\text{CoPc/MWCNT}_7/\text{GC}$ en presencia de una mezcla a concentraciones crecientes de GSH (0.5 mM, 1 mM, 3 mM, 5 mM y 7 mM) y GSSG (150 μM , 500 μM , 1 mM, 2 mM, 3 mM) en solución sintética, B) GSH y C) GSSG son las curvas de calibración correspondientes para cada especie de glutatión. Parámetros DPV: altura de pulso 50 mV, anchura 2 mV, amplitud de pulso: 50 mV, incremento de E: 4 mV, ancho de pulso: 50 ms, periodo de muestra: 1 periodo de línea, periodo de pulso: 200 ms.

Las curvas de calibración se presentan en la figura 12B y 12C para GSH y GSSG respectivamente. Los límites de detección LoD son 0.1 mM para GSH y 8.3 μM para GSSG, mientras que los límites de

cuantificación LoQ son 0.28 mM para GSH, y 29 μ M para GSSG. La estabilidad del sensor fue verificada al realizar 150 mediciones en presencia 500 μ M GSH y 200 μ M GSSG en buffer de fosfatos pH 7.4 y después de la manipulación no se observa cambio alguno en la respuesta. Tampoco se observa diferencia significativa cuando el sensor es almacenado a temperatura ambiente durante un mes. El sensor presenta una reproducibilidad satisfactoria para la determinación de GSH y GSSG. Al respecto, la desviación estandar (RSD%) para diez determinaciones de 500 μ M GSH y 200 μ M GSSG fue de 1.5% y 1.7% respectivamente. También una serie de 5 sensores fueron preparados de la misma manera y evaluados en 500 μ M GSH y 200 μ M GSSG y se obtuvieron respuestas con una desviación estándar de 2.3% y 2.8% respectivamente. Todos estos análisis muestran la buena reproducibilidad y estabilidad del sensor en soluciones sintéticas de ambos analitos.

4.5. Estudio de la viabilidad para la detección simultánea de GSH y GSSG en muestras biológicas.

El análisis simultáneo de GSH y GSSG en muestras de orina y plasma de ratas Winstar se llevó a cabo para validar el uso del electrodo modificado con el nanocomposito en estas matrices complejas. Las muestras fueron enriquecidas con cantidades conocidas de GSH (0.5, 1, 3, 5 and 7 mM) y GSSG (0.15, 0.5, 1, 2 and 3 mM) y el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) fueron determinados bajo las mismas condiciones por DPV, como se describió anteriormente. Debido a la alta viscosidad de las muestras biológicas, estas fueron diluidas en PBS con un factor de dilución 3 para plasma y 2 para orina. De las curvas de calibración obtenidas el LOD fue determinado usando la ecuación $LOD = 3 (\text{ruido}) / \text{pendiente}$ de la ecuación de regresión lineal, de manera similar, el LOQ fue estimado usando la ecuación $LOQ = 10 (\text{ruido}) / \text{pendiente}$ de la ecuación de regresión lineal. La sensibilidad fue la pendiente de las líneas de calibración. La tabla 2.4 presenta los resultados obtenidos para el LOD, LOQ y sensibilidad. Los valores reportados con respecto a las muestras biológicas indican claramente una similitud con los valores obtenidos en solución desairada de buffer de fosfatos (pH 7.4), mostrando que el comportamiento del sensor no es afectado drásticamente por efectos de las matrices complejas durante el tiempo de manipulación experimental. Cabe mencionar que hay una ligera diferencia en el límite de detección y la sensibilidad para GSH y GSSG.

Tabla 2.4. Parámetros analíticos para la detección simultánea de GSH y GSSG en PBS, Orina, y Plasma usando DPV.

Biomarcador	LOD			LOQ			Sensitividad ($\mu\text{A}/\text{mM}$)		
	PBS	Orina	Plasma	PBS	Orina	Plasma	PBS	Orina	Plasma
GSH/ μM	100	130	220	280	320	470	9.7	9.2	6.4
GSSG/ μM	8.3	16.6	28.5	29	45	71	1.3	0.72	0.42

4.6. Estudio de interferentes.

Potenciales interferentes redox como ácido ascórbico, glicina, cisteína, ácido glutámico y glucosa fueron investigados, dada su presencia en muestras biológicas de interés. Soluciones 2 mmol L^{-1} de cada uno de estos componentes fueron preparadas bajo las mismas condiciones que para la mezcla 1 mmol L^{-1} de GSH/GSSG.

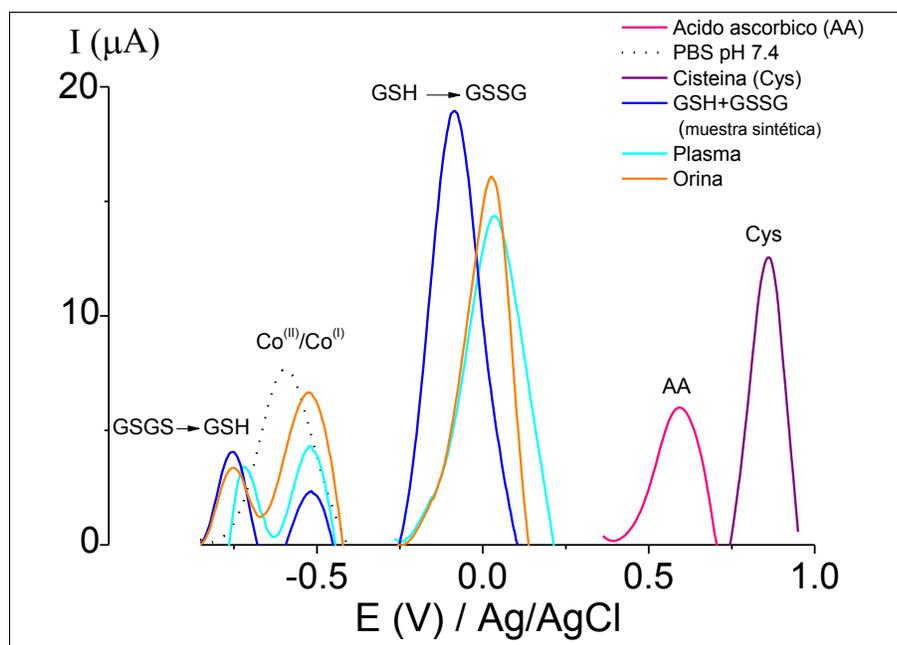


Figure 2.13. Estudio de los principales analitos interferentes: ácido ascórbico y cisteína en el análisis electroquímico del GSH y GSSG usando el electrodo modificado $\text{CoPc-MWCNT}_7/\text{GC}$. Las curvas DPV muestran el proceso de reducción de GSSG a $E = -0.750 \text{ V}$. En seguida en dirección anódica, el proceso redox de la ftalocianina de cobalto; $E = -0.560 \text{ V}$, la oxidación de GSH; $E = -0.100 \text{ V}$, la oxidación del ácido ascórbico; $E = 0.550 \text{ V}$ y la oxidación de la cisteína; $E = 0.790 \text{ V}$. Los parámetros DPV son los mismos que los mencionados en la figura 2.12.

La respuesta del sensor fue registrada para cada una de las sustancias individualmente y después consecutivamente fue adicionada a la solución de la mezcla GSH/GSSG en una relación 1:1 v/v. Como se puede ver en la figura 2.13, cuando el barrido de potencial se realiza entre 0.2 y 1.0 V, el ácido ascórbico y la cisteína son oxidados a 0.55 V y 0.79 V respectivamente. Es importante destacar que las señales que corresponden al proceso de reducción del GSSG ($E = -0.75$ V), el proceso redox de CoPc ($E = -0.56$ V) y la oxidación de GSH ($E = -0.10$ V) siguen siendo visibles independientemente de la presencia de interferencias. Con respecto a la glucosa y el ácido glutámico no se observa respuesta electroquímica. Para evitar la posible interferencia del ácido ascórbico y la cisteína, el barrido de potencial se ha realizado en dirección anódica desde -0.90 V a 0.20 V, y en dirección catódica barriendo del barrido de potencial se realizó desde 0.40 V a -0.90 V.

4.7. Ensayo espectrofotométrico para la detección de G-SH usando *N*-etilmaleimida.

Algunos de los métodos alternos que son propuestos para la detección de GSH en tejidos y sangre, se basan en el uso de agentes acomplejantes como *N*-etilmaleimida (NEM) para capturar y cuantificar selectivamente grupos tiol -SH presentes en moléculas como el GSH. El uso de NEM para la capturar de G-SH es considerado un procedimiento relativamente eficaz cuando se requiere de hacer la determinación y cuantificación de GSH de manera sencilla y rápida. Este estudio consiste básicamente en un ensayo espectrofotométrico, en donde la reacción entre los grupos -SH y NEM es monitoreada siguiendo el fenómeno de “*quenching de absorbancia*” que sufre NEM a una $\lambda = 300$ nm en función de la concentración de grupos -SH en la muestra ²¹.

La cinética de la reacción entre NEM y grupos -SH es mucho más rápida a pH neutro (con un tiempo de reacción oscila entre 1 y 15 min) en comparación con pH ácidos ^{76,77} ya que a pH ácido disminuye la nucleofilicidad de los tioles y se incrementa la posibilidad de su autooxidación ⁷⁸. El pH neutro de la solución permite reducir el exceso molar NEM. La completa alquilación de grupos tiol con NEM se ha llevado a cabo en estudios con proteínas simples a una relación aproximada de 1:15 a pH 7.3 ⁷⁸ y a una relación molar de 1:125 en preparaciones de tejido a pH 4.3 ⁷⁶.

A continuación se presenta un rápido y simple método espectrofotométrico para la determinación de GSH con *N*-etilmaleimida. La reacción se llevó a cabo en buffer PBS 0.1 M, pH 7.4 con 3.5 mM de NEM y concentraciones de GSH entre 100 y 500 μ M. La reacción es observada a 300 nm, considerando el coeficiente de extinción $\epsilon_{NEM} = 620 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una solución de NEM 3.5 mM es preparada en PBS y la absorbancia

a 301 nm es registrada como la señal del blanco. Posteriormente las soluciones sintéticas son leídas y al respecto se observa el fenómeno de quenching de absorbancia para NEM como se muestra en la figura 2.14, el cual es directamente proporcional al incremento de la concentración de GSH en la muestra. Las mediciones espectrofotométricas de llevaron a cabo en una celda de cuarzo de 1 cm. El cambio en la absorbancia es proporcional a la concentración de grupos -SH cuando NEM se presenta en un exceso mayor del 10 % en la solución.

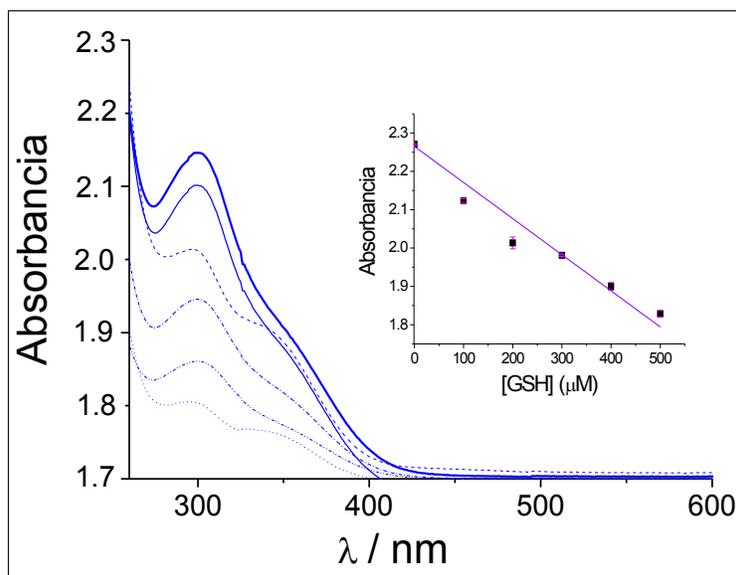


Figura 2.14. Espectro UV-vis para el comportamiento *quenching de absorción* sobre NEM en presencia de GSH a una $\lambda = 301$ nm. La mezcla de la reacción contiene 3.5 mM de NEM en buffer PBS 0.1 M, pH 7.4 con adición de concentraciones conocidas de GSH en un rango de 100 a 500 μ M.

En la tabla 2.5 se muestran los resultados obtenidos con este método, como método alternativo para la detección y cuantificación de GSH en plasma y orina. Se midió la absorbancia de 1 mL de solución 3.5 mM de NEM, este valor es registrado como el blanco para este bloque de experimentos. Soluciones de GSH 100 μ M y 200 μ M fueron adicionados a la celda de cuarzo (experimentos 2 y 3), la cual contiene 3.5 mM de NEM en una relación 1:1 (v/v), en ambos casos se registró el valor de la absorbancia para cada concentración. Enseguida se continuó con el análisis de las muestras de plasma (experimentos del 4 al 7), a la celda que contiene 3.5 de NEM se adicionan 250 μ L de plasma y 250 μ L de GSH 100 μ M. De este grupo de experimentos se obtuvo el valor de la absorbancia, la cual corresponde a la sumatoria de la concentración de GSH presente en la muestra de plasma y la concentración del estándar GSH adicionado. A partir de la ley de

Beer se calculó el valor real de la concentración de GSH en plasma, para lo cual se consideró el factor de dilución 10 para esta muestra biológica.

Para la muestra de orina se realizó un grupo de experimentos prácticamente bajo las mismas condiciones (experimentos del 8 al 11), en este caso a la celda se adicionaron 250 μL de plasma y 250 μL de GSH 200 μM . Las absorbancias fueron registradas para cada una de las muestras analizadas y utilizando estos valores se calculó la concentración real de GSH en la orina, cuyo factor de dilución es 5.

Cabe mencionar que cada conjunto de experimentos se llevó a cabo por triplicado.

Tabla 2.5. Se muestra el grupo de experimentos para la detección y cuantificación de GSH en plasma y orina, utilizando como método alternativo el ensayo espectrofotométrico con NEM.

Muestra	[NEM] 3.5 mM	Plasma *f _D 10	Orina *f _D 5	[GSH] _{adicionado} μM	Abs	[GSH] _{exp} μM	[GSH] _{real} / mM	
							Plasma	Orina
1	+	2.270	0.000		
2	+	100	2.125	100.235		
3	+	200	2.010	199.02		
4	+	Control		100	1.990	292.03	1.92 ± 0.2	
5	+	M ₁			1.908	398.12	2.98 ± 0.15	
6	+	M ₂			1.866	479.26	3.79 ± 0.15	
7	+	M ₃			1.949	356.28	2.56 ± 0.1	
8	+		Control	200	2.000	274.12		0.37 ± 0.05
9	+		M ₁		1.949	356.30		0.78 ± 0.04
10	+		M ₂		1.936	378.11		0.89 ± 0.05
11	+		M ₃		1.966	328.08		0.64 ± 0.05

*Muestras 1,2,3 (M₁, M₂, M₃)

*f_D: factor de dilución (10) para plasma ; (5) para orina.

4.8. Análisis simultáneo de GSH y GSSG en muestras de plasma y orina de rata Wistar como matrices biológicas y su asociación con la toxicidad con plomo.

En el presente estudio los biomarcadores GSH y GSSG han sido considerados para evaluar el fenómeno de estrés oxidativo en ratas Wistar. El análisis fue llevado a cabo en tres muestras de orina y tres muestras de plasma cada una en triplicado y los resultados son presentados como la media \pm SD of *n* experimentos independientes. Por comparación, las muestras fueron analizadas usando un ensayo espectrofotométrico con NEM (*N*-etilmaleimida). Los resultados obtenidos por el método electroquímico propuesto y el espectroscópico permiten obtener datos similares (Tabla 2.6), promoviendo con ello niveles satisfactorios de confiabilidad entre las mediciones. Los datos relacionados al efecto de intoxicación con plomo sobre los

niveles de GSH y GSSG en el organismo, pre- y post-tratamiento con acetato de plomo, son presentados en la tabla 2.6. El mecanismo de toxicidad con plomo aún no está claramente comprendido ³, y en nuestras muestras, la evaluación independiente de la concentración de GSH y GSSG muestran un incremento significativo en la concentración de GSH. También los niveles de GSSG, tanto en orina, como en plasma (post-intoxicación) incrementa con respecto a los valores de las muestras control (pre-intoxicación). En general la variación en los niveles de GSH depende del animal u organismo vivo bajo estudio, el proceso de intoxicación implementado, y/o la patofisiología expresada y el tipo de fluido biológico que es analizado ^{3,9,72,79}. En ratas Wistar ha sido reportado que bajo estrés oxidativo, los niveles de GSH incrementan en plasma¹³, suero, músculo esquelético⁸⁰, médula espinal lumbosacral⁸¹, riñones⁸² e hígado⁸⁰, por el contrario este decrece en nervio ciático⁸³, hígado⁸² y cerebro⁸⁴. El incremento en los niveles de GSSG puede estar asociado o conectado con la actividad celular redox para proteger el tejido después del daño oxidativo. Al respecto se ha reportado que los niveles de GSSG incrementan en plasma, pulmón y cerebro¹³, hígado^{13,84} y riñones⁸². Los resultados que se obtuvieron y que aquí se presentan para cada biomarcador en las muestras post-intoxicación pueden ser considerados una consecuencia por la exposición al plomo. La exposición al plomo causa múltiples patologías incluyendo disfunción renal, desencadenando estrés oxidativo y al mismo tiempo la estimulación del mecanismo de defensa antioxidante incrementando la secreción de GSH, el cual protege a la células del ataque por ROS y al mismo tiempo es generado el GSSG como producto, el cual es considerado un metabolito marcador de daño celular ^{3,72}. La relación GSH/GSSG es entonces considerada como un importante indicador que puede ser usado para establecer el estado oxidativo ^{81,85,86}. Usando como modelo ratas Wistar que han sido intoxicadas para provocar estrés oxidativo, estudios previos han reportado un decremento de la relación GSH/GSSG en plasma (control 10; post-lesión 5)⁸⁷, hígado (control 4.8; post-lesión 2.9), cerebro (control 4.8; post-lesión 2.9) y (control 4.5; post-lesión 2.7)⁸⁴, riñón (control 4; post-lesión 1.5)⁸², y también pulmón (control 10.3; post-lesión 7)¹³. Nuestros resultados usando el sensor electroquímico en plasma también muestra un decremento en la relación GSH/GSSG después de la intoxicación con plomo (control 4.5; post-lesión 2.6). Esto demuestra la satisfactoria aplicación del método electroquímico propuesto para la detección y cuantificación de GSH y GSSG y la relación GSH/GSSG en muestras de plasma y orina de ratas Wistar, lo cual abre la posibilidad para su uso en futuros estudios toxicológicos.

Tabla 2.6. Valores de concentración para GSH y GSSG \pm SD obtenidos por el método electroanalítico propuesto. También la variación en la relación GSH/GSSG en plasma y orina de ratas Wistar fue analizada pre- y post-intoxicación con plomo.

GSH y GSSG valores de concentración en plasma de ratas Wistar							
MUESTRAS	GS-H /mM $\pm \sigma$		GS-H /mM $\pm \sigma$		GS-SG /mM $\pm \sigma$	GSH/GSSG	
	Ensayo espectrofotometrico						
Plasma control	1.11	± 0.07	1.92	± 0.18	0.247	± 0.006	4.5
Post-intoxicación 1	2.18	± 0.02	2.98	± 0.13	0.966	± 0.002	2.3
Post-intoxicación 2	3.14	± 0.03	3.79	± 0.15	0.979	± 0.001	3.2
Post-intoxicación 3	2.08	± 0.02	2.56	± 0.12	0.925	± 0.001	2.2

GSH y GSSG valores de concentración en orina de ratas Wistar							
MUESTRAS	GS-H /mM $\pm \sigma$		GS-H /mM $\pm \sigma$		GS-SG /mM $\pm \sigma$	GSH/GSSG	
	Ensayo espectrofotometrico						
Orina control	0.13	± 0.01	0.37	± 0.03	<LD ^{b)}	--	--
	\approx LD ^{a)}						
Post-intoxicación 1	0.65	± 0.01	0.78	± 0.04	0.485	± 0.001	1.3
Post-intoxicación 2	0.76	± 0.02	0.89	± 0.05	0.613	± 0.001	1.2
Post-intoxicación 3	0.57	± 0.02	0.64	± 0.05	0.563	± 0.001	1.0

- a) Cabe destacar que en estas muestras la concentración obtenida fue estadísticamente similar al límite de detección listado en la Tabla 1 para este fluido.
 b) La concentración obtenida fue inferior al límite de detección listado en la Tabla 1 para este fluido.

4.9. Análisis de Pb en sangre por espectroscopia de absorción atómica.

En este estudio se demuestra que la exposición al plomo en una concentración 50 mg_{PbAc} induce estrés oxidativo en ratas Wistar. De tal manera que para validar y verificar la intoxicación de los animales se planteó el objetivo de evaluar el contenido de plomo en sangre ^{88,89,90}.

Después del tratamiento de intoxicación con PbAc las ratas fueron anestesiadas con éter y consecutivamente se tomaron las muestras de sangre por punción de corazón. Las muestras de sangre total fueron desproteinizadas con HNO₃ al 15%, el sobrenadante es extraído y centrifugado a 5000 rpm/7 minutos. En seguida el sólido fue separado de la parte acuosa y ésta posteriormente diluida con HNO₃ al 1.5% en una relación 1:5. La concentración de plomo metálico fue determinada en sangre total por medio de espectroscopía de absorción atómica usando un espectrofotómetro (AAS Perkin-Elmer modelo AAnalyst 200) ^{88,91}. Las condiciones impuestas para esta técnica de análisis fueron el uso de Aire-acetileno como gas generador de la flama. La longitud de onda para la determinación del elemento fue 217.0 nm⁹². El análisis fue sujeto al método de curva de calibración (en un rango lineal de 0.1 a 40 μ M) usando soluciones adecuadas de

estándar de plomo. Las muestras fueron analizadas por triplicado para obtener los valores estadísticos correspondientes a la concentración media, la desviación estándar y el % de error.

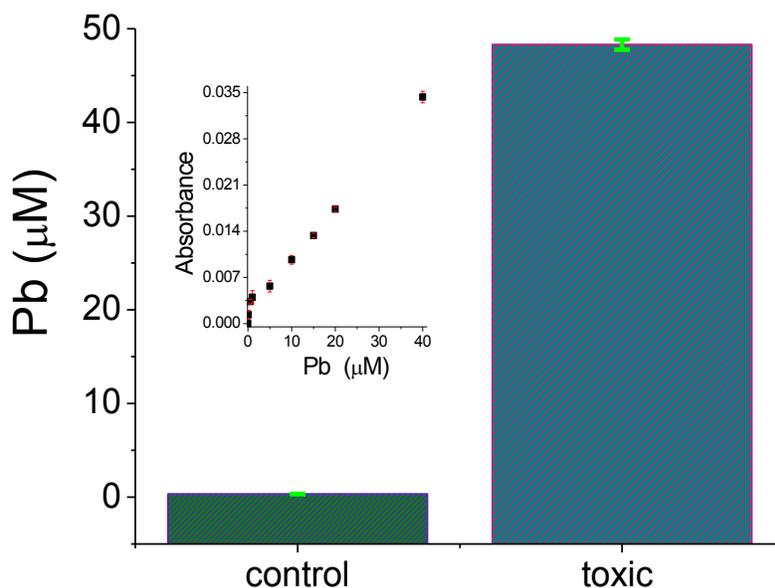


Figura 2.15. Niveles de plomo en sangre de ratas Wistar intoxicadas con AaPb (grupo toxic) y no intoxicadas (control). Inserto se muestra la curva de calibración correspondiente.

En la figura 2.15 se muestra la gráfica de barras que representan la concentración media de plomo en sangre, la cual es significativamente mayor para el grupo intoxicado ($48.3 \pm 0.9 \mu\text{M}$) que para el grupo control ($0.34 \pm 0.008 \mu\text{M}$). Al respecto, numerables grupos de trabajo dedicados al estudio de intoxicación de ratas con acetato de plomo mencionan que después de exceder la concentración crítica ($\approx 35 \text{ mg}_{\text{PbAc}}/\text{kg}_{\text{corporal de RW}}$) de AcPb, se incrementa el padecimiento de fenómenos fisiopatológicos como estrés oxidativo entre otros^{75,91}. La acumulación de plomo en sangre es considerado como un parámetro importante que suele ser relacionado con el efecto tóxico y su asociación a estrés oxidativo⁹³. De tal manera que los resultados reportados en esta sección confirman la validación de toxicidad promovida por AcPb en ratas Wistar.

Con respecto a estos resultados, en el **Anexo II** se presentan algunos efectos físicos (tumores abdominales) generados por la intoxicación de las ratas con plomo y su asociación al estrés oxidativo.

5. CONCLUSIÓN PARCIAL

La detección directa de GSH y GSSG e muestras biológicas siempre ha sido un foco de atención dentro del area de las ciencias biomédicas. En este trabajo, hemos demostrado un método electroquímico para el análisis de GSH y GSSG como biomarcadores antioxidantes en fluidos biológicos (plasma y orina de ratas). De manera particular se ha puesto atención a la detección de GSSG, el cual no había sido evaluado directamente en muestras biológicas utilizando métodos electroquímicos. El método electroquímico aquí descrito está basado en un material híbrido (*CoPc/MWCNT_f/GC*), el cual ha demostrado funcionar adecuadamente como un sensor en la detección y cuantificación de GSH y GSSG. Específicamente hemos validado el uso del sensor durante fenómenos de intoxicación con plomo en organismos vivos modelo. Los valores de los parámetros analíticos, límites de detección y cuantificación en muestras sintéticas y reales, son un indicativo de la funcionalidad del sensor para el análisis simultáneo de ambas especies. La interferencia de ácido ascórbico, cisteína y ácido glutámico fue estudiada, ácido ascórbico y cisteína dieron señales electroquímicas en una ventana de potencial más positiva que aquella requerida para la detección de GSH y GSSG. El método aquí descrito explica las interferencias de estas especies activas redox en la matriz biológica. Finalmente es posible la aplicación del método electroquímico propuesto, sin el uso de manipulaciones extensivas, tales como reacciones enzimáticas, fuertes oxidantes y pasos de separación, lo cual limita la capacidad de detección y agrega incertidumbre a la determinación de la relación de glutatión oxidado y reducido.

6. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- (1) Kim, E.; Winkler, T. E.; Kitchen, C.; Kang, M.; Banis, G.; Bentley, W. E.; Kelly, D. L.; Ghodssi, R.; Payne, G. F. *Analytical Chemistry* **2017**, *89*, 1583-1592.
- (2) Jones, D. P.; Sies, H. *Antioxidants & Redox Signaling* **2015**, *23*, 734-746.
- (3) Labib, M.; Sargent, E. H.; Kelley, S. O. *Chemical Reviews* **2016**, *116*, 9001-9090.
- (4) Vendemiale, G.; Grattagliano, I.; Altomare, E. *International Journal of Clinical & Laboratory Research* **1999**, *29*, 49-55.
- (5) Cheesman, B. V.; Arnold, A. P.; Rabenstein, D. L. *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 6359-6364.
- (6) Harfield, J. C.; Batchelor-McAuley, C.; Compton, R. G. *Analyst* **2012**, *137*, 2285-2296.
- (7) Bellinger, D. C. *Current Opinion in Pediatrics* **2008**, *20*, 172-177.
- (8) Dewanjee, S.; Sahu, R.; Karmakar, S.; Gangopadhyay, M. *Food and Chemical Toxicology* **2013**, *55*, 78-91.

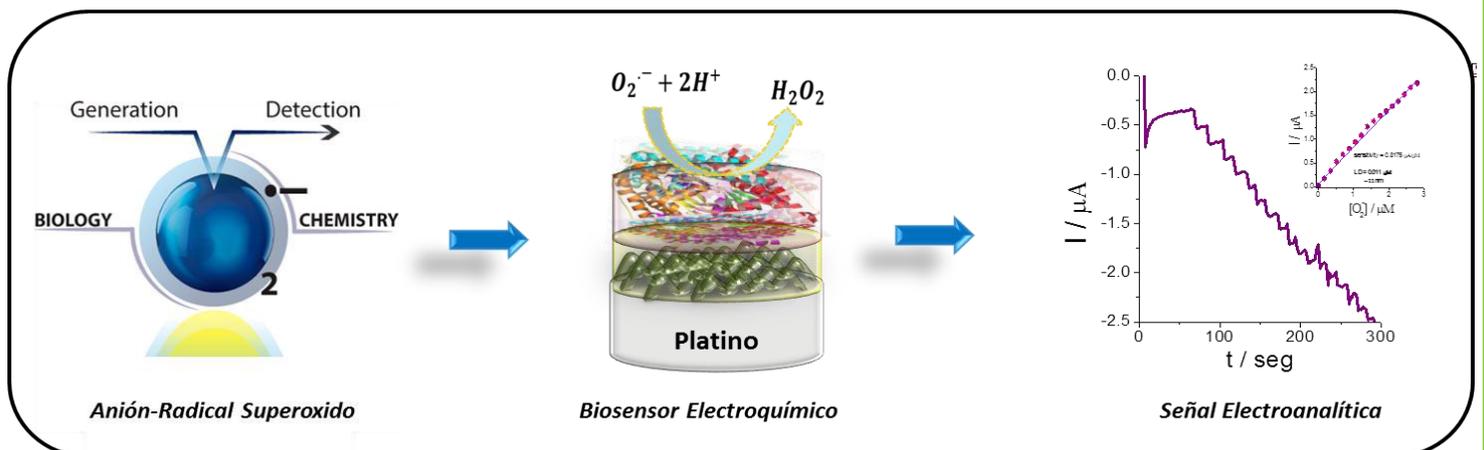
- (9) Fahrenholz, T.; Wolle, M. M.; Kingston, H. M.; Faber, S.; Kern, J. C.; Pamuku, M.; Miller, L.; Chatragadda, H.; Kogelnik, A. *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 1232-1240.
- (10) Townsend, D. M.; Tew, K. D.; Tapiero, H. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2003**, *57*, 145-155.
- (11) Monostori, P.; Wittmann, G.; Karg, E.; Turi, S. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2009**, *877*, 3331-3346.
- (12) Vidyasagar, M. S.; Kodali, M.; Saxena, P. P.; Upadhy, D.; Krishna, C. M.; Vadhiraja, B. M.; Fernandes, D. J.; Sadashiva, S. R. B. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **2010**, *78*, 343-349.
- (13) Yeh, C. C.; Hou, M. F.; Wu, S. H.; Tsai, S. M.; Lin, S. K.; Hou, L. A.; Ma, H.; Tsai, L. Y. *Cell Biochemistry and Function* **2006**, *24*, 555-559.
- (14) Shaik, I. H.; Mehvar, R. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *385*, 105-113.
- (15) Patel, C. B.; Wang, C.; Zhang, J.; Dong, L. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **2005**, *63*, S523-S523.
- (16) Pires, M. M.; Chmielewski, J. *Organic Letters* **2008**, *10*, 837-840.
- (17) Huang, K. J.; Xu, C. X.; Xie, W. Z.; Zhang, H. S.; Wang, H. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2008**, *69*, 437-442.
- (18) Trabesinger, A. H.; Weber, O. M.; Duc, C. O.; Boesiger, P. *Magnetic Resonance in Medicine* **1999**, *42*, 283-289.
- (19) New, L. S.; Chan, E. C. Y. *Journal of Chromatographic Science* **2008**, *46*, 209-214.
- (20) Asensi, M.; Sastre, J.; Pallardo, F. V.; Delaasuncion, J. G.; Estrela, J. M.; Vina, J. *Analytical Biochemistry* **1994**, *217*, 323-328.
- (21) Giustarini, D.; Dalle-Donne, I.; Colombo, R.; Milzani, A.; Rossi, R. *Free Radical Biology and Medicine* **2003**, *35*, 1365-1372.
- (22) Nemeth, I.; Boda, D. *Free Radical Biology and Medicine* **1994**, *16*, 347-353.
- (23) Camera, E.; Picardo, M. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2002**, *781*, 181-206.
- (24) Patterson, A. D.; Li, H.; Eichler, G. S.; Krausz, K. W.; Weinstein, J. N.; Formace, A. J.; Gonzalez, F. J.; Idle, J. R. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 665-674.
- (25) Agrawal, K.; Wu, H. F. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, *22*, 283-290.
- (26) Beckers, J. L.; Bocek, P. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2747-2767.
- (27) Mala, Z.; Krivankova, L.; Gebauer, P.; Bocek, P. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 243-253.
- (28) Bayle, C.; Causse, E.; Couderc, F. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1457-1472.
- (29) Muzakova, V.; Skalicky, J.; Kandar, R. *Febs Journal* **2006**, *273*, 201-201.
- (30) Ates, B.; Ercal, B. C.; Manda, K.; Abraham, L.; Ercal, N. *Biomedical Chromatography* **2009**, *23*, 119-123.
- (31) Sakhi, A. K.; Russnes, K. M.; Smeland, S.; Blomhoff, R.; Gundersen, T. E. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1104*, 179-189.
- (32) Vovk, T.; Bogataj, M.; Roskar, R.; Kmetec, V.; Mrhar, A. *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, *291*, 161-169.
- (33) Cabral, C. B.; Bullock, K. H.; Bischoff, D. J.; Tompkins, R. G.; Yu, Y. M.; Kelleher, J. K. *Analytical Biochemistry* **2008**, *379*, 40-44.
- (34) Seiwert, B.; Karst, U. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 7131-7138.
- (35) Hoque, M. E.; Amett, S. D.; Lunte, C. E. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2005**, *827*, 51-57.
- (36) Zinellu, A.; Sotgia, S.; Scanu, B.; Usai, M. F.; Fois, A. G.; Spada, V.; Deledda, A.; Deiana, L.; Pirina, P.; Carru, C. *Amino Acids* **2009**, *37*, 395-400.
- (37) Luz, R. C. S.; Maroneze, C. M.; Tanaka, A. A.; Kubota, L. T.; Gushikem, Y.; Damos, F. S. *Microchimica Acta* **2010**, *171*, 169-178.
- (38) Pereira-Rodrigues, N.; Cofre, R.; Zagal, J. H.; Bedioui, F. *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 147-154.

- (39) Ruiz-Diaz, J. J. J.; Torriero, A. A. J.; Salinas, E.; Marchevsky, E. J.; Sanz, M. I.; Raba, J. *Talanta* **2006**, 68, 1343-1352.
- (40) Khaleghi, F.; Khalilzadeh, M. A.; Raof, J. B.; Tajbakhsh, M.; Karimi-Maleh, H. *Journal of Applied Electrochemistry* **2009**, 39, 1651-1654.
- (41) Raof, J. B.; Ojani, R.; Baghayeri, M. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2009**, 143, 261-269.
- (42) Abiman, P.; Wildgoose, G. G.; Compton, R. G. *Electroanalysis* **2007**, 19, 437-444.
- (43) Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; Tanaka, A. A.; Kubota, L. T.; Gushikem, Y. *Talanta* **2008**, 76, 1097-1104.
- (44) Salimi, A.; Hallaj, R. *Talanta* **2005**, 66, 967-975.
- (45) Ndamanisha, J. C.; Bai, J.; Qj, B.; Guo, L. *Analytical Biochemistry* **2009**, 386, 79-84.
- (46) Bhattacharyay, D.; Dutta, K.; Banerjee, S.; Turner, A. P. F.; Sarkar, P. *Electroanalysis* **2008**, 20, 1947-1952.
- (47) Lezna, R. O.; Juanto, S.; Zagal, J. H. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1998**, 452, 221-228.
- (48) Nekrassova, O.; White, P. C.; Threlfell, S.; Hignett, G.; Wain, A. J.; Lawrence, N. S.; Davis, J.; Compton, R. G. *Analyst* **2002**, 127, 797-802.
- (49) Zagal, J. H. *Coordination Chemistry Reviews* **1992**, 119, 89-136.
- (50) Griveau, S.; Pavez, J.; Zagal, J. H.; Bedioui, F. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2001**, 497, 75-83.
- (51) Cardenas-Jiron, G. I.; Caro, C. A.; Venegas-Yazigi, D.; Zagal, J. H. *Journal of Molecular Structure-Theochem* **2002**, 580, 193-200.
- (52) Griveau, S.; Gulppi, M.; Pavez, J.; Zagal, J. H.; Bedioui, F. *Electroanalysis* **2003**, 15, 779-785.
- (53) Chee, S. Y.; Flegel, M.; Pumera, M. *Electrochemistry Communications* **2011**, 13, 963-965.
- (54) Zagal, J. H.; Griveau, S.; Santander-Nelli, M.; Gutierrez Granados, S.; Bedioui, F. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2012**, 16, 713-740.
- (55) Britto, P. J.; Santhanam, K. S. V.; Ajayan, P. M. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1996**, 41, 121-125.
- (56) Kitano, H.; Tachimoto, K.; Anraku, Y. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, 306, 28-33.
- (57) Lawrence, N. S.; Deo, R. P.; Wang, J. *Talanta* **2004**, 63, 443-449.
- (58) Hiura, H.; Ebbesen, T. W.; Tanigaki, K. *Advanced Materials* **1995**, 7, 275-276.
- (59) Belin, T.; Epron, F. *Materials Science and Engineering B-Solid State Materials for Advanced Technology* **2005**, 119, 105-118.
- (60) Gooding, J. J. *Electrochimica Acta* **2005**, 50, 3049-3060.
- (61) Silva, J. F.; Griveau, S.; Richard, C.; Zagal, J. H.; Bedioui, F. *Electrochemistry Communications* **2007**, 9, 1629-1634.
- (62) Zagal, J. H.; Griveau, S.; Silva, J. F.; Nyokong, T.; Bedioui, F. *Coordination Chemistry Reviews* **2010**, 254, 2755-2791.
- (63) Murakami, H.; Nakamura, G.; Nomura, T.; Miyamoto, T.; Nakashima, N. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2007**, 11, 418-427.
- (64) Ye, J. S.; Wen, Y.; Zhang, W. D.; Cui, H. F.; Xu, G. Q.; Sheu, F. S. *Electroanalysis* **2005**, 17, 89-96.
- (65) Moraes, F. C.; Mascaro, L. H.; Machado, S. A. S.; Brett, C. M. A. *Talanta* **2009**, 79, 1406-1411.
- (66) de la Torre, G.; Blau, W.; Torres, T. *Nanotechnology* **2003**, 14, 765-771.
- (67) Siswana, M. P.; Ozoemena, K. I.; Nyokong, T. *Electrochimica Acta* **2006**, 52, 114-122.
- (68) Caro, C. A.; Bedioui, F.; Zagal, J. H. *Electrochimica Acta* **2002**, 47, 1489-1494.
- (69) Ozoemena, K. I.; Pillay, J.; Nyokong, T. *Electrochemistry Communications* **2006**, 8, 1391-1396.
- (70) Griveau, S.; Albin, V.; Pauporte, T.; Zagal, J. H.; Bedioui, F. *Journal of Materials Chemistry* **2002**, 12, 225-232.
- (71) Qi, X. H.; Baldwin, R. P. *Journal of the Electrochemical Society* **1996**, 143, 1283-1287.
- (72) Gulppi, M. A.; Paez, M. A.; Costamagna, J. A.; Cardenas-Jiron, G.; Bedioui, F.; Zagal, J. H. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2005**, 580, 50-56.

- (73) Martinez-Alfaro, M.; Ramirez-Garcia, G.; Gutierrez-Granados, S.; Alcaraz-Contreras, Y.; Gallegos-Corona, M. A.; de Larrea, G. Z. L.; Carabez-Trejo, A. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2013**, *27*, 364-369.
- (74) Rossi, R.; Milzani, A.; Dalle-Donne, I.; Giustarini, D.; Lusini, L.; Colombo, R.; Di Simplicio, P. *Clinical Chemistry* **2002**, *48*, 742-753.
- (75) Pande, M.; Mehta, A.; Pant, B. P.; Flora, S. J. S. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2001**, *9*, 173-184.
- (76) Rogers, L. K.; Leinweber, B. L.; Smith, C. V. *Analytical Biochemistry* **2006**, *358*, 171-184.
- (77) Scotcher, J.; Clarke, D. J.; Weidt, S. K.; Mackay, C. L.; Hupp, T. R.; Sadler, P. J.; Langridge-Smith, P. R. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2011**, *22*, 888-897.
- (78) Bagiyan, G. A.; Koroleva, I. K.; Soroka, N. V.; Ufimtsev, A. V. *Russian Chemical Bulletin* **2003**, *52*, 1135-1141.
- (79) Venkareddy, L. K.; Muralidhara. *Neurotoxicology* **2015**, *48*, 142-151.
- (80) Lukaszewicz-Hussain, A. *Medycyna Pracy* **2011**, *62*, 23-29.
- (81) Cruzat, V. F.; Tirapegui, J. *Nutrition* **2009**, *25*, 428-435.
- (82) Guedes, R. P.; Dal Bosco, L.; Araujo, A. S. D.; Bello-Klein, A.; Ribeiro, M. F. M.; Partata, W. A. *Brain Research Bulletin* **2009**, *80*, 422-427.
- (83) Jimenez, R.; Galan, A. I.; de Buitrago, J. M. G.; Palomero, J.; Munoz, M. E. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **2000**, *27*, 991-996.
- (84) Dudhgaonkar, S. P.; Tandan, S. K.; Kumar, D.; Naik, A. K.; Raviprakash, V. *European Journal of Pain* **2007**, *11*, 528-534.
- (85) Satpute, R. M.; Lomash, V.; Hariharakrishnan, J.; Rao, P.; Singh, P.; Gujar, N. L.; Bhattacharya, R. *Toxicology and Industrial Health* **2014**, *30*, 12-24.
- (86) Ghezzi, P. *Free Radical Research* **2005**, *39*, 573-580.
- (87) Castela, A.; Gomes, P.; Domingues, V. F.; Paiga, P.; Costa, R.; Vendeira, P.; Costa, C. *Journal of Diabetes* **2015**, *7*, 393-401.
- (88) Gassowska, M.; Baranowska-Bosiacka, I.; Moczydlowska, J.; Frontczak-Baniewicz, M.; Gewartowska, M.; Struzynska, L.; Gutowska, I.; Chlubek, D.; Adamczyk, A. *Toxicology* **2016**, *373*, 13-29.
- (89) Kang, H. G.; Jeong, S. H.; Cho, M. R.; Cho, J. H.; Bischoff, K. *Human & Experimental Toxicology* **2009**, *28*, 647-654.
- (90) Xu, S. Z.; Bullock, L.; Shan, C. J.; Cornelius, K.; Rajanna, B. *International Journal of Developmental Neuroscience* **2005**, *23*, 53-64.
- (91) Skoczynska, A.; Smolik, R.; Jelen, M. *Archives of Toxicology* **1993**, *67*, 200-204.
- (92) Ngwoke, K. G.; Uzoabaka, T. C.; Ezemokwe, I.; Esimone, C. *Polish Journal of Environmental Studies* **2015**, *24*, 1717-1721.
- (93) Reckziegel, P.; Dias, V. T.; Benvegnu, D. M.; Boufleur, N.; Barcelos, R. C. S.; Segat, H. J.; Pase, C. S.; dos Santos, C. M. M.; Flores, E. M. M.; Burger, M. E. *Toxicology Reports* **2016**, *3*, 351-356.

CAPITULO III

Análisis amperométrico de superóxido con un biosensor de alta respuesta enzimática a base de PEDOT y Superóxido dismutasa.



1. INTRODUCCIÓN Y ESTADO DEL ARTE

1.1. Principales características del superóxido en sistemas biológicos.

Entre las especies reactivas de oxígeno a nivel biológico se encuentra el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) el cual es generado como intermediario reducido de oxígeno molecular ^{1,2}. La principal fuente de superóxido en las células proviene a partir de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y el retículo endoplásmico ³. Bajo condiciones metabólicas normales los ROS son producidos a una velocidad la cual no excede la capacidad del tejido para catabolizar dichas especies ⁴. De lo contrario cuando la producción de $O_2^{\cdot-}$ excede la capacidad natural del organismo para su dismutación este potencial oxidante desencadena procesos de citotoxicidad dando lugar a ciertas enfermedades incluyendo el cáncer y enfermedades crónico degenerativas ^{5,6}. Bajo condiciones fisiológicas normales la concentración de $O_2^{\cdot-}$ se ha registrado en valores que van de 10 a 100 nM ^{7,8}, este bajo nivel de concentración se atribuye a la alta capacidad de la SOD para su dismutación y a la alta reactividad con otras moléculas pequeñas ⁹.

Esta especie reactiva de oxígeno es un indicador biológico que puede ser asociado con el estrés oxidativo que padecen los organismos vivos bajo ciertas alteraciones fisiopatológicas. De tal manera que surge un especial interés por realizar determinaciones de $O_2^{\cdot-}$ en muestras biológicas, lo cual permitirá una mejor comprensión del estado oxidativo. Sin embargo existe una gran complejidad para establecer metodologías de análisis debido a la reactividad del $O_2^{\cdot-}$, esta característica en particular hace difícil mantener al anión-radical en un estado estable por un largo tiempo ¹⁰.

1.2. Generación de superóxido.

Métodos simples, pero confiables deben de ser usados para preparar adecuadamente especies radicales como el $O_2^{\cdot-}$ para su estudio en sistemas químicos y bioquímicos. La producción de $O_2^{\cdot-}$ puede ser posible por métodos: i) biológicos ¹¹, ii) químicos ¹² y iii) electroquímicos ^{13,14,15}.

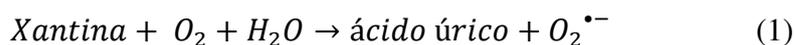
1.2.1. Generación química de superóxido.

El $O_2^{\cdot-}$ puede ser generado químicamente a partir de sales de metales alcalinos, tales como sodio y potasio. El superóxido de potasio (KO_2) es una sal estable de color amarillo o anaranjado ^{16,17}. Algunos grupos especializados han investigado la toxicidad y actividad del $O_2^{\cdot-}$ en sistemas biológicos utilizando

como principal productor del anión-radical el KO_2 ¹⁸. El tipo de medio prótico o aprótico juega un roll importante en la generación de superóxido estable. En solución acuosa el $\text{O}_2^{\bullet-}$ tiene un tiempo de vida corto, pero en soluciones fuertemente alcalinas es posible producir $\text{O}_2^{\bullet-}$ en un estado más estable. Debido sobre la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a partir de sales de supeóxido. Esto es probablemente se debe a que la concentración de OH^- tiene un efecto dominante que evita la protonación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ cuando el poder de alcalinidad incrementa¹⁹.

1.2.2. Generación biológica de superóxido

La producción enzimática artificial de $\text{O}_2^{\bullet-}$ ha sido mayormente empleado como un ensayo enzimático *in vitro*. Este ensayo enzimático consiste en la reacción de xantina con xantina oxidasa para generar como productos superóxido y ácido úrico (ecuación 1)²⁰.



Las moléculas de superóxido tienen un tiempo de vida corto ($k_1 = 1.4 \text{ s}^{-1}$) por lo cual se descomponen espontáneamente a peróxido de hidrógeno con una k_2 de $2.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (ecuación 2)²¹.



1.3. Métodos de detección del superóxido.

Numerosos métodos has sido usados para la detección de $\text{O}_2^{\bullet-}$ generado en diferentes medios. Estos métodos son utilizados en sistemas biológicos y químicos y son mayoritariamente indirectos. La detección de $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede estar basada en sus propiedades redox o en reacciones químicas del anión-radical para producir un compuesto relativamente estable y fácilmente detectable^{22 23}.

Los métodos de detección pueden ser clasificados dentro de los métodos espectrofotométricos y no espectrofotométricos²⁴. La siguiente figura 3.1 muestra un diagrama de flujo de los métodos de detección más conocidos para $\text{O}_2^{\bullet-}$ en ambos sistemas biológicos y químicos.

1.3.1. Métodos espectrofotométricos.

1.3.1.1. UV-vis.

Un espectrofotómetro UV-vis fue empleado para la detección de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a una λ de 255 en solventes apróticos¹⁰ y a una λ de 245 en soluciones acuosas²⁵. Este método puede ser aplicado para el monitoreo

de $O_2^{\bullet-}$ por un largo periodo, bajo ciertas consideraciones experimentales; sin embargo presenta algunas limitaciones que causan dificultades técnicas.

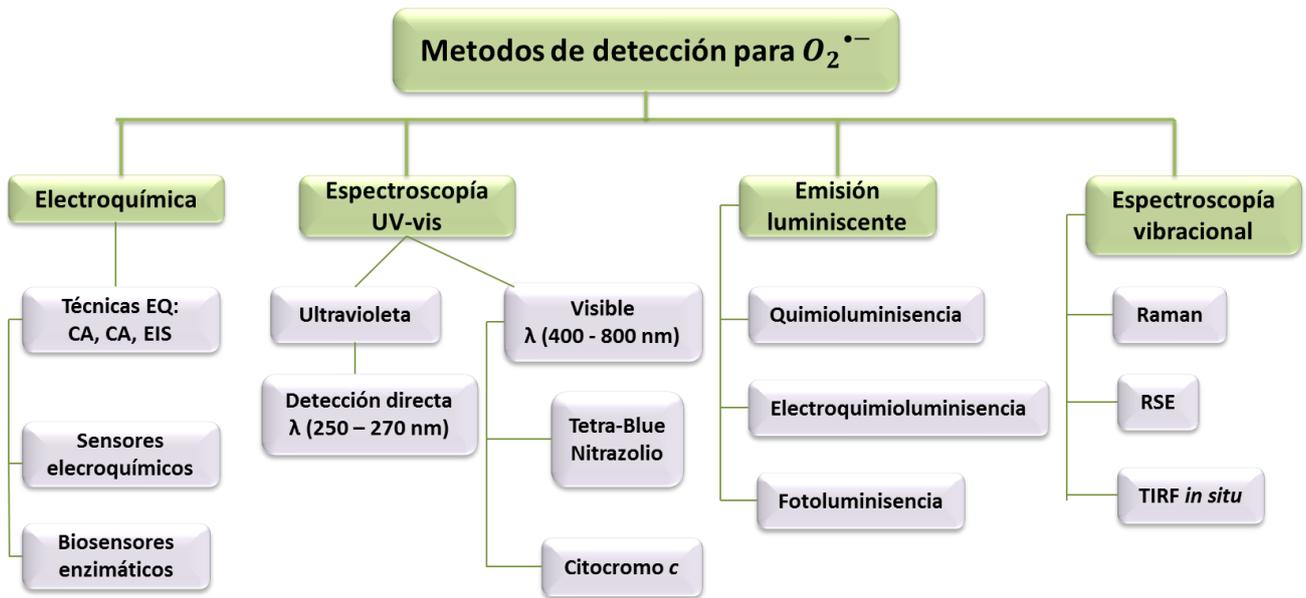


Figura 3.1. Esquema representativo de los métodos de detección para $O_2^{\bullet-}$ 10

1.3.1.2. Reducción de NTB

Una de las alternativas espectroscópicas para la detección de $O_2^{\bullet-}$ en sistemas biológicos es utilizando compuestos como el nitrotetrazolio azul (por sus siglas en inglés, NBT_Nitro Blue Tetrazolium) 26.

Algunos estudios al respecto han reportado el uso frecuente de capturadores de radicales y reactivos orgánicos tales como NBT para la detección de $O_2^{\bullet-}$ 27. En este caso particular la reacción ocurre mediante la reducción del NBT por el $O_2^{\bullet-}$ reduce NBT para dar como producto un diformazan de color azul, el cual puede ser monitoreado por métodos espectrofotométrico. El ensayo colorimétrico con NBT normalmente requiere de un medio básico y disolución en DMSO para la obtención de resultados cuantitativos en la detección de $O_2^{\bullet-}$ 28.

Sin embargo, el NBT es insoluble en agua y su precipitación provoca inconsistencias en las lecturas de la absorbancia. De tal manera que algunos derivados de NBT han sido modificados para obtener productos solubles en agua y de fácil adquisición comercial. Dentro de estos derivados se encuentra el ácido 3'-{1-[(fenilamino)-carbonil]-3,4-tetrazolium}-bis(4-metoxi-6-nitro) bezenosulfónico (XTT) entre

otros ^{26 28} La solubilidad del XTT está limitada a < 2 mM y este debe de ser calentado hasta 50 °C aproximadamente para la preparación de las soluciones. Esta sal de tetrazolium es reducida en presencia de $O_2^{\bullet-}$ ($k = 8.59 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para generar un formazan estable (figura 3.2). Este formazan de color rojo puede ser monitoreado cuantificando la máxima absorbancia a una longitud de onda de 470 nm y un coeficiente de extinción $\epsilon_{470 \text{ nm}} = 21.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ²⁹.

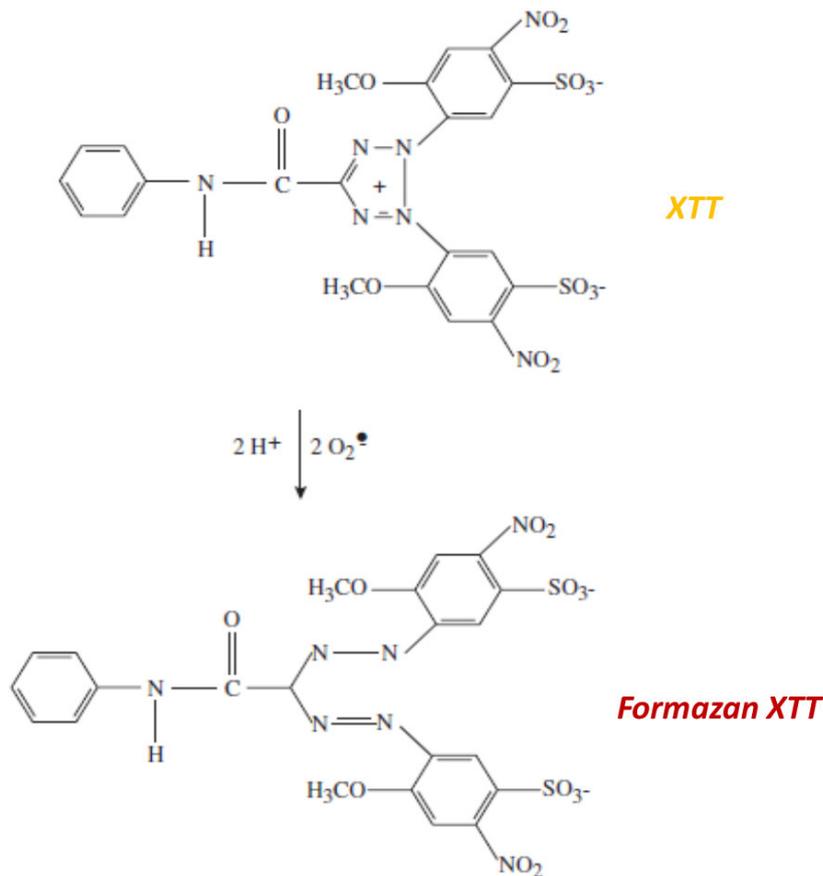
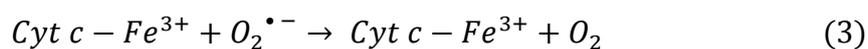


Figura 3.2. Reacción de reducción univalente de XTT generando como producto su respectivo formazan, en presencia del radical-anión superóxido ²⁹.

1.3.1.3. Reducción de Citocromo c.

El Citocromo c (Cyt c) también ha sido utilizado ampliamente para la detección de $O_2^{\bullet-}$ en sistemas biológicos principalmente, gracias a su rápida reducción a $Cyt\ c^{2+}$ provocada por el radical-anión superóxido ³⁰, de acuerdo con la ecuación:



El Cyt c puede ser reducido por $O_2^{\bullet-}$ lo cual resulta en un cambio de coloración que va del rojo al incoloro³¹. Este método ha sido empleado para monitorear la velocidad de producción de $O_2^{\bullet-}$ por varias enzimas, células y tejido vascular. La reacción espectrofotométrica es registrada a 550 nm.

1.3.1.4. Resonancia de spin electrón y trampa de spin.

El $O_2^{\bullet-}$ ha sido ampliamente investigado usando ESR por que esta técnica proporciona información, sobre su estructura, localización, estabilidad y movilidad superficial³². Además, ESR es una técnica no destructiva, lo cual es una ventaja sobre otras técnicas químicas cuando se requiere hacer la determinación del radical libre en sistemas biológicos³³. Debido a que el tiempo de vida media de estos radicales es demasiado corto para ser detectados únicamente con ESR, se ha implementado el uso de trampas de spin, las cuales reaccionan covalentemente con los productos del radical, formando aductos más estables que pueden ser analizados. El oxido-5-tert-butoxicarbonil-5-metil-1-pirrolin (BMPO) y sus derivados, son compuestos comúnmente utilizados como trampa de spin para la detección de $O_2^{\bullet-}$ ³⁴. Sin embargo, comparado con otras técnicas, el uso del método de trampa de spin está limitado por su instrumentación expansiva, baja sensibilidad y selectividad, baja constante de velocidad entre el compuesto y el radical, baja estabilidad del aducto. Estas inconveniencias mencionadas han sido corroboradas en algunos estudios³⁵ que indican que el método es ineficiente para la detección de $O_2^{\bullet-}$.

1.3.2. Métodos no espectrofotométricos.

1.3.2.1. Métodos electroquímicos.

El uso de métodos electroquímicos para la detección de $O_2^{\bullet-}$ ha sido un foco de atención, debido a que ellos permiten realizar mediciones directas y en tiempo real tanto en sistemas químicos como biológicos. Estos métodos son considerados por su fácil acceso y fácil manejo en comparación con otros métodos¹⁰.

1.3.2.1.1. Sensores electroquímicos.

En los últimos años diversas estrategias se han implementado para el desarrollo de electrodos modificados superficialmente y que como consecuencia muestren importante desempeño para la determinación de $O_2^{\bullet-}$ ^{21 36}. Un chip-sensor para la medición selectiva y sensitiva de radical superóxido fue desarrollado, usando la oxidación electroquímica directa del $O_2^{\bullet-}$ sobre electrodos de oro

modificados con películas boipoliméricas empleando amperometria a bajo potencial de operación ²¹ (tabla 3.1). En otro trabajo se hace uso de sensores electroquímicos a base de complejos metálicos como el “naringin-cobre”, este tipo de complejos muestra un comportamiento mimético redox óptimo para la detección de $O_2^{\bullet-}$ ³⁶.

Tabla 3.1. Se presentan algunos de los últimos ejemplos de sensores electroquímicos utilizados para la determinación de $O_2^{\bullet-}$.

Configuraciones utilizadas para la detección de superóxido						
Matriz	Método	Electrodo modificado	E_{det}	Sensitividad	LoD	RE
Xantina/XO in vitro PBS, pH 7.4	AMP	Fenilenediamina/Au/Glass	200 mV	N.R.	N.R.	21
		Plasmapolímero/Au/Glass				
Células T-47D PBS, pH 7.4	AMP	Polietilenimida/Au/Glass	120 mV	2235 $AM^{-1} m^{-2}$		
		Naringin-Cu/Pt	123 mV	N.R.	150 nM	36

1.3.2.1.2. Biosensores por inmovilización de enzimas.

La inmovilización de ciertas enzimas sobre electrodos para actuar como biosensores para la detección de $O_2^{\bullet-}$ han sido ampliamente descritos ^{37 38 39}. La principal enzima empleada para estos fines es la enzima SOD altamente reconocida por especificidad y selectividad para la dismutación ^{40, 41}, la cual convierte el $O_2^{\bullet-}$ a O_2 y H_2O_2 vía un mecanismo cíclico de óxido-reducción de $O_2^{\bullet-}$ ⁴² (figura 3.3A).

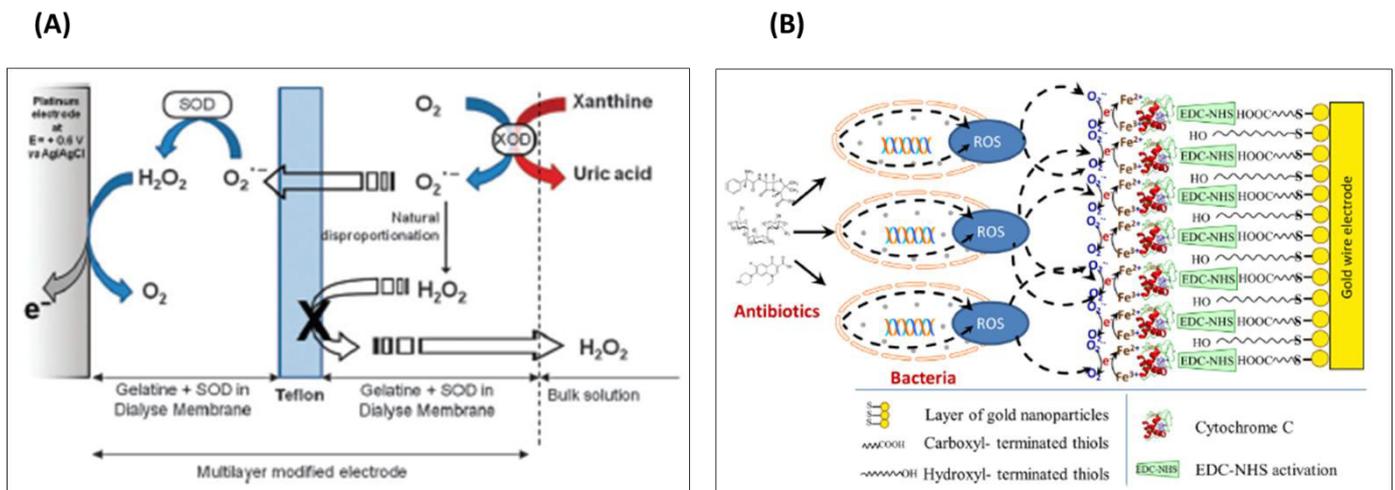


Figura 3.3. (A) esquema general de las reacciones electroquímicas en la interfase de un biosensor a base de una multicapa de teflón donde se encuentra inmovilizada SOD, para la detección de $O_2^{\bullet-}$ ⁴²; (B) estructura supramolecular que conforma el biosensor a base de Citocromo c para la detección de $O_2^{\bullet-}$ ⁴⁴.

Aunque menos común, algunas otras proteínas redox como el Citocromo c son utilizadas⁴³ (Figura 3.3B)⁴⁴. Estos sensores modificados continuamente son mejorados con la intención de obtener un excelente rendimiento para su aplicación en el análisis de $O_2^{\bullet-}$.

Al respecto se han desarrollado biosensores de primera⁴⁵, segunda⁴⁶ y tercera generación⁴⁷ para el monitoreo de $O_2^{\bullet-}$ utilizando diferentes tipos de materiales transductores como Pt, Au, y fibra de carbón y varias técnicas de modificación superficial e inmovilización de SOD.

En la última década algunos grupos de investigación han publicado sus estudios sobre la construcción, caracterización y aplicación de biosensores para la detección de $O_2^{\bullet-}$. En todos los casos la enzima fundamentalmente utilizada es la SOD. Sin embargo la diferencia entre un trabajo y otro radica en el uso de diferentes y diversos materiales nanoestructurados durante la fabricación de los dispositivos, por ejemplo la incorporación de nanopartículas de Fe_3O_4 ⁴⁸ o bien de oro^{49,50}, hasta aquellos que han empleado nanopartículas de paladio y platino⁵¹ para promover un mejor desempeño en las funciones del biosensor tanto en términos analíticos como de transferencia de carga.

Cabe mencionar que es muy importante la adecuada comunicación interfacial entre la enzima y el electrodo con la finalidad de facilitar la transferencia de carga. Para lograr lo anterior, se han realizado estudios utilizando polímeros conductores generadores de sistemas carga/hueco que a su vez permitan inmovilizar la enzima. Entre estos los principales polímeros destaca el poli(3,4-etilendioxitiofeno).

1.4. Biopolímero poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) como soporte para la inmovilización de enzimas SOD.

El 3,4-etilendioxitiofeno (EDOT) es el monómero mayormente investigado en la última década debido a su alta conductividad y excelente estabilidad ambiental de su forma polimérica poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT)^{53,54}. El PEDOT y sus derivados son considerados atractivos para su estudio y aplicación en las áreas de la electroquímica, ingeniería electrónica y óptica por mencionar algunas⁵⁵.

La polimerización química y electroquímica de EDOT normalmente se lleva a cabo en medio orgánico. Sin embargo el medio acuoso es ideal en términos operacionales de costos, seguridad y ambiental⁵⁶. El método de electropolimerización específicamente para formar películas de PEDOT en medio acuoso es posible con el uso de compuestos como el NaSS (sulfonato estireno de sodio) que en algunos casos actúa como surfactantes y como electrolito soporte. Esta metodología electroquímica (considerada “metodología verde”) permite la preparación efectiva de películas de polímero conjugado de alta calidad sobre ciertos sustratos (p.e. Pt, ITO, GCE)⁵⁷.

Voltametría cíclica es la técnica más usada para promover la polimerización electroquímica de PEDOT. Este método muestra cualitativamente la reversibilidad de la transferencia electrónica durante la electropolimerización mostrando los procesos de oxidación y reducción en los diagramas de corriente vs potencial. El crecimiento de las curvas voltamperométricas representan el comportamiento electroquímico característico para formación PEDOT (figura 3.4a). En este perfil de polimerización se observa la oxidación del monómero EDOT a potencial entre 0.90 V vs Ag/AgCl ⁴⁷ en otro caso a 1.15 vs SCE ⁵⁸. Debido a que el barrido de potencial continua, esto promueve la formación del polímero y el crecimiento de la cadena con respecto a cada ciclo redox.

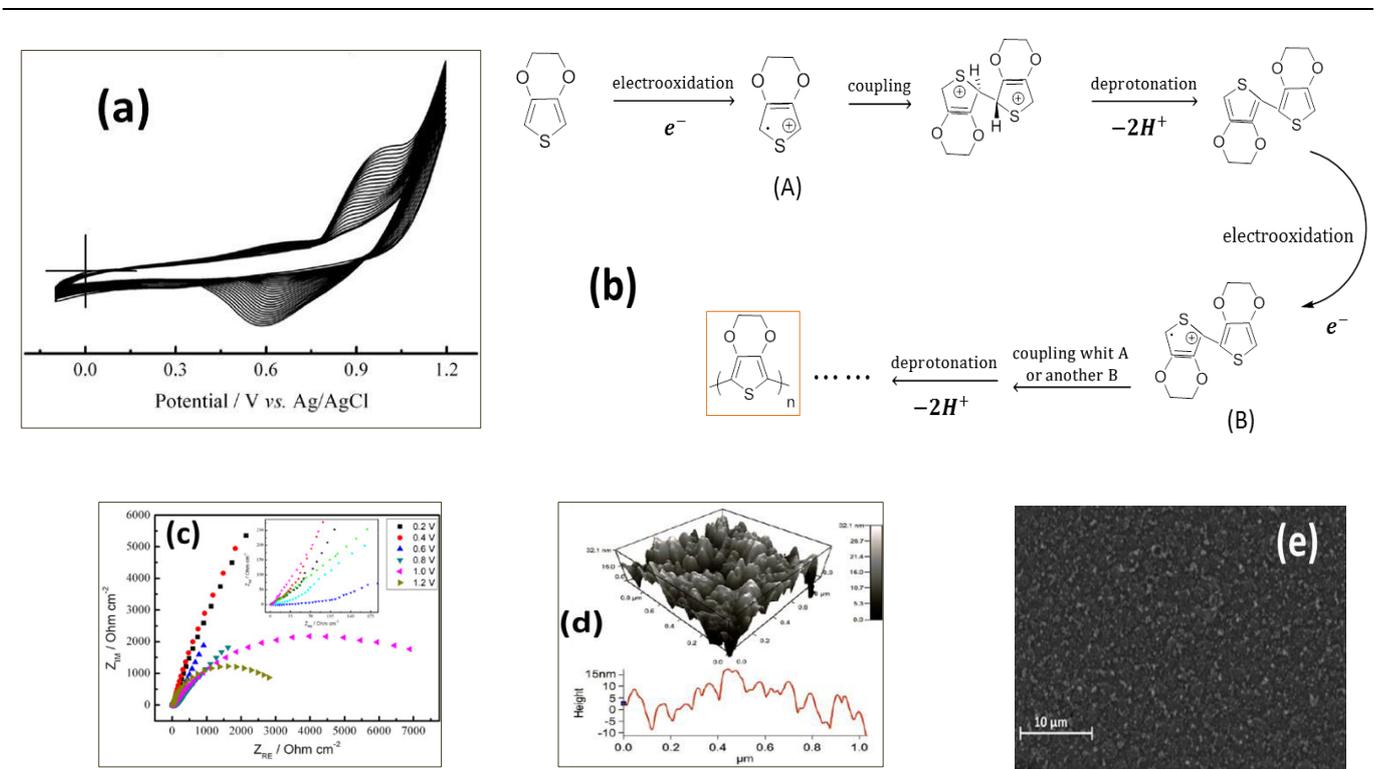


Figura 3.4. (a) perfil de electropolimerización de EDOT en agua-etanol, electrolito $\text{LiClO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -PSSNa. Velocidad de barrido 100 mV s^{-1} . (b) esquema del posible mecanismo de polimerización electroquímica de EDOT. (c) espectros de Nyquist que muestran la resistencia a la transferencia de carga asociada a la formación de la película de PEDOT sobre Pt. (d) micrografías AFM de películas poliméricas sobre ITO. (e) imagen SEM para un recubrimiento de PEDOT sobre ITO. ^{47, 57, 59, 60}

Técnicas espectroscópicas de caracterización estructural tales como FT-IR proporcionan bastante información sobre los polímeros conductores. Los espectros FT-IR que esta técnica arroja permiten realizar la interpretación comparativa entre las estructuras del monómero EDOT y el correspondiente polímero PEDOT, lo cual a su vez hace posible con ayuda de otras técnicas proponer algún mecanismo de reacción electroquímica ⁵⁷. En la figura 3.4b se muestra el posible mecanismo de polimerización electroquímica de EDOT, el paso de iniciación involucra la oxidación anódica de los monómeros para

generar cationes radicales en la interfase electroquímica. Los cationes radicales dimerizan y se desprotonan. Después del paso de desprotonación, el dímero es reoxidado y se acopla con otro radical catión. La desprotonación y reoxidación continúa una y otra vez según el número de ciclos de barrido de potencial, esto provoca la formación de especies de oligómeros y el aumento en la longitud de la cadena polimérica que se deposita formando una película sobre el electrodo. La velocidad de polimerización está limitada por la difusión del monómero hacia la superficie del electrodo durante la etapa de propagación.

El uso de la polimerización electroquímica en medio acuoso ha sido elegido de manera ideal por algunos grupos de investigación con la finalidad de inmovilizar enzimas, anticuerpos o células, para su aplicación y uso en la fabricación de biosensores ⁵⁹.

Las películas de polímero EDOT suelen ser caracterizadas de acuerdo a sus propiedades por medio de diferentes técnicas, entre ellas la electroquímica, donde se emplean por ejemplo la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) (figura 3.4c) para evaluar su electroactividad ⁵⁷. La caracterización con AFM permite obtener el factor de rugosidad y tamaño de la cobertura polimérica superficial (figura 3.4d) ⁶⁰. La microscopía de barrido de electrón (SEM) permite obtener imágenes que muestran la apariencia de la película polimérica (figura 3.4e) ⁴⁷ entre otras.

La inmovilización de la enzima SOD es otra de las variables de suma importancia en el estudio para la cual se han reportado diferentes metodologías. Entre estas el uso de agentes estabilizadores como la polietilenoimina (PEI) ⁷, el glioxal (GO) y/o el glutaraldehído (GA) ⁵² entre otros.

1.5. Inmovilización enzimática sobre polímeros biocompatibles.

1.5.1. Superóxido dismutasa.

Gran variedad de sensores electroquímicos se han diseñado y construido para la detección de superóxido. Algunos de ellos a base de Mn^{2+}/MnO^{2+} quien actúa como agente mimético para promueven la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ ⁶¹. Otros biosensores emplean capturadores enzimáticos eficaces tales como Citocromo c ^{20, 62}. Sin embargo aquellos construidos con enzima SOD promueven una mayor ventaja, la cual es atribuida a la alta especificidad para dismutar el $O_2^{\bullet-}$ ^{7,47,40,63}.

Superóxido dismutasa de Cobre-Zinc (CuZnSOD) es una proteína homodimérica de 32 kDa la cual se encuentra en el citoplasma de células eucariotas. La función principal de CuZnSOD (figura 3.5a) es catalizar la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ a oxígeno y peróxido de hidrógeno ⁶⁴.

El mecanismo enzimático propuesto para CuZnSOD describe la reducción del Cu^{II} de la enzima en su forma oxidada por el $\text{O}_2^{\bullet-}$, liberando oxígeno (figura 3.5b, reacción I), alternando con la oxidación del Cu^{I} de la enzima en su forma reducida por otro $\text{O}_2^{\bullet-}$ y dos protones, generando peróxido de hidrógeno (figura 3.5b, reacción II) ⁶⁵.

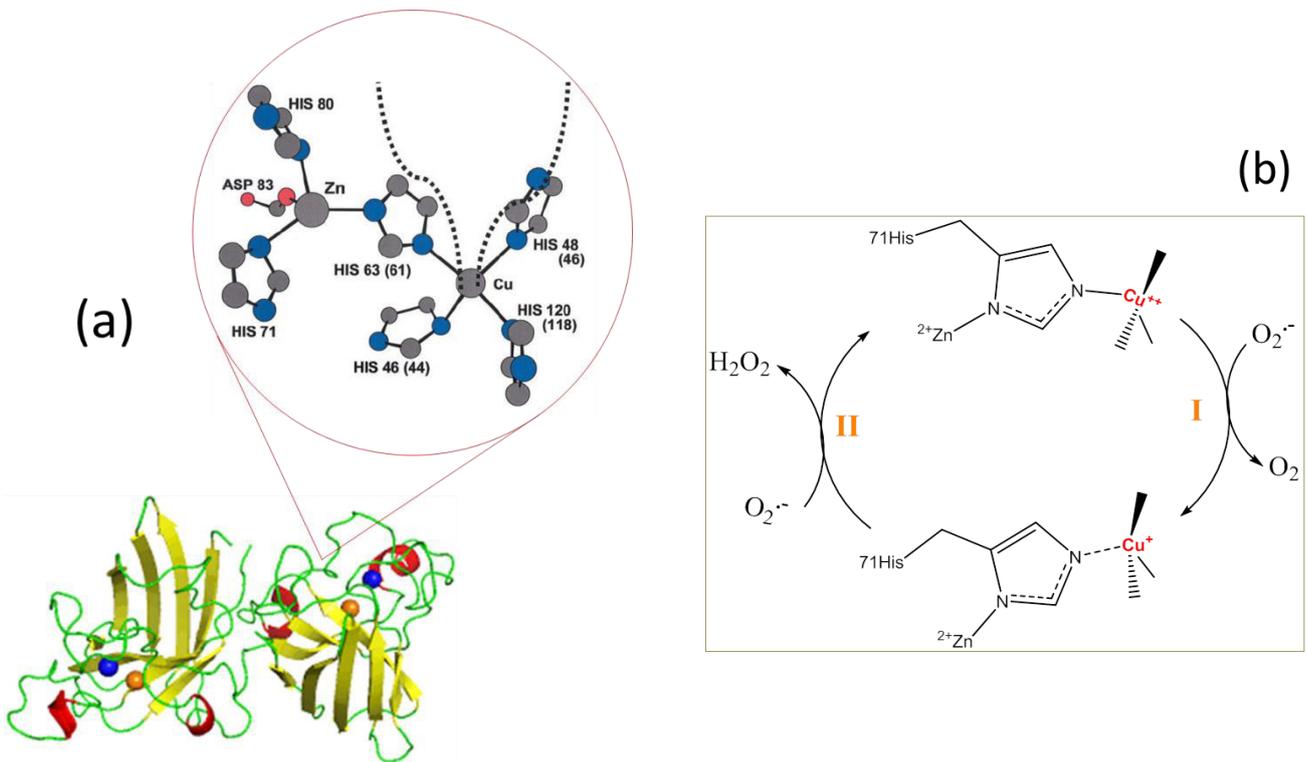


Figura 3.5. (a) estructura terciaria de CuZnSOD, inserto se muestra la estructura de rayos X de la misma enzima en donde se muestran los residuos de aminoácidos (Histidina y Aspartato) enlazados al $\text{Cu}(\text{II})$ y $\text{Zn}(\text{II})$. En este caso el sitio activo de SOD es el ión metálico de Cu (zona punteada). (b) diagrama esquemático del ciclo catalítico para CuZnSOD ⁶⁵.

1.5.2. Cross-Linker para inmovilización de enzimas.

Con respecto a los métodos de inmovilización de enzimas, los más comunes emplean el atrapamiento en una membrana, enlace cruzado (cross-linking), enlace covalente y adsorción física ¹⁵. Diversos agentes cross-linking han sido evaluados para la inmovilización de enzimas sobre electrodos modificados, entre ellos se encuentra el Glutaraldehido (GA), Glioxal (GO) y Epiclorohidrin (ECH) ⁵². Estudios más detallados al respecto han presentado que el GA muestra mejores resultados en la construcción de biosensores enzimáticos ^{7,47}.

1.5.2.1. Glutaraldehído como crosslinker de proteínas y enzimas.

El glutaraldehído es un reactivo bi-funcional con gran capacidad de autopolimerizarse, y a su vez de reaccionar con gran variedad de enzimas y proteínas, principalmente con los grupos amino primario de estas biomoléculas. Sin embargo, eventualmente el glutaraldehído también puede reaccionar con otros grupos como por ejemplo tioles, fenoles e imidazoles ^{66,67}. El mecanismo de reacción del GA con proteínas y enzimas aún no es del todo claro, pero en la figura 3.6 se muestran algunos de los posibles mecanismos de reacción en medio acuoso ⁶⁸. En el primer caso se muestra la reacción en medio acuoso a pH neutro y/o ligeramente ácido de una molécula de GA y el grupo NH₂ de la enzima de manera alterna. En la segunda reacción bajo condiciones ligeramente básicas, primero se lleva a cabo la polimerización intramolecular del GA y posteriormente ocurre la reacción con los grupos NH₂ de la enzima.

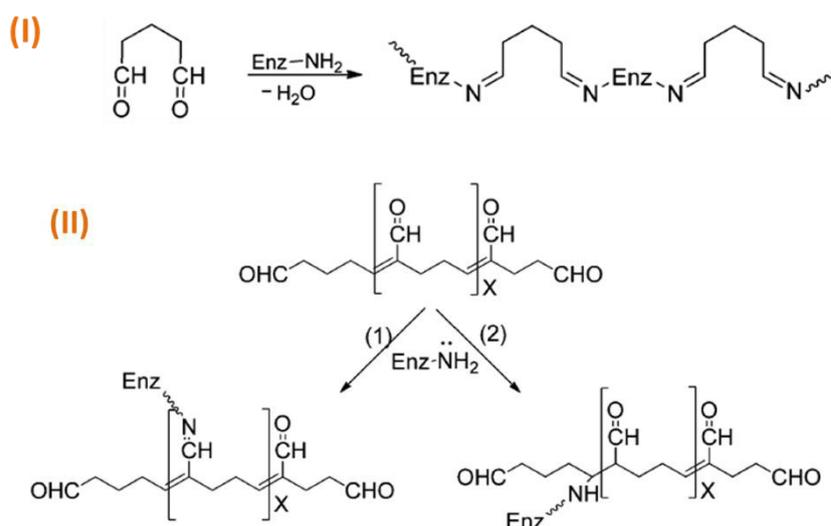


Figura 3.6. (I) reacción de glutaraldehído con enzimas bajo condiciones neutras o ligeramente ácidas. (II) reacciones de glutaraldehído bajo condiciones básicas ⁶⁸.

El crosslinking de enzimas puede llevarse a cabo intermolecular o intramolecularmente. En el primer caso el enlace cruzado ocurre entre los grupos aminos presentes en la superficie de una enzima y otra. El segundo caso el enlace se da entre los enlaces amino de una misma enzima ⁶⁹. La adición de glutaraldehído a una solución de enzima puede producir agregación química de la enzima generando de esta manera una copolimerización GA-Enzima (figura 3.7) que actúa como un biocatalizador sólido.

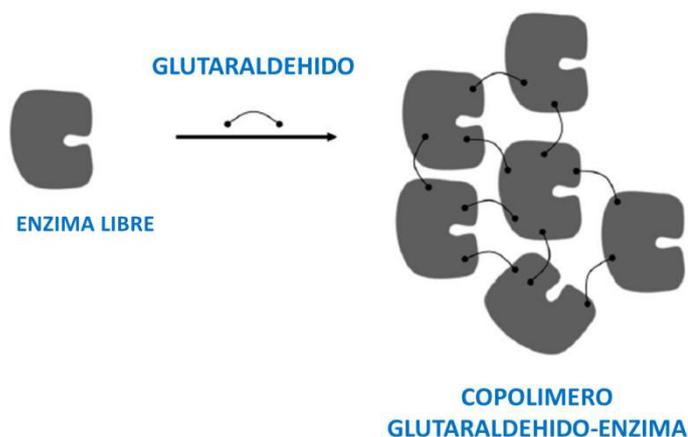


Figura 3.7. Inmovilización de enzima *via* copolimerización con glutaraldehído ⁶⁹.

La BSA es una proteína inerte con alta densidad de grupos de Lys en su superficie, esto permite que el glutaraldehído interactúe con los grupos amino de la BSA formando redes intermoleculares GA-BSA (figura 3.8) de primera instancia provocando la formación de redes poliméricas más estables y consistentes ⁷¹. Esta estrategia de inmovilización evita la interacción directa del GA con los grupos amino de la enzima permitiendo de esta manera su dispersión dentro de la red lo cual a su vez mantiene su conformación nativa y actividad enzimática.

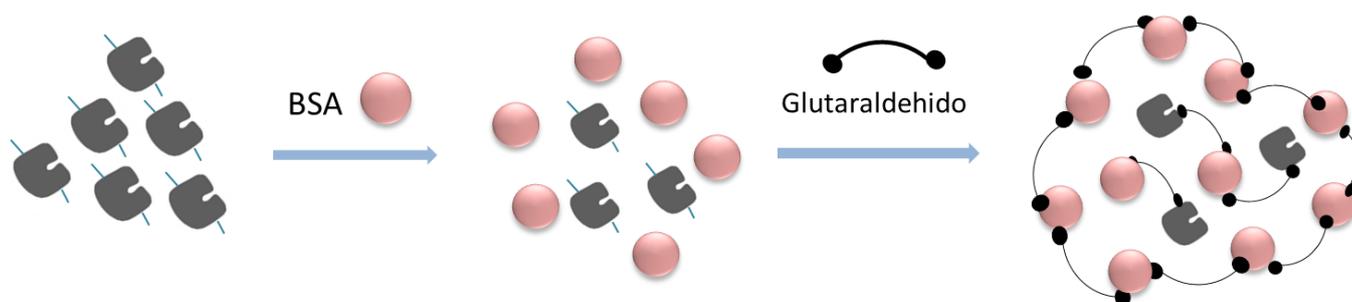


Figura 3.8. Preparación de crosslinked usando BSA como proteína rica en residuos de Lys y una enzima modelo. El enlace cruzado es promovido por el glutaraldehído ⁷¹.

2. OBJETIVOS

En este trabajo de investigación se presenta y propone un simple pero efectivo y detallado procedimiento para la fabricación, caracterización y aplicación de un biosensor específico para la detección y cuantificación de $O_2^{\bullet-}$. Este procedimiento a diferencia de los reportados hasta el momento no depende del uso de nanomateriales sofisticados en la construcción del dispositivo. Paralelamente se estableció también un método espectroscópico alternativo para la caracterización y validación de la producción de superóxido a partir de KO_2 .

En ese caso utilizamos la técnica de drop coating para incorporar la enzima en la superficie del electrodo modificado con PEDOT y crear de esta manera un compuesto (enzíma-agentes estabilizadores) lo cual permite incrementar la sensibilidad del biosensor. Los electrodos modificados por electropolimerización de EDOT se caracterizaron con técnicas microscópicas de AFM y SEM, su actividad electroquímica también fue evaluada con CV. El recubrimiento superficial de PEDOT actúa como capa permselectiva que facilita el paso de H_2O_2 generado enzimáticamente, además de funcionar como barrera efectiva al impedir el paso de posibles interferentes como ácido úrico, ácido ascórbico, xantina y superóxido de potasio. Las condiciones experimentales fueron optimizadas para obtener el biosensor adecuado con una configuración (Pt/PEDOT/(SOD 0.1% - ASB 2% - GA 2.5%)). El comportamiento del biosensor en presencia de $O_2^{\bullet-}$ fue evaluado por amperometría a potencial fijo.

3. CONDICIONES EXPERIMENTALES

3.1. Reactivos y soluciones.

Enzima superóxido dismutasa Cu-Zn de eritrocitos de bovino, Superóxido de potasio, 3,4-etilendioxitiofeno (EDOT), Glutaraldehído (GA), tabletas de PBS 0.01 M, ácido úrico, ácido ascórbico, xantina, H_2O_2 , XTT de sodio, sulfonato estireno de sodio (NaSS), Albumina Sérica de Bovio, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

Los experimentos electroquímicos se realizaron utilizando como electrolito soporte buffer de fosfatos 0.01M, pH 7.4. Para la polimerización de EDOT se empleó 0.1 M NaSS conteniendo 10 mM EDOT.

La solución estándar de KO_2 fue preparada en medio básico de NaOH pH 12.3, y esta fue utilizada como fuente de anión-radical superóxido.

Agua Milli Q se calentó hasta 40 °C y en ella se adicionaron 0.0134 g de XTT para obtener una solución madre 1mM.

Una solución de CuZnSOD al 0.1% fue preparada al mismo tiempo se le integró la proteína BSA al 2%. Esta solución fue nombrada como solución A. Consecutivamente se preparó la solución de glutaraldehído al 2.5%, solución que fue nombrada como B. Al final ambas soluciones A y B fueron mezcladas, de esta mezcla se tomó 1 μL el cual fue colocado como gota sobre el electrodo PEDOT/Pt.

3.2. Instrumentación.

Los experimentos electroquímicos fueron realizados en un potenciostato-galvanostato. Una celda convencional de tres electrodos fue utilizada como sistema electroquímico, empleando como electrodos de trabajo Pt ($d = 1\text{mm}$) modificados con PEDOT, alambre de platino como contraelectrodo y un electrodo de Calomel saturado (SCE por sus siglas en inglés, Saturated Calomel Electrode) como electrodo de referencia.

Para el estudio espectrofotométrico se empleó un UV-vis Instrumentation, equipo UVIKON XL, BIO-TEK, con el programa software LabPower v3.50.

3.3. Preparación y caracterización de los electrodos modificados PEDOT/ITO.

Se han usado sustratos de vidrio cubiertos por una película nanométrica de óxido de estaño dopado con indio (ITO) como electrodos de trabajo sobre los cuales se realizó la electropolimerización de PEDOT en una solución 10 mM de EDOT en 0.1 M de NaSS como electrolito soporte; el barrido de potencial se aplicó desde -0.6 V a 1.2 V, a una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} por 10 ciclos. Una celda convencional de tres electrodos fue empleada; los sustratos de ITO se utilizaron como electrodo de trabajo, como contra electrodo un alambre de platino y como referencia Ag/AgCl (3M KCl).

Los experimentos para Microscopía de Fuerza Atómica se llevaron a cabo en un AFM Nanosurf easyscan 2 con una punta de contacto. Y el procesamiento de las imágenes se realizó con el software Gwyddion.

Un Microscopio Electrónico de Barrido modelo SIGMA-HDVP Field Emission de la marca Carl Zeiss fue utilizado para caracterizar la presencia, morfología y topografía de la película de PEDOT electropolimerizado sobre sustratos de ITO con características 4-10 Ω de resistencia y dimensiones de 150x150x1.1 mm, adquiridos en Delta Technologies.

3.4. Preparación de los electrodos modificados PEDOT/Pt y el biosensor.

Los electrodo Pt ($d=1\text{mm}$) fueron modificados con el polímero conductor PEDOT, el cual fue depositado sobre los electrodos durante 10 barridos de potencial desde -0.6 a 1.2 V vs. SCE a 50 mV s^{-1} en una solución 10 mM EDOT + 0.1 M NaSS.

Para la preparación del biosensor, la solución de la enzima se preparó en un medio de albumina sérica de bovino (por sus siglas en inglés BSA, Bovine Serum Albumin), 0.1% SOD + 2% BSA. La solución de enzima fue mezclada con una solución 2.5% GA en una relación 2:1 (v/v) enzima:GA y una gota de 1 μ L fue colocada en la superficie de los electrodos modificados, se dejó secar durante 4 h a temperatura ambiente. El biosensor se guardó sumergido en una solución PBS 0.01 M, pH 7.4 a 4°C.

3.5. Caracterización electroquímica.

En presencia de 5 mM Fe (CN)₆ utilizando como electrolito soporte buffer de fosfatos PBS 0.01 M pH 7.4; velocidad de barrido 50 mV/s y variando la velocidad v (20 a 200) mV/s.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Electropolimerización de EDOT sobre sustratos de platino.

El desarrollo de biosensores enzimáticos requiere de cuidadosos pasos que aseguren la buena transferencia electrónica entre el electrodo, la enzima y el analito. Polímeros electroconductores como PEDOT muestran efectos sinérgicos que favorecen la detección de la reacción electroquímica interfase. La polimerización superficial del monómero de EDOT sobre platino (Pt) aborda la primera etapa del biosensor.

La electropolimerización de EDOT 10 mM fue llevada a cabo durante 10 ciclos en medio acuoso empleando como electrolito soporte NaSS 0.1 M. El perfil voltamperométrico de polimerización (figura 3.9) muestra desde el primer ciclo la oxidación anódica del monómero de EDOT a potencial de oxidación (E_{oxi}) = + 0.90 V vs SCE.

En el primer paso de la electropolimerización se genera como producto el catión radical (estructura I) en la vecindad más próxima del electrodo. Los cationes radicales dimerizan (estructura II) y se desprotonan consecutivamente⁵⁷. Después del paso de desprotonación el dimero es reoxidado (estructura III) y consecutivamente este se acopla a otro radical catión. La reacción es consecutiva hasta formar oligómeros (estructura IV) los cuales determinarán el tamaño de la cadena polimérica y la formación de la película depositada sobre el electrodo. Como el barrido es continuo los picos de oxidación (I_{pa}) y reducción (I_{pc}) se observan a $\sim + 0.90$ y $- 0.30$ V vs SCE. El incremento de corriente redox es proporcional al aumento de polímero depositado en el electrodo. El desplazamiento de potencial (E_{oxi}) conforme incrementa el número de barridos indica de la resistencia eléctrica promovida por la película de polímero y el sobrepotencial necesario para compensar la resistencia.

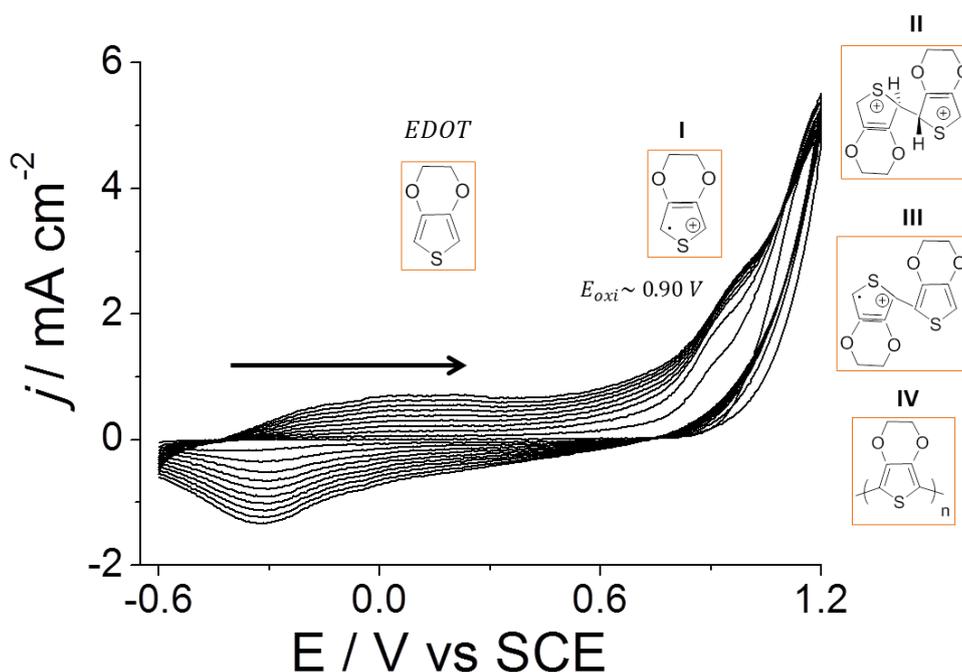


Figura 3.9. Voltamogramas cíclicos de la electropolimerización de PEDOT sobre GCE (inserto sobre platino) en solución 10 mM EDOT en 0.1 M NaSS. Barrido de potencial de -0.6 a 1.2 V, velocidad de barrido 50 mVs^{-1} , por 10 ciclos.

4.2. Caracterización electroquímica de los electrodos modificados PEDOT/Pt.

Los voltamogramas de la figura 3.10a muestra el VC de 5mM de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ donde se observa la notable diferencia en la transferencia de carga para el electrodo de Pt después de su modificación superficial con PEDOT. Esto se debe a que el polímero permite un fácil acceso/expulsión de los iones en la solución durante el proceso de carga/descarga, como se muestra en la figura 10b.

La electroactividad de la película de PEDOT fue determinada por voltametría cíclica en buffer de fosfatos PBS 0.01 M, pH7.4 (figura 3.11a). Los resultados obtenidos muestran CVs de un anchura típica reportada para películas poliméricas electrodepositadas⁵⁷. Estos voltamogramas anchos se deben a la gran corriente capacitiva interfacial que presentan estas estructuras poliméricas sobre el electrodo. Las películas fueron cicladas repetidamente identificando en cada ciclo el potencial de oxidación ($E_a = 0.061 \text{ V}$) y reducción ($E_c = 0.065 \text{ V}$) del PEDOT en buffer PBS. La película de PEDOT mantiene el mismo comportamiento redox en cada ciclo a diferente velocidad lo que indica que la película polimérica muestra buena y constante electroactividad y alta estabilidad estructural.

Consecutivamente se realizó el análisis de la influencia de la velocidad de barrido para los electrodos modificados *PEDOT/Pt*, en presencia de una solución 5mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6$. La figura 3.11b muestra el valor de la pendiente ($m_{\text{PEDOT/Pt}} = 0.5$) a partir de la gráfica de la $\log I_p$ vs. $\log v$ para

velocidades de barrido entre 20 a 200 mV s^{-1} . Este criterio indica que el comportamiento del sistema está regido por la difusión de iones en la interface electrodródica.

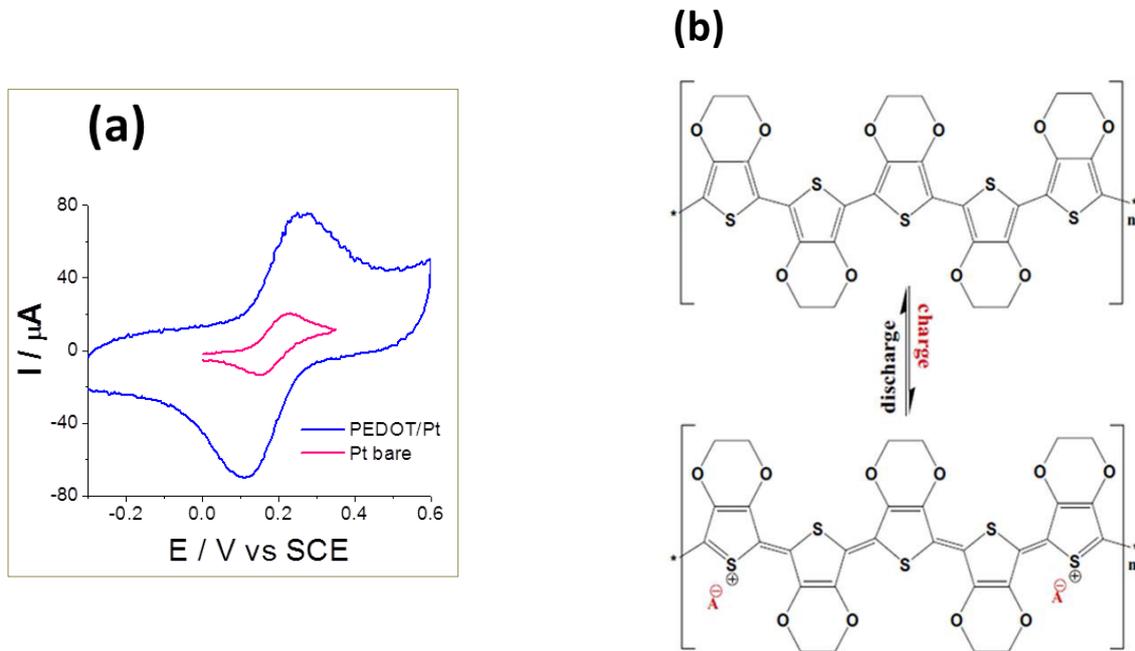


Figura 3.10. (a) voltamogramas cíclicos para los electrodos de Pt y PEDOT/Pt en presencia de 5 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en PBS pH 7.4; velocidad de barrido 50 mV/s . (b) esquema que representa el mecanismo de carga y descarga para el polímero PEDOT.

De manera paralela también fue realizado el estudio de la estabilidad de la película de polímero conductor para los electrodos modificados *PEDOT/Pt* en función del tiempo. En este contexto es posible identificar que durante el periodo de un mes el PEDOT muestra prácticamente la misma capacidad electroconductora ya que las señales de intensidad de corriente de pico no se ven alteradas.

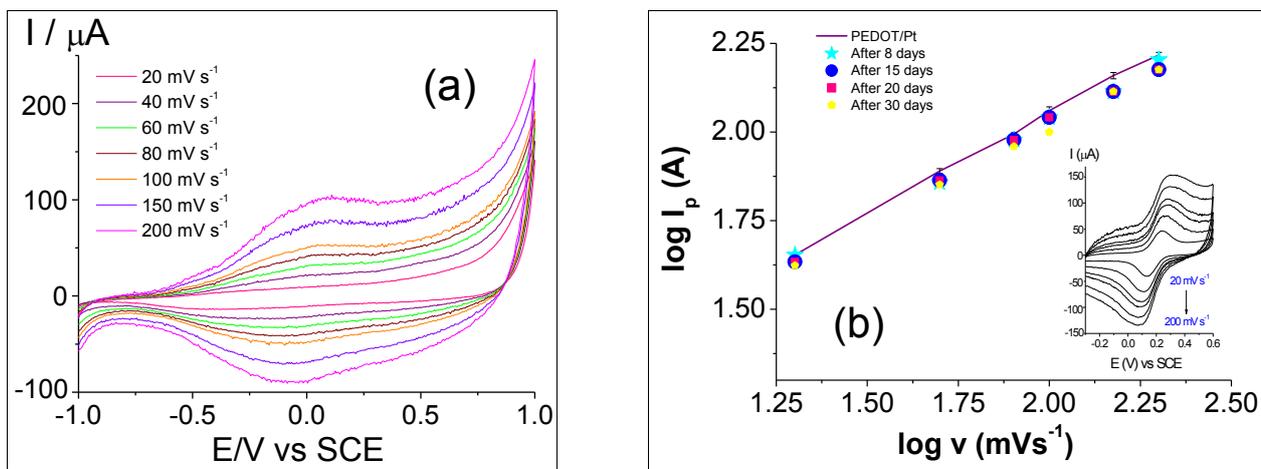


Figura 3.11. (a) Voltamperogramas cíclicos de las películas de PEDOT sobre platino en buffer PBS 0.01M, pH 7.4, a diferentes velocidades de barrido de potencial (de 20 a 200 mVs^{-1}). (b) Gráficas de $\log I_p$ vs $\log v$ para los electrodos modificado PEDOT/Pt en presencia de 5mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en PBS pH 7.4 a diferentes velocidad de barrido. En el inserto se muestran los voltamogramas realizados a velocidad de barrido de 20 a 200 mVs^{-1} .

Con base en este estudio se determinó que los electrodos modificados *PEDOT/Pt* pueden ser una plataforma electroconductora y biocompatible en la construcción del biosensor *SOD/PEDOT/Pt*.

4.3. Caracterización microscópica de la película de PEDOT sobre ITO.

En la figura 3.12(a) se presenta una imagen (izquierda) que resalta la cobertura de color gris oscuro sobre el sustrato de ITO, lo cual es atribuido a la formación de la película de PEDOT generada por electropolimerización del monómero EDOT sobre la superficie del material. Para comparar, a la derecha de la misma figura se muestra el ITO sin modificación superficial.

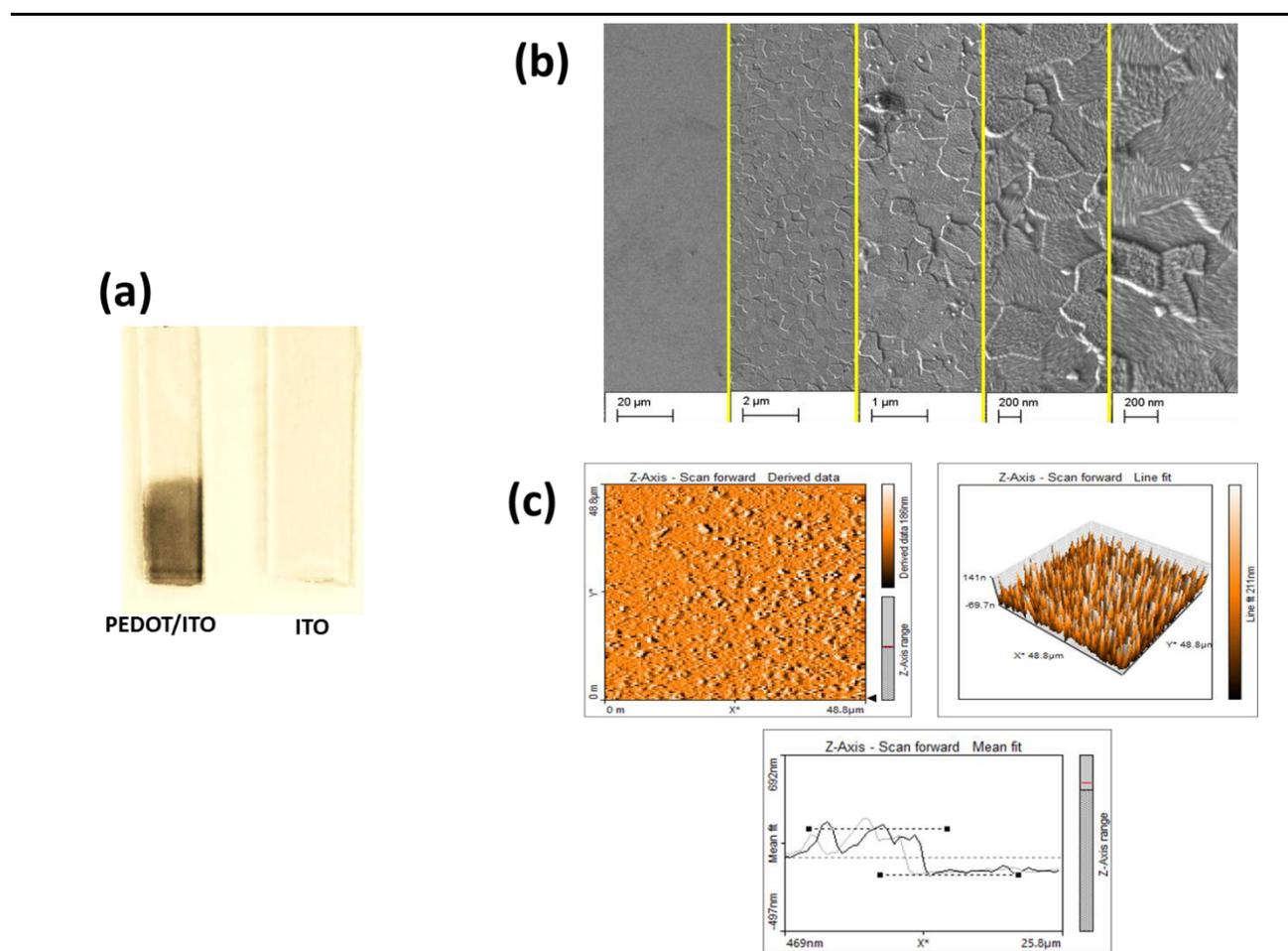


Figura 3.12. (a) fotografía del ITO modificado con PEDOT (izquierda) y del ITO sin modificación superficial (derecha). (b) imágenes SEM del recubrimiento de PEDOT sobre ITO, se muestra un “close up” sobre el polímero desde 20 μm hasta 20 nm. (c) imágenes de AFM de 50 μm x 50 μm en 2D y 3D. También se muestra el perfil para el espesor de la película.

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es capaz de resolver estructuras a nivel atómico y molecular representando un importante papel en el análisis morfológico de los polímeros. Las imágenes

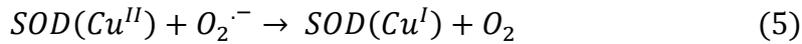
SEM de los electrodos de ITO modificados con PEDOT se presentan en la figura 3.12(b). En este caso se realizó el acercamiento secuencial (“close up”) hacia la película de PEDOT, y las imágenes de izquierda a derecha muestran la aproximación que va desde 20 μm hasta 200 nm; donde es posible observar que el polímero presenta una estructura rugosa/porosa con cobertura aparentemente homogénea sobre el sustrato de ITO.

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una técnica de caracterización de superficies de alta resolución para una gran cantidad de materiales como los recubrimientos poliméricos, ya que permite obtener un perfil topográfico tridimensional cuantitativo de la superficie. En este estudio se pretende demostrar la presencia de PEDOT sobre sustratos de óxido de estaño dopados con indio (ITO). A continuación, se muestran las imágenes de AFM para el PEDOT. En la figura 3.12(c), la imagen de la derecha muestra la topografía de un área determinada en 3D y la imagen de la izquierda muestra la misma área pero en 2D. Al respecto es posible observar que con el proceso de electropolimerización de EDOT permite obtener recubrimientos superficiales homogéneos. Entre ambas imágenes se muestra el valor de la rugosidad media cuadrática o rms expresado en nm, en este caso se reporta como $R_{\text{sm}} = 34.62$ nm. Dentro de la misma figura en la parte inferior se muestra el perfil de la película que permite determinar el espesor promedio de la cobertura de PEDOT, cuyo valor es el promedio de 278 nm. Todas las mediciones se hicieron por triplicado en varios puntos de la película y se obtuvo el promedio.

4.4. Recubrimiento superficial de PEDOT y su función como capa permselectiva al paso de H_2O_2 y barrera al paso de interferentes redox.

4.4.1. Efecto del recubrimiento PEDOT/Pt como capa permselectiva para H_2O_2 .

La respuesta amperométrica del electrodo modificado fue registrada en buffer PBS 0.01 M, pH 7.4 a un potencial de trabajo $E_w = -0.30$ V vs. SCE. Las condiciones de estos parámetros analíticos fueron establecidas considerando el mecanismo de detección de $\text{O}_2^{\cdot-}$ el cual involucra el ciclo redox llevado a cabo por la enzima SOD. SOD dismuta eficientemente el $\text{O}_2^{\cdot-}$ a O_2 y H_2O_2 vía un ciclo redox atribuido a la cupla del centro metálico Cu^{II} el cual actúa como mediador redox en el complejo enzimático Cu-Zn SOD. Dos iones de anión radical superóxido son convertidos estequiométricamente en una molécula de oxígeno y una molécula de peróxido de hidrógeno con el consumo de dos iones H^+ . El mecanismo de las reacciones consecutivas es el siguiente:



A potencial -0.30 V vs. SCE el H_2O_2 generados por la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ puede ser reducido, proporcionando de esta manera la señal analítica asociada al superóxido. De tal manera que el principal enfoque del biosensor desarrollado aquí está basado en la señal amperométrica ligada a la ecuación (4).

De aquí surge la importancia de corroborar que la cobertura de PEDOT en el electrodo modificado *PEDOT/Pt* funciona adecuadamente como capa permselectiva para H_2O_2 (Figura 3.13a), registrando buenas señales analíticas y promoviendo alta sensibilidad para su detección y cuantificación. La respuesta del electrodo modificado en presencia de H_2O_2 se registró para un incremento de la concentración por adición de alícuotas desde $0.5 \mu\text{M}$ hasta una concentración final $37.5 \mu\text{M}$. El estudio amperométrico muestra como la corriente catódica en función del tiempo (Figura 3.13b) va incrementando proporcionalmente al cambio en la concentración de H_2O_2 en la solución. La señal analítica es reproducible, permitiendo alta sensibilidad ($0.212 \mu\text{A}/\mu\text{M}$) para la detección del peróxido de hidrógeno con un límite de detección $0.0707 \mu\text{M}$.

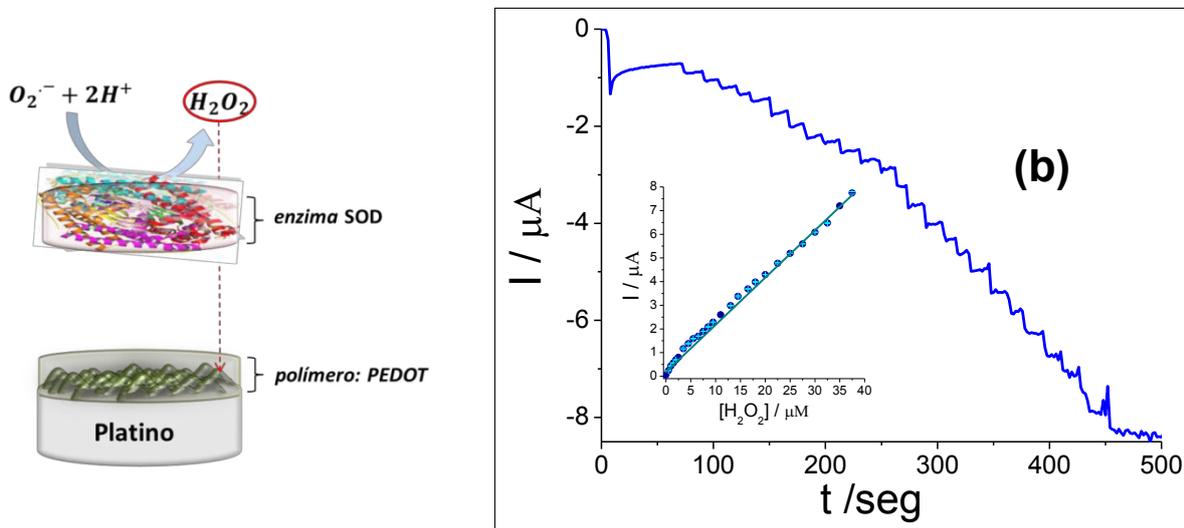


Figura 3.13. (a) esquema representativo para la función del recubrimiento de *PEDOT* como capa permselectiva para el paso del H_2O_2 . (b) respuesta amperométrica del electrodo modificado *PEDOT/Pt* para adiciones sucesivas de H_2O_2 desde una concentración inicial $0.5 \mu\text{M}$ hasta $37.5 \mu\text{M}$. potencial aplicado -0.30 V vs SCE en PBS 0.01 M, pH 7.4 , inserto se encuentra el gráfico de la curva de calibración correspondiente.

4.4.2. Estudio de Interferentes.

Uno de los problemas a resolver durante la práctica para la aplicación de sensores amperométricos es minimizar y/o evitar el efecto de especies redox que pueden estar presentes en fluidos biológicos junto con el analito. Los posibles compuestos que pueden interferir en la determinación amperométrica del anión radical superóxido se encuentran el ácido úrico (UA), xantina (XA), ácido ascórbico (AA). En este caso también se ha considerado el superóxido de potasio (KO_2) como posible interferente en la solución, ya que es este compuesto el que se ha utilizado para la generación del $\text{O}_2^{\cdot -}$ durante la caracterización y calibración electroquímica y espectroscópica del biosensor. Voltametría cíclica se empleó para evaluar el comportamiento electroquímico de los electrodos de Pt y los electrodos modificados *PEDOT/Pt* en presencia de cada uno de los posibles interferentes de manera individual y registrar su proceso redox en cada caso.

Los datos electroquímicos se obtuvieron para cada compuesto a una concentración de 1mM, con respecto al ácido úrico se muestra su reducción sobre Pt a $E_{\text{cat}} = 0.06 \text{ V}$ con $I_{\text{pc}} = 12.3 \mu\text{A}$; la reducción de ácido ascórbico se observa en $E_{\text{cat}} = 0.03 \text{ V}$ con una $I_{\text{pc}} = 23.3 \mu\text{A}$; xantina a su vez es reducida a $E_{\text{cat}} = -0.25 \text{ V}$ con una $I_{\text{pc}} = 14.7 \mu\text{A}$; y superóxido de potasio es reducido a $E_{\text{cat}} = -0.20 \text{ V}$ con una $I_{\text{pc}} = 20 \mu\text{A}$.

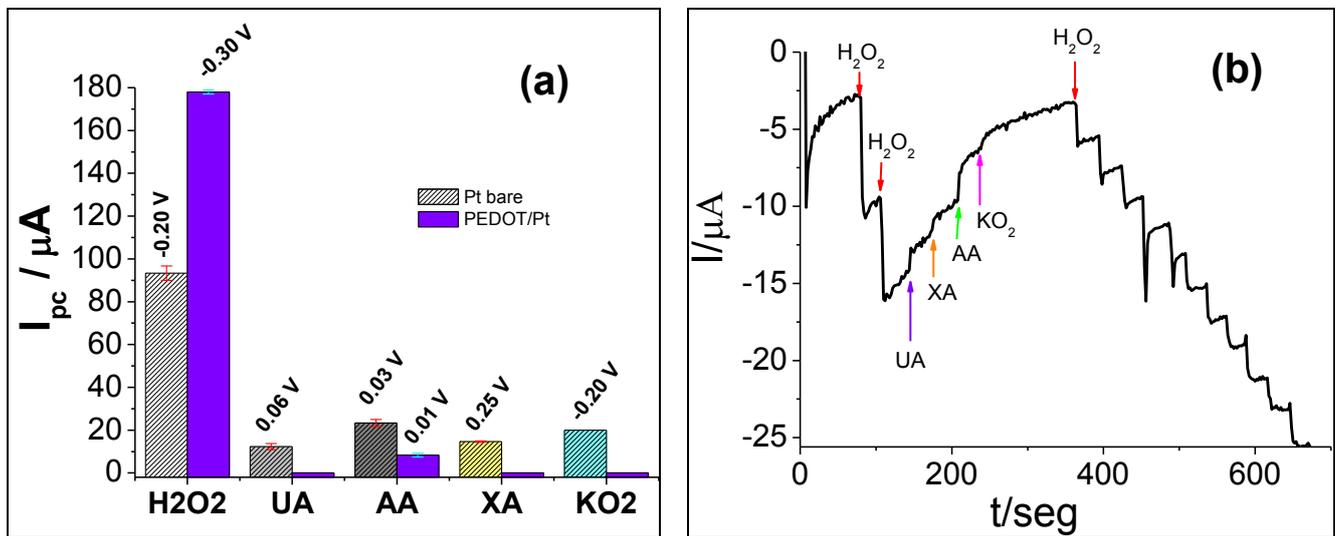


Figura 3.14. (a) Estudio electroquímico de posibles compuestos interferentes tales como ácido úrico (UA), ácido ascórbico (AA), xantina (XA) y superóxido de potasio (KO_2) en la determinación final de anión radical superóxido. (b) Respuesta amperométrica para la evaluación de la influencia electroactiva de los interferentes (UA, AA, XA, KO_2) en la detección de H_2O_2 utilizando el electrodo modificado *PEDOT/Pt* a -0.30 V vs SCE en PBS 0.01 M, pH 7.4, relación molar H_2O_2 : *interferente* 1:4.

De igual manera se realizó el mismo estudio para peróxido de hidrógeno, el cual muestra su señal de reducción sobre Pt a $E_{\text{cat}} = -0.20 \text{ V}$ con una $I_{\text{pc}} = 93 \mu\text{A}$ (Figura 3.14a). Como se observa la superficie del material sustrato de Pt es capaz de detectar por si sola el H_2O_2 como analíto de interés, la desventaja es que al mismo potencial catódico detecta al KO_2 y a potenciales cercanos registra la reducción de UA y AA principalmente, cuyas señales pudieran alterar de manera significativa la detección del H_2O_2 . De acuerdo con estos resultados se continuó con la evaluación del electrodo modificado *PEDOT/Pt* en presencia de cada uno de los posibles interferentes y el H_2O_2 bajo las mismas condiciones.

En la figura 3.14a se muestra claramente el comportamiento que desempeña el recubrimiento de PEDOT como una barrera al paso de UA, XA, y KO_2 ya que no se registra ninguna señal redox para estas especies interferentes por ende el valor de la $I_{\text{pc}} = 0$. Sin embargo para AA se registró una ligera señal de $I_{\text{pc}} = 8.4 \mu\text{A}$ a $E_{\text{cat}} = 0.01 \text{ V}$. A pesar de la señal registrada para AA, el electrodo modificado sigue siendo selectivo para H_2O_2 . Primero, por la considerable y significativa señal de intensidad de corriente que se obtiene ($I_{\text{pc}} = 175 \mu\text{A}$) a $E_{\text{cat}} = -0.30 \text{ V}$, lo cual indica la alta sensibilidad del electrodo modificado para la detección y cuantificación del H_2O_2 . Segundo, debido al rango de potencial de trabajo, ya que las mediciones amperométricas para la detección de peróxido de hidrógeno se realizan a potencial fijo de -0.30 V cerrando de esta manera la ventana de potencial y al mismo tiempo la posibilidad de efectuar cualquier otra reacción electroquímica en el medio.

Las mediciones amperométricas a potencial fijo de -0.30 V se presentan en la figura 14b. El H_2O_2 fue inyectado en dos ocasiones para una concentración final de $25 \mu\text{M}$ en la celda antes de los componentes interferentes (UA, AA, XA, KO_2) ya mencionados e inyectados secuencialmente; este hecho con la finalidad de corroborar la señal amperométrica específica para la detección del H_2O_2 para una relación de concentración 1:4 peróxido de hidrógeno:interferentes ($100 \mu\text{M}$). La respuesta amperométrica de la influencia de los compuestos interferentes en la detección de peróxido de hidrógeno se muestra en la figura 14b, donde se aprecia claramente que ninguno de estos compuesto se oxida o reduce a -0.30 V . De tal manera que después de las señales registradas para H_2O_2 , la intensidad de la corriente regresa prácticamente al estado estacionario sin mostrar ninguna otra señal faradáica que pudiera asociarse a otras reacciones electroquímicas en el medio a pesar de la alta concentración de cada uno de los compuestos interferentes adicionados de manera consecutiva. Posteriormente se vuelven a inyectar alícuotas de H_2O_2 obteniendo como resultado el registro de las señales de intensidad de corriente correspondientes al analíto. Esto confirma que dichos compuestos no serán interferencias para la detección final de $\text{O}_2^{\cdot-}$ utilizando el biosensor final *SOD/PEDOT/Pt*.

4.5. Generación química, caracterización y cuantificación espectroscópica de superóxido.

4.5.1. Caracterización espectroscópica de KO_2 como fuente generadora de $O_2^{\bullet-}$.

La espectrofotometría UV-vis ha sido empleada para detectar $O_2^{\bullet-}$ a una longitud de onda de 255 nm en medio aprótico y a 245 nm en solución acuosa. Estos métodos son adecuados para el monitoreo y detección de $O_2^{\bullet-}$ generado a partir de sales de KO_2 por periodos de tiempo largo²⁹.

El interés principal al realizar este ensayo espectrofotométrico ha sido con la finalidad de verificar la producción y concentración de superóxido a partir del reactivo KO_2 .

En este caso se utilizó una solución 20 mM de KO_2 en un medio básico de NaOH, pH 12.5. El pH de la solución contribuye a una mínima dismutación espontánea del $O_2^{\bullet-}$. A partir de esta solución se adicionaron alícuotas para una concentración inicial 0.175 mM a una concentración final de 3.5 mM en una celda de cuarzo ($l = 1\text{cm}$) que contiene una matriz de buffer PBS 0.01 M, pH 7.4. Utilizando la técnica UV-vis se registró la absorbancia en un rango de longitud de onda entre 180 y 300 nm.

En la figura 3.15 (a) se muestran los espectros UV-vis, donde la máxima absorbancia se registra a una $\lambda = 203 \pm 3$ nm. Dentro de la misma gráfica es posible observar la inclinación de las curvas ($abs_{vs} \lambda$) hacia valores mayores de longitud de onda, esta ligera deformación puede estar atribuida a la degradación o dismutación espontánea del $O_2^{\bullet-}$.

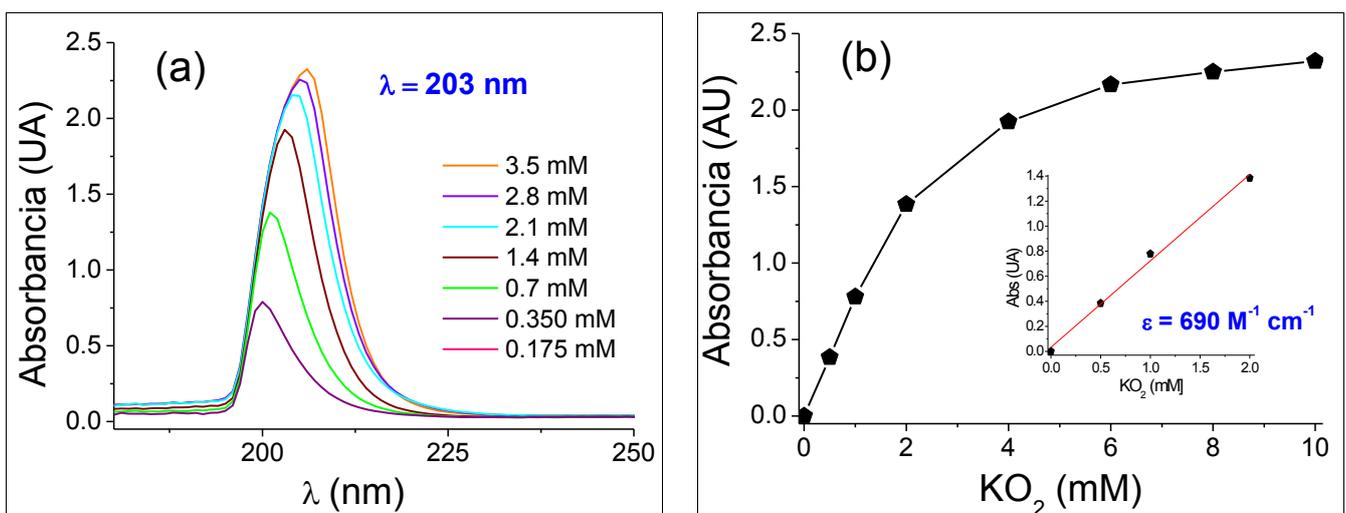


Figura 3.15. (a) Espectros de absorción UV-vis de KO_2 a una concentración inicial de 0.175 mM a una concentración final de 3.5 mM en buffer PBS, pH 7.4; (b) curva de calibración experimental que corresponde al ensayo UV-vis considerando un rango de concentración de 0.5 a 10 mM de KO_2 .

A partir del ensayo UV-vis de KO_2 se construyó la respectiva curva de calibración (figura 3.15b). En este caso la tendencia lineal solo se presenta con los primeros tres puntos. A partir de la regresión lineal se calculó el coeficiente de extinción molar $\varepsilon_{202nm} = 690 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para este reactivo (sal KO_2) en particular. En la literatura se reporta el coeficiente de extinción (ε_T) para el KO_2 en solución a pH 12.5 de $2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Considerando este parámetro reportado, se prosiguió a calcular (como a continuación se muestra) la concentración real de $\text{O}_2^{\bullet-}$ estable presente en nuestra solución.

Considerando:

$$\varepsilon_T = 2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{exp} = 690 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

entonces, el porcentaje de concentración real es:

$$[\%] = \frac{\varepsilon_{exp}}{\varepsilon_T} = 35\%$$

Este cálculo demuestra que la concentración disponible de $\text{O}_2^{\bullet-}$ estable es únicamente el 35% de la concentración con la que fue preparada la solución madre. Este hecho puede ser verificado mediante la interacción y reacción del $\text{O}_2^{\bullet-}$ con agentes capturadores químicos como el XTT o enzimáticos como la SOD.

4.5.2. Caracterización espectroscópica del reactivo XTT.

Este estudio se ha realizado para identificar la longitud de máxima absorbancia correspondiente al reactivo capturador XTT, además para establecer la concentración adecuada que permita dar continuación a la detección de $\text{O}_2^{\bullet-}$. En la figura 3.16 se presentan los espectros de absorbancia para concentraciones crecientes de XTT desde 5 hasta 300 μM . En general se registran las señales a la misma $\lambda = 285 \text{ nm}$. Este valor nos permite corroborar que no habrá traslape o interferencia entre los espectros de KO_2 y XTT al momento de realizar el estudio de la reacción de reducción de XTT con $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Dentro de la misma gráfica se observa que a concentraciones mayores de 200 μM existe una saturación en el sistema. De estos resultados se ha determinado que la concentración adecuada para dar continuación a la detección de superóxido es aquella de 100 μM de XTT. Estudios similares reportan buenos resultados en base al uso de esta concentración ²⁹.

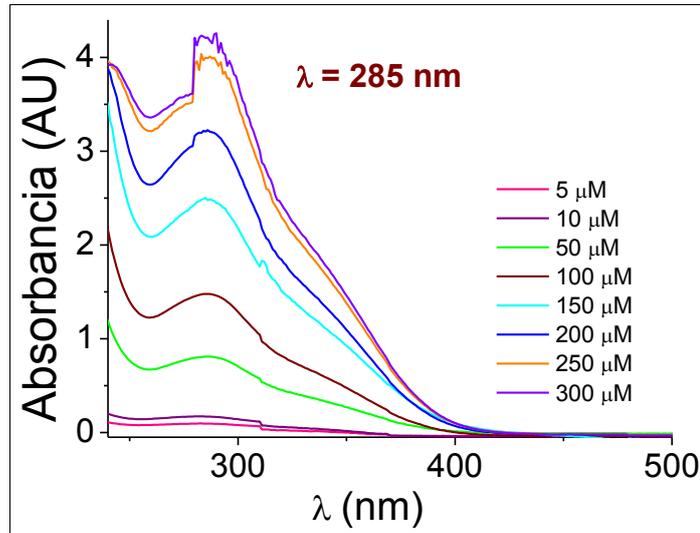


Figura 3.16. Espectro de UV-vis para concentraciones crecientes de XTT desde 5 μM hasta 300 μM en buffer de fosfatos PBS 0.01 M, pH 7.4.

4.5.3. Detección espectroscópica de $\text{O}_2^{\bullet-}$ usando el sistema KO_2/XTT .

Caracterizados los dos reactivos principales para este ensayo, se continuó con el monitoreo espectrofotométrico de la reacción de reducción de XTT con $\text{O}_2^{\bullet-}$ generado a partir de KO_2 . La principal ventaja que muestra el XTT como agente capturador de radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ es su alta solubilidad en agua, hasta $< 2 \text{ mM}$. Esta sal de tetrazolium XTT, reacciona con $\text{O}_2^{\bullet-}$ a una velocidad de reacción $k = 8.59 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ formando un formazan soluble de color rojo (ecuación 6). El formazan soluble puede ser cuantificado por medio de espectrofotometría UV-vis, en donde se registra la máxima absorbancia a una longitud de onda de 470 nm ($\epsilon_{470 \text{ nm}} = 21.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)²⁹.

reacción de reducción de tetrazolium (XTT) por superóxido:



500 μL de XTT 100 μM se colocaron en una celda de cuarzo (volumen 1mL) y se registró su espectro UV-vis correspondiente ($\text{vol}_{\text{KO}_2} = 0$) donde se observa la característica señal de máxima absorbancia a una $\lambda = 285 \text{ nm}$.

Consecutivamente se fueron adicionando alícuotas de 100 μL de KO_2 [20 mM] de manera sucesiva (Figura 3.17). En cada caso se registró su señal de $\text{abs}_{\text{vs } \lambda}$ correspondiente, y claramente se observa como

el pico de máxima absorbancia para XTT va disminuyendo de manera proporcional al incremento de la concentración de $O_2^{\bullet-}$. Dicho decremento de la absorbancia a 285 nm indica la reacción de reducción de XTT, cuyo producto final (formazan de color rojo) muestra su respectiva señal de absorbancia a una $\lambda = 440$ nm. La absorbancia del producto formazan estable incrementa en función de la concentración creciente de $O_2^{\bullet-}$ en la celda.

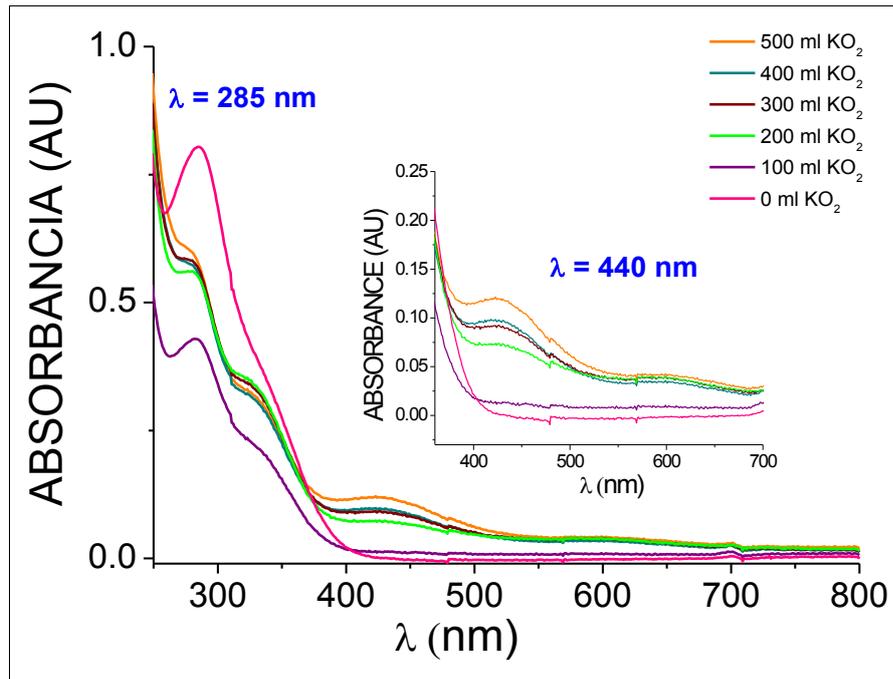


Figura 3.17. Ensayo espectrofotométrico para la influencia de la concentración de $O_2^{\bullet-}$ sobre la reducción de XTT. La mezcla de reacción contiene XTT 100 μ M con adición sucesiva de alícuotas de 100 μ L de KO_2 20 mM.

La gráfica de la figura 3.17 establece claramente que por medio de este método espectrofotométrico es posible realizar la detección de $O_2^{\bullet-}$. A partir de estos resultados cualitativos se construyó la siguiente tabla (Tabla 3.2), en donde se indica los volúmenes sucesivos de KO_2 (columna 1) que fueron adicionados a la celda y la concentración teórica que se esperaba reaccionaría con el XTT (columna 2). Sin embargo, como ya se había obtenido el dato del porcentaje de $O_2^{\bullet-}$ disponible para reaccionar, se realizó el ajuste al 35% considerando esta concentración resultante como la “concentración de reactivo activo” (columna 3). Este dato relativamente teórico fue corroborado y validado usando los valores de máxima absorbancia a $\lambda_{440\text{ nm}}$. Dichos datos de absorbancia (columna 4) se integraron a la ecuación de Beer ($a = \epsilon_{XTT} * l * c$), donde $\epsilon_{XTT} = 0.0071\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ es el valor del coeficiente experimental obtenido a partir de nuestros datos experimentales. Mediante la ecuación de Beer se obtuvieron los

valores de la concentración experimental de $O_2^{\bullet-}$ (columna 5), y estos son prácticamente los mismos que se calcularon como concentración de reactivo activo.

Tabla 3.2. Se muestra la secuencia de valores calculados para determinar la concentración real del superóxido que reacciona para reducir al XTT.

mL KO ₂ [20 mM]	KO ₂ exp [mM]	[O ₂ ^{•-}] _{ra} = f _{35%} [mM]	Abs(AU) ± SD	[O ₂ ^{•-}] _{real} / mM
0	0	0.0	0 ± 0	0
100	4	1.4	0.027 ± 0.012	1.25
200	8	2.8	0.073 ± 0.002	3.36
300	12	4.2	0.091 ± 0.001	4.19
400	16	5.6	0.104 ± 0.005	4.83
500	20	7.0	0.130 ± 0.008	6.04

Finalmente se construyó la respectiva curva de calibración en función de la concentración UA vs. [O₂^{•-} mM] (Figura 3.18). Se realizó la regresión lineal, obteniendo los parámetros analíticos de sensibilidad 0.02 AU mM⁻¹ y límite de detección (LoD = 138 μM).

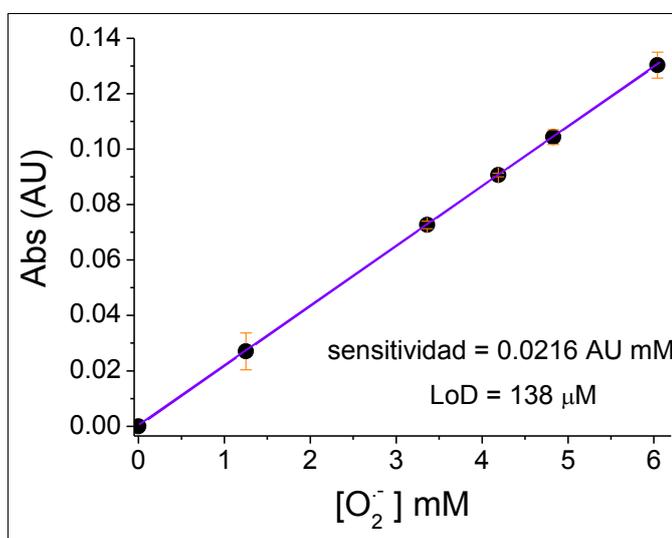


Figura 3.18. Curva de calibración para superóxido correspondiente al ensayo espectrofotométrico para la reacción de reducción de XTT por adición continua de $O_2^{\bullet-}$ desde una concentración 1.25 a 6.04 mM en buffer de fosfatos PBS 0.01 M, pH 7.4.

El estudio realizado ha permitido evidenciar por una parte la generación adecuada de $O_2^{\bullet-}$ utilizando como fuente productora KO₂. El anión-radical superóxido puede ser detectado eficientemente mediante la reducción de XTT. Aquí se establece un ensayo espectrofotométrico sencillo y eficaz para la detección y cuantificación de $O_2^{\bullet-}$, lo que permite establecerlo como un método analítico alternativo para el análisis de $O_2^{\bullet-}$ en soluciones acuosas a pH fisiológico.

4.6. Desempeño del biosensor SOD/PEDOT/Pt para la detección electroquímica de $O_2^{\cdot-}$.

4.6.1. Actividad enzimática de la SOD inmovilizada sobre PEDOT/Pt.

Adicionalmente se evaluó por método electroquímico la actividad de la enzima SOD inmovilizada en el biosensor *SOD/PEDOT/Pt* para la dismutación espontánea de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (ecuación 7) a partir de KO_2 como fuente generadora del anión-radical superóxido en buffer PBS 0.01 M, pH 7.4. Este estudio se realizó por medio de la inyección consecutiva de alícuotas de $0.09 \mu M$ KO_2 verificando de esta manera las señales amperométricas que corresponden a la detección de H_2O_2 registrada por el biosensor, enseguida se adicionaron $200 \mu L$ de 0.1% Catalasa. La principal acción de la catalasa es la captura de H_2O_2 presente en la en la celda electroquímica convirtiéndolo en agua y oxígeno (ecuación 8). Este hecho evita el desempeño del biosensor y como respuesta se produce el decremento instantáneo en la señal analítica de intensidad de corriente regresando prácticamente hasta la línea base (Figura 3.19a).

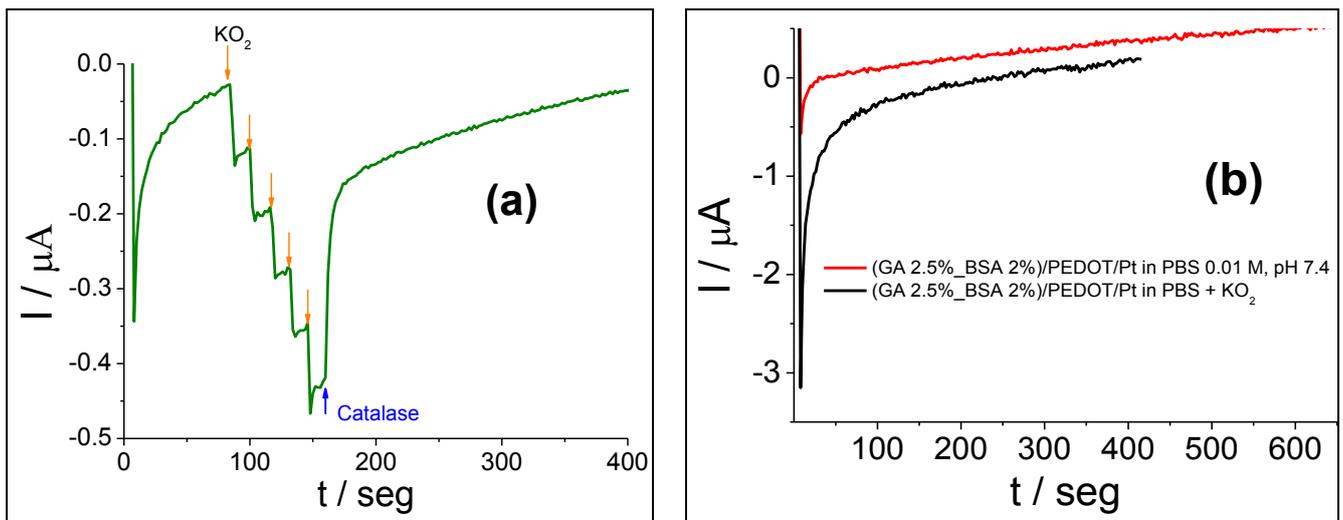
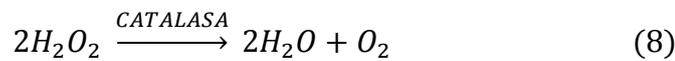
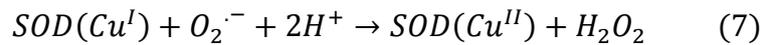


Figura 3.19. (a) Típica respuesta amperométrica para la reacción H_2O_2 + catalasa a -0.30 V vs SCE en buffer PBS 0.01 M, pH 7.4. Las flechas naranjas representan la adición secuencial de $0.09, 0.175, 0.263, 0.350, 0.438 \mu M$ de $O_2^{\cdot-}$. La fuente de producción de superóxido fue KO_2 en NaOH, pH 12.3. La flecha azul indica la inyección de $200 \mu L$ de 0.1% catalasa. (b) Respuesta amperométrica del electrodo modificado (GA 2.5%_BSA 2%)/PEDOT/Pt en presencia de buffer PBS 0.01 M, pH 7.4 y KO_2 : $0.175, 0.35, 0.7, 0.875 \mu M$ a -0.30 V vs SCE en PBS 0.01 M, pH 7.4.

Esto sugiere que la capacidad enzimática de SOD es espontánea y que a su vez la producción de $O_2^{\cdot-}$ por parte del KO_2 es adecuada, lo cual finalmente permite la acción eficiente del biosensor para llevar a cabo la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ y la detección continua de H_2O_2 como señal analítica.

Una de las controversias es el hecho del impacto que surge dentro del sistema en estudio debido a la descomposición del $O_2^{\cdot-}$ por si solo en el medio de reacción. Sin embargo en este trabajo se ha considerado que la enzima (SOD-CuZn) utilizada en el desarrollo del biosensor acelera la destrucción de $O_2^{\cdot-}$ a una constante de velocidad de dismutación $10^9 M^{-1} s^{-1}$ ⁷, en comparación con la constante de descomposición espontánea del mismo anión-radical superóxido en el medio, la cual se ha calculado de $\sim 10^5 M^{-1} s^{-1}$ a pH 7.0 ⁷. Esto indica que la dismutación enzimática de $O_2^{\cdot-}$ es más favorable que su descomposición espontánea en el electrolito.

Con respecto a esto, se evaluó la respuesta amperométrica del sensor restringiendo la integración de la enzima SOD en presencia de $O_2^{\cdot-}$ generado a partir de KO_2 con la intención de observar si se registra la señal de intensidad de corriente asociada al H_2O_2 , lo cual indicaría su descomposición instantánea y el registro de su detección como interferente. En la figura 3.19b se muestra la respuesta del electrodo modificado (GA 2.5%_BSA 2%)/PEDOT/Pt en buffer PBS 0.01 M, pH 7.4 y en presencia de KO_2 . En ambos casos no se presenta ninguna señal faradaica que refleje alguna reacción electroquímica en la celda, prácticamente los perfiles obtenidos corresponden al blanco. Con estos resultados se muestra una vez más la importancia de la actividad enzimática SOD en el biosensor, además de descartar la intervención del H_2O_2 producido por la descomposición espontánea de $O_2^{\cdot-}$ en el electrolito.

4.6.2. Caracterización electroquímica del biosensor para el análisis de $O_2^{\cdot-}$

Los niveles de concentración del anión-radical superóxido en el entorno extracelular bajo condiciones normales han sido reportados en un rango entre 10 a 100 nM ⁷, lo cual es una consideración crítica cuando se pretende diseñar, construir y aplicar biosensores para su detección *in vitro* e *in vivo*. En este trabajo de investigación se ha realizado paso a paso la optimización del biosensor amperométrico diseñado a base de (SOD 0.1%_BAS 2%_GA 2.5%)/PEDOT/Pt (Figura 3.20a) con la finalidad de obtener los parámetros analíticos adecuados para su futura aplicación en sistemas *in vitro* e *in vivo*.

Sobre el recubrimiento biocompatible de PEDOT/Pt se inmovilizó la enzima SOD usando el método “drop coating”. La solución de la enzima se preparó adicionando albúmina sérica de bovino (BSA), la cual permite mantener la actividad enzimática de la SOD. Posteriormente se integra el glutaraldehído (GA) como agente promotor de *cross-linking*, el cual es utilizado con regularidad en la construcción de biosensores para proporcionar estabilidad a la enzima. El Glutaraldehído realiza el *cross-*

linking con los residuos de lisina presentes en la BAS localizados generalmente en su superficie, estas interacciones evitan el enlace directo de GA con los residuos de lisina contenidos en la SOD preservando de esta manera la actividad y configuración de la enzima.

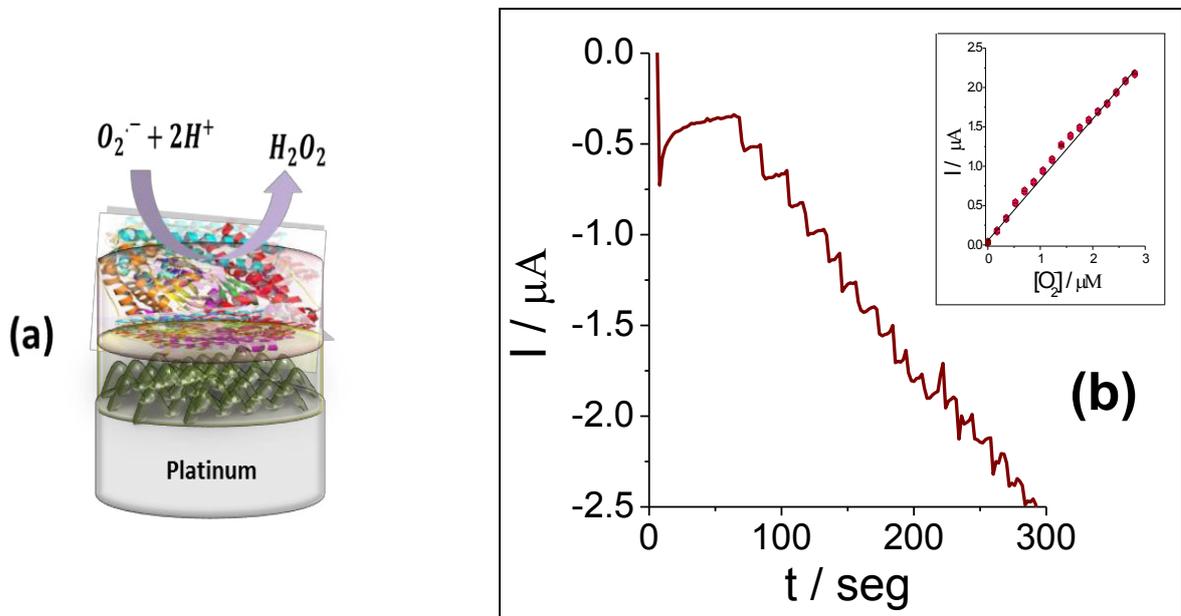


Figura 3.20. (a) Esquema representativo de la configuración final para el biosensor (*SOD 0.1%_BAS 2%_GA 2.5%*)/PEDOT/Pt. (b) Respuesta amperométrica del biosensor SOD/PEDOT/Pt para la adición sucesiva de $O_2^{\cdot-}$ desde una concentración inicial de $0.175 \mu\text{M}$ hasta $2.8 \mu\text{M}$. Potencial aplicado -0.30 V vs SCE en PBS 0.01 M , pH 7.4 ; inserta se encuentra la curva de calibración correspondiente.

La respuesta amperométrica del biosensor desarrollado fue registrada en buffer PBS 0.01 M , pH 7.4 a -0.30 V vs SCE. La figura 3.20b muestra la gráfica de la corriente en función del tiempo de respuesta del electrodo a diferentes concentraciones adicionadas de superóxido, donde se observa que la corriente es más negativa con respecto al incremento en la concentración de $O_2^{\cdot-}$. Después de la caracterización, las condiciones experimentales han sido optimizadas y los parámetros analíticos del biosensor (*SOD 0.1%_BAS 2%_GA 2.5%*)/PEDOT/Pt muestran alta sensibilidad para $O_2^{\cdot-}$ ($0.818 \mu\text{A}/\mu\text{M}$) y bajo límite de detección de *ca.* 11 nM , lo cual sugiere su potencial uso para el monitoreo de $O_2^{\cdot-}$ *in vitro* e *in vivo*.

Algunos parámetros analíticos de biosensores a base de SOD sobre materiales nanoestructurados, reportados desde 2009 son resumidos en la tabla 3.3 ^{7,47,48-51,72-73}.

Nuestros resultados pueden ser comparados con aquellos de más bajo límite de detección 3.5 nM ⁴⁸ y 1.7 nM ⁴⁹. Sin embargo hay que considerar los diferentes contenidos de materiales nanoestructurados para la construcción de ambos biosensores los cuales requieren del uso de nanopartículas de Fe_3O_4 y Au respectivamente. La principal diferencia en el diseño y construcción del biosensor que se presenta en este

trabajo el cual mantiene una configuración más sencilla al final refleja buenos resultados analíticos para la detección y cuantificación de $O_2^{\cdot-}$.

Tabla 3.3. Comparación de los parámetros analíticos reportados para biosensores a base de SOD sobre materiales nanoestructurados. Datos reportados desde 2009 a la fecha.

Electrodo modificado	$E_{trabajo}$ (V)	Sensitividad	LoD	Referencia
SOD/Fe ₃ O ₄ NP/Au	+0.50 vs. Ag/AgCl	183.1 $\mu A cm^{-2} mM^{-1}$	3.5 nM	48
SOD/CNT/PPy/Pt	+0.07 vs. Ag/AgCl	190.0 $\mu A cm^{-2} mM^{-1}$	0.1 μM	72
PMMA/PANI-AuNP/SOD-ESCFM	+0.30 vs. Ag/AgCl	42.5 $\mu A cm^{-2} mM^{-1}$	0.3 μM	74
SOD/chitosan AuNP/GCE	-0.19 vs. Ag/AgCl	6.7 $\mu A cm^{-2} mM^{-1}$	1.7 nM	49
SOD/Cys- SG/AuNP/ITO	+0.17 vs. Ag/AgCl	185 $\mu A cm^{-2} mM^{-1}$	0.2 μM	50
SOD/Pt-Pd NP/CNT/SPEG	-0.1 vs. Ag/AgCl	601 $\mu A cm^{-2} mM^{-1}$	0.71 μM	75
SOD/Pt-Pd NP/PDARGO	-0.30 vs. Ag/AgCl	909.7 $\mu A cm^{-2} mM^{-1}$	2.0 μM	51
MeSOD/AuFs/GCE	-0.30 vs. Ag/AgCl	4.2 $\mu A cm^{-2} mM^{-1}$	92.1 μM	73
SOD/CNT/PEDOT/GCE	-0.30 vs. Ag/AgCl	1115 $\mu A cm^{-2} mM^{-1}$	1.0 μM	47
Sty-(SOD-0.5% GA-2%PEI)/Pt	+0.700 vs. SCE	115.86 nA $cm^{-2} \mu M^{-1}$	0.063 μM	7
(SOD 0.1%_BAS 2%_GA 2.5%)/PEDOT/Pt	-0.30 vs. SCE	104.15 $\mu A cm^{-2} \mu M^{-1}$	11 nM	Presente trabajo

4.6.3. Estudio electroquímico de la estabilidad del biosensor.

Se evaluó el comportamiento de la eficacia del biosensor para el análisis del anión-radical superóxido con respecto al tiempo. El estudio consistió en monitorear las señales amperométricas registradas para la detección y cuantificación de $O_2^{\cdot-}$ por medio de curvas de calibración durante un periodo de 28 días.

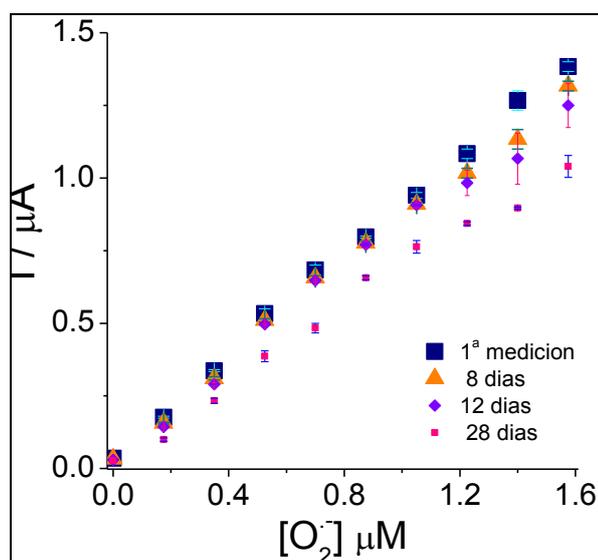


Figura 3.21. Mediciones electroquímicas con el biosensor (SOD 0.1%_BAS 2%_GA 2.5%)/PEDOT/Pt en un rango de concentración (0.175,0.35,0.7,0.875,1.05,1.225,1.4,1.575) μM de $O_2^{\cdot-}$. Estudio de la estabilidad después de 8,12 y 28 días de la primera medición. La fuente de producción de peróxido fue a partir del sistema $KO_2/NaOH$ pH 12.3.

En la figura 3.21 se muestran las curvas de calibración correspondientes a los resultados de corriente (μA) contra la concentración ($\text{O}_2^{\cdot-} / \mu\text{M}$) a los 8, 12 y 28 días después del primer uso del biosensor en el análisis. Se observa que la corriente registrada en las mediciones va disminuyendo hasta en un 27% conforme avanza el tiempo. Esto se refleja a su vez en la ligera disminución de la sensibilidad ($0.597 \mu\text{A}/\mu\text{M}$) del método para el análisis de $\text{O}_2^{\cdot-}$, pero finalmente este valor se mantiene dentro del mismo orden de magnitud que el valor inicial, conservando un buen límite de detección (15 nM).

5. CONCLUSIONES PARCIALES

Un biosensor sensitivo y selectivo para $\text{O}_2^{\cdot-}$ a base de superóxido dismutasa es presentado. El desarrollo del mismo fue realizado inmovilizando la enzima SOD por el método de *drop coating* sobre el electrodo modificado PEDOT/Pt. La integración de glutaraldehido y albúmina sérica de bovino proporcionaron y preservaron la integridad, actividad y estabilidad de la enzima, lo cual contribuyó en la buena sensibilidad y buenos parámetros analíticos exhibidos por el biosensor para el análisis del anión-radical superóxido.

La electropolimerización de PEDOT sobre la superficie de platino muestra un eficiente método de recubrimiento superficial, que contribuye en el aumento sinérgico de la transferencia de carga interfacial, lo cual impacta directamente en el incremento significativo de las señales analíticas. Otra particularidad atribuida al recubrimiento de PEDOT es que actúa al mismo tiempo como capa permselectiva al paso de H_2O_2 y como barrera para evitar el paso de especies interferentes como UA, AA, XA, KO_2 .

Los resultados analíticos que este trabajo muestra permiten establecer al biosensor para su potencial aplicación futura en la detección del $\text{O}_2^{\cdot-}$ para modelos biológicos *in vitro* e *in vivo*.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Stein, T. P. *Nutrition* **2002**, *18*, 867-871.
- (2) Fridovich, I. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 18515-18517.
- (3) Maier, C. M.; Chan, P. H. *Neuroscientist* **2002**, *8*, 323-334.
- (4) Khodade, V. S.; Chandra, M. S.; Banerjee, A.; Lahiri, S.; Pulipeta, M.; Rangarajan, R.; Chakrapani, H. *Acs Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *5*, 777-781.
- (5) Hancock, J. T.; Desikan, R.; Neill, S. J. *Biochemical Society Transactions* **2001**, *29*, 345-350.
- (6) Ray, P. D.; Huang, B. W.; Tsuji, Y. *Cellular Signalling* **2012**, *24*, 981-990.
- (7) Doran, M. M.; Finnerty, N. J.; Lowry, J. P. *Chemistryselect* **2017**, *2*, 4157-4164.
- (8) Aly, H. A. A.; Domenech, O.; Banjar, Z. M. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2012**, *261*, 134-141.
- (9) Liochev, S. I.; Fridovich, I. *Free Radical Biology and Medicine* **2013**, *65*, 1534-1534.

- (10) Hayyan, M.; Hashim, M. A.; AlNashef, I. M. *Chemical Reviews* **2016**, *116*, 3029-3085.
- (11) Sheng, Y. W.; Abreu, I. A.; Cabelli, D. E.; Maroney, M. J.; Miller, A. F.; Teixeira, M.; Valentine, J. S. *Chemical Reviews* **2014**, *114*, 3854-3918.
- (12) Smith, B. A.; Teel, A. L.; Watts, R. J. *Journal of Contaminant Hydrology* **2006**, *85*, 229-246.
- (13) Wei, Y. L.; Wu, K. B.; Wu, Y. H.; Hu, S. S. *Electrochemistry Communications* **2003**, *5*, 819-824.
- (14) Wadhawan, J. D.; Welford, P. J.; McPeak, H. B.; Hahn, C. E. W.; Compton, R. G. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2003**, *88*, 40-52.
- (15) Mano, N.; Fernandez, J. L.; Kim, Y.; Shin, W.; Bard, A. J.; Heller, A. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 15290-15291.
- (16) Cha, M.; Shin, K.; Kwon, M.; Koh, D. Y.; Sung, B.; Lee, H. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 3694-+.
- (17) Islam, M. M.; Imase, T.; Okajima, T.; Takahashi, M.; Niikura, Y.; Kawashima, N.; Nakamura, Y.; Ohsaka, T. *Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*, 912-916.
- (18) Moorcroft, M. J.; Hahn, C. E. W.; Compton, R. G. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2003**, *541*, 117-131.
- (19) Coulter, E. D.; Emerson, J. P.; Kurtz, D. M.; Cabelli, D. E. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 11555-11556.
- (20) Ge, B.; Lisdat, F. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *454*, 53-64.
- (21) Flamm, H.; Kieninger, J.; Weltin, A.; Urban, G. A. *Biosensors & Bioelectronics* **2015**, *65*, 354-359.
- (22) Zielonka, J.; Kalyanaraman, B. *Free Radical Biology and Medicine* **2010**, *48*, 983-1001.
- (23) Burns, J. M.; Cooper, W. J.; Ferry, J. L.; King, D. W.; DiMento, B. P.; McNeill, K.; Miller, C. J.; Miller, W. L.; Peake, B. M.; Rusak, S. A.; Rose, A. L.; Waite, T. D. *Aquatic Sciences* **2012**, *74*, 683-734.
- (24) Zhang, L. L.; Huang, D. J.; Kondo, M.; Fan, E.; Ji, H. P.; Kou, Y.; Ou, B. X. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 2661-2667.
- (25) Bielski, B. H.; Arudi, R. L.; Cabelli, D. E.; Bors, W. *Analytical Biochemistry* **1984**, *142*, 207-209.
- (26) Choi, H. S.; Kim, J. W.; Cha, Y. N.; Kim, C. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry* **2006**, *27*, 31-44.
- (27) Furman, O.; Laine, D. F.; Blumenfeld, A.; Teel, A. L.; Shimizu, K.; Cheng, I. F.; Watts, R. J. *Environmental Science & Technology* **2009**, *43*, 1528-1533.
- (28) Xu, C.; Liu, S.; Liu, Z. Q.; Song, F. R.; Liu, S. Y. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *793*, 53-60.
- (29) Bartosz, G. *Clinica Chimica Acta* **2006**, *368*, 53-76.
- (30) Tarpey, M. M.; Wink, D. A.; Grisham, M. B. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **2004**, *286*, R431-R444.
- (31) Lisdat, F.; Ge, B.; Ehrentreich-Forster, E.; Reszka, R.; Scheller, F. W. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 1359-1365.
- (32) Anpo, M.; Che, M.; Fubini, B.; Garrone, E.; Giamello, E.; Paganini, M. C. *Topics in Catalysis* **1999**, *8*, 189-198.
- (33) Petukhov, V. I.; Baumane, L. K.; Kalvinsh, I. Y.; Skesters, A. P.; Silova, A. A.; Rozentale, B.; Ivanchenko, L. A. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* **2008**, *146*, 875-877.
- (34) Zhao, H. T.; Joseph, J.; Zhang, H.; Karoui, H.; Kalyanaraman, B. *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, *31*, 599-606.
- (35) Chu, H. H.; Yan, J. L.; Tu, Y. F. *Sensors* **2010**, *10*, 9481-9492.
- (36) Madhurantakam, S.; Selvaraj, S.; Nesakumar, N.; Sethuraman, S.; Rayappan, J. B. B.; Krishnan, U. M. *Biosensors & Bioelectronics* **2014**, *59*, 134-139.
- (37) Deng, Z. F.; Rui, Q.; Yin, X.; Liu, H. Q.; Tian, Y. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 5839-5846.
- (38) Mello, L. D.; Kubota, L. T. *Talanta* **2007**, *72*, 335-348.
- (39) Chen, X. J. J.; West, A. C.; Crokek, D. M.; Banta, S. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 9622-9629.
- (40) Di, J. W.; Bi, S. P.; Zhang, M. *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, *19*, 1479-1486.
- (41) Qian, W.; Luo, Q. H.; Wang, Z. L.; Shen, M. C. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004**, *568*, 143-149.

- (42) Bedioui, F.; Quinton, D.; Griveau, S.; Nyokong, T. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12*, 9976-9988.
- (43) Reddy, K. K.; Gobi, K. V. *Electrochimica Acta* **2012**, *78*, 109-114.
- (44) Liu, X. B.; Marrakchi, M.; Jahne, M.; Rogers, S.; Andreescu, S. *Free Radical Biology and Medicine* **2016**, *91*, 25-33.
- (45) Campanella, L.; Favero, G.; Persi, L.; Tomassetti, M. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2000**, *23*, 69-76.
- (46) Kintzios, S.; Marinopoulou, I.; Moschopoulou, G.; Manganab, O.; Nomikou, K.; Endo, K.; Papanastasiou, I.; Simonian, A. *Biosensors & Bioelectronics* **2006**, *21*, 1365-1373.
- (47) Braik, M.; Barsan, M. M.; Dridi, C.; Ben Ali, M.; Brett, C. M. A. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2016**, *236*, 574-582.
- (48) Thandavan, K.; Gandhi, S.; Sethuraman, S.; Rayappan, J. B. B.; Krishnan, U. M. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2013**, *176*, 884-892.
- (49) Wang, L.; Wen, W.; Xiong, H. Y.; Zhang, X. H.; Gu, H. S.; Wang, S. F. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *758*, 66-71.
- (50) Wang, Y.; Wu, Y.; Wang, J. W.; Di, J. W. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2009**, *32*, 531-536.
- (51) Tang, J.; Zhu, X.; Niu, X. H.; Liu, T. T.; Zhao, H. L.; Lan, M. B. *Talanta* **2015**, *137*, 18-24.
- (52) Kakhki, S.; Barsan, M. M.; Shams, E.; Brett, C. M. A. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 77-84.
- (53) Storsberg, J.; Ritter, H.; Pielartzik, H.; Groenendaal, L. *Advanced Materials* **2000**, *12*, 567-569.
- (54) Elschner, A.; Lovenich, W. *Mrs Bulletin* **2011**, *36*, 794-798.
- (55) Brabec, C. J.; Cravino, A.; Meissner, D.; Sariciftci, N. S.; Fromherz, T.; Rispens, M. T.; Sanchez, L.; Hummelen, J. C. *Advanced Functional Materials* **2001**, *11*, 374-380.
- (56) Engberts, J.; Blandamer, M. J. *Chemical Communications* **2001**, 1701-1708.
- (57) Lu, B. Y.; Qin, L. Q.; Chen, W. L.; Chen, S.; Xu, J. K. *International Journal of Electrochemical Science* **2014**, *9*, 4535-4547.
- (58) Wang, L.; Schindler, J.; Thomas, J. A.; Kannewurf, C. R.; Kanatzidis, M. G. *Chemistry of Materials* **1995**, *7*, 1753-&.
- (59) Cosnier, S. *Biosensors & Bioelectronics* **1999**, *14*, 443-456.
- (60) Llorens, E.; Armelin, E.; Perez-Madrigal, M. D.; del Valle, L. J.; Aleman, C.; Puiggali, J. *Polymers* **2013**, *5*, 1115-1157.
- (61) Luo, Y. P.; Tian, Y.; Rui, Q. *Chemical Communications* **2009**, 3014-3016.
- (62) Gobi, K. V.; Mizutani, F. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2000**, *484*, 172-181.
- (63) Tian, Y.; Mao, L. Q.; Okajima, T.; Ohsaka, T. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 4162-4168.
- (64) Tainer, J. A.; Getzoff, E. D.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *Nature* **1983**, *306*, 284-287.
- (65) Hart, P. J.; Balbirnie, M. M.; Ogihara, N. L.; Nersissian, A. M.; Weiss, M. S.; Valentine, J. S.; Eisenberg, D. *Biochemistry* **1999**, *38*, 2167-2178.
- (66) Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. *Biotechniques* **2004**, *37*, 790-+.
- (67) Wine, Y.; Cohen-Hadar, N.; Freeman, A.; Frolow, F. *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, *98*, 711-718.
- (68) Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, A.; Torres, R.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. *Rsc Advances* **2014**, *4*, 1583-1600.
- (69) Govardhan, C. P. *Current Opinion in Biotechnology* **1999**, *10*, 331-335.
- (70) Karimpil, J. J.; Melo, J. S.; D'Souza, S. F. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2011**, *71*, 113-118.
- (71) Cruz, J.; Barbosa, O.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R.; Torres, R.; Ortiz, C. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2012**, *80*, 7-14.
- (72) Rajesh, S.; Kanugula, A. K.; Bhargava, K.; Ilavazhagan, G.; Kotamraju, S.; Karunakaran, C. *Biosensors & Bioelectronics* **2010**, *26*, 689-695.
- (73) Ye, Q.; Li, W.; Wang, Z.; Zhang, L. M.; Tan, X. S.; Tian, Y. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2014**, *729*, 21-26.

CAPITULO III. Análisis amperométrico de superóxido con un biosensor de alta respuesta enzimática a base de PEDOT y Superóxido dismutasa.

(74) Santhosh, P.; Manesh, K. M.; Lee, S. H.; Uthayakumar, S.; Gopalan, A. I.; Lee, K. P. *Analyst* **2011**, *136*, 1557-1561.

(75) Zhu, X.; Niu, X. H.; Zhao, H. L.; Tang, J.; Lan, M. B. *Biosensors & Bioelectronics* **2015**, *67*, 79-85.

CONCLUSIONES GENERALES

- Una metodología novedosa de electroanálisis fue implementada para la detección y cuantificación simultánea de GSH y GSSG como biomarcadores de estrés oxidativo en fluidos biológicos (orina y plasma) de organismos vivos, como modelo ratas Wistar intoxicado con plomo. Ningún otro estudio hasta la fecha ha reportado metodología similar para la determinación de la cupla antioxidante (GSH/GSSG) en fluidos biológicos empleando técnicas electroanalíticas. Además cabe mencionar que tampoco se ha reportado el análisis de estos biomarcadores simultáneamente sin el uso de pretratamiento y derivatización empleando técnicas sofisticadas como HPLC/MS-MS. De tal suerte que el trabajo de investigación aquí presentado y con base en los resultados obtenidos, es pionero en este contexto.

- Dentro del mismo tema fue posible determinar que el método de electroanálisis, también permite la determinación de otras especies antioxidantes de suma importancia como el Ácido ascórbico y la Cisteína. Estos antioxidantes así como el GSH juegan un rol importante durante el padecimiento de estrés oxidativo y pueden ser clasificados como biomarcadores asociados al mismo. Esto implica que con nuestro método sería posible determinar toda una gama de biomarcadores dentro de una misma muestra de fluido biológico.

- Como se mencionó el fenómeno del estrés oxidativo engloba tanto la participación de especies antioxidantes y oxidantes. De tal manera que para complementar el trabajo de investigación, también se desarrolló un método de electroanálisis para la determinación de superóxido. Este método también ha sido novedoso en comparación con los reportados hasta la fecha, ya que sugiere el uso de una metodología relativamente sencilla pero eficaz para la detección del superóxido a niveles de concentración inferiores a los publicados en la literatura empleando técnicas de electroanálisis. Hasta el momento los resultados reportados fueron los obtenidos en soluciones sintéticas de superóxido, sin embargo su aplicación para la detección del anión-radical superóxido en sistemas *in vivo* e *in vitro* es prometedora.

PERSPECTIVAS

- Con respecto al tema de los antioxidantes, se continuará con la optimización adecuada del método electroanalítico para la detección de una gama de antioxidantes (ácido ascórbico, cisteína y GSH-GSSG) de manera simultánea en muestras sintéticas y muestras reales (p.e. orina y plasma).
- De igual manera, a la par se realizarán métodos alternos de validación para el método de electroanálisis propuesto. En este caso para la detección de ácido ascórbico y cisteína.
- Para la determinación de superóxido, se trabaja en la detección de este radical-anión en sistemas *in vitro*. Empleando un sistema enzimático de Xantina/Xantinaoxidasas. Posteriormente se considera la aplicación del método para el monitoreo del superóxido en cultivos celulares perturbados por algún inductor que provoque el padecimiento de estrés oxidativo. Finalmente los resultados podrán ser asociados.
- Se trabaja también en el escalamiento del biosensor para la detección de superóxido. En este caso se ha considerado el uso de ultramicroelectrodos de platino. La optimización de todos los parámetros para su modificación e inmovilización de la enzima SOD siguen en marcha. Los resultados son prometedores y se continúa trabajando para establecer calibración adecuada para su posible aplicación.

ANEXO I.**METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO****i. Cuantificación de ROS.**

La evaluación y demostración de la participación de ROS en eventos bioquímicos es posible mediante el uso de diferentes metodologías ¹. En la figura A1 se describe la clasificación básica de las metodologías empleadas para la determinación del estrés oxidativo en organismos vivos. Comenzando por los ROS, la única detección directa de estos radicales es RSE ².

Sin embargo de manera indirecta también es posible cuantificarlos mediante métodos espectroscópicos donde usualmente se emplean cierto tipo de sales que son reducidas cuando se ponen en contacto con el agente oxidante (p.e. $O_2^{\bullet-}$) para generar un producto colorido que puede ser analizado en muestras biológicas ³. Los métodos de trampas de spin permiten que el radical reaccione con moléculas detectoras de amplio campo para generar un producto estable el cual puede ser evaluado usando una variedad de técnicas, entre estas UV-vis y HPLC. Algunos de los principales ensayos son la hidroxilación del ácido salicílico la reducción de citocromo c para la detección de radicales superóxido ⁴ y la detección de óxido nítrico por la producción de compuestos coloreados ².

ii. Cuantificación de metabolitos como productos de peroxidación.

Otra manera indirecta para la cuantificación de ROS consiste en el análisis de metabolitos productos de la peroxidación de biomoléculas, ya que la presencia de estos productos finales sirve como una prueba de la existencia de ROS en las células y tejidos. Generalmente el ADN se somete a hidrólisis enzimática para posteriormente analizar los fragmentos de telómeros dañados por medio de electroforesis en gel ⁵. Las muestras hidrolizadas se aprovechan para hacer también análisis de bases de ADN hidroxiladas tales como 8-OHdG y N₂-etenodeoxiguanosin por mencionar algunos ejemplo; generalmente en este caso son empleadas técnicas HPLC, MS-MS, GC-MS y UV-vis. Otra de las pruebas realizadas sobre el DNA es el ensayo cometa donde es posible observar macroscópicamente la modificación que esta macromolécula presenta por efecto del daño oxidativo ².

El deterioro y daño a lípidos altera y modifica la membrana celular y por lo tanto las funciones celulares en general. La peroxidación lipídica puede ser determinada por métodos alternos para cuantificar el progreso del proceso oxidativo y evidenciar su existencia. Este proceso es caracterizado por la formación de dienos

conjugados (DC)⁶ los cuales pueden ser fácilmente monitoreados por métodos espectroscópicos. En la última etapa de se produce malondialdehído (MDA), el cual puede ser detectado por ácido tiobarbitúrico que da un color rosa fácilmente medible ⁷. El pentano y el hexano son gases de hidrocarburo los cuales son productos finales de la peroxidación. Estos gases son detectados en el aliento de humanos y animales de prueba usando cromatografía de gases.

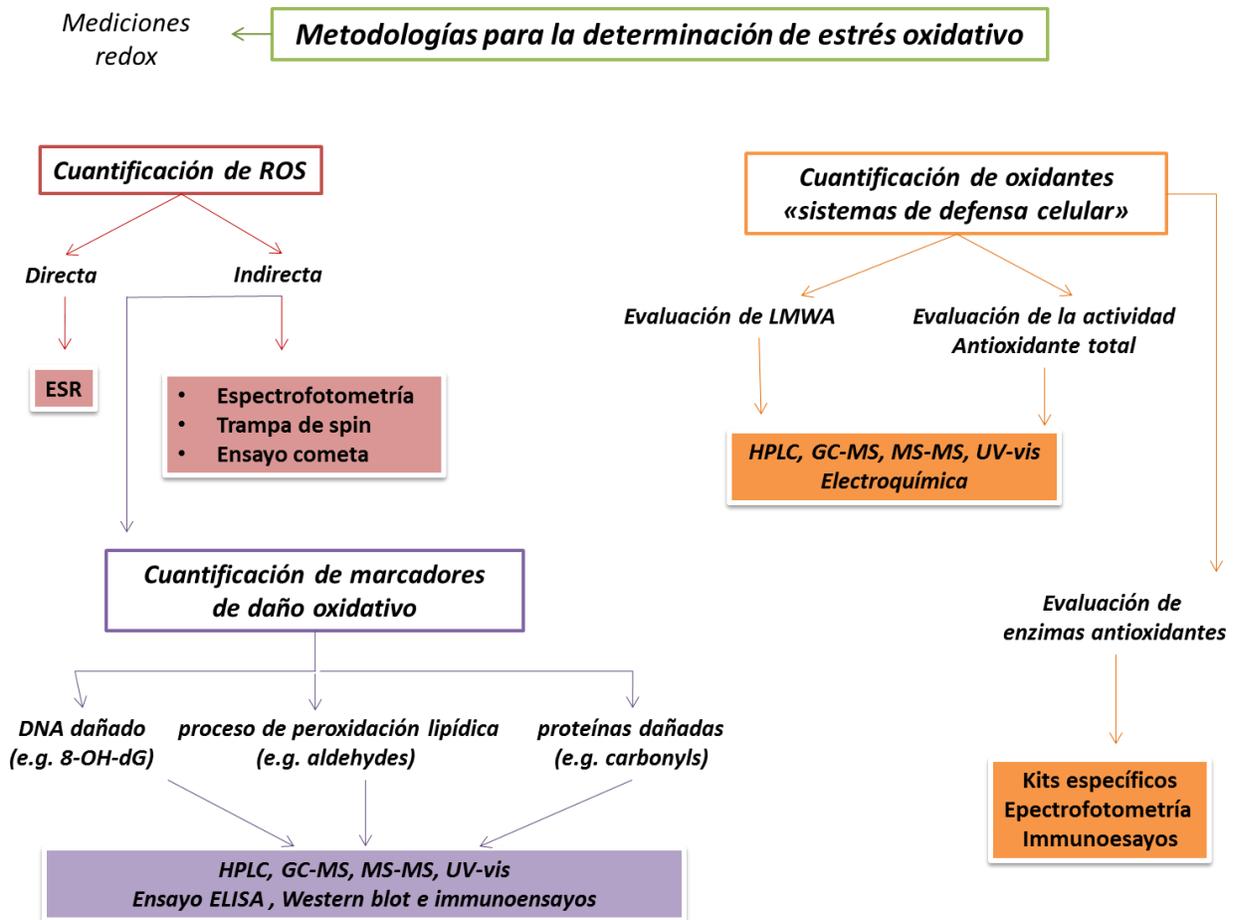


Figura A1. Clasificación básica de los métodos usados para determinar estrés oxidativo ².

iii. Detección y cuantificación de residuos proteicos oxidados.

La evaluación del daño oxidativo sobre proteínas puede ser abordado usando el ensayo de Dinitrofenilhidracina (DNP) el cual sirve para marcar residuos carboxil, empleando técnicas como ELISA y Western blot para cuantificar los niveles de DNP enlazada a grupos carboxilo ⁸. La cuantificación de la

perdida de grupos tiol –SH es otra metodología alterna que a partir del quenching de fluorescencia en algunas proteínas (p.e. triptófano) puede estimarse ⁹. Todos estos productos de residuos proteícos oxidados pueden ser evaluados tanto por inmunomarcadores específicos, como con métodos de cromatografía líquida (HPLC) y cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS) ¹⁰.

iv. Detección y cuantificación de niveles de antioxidantes y sus metabolitos.

Los ensayos de actividad total antioxidante ofrecen grandes ventajas y es considerada una herramienta muy útil para detectar fenómenos de estrés oxidativo en fluidos biológicos y tejidos. Una gran cantidad de métodos han sido propuestos para evaluar la actividad y composición de enzimas antioxidantes, las cuales junto con los LMWAs, constituyen los dos principales componentes del sistema antioxidante.

v. Determinación de la actividad enzimática antioxidante.

La actividad de aquellas enzimas antioxidantes (p.e. SOD, CAT) puede ser determinada con técnicas espectroscópicas, empleando Kits específicos cuyos reactivos interactúan con las enzimas para generar un producto generalmente colorido, el cual se mide con UV-vis. Por medio de electroforesis en gel también es posible determinar la actividad enzimática, por reconocimiento y diferenciación de enzimas oxidadas. La inmunocitometría es otra de las metodologías alternas que permite evaluar la función de enzimas antioxidantes.

vi. Análisis del perfil antioxidante redox.

Los cambios en el perfil antioxidante redox pueden indicar inmediatamente que el sistema biológico se encuentra bajo ciertas fisiopatologías generadas por daño oxidativo ². En este caso el agotamiento de una molécula antioxidante causa cambios en los niveles de todas las moléculas antioxidantes. Este comportamiento puede ser evaluado por medio del estudio individual de cada antioxidante o más bien dicho de la relación particular de cada cupla redox por ejemplo ácido ascórbico/ascorbato; GSH/GSSG entre otros ¹¹.

Numerosos procedimientos de análisis permiten la detección y cuantificación de LMWAs y los metabolitos generados debido a su oxidación; lo que en conjunto determina la relación de la cupla redox ¹². Los métodos empleados generalmente son indirectos, ya que estos requieren de la reacción por una parte de la especie antioxidante con algún agente químico que permite su derivatización y que posteriormente es

detectado y cuantificado por técnicas espectrofotométrica, fluorescencia, HPLC, MS-MS ¹². El metabolito producto de la oxidación del antioxidante también suele someterse a análisis semejantes.

Otras técnicas indirectas son los métodos de inhibición competitiva que involucran una especie radical adicionada a la muestra junto con un capturador el cual compite con el antioxidante para atrapar al radical oxidante. Los LMWAs presentes en las muestras bajo investigación pueden opacar/apagar al radical, entonces interfiere en esta reacción con el capturador adicionado; de tal manera que la variación en la concentración del capturador es cuantificada con técnicas espectroscópicas (UV-vis) o electroquímicas y finalmente estos valores son asociados a la concentración de antioxidante presente en la muestra Existen otras metodologías alternas, las cuales emplean diferentes técnicas incluyendo bioquímicas e inmunohistológicas ^{13 14}.

Los cambios en el poder reductor de las muestras biológicas esta correlacionado con todos los LMWAs. El poder reductor o también conocido como capacidad antioxidante total puede ser determinada por medición directa con el uso de métodos electroquímicos, en donde se emplea un electrodo sobre el cual se promueve la oxidación de todas aquellas especies reductoras presentes en la muestra. Los métodos electroquímicos incluyen varias técnicas, tales como potenciometría, titulación electroquímica y voltametría ². La última se describe a detalle, porque esta hace posible la medición del poder reductor de ambos antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos en fluidos biológicos y tejidos homogenados. La medición del poder reductor por métodos voltametricos ofrece grandes ventajas ¹⁴. Algunas mediciones se realizan fácil y rápidamente, lo que permite la evaluación de varias muestras sin extracción y tratamientos sofisticados.

Otro método directo se realiza monitoreando la actividad de una sonda ideal redox conocida cuyo estado reducido y oxidado tienen diferentes propiedades físicas que pueden ser medidas como una función de concentración. Esta sonda redox es comúnmente férrico/ferroso la cual es empleada en el ensayo FRAP el cual está basado en la reducción del férrico con antioxidantes en la muestra lo cual resulta en una solución de color azul que puede ser medido a 593 nm ¹⁵.

vii. Referencias bibliográficas.

- (1) Llesuy, S.; Evelson, P.; Campos, A. M.; Lissi, E. *Biological Research* **2001**, *34*, 51-73.
- (2) Nyska, A.; Kohen, R. *Toxicologic Pathology* **2002**, *30*, 620-650.
- (3) Hayyan, M.; Hashim, M. A.; AlNashef, I. M. *Chemical Reviews* **2016**, *116*, 3029-3085.
- (4) Liu, R. M.; Liu, Y. W.; Forman, H. J.; Olman, M.; Tarpey, M. M. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2004**, *286*, L121-L128.
- (5) Fairbairn, D. W.; Olive, P. L.; Oneill, K. L. *Mutation Research-Reviews in Genetic Toxicology* **1995**, *339*, 37-59.
- (6) Halliwell, B. *American Journal of Clinical Nutrition* **2000**, *72*, 1082-1087.
- (7) Zhang, Y. J.; Chen, S. Y.; Hsu, T. M.; Santella, R. M. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 207-211.
- (8) Sies, H. *European Journal of Biochemistry* **1993**, *215*, 213-219.

ANEXO I.

- (9) Levine, R. L.; Moskovitz, J.; Stadtman, E. R. *Iubmb Life* **2000**, *50*, 301-307.
- (10) Davies, K. J. A. *Molecular Aspects of Medicine* **2016**, *49*, 1-7.
- (11) Motchnik, P. A.; Frei, B.; Ames, B. N. *Oxygen Radicals in Biological Systems, Pt D* **1994**, *234*, 269-279.
- (12) Lenchner, I.; Segev, G.; Ben Ari, T.; Kohen, R.; Sirota, R.; Bruchim, Y. *Research in Veterinary Science* **2018**, *117*, 92-96.
- (13) Proteggente, A. R.; Pannala, A. S.; Paganga, G.; Van Buren, L.; Wagner, E.; Wiseman, S.; Van De Put, F.; Dacombe, C.; Rice-Evans, C. A. *Free Radical Research* **2002**, *36*, 217-233.
- (14) Ou, B. X.; Chang, T.; Huang, D. J.; Prior, R. L. *Journal of Aoac International* **2013**, *96*, 1372-1376.
- (15) Chung, W. Y.; Benzie, I. F. F. *Clinica Chimica Acta* **2013**, *424*, 237-244.

ANEXO II

INTOXICACIÓN AGUDA DE RATAS WISTAR CON PLOMO Y SU ASOCIACIÓN AL PADECIMIENTO DE ESTRÉS OXIDATIVO.**i. Generación de tumores en ratas Wistar por efecto del estrés oxidativo inducido con plomo.**

La intoxicación aguda se refiere a una intoxicación periódicamente rpomovida sobre el organismos vivo, el cual suele presentar ciertas alteraciones fisiopatológicas (entre ellas tumoraciones corporales) y alteraciones en el comportamiento ¹. La intoxicación aguda puede ser prolongada hasta provocar la muerte del organismo biológico modelo. Análisis microscópico de cortes de tejido suelen ser utilizados para evidenciar la acumulación de plomo asociada a la intoxicación, además del análisis químico de la concentración de plomo en sangre ^{2 3 4}.

En esta pequeña sección se muestran los resultados físicos y químicos observados durante la manipulación de intoxicación de ratas Wistar con plomo, y su asociación con el padecimiento de estrés oxidativo.

En este estudio los experimentos fueron realizados con animales (ratas Wistar) de peso promedio 210 ± 37 g, estos se dividieron en dos grupos: control y tratados con plomo (intoxicado). El grupo tratado con plomo ($n = 3$) recibió $50 \text{ mg}_{\text{PbAc}}/\text{kg}_{\text{corporal}}$ de RW de dosis intraperitoneal durante un periodo de dos semanas. La solución de PbAc fue preparada diariamente a partir de los reactivos originales para obtener la concentración deseada. El grupo control ($n = 2$) prescindió de la administración de PbAc, pero, recibió la misma dieta, administración de agua y entorno general. Para el grupo de ratas tratadas elegimos la ruta intraperitoneal (figura AII-1(i)) de exposición a PbAc promoviendo así la intoxicación aguda en los animales ¹.

Por una parte mencionaremos que después de la primera semana de haber aplicado la solución intraperitoneal de AcPb diariamente, observamos que justo en el cuadrante inferior abdominal de las ratas se presenta una cierta inflamación anormal (figura AII-1(ii)). Esta inflamación mencionada crecía conforme el tiempo avanzaba, después de termindo el tratamiento de dosificación se observa que la inflamación aumento considerablemente formado una especie de tumor (figura AII-1(iii)) cuya apariencia es dura al tacto. Cabe mencionar que durante la última semana de intoxicación también observamos el comportamiento bastante agresivo que las ratas mostraban.

Consecutivamente se realizó el análisis químico de plomo en sangre. En la figura AII-I se observa claramente el incremento significativo de plomo hasta de casi 48 unidades en la sangre de aquellos animales dosificados con AcPb.

ANEXO II

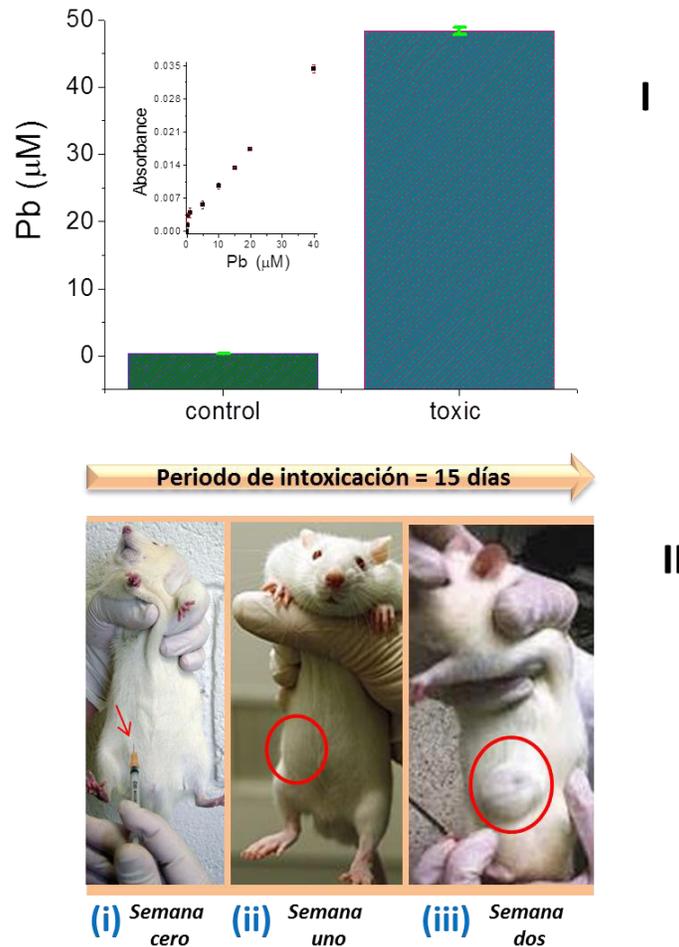


Figura AII-1. (I) Niveles de plomo en sangre de ratas Wistar intoxicadas con AaPb (grupo toxic) y no intoxicadas (control). Inserto se muestra la curva de calibración correspondiente. Fotografías de ratas Wistar (II-i) inyección intraperitoneal de ACPb; (II-ii) inflamación del abdomen bajo; (II-iii) tumor en el abdomen bajo.

*Fotografías tomadas con ayuda del asistente Juan Pedro Galvan del bioterio, Departamento de Biología Experimental, Universidad de Guanajuato.

Con base en las observaciones físicas (pseudodiagnóstico físico) y el análisis químico de plomo en sangre, podemos determinar que debido a la intoxicación aguda de las ratas, este modelo biológico encaja dentro de la clasificación del padecimiento de estrés oxidativo en un nivel de intensidad intermedia^{5 6} como se observa en la siguiente tabla A-II.

Esto lo podemos explicar de alguna manera, con la validación de la intoxicación de los animales, la cual promueve e incrementa el padecimiento de fenómenos fisiopatológicos como estrés oxidativo⁷, el cual a su vez provoca efectos fisiopatológicos de daño celular generando tumoraciones debido al daño tisular. De alguna manera el propio organismo del animal logra mantener su homeostasis celular y continúa con vida durante el periodo de intoxicación.

Tabla A-II. Se muestran los principales grados de intensidad para el estrés oxidativo, algunos de los factores que lo detonan, las rutas de señalamiento específico y finalmente las respuestas fisiológicas que se expresa.

Factores de inducción	Intensidad de estrés oxidativo	Ruta de señalización	Activación molecular	Efecto fisiológico
Dieta Shock fisico Fármacos Drogas Metales pesados Radiaciones UV e IR	Baja	Nrf2/Keap1	Mecanismo antioxidante	Respuesta adaptativa
	Intermedia	NF-kB, AP1,MAP quinasas	Mecanismo antioxidante y proteínas de inflamación	Respuesta combinada: Adaptación vs Daño celular
	Alta	Desconocida ?	Desconocida ?	Necrosis y Apoptosis

ii. Asociación entre estado redox y el padecimiento de tumores en ratas Wistar intoxicadas con plomo.

Dentro del mismo contexto hemos querido también interpretar y asociar nuestros resultados con el estado redox del organismo vivo ⁵. De acuerdo a los procesos de generación y eliminación de ROS. Al parecer nuestro modelo biológico en estudio (ratas Wistar) muestra la capacidad de regular y mantener niveles bajos de ROS ^{8 9 5}.

Creemos que esto ocurre de la siguiente manera: durante la primera semana de intoxicación (Figura AII-2i) las ratas entran dentro del proceso de estrés oxidativo agudo, donde el organismo de estos animales genera una sobreproducción de ROS durante este periodo de tiempo. En este caso es posible pensar que los sistemas de defensa antioxidante son capaces de hacer frente adecuadamente para controlar la cantidad de ROS y regresar a los niveles dentro del rango de una fisiología normal. Probablemente esto es atribuido al incremento en la producción y expresión de sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos ⁸, evitando de alguna manera trastornos fisiológicos severos.

Posteriormente mediante el tiempo de intoxicación se prolonga (segunda semana) se pasa a la siguiente etapa, el estrés oxidativo crónico (Figura AII-2ii), en donde al parecer la sobreproducción de ROS sigue dentro de los mismos niveles y es constante. Sin embargo en este caso la capacidad celular requiere de más tiempo para neutralizar la sobreproducción de ROS. De tal manera que la homeostasis del organismo se ve alterada lo que implica aletargar un poco más su estabilidad fisiológica. El daño celular y tisular se muestra más grave debido a la exposición de los componentes celulares con las especies oxidantes durante un periodo mayor de tiempo lo que provoca la formación de tumores ¹⁰ y otros padecimientos.

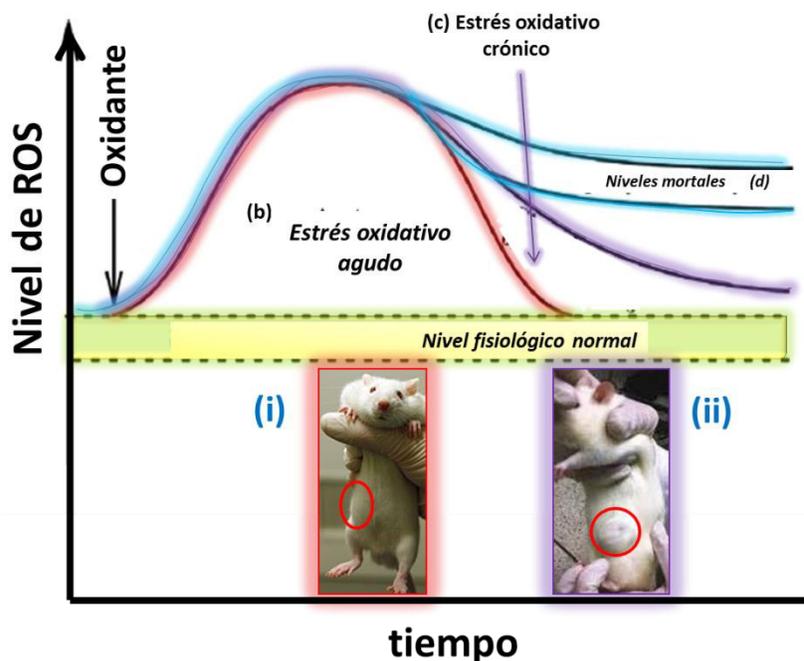


Figura AII-2. El esquema muestra el comportamiento dinámico para las diferentes etapas descritas para el estrés oxidativo. El estado redox asociado a ratas Wistar intoxicadas con plomo se explica en función a la fluctuación de los niveles de ROS y antioxidantes bajo estrés oxidativo agudo (i) y crónico (ii).

Esta información nos ha permitido completar y entender aún más el desarrollo del trabajo de investigación aquí realizado. Cabe aclarar que quedan algunos puntos por retomar, los cuales serán abordados posteriormente como perspectivas.

iii. Referencias bibliográficas.

- (1) Pande, M.; Mehta, A.; Pant, B. P.; Flora, S. J. S. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2001**, *9*, 173-184.
- (2) Gassowska, M.; Baranowska-Bosiacka, I.; Moczydlowska, J.; Frontczak-Baniewicz, M.; Gewartowska, M.; Struzynska, L.; Gutowska, I.; Chlubek, D.; Adamczyk, A. *Toxicology* **2016**, *373*, 13-29.
- (3) Kang, H. G.; Jeong, S. H.; Cho, M. R.; Cho, J. H.; Bischoff, K. *Human & Experimental Toxicology* **2009**, *28*, 647-654.
- (4) Xu, S. Z.; Bullock, L.; Shan, C. J.; Cornelius, K.; Rajanna, B. *International Journal of Developmental Neuroscience* **2005**, *23*, 53-64.
- (5) Lushchak, V. I.; Bagnyukova, T. V.; Husak, V. V.; Luzhna, L. I.; Lushchak, O. V.; Storey, K. B. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2005**, *37*, 1670-1680.
- (6) Labunskyy, V. M.; Hatfield, D. L.; Gladyshev, V. N. *Physiological Reviews* **2014**, *94*, 739-777.
- (7) Skoczynska, A.; Smolik, R.; Jelen, M. *Archives of Toxicology* **1993**, *67*, 200-204.
- (8) Sies, H. *Redox Biology* **2017**, *11*, 613-619.
- (9) Poole, L. B. *Free Radical Biology and Medicine* **2015**, *80*, 148-157.
- (10) Leinonen, H. M.; Kansanen, E.; Polonen, P.; Heinaniemi, M.; Levonen, A. L. *Redox and Cancer, Pt A* **2014**, *122*, 281-320.

