

Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas



Desarrollo de un minibiosensor para la determinación
de lactato en muestras biológicas

Noelia Soledad Marchetti Acosta

Tesina para optar al título de Licenciada en Biotecnología

Director: Dr. Joaquín Rodríguez

Director Asistente: Lic. Matías Carnevale

Año: 2017



A mi familia

Agradecimientos

A Dios por regalarme la vida y su amor infinito.

A mis viejos Oscar y Julia por haberme dado esta maravillosa oportunidad y haber estado siempre a mi lado durante este largo camino, confiando en mi, alentándome, dándome sus fuerzas cada vez que las mías se agotaban. Por su apoyo en cada paso y cada una de mis decisiones. Por su entrega y su amor incondicional.

A Yamile, mi hermana, mi amiga, mi compañera de la vida. Por guiarme, ayudarme y bancarme siempre.

A Walter por aceptar mis complicados tiempos y cambios de humor, por su apoyo, comprensión y respeto.

A mis abuelos, por todo el amor que siempre me brindaron y porque son mi ejemplo más grande de lucha, fuerza y perseverancia.

A mi Director, el Dr. Joaquin Rodríguez por guiarme durante la realización de este trabajo y transmitirme su pasión por esta disciplina y a mi Co-director Matías, por su paciencia y predisposición cada vez que necesité su ayuda.

A mis amigas de siempre y a las que conocí durante la carrera. Gracias a todas ellas por haber estado presente en todo momento, por su confianza, sus consejos y su cariño sincero. Soy muy afortunada de tener a mi lado a personas como ellas.

Al Dr. Edgardo Guibert y a todas las personas que forman parte de CAIC, por haberme recibido con amabilidad y por hacer del instituto un lugar agradable para trabajar.

A Hebe por su valiosa colaboración en los análisis estadísticos de los resultados.

Índice

1 Introducción.....	1
1.1 Lactato.....	1
1.1.1 Lactato y Acidosis Láctica.....	2
1.1.1.1 Utilidad clínica de la medición de lactato.....	2
1.1.2 Lactato y preservación de órganos.....	3
1.1.2.1 Preservación hipotérmica.....	3
1.1.3 Lactato y vinos.....	4
1.2 Métodos usados para medir lactato en muestras biológicas.....	5
1.2.1 Métodos amperométricos.....	6
1.2.2 Métodos espectrofotométricos.....	7
1.2.3 Métodos de oxidación química.....	7
1.3 Biosensores.....	7
1.3.1 Clasificación de los biosensores.....	9
1.4 Minibiosensor de L-lactato.....	9
1.4.1 Conformación del bioreceptor.....	9
1.4.1.1 Enzima.....	9
1.4.1.2 Membrana de huevo (ESM).....	10
1.4.1.3 Quitosano.....	12
1.4.2 Transductor.....	12
1.4.2.1 Diferencia de potencial de polarización. Curva característica.....	13
1.4.2.2 Características del sensor de Clark.....	14
Tiempo de respuesta.....	14
Efecto de la temperatura.....	16
1.5 Estudio de la permeabilidad de la membrana de huevo al lactato.....	16
2 Objetivos.....	19
2.1 Objetivo general.....	19
2.2 Objetivos particulares.....	19
3 Materiales y Métodos.....	20
3.1 Construcción del biosensor.....	20

3.1.1 Preparación del bioreceptor.....	20
3.1.1.1 Obtención de la membrana aviar.....	20
3.1.1.2 Preparación del buffer fosfato.....	21
3.1.1.3 Preparación de la solución de quitosano.....	21
3.1.1.4 Preparación de la enzima LOx.....	21
3.1.1.5 Fijación de la enzima LOx sobre la membrana.....	21
3.1.2 Ensamble del biosensor	22
3.1.2.1 Cloridización del electrodo.....	22
3.1.2.2 Montaje del bioreceptor.....	23
3.1.2.3 Configuraciones del biosensor.....	23
3.1.3 Descripción del sistema de detección.....	23
3.2 Caracterización del biosensor.....	24
3.2.1 Determinación del potencial de polarización del electrodo.....	24
3.2.2 Calibración del electrodo.....	25
3.2.3 Determinación del tiempo de respuesta del electrodo.....	26
3.2.3.1 Efecto del tiempo de utilización del bioreceptor sobre la determinación del tiempo de respuesta del electrodo.....	26
3.2.3.2 Efecto del quitosano sobre tiempo de respuesta del electrodo.....	27
3.2.4 Determinación de la constante de permeabilidad de la membrana al lactato.....	28
3.2.4.1 Experimentos con la cámara de Ussing.....	28
3.2.4.2 Cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente.....	29
3.2.5 Respuesta analítica del biosensor al lactato.....	29
3.2.5.1 Determinación del consumo de oxígeno por la enzima LOx ...	29
3.2.5.2 Concentración de lactato y consumo de oxígeno.....	29
3.2.5.3 Efecto de la temperatura sobre el consumo de oxígeno.....	30
3.2.5.4 Ajuste lineal de la repuesta analítica.....	30
3.2.5.5 Efecto del tiempo de utilización del bioreceptor sobre la determinación de los parámetros del ajuste lineal.....	31
3.2.5.6 Cálculo de concentración de lactato en muestras.....	31
3.2.5.7 Efecto de la configuración sobre la determinación de la concentración.....	31
3.2.6 Precisión del método.....	31

3.2.7	Análisis de interferencias.....	31
3.3	Método espectrofotométrico para la determinación de lactato.....	32
3.3.1	Fundamento del método.....	32
3.3.2	Determinación del rango de linealidad.....	32
3.3.3	Ensayo.....	33
3.3.4	Calculo de concentración de lactato en muestras.....	33
3.4	Determinación de Lactato en muestras biológicas.....	33
3.4.1	Soluciones de preservación y perfusatos.....	34
3.4.1.1	Obtención de muestra.....	34
Animales.....		34
Procedimiento quirúrgico.....		35
3.4.1.2	Preservación hipotérmica estática.....	35
Soluciones de preservación utilizadas.....		35
3.4.1.3	Perfusión normotérmica <i>ex vivo</i> de hígado.....	36
Etapa de adaptación.....		36
Etapa de perfusión circulatoria.....		36
Buffers utilizados.....		36
3.4.1.4	Determinación de Lactato.....	38
3.4.2	Plasma Humano.....	38
3.4.2.1	Obtención de muestras.....	38
3.4.2.2	Determinación de lactato.....	38
3.4.2.3	Precisión del método voltamperométrico aplicado en plasma.....	38
3.4.3	Vinos.....	39
3.4.3.1	Obtención de muestras.....	39
3.4.3.2	Determinación de lactato.....	39
3.5	Análisis estadístico.....	39
4	Resultados.....	40
4.1	Caracterización del biosensor.....	40
4.1.1	Determinación del potencial de polarización del electrodo.....	40
4.1.2	Determinación del tiempo de respuesta del electrodo.....	40
4.1.2.1	Efecto del tiempo de utilización del bioreceptor sobre la determinación del tiempo de respuesta del electrodo.....	41
4.1.2.2	Efecto del quitosano sobre el tiempo de respuesta del electrodo.....	41

4.1.3 Determinación de la constante de permeabilidad de la membrana al Lactato.....	42
4.1.4 Respuesta analítica del biosensor al lactato.....	43
4.1.4.1 Concentración de lactato y consumo de oxígeno.....	43
4.1.4.2 Efecto de la temperatura sobre el consumo de oxígeno.....	44
4.1.4.3 Ajuste lineal de la repuesta analítica.....	45
4.1.4.4 Efecto de la configuración sobre la determinación de la concentración.....	45
4.1.4.5 Efecto del tiempo de utilización del bioreceptor sobre la determinación de los parámetros del ajuste lineal.....	46
4.1.5 Precisión del método.....	47
4.1.6 Analisis de interferencias.....	48
4.2 Método espectrofotométrico para la determinación de lactato.....	50
4.2.1 Determinación del rango de linealidad.....	50
4.3 Determinación de lactato en muestras biológicas.....	50
4.3.1 Soluciones de preservación y perfusatos.....	50
4.3.2 Plasma Humano.....	52
4.3.2.1 Precisión del método voltamperométrico aplicado en plasma.....	53
4.3.3 Vinos.....	54
5 Discusión y Conclusiones.....	55
6 Referencias bibliográficas.....	59

Abreviaturas

LOx: L-lactato Oxidasa

ESM: Egg Shell Membrane (membrana de huevo)

pO₂: presión parcial de oxígeno

tr_{90%}: tiempo de respuesta del 90%

P_{app}: Coeficiente de Permeabilidad aparente

Δ[O₂]: consumo de oxígeno

LDH: Lactato Deshidrogenasa

Solución BGP-CS: solución de preservación en base a BES-Gluconato-Polietilenglicol

Solución HTK: Solución de preservación en base a Histidina-Triptofano-Cetoglutarato

Buffer KH: Buffer Krebs-Henseleit

Buffer KH-D: Buffer Krebs-Henseleit- Dextran

Resumen

Los biosensores han sido desarrollados como métodos analíticos, cuantitativos o semicuantitativos para detectar determinados analitos o compuestos específicos. Estos dispositivos utilizan un elemento de reconocimiento biológico que se mantiene en contacto espacial directo con un elemento de transducción. La extensa posibilidad de combinaciones de ambos elementos, ha dado lugar a una gran variedad de alternativas para resolver numerosos problemas analíticos en diversos campos como: salud, industria alimentaria y control ambiental.

En el presente trabajo nos propusimos desarrollar un minibiosensor que permita la determinación de lactato en muestras biológicas, utilizando la enzima L-lactato oxidasa (LOx), inmovilizada sobre una biomembrana de huevo aviar y montada sobre un electrodo de oxígeno como transductor.

Tradicionalmente, los niveles de lactato han servido para evaluar patologías tales como como la hipoperfusión tisular. Su medición puede ser de gran ayuda en el diagnóstico y la evaluación de la gravedad de la sepsis, así como para monitorizar su avance.

La preservación hipotérmica es una técnica ampliamente utilizada para la preservación de órganos para uso clínico. En el periodo de isquemia generado durante el almacenamiento en frío se genera una acumulación de lactato en las células, debido principalmente a la glucólisis anaerobia, lo cual es perjudicial para las mismas. Por lo tanto determinar la producción de lactato por las células durante la preservación hipotérmica es de mucha utilidad ya que ello proporcionará un índice de calidad de la preservación.

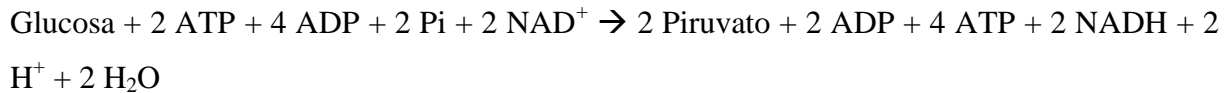
Nuestro biosensor permitió la medición de lactato en muestras de soluciones de preservación, perfusatos, plasma humano y vino. Los valores obtenidos en soluciones de preservación, perfusatos y plasma se compararon con los obtenidos mediante una técnica espectrofotométrica de referencia y se obtuvieron resultados comparativos.

A través de los días de uso, se detectaron variaciones mínimas en los parámetros que caracterizan la estabilidad de operación del biosensor, sin embargo esto no afectó la precisión del método, ya que cuando se hicieron determinaciones de concentración en un período de varios días, no se encontró una variación estadísticamente significativa.

1 Introducción

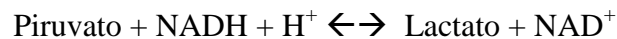
1.1 Lactato

El ácido láctico es un intermediario del metabolismo anaeróbico de los hidratos de carbono. En sangre se encuentra casi en su totalidad disociado en forma de lactato e ión hidrógeno⁽¹⁾. A través del proceso de glucólisis, animales como los mamíferos utilizan la glucosa para producir energía. A partir de cada molécula de glucosa se generan dos moléculas de piruvato:



En condiciones aeróbicas el piruvato es transformado en acetil coenzima A para dirigirse al ciclo de Krebs y oxidarse totalmente a CO₂ y agua.

En condiciones anaeróbicas, el piruvato se reduce a lactato en una reacción catalizada por la enzima L-lactato Deshidrogenasa y de esta forma se regenera el NAD⁺ permitiendo que la glucólisis pueda continuar.



El lactato pasa a la sangre y es transportado hasta el hígado donde puede transformarse nuevamente en piruvato y utilizarse para la síntesis de glucosa (ciclo de Cori, el cual consiste en la conversión de glucosa a lactato en la periferia y de lactato a glucosa en el hígado) o puede permanecer en la célula hasta que se restablezcan las condiciones aeróbicas, momento en que se transformará en piruvato. La concentración de lactato se encuentra directamente relacionada con la disponibilidad de oxígeno. En condiciones normales, el valor de referencia para el lactato en sangre es inferior a 2,2 mmol/l⁽¹⁾. Durante el ejercicio, la concentración del mismo puede incrementarse desde un nivel medio de 0,9 mmol/l hasta 12 mmol/l. Sin embargo, la concentración de piruvato en esos casos se eleva de forma paralela a la de lactato, por lo que la relación lactato/piruvato permanece dentro de la normalidad (6/1 ó 7/1)⁽²⁾. La concentración de lactato aumenta cuando la tasa de producción supera la tasa de eliminación. Su acumulación puede provocar una importante disfunción celular y orgánica de todos los sistemas del organismo dando lugar a un cuadro metabólico denominado acidosis láctica.

1.1.1 Lactato y Acidosis Láctica

Si el aporte de oxígeno que reciben las células es inadecuado para satisfacer las necesidades energéticas de la misma, se produce una acumulación de lactato que conduce a la acidosis láctica, con un pH sanguíneo inferior a 7,32⁽²⁾. Tradicionalmente, la acidosis láctica se ha clasificado en dos categorías: tipo A y tipo B. La tipo A es la resultante del metabolismo anaeróbico por hipoxia tisular y la tipo B incluye causas no anaeróbicas ya que puede producirse en condiciones de oxigenación tisular global adecuada⁽³⁾.

La disminución de la disponibilidad de oxígeno por los tejidos debida a un shock de cualquier etiología (séptico, hipovolémico, etc.), es la principal causas de acidosis láctica tipo A. De esta forma, la hipoxia se convierte en un factor influyente en las vías enzimáticas del metabolismo del piruvato y del lactato al estimular la glucólisis anaeróbica y alterar la función mitocondrial, disminuyendo la utilización del lactato. Cuando la cadena oxidativa mitocondrial no regenera NAD^+ , se estimula la reducción de piruvato a lactato como una fuente de NAD^+ . La hipoxia compromete las dos vías de utilización del lactato. Se inhibe la oxidación del lactato en el ciclo del ácido cítrico, que ocurre principalmente en cerebro, músculo y tejido adiposo, ya que la primera etapa de esta reacción, la oxidación del lactato, está deteriorada por la falta de NAD^+ disponible y la función mitocondrial se altera por la falta de oxígeno. Por otro lado, la glucogénesis que ocurre principalmente en el hígado y en el riñón, también se verá inhibida, la piruvato carboxilasa, que cataliza la conversión del piruvato en oxaloacetato, requiere valores intracelulares adecuados de ATP, los cuales se encuentran en bajo nivel en los estados de hipoxia. Todos estos fenómenos citados pueden originar muy rápidamente acidosis láctica⁽⁴⁾.

La acidosis láctica tipo B se produce por trastornos no asociados a la hipoxia tisular. Estos incluyen enfermedades sistémicas subyacentes, tales como insuficiencia renal o hepática, utilización de diversos fármacos y errores innatos del metabolismo.

1.1.1 1.Utilidad clínica de la medición de lactato

Como se explicó anteriormente, el valor de referencia para el lactato en sangre es inferior a 2,2 mmol/l. En plasma arterial los valores oscilan desde 0,5-1,6 mmol/l y en plasma venoso desde 0,5-2,2⁽⁵⁾. Un aumento, ligero o moderado (inferior a 5 mmol/l) de su concentración, suele cursar sin signos ni síntomas específicos. Cuando se eleva por encima de ese nivel, aumenta el riesgo de aparición de las manifestaciones clínicas de la acidosis láctica: taquicardia, taquipnea y alteración del estado mental, que puede manifestar desde un estado confusional leve hasta el coma⁽⁶⁾.

Por lo mencionado en el apartado anterior, la medición de los niveles de lactato en sangre es importante para valorar la oxigenación tisular, resultando en un buen indicador de hipoperfusión tisular. Otra de las aplicaciones de dicha medición es la detección de alteraciones del metabolismo mitocondrial energético.

El diagnóstico de acidosis láctica en situación basal en algunas ocasiones puede resultar difícil, debido a que es una magnitud que debe medirse en el momento metabólico adecuado, por lo que su interpretación debe realizarse en conjunto con otras magnitudes como el piruvato y/o amonio tras pruebas funcionales como la sobrecarga de glucosa intravenosa, de glucagón o de galactosa. Las pruebas de ejercicio o de ayuno pueden ser de gran utilidad para el correcto diagnóstico del paciente ⁽⁷⁾.

1.1.2 Lactato y preservación de órganos

En los últimos 10 años se ha producido un crecimiento sostenido del empleo de células y tejidos para el tratamiento clínico de enfermedades, para trasplantes, etc^(8, 9). Esto ha generado la necesidad de poder mantener dicho material biológico en condiciones viables durante el tiempo que permanezcan fuera de los organismos de los que provienen. Con este fin se ha desarrollado la ciencia de la preservación de tejidos denominada “biopreservación”, basada en las aplicaciones de los principios de la Criobiología. Al enfocarnos en la preservación de órganos y células, el objetivo principal de la criobiología es mantener dicho material biológico, en condiciones tales que retrasen la disminución de la viabilidad y funcionalidad del mismo tanto como sea posible.

Actualmente, y en base a las condiciones de temperatura empleadas, existen distintas técnicas de preservación. Una de ellas es la preservación hipotérmica, con un rango de temperaturas que van de 0 a 4°C⁽¹⁰⁾, la cual ha sido ampliamente utilizada para preservar órganos para su uso clínico. La otra técnica es la preservación a temperaturas subcero sin congelamiento, que cubre un rango de temperaturas subcero desde -4 a -10°C⁽¹¹⁾. Por último podemos citar a la perfusión hipotérmica de órganos para trasplante⁽⁸⁾.

1.1.2 1. Preservación hipotérmica

La hipotermia es una de las claves para lograr una preservación exitosa, ya que disminuye la velocidad de las reacciones enzimáticas intracelulares y por ende el metabolismo, disminuyendo la senescencia de las células en situaciones de isquemia.

La isquemia, condición en la cual el flujo sanguíneo que recibe un determinado tejido es insuficiente para satisfacer las demandas metabólicas, se encuentra fuertemente asociada a la

preservación de órganos y a la ablación (isquemia quirúrgica) ya que durante la preservación, dichos órganos se someten a isquemia en frío. Durante la isquemia fría se producen ciertos cambios bioquímicos que condicionan el funcionamiento posterior del tejido, y los efectos deletéreos de la misma dependerán directamente del tiempo de almacenamiento del tejido en frío^(12, 13).

En nuestro grupo de trabajo se ha obtenido considerable experiencia en la preservación hipotérmica de hepatocitos aislados y de hígados de rata^(14,15).

El principal problema derivado de la preservación es el fenómeno de injurias por isquemia fría-reoxigenación, que incluye una serie de eventos que atentan contra la viabilidad y posterior funcionalidad de los tejidos, ellos son⁽¹⁶⁾:

- Alteraciones de la fluidez de membranas.
- Alteraciones de la homeostasis iónica de las células.
- Alteraciones metabólicas debido a las diferentes sensibilidades de las enzimas tisulares a la temperatura.
- Producción de especies reactivas del oxígeno.
- Desintegración del citoesqueleto.

Dentro de este espectro de posibilidades, en nuestro grupo de trabajo, específicamente nos interesa conocer aquellos eventos relacionados al contenido energético de la célula y su impacto en la reoxigenación y viabilidad posterior del órgano a ser trasplantado.

En el periodo de isquemia generado durante el almacenamiento en frío, el metabolismo aeróbico se ve fuertemente disminuido, mientras que el metabolismo anaeróbico se mantiene activo. De esta manera, la hipotermia genera una acumulación de lactato en las células, debido principalmente a la degradación de glucógeno, lo cual es perjudicial para las mismas⁽¹⁷⁾. Además, la fuerte disminución de los niveles de ATP ocasionada por el cese del metabolismo aeróbico compromete la función y viabilidad del tejido durante la reoxigenación⁽¹⁶⁾.

Por lo tanto, es de suma importancia determinar la producción de lactato por las células hepáticas durante la preservación hipotérmica, ya que ello proporcionará un índice de calidad de la preservación.

1.1.3 Lactato y vinos

El vino es la bebida que se obtiene de la fermentación alcohólica total o parcial, del zumo de uvas maduras. Está formado por diferentes componentes, de los cuales el principal es el agua, que está en valores que oscilan entre un 82% y un 88%. El segundo componente más

importante es el alcohol, que surge gracias a la fermentación, y le da cuerpo y aroma al vino. El resto de componentes, tales como azúcares, sustancias volátiles, y ácidos, aparecen en menor cantidad. Los azúcares, influyen en el sabor del vino, las sustancias volátiles constituyen parte del aroma, y los ácidos participan en el sabor del vino.

Uno de los principales atributos y cualidades del vino, es la acidez. En algunos ejemplares se le otorga más importancia que en otros, pero siempre forma parte de los pilares fundamentales de la bebida.

Los ácidos orgánicos mejoran considerablemente la composición, la estabilidad y las características organolépticas de todos los vinos^(18,19).

Dentro de ellos, el ácido láctico es fundamental para la calidad de esta bebida. Está presente en un rango que oscila entre 1 y 4gr/l (11 mM -44 mM). El mismo proviene de la fermentación maloláctica, proceso por el cual el ácido málico se transforma químicamente en ácido láctico, mediante la decarboxilación del ácido málico con desprendimiento de CO₂.

1.2 Métodos usados para medir lactato en muestras biológicas

En la actualidad, el análisis de lactato se realiza utilizando técnicas fotométricas estándar y biosensores.

Las técnicas fotométricas se aplican típicamente en el laboratorio clínico y por lo tanto proporcionan una alta precisión y fiabilidad⁽²⁰⁾. Sin embargo, el tiempo necesario para el transporte y la preparación de las muestras a menudo se contradice con las demandas clínicas, especialmente cuando se necesitan medidas repetidas de lactato en un corto período de tiempo.

Los biosensores son generalmente parte integral de los llamados “analizadores sanguíneos de gases” los cuales pueden proporcionar no sólo datos acerca del lactato, sino también de una variedad de otros parámetros (gases en sangre, pH, electrolitos, hemoglobina, etc.) sin demora 24 h/día. Además, estos dispositivos, no requieren una preparación previa de las muestras y pueden ser operados fácilmente en el punto de atención por personal no especializado. Sin embargo, se dice que esta operación no profesional incorpora más fuentes de errores e inexactitudes en comparación con las determinaciones de laboratorio clínico⁽²¹⁾. En el caso del lactato varios autores abordaron el estudio de la performance analítica de los biosensores comparando sus resultados con los obtenidos por métodos ya establecidos⁽²¹⁻²⁴⁾. Biedler y col⁽²⁵⁾ realizaron una investigación con el fin de obtener información sistemática sobre la exactitud, precisión y comparabilidad de la medición de lactato obtenida con el biosensor y los métodos fotométricos estándares. Los datos obtenidos sugieren que la exactitud de la

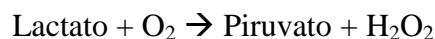
determinación utilizando biosensores es aceptable para fines clínicos pero al mismo tiempo muy variable, lo cual limita la precisión del valor a una sola determinación y la comparabilidad de los resultados obtenidos, con diferentes procedimientos.

La ventaja del uso de biosensores está basada en que no es necesario preparar y diluir la muestra. Esto minimiza el riesgo de fuentes preanalíticas de errores, lo que parecía ser el mayor inconveniente de los métodos fotométricos⁽²⁵⁾.

1.2.1 Métodos amperométricos

La voltamperometría es un método mediante el cual se puede obtener información sobre un determinado analito, midiendo las intensidades de corriente generadas en función de la diferencia de potencial aplicado, en ciertas condiciones, que favorecen la polarización en el electrodo de trabajo. Cuando la corriente proporcional a la concentración del analito se controla a un potencial fijo, la técnica se denomina amperometría⁽²⁶⁾. Estos métodos se basan en la utilización de un electrodo compuesto por un cátodo de plata y un ánodo de platino⁽²⁷⁾. Por lo general el electrodo está protegido por una funda con una solución electrolítica y tiene una membrana de capa múltiple en su extremo. La membrana se compone de tres capas: capa exterior (permeable al lactato), capa media (enzimática) y capa interior (permeable al peróxido de hidrógeno).

La enzima Lactato Oxidasa (EC 1.13.12.4), inmovilizada entre las capas interna y externa de la membrana cataliza la siguiente reacción:



El peróxido de hidrógeno producido por la reacción enzimática atraviesa la capa interior de la membrana y llega al ánodo de platino.



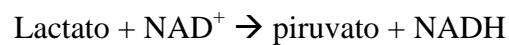
Cuando se aplica un potencial al electrodo, se produce una intensidad de corriente eléctrica directamente proporcional a la concentración de lactato.

Estos métodos permiten la medida de lactato en sangre y, como se dijo anteriormente, suelen estar incorporados a gasómetros que miden de forma simultánea el pH y los gases sanguíneos. Así la concentración de lactato complementa la evaluación del equilibrio ácido-base y el estado de oxigenación del paciente. Esta metodología también se puede utilizar para medir el

lactato en otras muestras biológicas como plasma, líquido cefalorraquídeo y otros líquidos biológicos. Otra ventaja que presentan estos dispositivos es la rapidez con la que es posible obtener resultados (minutos).

1.2.2 Métodos espectrofotométricos

Estos métodos utilizan la reacción de la enzima Lactato Deshidrogenasa, la cual cataliza la oxidación del lactato a piruvato con la reducción simultánea del NAD^+ a $\text{NADH}^{(27)}$. Un mol de NAD^+ se transforma en un mol de NADH por cada mol de lactato presente en la muestra. La absorbancia del NADH es directamente proporcional a la concentración de lactato.



Estos métodos se utilizan principalmente para medir la concentración de lactato en plasma y en líquido cefalorraquídeo.

1.2.3 Métodos de oxidación química

Utilizan permanganato o dióxido de manganeso para degradar el lactato a acetaldehído, monóxido o dióxido de carbono⁽²⁷⁾. El acetaldehído puede medirse espectrofotométricamente o por cromatografía de gases⁽²⁸⁾. Estos métodos son laboriosos y lentos y además es necesario controlar cuidadosamente las condiciones de reacción para evitar inexactitudes. Por estos motivos, actualmente no son utilizados con frecuencia en el laboratorio clínico y se encuentran en desuso.

1.3 Biosensores

Un biosensor es un dispositivo integrado autónomo capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa específica utilizando un elemento de reconocimiento biológico (receptor bioquímico) el cual se mantiene en contacto espacial directo con un elemento de transducción electroquímico⁽²⁹⁾. El receptor es una unidad de reconocimiento que proporciona la unión selectiva o la conversión bioquímica/metabólica del analito lo cual da lugar a un cambio fisicoquímico que va a ser detectado por el transductor. Dicho cambio es una señal, la cual luego es adquirida por el detector y acondicionada por el mismo para su lectura (Figura 1-1).

El receptor puede ser tomado de la naturaleza o ser un producto de la biología sintética. Los bioreceptores más utilizados son tejidos, un cultivo de microorganismos, enzimas,

anticuerpos, cadenas de ácidos nucleicos, etc. Un paso crucial en la construcción de un biosensor es inmovilizar al bioreceptor sobre un soporte, esto asegura el máximo contacto con la muestra y la estabilización del mismo para poder utilizarlo en forma repetida.

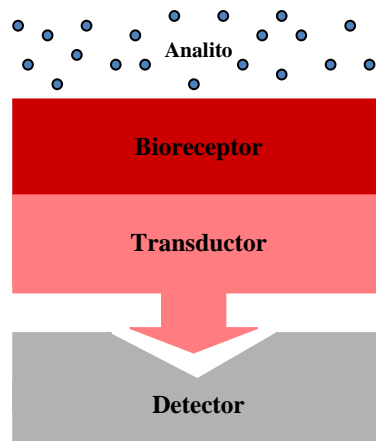


Figura 1-1. Representación esquemática de un biosensor.

Normalmente el bioreceptor se inmoviliza fijándolo sobre un soporte y, a menudo se cubre con una membrana externa (o se coloca entre dos membranas a modo de sándwich), que impide la penetración de sustancias interferentes en la capa sensible bioselectiva y la superficie del transductor, o crea una barrera de difusión para el analito. Tales estrategias aumentan la estabilidad del elemento de bioreconocimiento, aumentan su selectividad y proporcionan las limitaciones de difusión para las reacciones bioquímicas.

El transductor provee la evidencia de que ha ocurrido una reacción en el bioreceptor. La elección del transductor depende del tipo de reacción y de las sustancias liberadas o consumidas. Dicho transductor puede ser electroquímico, termométrico, fotométrico o piezoeléctrico y de acuerdo al tipo de bioreceptor con el que se combina pueden formarse múltiples tipos de biosensores. Los dispositivos electroquímicos (amperométricos, potenciométricos, conductométricos) y ópticos (resonancia de plasmón superficial) son los transductores más utilizados en biosensores disponibles comercialmente⁽³⁰⁾.

Las ventajas esenciales de los biosensores, son su excelente selectividad química y alta sensibilidad, su posibilidad de miniaturización y compatibilidad con computadoras. Además la fijación del bioreceptor permite que el biosensor pueda ser utilizado en forma repetida. Sus desventajas son la estabilidad limitada y requerir un procedimiento bastante complicado para la preparación del material biológicamente activo⁽³¹⁾.

1.3.1 Clasificación de los Biosensores

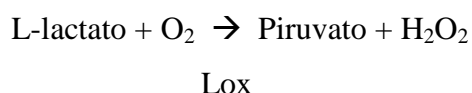
Los biosensores pueden clasificarse de acuerdo al tipo de bioreceptor o del transductor usado (Tabla I).

Según el elemento de reconocimiento	Según el tipo de respuesta físico-química del transductor
Enzimáticos Anticuerpos Células Ácidos nucleicos	Electroquímicos (amperométricos, potenciométricos, conductimétricos) Térmicos Ópticos Piezoeléctricos

Tabla I. Clasificación de los biosensores.

1.4 Minibiosensor de L-lactato

Se ha desarrollado un biosensor para cuantificar L-lactato usando la enzima L-lactato oxidasa (LOx) inmovilizada sobre membrana de huevo aviar, y un electrodo de oxígeno⁽³²⁾. El electrodo actúa como transductor midiendo el consumo de oxígeno que se genera durante la reacción enzimática:



La señal analítica del biosensor es la disminución del contenido de O₂ disuelto luego de la exposición a una solución de L-lactato.

En el presente trabajo de tesina se desarrollará un minibiosensor de lactato (biosensor miniaturizado) con las mismas características del recientemente descrito y se realizarán estudios complementarios no desarrollados en el trabajo original.

La medición de lactato con este minibiosensor se clasifica como método voltamperométrico de medición, debido a que el electrodo mide la corriente generada debido a la reducción del oxígeno en presencia de lactato.

1.4.1 Conformación del bioreceptor

1.4.1.1 Enzima

En este minibiosensor, la enzima LOx es el bioreceptor. Este último elemento es el que usualmente limita la vida útil y estabilidad del biosensor. Es por eso que la inmovilización del

mismo es de suma importancia. Se han intentado varios métodos convencionales para la inmovilización de enzimas (bioreceptores), incluyendo absorción física, unión covalente y microencapsulación en polímeros o matrices de gel. Sin embargo, a pesar de inmovilizar enzimas purificada sobre dichas matrices, a menudo las mismas no son estables luego de haber sido inmovilizadas. Una de las formas posibles y más eficaces de mejorar la estabilidad y actividad de una enzima inmovilizada es incorporarla en un biomaterial, debido a que son biocompatibles entre sí.

En trabajos anteriores se ha determinado que el tiempo de vida de las enzimas fue mucho más prolongado cuando las mismas fueron inmovilizadas sobre membranas de cáscara de huevo. Dichas membranas están constituidas de proteínas fibrosas, lo cual las convierte en un polímero natural biocompatible y altamente permeable y flexible en agua. Así las enzimas pueden atrparse en esta red tridimensional y ser insolubles en solución acuosa⁽³²⁾.

1.4.1.2 Membrana de huevo (ESM)

El huevo de las aves es un sistema vital y autosuficiente para el embrión en desarrollo. Todos los nutrientes, minerales, fuentes de energía y agua utilizados por el embrión durante su incubación, ya se encuentran presentes en el huevo recién puesto. No obstante, el mismo carece de un requisito crucial: el oxígeno, que alimenta la maquinaria metabólica de las células embrionarias de modo que estas puedan ejecutar las complejas maniobras del desarrollo. El huevo respira por difusión a través de millares de poros microscópicos de la cáscara. El gas pasa a través de los mismos mediante dicho proceso pasivo de transporte⁽³³⁾.

La membrana de huevo (ESM, por sus siglas en inglés Egg Shell Membrane) es un tejido que se encuentra entre la cáscara y la clara (Figura 1-2).

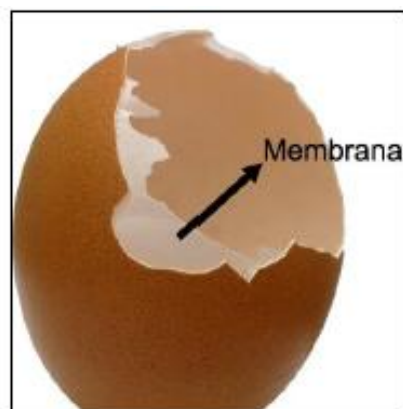


Figura 1-2. Membrana de huevo. La misma se sitúa entre el cascaron y la clara.

La misma está constituida por una red bidimensional de fibras que forman una estructura porosa interconectada (Figura 1-3).

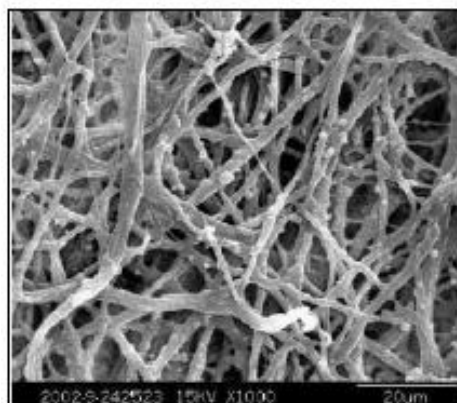


Figura 1-3. Imagen obtenida por microscopía de barrido electrónico de una membrana de huevo. Se puede apreciar que la membrana está formada por una red bidimensional de fibras. (Extraído de Yi y col. 2004⁽³⁴⁾)

Se ha reportado que dicha membrana está compuesta principalmente por colágeno tipo I, V y X. Además, se encuentran presentes proteínas como osteopontina, sialoproteína y queratina^(35, 36). La ESM está constituida por dos membranas, una interna (en contacto con la clara) y otra externa (en contacto con la cáscara). La Tabla II lista los aminoácidos encontrados en las membranas interna y externa de la ESM, junto con los presentes en la cáscara.

Aminoácido	Cascarón de huevo descalcificado	Membrana interna	Membrana externa
	Mol %		
Asx	8.1 ± 0.1	8.4 ± 0.4	8.8 ± 0.1
Thr	6.2 ± 0.1	6.9 ± 0.0	6.9 ± 0.2
Ser	9.7 ± 0.1	9.2 ± 0.2	9.2 ± 0.0
Glx	11.8 ± 0.2	11.1 ± 0.4	11.9 ± 0.3
Gly	13.0 ± 0.3	11.1 ± 0.2	10.6 ± 0.2
Ala	6.9 ± 0.4	4.6 ± 0.2	4.1 ± 0.2
Val	7.3 ± 0.1	7.2 ± 0.2	7.9 ± 0.1
Met	2.0 ± 0.2	2.3 ± 1.0	2.3 ± 1.0
Ile	2.6 ± 0.1	3.3 ± 0.4	3.4 ± 0.1
Leu	6.1 ± 0.2	3.6 ± 0.3	4.8 ± 0.2
Tyr	1.8 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1.7 ± 0.3
Phe	2.1 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1
His	4.2 ± 0.1	4.1 ± 0.4	4.3 ± 0.4
Lys	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3.4 ± 0.2
Arg	5.9 ± 0.1	3.7 ± 0.3	3.8 ± 0.2
Pro	8.3 ± 0.3	11.6 ± 0.7	12.0 ± 0.9
Hyp	0.3 ± 0.1	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.4

Tabla II. Aminoácidos presentes en el cascarón descalcificado de huevo, membrana externa e interna de huevo. (Adaptada de Nakano y col. 2003⁽³⁶⁾).

La ESM posibilita numerosas aplicaciones. Se ha reportado su utilización en terapias de la regeneración de huesos y como parche para el tratamiento de heridas^(37, 38). Tavassoli y colaboradores⁽³⁹⁾ han utilizado la membrana de huevo como un sustrato para el crecimiento celular debido a que su red bidimensional favorecería la adherencia de las células. Otras aplicaciones publicadas incluyen su utilización como material para la inmovilización de enzimas en biosensores de glucosa⁽⁴⁰⁾, como una plantilla para la fabricación de redes de tubos de ZrO_2 ⁽⁴¹⁾, como materia prima para la preparación de películas bioactivas, y para la adsorción de iones metálicos⁽⁴²⁾.

1.4.1.3 Quitosano

Uno de los problemas que presentan los biosensores de L-lactato es que la LOx tiene una estabilidad limitada. Aunque hasta la fecha se han desarrollado muchos de estos dispositivos, algunos de ellos todavía implican procedimientos complicados y la estabilidad a largo plazo de los mismos no es satisfactoria.

Choi y colaboradores utilizaron glutaraldehído para reticular diferentes enzimas sobre membranas de cáscara de huevo durante la fabricación de biosensores de glucosa y H_2O_2 ^(40, 43). Desafortunadamente cuando se utilizó esta misma técnica para inmovilizar LOx sobre la membrana de cáscara de huevo, dicha enzima presentó una sensibilidad muy baja a las soluciones L-lactato. Se cree que el glutaraldehído podría desactivarla⁽⁴⁴⁾.

Recientemente, se ha encontrado que el quitosano es un biomaterial eficiente para inmovilizar LOx a través de la formación de complejos polielectrolíticos entre sus cadenas de polisacáridos y las moléculas de LOx⁽⁴⁵⁾. El quitosano posee propiedades favorables de excelente capacidad de conformado, alta permeabilidad al agua, buena adherencia y biocompatibilidad. Además, tiene propiedades antifúngicas⁽⁴⁶⁾. Debido a todas estas propiedades se decidió utilizar quitosano como agente para inmovilizar la LOx sobre la membrana aviar.

1.4.2 Transductor

Como se dijo anteriormente, los dispositivos electroquímicos son los transductores más utilizados en biosensores disponibles comercialmente. En el presente trabajo se utilizará un electrodo de oxígeno miniClark como transductor.

El electrodo de oxígeno de Clark está conformado por un electrodo activo de platino (Pt) y uno de referencia de Plata-Cloruro de plata (Ag-AgCl), inmersos en una solución saturada de

KCl y separados de la muestra por una membrana de teflón, permeable al oxígeno, pero impermeable a los demás constituyentes de la solución externa (Figura 1-4).

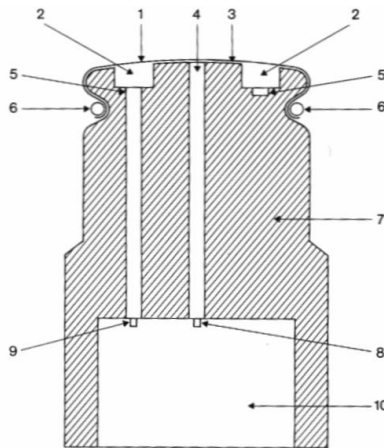
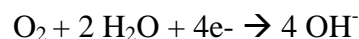


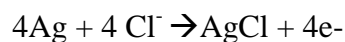
Figura 1-4. Sección transversal de una Celda de Clark. (1) Membrana, (2) Reservorio de electrolito; (3) Película de electrolito sobre la superficie del cátodo; (4) Cátodo; (5) Ánodo (6) “O”-ring; (7) Cuerpo del detector de material aislante; (8) Conexión al cátodo (9) Conexión al ánodo; (10) Espacio relleno con material aislante. (Figura tomada de Hitchman⁽⁴⁷⁾).

El método amperométrico de medición de oxígeno se basa en la reducción de la molécula de oxígeno en el cátodo de platino, que es el electrodo de trabajo. Dicha reacción genera iones OH⁻ que al combinarse con el KCl generan iones Cl⁻. Éstos difunden y reaccionan con el ánodo (electrodo de referencia) de Ag-AgCl generando los electrones necesarios para la reducción del oxígeno⁽⁴⁸⁾.

Reacción en el cátodo:



Reacción en el ánodo



Si los electrodos están conectados a una fuente de tensión y bajo condiciones de polarización del electrodo de trabajo, la magnitud de la corriente será directamente proporcional a la actividad del O₂⁽⁴⁹⁾ o, en forma equivalente, a su presión parcial (pO₂) en la fase gaseosa en contacto con la solución⁽⁵⁰⁾.

1.4.2.1 Diferencia de potencial de polarización. Curva característica

La intensidad de la corriente generada por la reducción del O₂ en el cátodo de platino depende de la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos. La gráfica de la intensidad

generada en función de la diferencia de potencial de polarización se denomina curva característica del sensor de O₂ (Figura 1-5)⁽⁵¹⁾.

En la región comprendida por debajo de -0.5 volts, la relación diferencia de potencial corriente es aproximadamente lineal. A medida que se aumenta el potencial aplicado por encima de -0.5 volts, la corriente tiende a alcanzar el plateau. A medida que la diferencia de potencial se aumenta por encima de -1.0 volts, la magnitud de la corriente nuevamente aumenta debido a la reducción de otras especies además del O₂. El electrodo se opera normalmente eligiendo como diferencia de potencial de polarización al valor correspondiente al punto medio de la región plateau⁽⁵¹⁾. Este potencial es lo suficientemente negativo como para reducir rápidamente todo el O₂ que llega a la superficie. De esta manera, la corriente que circula está limitada por la velocidad de difusión del O₂ y es proporcional a la presión parcial de O₂ disuelto en la solución.

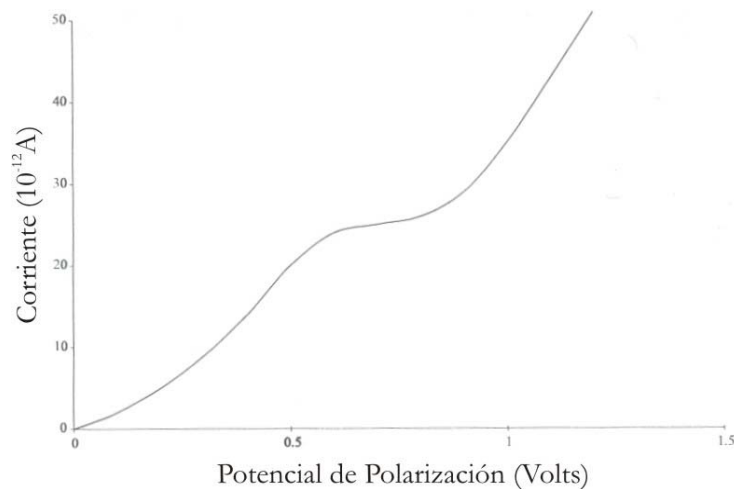


Figura 1-5. Curva característica para un sensor de O₂. (Adaptada de: “Chemical Microsensor, Product No 1201, Operating and Maintenance Manual”, Diamond General Development Corp). El eje horizontal del gráfico muestra los valores absolutos de potencial ya que los mismos son negativos

1.4.2.2 Características del sensor de Clark

Tiempo de respuesta

Cuando se sumerge una superficie sólida, como un electrodo metálico, en una solución agitada se establece un perfil de diferentes capas de solución cerca de la superficie del mismo, con características que permiten diferenciarlas entre sí (Figura 1-6).

La señal del sensor se origina por reducción del O₂ del medio, que debe difundir desde el seno de la solución través de la capa estacionaria de difusión y de la membrana, hasta llegar a la superficie del electrodo. En el estado estacionario, se establece un gradiente de

concentración aproximadamente lineal tanto en la capa estacionaria como en la membrana. Si la pO_2 en la superficie del electrodo se mantiene constante e igual a cero, pero la pO_2 en el seno de la solución cambia, se producirán alteraciones en los gradientes de concentración existentes, hasta alcanzar un nuevo estado estacionario.

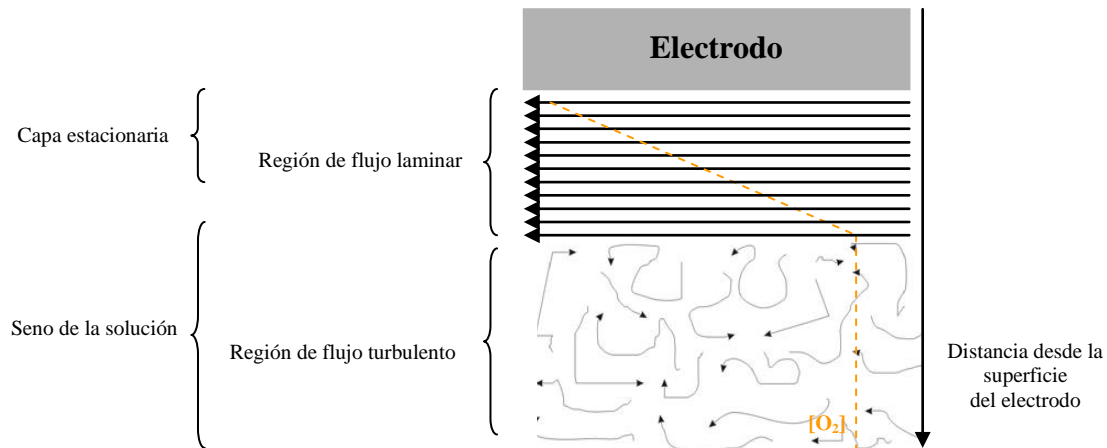


Figura 1-6. Flujo de la solución y perfiles de concentración en la región cercana a la superficie del electrodo.

(Adaptada de Zúñiga et al.,⁽⁵²⁾)

La velocidad con que responde el sensor a un cambio en la pO_2 del medio, es decir el tiempo de repuesta del mismo, depende del tiempo requerido para modificar estos gradientes⁽⁴⁸⁾.

Por razones de conveniencia, la respuesta del electrodo se describe con el tiempo de respuesta del 90% ($tr_{90\%}$) definido como el tiempo necesario para que la señal alcance el 90% de su valor final ante un cambio instantáneo en la presión de O_2 en la solución. Esto se debe a que el sistema nunca llega a una situación cero de corriente ya que existe una circulación mínima de la misma incluso a 0% de pO_2 . Esta es conocida como corriente residual y resulta de pérdidas eléctricas a través de materiales aislantes en el sistema y de la reducción de oxígeno adsorbido en los materiales que componen el electrodo⁽⁵¹⁾. Por ello, la señal nunca alcanza el 100% de su valor final ante un cambio instantáneo en la presión de O_2 en la solución. Además, el tiempo de respuesta del sensor es altamente dependiente de la temperatura, debido al efecto de la misma sobre el coeficiente de difusión del O_2 en la membrana. Para disminuir el tiempo de respuesta del sensor conveniente utilizar una membrana fina con una alta constante de difusión del O_2 y trabajar homogeneizando vigorosamente la solución⁽⁴⁸⁾.

Para los electrodos de membrana modernos, este valor se encuentra en el orden de los 10 segundos, a 37 °C⁽⁵³⁾.

Efecto de la temperatura

La corriente generada en el sensor es altamente dependiente de la temperatura. Tanto la solubilidad del O₂ en el medio como la permeabilidad de la membrana y la velocidad de difusión del O₂ son sensibles a la temperatura^(53, 54). La señal del sensor puede aumentar hasta un 6 % para un aumento de 1 °C de la temperatura⁽⁴⁸⁾. Este coeficiente de temperatura relativamente alto hace necesario mantener siempre un estricto control de la misma ya que si no es constante, se observarán fluctuaciones de la señal como consecuencia de los cambios de temperatura del sensor y de la muestra⁽⁵⁵⁾.

Debido a que las características descritas son muy variables entre sensores, incluso de un mismo tipo, es recomendable caracterizar el sistema antes de comenzar las determinaciones y posteriormente controlar estas características regularmente.

1.5 Estudio de la permeabilidad de la membrana de huevo al lactato

El estudio de transporte a través de segmentos intestinales de animales es un método ampliamente utilizado para estudiar la permeabilidad de fármacos. Este método implica aislar el tejido intestinal, cortarlo en fragmentos de tamaño apropiado y colocarlos en un dispositivo adecuado (cámara de Ussing) para medir la velocidad de transporte del fármaco a través de este tejido. En este método, la permeabilidad se mide con la obtención del fármaco en la cara serosa, en lugar de la desaparición de fármaco en la cara mucosa.

De forma análoga puede estudiarse la permeabilidad de un compuesto de interés a través de una determinada membrana. Para ello se utiliza un compartimento dador con una concentración y volumen inicial definidos de un compuesto, una barrera estructural con un área de sección transversal y grosor definidos, y un compartimento receptor con una concentración y volumen inicial definidos (Figura 1-7).

El compartimento dador debe mantenerse en homogenización constante para asegurar que no haya gradiente de concentración dentro de los dos compartimentos, y así, el único gradiente presente sea a través de la barrera estructural que separa los dos compartimentos. Seguidamente los flujos son estimados de forma simple, midiendo la cantidad de compuesto de interés en el compartimento receptor a determinados tiempos luego de la adición del mismo al compartimento dador.

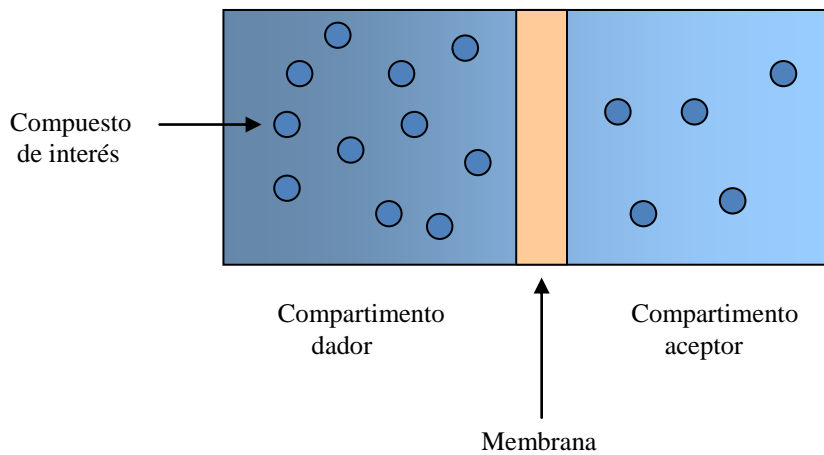


Figura 1-7. Representación esquemática de la cámara de Ussing

En la situación más simple, donde el flujo solo mueve una cantidad insignificante de soluto ensayado a la cámara donante, el gradiente de concentración a través de la barrera es esencialmente constante y el flujo debería por lo tanto ser del orden de cero, es decir, ser constante ya que el flujo ocurre como una función del gradiente de concentración. En tal caso, puede usarse la versión simple de la ley de Fick para relacionar flujo y gradientes de concentración

$$(1) \quad J = P (C_{\text{dador}} - C_{\text{receptor}})$$

Donde P es el coeficiente de permeabilidad, C_{dador} y C_{receptor} son las concentraciones del compuesto en los compartimentos donores y receptores respectivamente y J es el flujo desde el compartimento dador al receptor de la sustancia en cuestión.

Asumiendo que el gradiente de concentración ($C_{\text{dador}} - C_{\text{receptor}}$), a través de la barrera es lineal y constante, independiente del tiempo, la ley de Fick puede simplificarse a 1 más aún si se asume que la concentración de la sustancia en el compartimento receptor es virtualmente cero comparada con la concentración del compartimento dador. Así, el gradiente de concentración es igual a la concentración de la sustancia en el compartimento dador a tiempo cero.

$$(2) \quad J = P (C_{\text{dador}}) \rightarrow P = \frac{J}{(C_{\text{dador}})}$$

De las ecuaciones 1 y 2 se deduce que el flujo es proporcional al gradiente de concentración y que la permeabilidad es simplemente la constante que relaciona flujo y gradiente de concentración.

De esta manera, la permeabilidad de una sustancia en una determinada barrera puede ser estimada por un simple experimento de flujo a un dado gradiente de concentración.

Para que la permeabilidad estimada mediante este método sea válida debe hacerse la consideración experimental de que el gradiente de concentración se mantiene constante o casi constante a través del experimento. Normalmente, la concentración del compartimento receptor es inicialmente cero y se asume que aumenta insignificamente durante el tiempo que curse el experimento. El aumento aceptable en C_{receptor} depende de la precisión requerida, pero se sugiere que el gradiente de concentración no debe cambiar más del 10% durante el experimento⁽⁵⁶⁾.

En este proyecto de tesina hemos planteado este estudio debido a que en ninguno de los trabajos reportados en la bibliografía sobre biosensores construidos sobre membrana de huevo se ha estudiado la permeabilidad del lactato en las diferentes caras de la misma.

2 Objetivos

2.0 Objetivo general

Desarrollar un minibiosensor que permita la determinación de L-lactato en muestras biológicas.

2.1 Objetivos particulares

2.1.1 Caracterizar el funcionamiento del biosensor en base a estudios del tiempo de respuesta, y parámetros de su respuesta analítica (rango de concentraciones medibles, sensibilidad, límite de detección) para determinar su configuración óptima.

2.1.2 Analizar la estabilidad y precisión del método de medición a través del tiempo y caracterizar las posibles interferencias.

2.1.3 Determinar la concentración de lactato en soluciones de preservación y buffers provenientes de procedimientos de preservación hipotérmica estática y reperfusión normotérmica de hígados de rata, en muestras de plasma humano y en vinos.

2.1.4 Comparar los resultados obtenidos con el minibiosensor desarrollado en nuestro laboratorio con aquellos obtenidos por el método espectrofotométrico estándar.

3 Materiales y métodos

La totalidad de los reactivos utilizados para la realización de esta tesina fueron de calidad pro-análisis y provistos por empresas como Sigma, Fluka, Anedra, Ciccarelli y Merck. La enzima Lactato Oxidasa (EC 1.13.12.4), extraída de *Pediococcus* sp., fue provista por Sigma

3.1 Construcción del biosensor

3.1.1 Preparación del bioreceptor

3.1.1.1 Obtención de la membrana aviar

La membrana se obtuvo de acuerdo a la técnica de Arias⁽⁵⁷⁾. Se realizó un orificio en el extremo más romo del huevo haciendo un corte circular con tijera. Se extrajo todo el contenido del mismo y se llevó a cabo un lavado exhaustivo del mismo con agua destilada. Posteriormente su interior fue llenado con una solución de ácido acético al 10% y se colocó en un vaso de precipitado, conteniendo también ácido acético. La boca del recipiente se cubrió con papel film y se dejó reposar durante 24 h. Este procedimiento permitió que la cáscara se desintegre dejando expuesta la membrana. La misma se lavó varias veces con agua destilada para eliminar los restos de ácido acético y cáscara.

Con la ayuda de un sacabocados se obtuvieron discos de membrana de 13 mm de diámetro. En cada uno de ellos se identificaron perfectamente las caras interna (A) y externa (B). Estos discos se dispusieron sobre Parafilm® (con la cara A o B, identificada hacia arriba), se colocaron en placas de Petri, y se almacenaron a 4°C para posteriores usos.



Figura 3-1. Protocolo de obtención y almacenamiento de la membrana aviar.

3.1.1.2 Preparación del buffer fosfato

Na₂HPO₄ 0,1 M- se disolvieron 6,7 g de Na₂HPO₄ en 250 mL de agua destilada

NaH₂PO₄ 0,1 M- se disolvieron 3,45 g de NaH₂PO₄ en 250 mL de agua destilada.

Buffer fosfato- en un vaso de precipitado se colocaron 81 mL de solución de Na₂HPO₄ y se agregó solución de NaH₂PO₄ (19 mL) hasta alcanzar un pH= 7,50 luego se llevó a 200 mL con agua destilada.

3.1.1.3 Preparación de la solución de quitosano

Se preparó una solución de quitosano 0,6 % p/v disolviendo 0,06 g de quitosano en 10 mL de HCl 0,05 M caliente (80-90°C). Luego de enfriar la solución hasta alcanzar la temperatura ambiente, se ajustó el pH a 5,40 con 5 mL de NaOH 0,1 M. Posteriormente se enrazó a 20 mL con agua destilada. Finalmente se filtró para obtener una solución clara de quitosano⁽³²⁾.

3.1.1.4 Preparación de la enzima LOx

Se preparó una solución 1,2 % p/v de LOx disolviendo 3,1 mg de LOx (EC 1.13.12.4) 32,5 U/mg en 0,25 mL de buffer fosfato a pH = 7,50.

3.1.1.5 Fijación de la enzima LOx sobre la membrana

Las membranas interna y externa que componen la EMS no son iguales en cuanto a sus ubicaciones en el huevo, ya que la cara A de la EMS está en contacto con la clara y la cara B se mantiene en contacto con la cáscara. Por lo tanto fijar la LOx en una cara de la membrana o en la otra podría no ser indistinto. Debido a esto, se decidió fijar la enzima en las distintas caras de la membrana.

Para realizar la fijación se colocó una alícuota de 10 µL de solución de LOx sobre la superficie de los discos de membrana (descritos en la sección 3.1.1.1), previamente humedecidos con agua destilada. Luego se agregaron 100 µL de la solución de quitosano, como agente gelificante⁽³²⁾. Se utilizó una espátula especialmente diseñada para mezclar ambas soluciones y extender la mezcla uniformemente sobre toda la superficie de la membrana. Se prepararon una serie de membranas con la LOx fijada sobre la cara A y otra serie con LOx fijada sobre la cara B. Estos discos de membrana con la enzima inmovilizada sobre ellos (bioreceptores) se dispusieron sobre Parafilm®, con la cara que contiene la enzima dispuesta hacia arriba (de la misma forma que se muestra en la figura 3-1) y se dejaron secar a

temperatura ambiente durante 12 h. Luego del secado, se colocaron en placas de Petri, y se almacenaron a 4 °C.

Antes de su uso, el bioreceptor fue sumergido en buffer fosfato durante 10 min y lavado con el mismo para remover cualquier resto de enzima no unida.

3.1.2 Ensamble del biosensor

3.1.2.1 Cloridización del electrodo

La capa de Cl^- (Ag-AgCl) que rodea al electrodo es de primordial importancia para la estabilidad del mismo. Dicha capa se va perdiendo con el tiempo y el uso. Por este motivo es muy importante rechloridizar el electrodo periódicamente⁽⁴⁸⁾. A tal fin, se utilizó un cloridizador fabricado en nuestro laboratorio (Figura 3-2).

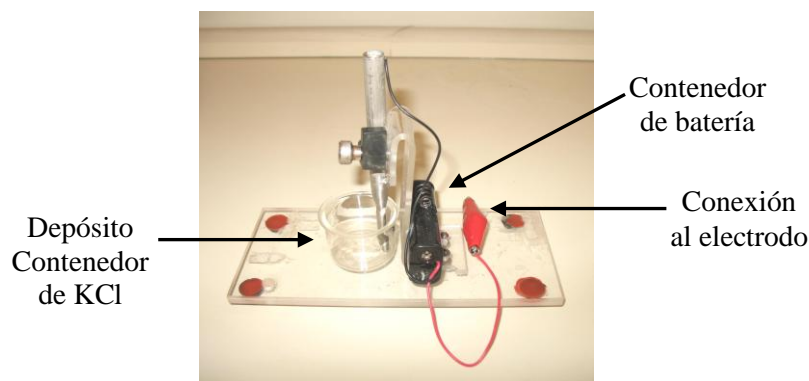


Figura 3-2. Dispositivo usado para la cloridización.

Dicho dispositivo consta de un depósito contenedor de KCl 4M y una fuente de poder (batería 2A 1.5 volts).

Previo a la cloridización, y para eliminar residuos acumulados de usos anteriores, se limpió el extremo del electrodo utilizando una lija fina (grano $n = 1000$) húmeda y un paño. Luego se enjuagó con agua destilada y se procedió a la cloridización.

El depósito del cloridizador se llenó con solución de KCl 4 M. La masa del electrodo de oxígeno se conectó a la terminal positiva de la batería. La terminal negativa se conectó a un contraelectrodo de acero inmerso en la solución. El extremo del electrodo se sumergió 10 mm en la solución de KCl durante 30 s hasta que la misma tomó color gris oscuro. Luego se retiró y se enjuagó con agua destilada.

3.1.2.2 Montaje del bioreceptor

En todos los experimentos, antes del montaje, el biorreceptor se sumergió en buffer fosfato durante 15 minutos para su hidratación. Posteriormente se posicionó sobre la superficie del electrodo de oxígeno y se inmovilizó con un anillo de goma. Se utilizó un electrodo de tipo miniClark (diámetro 5 mm). Para colocar el bioreceptor se utilizó la solución de KCl disponible en el kit del electrodo. El área del bioreceptor dispuesta en el electrodo fue de 6,25 mm² (Figura 3-3)

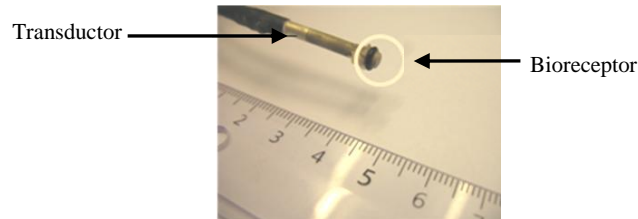


Figura 3-3. Biosensor. Compuesto por el bioreceptor montado sobre el elemento transductor.

3.1.2.3 Configuraciones del biosensor

Considerando las distintas posibilidades de ensamble del bioreceptor sobre el transductor, el biosensor puede presentar cuatro configuraciones diferentes (Figura 3-4).

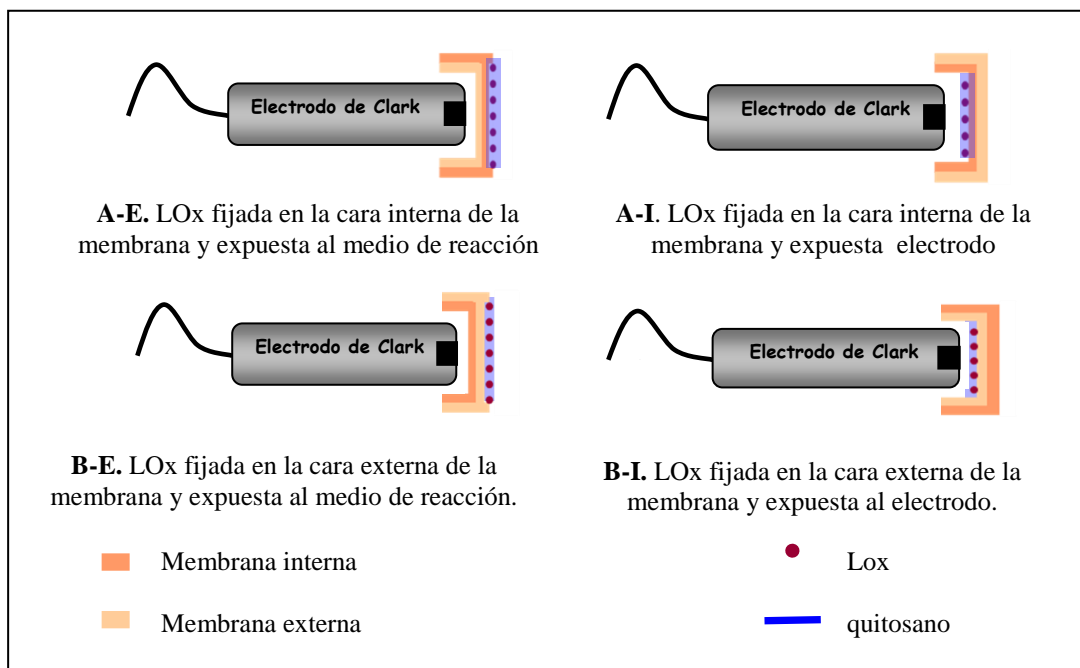


Figura 3-4. Representación esquemática de las configuraciones del biosensor: A-E, A-I, B-E y B-I.

3.1.3 Descripción del sistema de detección

El sistema de detección consiste de tres elementos conectados entre sí: a, b y c. El biosensor (a) se conectó a la unidad polarográfica Chemical Microsensor 1201 (Diamond General Dev. Corp. Ann Arbor. Michigan USA) (b). Dicha unidad es un instrumento para la medición amperométrica de la presión parcial de gases moleculares disueltos. Para obtener el registro gráfico del sensor se conectó el registrador (Gilson) (c) a la unidad polarográfica. Se usaron dos cámaras: la cámara de reacción y una cámara secundaria. La cámara de reacción consta de un vial de vidrio de 2.5 mL. Como cámara secundaria se utilizó un erlenmeyer de 10 mL. (Figura 3-5). Esta cámara fue utilizada durante la calibración del electrodo y en las determinaciones de tiempo de respuesta del mismo.

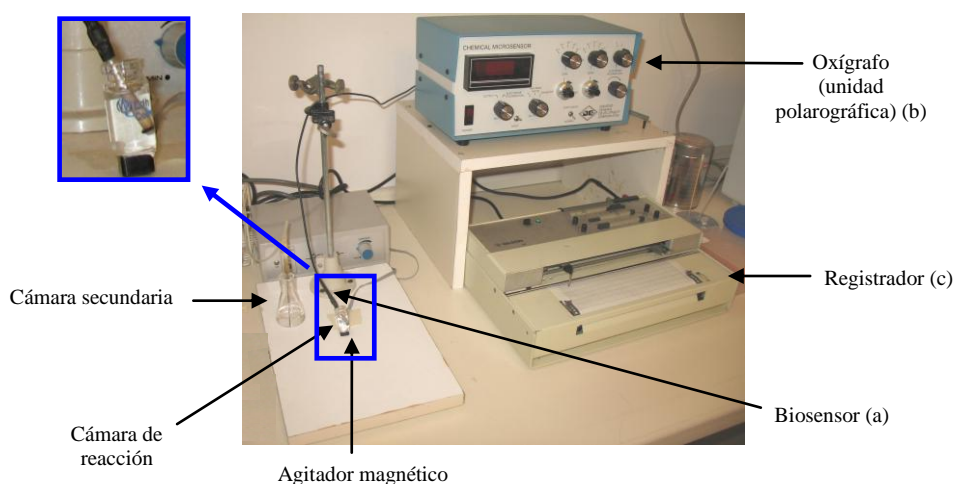


Figura 3-5. Sistema de detección.

3.2 Caracterización del biosensor

3.2.1 Determinación del potencial de polarización del electrodo

Se determinó el potencial de polarización del electrodo de oxígeno tal como se indica en el manual de uso y mantenimiento del mismo⁽⁴⁸⁾. Para dicho procedimiento se utilizó una membrana de polietileno permeable al O₂. Como celda de ensayo se utilizó un vaso de precipitado de 80 mL. El mismo se llenó con solución de NaCl 0,9% y se equilibró con aire atmosférico (aproximadamente 20.5 % O₂, dependiendo de P y T) provisto por un aireador de pecera a un flujo de 600 mL/min. La determinación fue llevada a cabo a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó el electrodo en la solución de NaCl y se ajustó el voltaje de polarización a un valor inicial de -1 V. Se permitió que la corriente se estabilice durante algunos minutos. Una vez que la corriente se encontró estable en -1 V, la misma se registró y se procedió a disminuir el voltaje de polarización hasta -0,9 V. El procedimiento fue repetido

a intervalos de 0,1 V, permitiendo que la corriente se estabilice en cada nivel. En algún valor por debajo de -0,5 V la corriente fue inversa y en este punto se interrumpió el procedimiento. Luego los datos se registraron en un gráfico de corriente vs potencial de polarización.

3.2.2 Calibración del electrodo

Se calculó la pO_2 en el buffer fosfato considerando la temperatura y presión barométrica del día. Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación ⁽⁴⁸⁾:

$$(3) \quad pO_2(\text{corr}) = \%O_2(\text{seco}) (B-pv)/100$$

$pO_2(\text{corr})$: pO_2 real en la fase gaseosa en equilibrio con la solución

$\%O_2$: porcentaje de O_2 en la mezcla de gases seca

B: presión total de la fase gaseosa en equilibrio con la solución

pv: presión de vapor de H_2O a la temperatura de trabajo

Con el dato de la pO_2 se calculó la $[O_2]$ presente en el buffer fosfato ⁽⁵⁸⁾:

$$(4) \quad [O_2] = sO_2 \cdot pO_2$$

sO_2 : solubilidad de oxígeno

El procedimiento de calibración se realizó a 20°C y los gases utilizados fueron: N_2 (100 %) y aire atmosférico (aproximadamente 20.5 % O_2 , dependiendo de P y T) provisto por un aireador de pecera a un flujo de 600 mL/min. En la cámara de reacción se colocó una alícuota de 2 mL de buffer fosfato saturado con aire y se mantuvo con homogenización constante (480 rpm) utilizando una minibarra de teflón y un agitador (Hellma Cuv o Stir modelo 333). En dicha cámara se colocó el biosensor. Inicialmente el mismo fue dejado durante 30 minutos hasta que la señal se equilibró con la pO_2 . Una vez estabilizada la señal, la misma se registró (velocidad del registrador = 2 mm/s) y se determinó así la concentración de O_2 presente en el buffer saturado. Luego se retiró el biosensor y el mismo se colocó en la cámara secundaria que contenía el buffer fosfato, burbujeada con N_2 (desplaza completamente el O_2) y se permitió que la señal alcance el 0% de O_2 . El procedimiento descrito se repitió varias veces (a partir de la segunda repetición del procedimiento, el biosensor solamente se dejó unos minutos en la cámara de reacción antes de ser trasladado a la cámara secundaria) hasta que el

El sistema se estabilizó entre los dos puntos de calibración: 0% y el % O_2 correspondiente a la $[O_2]$ presente en el buffer saturado.

3.2.3 Determinación del tiempo de respuesta del electrodo

En la cámara de reacción se colocó una alícuota de 2 mL de buffer fosfato saturado con aire y se mantuvo con agitación constante mediante una minibarra de teflón. Luego se colocó en la cámara de reacción el biosensor y se dejó unos minutos hasta que la señal se equilibra con la pO_2 . Una vez estabilizada, la señal se registró (velocidad del registrador = 2mm/s) y se determinó así la concentración de O_2 presente en el buffer saturado. Posteriormente se retiró el biosensor y el mismo se colocó en la cámara secundaria conteniendo buffer fosfato, burbujeada con N_2 (desplaza completamente al O_2) y se permitió que la señal alcance el 0% de O_2 . Se calculó el tiempo de respuesta del 90% ($tr_{90\%}$) utilizando el registro gráfico de la señal (Figura 3-6). Se midió la distancia en mm entre el 0% y el 90% del desplazamiento de la señal y utilizando la velocidad de la carta del registrador, en mm/s, se determinó el tiempo requerido para que la señal alcance el 90% de su valor final ante un cambio instantáneo en la presión de O_2 . El procedimiento se realizó a 20°C.

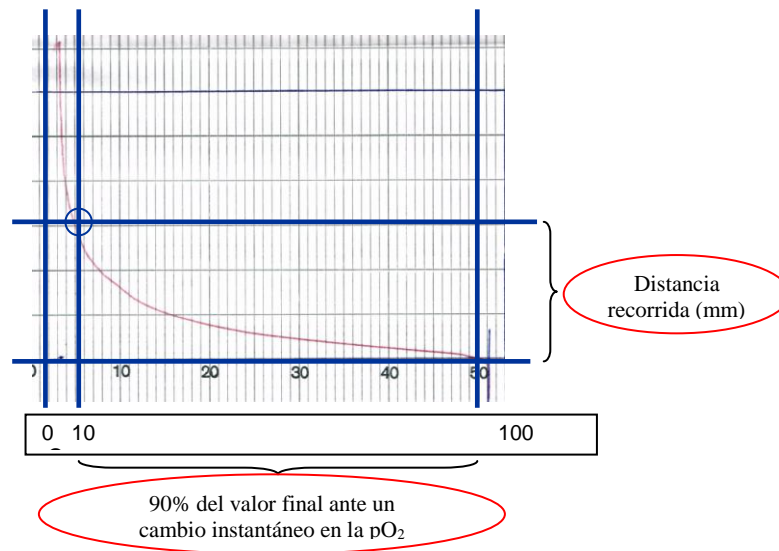


Figura 3-6. Cálculo gráfico del $tr_{90\%}$ respuesta del electrodo.

3.2.3.1 Efecto del tiempo de utilización del bioreceptor sobre la determinación del tiempo de respuesta del electrodo.

Se propuso estudiar el posible efecto generado por la utilización repetida del bioreceptor sobre la determinación de los valores de $tr_{90\%}$. Para ello, se hicieron determinaciones de $tr_{90\%}$ a los 0, 2 y 4 días posteriores al ensamblado, a 20°C, para todas las configuraciones.

3.2.3.2 Efecto del quitosano sobre tiempo de respuesta del electrodo

Este experimento fue diseñado con el propósito de determinar el posible efecto del quitosano sobre la difusión del oxígeno a través de la membrana. Debido a que este proceso puede caracterizarse estimando el tiempo de respuesta del electrodo, se propuso estudiar dicho parámetro utilizando membranas con y sin quitosano (sin la enzima fijada) tanto en la cara A como en la cara B. El volumen y el método de colocación de quitosano son los mismos que los descritos en la sección 3.1.1.5. Antes de iniciar los experimentos, cada membrana a utilizar se sumergió en buffer fosfato durante 15 minutos para su hidratación. Luego se colocaron en distintas configuraciones sobre el electrodo (Figura 3-7) y se determino el $tr_{90\%}$ para cada una de ellas.

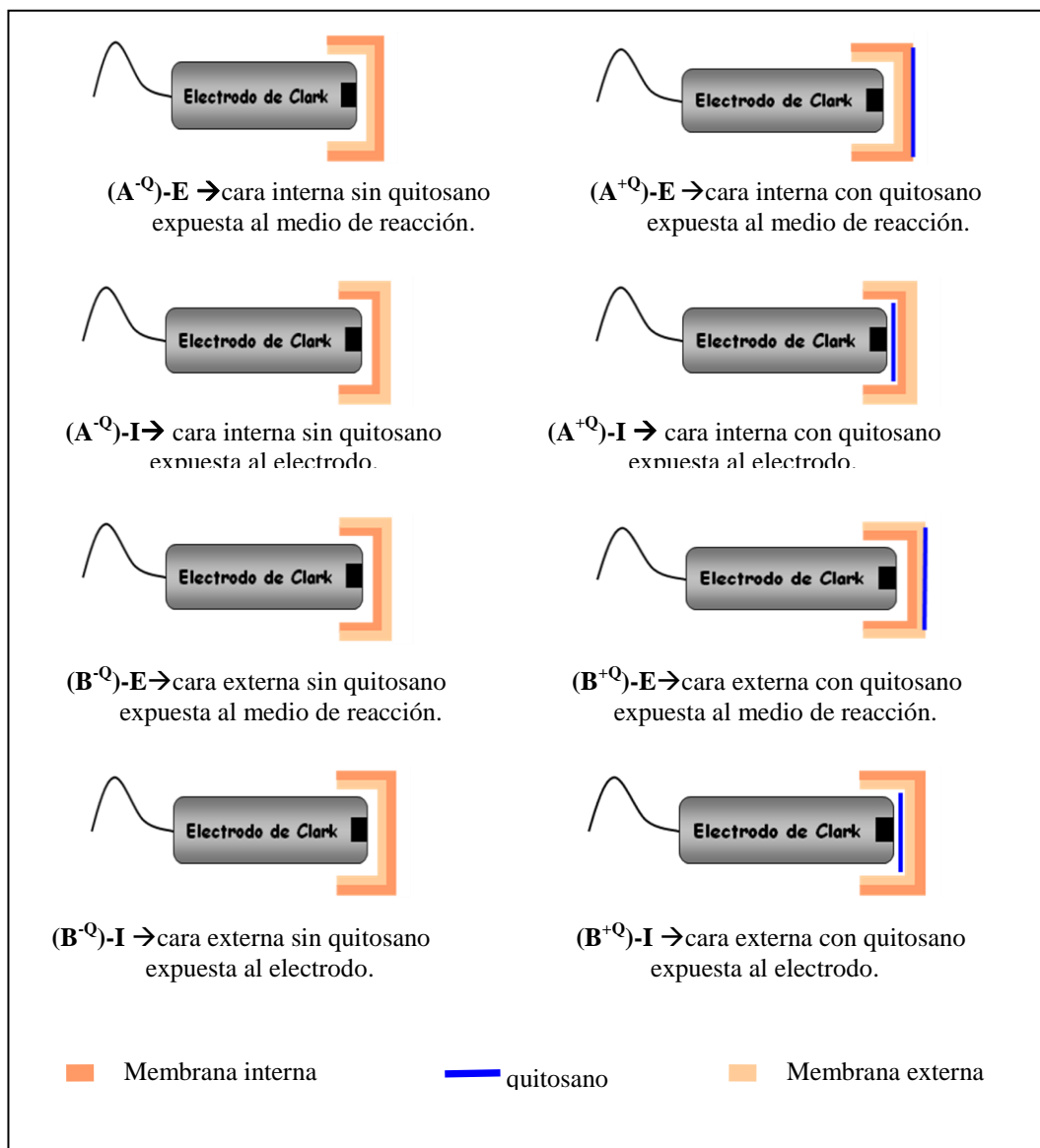


Figura 3-7. Representación esquemática de las configuraciones del biosensor para el estudio del tiempo de respuesta.

3.2.4 Determinación de la constante de permeabilidad de la membrana al lactato

3.2.4.1 Experimentos con la cámara de Ussing

Para complementar los datos obtenidos en los experimentos descritos en la sección 3.2.3.2 se decidió hacer el análisis de permeabilidad de la membrana al lactato mediante el estudio del coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) de cada cara de la misma en presencia y ausencia de quitosano. Se utilizó la misma serie de membranas que se describen en dicha sección. Cada membrana se colocó en el soporte que comunica los dos compartimentos de la cámara de Ussing, en distintas posiciones (Figura 3-8). Seguidamente, se colocó un volumen de 1,5 mL de buffer fosfato saturado con aire tanto en el compartimento dador (C_i), como en el compartimento receptor (C_e). Se agregó una solución de lactato en C_i a concentraciones de 13, 26 y 40 mM. Se efectuó un experimento por cada concentración y se realizaron tres repeticiones de la misma. Se colocó el biosensor en C_e para sensar la concentración de lactato alcanzada allí. Conociendo este dato y el dato de concentración inicial de C_i se determinó el P_{app} para cada cara de la membrana, en presencia y ausencia de quitosano.

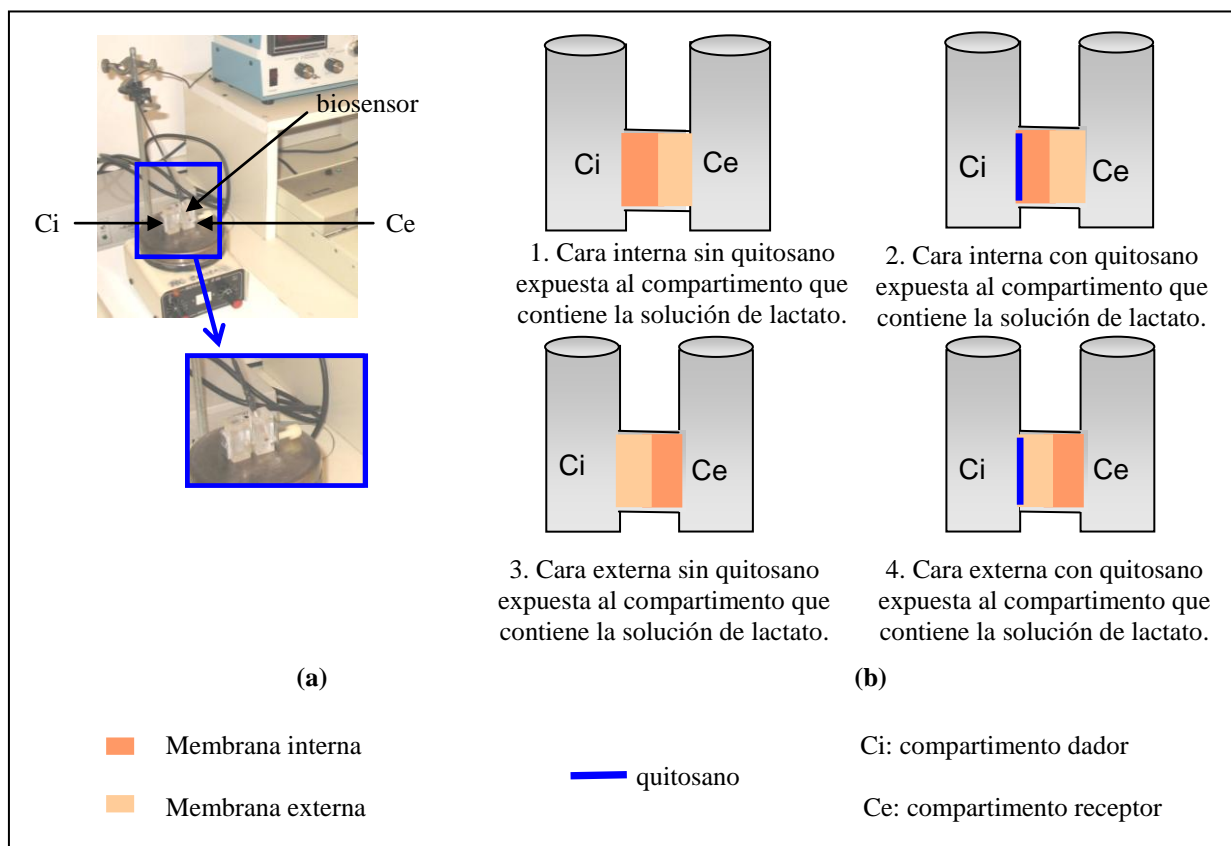


Figura 3-8. (a) cámara de Ussing y sistema de detección de lactato. (b) Posiciones de la membrana en la cámara de Ussing.

3.2.4.2 Cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente

Los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) fueron calculados utilizando la siguiente ecuación⁽⁵⁹⁾:

$$(5) \quad P_{app} = (dC/dt) (VCe/A.Co)$$

dC/dt = flujo ($\mu\text{M/s}$)

VCe = volumen del compartimento aceptor

A = área de la membrana (cm^2)

Co = concentración inicial de lactato en el compartimento dador (μM)

3.2.5 Respuesta analítica del biosensor al lactato

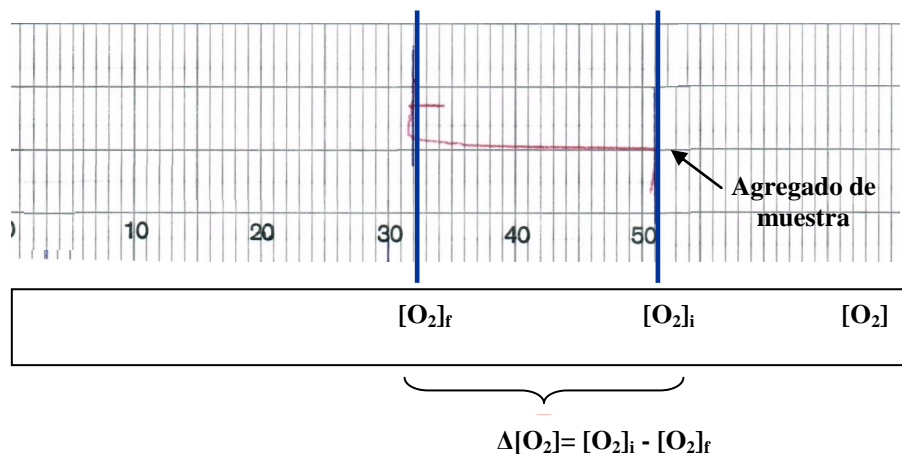
El biosensor mide la disminución del contenido de oxígeno, es decir, el consumo de oxígeno ($\Delta[\text{O}_2]$) disuelto en el medio de reacción, luego del agregado de una solución de lactato⁽³²⁾. La disminución en los niveles de oxígeno será proporcional a la concentración de L-lactato presente en la muestra.

3.2.5.1 Determinación del consumo de oxígeno por la enzima LOx

Para determinar el $\Delta[\text{O}_2]$ luego del agregado de una muestra, en la cámara de reacción se colocó una alícuota de 2 mL de buffer fosfato saturado con aire (medio de reacción) y se mantuvo con homogenización constante mediante una minibarra de teflón. Se colocó el biosensor y se dejó equilibrar la señal la señal con la $p\text{O}_2$. Una vez estabilizada, la señal se registró por unos minutos y se determinó la concentración inicial de O_2 presente en el medio de reacción. Posteriormente se agregó un volumen de la muestra, hasta la estabilización de la señal y se determinó la concentración final de O_2 . El procedimiento se realizó a 20°C . El $\Delta[\text{O}_2]$ se determinó gráficamente (Figura 3-9) teniendo en cuenta la concentración de oxígeno presente en la cámara de reacción, antes y después del agregado de lactato.

3.2.5.2 Concentración de lactato y consumo de oxígeno

Para verificar que la disminución en los niveles de oxígeno resulta proporcional a la concentración de L-lactato, se agregaron alícuotas de distintos volúmenes de una solución estándar de L-lactato de litio 0,096 M a la cámara de reacción. De esta manera se obtuvo el $\Delta[\text{O}_2]$ para cada agregado. El procedimiento se realizó a 20°C .



$[O_2]_i$ = concentración de oxígeno presente en la cámara de reacción antes del agregado de lactato.
 $[O_2]_f$ = concentración de oxígeno presente en la cámara de reacción después del agregado de lactato.

Figura 3-9. Cálculo gráfico del consumo de oxígeno.

3.2.5.3 Efecto de la temperatura sobre el consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno fue determinado agregando 50 μ L de un estándar de L-lactato de litio a la cámara de reacción. A diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 y 35 $^{\circ}$ C) y para todas las configuraciones del biosensor.

3.2.5.4 Ajuste lineal de la repuesta analítica

La curva de respuesta del biosensor fue construida ingresando los datos: $\Delta[O_2]$ vs $[L\text{-lactato}]$ en un grafica y ajustándolos con regresión lineal. Se obtuvo así una curva de calibración:

$$(6) \quad \Delta[O_2] = a[L\text{-lactato}] + h$$

Los datos de $\Delta[O_2]$ y $[L\text{-lactato}]$ se obtuvieron determinando el consumo de oxígeno producido cuando el biosensor se expuso a un rango de concentraciones de lactato de 50-500 μ M. Para variar la molaridad del mismo, se agregaron distintos volúmenes de la solución estándar 0,096 M en la cámara de reacción y se calculó el $\Delta[O_2]$ después de cada agregado. Se hicieron tres determinaciones para cada concentración estudiada. El procedimiento se realizó a 20 $^{\circ}$ C. Se construyeron curvas de calibración para cada una de las configuraciones del biosensor. La pendiente representa la sensibilidad de respuesta y el límite de detección se calcula a partir de la curva de calibración como la concentración de lactato que produce una señal analítica igual a tres veces la desviación estándar de la señal al punto cero.

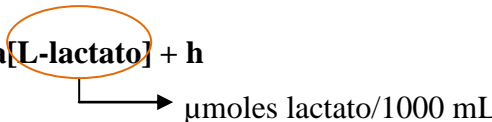
3.2.5.5 Efecto del tiempo de utilización del bioreceptor sobre la determinación de los parámetros del ajuste lineal

Se propuso estudiar el posible efecto de la utilización repetida del bioreceptor sobre la determinación de los parámetros de la curva de calibración. Para ello, se ensambló el biosensor y se construyeron curvas de calibración a los 0, 2 y 4 días posteriores al ensamblado, a 20°C, para todas las configuraciones.

3.2.5.6 Cálculo de concentración de lactato en muestras

La curva de calibración del biosensor se utilizó para relacionar el consumo de oxígeno presente en el medio de reacción con el contenido de lactato luego del agregado de la muestra:

$$\Delta[\text{O}_2] = a[\text{L-lactato}] + h$$



La concentración de lactato en la muestra se calculó teniendo en cuenta las diluciones que sufre la misma, cuando se coloca en el medio de reacción.

3.2.5.7 Efecto de la configuración sobre la determinación de la concentración

Para determinar el efecto producido por la disposición del bioreceptor empleada, sobre el ΔO_2 censado, se hicieron determinaciones de concentración de una solución estándar 0,096 M de L-lactato de litio utilizando las distintas configuraciones del biosensor. Las determinaciones se realizaron a 20°C.

3.2.6 Precisión del método

Se hicieron cinco determinaciones diarias de la concentración de una solución estándar 0,096 M de L-lactato de litio durante cinco días consecutivos⁽⁶⁰⁾. Con los datos obtenidos se calculó el cv% para cada día. El procedimiento se realizó a 20°C. El biosensor se ensambló en configuración B-E ya que la misma presenta la mayor sensibilidad según los datos obtenidos a partir de las graficas de linealidad.

3.2.7 Análisis de interferencias

Se estudió el potencial efecto interferente de 17 compuestos, que suelen estar presentes en muestras biológicas, sobre la modificación de la señal del biosensor. Para ello, el biosensor se expuso a concentraciones de 0,1mM y 3 mM de los mismos y se monitoreó la señal a través del registro gráfico.

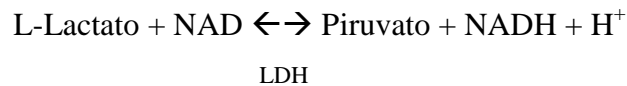
3.3 Método espectrofotométrico para la determinación de lactato

Se puso a punto el método espectrofotométrico de Gutmann y Wahlefeld⁽⁶¹⁾, método estándar para la determinación de lactato.

3.3.1 Fundamento del método

La Lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la oxidación de lactato a piruvato reduciendo NAD a NADH. Un mol de NAD se transforma en un mol de NADH por cada mol de lactato presente en la muestra.

El NADH tiene un máximo de absorción a 340 nm y su aparición, que puede medirse espectrofotométricamente es directamente proporcional a la concentración de lactato en la muestra.



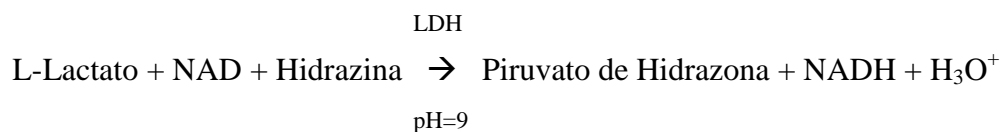
El equilibrio de esta reacción está desplazado hacia la formación de L-Lactato y NAD.

Presenta una constante de equilibrio $k = 2,9 \cdot 10^{-2}$ mol/L a 25°C.

Para poder cuantificar la oxidación de Lactato se debe lograr que la reacción sea desplazada hacia la derecha. Esto puede lograrse removiendo los productos de reacción.

Así, los protones son atrapados usando un medio alcalino y el piruvato es eliminado como hidrazona. El NAD se utiliza en exceso.

La ecuación para la determinación espectrofotométrica de lactato es:



La constante de equilibrio para esta reacción es $k = 7 \cdot 10^2$ mol/L a 25°C.

Se necesita una concentración relativamente alta de LDH para que la reacción curse lo suficientemente rápido.

3.3.2 Determinación del rango de linealidad

Se realizaron diluciones seriadas de una solución estándar de lactato y se midió el ΔAbs para cada dilución. Los datos obtenidos se ingresaron en una gráfica ΔAbs vs [L-lactato] y se

ajustaron con regresión lineal. Esto permitió visualizar el rango en el cual las mediciones resultan confiables

3.3.3 Ensayo

NAD = 3 mg/ ensayo -- Enzima= 25 U/ ensayo -- V_f ensayo = 1,46 mL

Reactivo	Ensayo	
	Blanco	Muestra
Buffer Hidrazina 0,4 M/Glicina 0,5M	1,25 mL	1,25 mL
NAD	0,1 mL	0,1 mL
Muestra		0,1 mL
Blanco	0,1 mL	
Leer Abs 1		
LDH	0,01 mL	0,01 mL
37 °C- 70 min Leer Abs 2		

3.3.4 Calculo de concentración de lactato en muestras

La concentración de lactato en muestra puede calcularse por la ley de Lambert-Beer ⁽⁶¹⁾:

$$\Delta \text{Abs}_{\text{blanco}} = \text{Abs } 2_{\text{blanco}} - \text{Abs } 1_{\text{blanco}}$$

$$\Delta \text{Abs}_{\text{standard}} = \text{Abs } 2_{\text{standard}} - \text{Abs } 1_{\text{standard}}$$

$$\Delta \text{Abs}' = \Delta \text{Abs}_{\text{standard}} - \Delta \text{Abs}_{\text{blanco}}$$

$$(6) \quad [\text{lactato}] = \frac{\Delta \text{Abs}' \cdot V}{v \cdot \epsilon \cdot d} \quad (\text{en muestra})$$

V= volumen del ensayo (cm³)

v = volumen de muestra agregado al ensayo (cm³)

ϵ = coeficiente de extinción molar (cm²/ μ mol)

d = paso óptico (cm)

3.4 Determinación de Lactato en muestras biológicas

Como se plantea en los objetivos, luego de desarrollar y poner a punto el biosensor (método voltamperométrico), el mismo se utilizó para realizar mediciones de concentración de lactato en muestras biológicas. Las mismas fueron realizadas en: soluciones de preservación,

perfusatos obtenidos al reperfundir órganos preservados, plasma y vino. Los resultados que se obtuvieron fueron comparados con los obtenidos por el método espectrofotométrico.

3.4.1 Soluciones de preservación y perfusatos

3.4.1.1 Obtención de muestra

El protocolo experimental de cirugías consistió en la ablación de hígados de ratas y su posterior preservación hipotérmica a 4°C en una solución de preservación. Luego de 24 h de preservación, los órganos fueron retirados de la hipotermia y se los reperfundió en normotermia *ex vivo*. Como control se realizó una reperfusión normotérmica *ex vivo* de hígados sin previa preservación hipotérmica. Se tomaron muestras de las soluciones de preservación a las 0, 4 y 24 h del inicio de la preservación y muestras de perfusato a los 0, 30, 60 y 90 min del inicio de la reperfusión (Figura 3-10). Las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización.

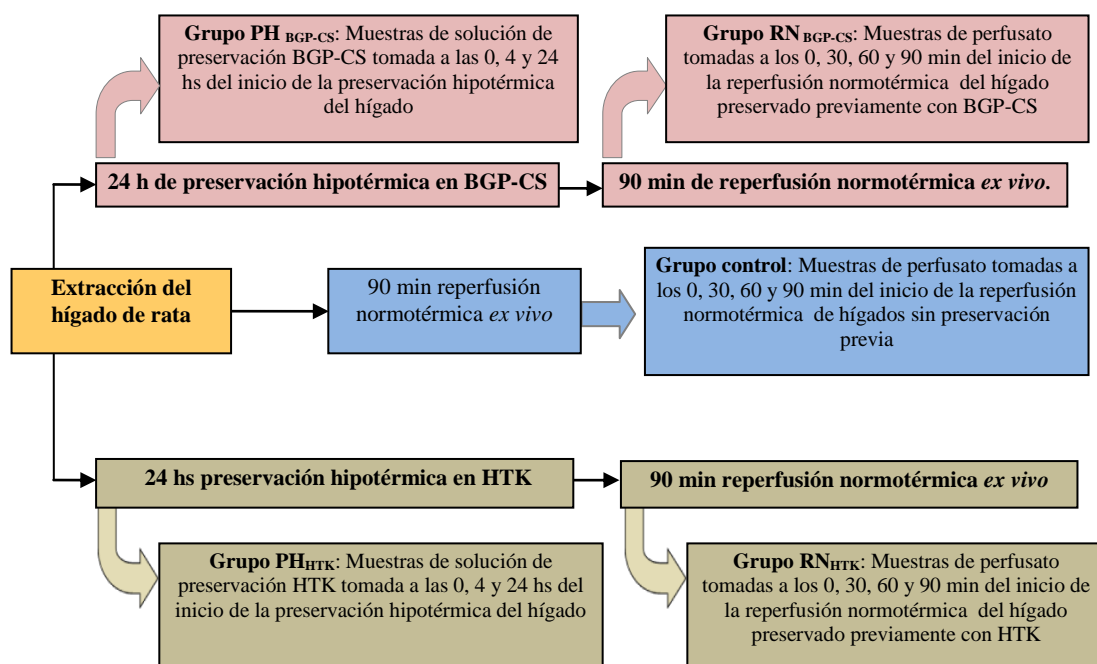


Figura 3-10. Toma de muestras para cada grupo experimental.

Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley hembras de 250-300 g de peso corporal, obtenidas del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Médicas dependiente de la Universidad Nacional de Rosario. Las ratas fueron mantenidas en una sala especialmente acondicionada en las instalaciones del Centro Binacional (Argentina-Italia) de Investigaciones en Criobiología

Clínica y Aplicada hasta el momento de llevar a cabo las cirugías, en un ambiente climatizado (25°C), con ciclos controlados de luz/oscuridad de 12 h. Los experimentos se realizaron de acuerdo a las reglamentaciones internacionales para el cuidado y manejo de animales de laboratorio.

Procedimiento quirúrgico

Se realizó la ablación como se describe en Balaban y col⁽⁶²⁾. Cada animal fue previamente anestesiado mediante una inyección de hidrato de cloral (50 mg/100g de peso corporal). En la sala de cirugía, fue inmovilizado sobre el área de trabajo, se le realizó una apertura de la cavidad abdominal y el animal fue heparinizado por vía femoral (0,1mL de heparina 1000 U/mL). Se aisló, ligó y cateterizó el conducto biliar con un catéter PE-50 (Intramedic USA). Luego de haber aislado, ligado y cortado el esófago, se cateterizó la vena porta con un catéter 14 G. Se perfundió el hígado con una solución Krebs- Henseleit oxigenada para remover la sangre del órgano. La vena cava inferior abdominal fue seccionada para liberar la presión dentro del órgano y luego se realizó una ligadura firme. Por último, se cateterizó la vena suprahepática con un tubo de acero (3 mm de diámetro interno) y se extrajo el hígado sin interrumpir la perfusión.

3.4.1.2 Preservación hipotérmica estática

La técnica de preservación hipotérmica consistió en almacenar cada órgano en una solución de preservación sin ningún tipo de intervención hasta su reoxigenación⁽⁸⁾. Luego de la cirugía de ablación, los hígados se lavaron con 20 mL de solución de preservación refrigerada a través del catéter en vena porta. Finalmente, los órganos fueron sumergidos en un recipiente con 80 mL (frasco de vidrio con tapa plástica a rosca de 100 mL) de la misma solución de preservación y se almacenaron en una conservadora con hielo dentro de una heladera (0-4°C) durante 24 h.

Soluciones de preservación utilizadas

Para los experimentos de preservación estática se utilizaron las soluciones BGP-CS y la solución comercial Histidina-Triptofano-Cetoglutarato (HTK). La Tabla III muestra la composición de cada una de ellas.

3.4.1.3 Perfusión normotérmica *ex vivo* de hígado

La técnica de perfusión normotérmica *ex vivo* de hígado de rata⁽⁶³⁾ permite mantener la estructura celular y lobular, la microcirculación y la producción biliar hepática, sin los efectos de señalización hormonal y nerviosas propias del organismo animal. Además esta técnica permite monitorear el daño celular y la función hepática durante todo el experimento, evitando procedimientos invasivos en otro animal de laboratorio

Etapa de adaptación

Una vez ubicado el hígado en un soporte (acomodado de forma tal que adopte una posición anatómica similar a la que presenta en el cuerpo del animal), se inicia la perfusión con 300 mL de buffer Krebs- Henseleit en un sistema no recirculante. Ésta etapa tiene el fin de estabilizar los parámetros de pH, presión, temperatura del baño y del hígado, etc., periodo que usualmente demanda entre 15 a 20 min hasta lograr la estabilización de los parámetros.

Etapa de perfusión circulatoria

Al cabo del tiempo requerido para la estabilización y alcanzados los 37°C de temperatura, se procede a cambiar el buffer Krebs- Henseleit por 150 mL de buffer Krebs- Henseleit suplementado con Dextran al 2% para perfundir al hígado en un sistema recirculante durante 90 min, a una presión portal de 90 mm H₂O. Durante esta etapa, el perfusato se oxigena constantemente a través de un oxigenador de tipo Hamilton el cual consiste en una tubería de silicona permeable al oxígeno ovillada dentro de un frasco alimentado con carbógeno a una presión de 90 mmHg. Una solución 300 µM de taurocolato de sodio se inyecta al medio de perfusión a una velocidad de 0,2 mL/min con el fin de sostener la producción de bilis⁽⁶⁴⁾. El pH se monitorea de forma constante para mantenerlo a 7,40 y las fluctuaciones se corrigen con HCl 1 N. La temperatura del órgano se mantiene con una lámpara infrarroja, controlada por un termómetro electrónico que censa la temperatura del hígado mediante una sonda colocada debajo del mismo. La temperatura del perfusato se mantiene mediante un baño de recirculación de agua a través de una camisa de intercambio de calor. Se tomaron muestras de perfusato a los 0, 30, 60 y 90 min de reperfusión, para determinar la producción de lactato.

Buffers utilizados

El buffer Krebs-Henseleit (KH) es de uso estándar para la perfusión del hígado aislado⁽⁶⁵⁾. En los experimentos realizados, se utilizó durante la perfusión en la cirugía y en la primera etapa de reperfusión normotérmica en un sistema no recirculante.

El Buffer Krebs-Henseleit- Dextran (KH-D) tiene los mismos componentes que el buffer Krebs-Henseleit pero con el agregado de 2% de Dextran, lo que proporciona las propiedades osmóticas coloidales adecuadas. La Tabla III muestra la composición de cada uno de ellos.

Composición	Solución de preservación		Buffer	
	BGP-CS	HTK	KH	KH-D
K ⁺ Gluconato	7 mM			
Na ⁺ Gluconato	100 mM			
Sucrosa	20 mM			
H ₂ KPO ₄	2,5 mM		1,20 mM	1,20 mM
BES.	30 mM			
PEG 35 KDa	11 gr/L			
MgSO ₄	5 mM		1,20 mM	1,20 mM
Glutati6n.	3 mM			
Adenosina.	5 mM			
Glicina.	15 mM			
Estreptomicina	0,25 mg/mL			
Penicilina G	10 UI/mL			
NaCl		15 mM	118 mM	118 mM
KCl		9 mM	4,80 mM	4,80 mM
CaCl ₂			1,50 mM	1.50 mM
NaHCO ₃			25 mM	25 mM
Glucosa			5 mM	5 mM
Heparina			2UI/mL	2UI/mL
2 cetoglutarato potasio hidrogenado		1 mM		
MgCl 6. H ₂ O		4 mM		
Histidina.		18 mM		
HCl. H ₂ O				
Histidina		180 mM		
Triptofano		2 mM		
Manitol		30 mM		
CaCl ₆ . H ₂ O.		0,015 mM		
Dextran				2%
	Osmolalidad=303 mOsm/kg H ₂ O pH=7,40	Osmolalidad=300 mOsm/kg H ₂ O pH=7,40	Saturaci6n con carb6geno (O ₂ :CO ₂ , 95:5%) durante 20 min. Osmolalidad=300 mOsm/kg H ₂ O pH=7,40 Filtraci6n previa utilizaci6n	Saturaci6n con carb6geno (O ₂ :CO ₂ , 95:5%) durante 20 min. Osmolalidad=300 mOsm/kg H ₂ O pH=7,40 Filtraci6n previa utilizaci6n

Tabla III. Composici6n de las soluciones y buffers utilizados en preservaci6n hipot6rmica y reperfusi6n normot6rmica.

3.4.1.4 Determinación de lactato

Para determinar la concentración de lactato en las muestras de los grupos PH_{BGP-CS}, RN_{BGP-CS} y control (ver Figura 3-10) se tomaron dos alícuotas de cada una de ellas. A una de las alícuotas se le realizó la determinación utilizando el método voltamperométrico y a la otra utilizando el método espectrofotométrico. A las muestras del grupo PH_{HTK}, RN_{HTK} solamente se le hizo la determinación por el método voltamperométrico. El dato de concentración se utilizó para determinar los μ moles de lactato producidos por g de tejido en cada grupo experimental. Para la medición con el método voltamperométrico se utilizaron volúmenes de muestra entre 0,2 y 0,3 mL. En el ensayo espectrofotométrico se utilizaron volúmenes de muestra de 0,1 ml diluidas $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$ y $\frac{1}{4}$, dependiendo del caso.

3.4.2 Plasma Humano

3.4.2.1 Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de plasma de origen humano de pacientes de distinto sexo y edad, las que fueron cedidas por el Laboratorio de Análisis Clínicos de los Dres. Galeazzi - Minisini. Dichas muestras fueron almacenadas en tubos heparinizados y mantenidas a -20 °C hasta el momento de su utilización.

3.4.2.2 Determinación de lactato

Se determinó la concentración de lactato en las muestras de plasma, mediante los métodos voltamperométrico y espectrofotométrico y se compararon los resultados obtenidos por ambos métodos de medición. Para la determinación con el método voltamperométrico se utilizaron volúmenes de muestra entre 0,2 y 0,3 mL. En el ensayo espectrofotométrico se utilizaron 0,1 mL de muestra a las que se le realizaron diluciones $\frac{1}{3}$ y $\frac{1}{4}$.

3.4.2.3 Precisión del método voltamperométrico aplicado en plasma

Se determinó la precisión del método voltamperométrico evaluando la repetitividad de la medición de la concentración de lactato de un pool de plasma de origen humano. Se hicieron cinco determinaciones diarias durante cinco días seguidos.

3.4.3 Vinos

3.4.3.1 Obtención de muestras

Se recolectaron muestras de vinos de distintas variedades y bodegas. Las mismas fueron almacenadas en tubos plásticos de 2 mL y mantenidas a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización.

3.4.3.2 Determinación de lactato

Se determinó la concentración de lactato en las muestras de vino por el método voltamperométrico. Se utilizaron volúmenes de muestra entre 0,01 y 0,015 mL.

3.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados aplicando análisis de la variancia (ANOVA). Los supuestos de normalidad e igualdad de variancias fueron comprobados a partir del análisis de residuos. En caso de encontrar diferencia significativa, se aplicaron comparaciones múltiples según Tukey. Se consideró significativo si $p < 0.05$.

Los análisis fueron realizados por la Bioquímica Hebe Bottai, docente del Área de Estadística y Procesamiento de Datos de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

4 Resultados

4.1 Caracterización del biosensor

4.1.1 Determinación del potencial de polarización del electrodo

La figura 4-1 muestra la curva característica del sensor de oxígeno. Se observa una región plateau en el rango de potencial que va de -0,6 a -0,8 V. Para operar el electrodo se eligió el valor de potencial correspondiente al punto medio de dicho rango, es decir -0,75 V.

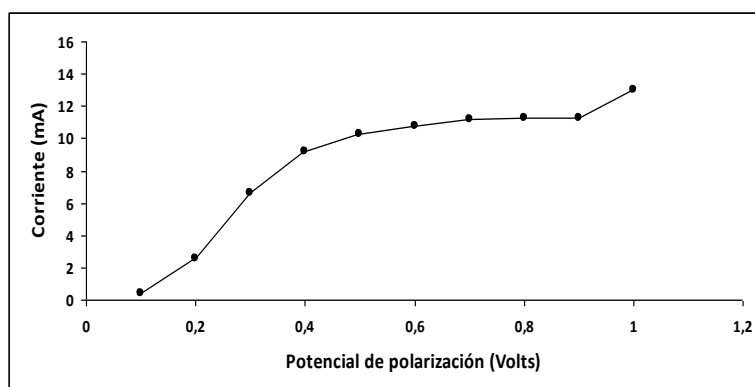


Figura 4-1. Curva de polarización característica obtenida para el electrodo miniClark. El eje horizontal del gráfico muestra los valores absolutos de potencial ya que los mismos son negativos

4.1.2 Determinación del tiempo de respuesta del electrodo

Para determinar la velocidad con que el electrodo (transductor) responde a un cambio en la pO_2 del medio se determinó el tiempo de respuesta para todas las configuraciones del biosensor. Se hicieron determinaciones de $tr_{90\%}$ por triplicado para cada una de las configuraciones: A-E, A-I, B-E y B-I (ver Figura 3-4). Los resultados se muestran en la figura 4-2.

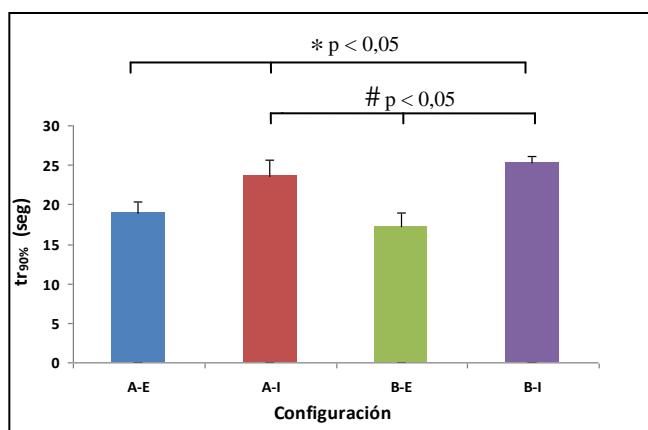


Figura 4-2. Valores de $tr_{90\%}$ del electrodo para todas configuraciones del biosensor. $T=20^{\circ}C$, $pH=7,5$. Resultados mostrados: media + SD, $n=3$. * $p < 0,05$: A-E diferente respecto de A-I y de B-I. # $p < 0,05$: B-E diferente respecto de A-I y de B-I.

Los resultados obtenidos muestran que los valores de $tr_{90\%}$ para las configuraciones A-E y B-E no presentan diferencias estadísticamente significativas y a su vez son menores que para las configuraciones B-I y A-I. Estas últimas no difieren significativamente.

Estos resultados indicarían que en las configuraciones del biosensor en las cuales la enzima esta dispuesta hacia el medio de reacción, el electrodo responde con mayor rapidez ante un cambio instantáneo de la pO_2 en la solución, respecto de las configuraciones donde se dispone hacia el interior del electrodo.

4.1.2.1 Efecto del tiempo de utilización del bioreceptor sobre la determinación del tiempo de respuesta del electrodo

La figura 4-3 muestra los valores de $tr_{90\%}$ del electrodo, determinados a los 0, 2 y 4 días posteriores al ensamblado del biosensor en cada una de sus configuraciones. Las determinaciones de $tr_{90\%}$ se hicieron por triplicado para cada una de ellas.

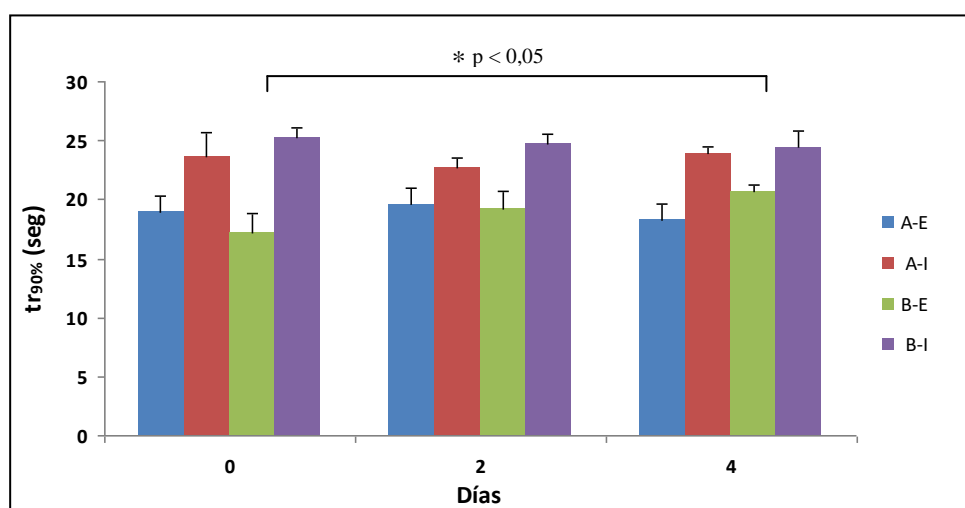


Figura 4-3. Valores de $tr_{90\%}$ del electrodo para todas las configuraciones del biosensor a los 0, 2 y 4 días posteriores al ensamblado. Resultados mostrados: media + SD, n=3. * $p < 0,05$: día 0 diferente respecto del día 4.

Los resultados muestran que los valores de $tr_{90\%}$ obtenidos utilizando, un mismo bioreceptor durante cuatro días seguidos, ensamblado en una determinada configuración, no varían significativamente para las configuraciones A-E, A-I y B-I. Sin embargo se observa una variación muy leve para la configuración B-E.

4.1.2.2 Efecto del quitosano sobre el tiempo de respuesta del electrodo

Con el objetivo de evaluar la influencia del quitosano sobre la difusión del oxígeno a través de la membrana se midió el $tr_{90\%}$ del electrodo, utilizando membranas con y sin quitosano (sin la enzima fijada), tanto en la cara A como en la cara B. Nótese que las configuraciones (A^Q)-E y

la (B^{-Q})-I son las mismas en relación a la disposición del quitosano y de la cara (A o B) respecto al electrodo (ver figura 3-7). Lo mismo ocurre con las configuraciones (A^{-Q})-I y la (B^{-Q})-E.

Por ello, los valores obtenidos para la configuración (A^{-Q})-E también fueron adjudicados a la configuración (B^{-Q})-I. Lo mismo se aplicó para las configuraciones (A^{-Q})-I y (B^{-Q})-E. La Tabla IV muestra los valores del tr_{90%} del electrodo, obtenidos para cada configuración en estudio. Se hicieron cinco determinaciones de tr_{90%} para cada una de ellas.

Configuración	Descripción	tr _{90%} (seg)
(A ^{-Q})-E	cara interna sin quitosano expuesta al medio de reacción	21,1 ± 2,4
(A ^{+Q})-E	cara interna con quitosano expuesta al medio de reacción	19,7 ± 4,9
(A ^{-Q})-I	cara interna sin quitosano expuesta al electrodo	20,8 ± 2,7
(A ^{+Q})-I	cara interna con quitosano expuesta al electrodo	18,5 ± 1,8 #
(B ^{-Q})-E	cara externa sin quitosano expuesta al medio de reacción	20,8 ± 2,7
(B ^{+Q})-E	cara externa con quitosano expuesta al medio de reacción	23,9 ± 1,3 #
(B ^{-Q})-I	cara externa sin quitosano expuesta al electrodo	21,1 ± 2,4
(B ^{+Q})-I	cara externa con quitosano expuesta al electrodo	32,9 ± 1,2 *

Tabla IV. Valores de tr_{90%} del electrodo para todas las configuraciones del biosensor en estudio. Resultados mostrados: media + SD, n=3. * p < 0,05: (B^{+Q})-I mayor que en resto de las configuraciones.

p < 0,05: (B^{+Q})-E mayor que en (A^{+Q})-I.

El análisis estadístico indica que el valor medio de tr_{90%} para la configuración (B^{+Q})-I es significativamente mayor que para el resto de las configuraciones. El valor medio de tr_{90%} para la configuración (B^{+Q})-E es significativamente mayor que en (A^{+Q})-I.

4.1.3 Determinación de la constante de permeabilidad de la membrana al lactato

La figura 4-4 muestra los valores de coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) obtenidos mediante los estudios realizados con la cámara de Ussing. Se determinó el coeficiente de permeabilidad aparente para las caras A y B de la membrana aviar en presencia y ausencia de quitosano en las mismas (ver figura 3.8). El análisis estadístico indica que el valor medio del P_{app} es significativamente mayor en presencia de quitosano que en ausencia del mismo, cualquiera sea la cara de la membrana y la concentración de Ci.

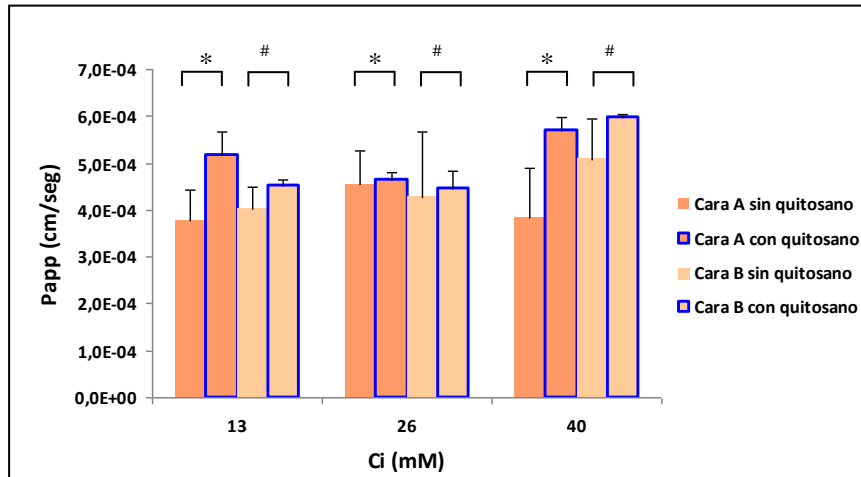


Figura 4-4. Coeficiente de permeabilidad aparente al lactato de las caras A y B de la membrana en presencia y ausencia de quitosano a tres concentraciones distintas de Ci. T=20°C, pH=7,5. Resultados mostrados: media + SD, n=3. * p < 0,05: cara A sin quitosano respecto de la cara A con quitosano para todas las concentraciones de Ci. # p < 0,05: cara B sin quitosano respecto de la cara B con quitosano para todas las concentraciones de Ci.

4.1.4 Respuesta analítica del biosensor al lactato

4.1.4.1 Concentración de lactato y consumo de oxígeno

Como se explicó anteriormente, la señal analítica del biosensor corresponde a la disminución del contenido de oxígeno en el medio de reacción, en presencia de lactato. La figura 4-5 muestra el registro gráfico correspondiente a la señal del biosensor ante el agregado de distintos volúmenes de una solución estándar de L-lactato de litio 0,096 M.

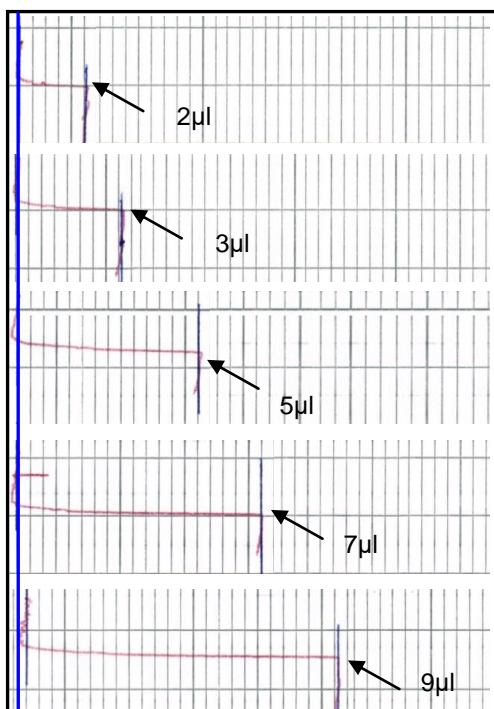


Figura 4-5. Registro gráfico del consumo de oxígeno (ΔO_2) cuando se hicieron agregados de 2, 3, 5, 7 y 9 μ l de un estándar de L-lactato de litio 0.096 M en la cámara de reacción contenido 2 mL de buffer fosfato saturado con aire. T=20°C, pH=7,5. Los valores de concentración de lactato en la cámara de reacción, luego del agregado de cada volumen, fueron de 96, 144, 239, 335 y 430 μ M respectivamente. La línea azul indica la posición correspondiente al 0% de pO_2 .

Se observa que el consumo de oxígeno presente en el medio de reacción es proporcional a los μmoles de lactato agregados. El agregado de menores volúmenes de estándar generó señales que no pudieron ser cuantificadas.

4.1.4.2 Efecto de la temperatura sobre el consumo de oxígeno

Debido a que la solubilidad del O_2 en el medio es sensible a la temperatura, se determinó el consumo de oxígeno ($\Delta[\text{O}_2]$) agregando $50\mu\text{L}$ de una solución estándar $0,096\text{ M}$ de L-lactato de litio en la cámara de reacción a $15, 20, 25, 30$ y $35\text{ }^\circ\text{C}$ para todas las configuraciones del biosensor.

Las determinaciones se hicieron por triplicado para cada configuración y a cada temperatura (figura 4-6).

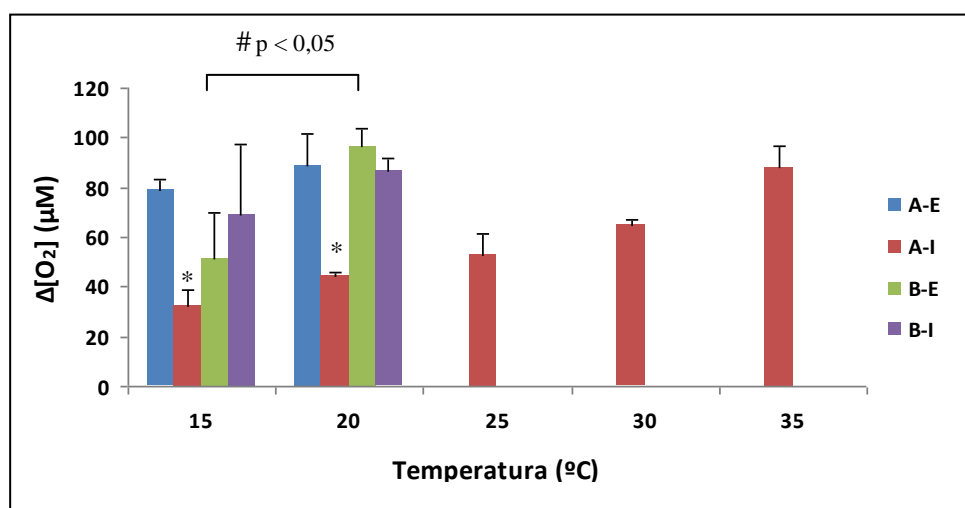


Figura 4-6. Consumo de oxígeno ($\Delta[\text{O}_2]$) medido a distintas temperaturas, para todas las configuraciones del biosensor. Resultados mostrados: media + SD, $n=3$. * $p < 0,05$: menor que el resto de las configuraciones. # $p < 0,05$: B-E a $15\text{ }^\circ\text{C}$ menor que B-E a $20\text{ }^\circ\text{C}$.

Se observa un aumento significativo del valor de $\Delta[\text{O}_2]$ a $20\text{ }^\circ\text{C}$ para la configuración B-E. La única configuración para la cual se pudo determinar claramente el $\Delta[\text{O}_2]$ en todo el rango de temperaturas estudiadas fue la A-I. Sin embargo, los valores obtenidos por la misma fueron significativamente menores que para el resto de las configuraciones. Cuando el $\Delta[\text{O}_2]$ se midió a temperaturas mayores que $20\text{ }^\circ\text{C}$, para las configuraciones A-E, B-E y B-I, el electrodo comenzó a comportarse de forma anómala generando una señal confusa en el registro, que no pudo utilizarse para realizar la determinación gráfica. Por ello, con las mediciones de $\Delta[\text{O}_2]$ a temperaturas mayores que $20\text{ }^\circ\text{C}$ no se pudieron obtener resultados reproducibles.

4.1.4.3 Ajuste lineal de la repuesta analítica

La figura 4-7 muestra las curvas de respuesta para todas las configuraciones del biosensor. Las mismas se construyeron ingresando los datos: $\Delta[\text{O}_2]$ vs [L-lactato] en un gráfico y ajustándolos mediante regresión lineal.

La pendiente de cada curva representa la sensibilidad de respuesta. El límite de detección se calcula a partir de la curva de calibración como la concentración de lactato que produce una señal analítica igual a tres veces la desviación estándar de la señal al punto cero. La Tabla V muestra los parámetros obtenidos de las curvas.

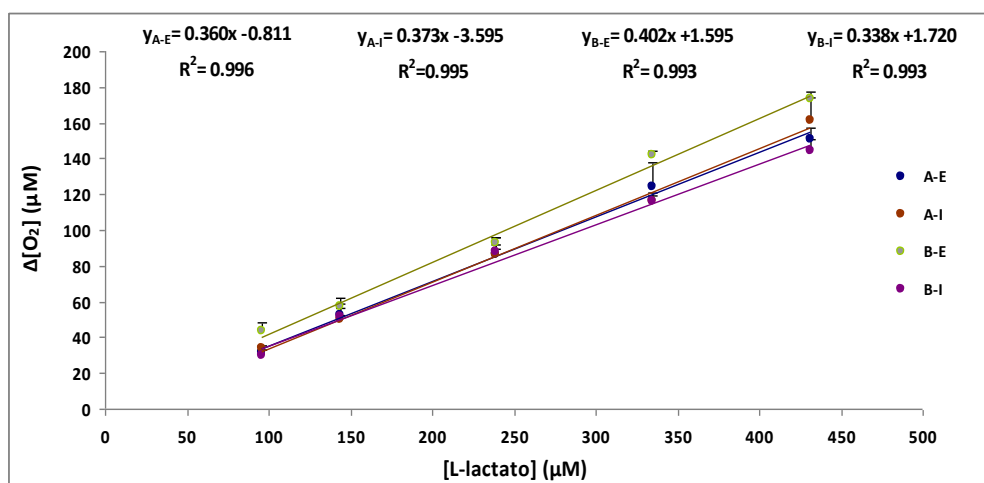


Figura 4-7. Curvas de calibración para todas las configuraciones del biosensor. $T=20^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7,5$. Resultados mostrados: media + sd, $n=3$ en cada punto de las curvas

Parámetro	Configuración			
	A-E	A-I	B-E	B-I
Rango de linealidad	96-431	96-431	96-431	96-431
Sensibilidad	0,360	0,373	0,402	0,338
Límite de detección	80,6	41,8	36,2	12,4

Tabla V. Rango de linealidad, sensibilidad y límite de detección para todas las configuraciones del biosensor.

El análisis estadístico indica que existen diferencias significativas entre los valores de las pendientes ($p = 0.0139$).

4.1.4.4 Efecto de la configuración sobre la determinación de la concentración

La figura 4-8 muestra los valores de concentración de la solución estándar 0,096 M de L-lactato de litio obtenidos utilizando las distintas configuraciones del biosensor. Se realizaron cinco mediciones para cada configuración. Los resultados indican que para cualquier

configuración del biosensor se obtienen valores que estiman la concentración real de lactato y que no presentan diferencias significativas entre ellos.

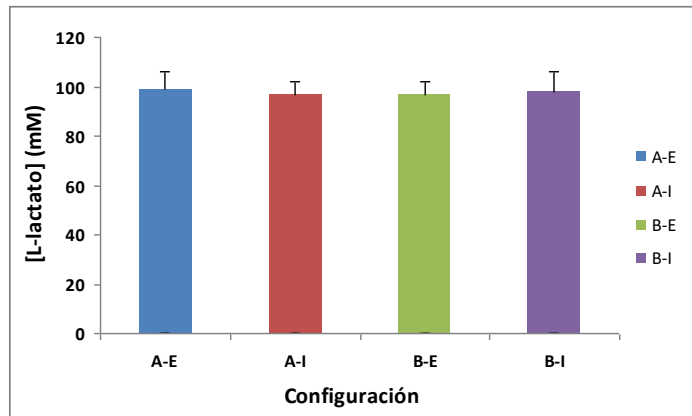


Figura 4-8. Determinación de la concentración de lactato en una solución estándar 96 mM utilizando las distintas configuraciones del biosensor. T=20°C. pH=7.5. Resultados mostrados: media + SD, n=5

4.1.4.5 Efecto del tiempo de utilización del bioreceptor sobre la determinación de los parámetros del ajuste lineal

La figura 4-9 muestra las curvas de calibración construidas a los 0, 2 y 4 días posteriores al ensamblado del biosensor (y_0 , y_2 y y_4 respectivamente), en cada una de sus configuraciones.

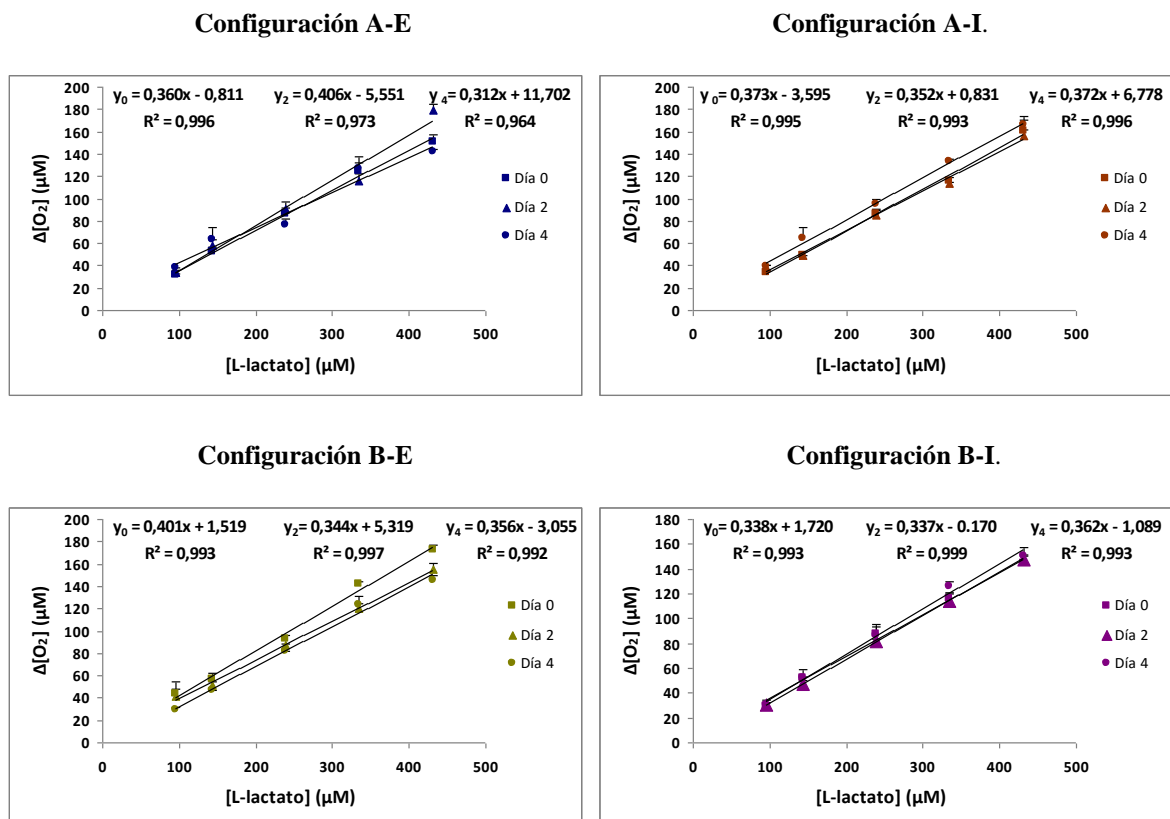


Figura 4-9. Curvas de calibración para todas las configuraciones del biosensor construidas a los 0, 2 y 4 días posteriores al ensamblado. T=20°C. pH=7.5. Resultados mostrados: media + SD, n=3, en cada punto de las curvas.

Para cada configuración, se analizaron las pendientes y las ordenadas al origen de las curvas obtenidas a los 0, 2 y 4 días posteriores al ensamblado del biosensor. Los resultados obtenidos de los estudios estadísticos fueron los siguientes:

Configuración A-E: no existen diferencias significativas en las ordenadas al origen ($p = 0.09$), pero si en las pendientes ($p = 0.004$).

Configuración A-I: existen diferencias significativas en las ordenadas al origen ($p = 0.0000$) pero no en las pendientes ($p=0.366$).

Configuración B-E: existen diferencias significativas en las ordenadas al origen ($p=0.0000$) y en las pendientes ($p = 0.004$).

Configuración B-I: no existen diferencias significativas en las ordenadas al origen ($p=0.06$) tampoco en las pendientes ($p = 0.315$).

El parámetro más importante de la curva es la pendiente, como se mencionó anteriormente, la misma representa la sensibilidad del método. Se observa que si se construyen curvas de respuesta durante cuatro días seguidos utilizando el mismo bioreceptor, las configuraciones que presentan una mayor variación en los parámetros de dichas curvas fueron aquellas en las cuales la enzima esta fijada sobre la cara B y dispuesta hacia el medio de reacción.

4.1.5 Precisión del método

La figura 4-10 muestra el gráfico obtenido para el ensayo de precisión. El biosensor se ensambló en configuración B-E debido a que la misma presenta mayor sensibilidad.

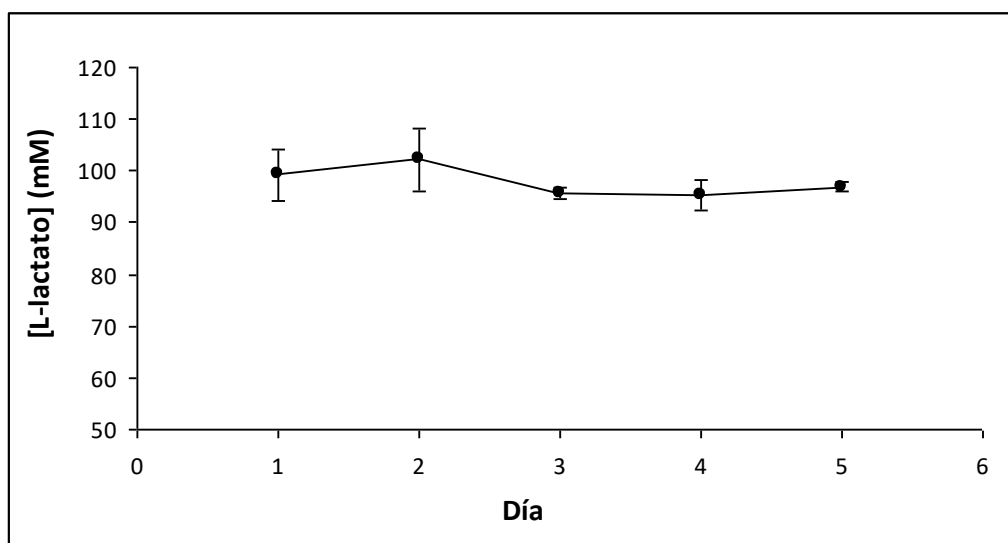


Figura 4-10. Determinación de la concentración de lactato en una solución estándar. $T=20^{\circ}\text{C}$. $\text{pH}=7.5$. Resultados mostrados: media + SD, $n=5$.

El ensayo de precisión se hizo realizando cinco determinaciones diarias de concentración de la solución estándar 0,096 M de L-lactato de litio, durante cinco días consecutivos. La Tabla VI muestra el coeficiente de variación para cada día de determinación.

Día	1	2	3	4	5
cv%	5	5,6	0,9	3,5	1,1

Tabla VI. Coeficientes de variación calculados para cada día de determinación de concentración.

Este ensayo permite observar que no existen diferencias significativas entre los valores de concentración determinados en los distintos días ($p > 0.05$).

4.1.6 Analisis de interferencias

Se realizó un analisis para evaluar el posible efecto interferente de compuestos que están presentes habitualmente en muestras de origen biológico sobre las mediciones realizadas con el biosensor. La Tabla VII muestra la lista de los compuestos analizados y el efecto de los mismos sobre la señal del biosensor. La figura 4-11 muestra el registro gráfico de la señal.

Compuesto	Concentración	Modificación de la señal	
		si	no
Trealosa	0,1mM		x
sucrosa	0,1mM		x
Fructosa	0,1mM		x
Glucosa	0,1mM		x
Galactosa	0,1mM		x
Ascorbato de sodio	0,1mM		x
Citrato de sodio	0,1mM		x
Cisteina	0,1mM	x	
Acido ascorbico	0,1mM		x
Acido urico	0,1mM		x
Salicilato de sodio	0,1mM		x
Benzoato de sodio	0,1mM		x
Glutation reducido	3mM	x	
Glutation oxidado	3mM		x
Solución BGP-CS	40% v/v		x
Solución HTK	40% v/v	x	
Buffer KH-D	40% v/v		x

Tabla VII. Compuestos analizados en la respuesta del biosensor de lactato.

Debido a la interferencia que presentó la solución HTK en la señal del biosensor, se decidió hacer un análisis comparando mediciones de concentración de soluciones estándar de lactato preparadas en agua y en HTK, para de esta manera, determinar si hay diferencia o no en los valores obtenidos. Se midió la concentración de dos soluciones estándar de lactato 1920 μM (una preparada en agua y otra en HTK). La figura 4-12 muestra los resultados obtenidos.

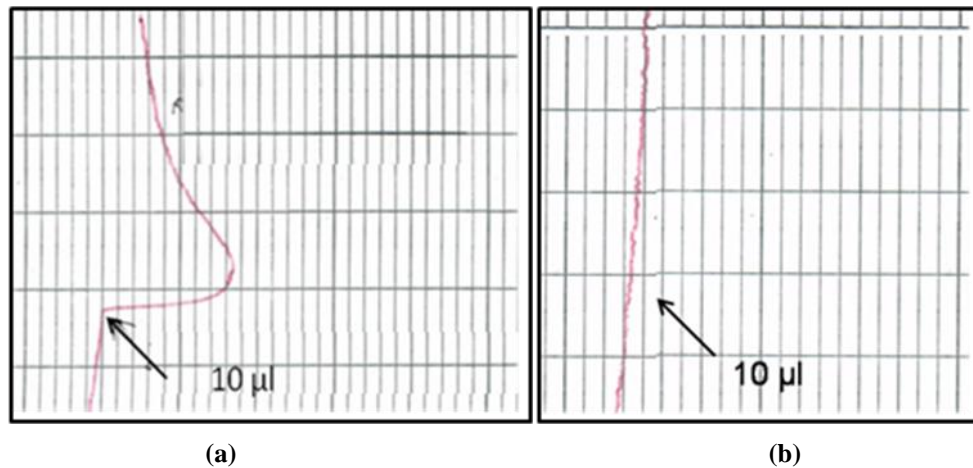


Figura 4-11. Registro gráfico de la señal en presencia (a) y ausencia (b) de interferencia.

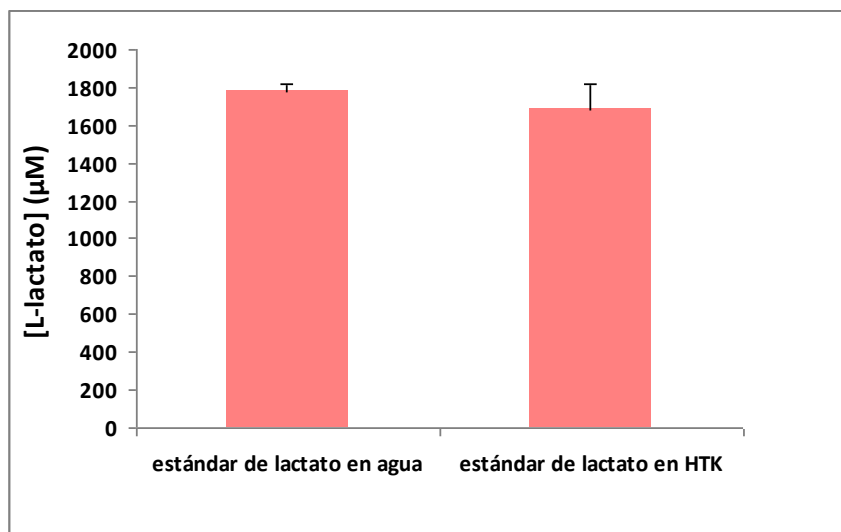


Figura 4-12. Comparación entre los valores de concentración para dos soluciones estándar de lactato de litio 1920 μM , una preparada en agua y otra en HTK. $T=20^{\circ}\text{C}$. $\text{pH}=7.5$. Resultados mostrados: media + SD, $n=5$

Los resultados indican que, al menos para una concentración de lactato de 1920 μM , no hay diferencia significativa entre los valores de concentración determinados para cada solución estándar.

4.2 Método espectrofotométrico para la determinación de lactato

4.2.1 Determinación del rango de linealidad

La figura 4-13 representa el ajuste lineal de la gráfica ΔAbs vs [L-lactato]

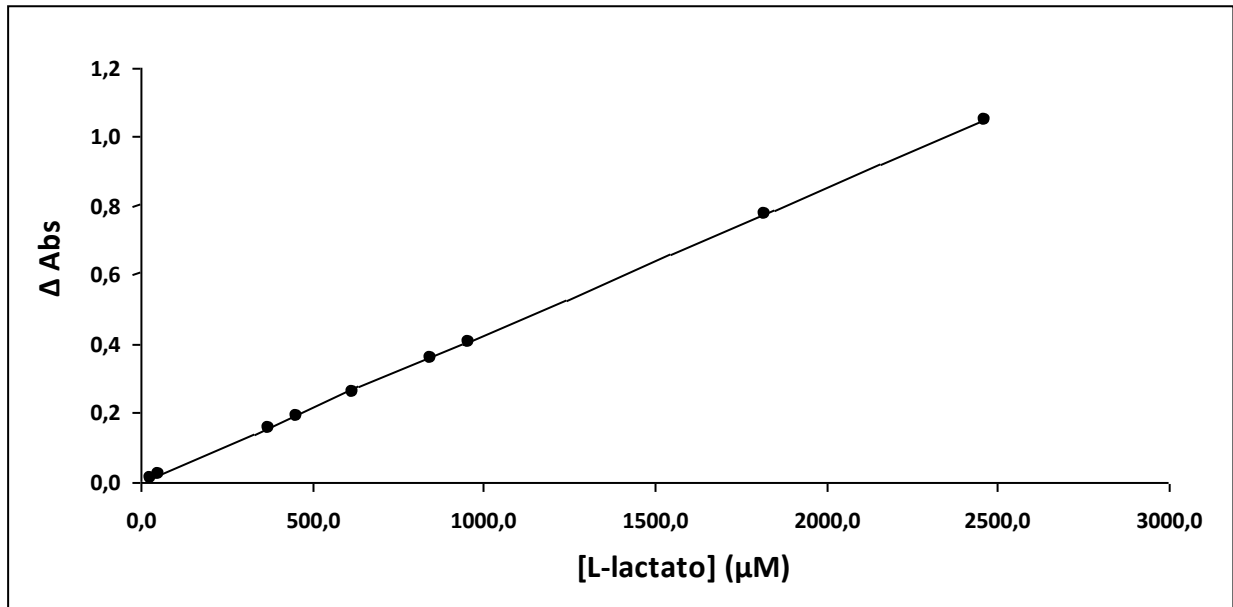


Figura 4-13. Ajuste lineal para las lecturas espectrofotométricas.

La gráfica muestra que en el rango de 25 a 2500 μM de lactato, el ΔAbs presenta un comportamiento lineal con respecto a la concentración de L-lactato, pudiendo asegurar que las mediciones realizadas dentro de ese rango son confiables.

4.3 Determinación de lactato en muestras biológicas

4.3.1 Soluciones de preservación y perfusatos

En las figuras 4-14, 4-15 y 4-16 se detalla la producción de lactato por gramo de tejido durante 24 h de preservación hipotérmica y 90 min de reperfusión normotérmica de hígados de rata. Se expone una comparación entre los valores determinados por los métodos espectrofotométrico y voltamperométrico.

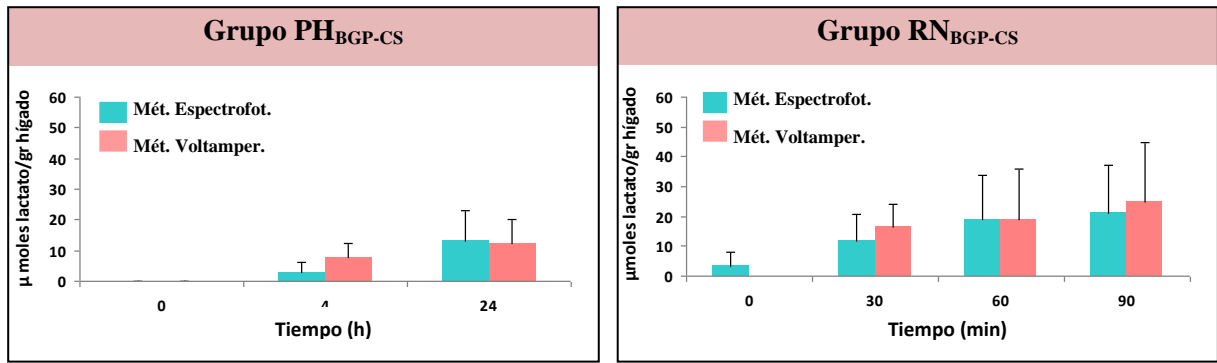


Figura 4-14. µmoles de lactato producidos/g de hígado durante 24 h de preservación a 4 °C en solución BGP-CS (a) y 90 min de reperusión normotérmica (b) posterior a la preservación. El t=0 hs. de la figura (a) corresponde al momento previo a la introducción del hígado en la solución. T=20°C. pH=7.5. Resultados mostrados: media + SD, n=3.

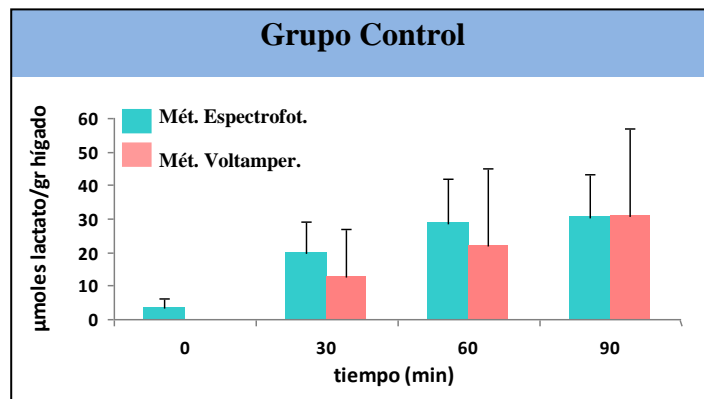


Figura 4-15. µmoles de lactato producidos/g de hígado producidos durante 90 min de reperusión normotérmica sin preservación hipotérmica previa. T=20°C. pH=7.5. Resultados mostrados: media + SD, n=3.

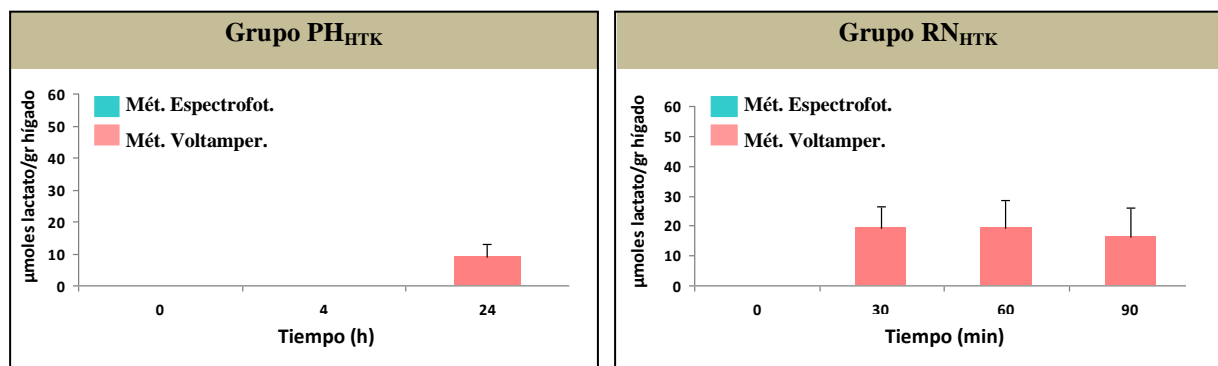


Figura 4-16. µmoles de lactato producidos/g de hígado durante 24 h de preservación a 4°C en solución HTK (a) y 90 min de reperusión normotérmica (b) posterior a la preservación. El t=0 hs. de la figura (a) corresponde al momento previo a la introducción del hígado en la solución. T=20°C. pH=7.5. Resultados mostrados: media + SD, n=3.

Los resultados muestran que el método voltamperométrico no fué lo suficientemente sensible para detectar la concentración de lactato en las muestras de perfusato tomadas a $t = 0$ min de la reperfusión normotérmica del hígado, previamente preservado en solución BGP-CS (Figura 4-14. b). El método presentó el mismo inconveniente con las muestras de perfusato tomadas a $t = 0$ min de la reperfusión del hígado sin previa preservación (Figura 4-15). Tampoco fue sensible para determinar lactato en las muestras de solución de preservación HTK tomadas a $t = 4$ h de preservación hipotérmica y en las muestras de perfusato tomadas a $t = 0$ min de la reperfusión del hígado previamente preservado en HTK (Figura 4-16. a y b).

Los análisis estadísticos indican que no existe diferencia significativa entre los valores obtenidos por ambos métodos de medición.

4.3.2 Plasma Humano

Se determinó la concentración de lactato, en cinco muestras diferentes de plasma, mediante los métodos voltamperométrico y espectrofotométrico. La figura 4-17 muestra una comparación de los valores obtenidos por ambos métodos.

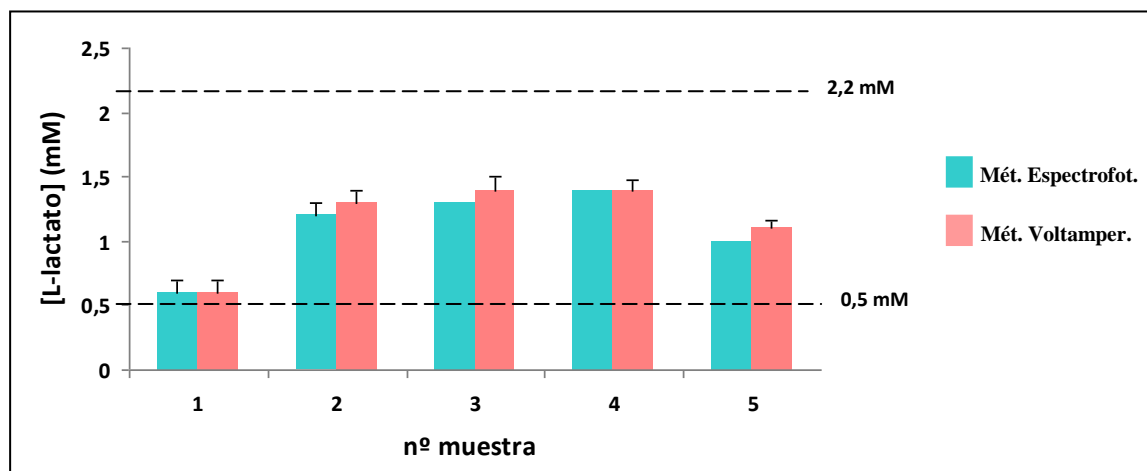


Figura 4-17. Concentración de lactato (mM) en muestras de plasma provenientes de cinco pacientes diferentes. Las líneas discontinuas en el gráfico indican el rango de valores de referencia de lactato en plasma venoso. En cada punto se muestra la media + SD ($n=3$) excepto para las muestras n°: 3, 4 y 5 (para las mismas se realizó una única medida con el método espectrofotométrico).

Los estudios estadísticos indican que no hay diferencia significativa entre los valores obtenidos por ambos métodos de medición.

Siguiendo con el análisis, posteriormente se realizaron mediciones de concentración de lactato mediante el método voltamperométrico en muestras de plasma de seis pacientes distintos, identificando su sexo y edad (figura 4-18).

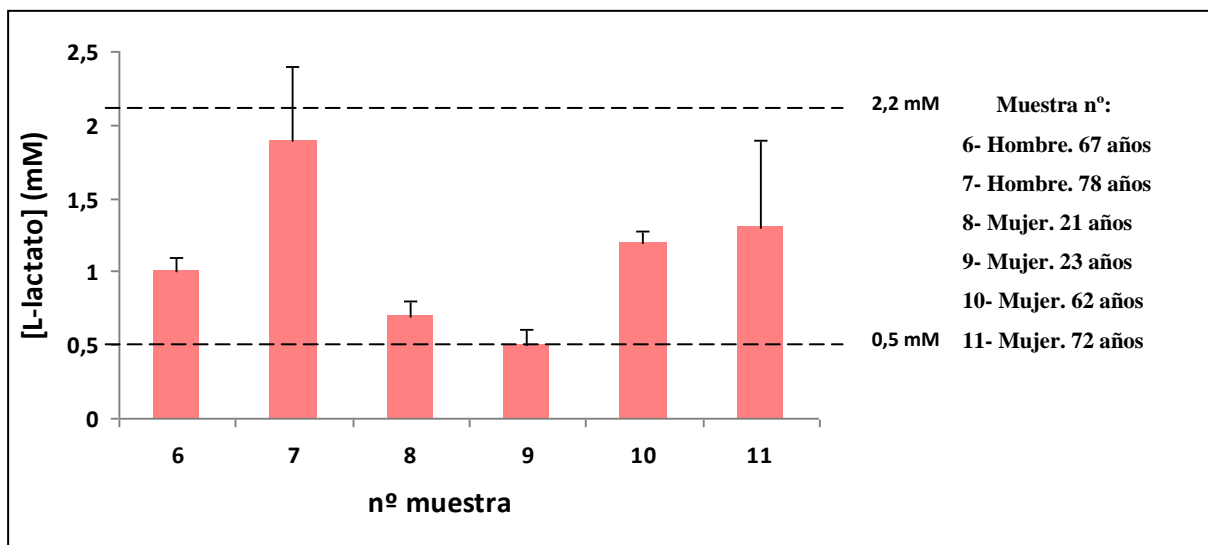


Figura 4-18- Concentración de lactato (mM) en muestras de plasma provenientes de seis pacientes a los cuales se identificó su sexo y edad. Las líneas discontinuas en el gráfico indican el rango de valores de referencia de lactato en plasma venoso. En cada punto se muestra la media + SD, n=3.

4.3.2.1 Precisión del método voltamperométrico aplicado en plasma

En la figura 4-19 se detalla el ensayo de precisión realizado con un pool de plasma. Se realizaron cinco determinaciones diarias de concentración de dicho pool, durante cinco días seguidos.

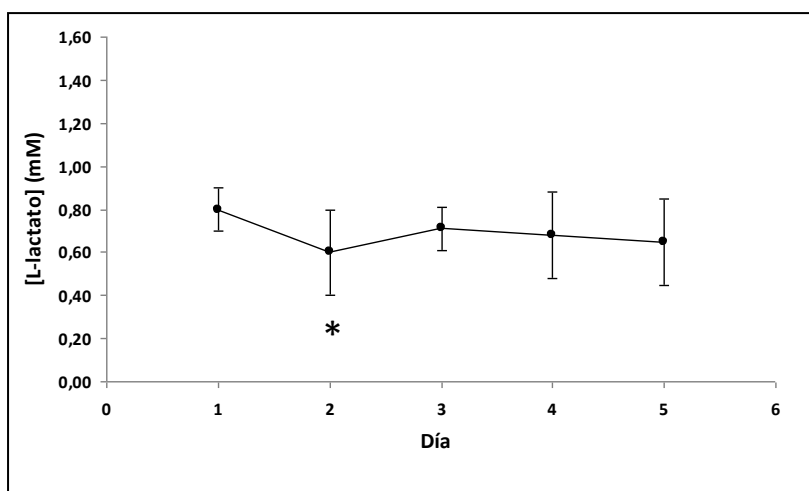


Figura 4-19. Determinación de la concentración de lactato en un pool de plasma. Resultados mostrados: media + SD, n=5. *p < 0,05: menor que el resto de las configuraciones.

Los resultados muestran que el valor de concentración obtenido el día 2 es significativamente diferente a los valores obtenidos los demás días ($p > 0.05$).

4.3.3 Vinos

En la figura 4-20 se pueden observar los valores de concentración de lactato en vinos obtenidos mediante el método voltamperométrico.

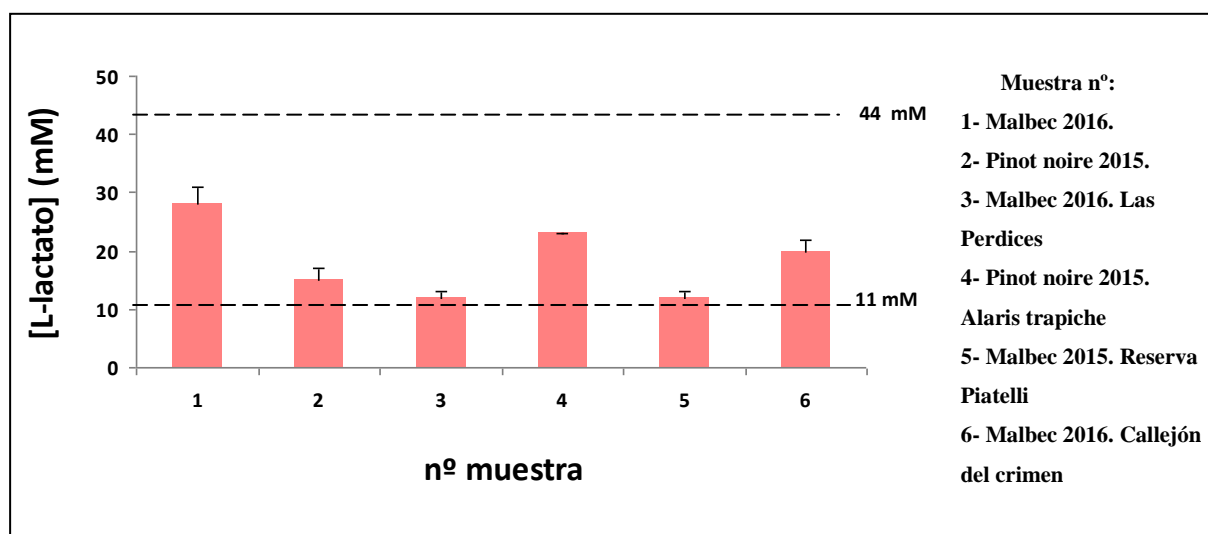


Figura 4-20. Concentración de lactato (mM) en muestras de vinos de distintas bodegas. Las líneas discontinuas en el gráfico indican el rango de valores permitidos de lactato en vinos. Resultados mostrados: media + SD, n=3.

Los valores de concentración de lactato obtenidos a partir de las distintas muestras se encuentran contenidos dentro del rango admitido que cita la bibliografía ^(18, 19).

5 Discusión y Conclusiones

La utilización de sensores para resolver cuestiones analíticas, es sin duda una de las tendencias más claras en la analítica moderna. Sin bien se dispone de una importante cantidad de técnicas de laboratorio, las mismas implican métodos laboriosos, principalmente debido a la necesidad del tratamiento previo de las muestras. Esto demanda también contar con personal entrenado además de tiempo y dinero⁽²⁵⁾.

La tecnología de los biosensores permite abordar este tipo de cuestiones de un modo rápido, barato y confiable. En la actualidad existen multitud de estos dispositivos, en los cuales se combinan la amplia diversidad de componentes biológicos (enzimas, ácidos nucleicos, receptores celulares, anticuerpos y células intactas) con los diferentes tipos de transductores (electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, termométricos). Estos biosensores presentan múltiples aplicaciones en campos como sanidad (análisis clínico), alimentación (tecnología de alimentos), vigilancia del medio ambiente (contaminantes), defensa y seguridad⁽⁶⁶⁾.

Los biosensores enzimáticos son los dispositivos más extendidos y muchos de ellos se producen comercialmente, los mismos se caracterizan por su alta selectividad. Además proporcionan una respuesta rápida debido a su alta actividad y la alta concentración local de enzimas en una capa sensible. Los inconvenientes de los biosensores enzimáticos son la estabilidad insuficiente y el alto precio de las enzimas purificadas⁽³¹⁾.

La utilización de un transductor electroquímico permite que, como la señal es eléctrica, sea factible la transducción directa de la velocidad de reacción en la señal de lectura. Además, los límites de detección que se obtienen son suficientes y adecuados para la detección de muchos analitos de interés⁽²⁵⁾.

Los sensores voltamperométricos permiten obtener una medida continua y prácticamente instantánea de la actividad del O₂, una ventaja fundamental para las determinaciones bioquímicas.

Nuestro biosensor contiene un electrodo de Clark de tamaño muy reducido, esto lo hace apropiado para ser utilizado con volúmenes pequeños de muestra. Se decidió estudiar las distintas posibilidades de fijación de la enzima en ambas caras de la membrana aviar y sobre todo la estabilidad de operación para cada configuración. Para ello se estudiaron las posibles variaciones en los tiempos de respuesta, en los parámetros de las curvas de respuesta y por último se estudió el posible efecto que las variaciones podrían ejercer en el objetivo principal del biosensor que es la determinación de lactato en muestras biológicas.

El tiempo de respuesta del 90% ($tr_{90\%}$) presentó valores variables para las distintas configuraciones, sin embargo los estudios estadísticos indicaron que dichas variaciones no fueron significativas cuando se consideró la cara sobre la cual está fijada la enzima pero si lo fueron cuando se consideró la disposición de la enzima en el sistema. Para la configuración en la cual la enzima se encuentra expuesta hacia el electrodo, el $tr_{90\%}$ mostró valores más altos, es decir, el sistema responde más lento a un cambio en la pO_2 del medio. Cuando la enzima se dispone hacia la parte interna del electrodo, el lactato debe atravesar la membrana para llegar hasta la capa enzimática en la cual se produce la reacción. Dicha membrana puede estar representando un punto que limita la velocidad global de la reacción, por lo cual es necesario un lapso mayor de tiempo para que el consumo de oxígeno sea detectado. De modo contrario, cuando la enzima esta dispuesta hacia la solución que contiene lactato, el mismo se encuentra disponible, sin necesidad de atravesar ninguna barrera.

En cuanto al efecto del quitosano, podemos afirmar en base a los resultados obtenidos, que el mismo genera un aumento en el $tr_{90\%}$ sobre todo cuando se encuentra en la cara B. Este aumento de $tr_{90\%}$ puede deberse al hecho que el quitosano podría estar retardando la difusión del oxígeno hacia la capa enzimática.

Estos resultados conciden con los obtenidos en los estudios sobre el coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) de la membrana a lactato, los cuáles indican que la presencia de quitosano provoca una aumento en el valor de de dicho parámetro.

La sensibilidad de la respuesta presentó diferencias estadísticamente significativas para las distintas configuraciones, obteniéndose el mayor valor para la configuración B-E. Esto puede deberse a la disponibilidad del sustrato. Cuando la enzima se dispone hacia el medio de reacción es más seguro que pueda utilizar todo el lactato disponible. En cambio, cuando esta dispuesta hacia el electrodo, parte del sustrato puede no atravesar la membrana, debido a la barrera que la misma representa, y no ser detectado en su totalidad.

Al momento de analizar la estabilidad de operación del bioreceptor debido a su uso, en función de la variación del tiempo de respuesta y de los parámetros del ajuste lineal, puede decirse que las configuraciones que presentan la enzima hacia el exterior son las que presentan mayor variación en los parámetros obtenidos. La causa probable de este efecto podría deberse a que, ante una exposición mayor del bioreceptor, se produzca una pérdida de enzima o la que misma se vea a afectada por factores contaminantes. Para resolver esta cuestión, la membrana que contiene el bioreceptor podría disponerse entre membranas protectoras (en forma de sándwich) como se ha hecho en otros trabajos, ofreciendo así una mayor protección a la enzima.

La actividad de una enzima inmovilizada se rige por la cinética de la reacción enzimática. La velocidad de reacción es mayor con el aumento de la temperatura de trabajo. Aunque las concentraciones de oxígeno disuelto en las soluciones son más bajas a temperaturas más altas, la enzima inmovilizada aún puede adquirir actividades más elevadas a temperaturas más altas y así, consumir oxígeno a un ritmo más elevado en la reacción enzimática. En nuestro trabajo, se observa que hay un aumento significativo del consumo de oxígeno a 20 °C en el caso de la configuración B-E. Sin embargo hay una pérdida del comportamiento normal del biosensor a temperaturas mayores a 20 °C debido. Esto puede deberse a la posible desnaturalización o a una disminución de la cantidad de enzima fijada a la membrana, ya que al ser el quitosano un material poroso, puede haber una pérdida de la enzima a través de dichos poros. La única configuración que permitió medir el consumo de oxígeno por encima de los 20 °C fue la A-I. Esto puede deberse probablemente a que, al estar en el interior de la membrana, la enzima se encuentra más protegida y con los movimientos más restringidos lo que impediría que pierda su estructura y se desactive. Sin embargo, el consumo de oxígeno para esta configuración presentó valores significativamente menores respecto de las configuraciones restantes.

Por lo tanto recomendamos la utilización del biosensor a 20 °C.

Al momento del análisis de interferencias, se encontró que la mayoría de las sustancias analizadas no produjeron ninguna alteración significativa en la respuesta del biosensor. Interferentes comunes para biosensores amperométricos de lactato, como el ácido úrico, no produjeron ningún efecto en nuestro biosensor. En cambio, la L-cisteína y el glutatión produjeron una ligera interferencia en la medición, probablemente debido a sus efectos sobre los grupos -SH de la enzima. En conclusión, la mayoría de las sustancias que se encuentran a menudo en las muestras de soluciones de preservación y plasma, no muestran una interferencia significativa en la determinación de L-lactato utilizando el biosensor desarrollado en este trabajo de tesina.

La reacción enzimática puede seguirse estimando la disminución de la concentración de oxígeno en el medio de reacción. La reducción del oxígeno sobre el electrodo necesita potenciales negativos, lo cual genera una corriente de fondo muy elevada, facilitando de esta forma la oxidación de especies fácilmente oxidables como ascorbatos y uratos, muy comunes en muestras clínicas. Para evitar algunas interferencias, se debe disminuir el potencial aplicado para la detección electroquímica.

Una forma de resolver el problema es obtener una transferencia electrónica directa entre las oxidasas y los electrodos, lo cual resulta difícil en muchos casos debido a que el centro activo está muy en el interior de las enzimas. Sin embargo muchas oxidasas reaccionan fácilmente

con mediadores artificiales que pueden ser utilizados para lanzar los electrones desde la forma reducida de la enzima hacia los electrodos. Esto hace que el potencial del electrodo de trabajo se fije ahora, por el potencial del par mediador, lo cual es muy ventajoso si dicho par mediador requiere un bajo potencial, ya que de esta manera se evita la interferencia de otras especies electroactivas que reaccionan a potenciales más elevados⁽⁶⁷⁾.

La estabilidad de operación del biosensor se evaluó midiendo la precisión de la respuesta en una solución estándar de L-lactato de litio 0,096 M a temperatura ambiente. La precisión de la respuesta se mantuvo sin cambios apreciables durante un período de 4 días de uso continuo, cuando el biosensor se almacenó a 4 °C. Por lo tanto, podemos inferir que la vida útil del biosensor puede prolongarse si se mantiene a 4 °C. Cuando el ensayo de precisión se realizó en el pool de plasmas, la precisión disminuyó. Esto pudo deberse, probablemente, a la presencia de compuestos que generan ligeras interferencias. La excelente vida útil del biosensor posiblemente esté relacionada con la compatibilidad biológica del quitosano y la membrana con la enzima. La membrana de la cáscara de huevo y el quitosano están compuestos principalmente por biopolímeros que pueden suministrar policationes para estabilizar la enzima^(45,68).

Podríamos afirmar que, a pesar de las variaciones mínimas detectadas a través de los días de uso del biosensor, en los tiempos de respuesta y en los parámetros del ajuste lineal, no se afectó la precisión del método, ya que los valores de concentración determinados en un período de varios días, no presentaron una variación estadísticamente significativa.

Las similitudes observadas entre los resultados obtenidos por la técnica estándar y nuestro electrodo sugieren que el mismo puede ser utilizado para futuras aplicaciones de determinación de lactato en plasma y otros líquidos biológicos.

6 Referencias bibliográficas

1. Caraway, W.T., Watts, N. B. (1987) Carbohydrates. In: Tietz NW, (ed.): Fundamentals of Clinical Chemistry. 3 ed. Saunders. p. 442-3.
2. Mizock, B. A. (1987). Controversies in Lactic Acidosis: Implications in Critically III Patients. *Jama*, 258(4), 497-501.
3. Higgins C. Lactate and lactic acidosis. Oct 2007. Disponible en: URL: <http://acutecaretesting.Org/>.
4. Heredero Valdés, M., Mena Miranda, V. R., & Riverón Corteguera, R. L. (2000). Acidosis láctica: algunas consideraciones. *Revista Cubana de Pediatría*, 72(3), 183-193.
5. <http://www.valoresnormales.com/l/lactato>
6. Mordes, J. P., Tranquada, R. E., & Rossini, A. A. (1999). Lactic acidosis. Irwin RS, Cerra FB, Rippe JM, rédacteurs. *Intensive care medicine*. 4e éd. Philadelphie: Lippincott Williams & Wilkins, 1289-96.
7. Pallarés Querol, E., Miguelañez Díaz, M., Rubí Cervino, J., Ripoll Sevillano, E., & Martínez Pardo, M. (2002). Acidosis láctica en pediatría. *Química Clínica*, 21(4), 280-284.
8. Guibert, E. E., Petrenko, A. Y., Balaban, C. L., Somov, A. Y., Rodriguez, J. V., & Fuller, B. J. (2011). Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 38(2), 125-142.
9. Fuller, B. J., Petrenko, A. Y., Rodriguez, J. V., Somov, A. Y., Balaban, C. L., & Guibert, E. E. (2013). Biopreservation of hepatocytes: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification. *CryoLetters*, 34(4), 432-452.

10. Rodríguez, J. V., Almada, L. L., Mamprin, M. E., Guibert, E. E., & Furno, G. (2009). Subzero nonfreezing storage of rat hepatocytes using modified University of Wisconsin solution (mUW) and 1, 4-butanediol. I-effects on cellular metabolites during cold storage. *Annals of Hepatology*, 8(1), 57-62.
11. Guibert, E. E., Almada, L. L., Mamprin, M. E., Bellarosa, C., Pizarro, M. D., Tiribelli, C., & Rodriguez, J. V. (2009). Subzero nonfreezing storage of rat hepatocytes using UW solution and 1, 4-butanediol. II-functional testing on rewarming and gene expression of urea cycle enzymes. *Annals of Hepatology*, 8(2), 129-33.
12. Rauen, U., Polzar, B., Stephan, H., Mannherz, H. G., & De Groot, H. (1999). Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *The FASEB Journal*, 13(1), 155-168.
13. Kerkweg, U., Li, T., de Groot, H., & Rauen, U. (2002). Cold induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: The central role of chelatable iron. *Hepatology*, 35(3), 560-567.
14. Mamprin, M. E., Vega, F., & Rodriguez, J. V. (2005). Adenosine 5'triphosphate transport and accumulation during the cold preservation of rat hepatocytes in University of Wisconsin solution. *World Journal of Gastroenterology: WJG World Journal of Gastroenerology*, 11, 1957-1964
15. Carnevale, M. E., Balaban, C. L., Guibert, E. E., Bottai, H., & Rodriguez, J. V. (2013). Hypothermic machine perfusion versus cold storage in the rescuing of livers from non-heart-beating donor rats. *Artificial organs*, 37(11), 985-991
16. Fuller, B., Guibert, E., & Rodríguez, J. (2010). Lessons from Natural Cold-Induced Dormancy to Organ Preservation in Medicine and Biotechnology: From the “Backwoods to the Bedside”. In *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*(pp. 253-278). Springer Berlin Heidelberg.

17. Southard, J. H. (1990) Temperature effects and cooling. *Clinical Ischemic Syndromes*. St Luis: Mosby, 303-25.
18. <https://www.touryvino.com/el-vino/que-es-el-vino/>
19. <https://www.verema.com/blog/verema/1237315-acidez-vino-dos-conceptos>
20. Noordally, O., & Vincent, J. L. (1999). Evaluation of a new, rapid lactate analyzer in critical care. *Intensive care medicine*, 25(5), 508-513.
21. Slomovitz, B. M., Lavery, R. F., Tortella, B. J., Siegel, J. H., Bachl, B. L., & Ciccone, A. (1998). Validation of a hand-held lactate device in determination of blood lactate in critically injured patients. *Critical care medicine*, 26(9), 1523-1528.
22. Boldt, J., Kumle, B., Suttner, S., & Haisch, G. (2001). Point-of-care (POC) testing of lactate in the intensive care patient. Accuracy, reliability, and costs of different measurement systems. *Acta anaesthesiologica scandinavica*, 45(2), 194-199.
23. Detry, B., Nullens, W., Cao, M. L., Frans, A., Robert, A., & Clerbaux, T. (1998). Assessment of the lactate biosensor methodology. *European Respiratory Journal*, 11(1), 183-187.
24. Bénétiau-Burnat, B., Bocque, M. C., Lorin, A., Martin, C., & Vaubourdolle, M. (2004). Evaluation of the blood gas analyzer GEM (r) PREMIER (tm) 3000. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 42(1), 96-101.
25. Biedler, A., Schneider, S., Bach, F., Soltesz, S., Wilhelm, W., Ziegeler, S., & Kreuer, S. (2007). Methodological aspects of lactate measurement evaluation of the accuracy of photometric and biosensor methods. *Open Anesthesiol J*, 1, 1-5.
26. <https://quimica.laguia2000.com/enlaces-quimicos/voltamperometria>
27. Científico C., Ramírez, P. G., García, R. D., Ortega, A. G., Campuzano, E. G., Malumbres, S., & Oujo, E. Lactato: utilidad clínica y recomendaciones para medición.

28. Kaplan, L. A., Pesce, A. J., & Gau, N. (1986). Acido láctico. Hidratos de carbono y metabolitos. Química Clínica. Editorial Panamericana, p 1226
29. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(1), 121-131.
30. Arnold, M. A. (1998). Commercial Biosensors. Applications to Clinical, Bioprocess, and Environmental Samples Edited by Graham Ramsay (Wolpert Polymers, Inc).
31. Smutok, O., Gayda, G., Dmytruk, K., Klepach, H., Nisnevitch, M., Sibirny, A., Puchalski, C., Broda, D., Schuhmann, W., Gonchar, W. & Sibirny, V. (2011). Amperometric Biosensors for Lactate, Alcohols, and Glycerol Assays in Clinical Diagnostics. In *Biosensors-Emerging Materials and Applications*. InTech.
32. Choi, M. M. (2005). Application of a long shelf-life biosensor for the analysis of L-lactate in dairy products and serum samples. *Food chemistry*, 92(3), 575-581.
33. Hermann Rahn, Amos Ar Charles Paganelli . 1979 - N° 31, 16-26 Como respiran los huevos de las aves investigación y ciencia) *Investigación y Ciencia* Abril 1979 - N° 31
34. Yi, F., Guo, Z., Zhang, L., Yu, J., Li, Q. (2004) Soluble eggshell membrane protein: preparation, characterization and biocompatibility. *Biomaterials*, 25, 4591-4599.
35. LEACH JR, R. M. (1982). Biochemistry of the organic matrix of the eggshell. *Poultry Science*, 61(10), 2040-2047.
36. Nakano, T., Ikawa, N. I., & Ozimek, L. (2003). Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. *Poultry Science*, 82(3), 510-514.
37. Yang, J. Y., Chuang, S. S., Yang, W. G., & Tsay, P. K. (2003). Egg membrane as a new biological dressing in split-thickness skin graft donor sites: a preliminary clinical evaluation. *Chang Gung medical journal*, 26(3), 153-159.

38. Maeda, K., & Sasaki, Y. (1982). An experience of hen-egg membrane as a biological dressing. *Burns*, 8(5), 313-316.
39. Tavassoli, M. (1983). Effect of the substratum on the growth of CFU-c in continuous marrow culture. *Experientia*, 39(4), 411-412.
40. Choi, M. M., Pang, W. S., Xiao, D., & Wu, X. (2001). An optical glucose biosensor with eggshell membrane as an enzyme immobilisation platform. *Analyst*, 126(9), 1558-1563.
41. Yang, D., Qi, L., & Ma, J. (2003). Hierarchically ordered networks comprising crystalline ZrO₂ tubes through sol-gel mineralization of eggshell membranes. *Journal of Materials Chemistry*, 13(5), 1119-1123.
42. Ishikawa, S. I., Suyama, K., Arihara, K., & Itoh, M. (2002). Uptake and recovery of gold ions from electroplating wastes using eggshell membrane. *Bioresource technology*, 81(3), 201-206.
43. Choi, M. M., & Yiu, T. P. (2004). Immobilization of beef liver catalase on eggshell membrane for fabrication of hydrogen peroxide biosensor. *Enzyme and microbial technology*, 34(1), 41-47.
44. Sirkar, K., Revzin, A., & Pishko, M. V. (2000). Glucose and lactate biosensors based on redox polymer/oxidoreductase nanocomposite thin films. *Analytical chemistry*, 72(13), 2930-2936.
45. Wei, X., Zhang, M., & Gorski, W. (2003). Coupling the lactate oxidase to electrodes by ionotropic gelation of biopolymer. *Analytical chemistry*, 75(9), 2060-2064.
46. Park, S. I., & Zhao, Y. (2004). Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(7), 1933-1939.
47. Hitchman, M. (1978) .Measurement of dissolved oxygen. *Chemical Analysis*; v.49. A Wiley-Interscience Publication.

48. Mini Clark style electrode. Product no. #730. Instructions for use. Diamond General Development Corp, Ann Arbor, USA.
49. Niederle, F. A., Madrid, R. E., & Felice, C. J. (2011). Medición de oxígeno por método potenciométrico. In XVIII Congreso argentino de Bioingeniería y VII Jornadas de Ingeniería Clínica, Mar del Plata, Bs As, Setiembre.
50. Castellan, G. W. (1987) Fisicoquímica. Segunda edición. Addison-Wesley Iberoamericana.
51. Chemical Microsensor, Product no. 1201. Operating & Maintenance Manual. Diamond General Development Corp, Ann Arbor, USA.
52. Zúñiga, M. W., Monsalve, R. L. F., & Valdivieso, H. M. (2007). Bioingeniería VI: Fundamentos de instrumentación para la química clínica y las radiaciones ionizantes. Ciencia y Tecnología. Universidad de Antioquia, 155-157.
53. Lessler, M. A. (1982) Adaptation of polarographic oxygen sensors for biochemical assays. *Methods in Biochemical Analysis*, 28, 175-199
54. YSI 5300 Biological Oxygen Monitor. Instruction Manual. Yellow Springs Instrument Co., Inc, Yellow Springs, Ohio, USA.
55. The Rank Brothers oxygen electrode. Operating manual. Rank Brothers Ltd. Cambridge, England.
56. Brodin, B., Steffansen, B., & Nielsen, C. U. (2010). Passive diffusion of drug substances: the concepts of flux and permeability. *Molecular Biopharmaceutics*; Steffansen, B., Brodin, B., Nielsen, CU, Eds, 135-152.
57. Referencia personal Dr. José Arias
58. Gnaiger E. Oxygen solubility in experimental media. *Mitochondrial Physiology Network* 20012004;6:1–6. Available at: <http://www.oroboros.at/index.php?oxygen-solubility>.

59. Neirinckx, E., Vervaet, C., Michiels, J., De Smet, S., Van Den Broeck, W., Remon, J. P., Backer, P., Crocabels & Croubels, S. (2011). Feasibility of the Ussing chamber technique for the determination of in vitro jejunal permeability of passively absorbed compounds in different animal species. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 34(3), 290-297.
60. Almada, L., Guibert, E. E., & Rodriguez, J. V. (2002). A simple GC method for determination of cryoprotector diols 1, 4-butanediol or 2, 3-butanediol in isolated rat hepatocytes. *Cryoletters*, 23(2), 113-120
61. Gutmann I and Wahlefeld. (1982) L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. En: *Methods in Enzymatic Analysis* (3rd ed.), Editores: H. U. Berneyer. Weinheim, Germany: Verlag Chemie, vol. III: 1464-1468.
62. Balaban, C. L., Rodriguez, J. V., & Guibert, E. E. (2011). Delivery of the bioactive gas hydrogen sulfide during cold preservation of rat liver: effects on hepatic function in an ex vivo model. *Artificial organs*, 35(5), 508-515.
63. Ballet, F.A. y Thurman, R. G. (1991) Why the perfused liver? En *Perfused Liver Clinical and basic applications* (F. Ballet y R.G. Thurman eds) pp.1-14. John Libbey, London, Paris, Rome
64. Pizarro, M. D., Rodríguez, J. V., Mamprin, M. E., Fuller, B. J., Mann, B. E., Motterlini, R., & Guibert, E. E. (2009). Protective effects of a carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) during hepatic cold preservation. *Cryobiology*, 58(3), 248-255.
65. Ross, B. D. (1972) *Perfusion techniques in Biochemistry: A laboratory manual in the use of isolated perfused organs in biochemical experimentation*. Oxford University Press, Ely House, London W.
66. García-Balboa, C., Costas, E. y López Rodas, V. (2012). Biosensores microalgales para la detección de contaminantes. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 6(1), 51-67

67. Carrazón, J. M. P., & García, A. J. R. (2000). Biosensores electroquímicos: una herramienta útil para el análisis medioambiental, alimentario y clínico. In *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (No. 2, pp. 5-15). Real Sociedad Española de Química.
68. Heller, J., & Heller, A. (1998). Loss of activity or gain in stability of oxidases upon their immobilization in hydrated silica: significance of the electrostatic interactions of surface arginine residues at the entrances of the reaction channels. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 4586–4590