



UNR Universidad
Nacional de Rosario

Universidad Nacional de Rosario

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

**Desarrollo de métodos (bio)electroquímicos que
faciliten la determinación de analitos de interés en el
campo de la Salud y las fuentes de energía renovables**

Tesis para optar por el título de:

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presentada por:

Lic. Pablo Luis Faccendini

Directora de Tesis:

Dra. Claudia M. Lagier

2014

Desarrollo de métodos (bio)electroquímicos que faciliten la determinación de analitos de interés en el campo de la Salud y las fuentes de energía renovables

Licenciado en Biotecnología Pablo Luis Faccendini

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en Instituto de Química Rosario, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2009 y el 18 de febrero de 2014, bajo la dirección de la Dra. Claudia Marina Lagier



UNR Universidad
Nacional de Rosario

Índice

1.	Resumen	vi
1.	Summary.....	viii
	Publicaciones	x
	Abreviaturas y Símbolos	xii
2	Introducción.....	1
2.1	Toxoplasmosis	1
2.1.1	Generalidades	1
2.1.2	<i>Toxoplasma gondii</i>	2
2.1.3	Diagnóstico.....	4
2.1.3.1	Métodos de diagnóstico	4
2.1.3.2	Importancia del correcto diagnóstico en la embarazada	6
2.1.3.3	Diagnóstico en la embarazada	6
2.1.3.4	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima.....	7
2.1.3.4.1	Esquema de captura o tipo “Sandwich”	7
2.1.3.5	Obtención de antígenos para diagnóstico	9
2.1.4	Predicción de epítopes reconocidos por células B	10
2.2	Tuberculosis	13
2.2.1	Generalidades	13
2.2.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
2.2.3	Diagnóstico.....	14
2.3	Biodiesel	16
2.3.1	Determinación de glicerol libre en biodiesel.....	16
2.4	Marco teórico de las técnicas electroquímicas utilizadas.....	18
2.4.1	Cronoamperometría.....	20
2.4.2	Técnicas voltamétricas	21
2.4.2.1	Voltametría de barrido lineal	22
2.4.2.2	Voltametría cíclica.....	23

2.4.3	Técnicas de pulso	24
2.4.3.1	Voltamperometría onda cuadrada, VOC	24
2.5	Biosensores	27
2.5.1	Superficie de bioreconocimiento en biosensores	28
2.5.2	Biosensores amperométricos	29
2.5.3	Biosensores de uso clínico	29
2.5.3.1	Biosensores para evaluación de infección toxoplásmica	32
2.5.4	Biosensores para cuantificación de glicerol.	32
3	Objetivos	37
3.1	Objetivos generales	37
3.2	Objetivos Particulares	37
4	Materiales y métodos	39
4.1	Reactivos y medios de cultivos	39
4.1.1	Reactivos	39
4.1.2	Medios de cultivos	40
4.2	Cepas bacterianas	40
4.3	Bacteriófagos	41
4.4	Plásmidos	41
4.5	Reacción en cadena de la polimerasa	41
4.6	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	42
4.7	Minipreparación de ADN plasmídico	42
4.8	Purificación del producto de amplificación	43
4.9	Prueba de expresión de proteínas de fusión a TRX y a “cola” de histidinas	43
4.10	Expresión y purificación preparativas de antígenos recombinantes	43
4.11	Separación de proteínas mediante SDS-PAGE	44
4.12	Cuantificación de proteínas.	44
4.13	Reacción de conjugación biotina-antígeno	44

4.14	Revelado cromogénico de la reacción de conjugación.....	45
4.15	Mediciones espectrofotométricas.	45
4.16	Ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima con detección fotométrica.....	45
4.16.1	Esquema A	46
4.16.2	Esquema B.....	46
4.17	Reacción de color para determinación cuantitativa de glicerol por método espectrofotométrico.	47
4.18	Determinación de glicerol remanente en cultivos de micobacterias	47
4.18.1	Determinación de glicerol remanente en cultivos de micobacterias con y sin fago D29 y ensayos controles respectivos	48
4.19	Instrumental electroquímico	48
4.19.1	Electrodos de trabajo	48
4.19.1.1	Bioelectrodo para evaluación de infección toxoplásmica.....	48
4.19.1.2	Electrodos para cuantificación de glicerol.....	49
4.19.2	Limpieza de electrodos.....	50
4.19.3	Determinación del área real del electrodo.....	50
4.19.3.1	Medición de la adsorción de oxígeno	50
4.19.3.2	Voltametría cíclica de ferricianuro de potasio.....	51
4.20	Medidas electroquímicas	51
4.20.1	Mediciones amperométricas para evaluación de infección toxoplásmica.....	51
4.20.2	Mediciones amperométricas para cuantificación de glicerol	52
4.20.2.1	Amperometrías con tip de oro	52
4.20.2.2	Amperometrías con electrodos de pasta de C.....	52
4.20.3	Voltamperometría de onda cuadrada.....	53
4.21	Funcionalización de nanotubos de carbono.....	53
4.22	Programas de predicción de epítopes lineales reconocidos por células B	54

4.22.1	Base de datos de proteínas	54
4.22.2	Programas utilizados	54
4.23	Análisis de Datos	54
4.24	Cálculos estadísticos y diseño experimental	55
5	Resultados y discusión	57
5.1	Evaluación de antígenos recombinantes de <i>T. gondii</i>	57
5.1.1	Antígeno P30.....	57
5.1.2	Antígeno P22.....	58
5.1.3	Antígeno P35.....	59
5.2	Marcado de antígenos recombinantes de <i>T. gondii</i>	60
5.3	Inmunoensayos	61
5.3.1	Inmunoensayos con detección fotométrica	61
5.3.1.1	Evaluación del esquema A.....	61
5.3.1.2	Esquema B	62
5.3.2	Inmunoensayos con detección amperométrica, utilizando los antígenos recombinantes	66
5.4	Determinación de la actividad electroquímica del glicerol en medio acuoso	67
5.5	Cuantificación de glicerol en medios acuosos complejos	71
5.5.1	Evaluación del modelo propuesto por medio de lecturas espectrofotométricas	72
5.5.1.1	Evaluación de la señal con la concentración de glicerol	76
5.5.1.2	Optimización de condiciones para disminuir el costo operativo ..	78
5.5.2	Determinación de glicerol remanente en cultivos de micobacterias .	79
5.5.2.1	Evaluación de glicerol remanente en cultivos axénicos de <i>M. smegmatis</i>	79
5.5.2.2	Determinación de glicerol remanente en cultivos de micobacterias con y sin fago D29 y ensayos controles respectivos.....	80

5.5.3	Biosensor amperométrico a base de pasta de carbono vítreo modificada.....	81
5.5.4	Desarrollo de un biosensor a base de pasta de carbono vítreo y nanotubos de carbono	83
5.5.4.1	Ensayos de cuantificación de glicerol con el bioelectrodo desarrollado, utilizando técnicas de pulso	86
5.6	Validación de métodos	88
6	Experimentos Auxiliares	94
6.1	Comparación de programas de predicción de epítopes lineales reconocidos por células B	94
6.2	Puesta a punto de ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima con detección fotométrica	95
6.2.1	Bloqueante a utilizar.....	96
6.2.2	Esquema A	97
6.2.3	Esquema B.....	98
6.3	Ensayos electroquímicos	99
6.3.1	Determinación del área real de un electrodo.....	99
6.3.1.1	Método de la adsorción de O ₂	99
6.3.1.2	Voltametría cíclica a distintas velocidades.....	99
6.3.2	Cubierta del biosensor selectivo para glicerol y soluciones amortiguadoras	100
6.3.3	Ensayos preliminares de voltametrías de onda cuadrada.....	100
6.3.3.1	Selección de un método apropiado para establecer la línea..... de base.....	101
7	Conclusiones.....	104
8	Bibliografía.....	106

1. Resumen

Este trabajo de Tesis se orientó al desarrollo de métodos analíticos alternativos a los hoy vigentes, que faciliten la determinación de compuestos de interés tanto para diagnóstico clínico como para la industria de combustibles alternativos. Se realizaron aportes para tres situaciones de relevancia: diagnóstico de toxoplasmosis, tuberculosis y evaluación de calidad de biodiesel.

La toxoplasmosis es una parasitosis causada por *Toxoplasma gondii* que afecta a humanos sin generar complicaciones, excepto cuando los infectados son inmunodeprimidos o mujeres embarazadas que no cursaron previamente la enfermedad. En este caso, el parásito puede atravesar placenta, generando infección congénita del feto, pudiendo producirle graves consecuencias que pueden llegar a la muerte. Una de las técnicas de diagnóstico utiliza el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima, permitiendo la detección de anticuerpos específicos contra el parásito, los cuales son indicadores de existencia de infección. No obstante, para detectar toxoplasmosis aguda, al día de hoy se carece de una estandarización confiable, principalmente en la preparación del antígeno. Por ello, en este trabajo se procuró identificar regiones donde se codificarán algunos marcadores de fase aguda que concentrarán una alta proporción de determinantes antigénicos para luego clonarlas, expresarlas como proteínas recombinantes, marcarlas con biotina y así utilizarlas como sistema de revelado de anticuerpos específicos contra proteínas de *T. gondii*. Los inmunoensayos aquí presentados proponen una metodología que permitirá en un futuro distinguir sueros provenientes de individuos con infección aguda de aquellos con infección crónica o no infectados.

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Su diagnóstico se basa en una serie de estudios que finaliza con la identificación del agente etiológico en cultivos obtenidos a partir de esputo. Esta identificación puede demorar aproximadamente dos meses, debido al prolongado tiempo de replicación de la micobacteria. Esto conlleva la potencialidad de contagio a individuos sanos y un compromiso importante de la salud del infectado. Últimamente, se han desarrollado técnicas indirectas de detección de *M. tuberculosis* utilizando el bacteriófago D29, capaz de infectar específicamente micobacterias. Es una metodología donde se facilita la replicación del fago en la muestra proveniente del paciente, para luego evaluar el título de fagos liberados, infectando un cultivo testigo de

Micobacterium smegmatis, micobacteria de replicación rápida. Siendo el glicerol fuente de carbono en cultivos de micobacterias, se planteó determinar su concentración remanente como método de evaluar integridad de *M. smegmatis* estableciéndose así una medida indirecta de la previa presencia de *M. tuberculosis* en la muestra problema.

Además, el glicerol es el principal subproducto en la elaboración del biodiesel y su concentración es indicativa de la calidad del combustible, transformándose en analito relevante para la industria de energías alternativas a la derivada del petróleo.

Se desarrollaron y validaron dos métodos amperométricos de cuantificación de glicerol: a) Con electrodo de oro en NaOH 0,1 M, aplicable a medios acuosos (LD 10 μM , intervalo lineal 0,024 a 2,00 mM), b) Con bioelectrodo de pasta de C modificada con glicerol deshidrogenasa, aplicable a medios complejos, como cultivos bacterianos (LD 20 μM , intervalo lineal: 0,060 a 1,75 mM).

1. Summary

This Thesis work was oriented to the development of analytical methods alternative to those currently used, to facilitate the identification of compounds of interest for both clinical diagnosis and the alternative fuel industry. Contributions of relevance to three situations were performed: Diagnosis of toxoplasmosis, tuberculosis and the assessment of biodiesel quality.

Toxoplasmosis is a parasitic disease caused by *Toxoplasma gondii* which does not bring complications in people, except when the infected individual is an immunocompromised patient, or pregnant women who have not previously suffered from the illness. In this case, the parasite can cross the placenta producing congenital infection of the fetus and potentially causing serious consequences, including death. One of the techniques used to its diagnosis is the enzyme-linked immunosorbent assay, allowing the detection of parasite-specific antibodies, which are indicators of the infection. However, this technique aimed to detect acute toxoplasmosis nowadays lacks of reliable standardization, particularly in the preparation of the antigen. Therefore, this study focused on identifying regions encoding several markers of acute phase which highly concentrated antigenic determinants to clone and express them as recombinant proteins, subsequently label them with biotin and thus use them as developing system of specific antibodies against *T. gondii* proteins. The immunoassays presented here propose a methodology which will allow in the future distinguishing sera from individuals with acute infection of those with chronic infection or uninfected.

Tuberculosis is an infectious and contagious disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*. Its diagnosis is based on a series of studies which eventually identify the etiologic agent in cultures obtained from sputum. This identification can take about two months, due to the extensive mycobacteria replication time. This leads to the potential contagion of healthy individuals and a major commitment to the health of the infected patient. Recently, indirect *M. tuberculosis* detection techniques have been developed. They use D29 bacteriophage, which is able to specifically infect mycobacteria. The methodology allows phage replication in the patient's sample, and then evaluates the number of released phages by infecting a control culture of *Mycobacterium smegmatis*, a short-term replicable mycobacteria. As glycerol is the carbon source commonly used in mycobacteria culture, this work proposes determining its residual concentration, as a method of evaluating integrity of

M. smegmatis, thus establishing an indirect measurement of the previous presence of *M. tuberculosis* in the sample.

Furthermore, glycerol is the main by-product in biodiesel production, and its concentration is an indicator of the fuel quality, becoming a relevant analyte to the energy industry alternative to that derived of petroleum.

Two amperometric methods for glycerol quantitation were developed and validated: a) Using a gold electrode, in 0.1 M NaOH medium, useful for simple aqueous solutions (LD 10 μ M, linear range from 0.024 to 2.00 mM), b) using a carbon paste bioelectrode modified with glycerol dehydrogenase, useful for complex media, such as bacterial cultures (LD 20 μ M, linear range: 0.060 to 1.75 mM).

Publicaciones

Los resultados parciales del presente trabajo de Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Trabajos en revistas internacionales:

1- Costa, J. G., Faccendini, P. L., Sferco, S. J., Lagier, C. M., Marcipar, I. S. Evaluation and comparison of the ability of online available prediction programs to predict true linear B-cell epitopes. *Protein & Peptide Letters*. (2013) 20(6):724-30

2- Faccendini, P. L., Ribone, M. E., Lagier, C. M., Selective application of two rapid, low-cost electrochemical methods to quantify glycerol according to the sample nature. *Sensors and Actuators B*. (2014) **193**: 142– 148

Trabajos en congresos:

1- Muñoz, A., Faccendini, P. L., Ribone, M. E., Lagier, C. M. Oxidación electroquímica de polialcoholes sustrato de sistemas enzimáticos bacterianos: Estudio de las condiciones para su cuantificación. V Congreso Argentino de Química Analítica, Bahía Blanca, Noviembre de 2009.

2- Costa, J. G., Faccendini, P. L., Carral, L., Kaufer, F., Lagier, C. M., Marcipar, I. S. Evaluación de dos regiones de la Proteína P35 de *Toxoplasma gondii* para el diagnóstico de fase aguda de la toxoplasmosis. Ascochinga, Córdoba, Octubre de 2010.

3- Costa, J. G., Faccendini, P. L., Lagier, C. M., Marcipar, I. S. Modelado y predicción de los epítopes del antígeno P22 de *Toxoplasma gondii*. 2do Congreso de Bioinformática y Biología Computacional, Córdoba, Mayo de 2011.

4- Faccendini, P. L., Costa, J. G., Ribone, M. E., Marcipar, I. S., Lagier, C. M. Ensamblado de un bioelectrodo económico para la detección de glicerol en medios altamente complejos. 6° Congreso Argentino de Química Analítica, Santa Fe, Septiembre de 2011.

5- Faccendini, P. L., Costa, J. G., Ribone, M. E., Marcipar, I. S., Lagier, C. M. Desarrollo y optimización de un método para la cuantificación de glicerol en matrices complejas. 6° Congreso Argentino de Química Analítica, Santa Fe, Septiembre de 2011.

6- Costa, J. G., Perotti, J., Faccendini, P. L., Lagier, C. M., Mancipar, I. S. Optimization of the acute toxoplasmosis immunodiagnostic during the pregnancy. Workshop Fronteras en Biociencias, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Embajada Alemana. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Abril de 2012.

7- Costa, J. G., Perotti, J., Faccendini, P. L., Dure; A., Carral, L., Kaufer, F., Lagier, C. M., Mancipar, I. S. Evaluación de diferentes regiones de las proteínas p22, p30 y p35 para diagnóstico de la fase aguda de la toxoplasmosis. XXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina Protozoología 2012. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Agosto de 2012.

8- Costa, J. G., Faccendini, P. L., Sferco, S. J., Lagier, C. M., Mancipar, I. S. Comparison of the ability to predict true linear B-cell epitopes by on-line available prediction programs. 3er congreso de la sociedad argentina de bioinformática y biología computacional. Paraná. Septiembre de 2012.

9- Faccendini, P. L., Costa, J. G., Ribone, M. E., Marcipar, I. S., Lagier, C. M. Desarrollo de un sistema electroquímico para evaluar infección toxoplásmica. 7° Congreso Argentino de Química Analítica, Mendoza, Octubre de 2013.

Abreviaturas y Símbolos

AD: Aglutinación Directa

ADN: Ácido desoxiribonucleico

Ac(s): Anticuerpo(s)

Ang(s): Antígeno(s)

D: Coeficiente de difusión

DHA: 1,3 dihidroxiacetona

DMSO: Dimetil sulfóxido

DO: Densidad óptica

DT: Dye Test con azul de metileno (Reacción de Sabín Feldman)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima)

F: Constante de Faraday

f: Frecuencia

GIDH: Glicerol deshidrogenasa

HAI: Hemoaglutinación indirecta

HEPES: Ácido 4-(2-hydroxietil)-1-piperazina etano sulfónico

HRP: Horse radish peroxidase (Peroxidasa de rábano picante)

I: Corriente eléctrica

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IgA: Inmunoglobulina A

IgG: Inmunoglobulina G

IgE: Inmunoglobulina E

IgM: Inmunoglobulina M

IgM-IFI: Inmunofluorescencia indirecta de IgM (Prueba de Remington)

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

ISAGA: Ensayo aglutinante de inmunoadsorción

LB: Medio Luria-Bertani

LC: Límite de cuantificación

LD: Límite de detección

MWCNT: Multi-walled carbón nanotubes (Nanotubos de carbono de paredes múltiples)

N: número de moles de especie reducida u oxidada

OMS: Organización Mundial de la Salud

P35: Antígeno de superficie de *T. gondii* de 35 kDa de peso

PBS: Phosphate buffer salin (Solución tampón fosfato salino)

PCR: Polimerasa chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

pET32a: Vector plasmídico

Q: Carga eléctrica circulante

SAG1: Surface antigen 1 (Antígeno de superficie 1 o antígeno P30 de *T. gondii*)

SAG2: Surface antigen 2 (Antígeno de superficie 2 o antígeno P22 de *T. gondii*)

SDS: Dodecil sulfato de sodio

TB: Tuberculosis

TRX: Tioredoxina

VBL: Voltametría de barrido lineal

VC: Voltametría cíclica

VPD: Voltametría de pulso diferencial

Introducción

2 Introducción

2.1 Toxoplasmosis

2.1.1 Generalidades

La toxoplasmosis es una enfermedad causada por el parásito protozoario *Toxoplasma gondii*, que infecta animales herbívoros, carnívoros y omnívoros dentro de los cuales se encuentra el hombre. Está ampliamente extendida por todo el mundo y su incidencia y prevalencia varían mucho según las zonas geográficas, los hábitos alimentarios, el tipo de trabajo, la higiene ambiental y la presencia o no de gatos infectados (Atias, 1998; Martín-Hernández, 2004). Es una zoonosis que afecta a los humanos a través de formas infectivas producidas durante el ciclo biológico que se desarrolla únicamente en gatos y otros félidos. Dependiendo de la localización geográfica, entre 15 y 85 % de la población adulta mundial presenta infección crónica (Fuentes y col., 2001).

Usualmente, la principal vía de transmisión de esta parasitosis es la oral, por ingestión de carnes crudas, o poco cocidas, contaminadas con quistes, o por la ingestión de ooquistes presentes en agua o alimentos contaminados con heces de gato. Son menos frecuentes las vías de transmisión parenteral, respiratorias, mucosal (conjuntival), cutánea y por transfusión de sangre o trasplante de órganos. La transmisión por vía transplacentaria puede ocurrir cuando la embarazada padece la primoinfección durante el curso del embarazo, aunque se han descrito casos raros de infección congénita por toxoplasmosis materna anterior al embarazo (Martín-Hernández, 2004, Centers of Diseases Control and Prevention (CDC), página web a).

Durante la infección pueden distinguirse dos etapas: **A) Aguda:** Al breve tiempo de ingerir ooquistes esporulados, éstos se transforman en taquizoítos, ingresan a la célula del huésped y comienzan a dividirse en forma asexual hasta que la célula se lisa, liberando así la progenie y ocasionando la parasitemia. Posteriormente, el taquizoíto evoluciona a bradizoíto, cuya multiplicación es lenta. Se produce la invasión de los órganos por vía linfática o hemática, siendo los órganos más comprometidos los músculos esquelético y cardíaco, así como cerebro y ojos **B) Crónica:** En la medida que evoluciona la defensa del huésped, desaparecen los parásitos extracelulares, limitándose la división intracelular y quedando las formas resistentes principalmente en el sistema nervioso central y músculo esquelético. Por lo general, esta etapa es latente pero puede

activarse por la ruptura de los quistes tisulares (Fuentes y col., 2001, Trabattoni y col., 2008).

2.1.2 *Toxoplasma gondii*

El *Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular obligado. Su ubicación taxonómica se detalla en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Ubicación taxonómica del *T. gondii*.

Reino	Protista
Sub-reino	Protozoa
Phylum	Apicomplexa
Clase	Sporozoea
Sub-clase	Coccidea
Orden	Eucoccidiia
Sub-orden	Eimeriina
Familia	Sarcocystidae
Sub-familia	Toxoplasmatinae
Género	Toxoplasma
Especie	<i>gondii</i>

Durante el ciclo de vida del *T. gondii* se distinguen tres formas: **a)** los taquizoítos, **b)** los bradizoítos (o quistes tisulares) y **c)** los ooquistes. Los taquizoítos (o trofozoítos) son la forma proliferativa y de reproducción rápida dentro de la célula del huésped durante la fase aguda que, posteriormente, deviene en la formación de un pseudoquiste. Tiene forma de medialuna y mide de 4 a 7 μm de ancho. Está recubierto por un sistema de membranas, constituido por una membrana doble interna y una externa interrumpida en dos puntos. El taquizoíto es afectado por anticuerpos (Acs) específicos y fármacos, y se destruye en condiciones ambientales adversas, como congelamiento-descongelamiento, desecación y bajo pH (por ejemplo el de los jugos gástricos). Los quistes tisulares son redondeados, de pared elástica, miden de 10 a 200 μm y pueden contener hasta 3000 parásitos denominados bradizoítos. Estas formas no son afectadas por Acs ni fármacos, pero pueden ser destruidos por calentamiento, congelamiento-descongelamiento y por desecación. Cuando estos quistes son ingeridos, los bradizoítos resistentes son liberados por la acción gástrica y pueden invadir la mucosa gastrointestinal. Los ooquistes son estructuras ovoides de 10 a 12 μm de diámetro y son eliminadas en la materia fecal del gato. Recién emitidos no son infectivos, pero bajo condiciones de temperatura, humedad y presencia de oxígeno esporulan, tornándose

infectivos y resistentes por más de un año en el suelo y dos años en el agua (Atias, 1998, Perotti, 2007).

La Fig. 2.1 describe el ciclo de vida del parásito. Los únicos huéspedes definitivos conocidos de *T. gondii* son miembros de la familia Felidae (por ejemplo, gatos domésticos). Los ooquistes no esporulados son liberados en las heces del felino. Los ooquistes tardan entre 1 y 5 días en esporular en el ambiente y volverse infectivos. Los huéspedes intermediarios se infectan al ingerir tierra, agua o plantas contaminadas con los ooquistes. Los ooquistes se transforman en taquizoítos al breve tiempo de ser ingeridos. Estos taquizoítos se localizan en los tejidos musculares y el sistema nervioso y evolucionan a bradizoítos formando los quistes tisulares (hísticos). Los felinos se infectan luego de ingerir la carne de huéspedes intermediarios que poseen quistes tisulares o por ingestión de los ooquistes esporulados. Los animales de caza y los criados para consumo humano también pueden infectarse por ingestión de ooquistes esporulados. En el huésped humano, los parásitos forman quistes en los tejidos y suele encontrarse generalmente en el músculo esquelético, el miocardio, cerebro y ojos, donde pueden permanecer durante toda la vida del huésped (Página web del CDC).

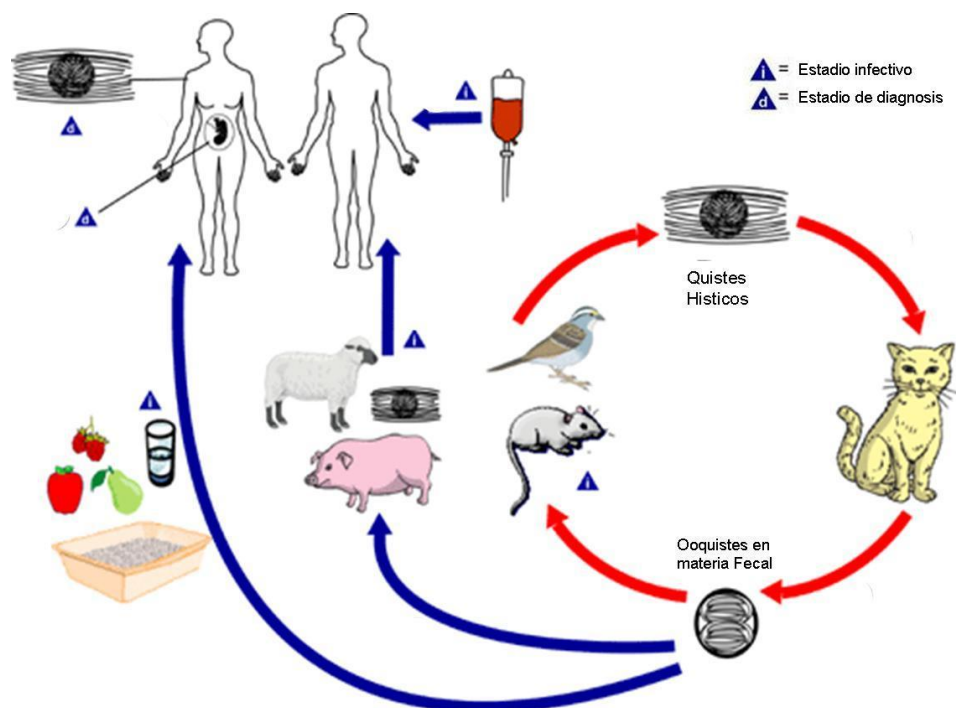


Figura 2.1. Ciclo de vida de *T. gondii*. El huésped definitivo son miembros de la familia Felidae, los demás huéspedes (incluido el hombre) se infectan accidentalmente y no son necesarios para completar el ciclo de vida del parásito. Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Toxoplasmosis.htm>

2.1.3 Diagnóstico

Puesto que las infecciones por *T. gondii* en individuos inmunocompetentes son, por lo general, asintomáticas o presentan síntomas imperceptibles, su diagnóstico se basa principalmente en pruebas de laboratorio. La toxoplasmosis no suele generar complicaciones, excepto en 2 situaciones, cuando se infectan individuos inmunodeprimidos y cuando se infectan por primera vez mujeres embarazadas. En este último caso, el parásito puede infectar al feto atravesando la placenta y generando la infección congénita. Las probabilidades de dañar al feto o al niño luego de nacer dependerán del trimestre en que suceda la infección (Atias, 1998; Martín-Hernández, 2005). Tanto en inmunocomprometidos como en el recién nacido, la infección puede producir graves consecuencias. Es por ello que en estos casos, así como en la embarazada, el diagnóstico cobra particular relevancia (Remington y col., 1995).

2.1.3.1 Métodos de diagnóstico

La infección puede diagnosticarse por métodos directos que consisten en la identificación de las estructuras parasitarias (por un estudio histopatológico, para lo cual es necesario realizar biopsias, punción de ganglios o cortes histológicos) o la identificación de ADN del parásito (a través de una reacción en cadena de la polimerasa, PCR). También se pueden realizar cultivos tisulares e inoculación al peritoneo de ratón, pero este método presenta la desventaja de involucrar el manejo de parásitos vivos y el uso de animales de laboratorio (Perotti, 2007).

Los métodos alternativos son las pruebas indirectas, a saber:

Intradermoreacción de Frenkel. Evalúa la inmunidad celular. Es una reacción cualitativa tardía y presenta resultado positivo a partir de la cuarta semana de infección, aunque se han reportado casos de pacientes en los que llevó varios meses hasta dar positiva. Se utiliza con fines epidemiológicos (Jirovec & Jindrich, 1961, Rodríguez Acar y col., 2008).

Reacción de Sabín Feldman o dye test con azul de metileno (DT). Es el método de referencia de la OMS. Evalúa la inmunidad humoral y mide la cantidad total de Acs que es capaz de destruir taquizoítos vía activación del complemento. Es un método cuantitativo y presenta valores positivos a partir de la primera o segunda semana de infección. Tiene la desventaja de requerir taquizoítos vivos y animales para su cultivo, por lo que sólo laboratorios de referencia llevan adelante este método (Perotti, 2007, Durlach y col., 2008).

Reacción de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Evalúa la cantidad de Acs que se unen a toxoplasmas inactivados. La reacción se evidencia con Acs anti-IgG humana, marcados con isocianato de fluoresceína y observando al microscopio de fluorescencia. Si bien no se trabaja con organismos vivos, la necesidad de un microscopio de fluorescencia y la subjetividad del operador limitan el uso de este método. Se han informado resultados falso-positivos debidos a Acs anti-nucleares (Durlach y col., 2008).

Aglutinación directa (AD). En este ensayo se produce una aglutinación visible con toxoplasmas tratados con formol. Se detecta fundamentalmente IgMs específicas.

Hemoaglutinación indirecta (HAI). Se utilizan antígenos (Angs) de *T. gondii* con los que se sensibiliza glóbulos rojos, que en presencia de Acs específicos producen una aglutinación visible como un botón rojo. En general, es utilizado para determinar incidencia o seroprevalencia en una región pero no se recomienda para la detección de la infección aguda (Durlach y col., 2008).

Fijación del complemento. Se detectan Acs que activan el sistema del complemento en presencia de Angs de *T. gondii*. La reacción se evidencia con el sistema hemolítico hemolisina-glóbulos rojos de carnero. Resultados positivos aparecen en forma más tardía que en el **DT** (Perotti, 2007).

Western blot. Se evalúa la presencia de Acs específicos a Angs que han sido separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida y transferidos a una membrana. Generalmente, no es utilizada como técnica de diagnóstico, debido a su difícil estandarización (Durlach y col., 2008).

Prueba de Remington (IgM-IFI). Se sigue el mismo esquema que en **IFI** pero se sustituyen el conjugado anti-IgG por uno anti-IgM, lo que permite detectar infección aguda. Acs anti-nucleares y el factor reumatoide pueden producir resultados falso-positivos y los Acs tipo IgG pueden producir resultados falso-negativos (Perotti, 2007).

Ensayo aglutinante de inmunoabsorción (ISAGA). Permite la detección y dosaje de Acs IgA, IgE, IgG e IgM específicos contra el parásito. Este método posee mayor sensibilidad en relación al **IgM-IFI** y al **ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) de IgM** para la detección de infecciones congénitas, pero tiene la desventaja que pueden detectarse IgM específicas luego de un año de la primoinfección. Esto dificulta la interpretación de un resultado positivo, si se desea determinar la antigüedad de la infección (Durlach y col., 2008).

Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA). Permite la detección de Acs específicos contra el parásito. Se evidencia la reacción con una enzima ligada a Acs o Angs (dependiendo del diseño del inmunoensayo, ver más adelante en punto 2.1.3.4) que transforma un reactivo auxiliar en un producto coloreado o fluorescente. Es un método cuantitativo que utiliza un espectrofotómetro o fluorómetro, lo que permite hacer medidas más objetivas y rápidas (Perotti, 2007). Aún así, este método aplicado a la detección de la toxoplasmosis de fase aguda carece de una estandarización confiable, principalmente en la preparación del Ang.

2.1.3.2 Importancia del correcto diagnóstico en la embarazada

A pesar de toda la batería de ensayos arriba descritos disponibles para el diagnóstico de la toxoplasmosis, el de la infección aguda en la mujer embarazada sigue siendo problemático, porque este diagnóstico se deduce a partir de los datos de las concentraciones relativas de los distintos isotipos de las inmunoglobulinas específicas. En efecto, la existencia y concentración de IgM, IgA e IgG específicas contra *T. gondii* es muy dependiente de la respuesta inmune del individuo infectado. Considerando que el tratamiento para prevenir la transmisión al feto consiste en administrar drogas antiparasitarias que tienen efectos nocivos sobre el nonato, aún en estos días se trabaja en mejorar este diagnóstico, ya que no se cuenta con un método confiable como para prevenir, por un lado los daños que suelen sufrir los recién nacidos de madres con primoinfección no diagnosticada y, por otra parte, los efectos perjudiciales en los fetos de las embarazadas incorrectamente diagnosticadas y medicadas. Por ello, es que en este trabajo se intentó desarrollar nuevas metodologías de diagnóstico de la infección toxoplásmica aguda utilizando técnicas electroquímicas.

2.1.3.3 Diagnóstico en la embarazada

El correcto diagnóstico de la infección aguda en la embarazada incluye la utilización de técnicas específicas y sensibles, así como también la aplicación de un esquema de seguimiento adecuado. El diagnóstico generalmente es realizado por serología. Para determinar si la paciente cursa una infección aguda, se determinan los títulos de los anticuerpos IgG, IgA e IgM (Arcavi y col., 1997) y se interpretan *prima-facie* según:

- 1 IgG, IgA, IgM negativas: ausencia de infección.
- 2 IgG e IgA positivas IgM: negativa infección crónica
- 3 IgG, IgA e IgM positivas: posible infección aguda.

2.1.3.4 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima

Los ensayos del tipo ELISA, consisten en la detección de un antígeno o un anticuerpo, inmovilizado sobre un soporte sólido y mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción. La prueba recurre al empleo de antígenos o anticuerpos conjugados a una enzima (marcados) que, por reacción con su sustrato, producen una especie coloreada cuya concentración puede ser medida fotométricamente. Este ensayo tiene las ventajas de ser versátil, robusto, simple en su realización y emplear reactivos relativamente económicos. El uso de una fase sólida que retiene el analito de interés proporciona una elevada sensibilidad, mientras que la elevada especificidad del ensayo viene dada por la gran selectividad de los anticuerpos por su antígeno. Las configuraciones más sencillas para estos ensayos son el directo y el indirecto, ambas esquematizadas en la Fig. 2.2.

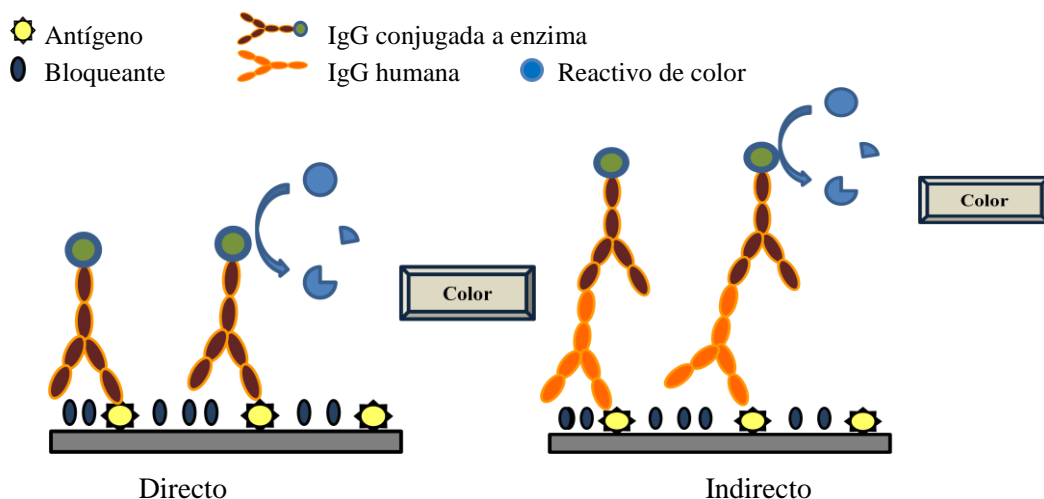


Figura 2.2. Esquemas que representan los ELISA directo (izquierda) e indirecto (derecha).

2.1.3.4.1 Esquema de captura o tipo “Sandwich”

Cuando los anticuerpos que desean detectarse son del isotipo IgM, suele tenerse el inconveniente que el isotipo IgG frecuentemente está en mayor concentración que el IgM y presenta una mayor afinidad por el antígeno. Por lo tanto, las IgG suelen dificultar la detección de las IgM en suero, cuando se sigue un esquema de ELISA indirecto con anticuerpos anti-IgM humana (Ac-a-IgMh) marcados. Es por esto que suele optarse por un esquema de captura o tipo sándwich, en el cual se aumenta la sensibilidad del ensayo incorporando un eslabón más en el inmunocomplejo adsorbido.

En este trabajo se ensayaron dos alternativas de captura o tipo sándwich. En la primera alternativa que sigue un esquema clásico (A), se adsorbieron los Ac-a-IgMh

sobre la superficie de la placa de poliestireno. Las placas así sensibilizadas se enfrentaron al suero a ensayar, capturando selectivamente una porción de las IgM de la muestra. Luego, se los enfrentó al antígeno de interés ligado a biotina, que se une a las IgMh específicas para dicho Ang previamente capturado. Finalmente, se buscó revelar con enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada a streptavidina, esta última forma un complejo estable con biotina. De esta forma, se aumenta la cantidad de Ac que se desean detectar adsorbido sobre la placa, seleccionando el tipo de anticuerpo que se adsorbe. En la Fig. 2.3 se muestra el esquema del ensayo tipo A.

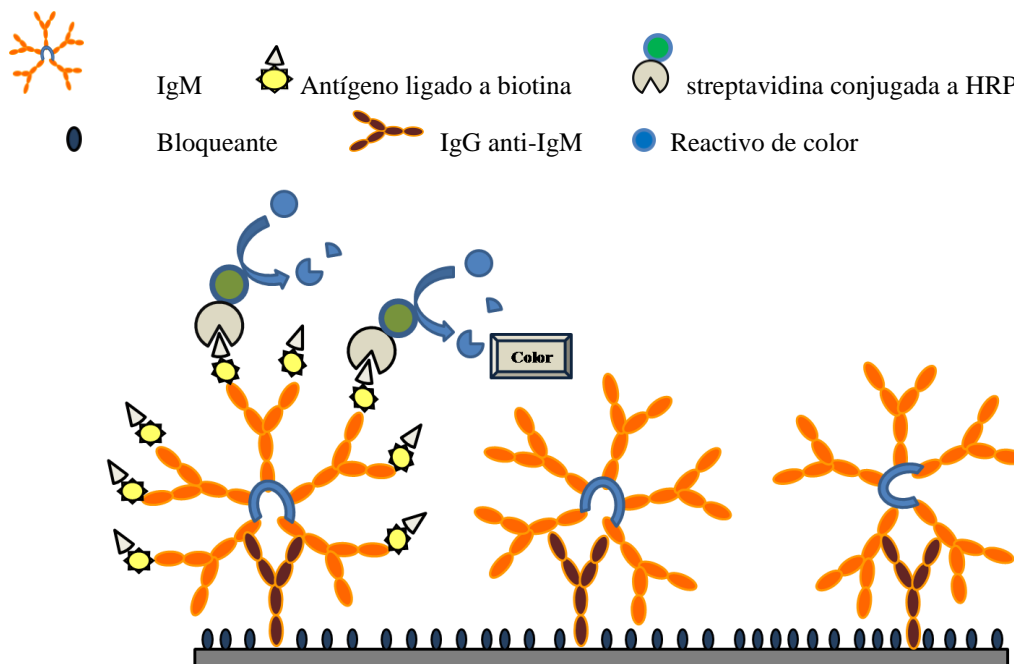


Figura 2.3. Esquema de ensayo ELISA tipo captura clásico, A. Un anticuerpo anti IgMh captura una porción de las IgM presentes en el suero humano, una porción de estas IgM capturadas son específicas para antígeno de *T. gondii* y se revela su presencia por medio del antígeno recombinante ligado a biotina, streptavidina ligada a HRP, adicionando el sustrato de la enzima y un cromógeno actuando como cosustrato.

La segunda alternativa, que denominamos tipo B, sale del esquema tradicional de los ELISA. Se adsorbe el antígeno recombinante sobre la superficie de la placa de poliestireno, enfrentándola luego al suero a ensayar. Así, se captura selectivamente las inmunoglobulinas que reconocen al antígeno. Luego, se expone la placa al mismo antígeno recombinante pero ligado a biotina, que se unirá a los anticuerpos específicos para dicho Ang, previamente capturados. Finalmente, se revela con HRP conjugada a streptavidina que forma un complejo estable con biotina. De esta forma, se aumenta la cantidad de Ang marcado en mayor proporción para IgM que para IgG, dada la

multivalencia de este isotipo de inmunoglobulina. En la Fig. 2.4 se muestra el segundo esquema, que fue el que brindó los resultados más promisorios.

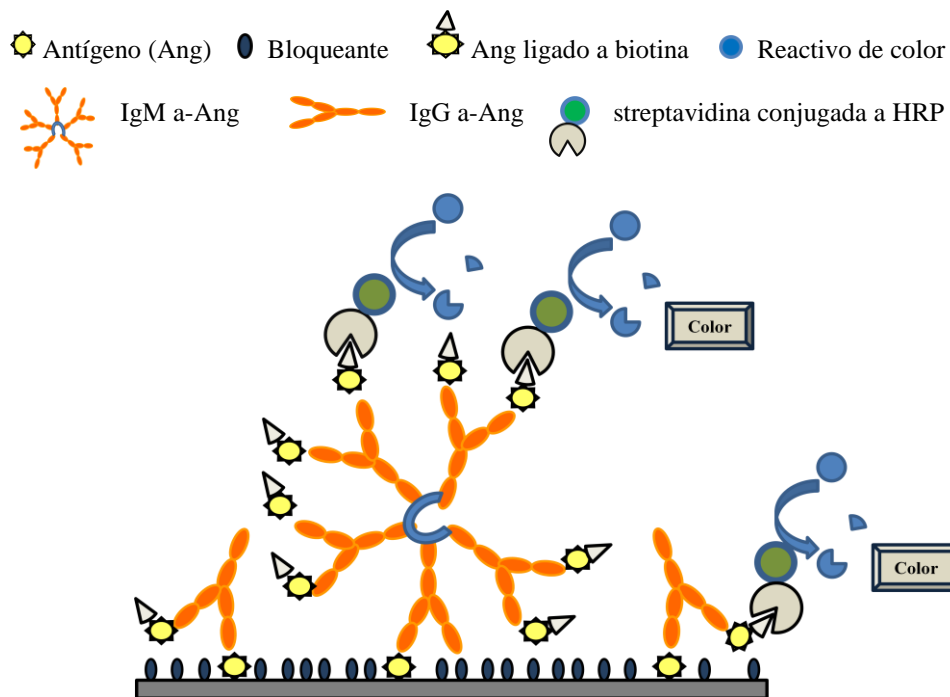


Figura 2.4. Esquema de ensayo ELISA de captura tipo B. El antígeno expuesto en la placa captura la porción de las IgM e IgG específicas presentes en el suero humano. Haciendo uso de la polivalencia de las IgM, su presencia se revela con el antígeno conjugado a biotina, streptavidina ligada a HRP, adicionando el sustrato de la enzima y un cromógeno actuando como cosustrato.

2.1.3.5 Obtención de antígenos para diagnóstico

El diagnóstico de rutina de la toxoplasmosis se basa en la detección serológica de anticuerpos en el paciente. Los antígenos utilizados en estas pruebas serológicas son generalmente proteínas derivadas de células *T. gondii* que se propagan en el ratón o el cultivo de células. El cultivo y el mantenimiento de este parásito es laborioso, lento y caro (Lau & Fong, 2006). El uso de antígenos nativos de taquizoitos es difícil de estandarizar y con frecuencia produce reacciones positivas falsas (Hiszczyńska-Sawicka y col., 2005). Por lo tanto, ha habido intentos de producir antígenos a través de medios más seguros, tales como tecnología de ADN recombinante. La mayoría de estos esfuerzos se han centrado en los principales antígenos de superficie del parásito como el antígeno de superficie 1 (SAG1, del inglés Surface antigen 1) y el antígeno de superficie 2 (SAG2, del inglés Surface antigen 2) (Lau & Fong, 2006). En estudios recientes, se ha estado evaluando que la presencia de IgM e IgG anti P35 sería un mejor indicador de infección reciente que la evaluación de IgM utilizando taquizoitos enteros en ensayos del tipo ELISA (Lu y col., 2006). En efecto, con la nueva tecnología de ADN

recombinante es posible obtener cualquier proteína, contándose además con ventajas como la posibilidad de seleccionar porciones específicas de un Ang para evitar reacciones inespecíficas, ligar distintas porciones que naturalmente corresponden a otras proteínas para aumentar la sensibilidad del ensayo, agregar secuencias aminoacídicas que faciliten la posterior purificación y estandarización de la proteína a utilizar (Hiszczyńska-Sawicka y col., 2005). A la postre, todo el proceso resulta más económico, seguro y confiable que la purificación de Angs a partir del microorganismo nativo, puesto que no requiere la manipulación de microorganismos patógenos, ya que la expresión de las proteínas recombinantes se lleva adelante en microorganismos no infectivos de rápido crecimiento (Babaie y col., 2013).

Por lo arriba expresado, debe seguirse un esquema para seleccionar cuales deben de ser las proteínas que conviene utilizar, acorde al diagnóstico que se pretende abordar y ello demanda un trabajo racional de selección de antígenos, generalmente inmunodominantes. No obstante, escoger tales proteínas no es tarea sencilla, por cuanto la verificación del grado de bondad del Ang seleccionado exige una ardua tarea experimental, siendo conveniente acotar el número de Angs alternativos a evaluar. Un modo de encarar esto es procurar predecir el grado de antigenicidad en base a la secuencia aminoacídica, lo cual puede realizarse computacionalmente.

2.1.4 Predicción de epítopes reconocidos por células B

Los programas de predicción definen el grado de antigenicidad por medio de una puntuación (score), en algunos casos para cada epítope y en otros para cada residuo amino acídico. En este último, se puede definir una región antigénica cuando varios residuos con alta puntuación son adyacentes en la estructura primaria. Por otra parte, el número de epítopes o regiones antigénicas que los programas de predicción encuentran depende de un umbral que es configurado por el usuario.

En la actualidad, los inmunoensayos para determinar anticuerpos son realizados utilizando regiones antigénicas definidas, ya sea como moléculas únicas, mezcla de varios componentes, o como antígenos de fusión multiepítope (Camussone, 2009). El desarrollo de herramientas informáticas para predecir de forma fiable la antigenicidad de los epítopes puede reducir el costoso y prolongado trabajo experimental, requerido para identificar las regiones de interés (Namrata & Rajat, 2010). Al momento de identificar estas regiones antigénicas, suele contarse sólo con la estructura primaria de las proteínas en estudio desconociéndose su estructura terciaria, en la mayoría de los

casos. De aquí que la predicción de epítopes lineales es el método más utilizado para seleccionar epítopes putativos.

Desde el informe inicial de Hopp y Woods en 1981 (Hopp & Woods, 1981), varios procedimientos se han hecho populares para detectar epítopes lineales reconocidos por células B, a partir de la estructura primaria de una proteína. El rendimiento de estos programas aún no ha logrado una eficiencia óptima, según lo declarado por sus propios autores (Kolaskar & Tongaonkar, 1990; Saha y col., 2005; Saha & Raghava, 2006; Larsen y col., 2006; Davydov & Tonevitskii, 2009).

La literatura sobre las aplicaciones de estos programas está orientada principalmente a identificar posibles vacunas (Namrata & Rajat, 2010). Por lo tanto, la **sensibilidad** (probabilidad de obtener un positivo entre los verdaderos positivos) y la **especificidad** (probabilidad de obtener un negativo entre aquellos negativos verdaderos) son los indicadores más utilizados para evaluar la calidad de estos programas, ya que un único epítope puede ser crucial para lograr una respuesta inmunoprotectora. Al mismo tiempo suele omitirse el **valor predictivo positivo** (VPP), que es la proporción de muestras que dan positivo el ensayo siendo verdaderos positivos, o sea es la capacidad para encontrar los epítopes reales de una proteína (ver el recuadro 1). Sin embargo, la fiabilidad del epítope predicho es más importante que su sensibilidad, para reducir el número de experimentos confirmatorios de su utilidad diagnóstica. Es entonces importante diferenciar ambos parámetros, ya que los programas de predicción pueden realizar predicciones de baja sensibilidad pero, al mismo tiempo, si los epítopes reales fueron predichos, la predicción presenta un alto VPP.

Recuadro 1

Los casos posibles en un ensayo son:

	Verdaderos positivos	Verdaderos negativos
Ensayo positivo	A	B
Ensayo negativo	C	D

$$\text{Sensibilidad} = \frac{A}{A + C}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{D}{B + D}$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{A}{A + B}$$

La falta de estudios comparativos entre los programas de predicción en la literatura actual impide que los usuarios hagan la mejor elección. Por ello, como trabajo inicial, se intentó evaluar los distintos programas disponibles en la red, en cuanto a su capacidad para predecir positivamente epítopes.

2.2 Tuberculosis

2.2.1 Generalidades

La tuberculosis (TB) humana es una enfermedad infecto-contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. La infección por *M. tuberculosis* suele ser asintomática en personas sanas, dado que su sistema inmune es capaz de controlar la bacteria. No obstante, en condiciones de desnutrición o inmunocompromiso, la enfermedad suele ser grave. La TB es una enfermedad vinculada a la pobreza, que puede afectar a adultos jóvenes en edad productiva.

La enfermedad se transmite por el aire de una persona a otra, a través de gotículas que portan bacterias. Cuando una persona con infección activa en pulmones o garganta tose, estornuda, habla o canta, las personas cercanas pueden respirar las bacterias liberadas e infectarse.

La enfermedad suele afectar los pulmones, pero también puede involucrar otros órganos como riñones, columna vertebral y cerebro. Los síntomas de la TB pulmonar activa son tos, a veces con esputo sanguinolento, dolor torácico, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna. Si no se trata adecuadamente, puede ser mortal. La mayoría de las muertes por TB se producen en los países en vías de desarrollo (Página web del CDC, b).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima en 2.000 millones a los infectados por *M. tuberculosis*, que anualmente hay 9 millones de nuevos infectados, y que mueren casi 2 millones de personas al año por causa de esta enfermedad (Página web de la OMS).

2.2.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Esta micobacteria, también conocida como Bacilo de Koch, es una bacteria ácido-alcohol resistente, frecuentemente incolora y es aeróbica estricta. Es muy resistente al frío, la congelación y la desecación y, por el contrario, es muy sensible al calor, la luz solar y la luz ultravioleta. Su replicación es muy lenta (una división cada 16 a 20 horas) y, ante circunstancias adversas, puede entrar en estado latente, pudiendo retrasar su multiplicación desde algunos días hasta varios años. El reservorio natural de *M. tuberculosis* es el hombre, tanto el individuo infectado asintomático como el enfermo con infección activa. Su clasificación taxonómica se detalla en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Ubicación taxonómica de *M. tuberculosis*.

Reino	Bacteria
Phylum	Actinobacteria
Clase	Actinobacteria
Sub-clase	Actinobacteridae
Orden	Actinomycetales
Sub-orden	Corynebacterineae
Familia	Mycobacteriaceae
Género	Mycobacterium
Especie	<i>tuberculosis</i>

2.2.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la infección tuberculosa se basa en una serie de estudios que se inicia con placas radiográficas pulmonares y la prueba de la tuberculina que pone de manifiesto un estado de hipersensibilidad del huésped frente a proteínas de *M. tuberculosis*. Esta sensibilidad se adquiere o bien por infección con el bacilo o por vacunación con cepas no infectivas (vacuna BCG). En una segunda etapa, la infección activa es confirmada por identificación del agente etiológico en cultivos obtenidos a partir de la muestra biológica remitida al laboratorio. Aún cuando la conjunción de los métodos de análisis vigentes permite un diagnóstico certero de la TB humana, es frecuente que se requiera de un prolongado tiempo de espera hasta la confirmación de la infección activa, por cuanto ello depende del lento proceso de replicación del bacilo. Esto conlleva que exista potencialidad de contagio a individuos sanos y se comprometa más la salud del infectado.

En los últimos años se han desarrollado técnicas de detección de *M. tuberculosis* que involucran al bacteriófago D29 (en adelante fago), capaz de infectar específicamente micobacterias (Park y col., 2003; Mc Nerney y col., 2004). Esta metodología se basa en procesar la muestra del paciente, sospechada de contener *M. tuberculosis*, ponerla en contacto con el fago, e incubarla para permitir su replicación. Finalmente, se evalúa el título de los fagos liberados, infectando un cultivo testigo de *M. smegmatis* (micobacterias de rápido crecimiento susceptibles al fago) y contando las placas de lisis que se obtienen. Esta novedosa metodología, si bien indirecta y preliminar, permite reducir considerablemente los tiempos de diagnóstico, puesto que se trabaja con especies de crecimiento rápido. Sin embargo, al utilizar el conteo de placas de lisis como eje central para el diagnóstico de infección activa, se recae en largos

períodos de incubaciones que podrían evitarse si se contase con otro método de evaluar la integridad celular de *M. smegmatis*.

Por lo arriba expuesto es que en este trabajo se intento desarrollar una nueva metodología de verificación de lisis de micobacterias utilizando técnicas intrínsecamente rápidas, como son las electroquímicas, que en un futuro, podrían facilitar el diagnóstico de infección tuberculosa.

2.3 Biodiesel

El grave impacto de la utilización de combustibles derivados del petróleo en el medio ambiente, la limitada disponibilidad de petróleo crudo, y sobre todo la inestabilidad de los mercados del petróleo han estimulado actualmente la propagación de combustibles líquidos alternativos (Monteiro y col., 2008). La organización American Society for Testing and Materials, ASTM, define biodiesel como una mezcla de "ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de aceites vegetales o grasas animales" (American Society for Testing and Materials, página web).

El biodiesel puro generalmente no se utiliza como combustible, sino que suele encontrarse en mezcla con diesel de petróleo. El biodiesel es clasificado utilizando la notación Bxx, donde xx indica el porcentaje en volumen de contenido de biodiesel en el líquido. Así, B100 es biodiesel puro, B50 contiene 50% en volumen de biodiesel, B5 contiene 5% en volumen, etc. Las mezclas comerciales más comunes son B2, B5 y B20.

El biodiesel se obtiene a partir de la transesterificación de glicerolípidos con alcoholes de cadena corta como el etanol o el metanol, siendo el glicerol el principal subproducto en la elaboración de este combustible, junto a productos menores como mono y diacil gliceroles o ácidos grasos libres. La masa de glicerol generada equivale aproximadamente al 10% en peso del total del combustible producido, siendo éste uno de los contaminantes frecuentes.

2.3.1 Determinación de glicerol libre en biodiesel

La presencia de glicerol es indicativa de la calidad del biodiesel, transformándose en un analito de interés para la creciente industria de energías alternativas a la derivada del refinamiento del petróleo.

Los métodos químicos más simples para cuantificar glicerol se basan en su oxidación a formaldehído utilizando peryodato. Luego, el formaldehído formado se determina cuantitativamente por diversos métodos, ya sea basados en reacciones específicas evaluando los productos por diferentes metodologías, o por titulación con NaOH valorado (Lapenaite y col., 2007).

La norma ASTM-D 6584 establece un método basado en cromatografía gaseosa que permite la determinación en simultáneo de glicerina libre y total (glicerol más mono, di y triglicéridos). No obstante, este procedimiento no es aplicable a los ésteres metílicos de aceites vegetales obtenidos a partir de aceites láuricos, tales como aceite de

coco o de palma, quedando restringido el método sólo para un grupo de biodiesels particulares.

En cuanto a los métodos cromatográficos, tienen la desventaja de ser poco amigables con el medio ambiente, dado el profuso uso de solventes orgánicos que son potencialmente contaminantes, a veces se tornan laboriosos y utilizan instrumental e insumos caros.

Considerando lo expresado arriba, en este trabajo se ha planteado cuantificar glicerol utilizando una metodología esencialmente económica, simple y no contaminante, como lo son las técnicas electroquímicas convencionales.

2.4 Marco teórico de las técnicas electroquímicas utilizadas

Los métodos electroquímicos de análisis estudian el analito de interés mediante la medición de los parámetros físicos como potencial eléctrico y/o corriente, en una celda electroquímica. El proceso fundamental en las técnicas electroquímicas es la transferencia de electrones entre especies redox y la superficie del electrodo (Bard & Faulkner, 2001). Este puede describirse con la siguiente reacción:



Para reacciones reversibles y rápidas el potencial sigue la ley de Nernst:

$$E = E^\circ - \frac{0,059}{n} \log \left[\frac{a_{R0}}{a_{O0}} \right] \quad [2.2]$$

siendo a_{R0} y a_{O0} , las actividades de las especies reducida y oxidada en la interfaz electrodo/solución, respectivamente.

La corriente que circula por la celda es la carga transportada por unidad de tiempo y puede expresarse como:

$$I = \frac{\delta Q}{\delta t} \quad [2.3]$$

De acuerdo a las leyes de Faraday, la carga circulante (Q) es proporcional a los moles de especie reducida u oxidada (N). El factor de proporcionalidad es la carga del electrón (n) por la constante de Faraday (F)

$$Q = n F N \quad [2.4]$$

Combinando las Ecs. 2.3 y 2.4 obtenemos:

$$I = nF \left(\frac{\delta N}{\delta t} \right) \quad [2.5]$$

A medida que avanza la reacción, se consume la especie electroactiva; esto produce un gradiente de concentración entre el seno de la solución y las inmediaciones del electrodo donde la especie es electrotransformada y, consecuentemente, asociado se

generará un transporte de masa por difusión. Si el proceso está bajo control difusional, la primera ley de Fick permite describir el flujo de partículas en función de la posición ec. 2.6 y la segunda ley de Fick lo describe en función de la variación de la concentración de la especie electroactiva en función del tiempo ec. 2.7

$$J = -D \left(\frac{\delta C}{\delta x} \right) \quad [2.6]$$

$$\left(\frac{\delta C}{\delta t} \right) = D \left(\frac{\delta^2 C}{\delta x^2} \right) \quad [2.7]$$

donde D es el coeficiente de difusión de la especie en estudio. El gradiente de concentración se generará sólo para la especie electroactiva que se transforma en la superficie del electrodo y su transporte de masa se verificará en dirección $-x$, es decir hacia el electrodo si se define $x = 0$ en la superficie. Luego, considerando la reacción de reducción ec. 2.1, el flujo J corresponderá al número de partículas de O que cambian de posición en dirección $-x$ con el tiempo, por unidad de área y puede expresarse como:

$$J = -\frac{\delta N}{\delta x} \quad [2.8]$$

Combinando las ecs. 2.6, 2.7 y 2.8 obtenemos la expresión combinada de las leyes de Fick para una especie que está reaccionando sobre un electrodo de área A:

$$J = -\frac{\delta N}{\delta t} = -DA \left(\frac{\delta C}{\delta x} \right) \quad [2.9]$$

o directamente:

$$\frac{\delta N}{\delta t} = DA \left(\frac{\delta C}{\delta x} \right) \quad [2.10]$$

Reemplazando en la ec. 2.5, obtenemos una expresión para la corriente (I) que circula por la celda en la que se lleva a cabo la reacción ec. 2.1 sobre un electrodo uniformemente accesible, de área A, y cuando el transporte de masa es exclusivamente controlado por difusión:

$$I = nFDA \left(\frac{\delta C}{\delta x} \right) \quad [2.11]$$

expresión que indica que la corriente es directamente proporcional al gradiente de concentración generado por efecto de la reacción electródica.

Para un sistema en estado estacionario, en el cual la velocidad de transformación de la especie electroactiva es igual a la de transferencia de masa y suponiendo que la reacción cumple las condiciones de rapidez y reversibilidad (Ec. de Nernst) podemos llegar a describir la relación entre la corriente circulante por la celda y el potencial al cual se lleva adelante la reacción por:

$$E = E^\circ - \frac{0,059}{n} \log \left[\frac{K_R}{K_O} \right] - 0,059 \log \left(\frac{I_1 - I}{I} \right) \quad [2.12]$$

donde K_R y K_O son constantes que dependen del área del electrodo de trabajo y los coeficientes de difusión de las especies reducida y oxidada respectivamente, e I_1 es la corriente límite.

Se define como potencial de media onda al potencial al cual el valor de corriente es la mitad del valor de corriente límite, y queda expresado por la siguiente ecuación:

$$E_{1/2} = E^\circ - \frac{0,059}{n} \log \left[\frac{K_R}{K_O} \right] \quad [2.13]$$

Tomando esta definición y operando en la ec. 2.12 se arriba a la expresión que describe la corriente como función del potencial de electrodo:

$$I = \frac{I_1}{1 + 10^{\left(\frac{n}{0,059}\right)(E_{1/2} - E)}} \quad [2.14]$$

ecuación que corresponde a una función sigmoidea, por lo tanto, al realizar un barrido de potencial, desde un potencial al cual no existe reacción electródica hacia un potencial al cual es posible reducir la especie electroactiva hasta alcanzar el estado estacionario, la corriente variará con el potencial siguiendo la forma de una curva sigmoidea.

Durante la ejecución del presente trabajo se utilizaron diversas técnicas voltamperométricas: cronoamperometría, voltametría de barrido lineal, voltametría cíclica y voltametría de onda cuadrada. Se pasa a comentar brevemente cada una de ellas:

2.4.1 Cronoamperometría

En esta técnica se estudia como varía la corriente que circula por la celda en función del tiempo transcurrido, mientras el electrodo de trabajo es sometido a un

determinado potencial. Al aplicar un pulso de potencial, se modifica el equilibrio de la reacción redox ec. 2.1, se pasa de un potencial inicial donde no ocurre reacción electroquímica, a un potencial donde las especies pueden intercambiar electrones en la interfaz electrodo/solución, favoreciendo la reacción en uno u otro sentido, dependiendo del potencial aplicado. Esto da lugar a una corriente límite difusional que varía en función del tiempo. Para un electrodo uniformemente accesible, esta corriente está descrita por la ec. 2.11. Fijando las condiciones de contorno correspondientes al experimento en cuestión:

$$\begin{aligned} \cdot t = 0; & \quad C_0 = C_\infty && \text{(no hay reacción en el electrodo)} \\ \cdot t \geq 0; & \quad \lim C = C_\infty \\ \cdot t \geq 0; & \quad C_0 = 0 \end{aligned}$$

donde C_0 y C_∞ son las concentraciones de la especie electroactiva en la interfaz electrodo/solución y en el seno de la solución, respectivamente. Es posible entonces resolver la ecuación diferencial de la segunda ley de Fick, donde la solución viene dada por la denominada ecuación de Cottrell:

$$I(t) = Id(t) = \frac{nFAD^{1/2}C_\infty}{(\pi t)^{1/2}} \quad [2.15]$$

donde $Id(t)$ es la corriente controlada por difusión.

En este trabajo se utilizó esta técnica porque permite cuantificar glicerol utilizando diferentes electrodos de trabajo, según el medio específico donde se encuentre disuelto.

2.4.2 Técnicas voltamétricas

Todas las técnicas voltamétricas tienen en común que el potencial eléctrico al que se somete el electrodo de trabajo varía en función del tiempo. En todos los casos se realiza un barrido lineal de potencial que va desde el potencial inicial (E_i) hasta un potencial final (E_f). Este barrido se realiza a una velocidad constante que es el cociente entre el salto (discreto) de potencial y el tiempo de duración de ese salto. La forma en que se realiza el barrido de potencial es lo que diferencia a una técnica voltamétrica de otra.

2.4.2.1 Voltametría de barrido lineal

En esta técnica se realiza un barrido desde un potencial inicial (E_i) al cual no existe proceso de transferencia de electrones en la interfaz electrodo/solución, y sólo podrá apreciarse corriente debida a procesos no farádicos, hasta un potencial final (E_f). En la medida que el potencial aumenta, alcanza un valor al cual ocurre la reacción electródica, comenzando un flujo de carga debido a procesos farádicos. En la Fig. 2.5 se muestra el perfil del potencial en función del tiempo utilizando el modo normal (en peldaños), para el caso de los experimentos realizados con el instrumento utilizado en el presente trabajo (Eco Chemie, 2000).

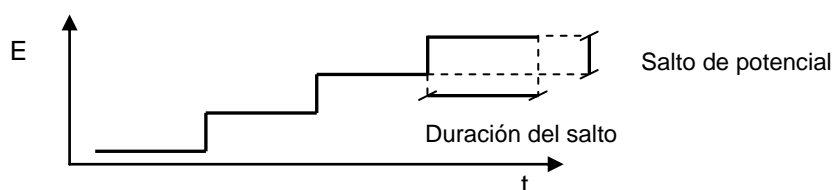


Figura 2.5. Perfil de potencial en función del tiempo. Si bien el potencial es una variable continua un potencióstato real solo puede establecer variaciones discretas de potencial, de aquí que en lugar de observar una “rampa” se observe una escalera.

Para una reacción de reducción reversible ec. 2.1, a medida que el potencial aumenta, se incrementará la corriente siguiendo la forma de una sigmoidea (según la ec. 2.1). Sin embargo, cuando la velocidad de transporte de masa por difusión de la especie O sea menor que la velocidad de consumo por la reacción electródica, no será posible alcanzar el estado estacionario y la corriente llegará a un máximo I_p . De aquí en más, la corriente comenzará a decaer con $t^{1/2}$, tal como lo describe la ecuación de Cottrell, ec. 2.15. En la Fig. 2.6 se muestra el perfil de corriente que se obtienen en experimentos voltamétricos clásicos.

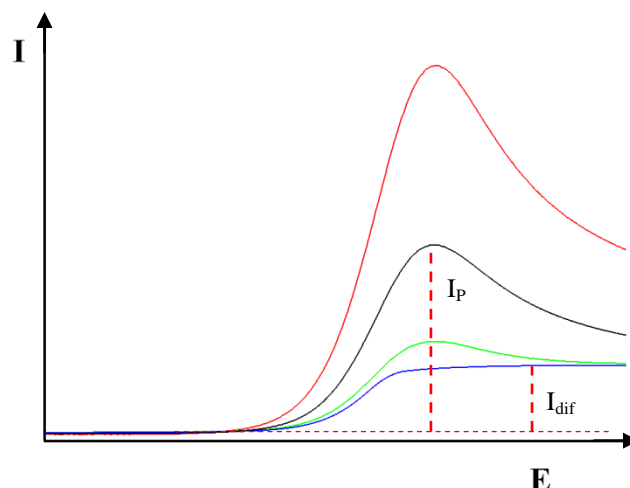


Figura 2.6. Perfiles de corriente en función del potencial para experimentos voltamétricos de barrido lineal. Línea azul: la velocidad de barrido es lo suficientemente baja, estableciéndose un estado estacionario. Líneas verde, negra y roja: la velocidad de barrido es alta y se origina un pico de corriente. La corriente de pico crece proporcionalmente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

El máximo de corriente, también denominado corriente de pico, se puede obtener a partir de la ecuación de Randles-Sevcik (Bard & Faulkner, 2001).

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C_\infty \quad [2.16]$$

siendo la temperatura 25 °C y donde A está en cm^2 , D en $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, C_∞ en mol cm^{-3} y v en V s^{-1} .

2.4.2.2 Voltametría cíclica

En esta técnica se realiza un barrido desde un potencial inicial (E_i) a un primer vértice de potencial (E_{v1}) y, a partir de allí, se invierte la dirección de barrido hasta llegar a un segundo vértice de potencial (E_{v2}) el cual puede coincidir con el E_i . El perfil de potencial en función del tiempo que se obtiene, utilizando el instrumento con el que se trabajó y de acuerdo a lo indicado por el fabricante, se esquematiza en la Fig. 2.7 (izquierda) y el perfil de corriente en función del potencial para una reacción reversible se esquematiza en la Fig 2.7 (derecha).

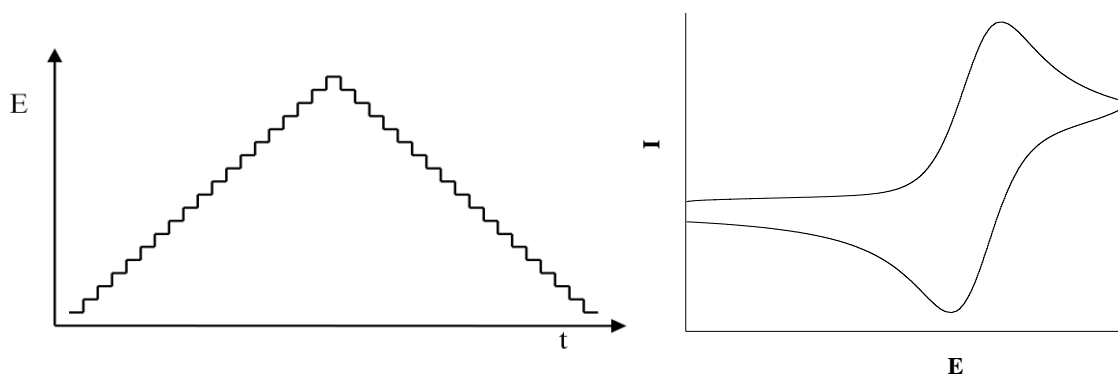


Fig 2.7. Perfil de potencial en función del tiempo (izquierda). Perfil de corriente en función del potencial para una reacción redox reversible (derecha).

En este trabajo se realizaron experimentos de voltametría cíclica para identificar la presencia de mediadores redox que, presentando reacciones electroquímicas reversibles, permitieran la regeneración del cofactor de la enzima glicerol deshidrogenasa (GIDH). Esta técnica también se utilizó para calcular las áreas de los electrodos de trabajo, de modo tal de normalizar la señal obtenida con la superficie del electrodo utilizado. Además, se utilizó para cuantificar glicerol e identificar los potenciales de oxidación del mismo.

2.4.3 Técnicas de pulso

Las técnicas de pulso surgieron vinculadas a la polarografía de corriente continua, la técnica voltamétrica cuya particularidad es utilizar un electrodo de goteo de mercurio. Este grupo de técnicas se ha ido diversificando a medida que se fueron haciendo más complejos, tanto los esquemas de potenciales aplicados a los electrodos de trabajo, como las medidas de intensidades de corrientes (Bard & Faulkner 2001).

2.4.3.1 Voltamperometría onda cuadrada, VOC

Esta técnica tiene varias ventajas, entre las que se encuentran su excelente sensibilidad (se han registrado límites de detección directa del orden de 10^{-8} M), la eliminación de las corrientes de fondo y la rapidez con que se lleva a cabo el experimento completo, ya que se puede trabajar a velocidades de barrido de potencial aún superiores a 1 V s^{-1} (Bard & Faulkner 2001).

El perfil de potencial aplicado al electrodo de trabajo en función del tiempo en la VOC se presenta en la Fig. 2.8. Consta de una onda cuadrada simétrica con una amplitud ΔE_p superpuesta a una escalera de potencial con escalones, o saltos de potencial ΔE_s (Fig.2.9), donde el pulso hacia adelante de la onda cuadrada coincide con el escalón de potencial de la escalera.

La utilización de las técnicas voltamperométricas de pulso presentan la ventaja de permitir realizar un barrido de potencial donde la especie electroactiva se oxida rápidamente produciendo una señal analítica. No es necesario trabajar durante períodos prolongados de tiempo a los elevados potenciales donde se establece la corriente límite controlada por difusión como lo requiere la técnica amperométrica.

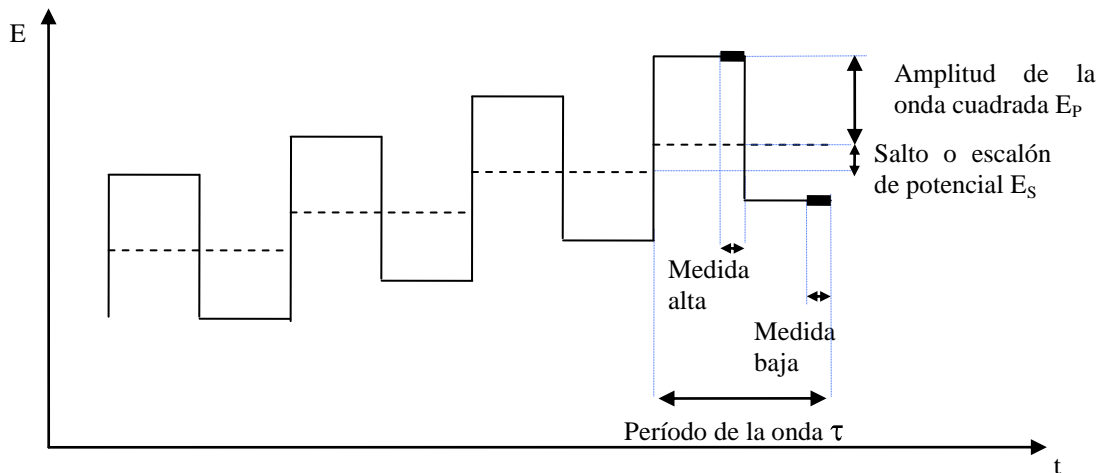


Figura 2.8. Perfil de potencial aplicado al electrodo de trabajo en la VOC, en función del tiempo. En línea cortada se indica cual es la escalera de potencial a la cual se le sobreimprime la onda cuadrada. Se indican resaltados (■) los tiempos durante los que se realizan las lecturas de corriente. En un ciclo se realizan las lecturas de corrientes alta y baja. Adaptado de Bard & Faulkner 2001

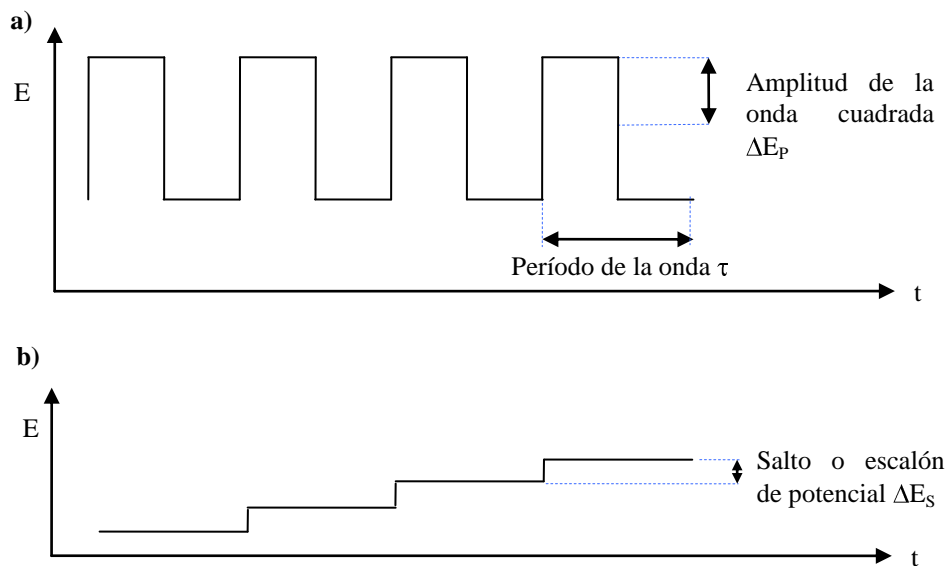


Figura 2.9. a) Onda cuadrada simétrica. b) Perfil de potencial en función del tiempo de una escalera de potencial.

El potenciostato registra la corriente durante la medida alta y la medida baja de un ciclo. La diferencia de estas corrientes es la corriente neta, I_{neta} , que se grafica en función del potencial de la escalera de potencial correspondiente a ese ciclo (línea cortada Fig. 2.8). Para sistemas reversibles, se obtiene una curva como se observa en la Fig. 2.10, donde se indican las corrientes de la medida alta, de la medida baja y neta, que resulta en un pico de corriente. La corriente de pico neta, $I_{p, n}$, observada en la VOC es proporcional a la concentración de la especie electroactiva en el seno de la solución y se centra alrededor del potencial de la cupla redox.

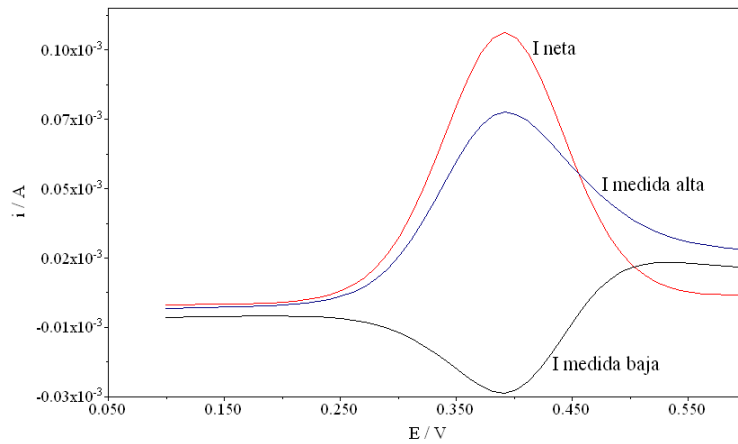


Figura 2.10. Voltamperograma de onda cuadrada típico para un sistema reversible, la corriente neta, I_{neta} , se obtiene por la diferencia entre la corriente registrada al finalizar el pulso, I medida alta, y la corriente registrada previamente al nuevo pulso, I medida baja.

La frecuencia (f) de la onda cuadrada, medida en Hz, se define como:

$$f = \frac{1}{\tau} \quad [2.17]$$

Siendo τ el período de la onda cuadrada medido en segundos que, a su vez, es dos veces el tiempo del pulso, t_p , por lo tanto tenemos que:

$$f = \frac{1}{2t_p} \quad [2.18]$$

Luego,

$$t_p = \frac{1}{2f} \quad [2.19]$$

Los valores de frecuencia pueden variar desde unos pocos Hz hasta varios miles, dependiendo de las condiciones particulares del caso. La velocidad de barrido, v , queda definida como el producto del salto de potencial ΔE_s por la frecuencia f .

$$v = E_s \times f \quad [2.20]$$

Las velocidades de barrido en los experimentos de VOC se obtienen modificando la frecuencia de la onda cuadrada, ya que el salto de potencial suele ser un valor fijo.

Se demostró que, para cuplas redox controladas por difusión, los parámetros de la VOC más adecuados son $\Delta E = 50/n$ mV y $\Delta E_s = 10/n$ mV (Osteryoung y Osteryoung, 1985).

Cuando se aplica un pulso de potencial en las cercanías del potencial de la cupla redox las corrientes faradaicas aumentan significativamente conforme se oxida o se reduce la especie electroactiva. Estas corrientes decaen con el tiempo según la ecuación de Cottrel, ya expresada anteriormente como ec. [2.15].

Si consideramos t como t_p , se observa que la disminución del tiempo del pulso implica mayor corriente. Luego, a medida que se aumenta la frecuencia, aumenta la velocidad de barrido y disminuye el tiempo del pulso. Para sistemas reversibles se predice que la intensidad tiene una dependencia lineal con la raíz cuadrada de la frecuencia (Osteryoung y Osteryoung, 1985).

$$I_{p,n} = A + B \times f^{1/2} \quad [2.21]$$

La elección de la frecuencia adecuada es de suma importancia. A frecuencias muy altas aumentan significativamente las corrientes capacitivas perdiéndose resolución, lo que impone un límite al aumento de la frecuencia.

2.5 Biosensores

En muchas determinaciones de analitos en muestras biológicas, se necesitan pasos previos a la evaluación propiamente dicha, que permiten eliminar o enmascarar las potenciales interferencias. Sin embargo, el pretratamiento de la muestra puede llevar a una disminución de la concentración del analito, ya sea por pérdidas en las etapas consecutivas del análisis o por transformación del analito, provocando errores por defecto en la determinación (Lagier & Verdini, 2000). Cuando la evaluación de la concentración del analito se utiliza con fines clínicos, tal resultado erróneo puede conducir a un diagnóstico incorrecto. Es por ello que, en la actualidad, el desarrollo de nuevas metodologías analíticas tiende no sólo a acortar los tiempos de análisis, previniéndose así las pérdidas por degradación del analito sino que, además, procura permitir la ejecución del análisis sin pasos separativos previos.

En los últimos años se ha avanzado en el desarrollo de biosensores, ya que estos dispositivos presentan ventajosas características que los convierten en herramientas

prometedoras de análisis (Belluzo y col., 2008). Los biosensores se pueden definir como dispositivos analíticos compuestos por dos componentes principales:

1- Una superficie selectiva, denominada bioreceptor o superficie bioreactiva (SBR), generalmente de origen biológico o sintética biomimética, la cual en contacto con la muestra es capaz de interactuar de manera específica con el analito (Vo-Dinh & Allain, 2003). Este elemento es el que aporta la especificidad del dispositivo.

2- Un transductor físico-químico, encargado de producir una señal que es función de la interacción entre el analito y la SBR (Vo-Dinh & Allain, 2003). Éste es el elemento que aporta la sensibilidad al dispositivo.

Los biosensores pueden ser clasificados de acuerdo a la señal físico-química que produce el transductor de acuerdo a:

Señal	Biosensor
Cambio de temperatura	Termométrico
Cambio en parámetro eléctrico	Electroquímico
Cambio en propiedades de la luz	Óptico
Cambio de masa	Piezoeléctrico /Acústico

(Adaptado de Vo-Dinh & Allain, 2003)

De los distintos tipos de biosensores, los electroquímicos han sido tradicionalmente los más desarrollados y usados, debido a sus ventajas con respecto a otros biosensores, tales como la generación de una respuesta electrónica directa, que permite una rápida respuesta, mayor simplicidad operativa, versatilidad para la miniaturización y bajo costo. Actualmente, gracias al avance de la tecnología de los semiconductores y la serigrafía, pueden ser producidos masivamente. Dependiendo del parámetro físico medido por el detector, los biosensores electroquímicos pueden a su vez subdividirse en conductimétricos, potenciométricos y amperométricos (Vo-Dinh & Allain, 2003).

2.5.1 Superficie de bioreconocimiento en biosensores

La SBR es un sistema biológico o biomimético que reacciona bioquímica o químicamente con el analito. En la actualidad existe una gran diversidad de elementos biológicos o derivados de ellos que son utilizados como SBR.

Los mismos van desde moléculas simples a sistemas complejos (Vo-Dinh & Allain, 2003). Así, la SBR puede contener antígenos, anticuerpos, ácidos desoxiribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), enzimas, receptores de membrana, tejidos,

microorganismos completos, o compuestos sintetizados “*ad-hoc*” que emulan especies biológicas, como pueden ser estructuras biomiméticas y polímeros molecularmente impresos (Vo-Dinh & Allain, 2003).

2.5.2 Biosensores amperométricos

De los biosensores electroquímicos, los amperométricos suelen presentar mayores sensibilidades (Iost y col., 2011).

En la Fig. 2.11 se esquematiza un biosensor amperométrico. El analito presente en la muestra compleja reacciona selectivamente con la SBR, lo que desencadena la señal analítica en el transductor físico-químico.

En este caso particular el transductor es un electrodo de trabajo, que integra una celda de tres electrodos. El mismo está sometido a un potencial eléctrico (con respecto a un electrodo de referencia), y la señal analítica es la corriente eléctrica que circula por la celda, utilizando un contraelectrodo de gran área. En estas condiciones, la máxima intensidad de corriente eléctrica que se observa está limitada exclusivamente por la reacción de óxido-reducción que ocurre en la superficie del electrodo de trabajo.

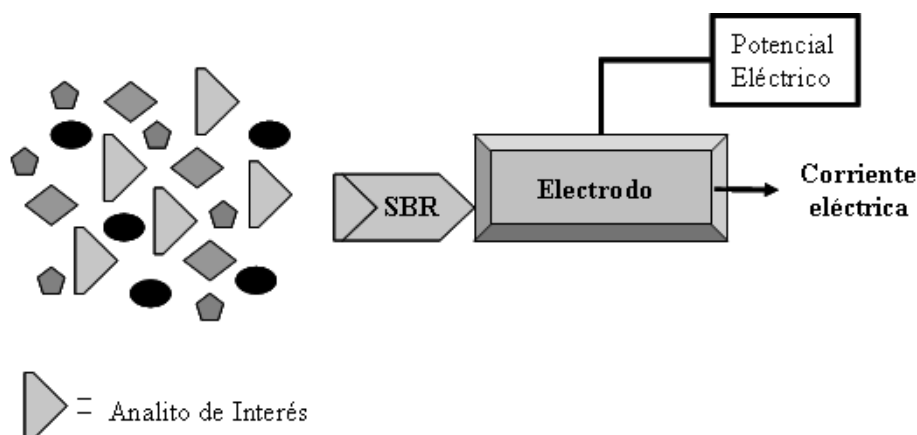


Figura 2.11. El electrodo de trabajo es sometido a un potencial eléctrico, en su superficie tiene lugar la reacción de óxido-reducción. Dicha reacción ocurre o no, o bien transcurre a velocidades diferentes, en presencia o ausencia del analito de interés.

2.5.3 Biosensores de uso clínico

En el caso de muestras para el diagnóstico clínico de infecciones, el analito a determinar puede ser alguna de las moléculas generadas por el individuo infectado como respuesta a la presencia del agente infeccioso, por ej. los anticuerpos (Acs) específicos, o el agente infeccioso íntegro o partes del mismo. En muchos casos, la sola presencia de Acs específicos es, por sí misma, indicativa de infección. Hay casos en que

la presencia de Acs no es *per-sé* indicativa de infección riesgosa. Dos ejemplos de esta situación son el de la toxoplasmosis y la tuberculosis.

En el caso de la toxoplasmosis, la detección de Acs anti-*T. gondii* es sólo de trascendental importancia en embarazadas porque, si la infección ha sido adquirida durante el embarazo, el feto está en riesgo de contagiarse y puede padecer lesiones severas (Dunn y col., 1999, Montoya & Liesenfeld, 2004). Por el contrario, si se trata de infección crónica, no es necesario exponer a la embarazada (y al feto) a medicación innecesaria, evitándose con ello los riesgos que devienen del uso de los fármacos específicos utilizados durante el tratamiento de la infección (Freij & Sever, 1999).

Debido a la incertidumbre que acompaña la detección de los anticuerpos hasta hoy utilizados con este fin, se ha propuesto realizar pruebas utilizando antígenos recombinantes del parásito. Se ha evaluado el desempeño de antígenos recombinantes sintetizados por técnicas de biología molecular, en forma individual o mezclados, para evaluar la avidéz de Acs IgG (Beghetto y col., 2003). Se observó que utilizando el fragmento del antígeno MIC3 en este ensayo, los índices de avidéz permitieron determinar la antigüedad de la infección con mayor grado de certeza que empleando homogenado total de parásito, resultando MIC3 un buen marcador para el diagnóstico de infecciones agudas (Beghetto y col., 2003). La proteína recombinante P35 también fue propuesta como marcador serológico para diferenciar infección aguda de crónica, ya que evidenció sensibilidades del 85,3% para sueros agudos y una especificidad del 98% respecto de sueros crónicos (Parmley y col., 2000). No obstante, y a pesar de haberse descrito moléculas para el diagnóstico de toxoplasmosis aguda, no existe un acuerdo sobre su efectividad, por lo que se requiere de la evaluación de nuevos antígenos para este fin. En general, el uso de una sola molécula recombinante no brinda suficiente sensibilidad, habiéndose demostrado que el empleo de varios antígenos recombinantes la mejora (Pinon y col., 2003). Se ha observado también, que una mezcla de moléculas no produce los mismos resultados que cuando se utilizan en forma separada (Silveira y col., 2001). Se ha postulado que esta diferencia se debe a las distintas características fisicoquímicas entre las moléculas de una mezcla, que impide la inmovilización homogénea en las superficies de captura utilizadas en los inmunoensayos. Por lo tanto, resulta muy factible que un ensayo que utilice una combinación o fusión en una sola molécula de estos antígenos recombinantes marcadores de infección reciente pueda mejorar el diagnóstico diferencial, tal como ha sido demostrado para el diagnóstico de otras infecciones (Camussone y col., 2009).

En el caso de la tuberculosis, la mayoría de los individuos de la población han recibido la vacunación reglamentaria por inoculación de una cepa de micobacterias inofensivas, generando Acs anti-*Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Por ello, estos Acs suelen estar presentes en casi toda la población. De aquí que la detección de Acs anti-*M. tuberculosis* no demuestra infección activa de riesgo. Por tal motivo, el indicador por excelencia de infección activa es la evidenciación del patógeno en la muestra. No obstante, las muestras suelen poseer una extremadamente baja cantidad de *M. tuberculosis*, lo que dificulta su detección directa. Por ello, es preciso utilizar algún paso amplificador del analito a censar. Dado el largo tiempo de replicación del microorganismo, los cultivos realizados para su replicación, insumen períodos prolongados. Siguiendo los trabajos de Park y col. y McNerney y col. (Park y col., 2003; McNerney y col., 2004), se formuló la siguiente hipótesis de trabajo: Sistemas enzimáticos presentes en *M. smegmatis* permitirían metabolizar sustratos electroactivos a distintas velocidades de reacción, dependiendo de la integridad del microorganismo. Siendo este el caso, sería posible distinguir entre cultivos de *M. smegmatis* que han sido lisados por el fago específico D29, de aquellos cultivos en que dichas micobacterias están íntegras. Si sólo existiera lisis cuando la muestra ensayada contiene organismos filogenéticamente emparentados como *M. tuberculosis*, que permitiesen la amplificación selectiva del fago D29 previamente a la infección del cultivo testigo de *M. smegmatis*, la evaluación electroquímica del sustrato metabolizable por el microorganismo debería permitir evidenciar presencia o ausencia de *M. tuberculosis*. La selección del fago D29 se justifica porque es capaz de infectar micobacterias de crecimiento rápido como *M. smegmatis* y las de crecimiento lento como *M. tuberculosis* (Park y col., 2003).

El glicerol es corrientemente utilizado como principal fuente de carbono en cultivos de micobacterias, siendo degradado eficientemente por sus sistemas enzimáticos que utilizan mecanismos redox. En este trabajo, nos hemos planteado detectar este polialcohol como analito de interés, ya que su consumo estará preferencialmente vinculado a la presencia de micobacterias aptas para tal degradación. Por este motivo, proponemos utilizar un bioelectrodo con una SBR que contenga una enzima cuyo sustrato sea glicerol.

2.5.3.1 Biosensores para evaluación de infección toxoplásmica

En el presente trabajo se propuso un biosensor para evaluación de infección toxoplásmica utilizando un electrodo de oro policristalino macizo sobre el cual se adsorbió un antígeno recombinante y se siguió un esquema ELISA del tipo indirecto con detección de IgGh. En la Fig. 2.12 se muestra el esquema que se siguió para este inmunoensayo.

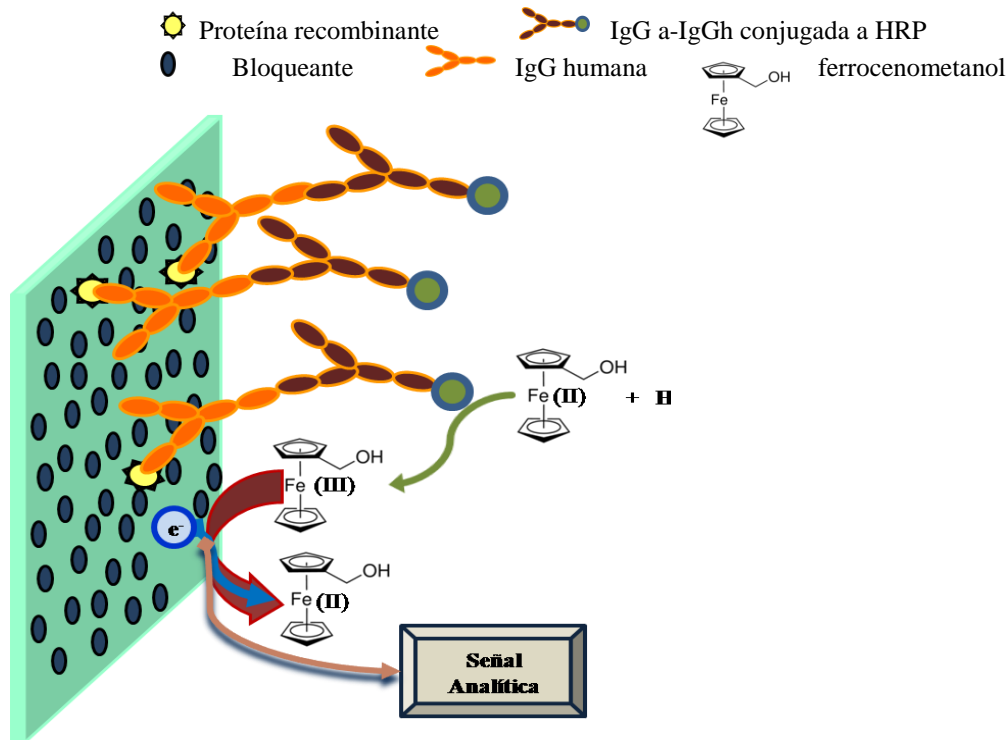


Figura 2.12. Sobre la superficie del electrodo se fija la proteína recombinante que capturará los anticuerpos específicos, si están presentes en el suero. El revelado se realiza con un segundo anticuerpo, específico para IgG humana marcado con HRP que, en presencia de H₂O₂, oxida el mediador FcMe, que se reduce sobre la superficie del electrodo, generando la señal analítica.

2.5.4 Biosensores para cuantificación de glicerol.

La determinación de glicerol ha ido ganando importancia en las últimas décadas debido al uso del mismo en varias industrias, como la farmacéutica, automotriz, alimenticia y textil, entre otros. El compuesto es un producto importante de la fermentación en la mayoría de las bebidas alcohólicas y su concentración es un parámetro útil para el seguimiento del proceso fermentativo (Goriushkina y col., 2010). También es un componente no deseable del biodiesel y su concentración es un indicador de la calidad del combustible (Monteiro y col., 2008).

Se han desarrollado numerosas metodologías para llevar adelante la cuantificación del glicerol, que incluyen técnicas espectrofotométricas y/o espectrofluorométricas (Bondioli & Bella 2005, Silva & Rocha 2010, Lima y col., 2012), incluidos los basados

en enzimas (Kronka y col., 2001, Li y col., 2001), los electroquímicos (Tehrani & Ghani, 2012, Gamella y col., 2008, Wu & Cheng, 2005) y los cromatográficos, estos últimos han sido oficialmente recomendados por la AOAC, como los métodos 968,09, 972,10 (AOAC, 2005). Sin embargo, a pesar de que estos métodos permiten determinar con eficacia de glicerol en presencia de muchos compuestos que interfieren, esta técnica se considera que es ecológicamente desfavorable, debido a la utilización de solventes nocivos para el medio ambiente, e intrínsecamente onerosa debido a los altos costos de los mismos (Gamella y col., 2008).

Por un lado, las propuestas espectrofotométricas que utilizan enzimas se basan en el uso de sistemas o bien de una o varias enzimas relativamente caras, que se eliminan después de que se han utilizado en una única determinación. En estos casos, a menudo son consumidos las enzimas y/o cofactores caros como nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) o adenosina 5'-trifosfato (ATP) a menudo son consumidos (Kronka y col., 2001, Li y col., 2001, Wu & Cheng, 2005). Como un ejemplo, la propuesta de Li para determinar glicerol en matrices complejas se basa en el uso de tres enzimas, a saber, glicerol quinasa (GK), piruvato quinasa (PK), y lactato deshidrogenasa (LDH), además de utilizar ATP y NAD^+ (Li y col., 2001). Este método produce buenos resultados en términos de sensibilidad y especificidad, pero consume 1 U de GK, 1,5 U de PK, 2,2 U de LDH, 2×10^{-6} moles de ATP, y $3,3 \times 10^{-7}$ moles de NAD^+ por determinación. Por lo tanto, el costo derivado por análisis es considerado caro, sobre todo cuando se debe analizar un elevado número de muestras.

Por otro lado, se han propuesto herramientas versátiles notables para cuantificar glicerol, como ser la basada en tecnología de biosensores, en particular los basados en métodos amperométricos (Ghica & Brett, 2006; Gamella y col., 2008). De hecho, los biosensores amperométricos proporcionan suficiente sensibilidad y selectividad para permitir la determinación del analito, junto con una velocidad apropiada para completar el análisis. En efecto, los biosensores amperométricos que utilizan enzimas como componente biológico para el reconocimiento dan lugar a una selectividad significativa, debido a su capacidad de reaccionar específicamente con su sustrato. Este último es a menudo el analito de interés, por lo que puede ser cuantificado de manera eficiente, aún ante la presencia de otros componentes similares estructuralmente que pueden hallarse en la muestra (Belluzo y col., 2008). Los dispositivos construidos con enzimas a menudo pueden ser reutilizados y, por lo tanto, el costo por determinación puede ser

reducido significativamente, en comparación con los métodos espectrofotométricos mencionados anteriormente.

Se han desarrollado varios biosensores utilizando enzimas que tienen como sustrato al glicerol (Gamella y col., 2008). En los diseños utilizados se utilizan diversas enzimas que reaccionan específicamente con el glicerol en un primer paso y se censa un producto de esta reacción. En otros diseños se encuentran involucradas más de una enzima, donde la segunda o tercera enzima utiliza como sustrato algunos de los productos de la primera o segunda reacción y, finalmente, se censa un producto de la última reacción enzimática. Algunos diseños que aparecieron en literatura al momento de iniciar este trabajo de tesis fueron detallados por Pingarrón y colaboradores (Gamella y col., 2008) y se encuentran resumidos en la Tabla 2.3 al final de este capítulo y se corresponden a los esquemas evaluados al momento de iniciar este trabajo de tesis.

Todos los diseños descritos al momento presentan la desventaja de ser onerosos, tanto por el diseño en sí, como por el costo operativo derivado del consumo de elevadas cantidades de reactivos caros.

Sobre la base del modelo propuesto por Tuñón-Blanco y colaboradores (Álvarez-González y col., 2000) se comenzaron los ensayos para construir un bioelectrodo selectivo para glicerol. La propuesta contempla, en primer lugar, disminuir la cantidad de enzima Glicerol deshidrogenasa. En segundo lugar, proponemos utilizar la coenzima NAD(H) en forma soluble, e introducir un mediador electroquímico distinto al utilizado previamente. En el trabajo citado se generaba una cupla catalítica por oxidación electroquímica del NAD^+ presente en un electrodo de trabajo de pasta de C modificada. En nuestro caso, el mediador soluble permite reoxidar la coenzima para cerrar el ciclo catalítico, siguiendo el esquema de la Fig. 2.13.

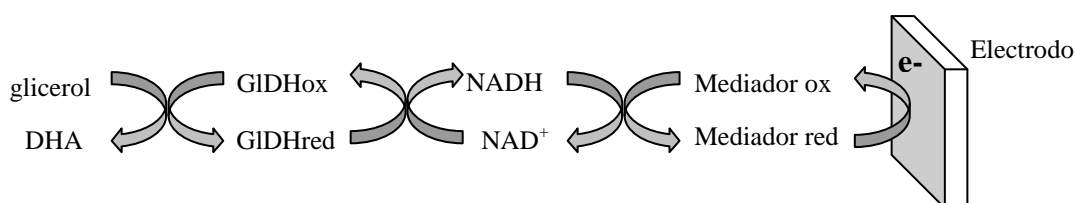


Figura 2.13. Esquema de reacciones que ocurren en la celda. DHA, 1,3 dihidroxiacetona; GIDH, gliceroldeshidrogenasa; NAD(H), nicotinadenina dinucleótido.

Tabla 2.3. Biosensores selectivos para glicerol. Las filas 1 a 10, son un extracto parcial del trabajo de Gamella y col., 2008. En las filas 11 y 12 se incluyen los diseños propuestos por Šeřčovičová y col., 2008 y Goriushkina y col., 2010.

	Electrodo	Enzima	Mediador	Potencial
1	Pt	GK/GPOx	-	+ 650 mV vs Ag/AgCl
2	Al	GIDH	Fe(CN)6	+ 400mV vs ECS
3	Barras de grafito espectroscópico	GIDH	Complejo de Os	+ 200 mV vs Ag/AgCl
4	Serigráfico (SPE)	pGlyDH	N-(4-hidroxibenzilideno)-4-ferrocenilnilina	+ 400 mV vs Ag/AgCl
5	Carbón Vítreo	a) GIDH/DP b) GK/GPOx/HRP	a)Fe(CN)63- b)Fe(CN)64-	a) + 350 mV vs Ag/AgCl b) - 300 mV vs Ag/AgCl
6	SPE modificado con ZrO2 y azul meldola	GIDH	Azul meldola	+ 100 mV vs Ag/AgCl
7	SPE modificado azul de Prusia	GIDH/ <i>Ti</i> NADH Ox	Azul de Prusia	- 50 mV vs Ag/AgCl
8	Pasta de carbono	GIDH	Producto de la electro-oxidación del NAD+	+ 150 mV vs Ag/AgCl
9	Flim de carbono	a) GPOx b)GK/GPOx	Poli (rojo neutro)	- 350 mV vs ECS
10	Au	a)GIDH/DP b) GK/GPOx/HRP	Tetra thiafulvaleno	a) + 150 mV vs Ag/AgCl b) 0 mV vs Ag/AgCl
11	Carbón Vítreo	GIDH/DP	Fe(CN)63-	+ 350 mV vs Ag/AgCl
12	Platino serigráfico	Gox	-	+ 300 mV vs electrodo intrínseco

Tabla 2.3. Continuación

	Muestra	Rango dinámico Lineal (M)		Sensibilidad (mA M⁻¹cm⁻²)	Límite de detección (M)	Estabilidad
		Desde	Hasta			
1	Mosto de uva	2×10 ⁻⁶	1×10 ⁻³	-	5×10 ⁻⁷	Hasta 1 mes
2	Jugo de uva	5×10 ⁻⁶	2×10 ⁻³	-	1×10 ⁻⁶	-
3	Vino	1×10 ⁻⁶	2×10 ⁻⁴	32	1×10 ⁻⁶	80% actividad inicial luego de 20 horas
4	Vino	-	-	-	-	actividad enzimática decae rápidamente
5	Fermento anaeróbico	1×10 ⁻⁵ 1×10 ⁻⁵	1×10 ⁻³ 1×10 ⁻³	a) 6,20 b) 1,42	-	% señal inicial luego de uso continuo: a) 60% a 90 hs; b) 70% 16 hs
6	Fermento de jugo de uva	1×10 ⁻⁵	1×10 ⁻⁴	-	9,4×10 ⁻⁶	-
7	-	1×10 ⁻⁵	1×10 ⁻³	-	2,2×10 ⁻⁶	-
8	Jarabe	9,97×10 ⁻⁷	1×10 ⁻⁴	162 × cm2	4,3×10 ⁻⁷	80% actividad inicial luego de 3 días
9	Vino	1×10 ⁻⁵	1,47×10 ⁻⁴	a) 10,1 b) 0,79	a) 4×10 ⁻⁶ b) 1,5×10 ⁻⁵	% señal inicial luego de uso continuo a) 87% a 8 días; b) 62% 8 días
10	Vino	1×10 ⁻⁶ 4×10 ⁻⁷	2×10 ⁻⁵ 1×10 ⁻⁵	a) 20,7 b) 25,0	a) 4×10 ⁻⁷ b) 3,1×10 ⁻⁷	% señal inicial luego de uso continuo a) 87% a 51 días b) 46% 8 días
11	Fermento	-	-	-	1,1×10 ⁻⁶	-
12	Vino	5×10 ⁻⁵ 2×10 ⁻⁶	2,5×10 ⁻² 6,4×10 ⁻³	-	5×10 ⁻⁵ 2×10 ⁻⁶	-

Objetivos

3 Objetivos

3.1 Objetivos generales

Desarrollar metodologías electroquímicas que permitan identificar analitos de interés tanto para el diagnóstico clínico como para la industria de combustibles alternativos.

3.2 Objetivos particulares

a) Obtener bioelectrodos que exhiban una corriente catalítica diferencial al efectuar inmunoensayos con muestras confirmadas positivas o negativas para infección aguda por *T. gondii*.

b) Desarrollar un método electroquímico que permita la cuantificación de glicerol en medio acuoso para determinarlo, por ejemplo, luego de su extracción, en combustibles alternativos.

c) Evidenciar electroquímicamente la ocurrencia de lisis de *M. smegmatis* por fagos D29, indicadores de la presencia de micobacterias patógenas emparentadas, provenientes de individuos padeciendo infección tuberculosa.

Materiales y Métodos

4 Materiales y métodos

4.1 Reactivos y medios de cultivos

4.1.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico, salvo que se indique lo contrario. Los ácidos: acético, sulfúrico, nítrico, clorhídrico y perclórico; las sales: KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NiSO₄, CuSO₄·5H₂O y la sal disódica del ácido etilen diamino tetra acético (EDTA); dimetilsulfóxido (DMSO), imidazol, tris base; las enzimas: peroxidasa de rábano picante, EC 1.11.1.7 (tipo VI) (HRP) y glicerol deshidrogenasa de cellulomonas, EC 1.1.1.6 (GIDH); acrilamida (adecuada para electroforesis), N,N'-(1,2-dihidroxietilen) bisacrylamide (97%), ditiotretitol (DTT), Coomasie blue G-250, alcohol isopropílico, β-mercaptoetanol, 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB), nicotina adenina dinucleótico (NAD), los desoxinucleótidos trifosfato: dATP, dGTP, dCTP y dTTP, reactivo de Folin-Ciocalteu, glicina, albúmina sérica bovina (ASB), peptona de carne, extracto de levadura, fueron suministrados por Sigma-Aldrich. El polvo de carbono vítreo (esférico, diámetro de partícula entre 2 y 12 μm, pureza 99,99+%) fue suministrado por Aldrich. El polvo de carbono grafito (pureza > 99%) fue provisto por Fisher Scientific. Dimetilformamida (DMF), 1, 1'-carbonil-diimidazol, las sales: tartrato de sodio y potasio, MgCl₂, CaCl₂, NaCl, Na₂CO₃, NaHCO₃, K₂CO₃, KHCO₃, K₃Fe(CN)₆, K₄Fe(CN)₆, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂S₂O₈ (>98%), dodecil sulfato de sodio (Farmacopea Unión Europea) (SDS); NaOH, KOH, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino (Temed), azul de bromofenol (Farmacopea Unión Europea), xilencianol (para electroforesis), etanol absoluto, fueron suministrados por Merck. El H₂O₂ y el glicerol, fueron provistos por Cicareli. El isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) fue suministrado por Promega. La enzima ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, EC 2.7.7.7, (polimerasa *Taq*) y los oligonucleótidos fueron suministrados por InvitrogenTM Argentina. La enzima peroxidasa de rábano picante ligada a estreptavidina (HRP-EAV) fue provista por Abcam. El ester biotin n-hidroxisuccinimida fue provisto por Thermo Scientific. La ampicilina (Farmacopea Argentina) fue provista por laboratorios Klonal. La alúmina para pulido (tamaño de partícula 0,3 μm) fue provista por Metrohm. El anticuerpo de cabra anti IgG humana ligado a HRP fue provisto por Zymed. El Tween-20 fue provisto por Anhedra.

No se detallan los reactivos contenidos en los equipos comerciales utilizados, disponibles en las páginas web de los respectivos proveedores.

4.1.2 Medios de cultivos

Para el crecimiento de cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) se utilizó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB), compuesto por 10 g L⁻¹ peptona de carne, 5 g L⁻¹ extracto de levadura y 10 g L⁻¹ NaCl. En los casos requeridos se suplementó este medio con el antibiótico ampicilina (100 µg mL⁻¹). Para la preparación de medios sólidos se agregó agar en concentración final de 15 g L⁻¹.

Para el crecimiento de células de *M. smegmatis* se utilizó el medio de cultivo Middlebrook 7H9 provisto en forma anhidra por Difco y fue suplementado con NaCl, CaCl₂, y/o glicerol en concentraciones variables, de acuerdo a los requerimientos del ensayo analítico ulterior, la composición del medio provisto por Difco se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 4.1. Caldo Middlebrook 7H9 (Difco) composición en g L⁻¹ del medio líquido recién preparado.

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,50
Na ₂ (HPO ₄)	2,50
K(H ₂ PO ₄)	1,00
Citrato de sodio	0,10
MgSO ₄	0,05
CaCl ₂	0,005
ZnSO ₄	0,001
CuSO ₄	0,001
Citrato férrico amónico	0,04
Ácido l-glutámico	0,50
Piridoxina	0,001
Biotina	0,0005

4.2 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas y sus características relevantes se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 4.2. Cepas bacterianas utilizadas.

Cepa	Características
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) BL21 (DE3)	E F- ompT hsdS (rB-mB-) [lon] (DE3 immP21 int- lacI+ lacUV5::lacZ::T7 ARN polimerasa). Contiene el gen de la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor lacUV5. El gen de la ARN polimerasa está integrado en el cromosoma bacteriano desde λ (DE3) y su expresión se induce por IPTG (Stratagene)
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2155 es un organismo aerobio, quimioorganotrofo, en forma de barra, no móvil, patógeno de humanos. Esta bacteria fue inicialmente aislada de esmegma humano. Esta cepa es un mutante de <i>M. smegmatis</i> . Es fácilmente transformable con vectores plasmídicos usando electroporación

4.3 Bacteriófagos

Se utilizó el bacteriófago D29, que infecta específicamente micobacterias. Los trabajos específicos de infección de micobacterias fueron realizados en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas (UNR), bajo la supervisión del Dr. Ricardo Morbidoni.

4.4 Plásmidos

El plásmido utilizado y sus características relevantes se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 4.3. Plásmido utilizado.

Plásmido	Características
pET32a	5900 pares de bases, resistencia ampicilina, promotor T7lac. Produce proteínas fusionadas a 6 histidinas y a la proteína tiorredoxina (TRX), de 20,4 kDa, lo que permite su purificación en columna de NTA-Ni ²⁺ . Este vector fue utilizado como sistema de expresión en la cepa BL21 (DE3) de <i>E. coli</i> .

4.5 Reacción en cadena de la polimerasa

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25 μ L, conteniendo solución de amplificación comercial suplementada con MgCl₂, para alcanzar una concentración final de MgCl₂ 2,5 mM y 0,2 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato dATP, dGTP, dCTP y dTTP, 20 pmoles de cebador directo y reverso, y 1 UI de polimerasa *Taq*. Se empleó un termociclador BOECO (Germany) y se inició la reacción con un paso de desnaturalización a 95 °C, durante 5 min. La amplificación de los fragmentos se realizó en 30 ciclos de: a) desnaturalización, 1 min a 95°C; b)

hibridización, 1 min a la temperatura óptima para cada par de cebadores; c) extensión, 72°C 1,5 min por cada Kpb amplificado; finalmente se realizó un paso de extensión durante 10 min.

Para la reacción de amplificación de la secuencia codificante de la proteína, se diseñaron oligonucleótidos cebadores específicos (ver más adelante). En el diseño de los mismos, se introdujeron sitios de restricción apropiados para el posterior clonado del fragmento en vectores de clonado o expresión.

Como molde se utilizó aproximadamente 0,03 µg de ADN plasmídico.

Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos (provistos por Invitrogen)

P22C directo 5'- GGATCCACCCACCGAGACGCCAGC -3'

P22C reverso 5'- GAATTCTTGCCCGTGAGAGACACAG -3'

4.6 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN (ADN plasmídico, productos de PCR) fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa de distinta concentración (0,8% a 2%) según el tamaño de los fragmentos a separar. Se utilizó el sistema de tipo submarino. La solución reguladora tris-acético-EDTA (TAE) 0,5 X se utilizó como solución de electroforesis y para la preparación de geles. A estos últimos se les agregó el agente intercalante bromuro de etidio en una concentración final de 0,3 µg mL⁻¹ antes de su gelificación. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con solución de siembra compuesta por 0,025% (m/v) azul de bromofenol, 0,025% (m/v) xilencianol y 30% (v/v) glicerol, en una proporción 5:1 en volumen de muestra: solución de siembra. Como marcadores de peso molecular se utilizaron Ladder 100 pb, PB-L (Productos BioLógicos). La corrida electroforética se realizó a un potencial constante de 100 V con una fuente BIO-RAD modelo 3000xi. Luego de la electroforesis, el ADN se visualizó por fluorescencia en un transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne y las imágenes se digitalizaron con una cámara FUJIFILM, modelo FinePix A120.

4.7 Minipreparación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se preparó a partir de cultivos celulares de *E. coli* conteniendo los plásmidos de interés, según el método de lisis alcalina, o bien utilizando los equipos comerciales “WIZARD[®] PLUS SV Minipreps DNA purification system” (Promega). El resultado de la preparación se evaluó realizando una electroforesis en gel de agarosa de una alícuota de la misma.

4.8 Purificación del producto de amplificación

La purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa se realizó utilizando el equipo comercial “GFXTM Gel Band Purification Kit” (Amersham/ GE Healthcare), según las especificaciones del fabricante. El resultado de la purificación se evaluó realizando una electroforesis en gel de agarosa de una alícuota de la elusión obtenida.

4.9 Prueba de expresión de proteínas de fusión a TRX y a “cola” de histidinas

Se cultivaron clones de las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET32a (con el inserto correspondiente) haciendo distintas diluciones, 1/75, 1/100 y 1/200 de un cultivo saturado en 2 mL de LB fresco (suplementado con ampicilina a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) y cultivando a 37°C , con agitación vigorosa (180 rpm) hasta una densidad óptica a 630 nm ($\text{DO}_{630\text{nm}}$) aproximada de 0,5 unidades. Se indujo la expresión de la proteína recombinante con IPTG (concentración final 1 o 0,1 mM) durante 3, 4 o 12 hs a 37°C y con agitación vigorosa. Posteriormente, se cosecharon las células, centrifugando a 3000 rpm durante 10 min. Finalmente, se lisaron las células con pulsos de ultrasonido utilizando un sonicador analógico Sonifier® S450A y se separaron las fracciones soluble e insoluble del extracto por centrifugación a 18000 g durante 20 min.

4.10 Expresión y purificación preparativas de antígenos recombinantes

Se cultivó la cepa de *E. coli* transformada con el vector pET32a, con el inserto correspondiente, haciendo una dilución 1/100 de un cultivo saturado en dos porciones de 150 mL de LB suplementado con ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) y cultivando a 37°C hasta una $\text{DO}_{630\text{nm}} \approx 0,5$. Se agregó IPTG hasta concentración final óptima, 1 mM para el Ang P35B o 0,1 mM para el Ang P22C, y se indujo el tiempo óptimo, 4 h para el Ang P35B o 12 h para el Ang P22C, a 37° . De esta manera, se obtuvo la proteína de fusión en forma soluble. Se cosecharon las células por centrifugación y se lavaron con solución tampón fosfato (Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 8). Luego se las resuspendió en 20 mL de solución de lisis (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 0,5 M, pH 8). Las células se lisaron por sonicado, aplicando pulsos de 30 s de duración, hasta clarificación del medio en hielo. Se separó la fracción soluble de la insoluble por centrifugación a 18.000 g y 4°C . La fracción soluble se congeló durante 24 h a -20°C y se descongeló en hielo, luego se centrifugó nuevamente a 18.000 g y 4°C . Este paso se repitió dos veces. Posteriormente, se realizó una separación cromatográfica de afinidad con una columna

de 5 mL empacada manualmente con resina Ni Sepharose™ High Performance, en condiciones nativas, elusión con imidazol 250 mM, según las especificaciones del proveedor (GE Healthcare). En los sucesivos pasos, se recogieron alícuotas y se verificó la purificación visualizando por electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE).

4.11 Separación de proteínas mediante SDS-PAGE

Se utilizaron geles de 12% y de 15% de acrilamida:bisacrilamida 29:1. Las muestras se sembraron en geles desnaturizantes mezclándolas 2:1 con solución de siembra 2 X compuesta por: Tris-HCl pH 6,8 125 mM, SDS 4 %, β -mercapto etanol 5 % v/v(alternativamente se usó DTT 200 mM), glicerol 20 % y azul de bromofenol 0,2 %. Las corridas electroforéticas se hicieron en solución Tris-glicina-SDS (Tris base 3,02 g L⁻¹; glicina 14,4 g L⁻¹; SDS 1 g L⁻¹). Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie G-250.

4.12 Cuantificación de proteínas.

Se utilizó el método propuesto por Lowry (Lowry y col.,1951) según el siguiente protocolo: un volumen de muestra cuya concentración de proteína se desea determinar y uno o dos testigos de albúmina (conteniendo típicamente de 5 a 25 μ g de proteínas totales) se disolvieron en 0,40 mL de agua destilada y se mezclaron con 1,50 mL de reactivo C, preparado inmediatamente antes de usar. El reactivo C se preparó mezclando una parte de tartrato de sodio y potasio 2% m/v, una parte de CuSO₄ 1% m/v y 100 partes de solución tampón carbonato 2% m/v e hidróxido de sodio 0,1 N. Se dejó reaccionar la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente y luego se adicionó 0,150 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, diluido 1/3 con agua destilada inmediatamente antes de usar. Se dejó reposar durante 45 min y se leyó la absorbancia a 660 nm.

4.13 Reacción de conjugación biotina-antígeno

Previo a la reacción de conjugación el antígeno P35B purificado, se llevó a una concentración final de 2 mg mL⁻¹ (como mínimo) en solución tampón carbonato de sodio 0,1 M (pH 8,5), usando las membranas de poro controlado Amicon Ultra-4 (Millipore Co.), según las instrucciones del proveedor. Se disolvieron 2,0 mg del éster biotinil-n-hidroxisuccinimida (BNHS) en 590 μ L de DMSO e inmediatamente después se mezclaron 80 μ L de esta solución con 800 μ L de solución de Ang.

Al antígeno P22C purificado se lo llevó a una concentración final de 20 mg mL⁻¹ (como mínimo) en solución tampón carbonato de sodio 0,1 M (pH 8,5), usando las membranas de poro controlado mencionadas. Se disolvieron 2,5 mg BNHS en 590 µL de DMSO e inmediatamente después se mezclaron 120 µL de esta solución con 1,00 mL de solución de Ang. Se incubó 4 h a temperatura ambiente con agitación suave. Se eliminaron los restos de éster hidrolizado y se cambió la solución tampón carbonato por PBS 1 X pH 7,4 haciendo lavados reiterados y reteniendo el Ang en las membranas de poro controlado.

4.14 Revelado cromogénico de la reacción de conjugación

El antígeno marcado con biotina respectivo fue retenido en membrana de nitrocelulosa, sembrando 1 µL del mismo sobre la membrana. Se procedió a bloquear los sitios activos de la membrana con leche descremada, disuelta al 5% m/v en PBS pH 7,4, durante 1 h. Se realizaron 3 lavados con PBS pH 7,4 de 1 min cada uno. Se incubó la membrana con la enzima peroxidasa de rábano picante ligada a streptavidina (HRP-EAV) disuelta en PBS pH 7,4-leche descremada al 1% m/v. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS pH 7,4 de 1 min cada uno. Finalmente, se reveló la presencia de la enzima HRP con el reactivo de color recién preparado según, 5 mg de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) se disolvieron en 500 µL de DMSO y se llevó a 10,0 mL de volumen final con PBS pH 7,4. A esta solución se le agregaron 100 µL de H₂O₂ 10 volúmenes, inmediatamente previo a su utilización.

4.15 Mediciones espectrofotométricas.

Para las medidas de absorbancia (Abs) a longitudes de onda específicas o la realización de espectros de absorción ultravioleta-visible se utilizó el espectrofotómetro Beckman DU 640. Como celda se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

4.16 Ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima con detección fotométrica

Como soporte sólido se utilizaron microplacas Microlon 600, high binding, Greiner Bio One provistas por GBO Argentina. Para las lecturas de Abs. se utilizó un lector de microplacas PowerWave XS (BioTek) o, alternativamente, se utilizó el lector ELx808 Absorbance Microplate Reader (BioTek). Los ensayos preliminares se detallan en la sección 6, Experimentos Auxiliares.

4.16.1 Esquema A

Sobre las microplacas de ELISA Microlon 600 high binding, Greiner Bio One, se depositaron 100 μ L de anticuerpo de captura (IgG de conejo anti IgM humana) provisto por Dakko, diluido 1/1000 en PBS pH 7,4. Se incubaron 48 h a 37 °C. Luego, se realizaron 3 lavados con PBS Tween 20 al 0,05% (PBS-T) de 1 min cada uno. Se procedió al bloqueo de los sitios libres de la placa con 100 μ L leche descremada comercial (marca Milkaut) al 1% m/v en PBS, durante 30 min a 37 °C y se realizaron 3 lavados con PBS-T de 1 min cada uno. Luego, se incubaron con suero humano (muestra incógnita) 1/100 en PBS con leche descremada al 1% m/v durante 1 h a 37 °C y se realizaron 3 lavados con PBS-T de 1 min cada uno. Se realizaron distintas incubaciones con los antígenos P22C y P35B conjugados a biotina. Luego de tres lavados con PBS-T, se incubaron con la enzima HRP-EAV en una dilución 1/2000, durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS-T, para finalmente revelar utilizando 50 μ L de solución comercial de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), sustrato de la enzima HRP, que da coloración azul en el medio de reacción, pasando a amarillo y permaneciendo estable el color cuando se detiene la reacción acidificando el medio con H₂SO₄ 0,5 M

4.16.2 Esquema B

Sobre las microplacas de ELISA comerciales se depositaron 500 ng de Ang P22C, disueltos en 100 μ L de solución carbonato pH 9,6, incubando 1 h a 37 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS Tween 20 al 0,05% (PBS-T) de 1 min cada uno. Se bloquearon los sitios libres de la placa con 100 μ L leche descremada 1% m/v en PBS, durante 30 min a 37 °C. Luego se realizaron 3 lavados con PBS-T de 1 min cada uno. Se incubaron con suero humano (muestra incógnita) 1/100 en PBS con leche descremada al 1% m/v durante 1 h a 37 °C. Luego, se realizaron 3 lavados con PBS-T de 1 min cada uno. Se realizó una incubación con el antígeno P22C conjugado a biotina. Luego de tres lavados con PBS-T, se incubaron con la enzima HRP-EAV en una dilución 1/2000, durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS-T. Finalmente, se reveló con 50 μ L de solución comercial de TMB y se detuvo la reacción acidificando el medio con 50 μ L H₂SO₄ 0,5 M.

4.17 Reacción de color para determinación cuantitativa de glicerol por método espectrofotométrico.

Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos diferentes. Por un lado, se utilizó el método enzimático con un equipo comercial provisto por Wiener Lab TG GPO / PAP AA (línea líquida) ensayando muestras de alícuotas del medio Middlebrook 7H9, suplementadas con glicerol en lugar de suero humano. Por otro lado, se realizaron reacciones de color que se llevaron a cabo en un volumen final de 1,00 mL, que resultó de la mezcla de 950 μL de reactivo A y 50 μL de muestra, la cual consistió en medio de cultivo de micobacterias Middlebrook 7H9, suplementado con distintas cantidades de glicerol. En los blancos de reacción se realizó un agregado de medio de cultivo Middlebrook 7H9 sin glicerol, de igual volumen que en los otros dos casos, para mantener las mismas condiciones que en las otras reacciones.

El reactivo A se preparó inmediatamente antes de ser usado, mezclando los reactivos necesarios según se indica en la siguiente tabla.

Tabla 4.4. Mezcla de reactivos necesaria para preparar 950 μL de reactivo A (necesario para 1 reacción).

Los volúmenes necesarios para un número n de reacciones se obtuvieron multiplicando por n los volúmenes de esta tabla.

Reactivo	Volumen para una reacción (μL)
Solución Tampón carbonato 0,125 M pH 10,5	815
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{NC})_6$ 10^{-2} M	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 M	10
NAD^+ 10^{-2} M	25
Enzima GIDH 2 mg mL^{-1}	1

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de Khan cerrados con parafilm para evitar evaporación de líquido y en baño termostático a 37 °C. La lectura de absorbancia se realizó cuando se cumplió una o dos h de iniciada la reacción, según la necesidad del ensayo. Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.18 Determinación de glicerol remanente en cultivos de micobacterias

Procedimiento seguido: a medios de cultivos Middlebrook 7H9 se los suplementó con glicerol a concentración 0,025 % m/v y se cultivaron cantidades iguales de: células de *M. smegmatis*, algunos medios se conservaron sin adicionar micobacterias, en

condiciones de esterilidad. Se tomaron alícuotas de estos cultivos a distintos tiempos. Se centrifugaron a 12.500 rpm durante 5 min para separar las células del sobrenadante, y a estos últimos se los congeló a -20°C para su posterior análisis.

Se realizaron determinaciones de glicerol con la técnica fotométrica propuesta. Se realizaron reacciones de color por triplicado a las muestras, e independientemente se hizo un blanco de reacción y 2 testigos cuyas concentraciones fueron de 0,01 y 0,04 % m/v.

4.18.1 Determinación de glicerol remanente en cultivos de micobacterias con y sin fago D29 y ensayos controles respectivos

Procedimiento seguido: a medios de cultivos Middlebrook 7H9 se los suplementó con glicerol a 0,025% m/v y se cultivaron cantidades iguales de: **a)** células de *M. smegmatis*, **b)** células de *M. smegmatis* infectadas con fago D29; **c)** fagos D29 **d)** algunos medios se conservaron sin adicionar micobacterias ni fagos, en condiciones de esterilidad. Se tomaron alícuotas de estos medios inmediatamente después de realizados los inóculos (tiempo 0), a las 2 h y a las 4 h de iniciados los cultivos. Se centrifugaron a 12.500 rpm durante 5 min para separar las células del sobrenadante, y a estos últimos se los congeló a -20 °C para su posterior análisis. A estas muestras se les realizaron determinaciones del glicerol remanente con la técnica fotométrica propuesta. Se realizaron reacciones de color por triplicado a cada muestra utilizándose como testigos los medios en condiciones de esterilidad.

4.19 Instrumental electroquímico

Para los experimentos electroquímicos se utilizó un analizador electroquímico Autolab (Eco Chemie) con amplificador electrométrico diferencial PGSTAT 30. Se utilizó una celda convencional de tres electrodos.

4.19.1 Electrodos de trabajo

4.19.1.1 Bioelectrodo para evaluación de infección toxoplásmica

Se utilizaron electrodos macizos tipo “banderita” de oro, de aproximadamente 1 cm² de área geométrica. El ensamblado se realizó de acuerdo al siguiente protocolo: los electrodos limpios se sumergieron durante 14 h en una solución de ácido 3 mercapto propanosulfónico preparada inmediatamente antes de usar, disolviendo 22 mg en 12 mL de H₂SO₄ 0,021 M (desoxigenada con burbujeo de N₂), en atmósfera de N₂ a

temperatura ambiente (T.A.). Luego de enjuagar con agua destilada se sumergieron en una solución de Ang recombinante P22C $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (PBS pH 7,4) durante 1 h a T.A. Luego de un lavado con PBS se bloquearon los sitios libres, no modificados con el Ang, sumergiendo los electrodos en solución de caseinato de sodio $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ (preparada inmediatamente antes de usar) 30 min. a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Los electrodos se lavaron con PBS Tween-20 0,5% m/v y se sumergieron en una dilución 1/200 de suero humano (muestra incógnita) en PBS, durante 30 min a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Se lavaron con PBS Tween-20 0,5% y, finalmente, se incubaron en una dilución 1/1500 de anticuerpos de conejo anti IgGh-HRP. Los biosensores así ensamblados se guardaron en PBS pH 7,4 a 4°C hasta su utilización.

4.19.1.2 Electrodo para cuantificación de glicerol

Como electrodos de trabajo se utilizaron: oro, platino, plata, carbono vítreo, pasta de carbono (vítreo y grafito) y pastas de carbono modificadas.

Los electrodos metálicos y de carbono vítreo fueron provistos por Metrohm (numero de catálogo 6.1204.3XX), consistentes en barras del material de 3 mm de diámetro embutidas en un armazón aislante.

Las pastas de carbono utilizadas se enumeran a continuación, indicando los porcentajes en masa de cada componente respectivamente:

- a) Pasta A: carbono vítreo, aceite mineral (70:30)
- b) Pasta B: carbono vítreo, aceite mineral, GLDH (68:30:2)
- c) Pasta C: carbono vítreo, aceite mineral, GLDH, MWCNT (58:30:2:10)

Las pastas se prepararon mezclando los componentes en mortero de ágata durante 15 a 20 min, hasta obtener una mezcla homogénea a la vista. Cuando se utilizó enzima GLDH, se dispersó en aceite mineral primero y luego se mezcló con el polvo de carbono vítreo. Cuando se utilizaron NTC (MWCNT, nanotubos de carbono de pared múltiple) se dispersó primero la enzima luego los NTC y finalmente el polvo de carbono vítreo. Así preparadas se empaquetaron firmemente en un armazón de teflón (diámetro 3 mm), y se friccionó firmemente sobre un papel liso apoyado en un vidrio para eliminar el exceso de pasta y pulir la superficie expuesta del electrodo.

Cuando se utilizaron electrodos de pasta de carbono con las pastas B se realizó una cubierta de poli-(o-fenilendiamino) que inmovilizara la enzima. Una vez empaquetada la pasta en el armazón de Teflon, se sumergió en una solución de o-fenilendiamino $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ en solución tampón carbonato $0,1 \text{ M}$ (pH 10). Se burbujeó $\text{N}_{2(\text{g})}$ para eliminar el

O_{2(g)} de la solución y dejar una atmósfera libre de O_{2(g)}. Para electropolimerizar, se realizó un barrido de potencial cíclico desde -0,51 V a + 0,69 V a 50 mV s⁻¹. Finalmente, se enjuagó con solución amortiguadora carbonato 0,1 M (pH 10).

4.19.2 Limpieza de electrodos

Los electrodos de oro macizo policristalino, tipo “banderita” se sumergieron en solución “piraña” (H₂SO₄ concentrado: peróxido de hidrógeno 30% en una relación 3:1) durante 30 min a 80°C. Luego se los enjuagó con abundante agua destilada. En caso de limpieza más rigurosa, previo al tratamiento con solución “piraña”, se los colocó a la llama directa, hasta rojo vivo (Ribone y col., 2006).

Los electrodos de oro policristalino macizo insertos en una barra de teflón (Tips de Au) se limpiaron siguiendo el siguiente protocolo: desengrase, frotándolo sobre tela de pulido humedecida con DMSO. Lavado con abundante agua destilada. Pulido, con suspensión acuosa de alúmina (diámetro promedio de partícula 0,3 μm) sobre tela de pulido. Lavado con abundante agua destilada. Sonicado durante 5 min en sonicador Cole-Palmer 8890. Luego de un enjuague con abundante agua destilada, se sumergieron en HNO₃ 9 M durante 1 min a 60 °C. Finalmente, se lavaron con abundante agua destilada.

4.19.3 Determinación del área real del electrodo

Para la determinación del área real de los electrodos metálicos se utilizaron dos metodologías *in-situ*:

4.19.3.1 Medición de la adsorción de oxígeno

Se asume que el oxígeno se quimioadsorbe en una capa monoatómica antes de la evolución de O₂ con una correspondencia de uno-a-uno con los átomos metálicos de la superficie. El valor de la carga asociada a la reducción de la monocapa de óxido en superficies de oro policristalino que se utilizó fue de 390±10 μC cm⁻² (Trasatti & Petrii, 1991)

Se realizaron VCs en H₂SO₄ a 50 mVs⁻¹ y se midió la carga correspondiente al pico de desorción de O₂ sobre la superficie del electrodo, y este valor se dividió por el valor de referencia.

4.19.3.2 Voltametría cíclica de ferricianuro de potasio

Registrando VCs a varias velocidades de barrido de potencial, conociendo el coeficiente de difusión del ión, su concentración en la celda y midiendo la corriente de pico a cada velocidad de barrido es posible determinar el área real del electrodo de trabajo, utilizando la ecuación de Randles Sevcik, ec.[2.16] (Belluzo y col., 2008):

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C_{\infty} \quad [2.16]$$

siendo la temperatura 25 °C y donde A está en cm², D en cm² s⁻¹, C_∞ en mol cm⁻³ y v en V s⁻¹.

4.20 Medidas electroquímicas

Todos los potenciales fueron medidos y referidos al electrodo de Ag/AgCl (KCl 3,00 M), que se utilizó como electrodo de referencia. Como contraelectrodos se utilizaron dos tipos, uno de oro de superficie mayor a 5 veces la superficie del electrodo de trabajo, cuando se utilizaron electrodos metálicos como electrodos de trabajo, y una barra de carbono vítreo, cuando se utilizaron electrodos de pasta de C como electrodos de trabajo. En todos los casos, las soluciones se burbujearon con N₂ durante 1 min para desplazar el O₂ disuelto, y se mantuvieron en atmósfera de N₂ durante las determinaciones.

Las voltametrías cíclicas se realizaron equilibrando el sistema al potencial de inicio. Para muestras conteniendo glicerol y, utilizando electrodos de oro, se realizaron barridos desde -0,30 V hasta 0,60 V, a distintas velocidades de barrido. Cuando se utilizaron electrodos de platino, se realizaron barridos desde -0,80 V hasta 0,20 V a distintas velocidades de barrido. Cuando se utilizaron electrodos de pasta de carbono o pasta de carbono modificada se realizaron barridos de potencial desde -0,40 V hasta 1,00 V. Las corrientes que se informan son las intensidades de pico obtenidas trazando una línea de base recta desde los extremos del pico de corriente utilizando algoritmos propios del programa General Purpose Electrochemical System (GPES).

4.20.1 Mediciones amperométricas para evaluación de infección toxoplásmica

Las amperometrías realizadas con el bioelectrodo para evaluación de infección toxoplásmica, se llevaron adelante en solución PBS (pH 7,4), FeMe 3 mM. El potencial de trabajo fue de 0,08V. Se registró la corriente de base hasta que se estabilizó y una

vez estable (usualmente a los 250 s) se adicionó el sustrato de la enzima (H_2O_2) concentración en celda 1,8 mM y se registró la corriente final (500 s). La corriente catalítica se evaluó como la diferencia entre la corriente final y la de base.

4.20.2 Mediciones amperométricas para cuantificación de glicerol

4.20.2.1 Amperometrías con tip de oro

Las amperometrías con tip de oro se realizaron en medio NaOH 0,1 M a potencial constante (0,1 V) y a temperatura ambiente (20 a 25 °C). El sistema se preconditionó aplicando un potencial de 0,5 V, se dejó equilibrar, y se registró la corriente de base en esas condiciones (generalmente a los 50 s). Luego, se adicionó la muestra, de forma de lograr la concentración final de analito deseada. La corriente fue registrada y se midió una vez que se estabilizó (aproximadamente a los 400 s). La corriente catalítica se evaluó como la diferencia entre la corriente final y la de base.

4.20.2.2 Amperometrías con electrodos de pasta de C

Las amperometrías donde se utilizó la pasta de carbono B se realizaron en solución tampón carbonato/bicarbonato de potasio 100 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 mM; $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1mM; NAD^+ 0,5 mM; pH 10,5. Se trabajó a potencial constante 0,38 V, y a temperatura ambiente (25 °C). El sistema se preconditionó aplicando el potencial de trabajo correspondiente durante 50 s, una vez iniciada la lectura de corriente se dejó equilibrar, y se registró la corriente de base en esas condiciones, usualmente a los 300 s. Luego, se adicionó la cantidad necesaria de muestra, de forma de lograr la concentración final de analito deseada. La corriente fue registrada y se midió una vez que se estabilizó (aproximadamente a los 500 s). La corriente catalítica se evaluó como la diferencia entre la corriente final y la de base.

Las amperometrías donde se utilizó la pasta de carbono C se realizaron en solución tampón carbonato/bicarbonato de potasio 100 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 mM; NAD^+ 0,5 mM; pH 10,5 a potencial constante 0,51 V, y a 25 °C. El sistema se preconditionó aplicando el potencial de trabajo correspondiente durante 50 s, una vez iniciada la lectura de corriente se dejó equilibrar, y se registró la corriente de base en esas condiciones, usualmente a los 300 s. Luego, se adicionó la cantidad necesaria de muestra, de forma de lograr la concentración final de analito deseada. La corriente fue registrada y se midió una vez que se estabilizó (aproximadamente a los 200 s del agregado). La corriente catalítica se evaluó como la diferencia entre la corriente final y la de base.

Cuando el tiempo de equilibrado no fue suficiente para que la corriente de base se estabilizara, se recurrió a realizar correcciones de línea de base. A tal fin, se llevaron a cero las corrientes de base aplicando los algoritmos que ofrece el programa GPES versión 4.9, provisto por Eco Chemie B.V.

4.20.3 Voltamperometría de onda cuadrada

Los experimentos de voltamperometría de onda cuadrada se realizaron en solución tampón carbonato/bicarbonato de potasio 100 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 mM; NAD^+ 0,5 mM; pH 10,5 y a 25 °C. Los valores de escalón de potencial utilizados fueron de 5 y 10 mV. Los valores de amplitud de pulso fueron de 25 y 50 mV. Las frecuencias utilizadas fueron de 8, 10, 20, 30, 40, 60 y 70 Hz. Específicamente, se evitó utilizar 50 Hz (frecuencia de la tensión alterna de la línea de alimentación). Los barridos de potencial se realizaron desde -0,3 V hasta 1,0 V.

Una vez registrado el blanco con medio Middlebrook 7H9, y se hicieron dos agregados secuenciales de solución estándar de glicerol 1,00 M, obteniéndose una concentración final de 25 y 50 mM, respectivamente, en la celda.

4.21 Funcionalización de nanotubos de carbono

Previo a la utilización de los nanotubos de carbono se procedió a funcionalizarlos realizando una carboxilación oxidativa. Se siguió una comunicación personal del Dr. José Manuel Pingarrón del Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid. A saber: se pesaron aproximadamente 2 mg de MWCNT y se dispersaron en 2 mL en una mezcla de ácido sulfúrico / ácido nítrico 3:1, con agitación ultrasónica, durante 5 h. Luego se diluyó la mezcla al 1/10 vertiéndola suavemente en agua destilada enfriada en baño de hielo, para evitar proyecciones. Se eliminó el exceso de ácido centrifugando a 14.000 rpm durante 30 min, descartando el sobrenadante y dispersando el precipitado en agua destilada con agitación ultrasónica durante 30 min. Esta operatoria se repitió 9 veces hasta que la dispersión de MWCNT en agua tuvo un pH cercano a la neutralidad ($7,0 \pm 0,5$). Los MWCNT se secaron en desecador con sulfato de cobre anhidro y aplicando vacío al sistema.

4.22 Programas de predicción de epítopes lineales reconocidos por células B

4.22.1 Base de datos de proteínas

Se creo manualmente una base de datos para mejorar la exactitud de los resultados. Las proteínas fueron seleccionadas de la base de datos de BciPep (Saha y col., 2005), HIV Molecular Immunology Database (disponible en: <http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/index.html>) o tomadas de la literatura: VP1 (Wang y col., 2011), proteína N (El-Manzalawy y col., 2008) y Gliadina (Sweredoski & Baldi, 2009). El criterio de selección fue la confirmación experimental previa mediante ensayos de puntos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELIspot), o mediante el uso de paneles multiespecíficos de anticuerpos monoclonales que reconocen epítopes lineales (Shin y col., 2005). Como resultado, se seleccionaron 11 proteínas de las que se obtuvieron un total de 65 epítopes lineales reconocidos por células linfocíticas tipo B.

4.22.2 Programas utilizados

Se utilizaron algunos programas para predecir los epítopes lineales, disponibles en línea gratuitamente. Todos estos programas utilizan algoritmos matemáticos con escalas de propensión y/o datos experimentales de antigenicidad. A menos que se indique lo contrario, cada programa se ejecutó utilizando los parámetros por defecto. Los programas utilizados fueron: *AAPPred* (Davydov & Tonevitskii, 2009), *ABCpred* (Saha, S & Raghava, 2006), *BcePred* (Saha y col., 2005), *BepiPred* (Larsen y col., 2006) y *Antigenic* (Kolaskar & Tongaonkar, 1990).

Los programas de predicción definen el grado de antigenicidad por medio de una puntuación (score), en algunos casos para cada epítope y en otros para cada residuo amino acídico. En este último, se puede definir una región antigénica cuando varios residuos con alta puntuación son adyacentes en la estructura primaria. Por otra parte, el número de epítopes o regiones antigénicas que los programas de predicción encuentran depende de un umbral que es configurado por el usuario.

4.23 Análisis de Datos

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se calcularon siguiendo las sugerencias de Armbruster & Pry (Armbruster & Pry, 2008), modificando la cantidad de replicados utilizados para la obtención de los desvíos estándar, habiéndose utilizado 10 réplicas. El cálculo del LD se realizó a partir del valor de corriente del blanco I_B más

3,3 veces el valor del desvío estándar de la corriente leída (DS_{n1}) de la muestra con menor concentración de glicerol medida, según:

$$LD = \frac{I_B + 3,3 \times DS_{n1}}{m} \quad [4.1]$$

El valor del LC se calculó como:

$$LC = \frac{I_B + 10 \times DS_{n1}}{m} \quad [4.2]$$

siendo m la pendiente de la curva de calibración.

La capacidad de discriminación entre dos concentraciones diferentes de los métodos propuestos se evaluó como el error asociado a la estimación de la concentración, E_c , calculada como:

$$E_c = \frac{E_r}{m} \sqrt{\frac{1}{N}} \quad [4.3]$$

siendo E_r el error relativo.

4.24 Cálculos estadísticos y diseño experimental

Para los cálculos estadísticos se utilizaron los programas SigmaStat 3.2 (Sigma Plot 9.0 u 11.0) o Microcal Origin 8.0 en forma indistinta. Para los cálculos de EJCR (región elíptica de confianza conjunta) se utilizó el programa Matlab con rutinas diseñadas “*ad-hoc*”.

Resultados y Discusión

5 Resultados y discusión

Para la obtención de antígenos específicos de fase aguda de la toxoplasmosis, se comenzó seleccionando un conjunto de proteínas denominadas P30, P22 y P35 mencionadas en la literatura como antígenos de fase aguda. (Harning y col., 1996, Parmley y col., 2000, Lu y col., 2006). Sobre la base de estos estudios iniciales se intentó identificar por medio de cálculos teóricos, que regiones de estas proteínas contenían mayor número de epítopes. De este modo, en la etapa siguiente, se procuraría expresarlos en forma soluble, para su posterior utilización en inmunoensayos. Al momento de seleccionar un programa de todos los disponibles “on line”, verificamos que éstos no informaban el valor predictivo positivo, VPP. Por ello, se inició un trabajo de identificación del programa que predijera más fidedignamente los epítopes. La búsqueda se realizó comparando los resultados arrojados por 5 programas, a los que se solicitó predicción de epítopes pertenecientes a 11 proteínas cuyos epítopes lineales habían sido perfectamente establecidos experimentalmente (Costa y col., 2013). Se analizó cuál de ellos presentaba el mayor VPP (ver punto 6.1, sección Experimentos Auxiliares) y para predecir epítopes lineales, se trabajó con este programa, que resultó ser AAPred.

El análisis de los Ang seleccionados permitió identificar en P35 dos regiones que concentraban los determinantes antigénicos, a las cuales se las denominó P35A y P35B. Los Ang P30 y P22 presentaban los determinantes antigénicos distribuidos homogéneamente, por lo tanto al momento de diseñar su clonado se tuvieron en cuenta criterios que faciliten la expresión y solubilidad mas allá de la antigenicidad.

5.1 Evaluación de antígenos recombinantes de *T. gondii*.

5.1.1 Antígeno P30

El antígeno de superficie 1 de *T. gondii*, SAG1, también denominado proteína P30, se ha identificado como antígeno de fase aguda (Harning y col; 1996), por lo cual se procuró obtenerlo en forma soluble. Sobre la base de ensayos previos realizados en el LTI se continuó con la obtención y purificación de dos porciones del antígeno P30 denominadas P30L y P30C (sección 4.10, Materiales y Métodos). Luego de la cosecha y lisis de las bacterias, se separaron las fracciones soluble e insoluble del extracto, se tomaron alícuotas de ambas y se analizaron por SDS-PAGE. Los Angs buscados sólo se

obtuvieron como proteínas precipitadas en cuerpos de inclusión en la fracción insoluble. Por ello se discontinuó el trabajo con las fracciones de P30.

5.1.2 Antígeno P22

El antígeno de superficie 2 o antígeno P22 de *T. gondii* (Gen Bank n° M33572) ha sido también identificado como antígeno de fase aguda (Parmley y col., 1992, Lau & Fong, 2006). En el presente trabajo se procuró amplificar la región del gen que permitiese expresar la proteína recombinante en forma soluble. El producto de amplificación se resolvió en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, como se observa en la Fig. 5.1.

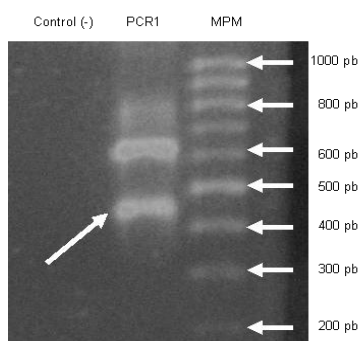


Figura 5.1. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en transiluminador UV. En PCR1 se observan los productos de amplificación obtenidos utilizando cebadores específicos para la región P22C, donde se señala el fragmento de tamaño esperado. Control (-) muestra la misma mezcla de reacción pero sin ADN molde. MPM indica el marcador de peso molecular y el tamaño de los fragmentos se indica sobre la derecha.

Se aisló y purificó el fragmento de interés utilizando un equipo comercial detallado en el punto 4.8, sección Materiales y Métodos. En un paso posterior se ligó al vector pET32a, y con la construcción resultante se transformaron células competentes de *E. coli*. Las células transformadas se seleccionaron creciéndolas en medio LB con ampicilina. Se verificaron las condiciones para la expresión en forma soluble (punto 4.10, sección Materiales y Métodos), encontrándose que las condiciones óptimas eran 0,1 mM IPTG y 12 h de incubación con agitación vigorosa.

Para la inducción preparativa se siguió el protocolo detallado en la sección 4.10, de Materiales y Métodos. La Fig. 5.2 muestra la fotografía de un gel de poliacrilamida, luego de la tinción, donde se analizaron alícuotas de todos los extractos obtenidos en los distintos pasos separativos de la proteína P22C.

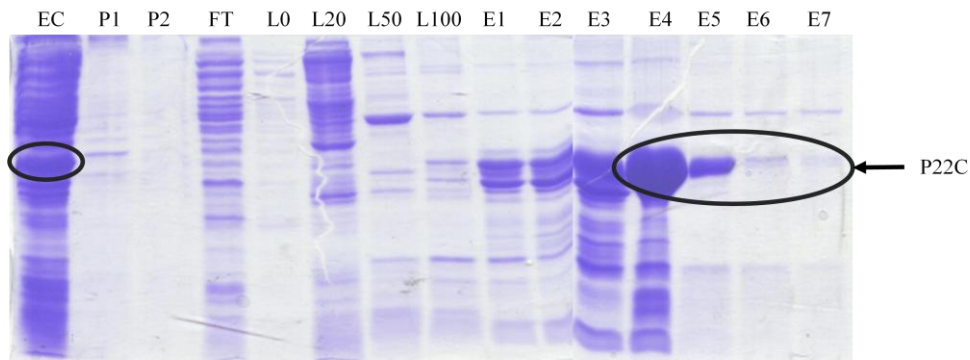


Figura 5.2. Gel de poliacrilamida teñido con azul brillante de Coomassie. En cada calle se sembraron 1 μ L de muestra. EC indica el extracto crudo, P1 muestra la fracción insoluble del lisado celular, P2 la fracción insoluble luego del congelamiento-descongelamiento del extracto centrifugado, FT muestra el extracto que pasó por la columna. Con L, se indican las calles con las fracciones de lavados sucesivos con tampón imidazol, 0 mM, 20 mM, 50 mM y 100 mM, respectivamente. E, muestra las fracciones de elución con solución imidazol 250 mM. Las fracciones de elución recolectadas fueron de 1,5 mL cada una.

5.1.3 Antígeno P35

El antígeno de superficie P35 de *T. gondii* (Gen Bank n° AF01275) se ha identificado como antígeno de fase aguda y distintas porciones del mismo presentan diferentes desempeños en su uso diagnóstico (Lu y col.; 2006). Sobre la base de ensayos previos realizados en el LTI se continuó con la obtención y purificación de las dos porciones del antígeno P35 denominadas P35A y P35B.

Se ensayó la expresión del antígeno P35A (punto 4.9, sección Materiales y métodos) y sólo se obtuvo como cuerpos de inclusión en la fracción insoluble. Si bien fue posible disolver las proteínas recombinantes en urea 8 M, al dializar volvían a precipitar.

El antígeno P35B se pudo obtener en forma soluble y las condiciones óptimas encontradas para la inducción del mismo fueron: IPTG 1 mM y 4 h con agitación vigorosa. La Fig. 5.3 muestra una imagen del gel de poliacrilamida luego de la corrida electroforética y su tinción. Se observó que una banda de la fracción soluble estaba sobreexpresada en los cultivos inducidos.

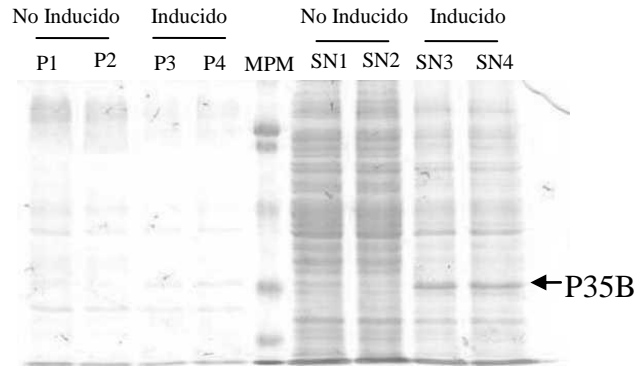


Figura 5.3. Gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. Se muestra lo obtenido para alícuotas de dos cultivos no inducidos 1 y 2, y dos inducidos 3 y 4. Con P se designan las fracciones insolubles en la solución de lisis y con SN las fracciones solubles. Las bandas que se observan del MPM corresponden a fragmentos de 19,445 KDa; 28,829 KDa; 36,545 KDa; 49,491 KDa; 80,664 KDa; 103,035 KDa. Se indica la banda sobreexpresada de tamaño esperado.

Para la inducción preparativa del antígeno P35B se siguió el protocolo descrito en el punto 4.10, sección Materiales y Métodos En la Fig. 5.4 se muestra un gel de poliacrilamida, luego de la tinción, donde se analizaron alícuotas de todos los extractos obtenidos en los distintos pasos separativos.

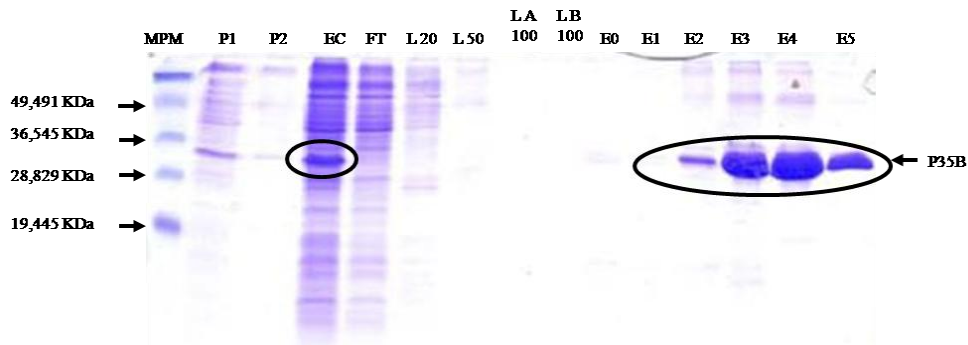


Figura 5.4. Gel de poliacrilamida teñido con azul brillante de Coomassie. En cada calle se sembraron 7 μ L de muestra. P1, fracción insoluble del lisado celular; P2 fracción insoluble luego del congelamiento-descongelamiento del extracto centrifugado; FT muestra el extracto que pasó por columna; L, calles con las fracciones de lavados sucesivos con tampón imidazol, 20 mM, 50 mM y 100 mM, respectivamente; E, fracciones de elución con solución imidazol 250 mM. Las fracciones recolectadas fueron de 1,5 mL cada una.

En consecuencia, se continuó el trabajo con P35B y se descartó transitoriamente la utilización del Ang P35A.

5.2 Marcado de antígenos recombinantes de *T. gondii*

Para los ensayos tipo ELISA de captura específicos para IgM, se propuso utilizar como sistema revelador la enzima HRP-EAV que se une específicamente a biotina. En consecuencia, se procedió a marcar los Ang solubles obtenidos con biotina.

La reacción de conjugación se realizó siguiendo el protocolo mencionado en el punto 4.13, sección Materiales y Métodos. La conjugación se evidenció con la reacción de color indicada en el inciso 4.13. En la Fig. 5.5 se muestra la membrana de nitrocelulosa sobre la que se fijaron las proteínas P22 y P35B luego del revelado cromogénico con la enzima HRP conjugada a streptavidina. Las reacciones de conjugación se llevaron adelante por separado.



Figura 5.5. Membranas de nitrocelulosa evidenciando las proteínas: P35B conjugada (izquierda) y P22C conjugada (derecha).

5.3 Inmunoensayos

Estudios preliminares (ver punto 6.2, sección Experimentos Auxiliares) con los antígenos recombinantes obtenidos permitieron verificar por ELISA indirecto que sueros confirmados positivos arrojaban resultados positivos, mientras que los sueros negativos daban el ensayo negativo. Se procedió entonces a evaluar la capacidad de los antígenos obtenidos para discriminar sueros de pacientes con infección aguda de sueros provenientes de pacientes con infección crónica.

5.3.1 Inmunoensayos con detección fotométrica

Como se anticipó en la introducción, se realizaron ELISA siguiendo dos alternativas de captura. En la primera alternativa que denominamos A, se procuró capturar selectivamente la máxima cantidad de Ac del isotipo que se deseaba detectar (IgMh), adsorbiendo sobre la placa un anticuerpo “*ad-hoc*” (Ac-a-IgMh). En la segunda alternativa que denominamos B, se buscó capturar con el Ang recombinante la máxima cantidad de Ac específicos, independientemente del isotipo que se tratara. En el paso siguiente del esquema B, se tomó ventaja de la mayor valencia de las IgM respecto de las IgG, para el revelado.

5.3.1.1 Evaluación del esquema A

Sobre placas de ELISA se capturaron los Acs IgMh, revelándose la presencia de los específicos con los antígenos obtenidos marcados con biotina y uniendo a estos últimos la enzima HRP-EAV. En los ensayos preliminares (ver punto 6.2.2, sección Experimentos Auxiliares) se identificó la cantidad de antígeno marcado y las diluciones de HRP-EAV óptimas a utilizar para revelar la presencia de IgM específica capturada. En la Tabla 5.1 se

muestran los valores de absorbancia a 450 nm obtenidos para el panel de 9 sueros ensayados. Se utilizaron 5 μg de P22C-biotina por pocillo y 100 μL de HRP-EAV en dilución 1/2000.

Tabla 5.1. Absorbancias a 450 nm obtenidas en los ELISA siguiendo el esquema de captura A, descrito más arriba.

	Placa 1	Placa 2
Agudos	0,100	0,158
	0,311	0,273
	0,140	0,165
Crónicos	0,281	0,322
	0,256	0,278
	0,260	0,226
Negativos	0,217	0,168
	0,235	0,179
	0,409	0,354
Sin suero	0,135	0,134
	0,143	0,114
	0,126	0,100
Sin suero Sin P22cBiotina	0,071	0,050
	0,070	0,037
	0,047	0,040

Los resultados obtenidos con ambos antígenos fueron desalentadores (los resultados obtenidos con P35B biotina no se informan), ya que no se hallaron diferencias significativas entre los valores de absorbancia obtenidos con sueros de pacientes agudos, crónicos y negativos.

5.3.1.2 Esquema B

En base a los resultados obtenidos en la sección anterior se orientaron los ensayos realizando los ELISA siguiendo un esquema no clásico al que denominamos B.

Debido a la baja sensibilidad que presentaron los Angs conjugados a biotina para detectar los Acs específicos, pensamos en hacer una primera etapa de concentración de los Acs específicos en la placa para luego revelar con el Ang conjugado a biotina. Esto se hizo adsorbiendo antígeno recombinante sobre la superficie de la placa de poliestireno, enfrentándola luego al suero a ensayar. Así, se captura selectivamente las inmunoglobulinas que reconocen al antígeno, ya sean IgM o IgG. Luego, se expone la placa al mismo antígeno recombinante pero ligado a biotina, que se unirá a los anticuerpos específicos para dicho Ang, previamente capturados. Finalmente, se revela

con HRP conjugada a streptavidina que forma un complejo estable con biotina. De esta forma, se aumenta la cantidad de Ang marcado en mayor proporción para IgM que para IgG, dada la multivalencia de este isotipo de inmunoglobulina. En la Fig. 5.6 se reproduce el esquema B, que fue el que brindó los resultados más promisorios.

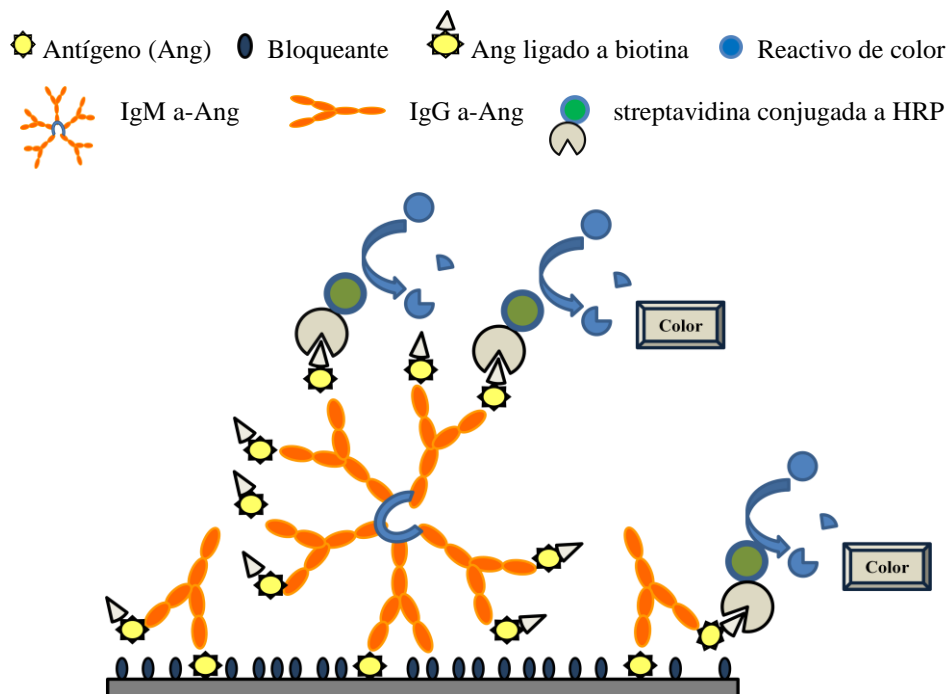


Figura 5.6. Esquema de ensayo ELISA de captura tipo B. El antígeno expuesto en la placa captura la porción de las IgM e IgG específicas presentes en el suero humano. Haciendo uso de la polivalencia de las IgM, su presencia se revela con el antígeno conjugado a biotina, streptavidina ligada a HRP, adicionando el sustrato de la enzima y un cromógeno actuando como cosustrato.

Buscando diferenciar sueros de pacientes en fase de infección aguda (agudos) de sueros provenientes de pacientes sin infección (negativos). En la Tabla 5.2 se muestran los valores de absorbancia a 450 nm obtenidos.

Tabla 5.2. Absorbancias a 450 nm obtenidas en los ELISA siguiendo el esquema de captura B.

Sueros \ Ang	Ang			
	P35B 0.5ug	P35B 0.01ug	P22C 0.5ug	P22C 0.01ug
Agudos	2,131	1,567	0,335	0,296
	1,849	1,311	0,65	0,413
Negativos	1,76	1,350	0,282	0,327
	1,025	1,676	0,262	0,325
Sin suero	1,658	1,658	0,174	0,149
	1,812	1,504	0,130	0,144
Sin Ang conjugado	0,055	0,04	0,041	0,045
	0,057	0,042	0,039	0,04

Este ensayo exploratorio demostró que los antígenos P22C y P35B pueden ser usados potencialmente en la detección de toxoplasmosis aguda, realizando inmunoensayos con el esquema B propuesto en el presente trabajo. Por ello, siguiendo este esquema de trabajo se exploraron cuales eran las condiciones óptimas (ver punto 6.2.3, sección Experimentos Auxiliares). Así, se estableció la dilución de la enzima HRP-EAV (1/2000), la cantidad de P22C biotina (5 μ g por pocillo) y se acotaron los valores de P22C adsorbidos inicialmente en la placa entre 500 y 50 ng. Finalmente, se realizaron tres ensayos en paralelo donde se evaluó la cantidad de antígeno adsorbido inicialmente en la placa y se amplió el panel de sueros. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig.5.7

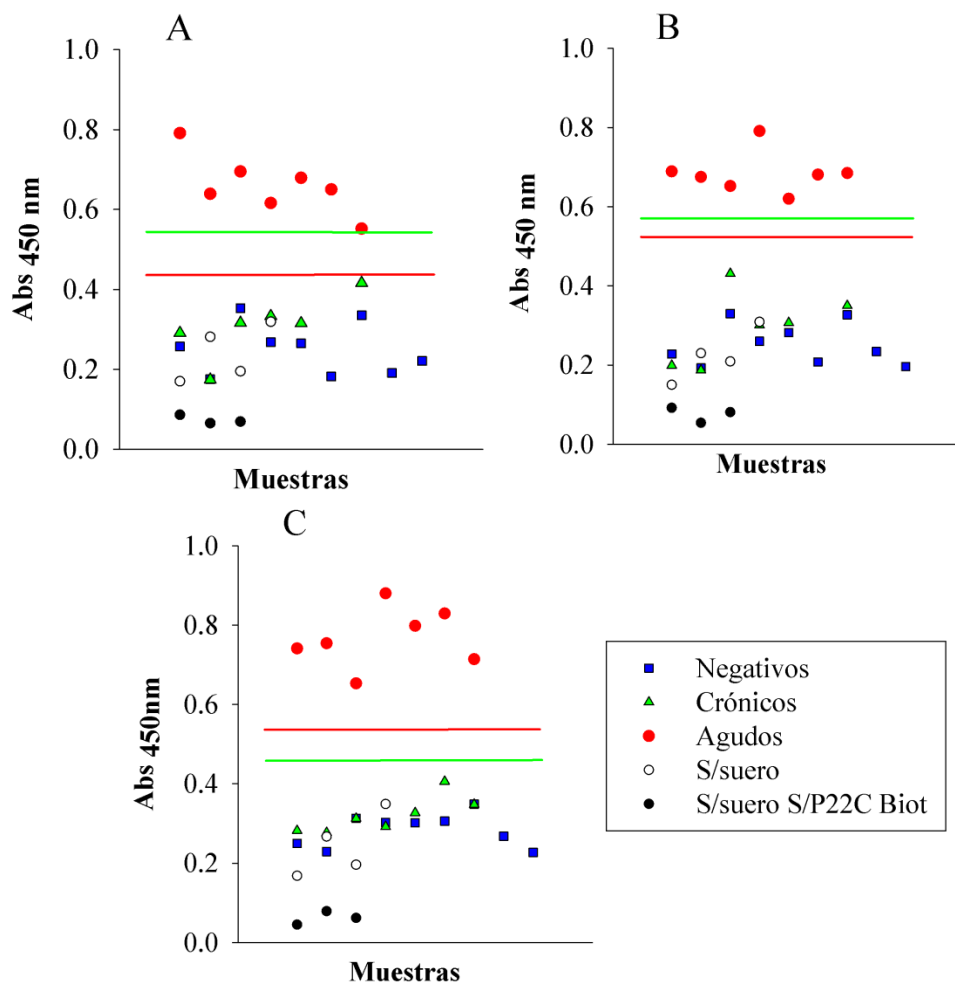


Figura 5.7 Absorbancias a 450 nm para los ELISA realizados con el esquema B. (A) 50 ng de Ang P22C. (B) 200 ng de Ang P22C. (C) 500 ng de Ang P22C. Con ● se indican los sueros provenientes de pacientes con infección aguda (Agudos), con ▲ los provenientes de pacientes con infección crónica (Crónicos) y con ■ los de pacientes sin infección (Negativos). Con la línea roja (—) se indica el valor de media menos tres desvíos estándares de los agudos ($Abs_A - 3 DS_A$) y con la línea verde (—) el valor de media más tres desvíos estándares de los crónicos ($Abs_C + 3 DS_C$).

En las tres condiciones evaluadas se obtiene una separación de las señales obtenidas al ensayar sueros provenientes de los pacientes con infección aguda (Agudos) de los sueros provenientes de pacientes con infección crónica (Crónicos) y los pacientes sin infección (Negativos).

Los resultados obtenidos con P35B no resultaron alentadores debido al elevado ruido de fondo (altos valores de absorbancia de los blancos). Por lo tanto, los ensayos electroquímicos se iniciaron sólo con P22C.

Mijak y colaboradores (Hiszczyńska-Sawicka y col., 2005) señalan que ya se ha demostrado la utilidad del Ang SAG2 para detectar IgG en el suero de pacientes con toxoplasmosis aguda y crónica (Parmley y col., 1992), destacando que en los resultados presentados por ese mismo grupo en otra publicación (Li y col., 2000a) sólo se examinaron un reducido número de sueros provenientes de pacientes con infección aguda, con resultados tanto positivos como negativos. También señala que Maine y colaboradores (Aubert y col., 2000) no obtuvieron resultados satisfactorios con este antígeno recombinante, realizando ELISA indirecto. Los resultados obtenidos en este trabajo con ELISA utilizando el esquema A han confirmado lo señalado por Mijak y col. sobre el desempeño de este Ang. El análisis que estos autores hacen se orienta a que el uso de estos antígenos recombinantes debe contemplar necesariamente el uso combinado de otros Angs. Por otro lado, en el presente trabajo se han presentado resultados que permitirían complementar esta visión, incorporando otro esquema para la detección de sueros de infectados agudos. Si bien es necesario ampliar el número de sueros para validar el ensayo, los resultados son promisorios. Hemos propuesto que las diferencias obtenidas en los ELISA de captura siguiendo el esquema B, pueden deberse a dos mecanismos no excluyentes entre sí y que podrían estar actuando en conjunto. Por un lado, está la multivalencia que presentan las IgM respecto de las IgG, que generaría una amplificación selectiva de acuerdo al isotipo. Por otro lado, independientemente del isotipo capturado, el Ang de fase aguda brindaría la sensibilidad y especificidad necesaria al ensayo identificando Acs de fase aguda. Resta pues esclarecer si esto es así fehacientemente, o si hay algún otro mecanismo actuando concomitante que permita explicar las diferencias observadas aquí entre sueros de fase aguda y de infectados crónicos.

5.3.2 Inmunoensayos con detección amperométrica, utilizando los antígenos recombinantes

Los bioelectrodos se ensamblaron como se describe en el inciso 4.19.1.1, de Materiales y Métodos. Al realizar los inmunoensayos con las diluciones pertinentes de suero humano (muestra incógnita), en caso de suero de paciente infectado (+), estarán presentes los anticuerpos IgG anti-P22 (analito de interés). Cuando se sumergen en una dilución de anticuerpos anti-IgG h conjugado con HRP (segundo anticuerpo marcado), éste quedará retenido en el electrodo y frente al agregado del sustrato de la enzima (H_2O_2) sobre PBS conteniendo el mediador FcMe, se genera la especie que será electro-reducida sobre el electrodo al potencial de trabajo, 0,08 V (vs. Ag/AgCl, ver inciso 4.20. 2). A los fines de claridad, en la Fig. 5.8 se reformula el esquema de funcionamiento del biosensor, previamente esquematizado (Fig. 2.12), para el caso particular aquí detallado, donde el Ang es la proteína P22C.

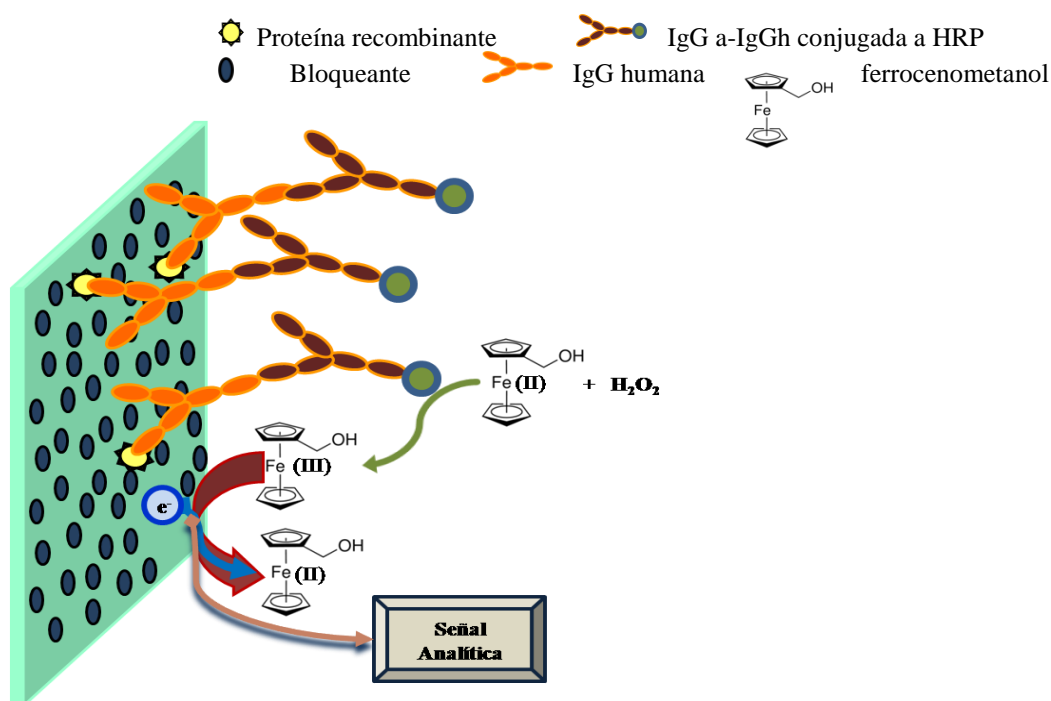


Figura 5.8. Sobre la superficie del electrodo se fija la proteína P22C que capturará los anticuerpos específicos, si están presentes en el suero. El revelado se realiza con un segundo anticuerpo, específico para IgG humana marcado con HRP que, en presencia de H_2O_2 , oxida el mediador FcMe que se reduce sobre la superficie del electrodo, generando la señal analítica.

En la Fig. 5.9 se muestran tres amperogramas representativos, obtenidos cuando se ensayaron sueros confirmados (+), sueros confirmados (-), y blancos (sin suero alguno). Los valores de corrientes se corrigieron por los valores de área reales determinados mediante voltametría cíclica a distintas velocidades de soluciones de ión ferricianuro (punto 4.19.3.2, sección Materiales y Métodos).

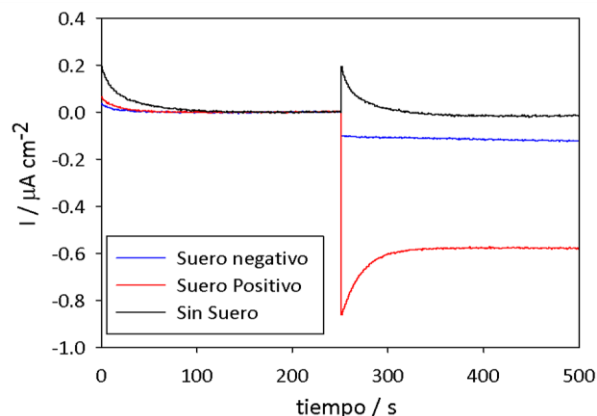


Figura 5.9 Amperometrías comparativas con bioelectrodos ensamblados con la proteína P22C

En la Tabla 5.4 se resumen los resultados de los ensayos sobre muestras confirmadas positivas, negativas y blanco.

Tabla 5.4. Valores promedios de la corriente catalítica diferencial obtenidas utilizando bioelectrodos ensamblados con el antígeno P22C.

Muestra	$j = I_c/\text{área}$ ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	DS ($\mu\text{A cm}^{-2}$)
Positivos	-0,455	0,026
Negativos	-0,150	0,021
Sin suero	-0,052	0,04

DS: desviación estándar

Las diferencias en las señales registradas fueron estadísticamente significativas, verificándose la potencialidad del uso de esta metodología para discriminar entre sueros de pacientes infectados con *T. gondii*, de sueros de pacientes no infectados. Los ensayos electroquímicos preliminares informados permiten pensar en el desarrollo de un biosensor amperométrico. A futuro sería deseable poder establecer un biosensor electroquímico basándonos en el esquema B de los ELISA presentados en este trabajo de Tesis, que permita la discriminación entre sueros de pacientes cursando infección aguda de sueros de pacientes con infección crónica.

5.4 Determinación de la actividad electroquímica del glicerol en medio acuoso

Si bien desde hace varios años se ha estudiado la oxidación electrocatalítica de polialcoholes, aún no existe acuerdo acerca del procedimiento más conveniente para su cuantificación electroquímica, así como tampoco ha sido posible identificar un único mecanismo que dé cuenta de los productos obtenidos luego de la reacción electrónica (Kahyaoglu *et. al*, 1984; Kwon & Koper, 2010).

Con el fin de encontrar el electrodo y las condiciones más convenientes para realizar la cuantificación del glicerol, se realizaron ensayos exploratorios de voltametrías cíclicas utilizando electrodos de: carbono vítreo, pasta de C (grafito y vítreo), Au, Pt y Ag. Los medios ensayados fueron: HClO₄ 0,1 M, solución tampón de fosfato salino (PBS) pH 7,2; 9,0; 12,0; NaCl al 0,8% m/v y NaOH 0,1 M. El intervalo de concentración de glicerol utilizado fue de $1,00 \times 10^{-5}$ M hasta 0,1 M.

En estos ensayos iniciales, las máximas señales se obtuvieron con electrodos de Au en medio alcalino (NaOH 0,1 M), coincidiendo con lo descrito por Lamy (Kahyaoglu *et. al.*, 1984). A modo ilustrativo en la Fig. 5.10 se observan dos voltametrías cíclicas para electrodos de oro y de platino en medio alcalino.

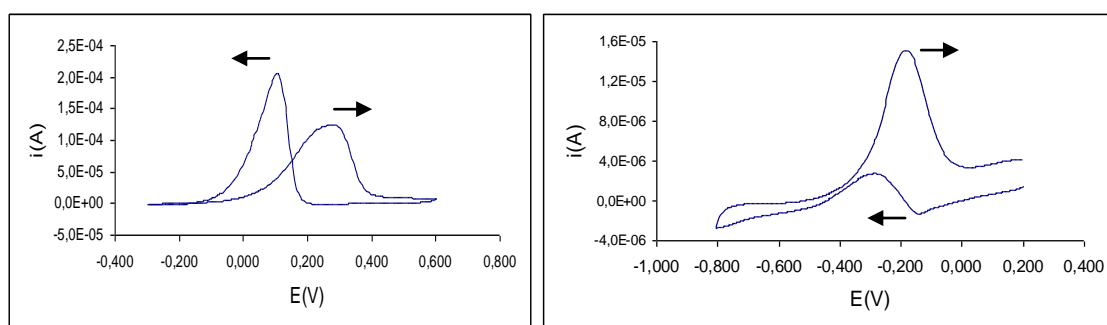


Figura 5.10. Voltamperogramas típicos para soluciones de glicerol 10^{-2} M en soluciones de base fuerte (NaOH 0,1M), utilizando electrodos de trabajo de Au (izquierda) y Pt (derecha).

En una etapa posterior se verificó que las señales obtenidas, I_p , respondían proporcionalmente a la concentración de glicerol. Se realizó una curva de calibración en el intervalo de concentraciones de $5,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ M. Todas las mediciones se hicieron por triplicado. La Tabla 5.5 muestra las medias de las corrientes de pico obtenidas para cada concentración ensayada, con su correspondiente desvío estándar. La corriente de pico se midió tomando una línea de base recta a un valor de potencial de $0,10 \text{ V} \pm 0,05 \text{ V}$, usando algoritmos propios del programa GPES 4.9.

Tabla 5.5. Valores medios de corriente obtenidos por voltametría cíclica para la oxidación del glicerol en medio alcalino (NaOH 0,1 M) sobre electrodos de oro.

[Glicerol] (mM)	I_p ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	DS I_p ($\mu\text{A cm}^{-2}$)
0,50	1,8	0,32
1,00	2,8	0,38
2,00	7,4	0,41
5,00	17,	0,35
7,50	26,2	0,55
10,0	34,7	0,53

En la Fig. 5.11 se presenta la dependencia de la corriente de pico voltamperométrica con la concentración de glicerol. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de cada medida, realizada por triplicados independientes. Se ajustaron estos valores a una recta con el método de los mínimos cuadrados y se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\frac{I_p}{A} = 3.5 \times [\text{Glicerol}] - 0.692 \quad [5.1]$$

donde I_p/A está en $\mu\text{A cm}^{-2}$ y $[\text{glicerol}]$ en mM. El valor de coeficiente de regresión (R^2) obtenido fue de 0,9980.

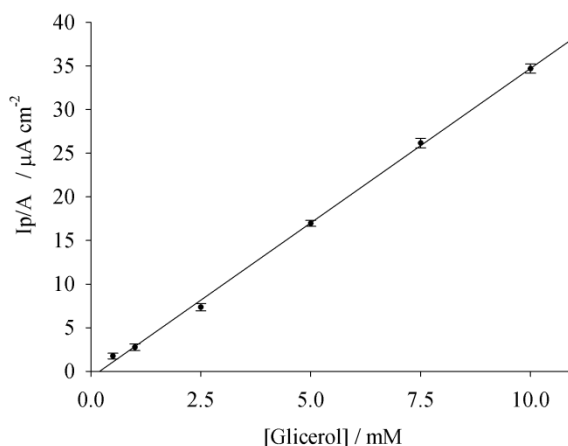


Figura 5.11 Dependencia de la corriente de pico voltamperométrica con la concentración de glicerol en medio alcalino (NaOH 0,1 M). Se muestran los valores promedios, de tres medidas independientes. Las barras de error se corresponden a los desvíos estándares.

En estas condiciones de trabajo, el pico de corriente oxidativa tiene dependencia lineal con la concentración de glicerol. En función de estos resultados se orientó la búsqueda hacia una metodología que permitiese determinar al glicerol en concentraciones de 10^{-5} M o menores. Para esto, iniciamos ensayos con técnica amperométrica.

Se realizaron los ensayos amperométricos como se describe en el punto 4.20.2 de la sección Materiales y Métodos. La Fig. 5.12 muestra el resultado de una amperometría típica para una solución de glicerol.

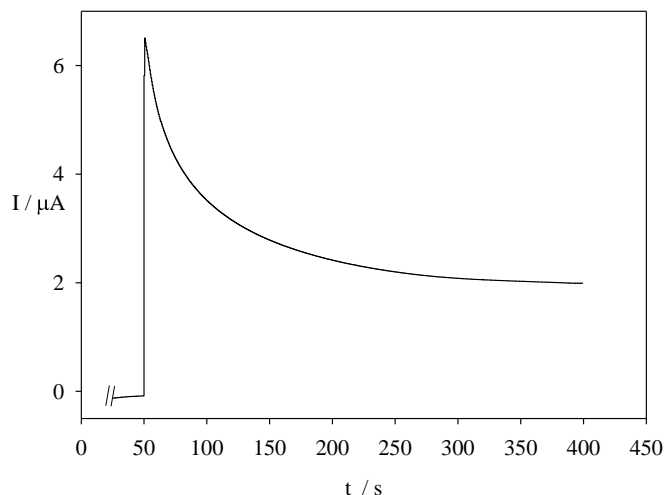


Figura 5.12 Amperometría típica de una muestra con glicerol (concentración en celda 1 mM). Se dejó estabilizar la corriente para una solución de NaOH 0,1 M y a los 50 segundos se realizó el agregado de la muestra con glicerol y se midió la corriente hasta los 400 segundos.

Se ensayaron soluciones de glicerol cuya concentración en la celda electrolítica fueron desde 0,01 mM hasta 5 mM. Como blanco se utilizó solución de NaOH 0,1 M. La corriente catalítica se midió como la diferencia entre la corriente final y la inicial (punto 4.20.2, sección Materiales y Métodos). A este valor de corriente, se lo dividió por el valor de área real del electrodo medida anteriormente, esta densidad de corriente (I_c/A) se tomó como la señal analítica. En la Tabla 5.6 se muestran las medias de las señales obtenidas para cada concentración de glicerol ensayada, con su correspondiente desvío estándar.

Tabla 5.6. Valores medios de densidades de corriente obtenidos por amperometría para la oxidación de glicerol en medio alcalino (NaOH 0,1 M).

[Glicerol] (mM)	I_c / A ($\mu A \text{ cm}^{-2}$)	DS ($\mu A \text{ cm}^{-2}$)
0,000	0,447	0,029
0,010	0,763	0,016
0,025	1,098	0,068
0,050	1,510	0,055
0,100	2,85	0,49
0,250	6,09	0,36
0,500	12,45	0,33
0,750	17,30	0,097
1,00	23,61	0,099
1,50	34,45	0,33
1,75	39,97	0,20
2,00	46,13	0,45

En la Fig. 5.13 se presenta la recta de regresión lineal obtenida a partir de los valores promedio de densidades de corriente para soluciones de glicerol en el intervalo de concentraciones de 0,025 mM y 2 mM. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándares de cada medida. La ecuación de la recta obtenida por el método de mínimos cuadrados fue:

$$\frac{I_c}{A} = 22,7 \times [\text{Glicerol}] + 0,6 \quad [5.2]$$

Donde I_c/A está en $\mu\text{A cm}^{-2}$ y $[\text{Glicerol}]$ en mM, el valor del coeficiente de regresión (R^2) obtenido fue de 0,9950.

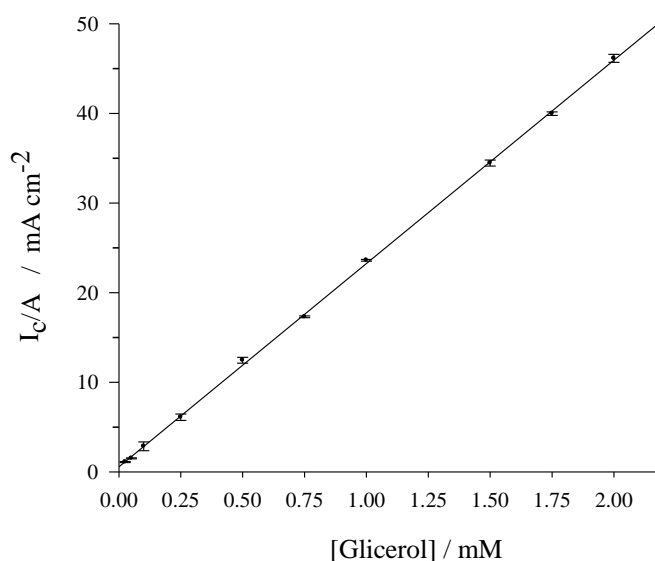


Figura 5.13 Curva de calibración obtenida para glicerol en medio alcalino (NaOH 0,1 M) con la técnica amperométrica. Se muestran los valores promedio de tres medidas independientes para cada solución. Las barras de error que se muestran corresponden al DS de cada punto.

Las cifras de mérito para esta técnica resultaron ser:

Límite de detección:	10 μM
Límite de cuantificación:	24 μM
Límite de discriminación:	10 μM
Intervalo de linealidad:	0,024 mM – 2,00 mM

5.5 Cuantificación de glicerol en medios acuosos complejos

El glicerol es corrientemente utilizado como principal fuente de carbono en cultivos bacterianos, siendo degradado eficientemente por sistemas enzimáticos que utilizan mecanismos redox. Por lo tanto, se comenzó a estudiar la posible cuantificación electroquímica de este alcohol, intentando detectar concentraciones del orden 10^{-5} M o

menores, para poder así evidenciar su consumo en medios de cultivos bacterianos que contienen glicerol como nutriente. El método amperométrico con electrodo de oro no fue lo suficientemente selectivo para glicerol, cuando este se encontraba en matrices complejas (no se muestran los resultados), por lo tanto al momento de cuantificarlo en medios de cultivos bacterianos tuvimos que optar por otra metodología.

Sobre la base del trabajo de Tuñón-Blanco y col. (Álvarez-González, *et. al.* 2000) se busco desarrollar un biosensor selectivo para este analito.

Para verificar la funcionalidad del modelo propuesto, se realizaron ensayos espectrofotométricos. La coenzima NAD(H) en su forma reducida (NADH) presenta un máximo de absorción a 340 nm, ausente en la forma oxidada (NAD⁺). Puede apreciarse en la Fig. 5.14, que el mediador electroquímico, Fe(CN)₆³⁻, presenta un máximo de absorción a 420 nm, ausente en la forma reducida, Fe(CN)₆⁴⁻. En un primer ensayo, se verificó espectrofotométricamente que la longitud de onda escogida podía utilizarse para el seguimiento de la reacción. En una serie de ensayos posteriores se monitoreó la reacción enzimática, en presencia y ausencia del mediador electroquímico, haciendo uso de estas propiedades espectrales.

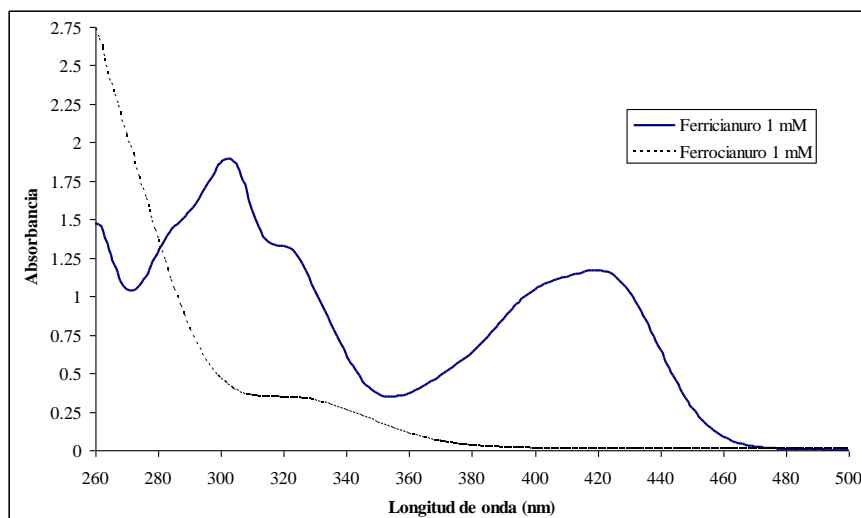


Figura. 5.14. Espectros de absorción UV-visible para las especies Fe(CN)₃³⁻ 1 mM y Fe(CN)₃⁴⁻ 1 mM. Ambas especies fueron disueltas en solución tampón carbonato pH 10,5. Puede apreciarse claramente que el máximo de absorción a 420 nm presente en el Fe(CN)₆³⁻ se encuentra ausente en el Fe(CN)₆⁴⁻. La velocidad de barrido fue 1200 nm min⁻¹.

5.5.1 Evaluación del modelo propuesto por medio de lecturas espectrofotométricas

El primer ensayo para validar el modelo propuesto fue seleccionar la longitud de onda óptima para el seguimiento espectrofotométrico. A tal fin, se llevaron adelante dos

reacciones: a) glicerol disuelto en medio 7H9, coenzima, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ y enzima GIDH, y b) glicerol disuelto en medio 7H9, coenzima, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ pero sin la enzima GIDH. En ambos casos se realizó un barrido espectral de 320 a 480 nm, registrándose la absorbancia, a una velocidad de barrido de 1200 nm min^{-1} , cada 10 min. Ambas reacciones se llevaron a cabo en solución tampón carbonato pH 10,5. En la Fig. 5.15 se muestran los barridos espectrales obtenidos para cada reacción y, en ella, puede apreciarse que la mayor diferencia se presenta a la longitud de onda prevista (420 nm).

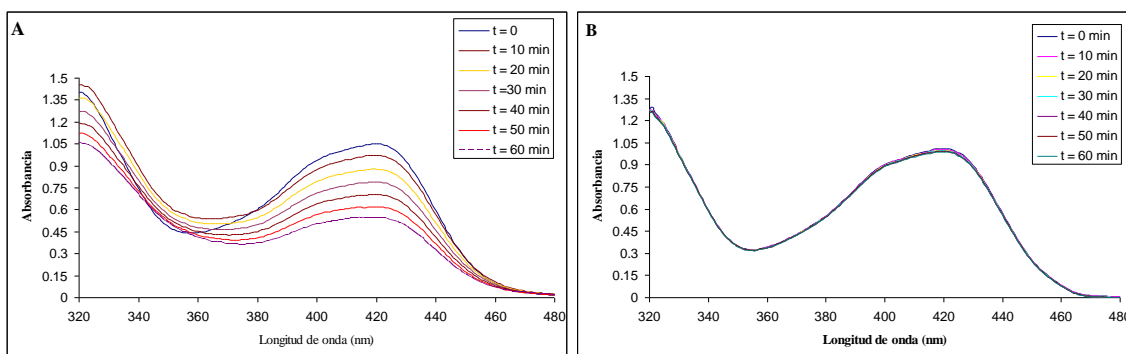
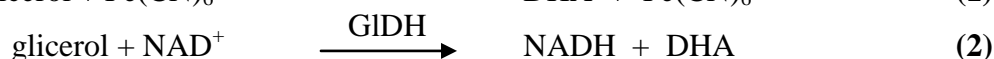


Figura 5.15. Espectros de absorción UV-visible para mezclas de reacción. (A) En presencia de enzima GIDH (B) Sin enzima GIDH. Barrido espectral cada 10 min.

Para elucidar si el consumo de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ observado se correspondía cuantitativamente con el NADH generado y, en consecuencia, con el glicerol consumido, se tuvieron en cuenta las siguientes reacciones:



Se realizaron series de 3 reacciones en paralelo, a saber **a)** blanco de reacción (**BR**) con enzima GIDH, NAD^+ y $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, en ausencia de glicerol, donde se siguió la absorbancia a 420 nm; **b)** reacción (1) con enzima GIDH, NAD^+ , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ y glicerol, donde se siguió la desaparición de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ a 420 nm. **c)** reacción (2) con enzima GIDH, NAD^+ y glicerol, donde se siguió la aparición de NADH a 340 nm. Debe tenerse en cuenta, por un lado, que el NAD^+ es reducido a NADH en la reacción (2) no se regenera mientras que, en la reacción (1) se regenera por la presencia del anión $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Esto implica que, si bien ambas reacciones se lentifican con el paso del tiempo a causa del consumo de glicerol (y acumulación de DHA), la reacción (2) se lentifica más que la (1) porque se consumen tanto el glicerol como el NAD^+ y se acumulan ambos productos de reacción (DHA y NADH). Los resultados pueden verse en la Fig. 5.16

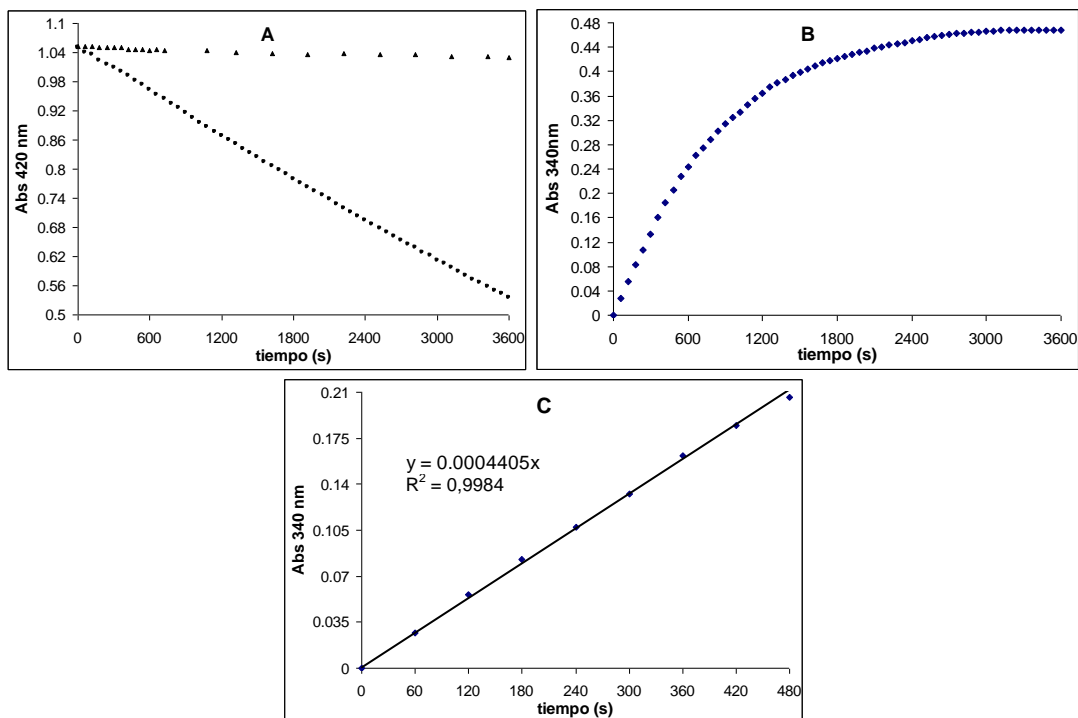


Figura 5.16. Absorbancias registradas a 420 nm durante las reacciones descritas en el texto. A) Blanco de reacción (BR), ▲, y reacción (1), ●. B) Reacción (2). C) Segmento inicial de la curva representada en B), a partir de la cual se calculó el valor límite de la velocidad inicial de reacción. Se muestra un experimento representativo de un original y replicado.

Se asumió que la reacción (1) transcurre a una velocidad constante en las condiciones en que se llevó a cabo. El análisis estadístico demuestra que hay una ligera tendencia a la no linealidad, evidenciada por la distribución de los residuos. No obstante, siendo las variancias iguales, se consideró que no hay un alejamiento significativo de la linealidad. Por ello, en los cálculos de variación de la concentración de coenzima a lo largo del tiempo de reacción, se tuvo en cuenta el cambio que se produciría si la velocidad de reacción se mantuviera constante e igual a la velocidad inicial. Para el caso del NAD^+ consumido (o NADH generado) en la reacción (2) tenemos:

$$v_i = \frac{\Delta[\text{NADH}]}{\Delta t} \quad [5.3]$$

Asumiendo que en el intervalo de concentraciones de trabajo se cumple la ley de Beer, la ec. [5.3] puede reescribirse como:

$$v_i = \frac{\Delta[\text{NADH}]}{\Delta t} = \frac{\Delta \text{Abs}_{340\text{nm}}}{\epsilon_{\text{NADH},340\text{nm}} \times b \times \Delta t} \quad [5.4]$$

Si la velocidad de la reacción enzimática se mantiene aproximadamente igual a la velocidad inicial por la regeneración de la coenzima, se puede admitir que la velocidad

de reacción es constante (reacción de orden cero para los reactivos) pudiéndose expresar la ec. [5.4] en la siguiente forma:

$$\frac{\Delta Abs_{340nm}}{\epsilon_{NADH,340nm} \times b \times \Delta t} = \frac{k \times \Delta t}{\epsilon_{NADH,340nm} \times b \times \Delta t} = \frac{k}{\epsilon_{NADH,340nm} \times b} \quad [5.5]$$

donde k es la constante de velocidad para esa reacción en unidades de absorbancia por unidad de tiempo (s^{-1}) y se obtiene como la pendiente del segmento lineal de la curva de la Fig. 5.16 B, presentado en la Fig. 5.16 C.

La variación de concentración total de coenzima se obtiene multiplicando el valor de velocidad por la variación de tiempo total:

$$\Delta[NADH] = \frac{k}{\epsilon_{NADH,340nm} \times b} \times \Delta t \quad [5.6]$$

siendo los valores de los parámetros y variables en cuestión:

$$\epsilon_{NADH, 340nm} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta t = 3600 \text{ s}$$

$$b = 1 \text{ cm}$$

$$k = 4,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

resultando:

$$\Delta[NADH] = \frac{4,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}}{6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}} \times 3600 \text{ s} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ M} \quad [5.7]$$

La variación de concentración del mediador será:

$$\Delta[Fe(CN)_6^{3-}] = \frac{\Delta Abs_{420nm}}{\epsilon_{Fe(CN)_6^{3-}, 420nm} \times b} \quad [5.8]$$

$$\epsilon_{Fe(CN)_6^{3-}, 420nm} = 1080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta Abs_{420nm} = 0,52$$

que reemplazando en la ec. [5.8] arroja:

$$\Delta[Fe(CN)_6^{3-}] = \frac{0,52}{1080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}} = 4,8 \times 10^{-4} \text{ M} \quad [5.9]$$

La variación de absorbancia observada en el blanco de reacción a lo largo de una hora fue de 0,0046 unidades de absorbancia, que representa menos del 1 % de la variación total observada en la reacción (1). Estos resultados permiten verificar que en las condiciones de reacción el $Fe(CN)_6^{3-}$ reducido a $Fe(CN)_6^{4-}$ equivale cuantitativamente al NADH generado en la reacción enzimática, de acuerdo a la siguiente estequiometría:



Lo mostrado corrobora la factibilidad del diseño de un biosensor de una sola enzima con un mediador soluble económico.

5.5.1.1 Evaluación de la señal con la concentración de glicerol

Para verificar si la señal analítica muestra dependencia con la concentración de glicerol, se realizaron 6 reacciones en paralelo, registrándose la absorbancia a 420 nm cada un minuto durante dos horas. Se realizó un blanco de reacción sin glicerol y cinco reacciones con concentraciones crecientes de glicerol. Como muestras se utilizaron el medio de cultivo de micobacterias Middlebrook 7H9 suplementado con glicerol a distintas concentraciones. En la Tabla 5.7, se presentan las concentraciones de glicerol en las mezclas de reacción y en las muestras. La Fig. 5.17 muestra la absorbancia a 420 nm para las seis reacciones.

Tabla 5.7. Concentraciones de glicerol en las mezclas de reacción.

Reacción	[glicerol] en mezcla de reacción (mM)	[glicerol] en muestra (mM)
Blanco	0	0
Muestra 1	1,1	22
Muestra 2	0,82	16
Muestra 3	0,55	11
Muestra 4	0,27	5,5
Muestra 5	0.11	2.2

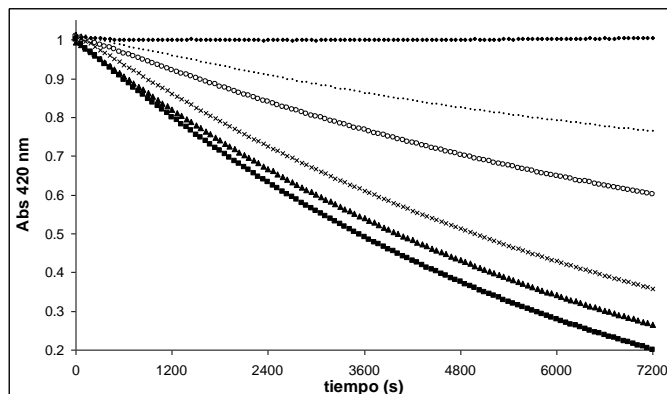


Figura 5.17. Absorbancia a 420 nm de las mezclas de reacción descritas en el texto. (■) 1,1 mM de glicerol, (▲) 0,82 mM de glicerol, (×) 0,55 mM de glicerol, (○) 0,27 mM de glicerol, (-) 0,11 mM de glicerol, (◆) blanco de reacción.

Habiendo verificado la dependencia de la señal analítica con el analito de interés, se procedió a determinar el intervalo dinámico lineal. Para ello, se realizaron las reacciones de color como se describe en el apartado 4.17 de la sección Materiales y métodos. Cada reacción se hizo por triplicado. En la Fig. 5.18 se muestran resumidos los resultados obtenidos.

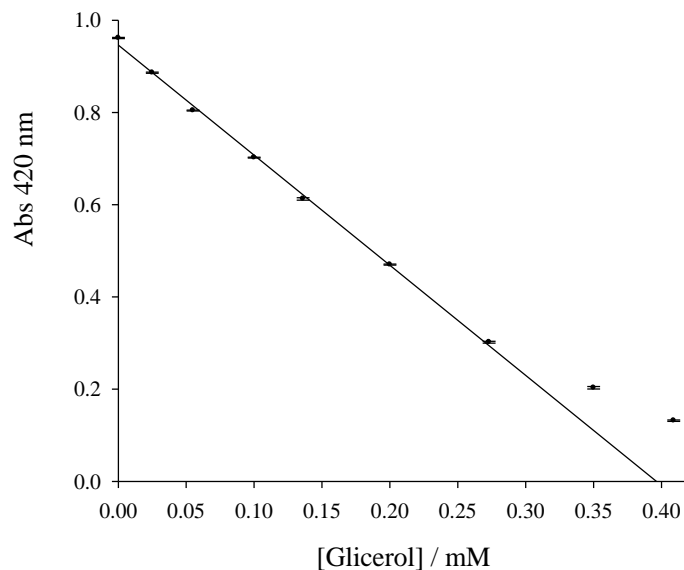


Figura 5.18. Curva de calibración para glicerol utilizando el método colorimétrico. Se muestran los valores promedios de tres medidas independientes. Las barras de error corresponden a los desvíos estándares.

La recta de regresión que se obtuvo a partir de estos valores fue:

$$\text{Abs}_{420\text{nm}} = 0,946 - 2,38 [\text{glicerol}] \quad [5.11]$$

cuyo coeficiente de regresión (R^2) fue 0,9980. En el intervalo de concentraciones de 0,025 a 0,27 mM la respuesta fue lineal.

5.5.1.2 Optimización de condiciones para disminuir el costo operativo

Se verificó la posibilidad de cuantificar glicerol en medio Middlebrook 7H9, optimizando las concentraciones de reactivos y los tiempos de reacción para obtener la máxima señal con la mezcla más económica posible. Se ensayaron distintas concentraciones de cofactor NAD^+ a utilizar y 2 tiempos de reacción, para una curva de calibrado de 6 puntos, consistente en un blanco y cinco estándares de glicerol, todos por triplicado.

Para verificar la factibilidad de disminuir la concentración de cofactor soluble sin alterar significativamente la sensibilidad del método, se utilizó un diseño experimental con un modelo de superficie de respuesta. Como factores, se tomaron la concentración de cofactor y el tiempo de reacción. Los niveles seleccionados en base a ensayos previos fueron: concentración de cofactor (NAD^+), 0,1 mM, 0,23 mM, 0,37 mM y 0,5 mM; tiempo, 1 y 2 h. Las respuestas que se evaluaron fueron la pendiente de una recta de regresión calculada a partir del método de mínimos cuadrados y el coeficiente de regresión lineal correspondiente. En la Tabla 5.8 se muestran los niveles parametrizados y los valores de las respuestas obtenidas

Tabla 5.8. Diseño experimental: factores parametrizados y respuestas obtenidas.

Estándar	[NAD^+]	Tiempo	Pendiente	R^2
4	1	-1	0,68	0,8790
7	0,3333	1	2,27	0,9962
8	1	1	1,84	0,9621
5	-1	1	1,59	0,9931
3	0,3333	-1	0,83	0,9590
2	-0,3333	-1	1	0,9850
6	-0,3333	1	2,44	0,9863
1	-1	-1	0,71	0,9914

Cada uno de los estándares indicados en la Tabla 5.8 se correlaciona con una curva de calibrado realizada. En la Tabla 5.9 se informan los valores de concentración de glicerol de las soluciones utilizadas para las reacciones de color, y la concentración correspondiente en la mezcla de reacción.

Tabla 5.9. Valores de concentración de los estándares utilizados para los ensayos de optimización.

Reacción	[glicerol] en mezcla de reacción (mM)	[glicerol] en muestra (mM)
Blanco	0	0
Muestra 1	0,010	0,2
Muestra 2	0,025	0,5
Muestra 3	0,050	1,0
Muestra 4	0,075	1,5
Muestra 5	0,10	2,0

La ecuación de ajuste propuesta por el modelo de superficie de respuesta para la pendiente fue:

$$m = 1,42 + A \times [NAD] + B \times t \quad [5.12]$$

donde A y B son los coeficientes del modelo que se calculan a partir de la forma de la superficie de respuesta, e indican la dependencia de la pendiente (m) con la concentración de cofactor ($[NAD^+]$) y el tiempo de reacción (t) respectivamente. El análisis de los resultados indica que, de los dos coeficientes, solo B es significativo y su valor es 0,62, mientras que A es un coeficiente no significativo. Esto significa que la pendiente de la recta de calibrado no muestra dependencia con la concentración de cofactor NAD^+ utilizado.

Por otra parte, el coeficiente de correlación no mostró dependencia con ninguno de los factores elegidos. Esto indica que el modelado de la función deseabilidad global queda reducido al de una sola respuesta, la pendiente de la recta de calibrado, y a un único factor significativo que es el tiempo de reacción. En base a estos resultados pudimos establecer un uso mínimo de cofactor soluble.

5.5.2 Determinación de glicerol remanente en cultivos de micobacterias

5.5.2.1 Evaluación de glicerol remanente en cultivos axénicos de *M. smegmatis*

Primeramente, se evaluó si podía evidenciarse el consumo de glicerol por parte de *M. smegmatis* en un cultivo axénico, es decir conteniendo sólo este microorganismo. Para ello, se realizaron cultivos de la micobacteria como se describe en el punto 4.18, de la sección Materiales y Métodos y se determinó el glicerol remanente haciendo uso del método fotométrico presentado previamente. El análisis de la variancia de los valores de absorbancia registrados y, posteriormente, se realizó un ensayo de comparaciones múltiples utilizando las pruebas de Tukey y de Bonferroni. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las absorbancias de las muestras del medio con *M.*

smegmatis a las 2 y 3 h de iniciados los cultivos, respecto de aquellos medios conservados en esterilidad.

5.5.2.2 Determinación de glicerol remanente en cultivos de micobacterias con y sin fago D29 y ensayos controles respectivos

En una segunda serie de ensayos nos propusimos ver si había consumo diferencial de glicerol entre cultivos de *M. smegmatis* y cultivos de la micobacteria infectados con el fago D29, siguiendo el protocolo descrito en el punto 4.18.1 de la sección Materiales y Métodos. En la Fig. 5.19 se muestran los valores de absorbancia a 420 nm de las muestras mencionadas. Sobre este conjunto de datos, nuevamente se realizó un análisis de la variancia y ensayos de comparaciones múltiples utilizando las pruebas de Tukey y de Bonferroni.

Los resultados obtenidos indican que todos los medios de cultivo a los cuales no se le inculó bacterias y aquellos medios donde se inculó bacterias pero fueron centrifugados inmediatamente después del inóculo (muestras a $t=0$), no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los ensayos de comparaciones múltiple realizados. Esto permite concluir que el agregado de fago y la incubación a 37 °C no producen modificaciones significativas *per se* en las reacciones de color. Por ello, es posible afirmar que, en el futuro, podrán simplificarse los controles a un único testigo de concentración inicial conocida, sin necesidad de tomar una muestra del cultivo inmediatamente después del inóculo, o de la adición de fagos a los controles negativos del ensayo.

En este ensayo preliminar pudimos observar que las diferencias de absorbancia resultaron estadísticamente significativas entre los medios de cultivo donde crecieron células de *M. smegmatis* y los medios donde crecieron células de *M. smegmatis* infectadas con fago D29, tanto a las 2 como a las 4 h de iniciados los cultivos. Este resultado indicó que la hipótesis de trabajo planteada era apropiada y, en consecuencia, sería factible desarrollar un método para verificar la integridad de micobacterias en un cultivo de las mismas.

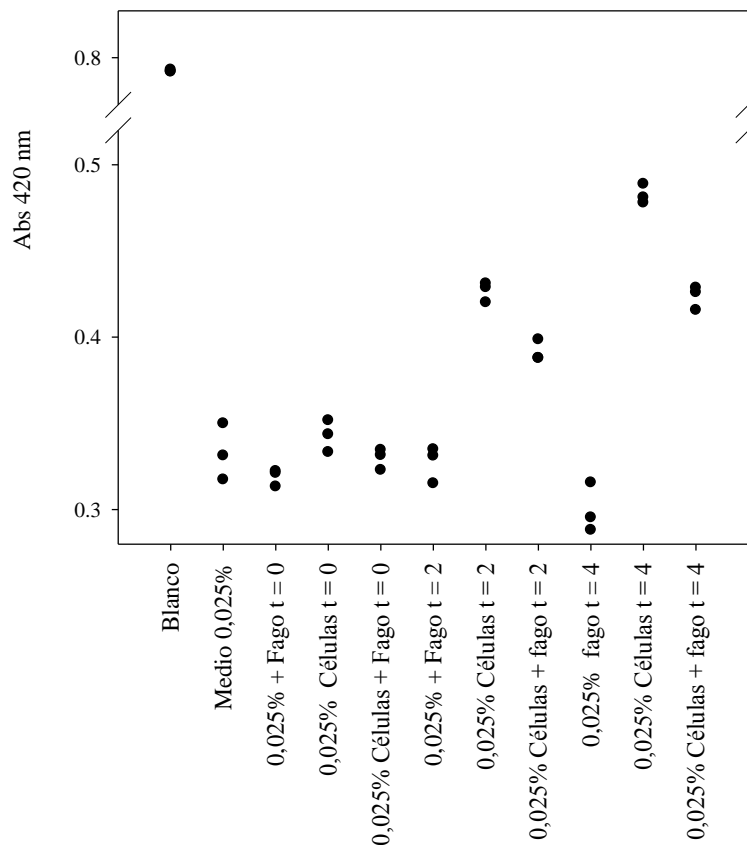


Figura 5.19. Absorbancias a 420 nm registradas para las muestras descritas. Se indica concentración inicial de glicerol en % m/v y tiempo de incubación a 37 °C. El blanco corresponde al de la reacción de color sin glicerol.

5.5.3 Biosensor amperométrico a base de pasta de carbono vítreo modificada

En función de los resultados previos, se procedió al ensamblado de un biosensor amperométrico, siguiendo el esquema de reacción presentado previamente que se reproduce en la figura 5.20

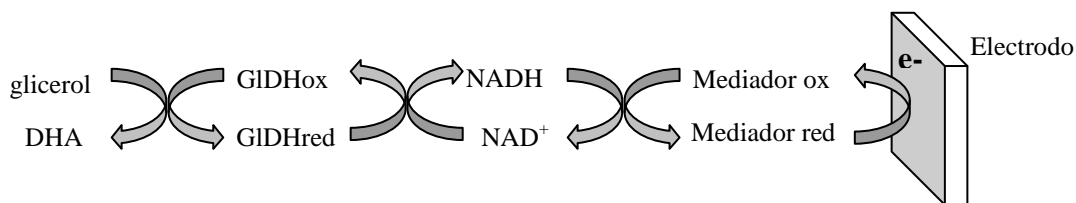


Figura 5.20. Esquema de reacción propuesto para biosensor amperométrico selectivo para glicerol. La coenzima reducida NADH se regenera a su forma oxidada NAD^+ reaccionando con el $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ que se reduce a $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. Este último se reoxida electroquímicamente sobre la superficie del electrodo completando el ciclo catalítico.

Utilizando electrodos de pasta de carbono B (punto 4.19.1.2, sección Materiales y Métodos) se realizaron amperometrías siguiendo el protocolo descrito en el punto 4.20.2

de la sección Materiales y Métodos. En la Fig. 5.21 se muestra un amperograma típico obtenido

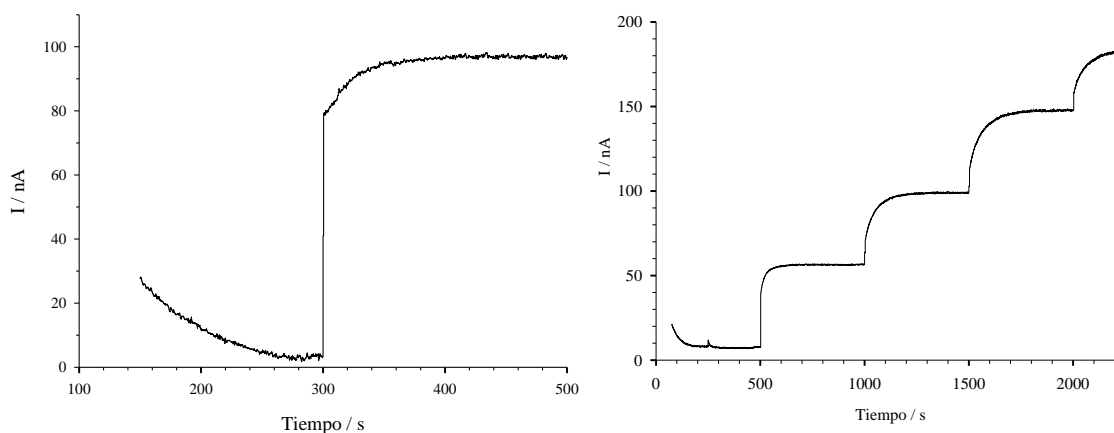


Figura 5.21 A) Amperograma típico obtenido con un electrodo de trabajo de pasta de carbono B, trabajando a un potencial de 0,38 V. Se agregaron 50 μL de medio 7H9 suplementado con glicerol, usualmente a los 300 s de iniciada la lectura de corriente, cuando ésta se estabilizó. B) Agregados sucesivos de 50 μL de medio 7H9 suplementado con glicerol 20 mM sobre 2,00 mL de la misma solución.

En la Fig. 5.22 se presenta la recta de regresión obtenida a partir de los valores promedios de corrientes para soluciones de glicerol en el intervalo de concentraciones de 0,062 mM y 1,75 mM. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de cada medida. La ecuación de la recta obtenida por el método de mínimos cuadrados fue:

$$I_c = 100,7 \times [\text{Glicerol}] + 0,626 \quad [5.13]$$

donde I_c está en nA y [Glicerol] en mM, el valor del coeficiente de regresión (R^2) obtenido fue de 0,9982.

Las cifras de mérito para esta técnica resultaron ser:

Límite de detección:	20 μM
Límite de cuantificación:	60 μM
Límite de discriminación:	15 μM
Intervalo de linealidad:	0,060 mM – 1,75 mM

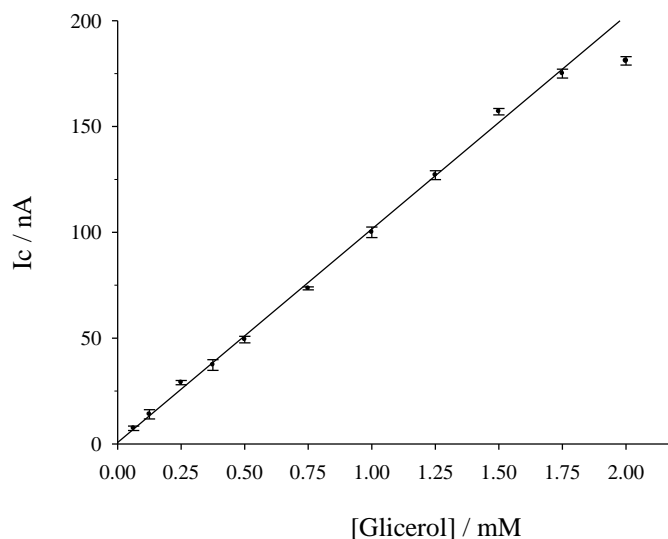


Figura 5.22. Recta de calibración para glicerol utilizando el método amperométrico descrito en el texto. Se muestran los valores promedios de corrientes límite corregidas y las desviaciones estándares de 3 lecturas independientes.

Una vez que se preparó la pasta de carbono vítreo modificada con la enzima, esta resultó estable durante 10 semanas sin pérdida de actividad enzimática, siempre que se mantuviese seca a 4 °C. Una vez que se ensambló el biosensor con el polímero electrodepositado, pudo utilizarse durante al menos 8 horas consecutivas con una pérdida de sensibilidad insignificante. En efecto, los cambios observados en las señales registradas de forma consecutiva se encontraron dentro del error intrínseco del método propuesto. La estabilidad de un mismo biosensor durante días sucesivos se evaluó realizando medidas de la misma solución y evaluando la relación señal/ruido, la cuál disminuyó un 15% del valor original al tercer día, y un 50%, al quinto día de uso.

5.5.4 Desarrollo de un biosensor a base de pasta de carbono vítreo y nanotubos de carbono

Para reducir los tiempos de análisis se procuró disminuir el período de estabilización de la corriente, modificando el esquema original propuesto para el sensor. Para esto, se modificó la pasta de carbono con nanotubos de carbono de paredes múltiples (Rubianes & Rivas, 2003). Según trabajos previos, esta estrategia permite disminuir el sobrepotencial asociado a la electrooxidación de la coenzima NADH, evitándose el uso de un mediador soluble (Musameh, 2002). Previo a su utilización los NTC fueron funcionalizados por carboxilación oxidativa, siguiendo el protocolo especificado en el punto 4.21 de la sección Materiales y Métodos.

En la Fig. 5.23 (derecha), se muestran las voltametrías que se obtuvieron utilizando un electrodo de trabajo relleno con pasta B (pasta de carbono vítreo modificada con enzima GIDH al 2% en masa).

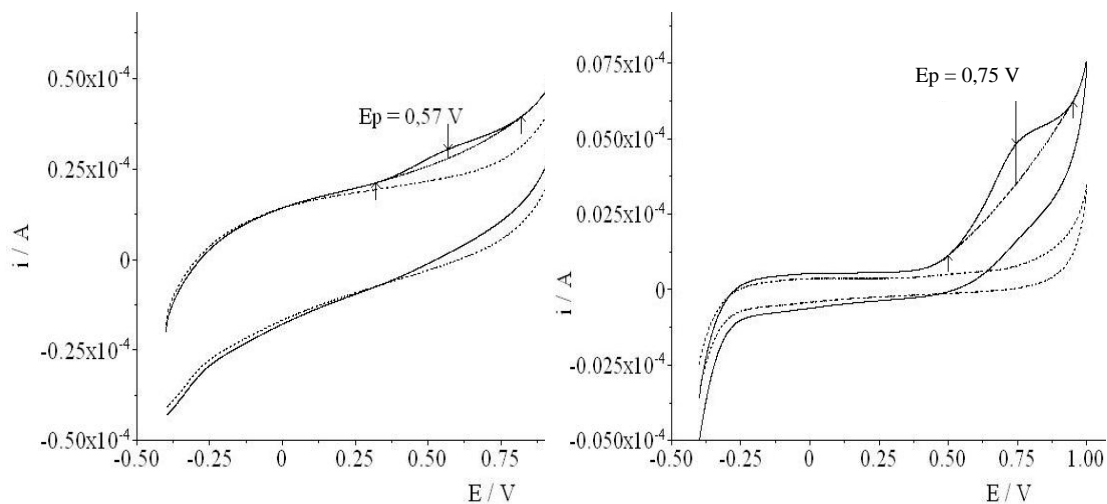


Figura 5.23. Voltamperogramas cíclicos utilizando bioelectrodos de pasta de carbono B, con GIDH (derecha) y pasta C, con GIDH y MWCNT (izquierda). En línea punteada se muestran las voltametrías de la solución NAD^+ 0,5 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25mM, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{KHCO}_3$ 0,1 M, pH 10,5 (blanco). En línea continua las voltametrías de las mismas soluciones con el agregado de glicerol en concentración final 25 mM. La velocidad de barrido fue 50 mV s^{-1} . Se marcan los picos de corriente observados y el potencial de pico.

El sobrepotencial asociado a la electrooxidación de la coenzima NADH en el electrodo de pasta de carbono B es 70 mV menor que el informado por Wang y col., $E_p = 0,82\text{V}$, sobre electrodos de carbono vítreo (Musameh, 2002). Esta diferencia podría deberse a los distintos pH de trabajo, o bien a alguna diferencia en las cualidades de la superficie del electrodo.

En la Fig. 5.23 (izquierda) se muestran los resultados obtenidos con los electrodos de pasta C, pasta de carbono modificada con GIDH al 2% y con MWCNT al 10% en masa. En este caso vemos que el sobrepotencial asociado a la electrooxidación de NADH es 0,180 V menor, $E_p = 0,57 \text{ V}$, que el observado para la pasta B. Esta diferencia podemos atribuirla a las cualidades diferentes de las superficies del electrodo debida a la presencia de los MWCNT. Es de destacar que Wang y col., en la oxidación del NADH sobre la superficie de carbono vítreo modificado con MWCNT, observaron dos procesos oxidativos: uno principal con un E_p de 0,33 V y otro secundario con E_p de 0,57 V, que aparece como hombro del primero (ver Fig. 5.24, reproducida de Wang y col).

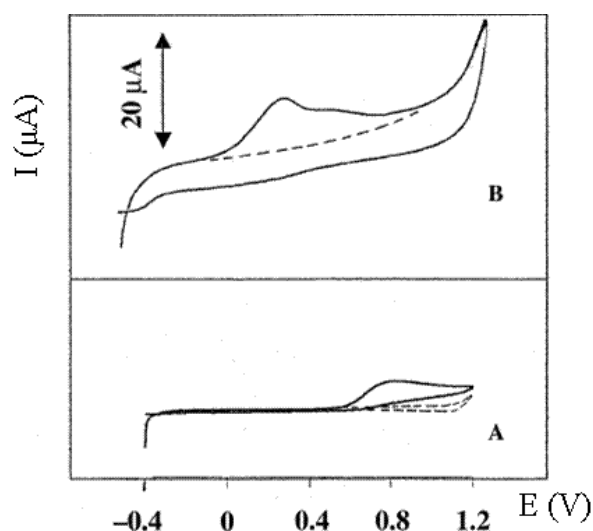


Figura 5.24 Reproducido de Musameh y col., 2002. Voltamperogramas correspondientes a una solución 5 mM de coenzima NADH en solución tampón fosfato 0,05 M pH 7,4, utilizando electrodos de trabajo de pasta de carbono vítreo sin modificar (A) y modificado con MWCNT (B). Velocidad de barrido 50 mV s^{-1} . En el voltagrama B puede apreciarse el pico principal y el secundario que aparecen como hombro del primero.

En este trabajo sólo se pudo identificar un único proceso oxidativo a 0,57 V. Si bien aún estamos investigando posibles causas que hayan originado esta diferencia, es de esperar que el pH sea un factor determinante, ya que la oxidación de NADH a NAD^+ involucra la pérdida de un H^+ . Por otra parte, en los voltagramas realizados con pasta C se registró un importante aumento de las corrientes capacitivas ($18 \text{ } \mu\text{A}$), en relación a las voltametrías donde se utilizaron electrodos de pasta sin MWCNT. Este mismo efecto, pero en menor magnitud ($5,5 \text{ } \mu\text{A}$), también fue registrado por Wang y colaboradores al trabajar con electrodo de carbono vítreo modificado con MWCNT, (Musameh, 2002). Los resultados obtenidos por Wang y colaboradores y los de este trabajo de Tesis se muestran comparativamente en la Tabla 5.10.

Tabla 5.10. Resultados obtenidos por Musameh y col. 2002 y los correspondientes a este trabajo.

Electrodo de trabajo	Musameh y col. 2002		Este trabajo	
	C_v	$C_v + \text{MWCNT}$	Pasta B	Pasta C
V barrido	50 mV s^{-1}		50 mV s^{-1}	
pH	7,4		10,5	
E_p (V)	0,82	0,33 0,57	0,75	0,57
Aumento de la I_{cap} (μA)	-	5,5	-	18

Con estos resultados preliminares comenzamos los ensayos amperométricos para cuantificar el glicerol remanente en los medios de cultivos de micobacterias. Se llevaron adelante distintos ensayos y, nuevamente, el inconveniente principal al que nos enfrentamos fue que la respuesta no era estable en el tiempo. En la Fig. 5.25 se muestra un amperograma obtenido con un bioelectrodo de pasta C y realizando agregados sucesivos de un estándar de glicerol 20 mM disuelto en medio Middelbrook 7H9.

Con este nuevo esquema de trabajo no se logró acortar los tiempos de estabilización de la corriente. Los algoritmos de corrección de corriente de base que están incorporados al programa GPES tampoco permitieron solucionar este inconveniente. Por este motivo, se optó por utilizar técnicas voltamétricas de pulso que, en principio, permitirían evitar este inconveniente.

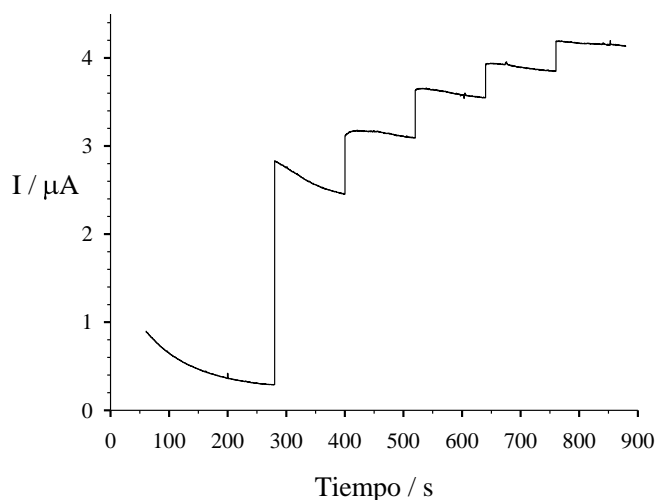


Figura 5.25. Amperograma obtenido con un bioelectrodo de pasta de carbono C, trabajando a 0,5 V vs. Ag/AgCl. A $t=200$ s de iniciada la lectura, se agregaron 50 μ L de medio 7H9 y, posteriormente, se realizaron agregados sucesivos de 50 μ L de medio 7H9 suplementado con glicerol 20 mM.

5.5.4.1 Ensayos de cuantificación de glicerol con el bioelectrodo desarrollado, utilizando técnicas de pulso

Las técnicas voltamétricas de pulso presentan la ventaja de permitir trabajar durante tiempos muy reducidos, en la zona de potencial donde la especie electroactiva cambia su estado de oxidación produciendo la señal analítica.

Se optó por ensayar la voltametría de onda cuadrada para los futuros ensayos de cuantificación y los experimentos preliminares procuraron establecer los valores más convenientes de los parámetros relevantes de la técnica, como la amplitud de pulso, el escalón de potencial y la frecuencia (punto 6.3.3, sección Experimentos Auxiliares).

En una segunda serie de ensayos se buscó observar la dependencia de la corriente de pico con la concentración de glicerol. Para esto, se realizaron ensayos independientes. En este esquema de trabajo surgió un inconveniente respecto del criterio de medida de la corriente de pico, ya que en ensayos independientes no se pudo establecer una línea de base común a todos los voltamperogramas.

Se ensayaron distintos criterios para determinar una línea de base apropiada como se detalla en el punto 6.3.3.1, de la sección Experimentos Auxiliares y en la Fig. 5.26 se muestran los voltamperogramas corregidos siguiendo el criterio elegido.

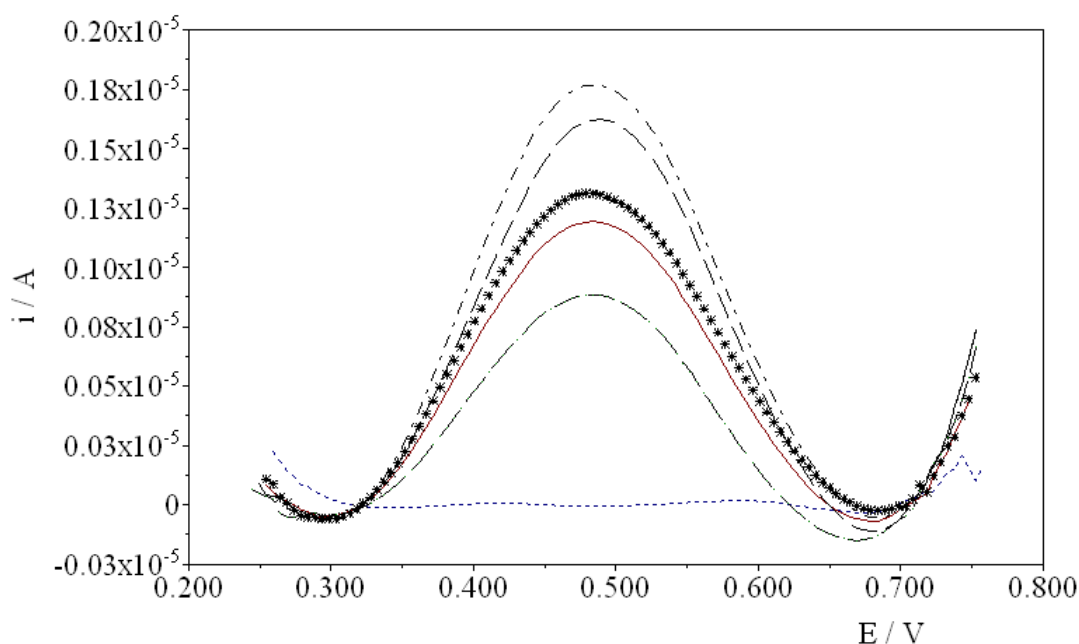


Figura 5.26. Voltamperogramas de onda cuadrada (corregidos) obtenidos utilizando electrodos de pasta de carbono vítreo modificada con GIDH y MWCNT. Se muestran los voltagramas de las soluciones blanco (.....), glicerol 5 mM (—•—), 12,5 mM (——), 25 mM (◆◆◆), 36 mM (- - -) y 50 mM (—•—).

En la Fig. 5.27 se muestran la dependencia de la corriente de pico con la concentración de glicerol obtenida a partir de experimentos exploratorios únicos para cada concentración. Resta, a futuro, repetir los experimentos para establecer el error asociado a la metodología, el intervalo dinámico lineal y el límite de detección.

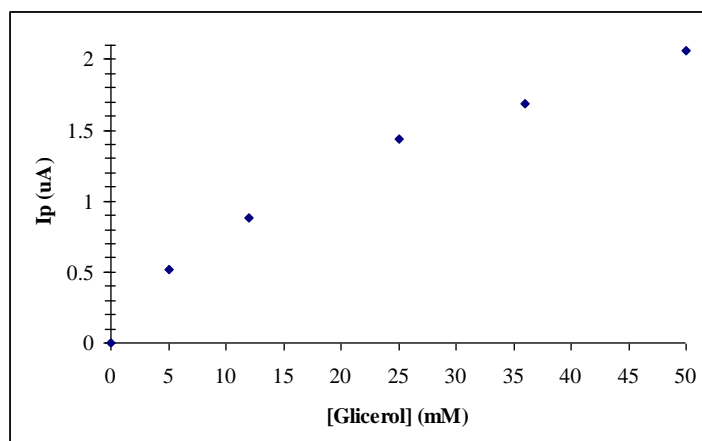


Figura 5.27. Dependencia de la corriente de pico registrada en la VOC en función de la concentración de glicerol en la celda electroquímica.

5.6 Validación de métodos

De los métodos desarrollados se seleccionaron aquellos dos que dieron resultados más fiables: método amperométrico utilizando un electrodo de trabajo de oro y el método amperométrico utilizando el biosensor con GIDH con mediador soluble. Se realizaron ensayos en paralelo con un método alternativo ampliamente utilizado, en particular se utilizó un equipo comercial que utiliza tres enzimas y detección espectrofotométrica (Wiener lab). La Fig. 5.28 muestra la concentración nominal versus concentración predicha obtenida por las tres metodologías, ensayando diferentes diluciones de muestra, y graficándose el valor medio de 3 medidas independientes.

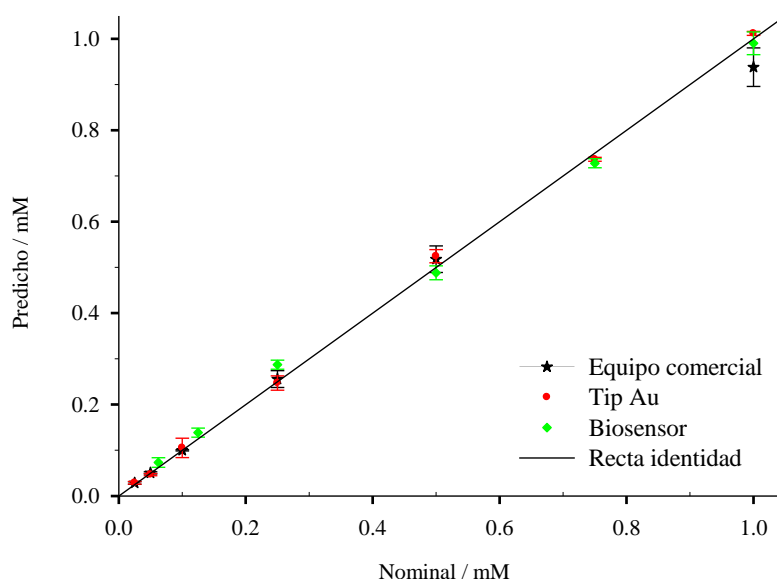


Figura 5.28, Concentración nominal vs predicha para las dos metodologías propuestas en este trabajo de tesis y un método enzimático disponible comercialmente.

Es evidente que los métodos propuestos se correlacionan adecuadamente con la recta identidad. En la Fig. 5.29 se muestran las tres regiones elípticas de confianza conjuntas (EJCR) para la pendiente y ordenada al origen. En este caso puede apreciarse que las tres elipses contienen el punto (0, 1), lo que indica una buena correlación entre los métodos propuestos en el presente trabajo y un método disponible comercialmente.

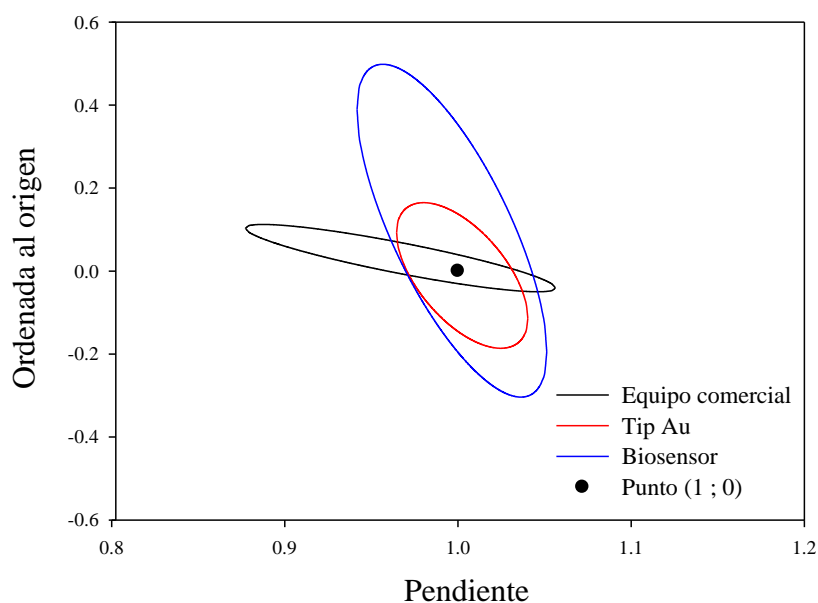


Figura 5.29. Regiones elípticas de confianza conjuntas para dos metodologías presentadas en este trabajo de Tesis y un método enzimático disponible comercialmente.

En la Tabla 5.11 se presentan distintas metodologías publicadas en la literatura actual en las que se referencia la cuantificación de glicerol, ya sean biosensores electroquímicos u otra metodología. El análisis de la Tabla 5.11, permite ver que la determinación de glicerol en medios alcalinos, sin presencia de interferentes, puede ser llevada a delante con metodologías económicas. Debe ser considerado que, cuando se realiza la determinación de glicerol en muestras de biodiesel, dicha cuantificación requiere extraer el analito de la matriz, como puede verse en los métodos más recientemente propuestos (Bondioli & Bella, 2005, Silva & Rocha, 2010, Lima y col., 2012, Tehrani & Ghani, 2012, Maruta & Paixao, 2012, Lourenço & Stradiotto, 2009, Stradiotto y col., 2009). Ya sea que se utilice detección espectroscópica o electroquímica, siempre se requiere la extracción previa a la determinación del analito. Incluso la propuesta de Fernández Band y col., que es el único método que hace una diferencia notable al comparar las cifras de mérito (LD 0,4 μ M, tiempo de análisis 4 min) implica un pretratamiento de la muestra (Lima y col., 2012).

Tabla 5.11. Comparación de métodos para cuantificar glicerol propuestos recientemente. Adaptado de Faccendini y col., 2014.

Método (Tratamientos previos)	LD (μM)	Rango de linealidad (M)	Muestra ensayada	Tiempo de análisis (min)	Reactivos o accesorios onerosos	Referencia
Espectrofotométrico (Extracción del analito)	22	4×10^{-5} a 2×10^{-4}	Biodiesel	20	-	Bondioli & Bella, 2005
Espectrofotométrico (Extracción del analito)	10	5×10^{-5} a 5×10^{-4}	Biodiesel	20 a 30	-	Silva & Rocha, 2010
Espectrofluorométrico (Extracción del analito)	0,4	1×10^{-6} a 5×10^{-4}	Biodiesel	4	-	Lima y col., 2012
Espectrofotométrico multienzimático	No informa	2×10^{-2} a 1×10^{-1}	Jugo de caña	5	GK, GPO, ATP	Kronka y col., 2001
Espectrofotométrico multienzimático	8	8×10^{-6} a $2,5 \times 10^{-4}$	Suero Humano	10	GK, PK, LDH, ATP, NAD ⁺	Li y col., 2001.
Electroquímico, VPD (Extracción del analito)	33	5×10^{-4} a $1,2 \times 10^{-2}$	Biodiesel	15	-	Tehrani y Ghani, 2012
Electroquímico, VC (Extracción del analito)	3	$3,3 \times 10^{-5}$ a $1,7 \times 10^{-3}$	Biodiesel	30	FIA	Maruta y Paixao, 2012
Electroquímico, VC (Extracción del analito)	25	$3,3 \times 10^{-5}$ a $1,7 \times 10^{-3}$	Biodiesel	20	Cartucho de C18	Lourenço & Stradiotto, 2009
Electroquímico, amperométrico (Extracción del analito)	No informa	$1,6 \times 10^{-4}$ a $1,6 \times 10^{-3}$	Biodiesel	60	-	Stradiotto y col., 2009
Electroquímico, VL VPD amperométrico (Extracción del analito)	10	$2,3 \times 10^{-5}$ a $2,3 \times 10^{-4}$	Solución Acuosa pH=13	5	MWCNT funcionalizados con Ag	Pop y col., 2011
Electroquímico, amperométrico (Extracción del analito)	10	$2,5 \times 10^{-5}$ a $2,0 \times 10^{-3}$	Solución Acuosa pH=13	8	-	Este Trabajo de Tesis
Electroquímico, amperométrico (Extracción del analito)	50	5×10^{-5} a $2,3 \times 10^{-2}$	Solución Tampón Fosfato	5 (estimados)	GO	Goriushnika y col., 2010
Biosensor amperométrico	0,4	$1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$	Jarabe de caña	15 (estimados)	GIDH, NAD ⁺	Álvarez-Gonzalez y col., 2000
Biosensor amperométrico	0,4	1×10^{-6} a 2×10^{-5}	Vino	3	GIDH, DP, NAD ⁺	Gamella y col., 2008
Biosensor amperométrico	0,3	1×10^{-6} a 1×10^{-5}	Vino	3	GK, GPO, HRP, ATP	Gamella y col., 2008.
Biosensor amperométrico	4	5×10^{-6} a 1×10^{-4}	Vino	5	GK, GPO, ATP	Ghica & Brett, 2006
Biosensor amperométrico	20	$7,0 \times 10^{-5}$ a $1,8 \times 10^{-3}$	Caldo Middlebrook	10	GIDHb, NAD ⁺	Este Trabajo de Tesis

Del mismo modo el enfoque de Tehrani y Ghani que utilizan un electrodo de grafito modificado con nanopartículas de nickel trabajando a pH = 13, realizan una extracción previa de glicerol a partir de muestras de biodiesel (Tehrani & Ghani, 2012). En este

caso, el LD fue de 33 μM , mientras que en este trabajo de Tesis, utilizando el mismo medio, hemos conseguido un LD de 10 μM empleando electrodos de oro policristalino. Maruta y Paixao han propuesto recientemente un método amperométrico usando un electrodo de cobre que trabaja a 0,65 V vs Ag/AgCl, adaptado en un sistema de FIA (Maruta & Paixao, 2012), mientras que Lourenço y Stradiotto informaron sobre un método electroquímico que requiere la extracción acuosa del glicerol a partir de la muestra y la purificación adicional por elución a través de un cartucho de C18, seguida de una concentración por evaporación y finalmente un análisis mediante VC (Lourenço & Stradiotto, 2009) También, otras propuestas informan sobre la determinación de glicerol por amperometría, haciendo uso de electrodos modificados, tales como electrodos de diamante dopados con boro y modificados con nanopartículas de níquel (Stradiotto y col., 2009), y electrodos compuestos de nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con plata (Pop y col., 2011). Si bien ambos métodos se presentan como útiles, se requieren diferentes pasos operativos para eliminar posibles interferencias, tales como otros alcoholes que podrían ser oxidados a los potenciales de trabajo, 0,65 V o 1,30 V (vs Ag/AgCl), respectivamente. En este sentido, nuestros resultados obtenidos por amperometría usando electrodos de oro en medio alcalino acuoso (pH = 13), están en el mismo orden que los obtenidos por Pop y colaboradores utilizando LSV (Pop y col., 2011), sobre electrodos compuestos de nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con plata. Efectivamente, este último y nuestra metodología mostraron las mejores cifras de mérito, entre los métodos electroquímicos de bajo costo que no consumen enzimas.

Los métodos enzimáticos espectrofotométricos aunque no son laboriosos, presentan la desventaja del consumo relativamente elevado de enzima; cada muestra necesita la adición del costoso reactivo biológico, ya que no puede ser reutilizado. También los LD de los métodos espectrofotométricos enzimáticos informados son generalmente superiores a los que presentan los biosensores. Puede añadirse que estos últimos presentan generalmente el intervalo dinámico lineal más amplio, en comparación con otros enfoques, ya sean electroquímicos o espectrofotométricos. Sólo la metodología de flujo discontinuo con detección fluorométrica propuesta por Fernández Band y col. (Lima y col., 2012), muestra una sensibilidad en el mismo orden que el más bajo de los biosensores.

En el análisis de los biosensores que se muestran en la Tabla 5.11, hay que destacar que el propuesto por Pingarrón y col. (Gamella y col., 2008) muestra el LD y tiempo de

análisis total más bajo. Para evaluar costos operativos, se presenta en la Tabla 5.12 un resumen comparativo de la cantidad y concentración de los reactivos onerosos consumidos por biosensor o por análisis, entre la propuesta de Pingarrón y col. y la del biosensor aquí propuesto.

Tabla 5.12. Comparación entre el método enzimático que mejores cifras de mérito presenta y el propuesto en el presente trabajo de Tesis. Adaptado de Faccendini y col., 2014

	GIDH / biosensor	Diaforasa / biosensor	tetratiofulvaleno / biosensor	NAD ⁺ / por análisis
Gamella y col., 2008	7.5 U	1.62 U	1.5x10 ⁻⁶ M	5x10 ⁻³ M
Este Trabajo de Tesis	2.3 U	-	-	5x10 ⁻⁴ M

Podemos afirmar que nuestra propuesta es menos costosa, hecho importante a ser evaluado cuando se va a analizar un gran número de muestras. Mediante la reducción de la cantidad de GIDH, el LD se elevó desde 0,4 hasta 20 μ M, aunque es adecuado aún para detectar cambios de concentración de glicerol en el orden de 15 μ M. Al mismo tiempo, evitando el uso de diaforasas, el tiempo total de análisis se extendió de 3 a 10 min. En conjunto, los resultados presentados confirman que los cambios introducidos a los biosensores, informados previamente en la literatura, tales como el uso de sólo una enzima en baja proporción, la sustitución del mediador redox por el ferricianuro soluble, y trabajar con el cofactor NAD⁺ soluble proporciona un sistema fiable de bajo costo para cuantificar el glicerol.

Experimentos Auxiliares

6 Experimentos Auxiliares

6.1 Comparación de programas de predicción de epítopes lineales reconocidos por células B

AAPPred, BcePred, ABCPred, BepiPred y Antigenic se ejecutaron en línea. En la Tabla 6.1 se muestran los VPP medios (ver definición en sección Materiales y Métodos, pag. 11) que se obtuvieron al predecir epítopes lineales reconocidos por células B de todas las proteínas enumeradas en la Tabla 6.2.

Los resultados obtenidos indican que BcePred es el único programa de los evaluados que muestra un VPP inferior al obtenido con la predicción al azar. También se obtuvo que sólo dos de los programas estudiados, AAPPred y ABCpred, predijeron epítopes con un VPP significativamente mayor al valor de VPP de un procedimiento de identificación aleatoria. Estos dos programas produjeron predicciones con valores máximos de 86,2% y 78,6% de VPP, respectivamente.

Tabla 6.1. Valores predictivos positivos promedio que se obtuvieron con cada uno de los programas predictores con los que se trabajó.

Programa	VPP promedio
AAPPred	69,1%
ABCPred	62,8%
BcePred	30,9%
BepiPred	45,3%
Antigenic	41,9%
Aleatorio	38,2%

En base a estos resultados, se trabajó con el programa AAPPred y se identificaron las regiones que concentraban el mayor número de epítopes reconocidos por células B de las proteínas P22, P30 y P35, con el fin de expresar estos Angs como proteínas recombinantes y utilizarlos en el desarrollo de métodos de diagnóstico de la toxoplasmosis aguda.

Tabla 6.2. Base de datos experimental: proteínas seleccionadas para este estudio. Se indican el nombre de la proteína, el código de acceso NCBI, la longitud total (en residuos de amino ácidos), el número de epítopes reales determinados experimentalmente y la localización de los epítopes o regiones antigénicas. Proteínas tomadas de base de datos: (A) BciPep, (B) VIH Inmunología Molecular base de datos o tomado de la literatura (véase el número de referencia 17 para VP1, 16 para la proteína N, y 18 para gliadina).

Proteína	Código NCBI	Nº de residuos	Cantidad de epítopes	Localización de los epítopes o regiones antigénicas
MPT70 (A)	NP_217391	193	2	31-70, 100-120
MSP-1 (A)	BAF62280.1	1693	3	29-39, 1594-1611, 1644-1662
Exotoxina A (A)	NP_249839	638	8	297-313, 324-333, 354-387, 412-421, 510-522, 528-539, 557-593, 596-638
GAG1 (A)	P20873	504	10	11-25, 113-122, 142-156, 176-214, 216-268, 280-308, 312-321, 330-367, 406-416, 428-448
Gp160 (A)	NP_057856	856	13	30-141, 161-191, 211-231, 252-281, 294-344, 346-413, 424-511, 525-558, 561-615, 639-701, 724-747, 761-778, 822-855
Pr55 (B)	NP_579876	132	2	11-38, 51-78
Rev (B)	NP_057854	116	4	5-15, 32-51, 70-91, 96-116
VP1 (17)	ABC87248	781	12	31-41, 55-65, 85-95, 151-161, 292-392, 316-326, 493-500, 529-539, 547-554, 571-578, 667-707, 712-722
Gliadin (18)	A27319	296	3	31-72, 165-176, 237-264
Proteína N (16)	AAP13445	422	6	1-6, 45-61, 153-192, 211-223, 225-235, 354-412
Proteasa (B)	CAB66012	99	2	1-7, 36-47

6.2 Puesta a punto de ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima con detección fotométrica

Previo al inicio de los ELISA de captura iniciamos una serie de pruebas preliminares con el propósito de:

a) Diferenciar sueros de pacientes infectados de sueros de individuos sin infección. De este modo, se pretende verificar la potencial utilidad en diagnóstico de los antígenos propuestos, corroborando que los procesos químicos llevados a cabo, como por ej. la conjugación, no eliminaron epítopes claves.

b) Minimizar la señal en los ensayos sin suero (blanco de reactivos), es decir, disminuir el ruido de fondo asociado a interacciones inespecíficas.

A tales fines, se realizaron ELISA indirectos utilizando los antígenos recombinantes obtenidos (marcados y sin marcar) adsorbidos sobre la placa, se utilizaron sueros tipificados y se reveló la presencia de IgG humana, revelando con anticuerpos de cabra anti IgG humana. Los resultados obtenidos se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 6.3. Valores de absorbancia a 450 nm obtenidos en ELISA indirectos con detección de IgGh con conjugado anti IgG humana-HRP.

Sueros	P22C	P22C-biotina	P35B	P35B - biotina
Positivos	2	>3	2.6	1.900
	3	2.900	2	>3
	>3	>3	2.6	>3
Negativos	1.3	1.000	1.1	0.800
	0.6	0.500	0.9	0.700
	1.1	1.600	1	1.000

Si bien los valores de absorbancia leídos en todos los pocillos resultaron elevados, los sueros confirmados positivos dieron los valores más altos de absorbancia, mientras que los sueros negativos dieron los valores más bajos. Las diferencias observadas entre sueros confirmados positivos y sueros confirmados negativos permitieron asumir que los antígenos obtenidos son de posible utilidad en diagnóstico. Además, no se detectaron diferencias significativas entre los valores de absorbancia obtenidos utilizando antígenos marcados de aquellos obtenidos con los no marcados, permitiéndonos pensar que la conjugación llevada a cabo no eliminó epítopes claves. Los elevados valores de absorbancia obtenidos en este ensayo, junto a otros estudios preliminares sugieren que existe una elevada adsorción inespecífica.

6.2.1 Bloqueante a utilizar

Se ensayaron diversos agentes bloqueantes para minimizar las interacciones inespecíficas encontradas durante los experimentos preliminares, y así evitar las altas señales obtenidas en los ensayos control realizados sin suero (blanco de reactivos) y con sueros confirmados negativos (blancos de muestra). Sobre placas comerciales de poliestireno se procedió al bloqueo total con el agente bloqueante a ensayar y, posteriormente, se realizó una incubación con y sin antígeno P22C, por duplicado. Finalmente, se reveló con la enzima HPR-EAV, que se une específicamente a biotina. En la Tabla 6.4 se muestran los valores de absorbancia a 450 nm.

Tabla 6.4. Valores promedio de absorbancia a 450 nm obtenidos en los ensayos de bloqueo.

450 nm	Sin P22cBiot	Con P22cBiot
Sin Bloqueante	-----	1.162
Leche 1%	0.066	0.1445
Caseinato 1%	0.0725	0.2425
Gelatina 1%	0.0725	0.3925
BSA 1%	0.0625	0.192
BSA 1% Tween 0,02%	0.0615	0.1515

En base a estos resultados, se continuó con el uso de leche descremada como agente bloqueante.

6.2.2 Esquema A

Cuando se realizaron ELISA siguiendo el esquema A, se ensayaron dos diluciones de la HRP-EAV, 1/2000 y 1/5000. Por otro lado, se ensayaron distintas masas de antígenos P22C y P35B conjugados a biotina, con los que se intentó revelar presencia de IgM específicas. Específicamente, se ensayaron 2; 0,2 y 0,02 µg por pocillo de P35B biotina y 5; 2; 0,2 y 0,02 µg por pocillo de P22C biotina. Con esto se buscó encontrar las cantidades óptimas de reactivos para poder llevar adelante estos ensayos. A modo ilustrativo, en la Tabla 6.5 se muestra un ensayo representativo siguiendo el esquema A. Se informan solamente los valores de absorbancia a 450 nm obtenidos para sueros provenientes de pacientes con infección crónica (crónicos), aguda (agudos) y de pacientes sin infección (negativos).

Tabla 6.5. Valores de absorbancia a 450 nm obtenidos en ELISA siguiendo el esquema A. Se muestran 3 cantidades de antígeno revelador utilizadas, 2; 0,2 y 0,02 µg. En este ensayo la dilución de la enzima HRP-EAV fue 1/5000 y se utilizaron 100 µL por pocillo.

Antígenos	P22C biotina (µg)			P35B biotina (µg)		
	2	0,2	0,02	2	0,2	0,02
Sueros						
Negativos	0,576	0,294	0,155	1,071	0,681	0,566
	0,543	0,335	0,176	1,079	0,769	0,23
Crónicos	0,469	0,246	0,135	1,03	0,69	0,299
	0,514	0,215	0,111	0,914	0,567	0,196
Agudos	0,331	0,181	0,109	0,81	0,574	0,168
	0,555	0,254	0,139	0,789	0,391	0,169

6.2.3 Esquema B

Cuando se realizaron ELISAs siguiendo el esquema B se ensayaron distintas masas de antígeno P22C y P35B, absorbidas sobre las microplacas comerciales, a saber: 500; 200, 50, 10 o 5 ng (disueltos en 100 μ L de solución tampón carbonato pH 9,6). En todos los casos se incubó 1h a 37 °C.

Para la incubación con la proteína conjugada a biotina se ensayaron 2 y 5 ug por pocillo. En la Tabla 6.6 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 6.6. Valores de absorbancia a 450 nm obtenidos en ELISA siguiendo el esquema B. Se muestran los resultados obtenidos para dos cantidades distintas de antígeno de captura (P22C): 10 y 50 ng, junto a 2 cantidades de antígeno revelador (P22C-biotina) utilizadas, 2 y 5 μ g. En este ensayo la dilución de la enzima HRP-EAV fue 1/2000 y se utilizaron 100 μ L por pocillo.

Masa de P22C (ng)	2 μ g P22C biotina		5 μ g P22C biotina	
	50	10	50	10
Muestras				
Agudos	0.393	0.303	0.553	0.450
	0.273	0.335	0.793	0.367
Crónicos	0.230	0.398	0.316	0.345
	0.284	0.291	0.444	0.493
Negativos	0.392	0.210	0.380	0.380
	0.286	0.292	0.314	0.350
Sin suero	0.367	0.468	0.415	0.411
	0.327	0.358	0.468	0.536
Sin Prot conjugada a biotina ni sueros	0.102	0.087	0.128	0.079
	0.131	0.095	0.116	0.104

Los resultados obtenidos indicaron que, para lograr una mejor discriminación de las muestras, es conveniente utilizar mayor cantidad de masa de antígeno de captura (P22C) depositada en el pocillo. Por otro lado, 5 μ g de antígeno revelador (P22C-biotina) por pocillo contribuyó a aumentar la discriminación entre las muestras sin incrementar significativamente el ruido de fondo.

6.3 Ensayos electroquímicos

6.3.1 Determinación del área real de un electrodo

6.3.1.1 Método de la adsorción de O₂

Se realizaron barridos de potencial como se indica en el punto 4.19.3.1 de la sección Materiales y Métodos. La Fig. 6.1 muestra un voltamperograma típico obtenido. Con el valor de la carga asociada a la desorción del óxido de oro, pudo determinarse el valor de área electroactiva del electrodo de trabajo utilizado, como se indica en el punto 4.19.3.1.

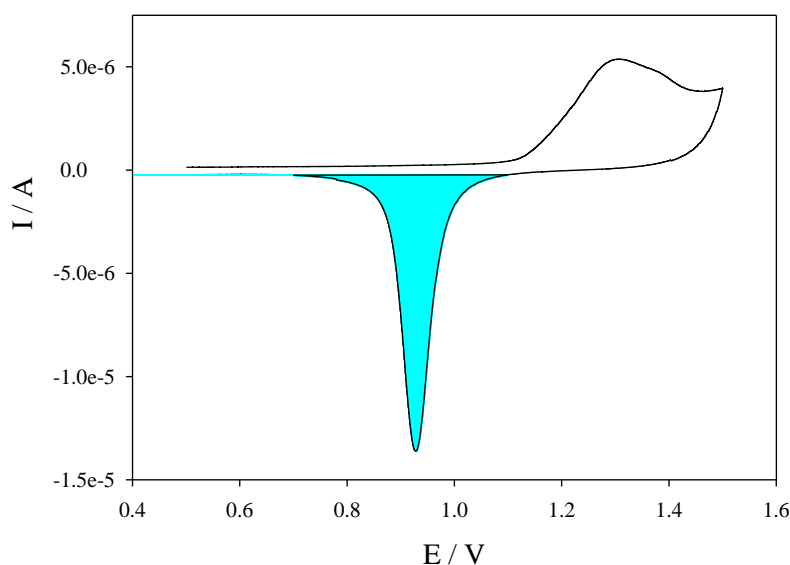


Figura 6.1. Voltamperograma cíclico típico obtenido con electrodos de oro en medio H₂SO₄ 0,5 M, velocidad de barrido 50 mV s⁻¹. Se indica en color turquesa el pico de desorción del óxido de oro, la carga (Q) obtenida del área encerrada en la curva se utilizó para determinar el área real de los electrodos de oro, previamente a los ensayos.

6.3.1.2 Voltametría cíclica a distintas velocidades

Se realizaron barridos de potencial a distintas velocidades como se indica en el punto 4.19.3.2 de la sección Materiales y Métodos. La Fig. 6.2 muestra los voltagramas típicos obtenidos en (A) y en (B), la dependencia de la corriente de pico, I_p , con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. Con el valor de la pendiente de la recta obtenida por regresión lineal, pudo determinarse el valor de área electroactiva del electrodo de trabajo utilizado, como se indica en el punto 4.19.3.2, habiéndose utilizado un coeficiente de difusión del Fe(CN)₆³⁻ de 0,762 cm² s⁻¹ (Sawyer & Roberts, 1974).

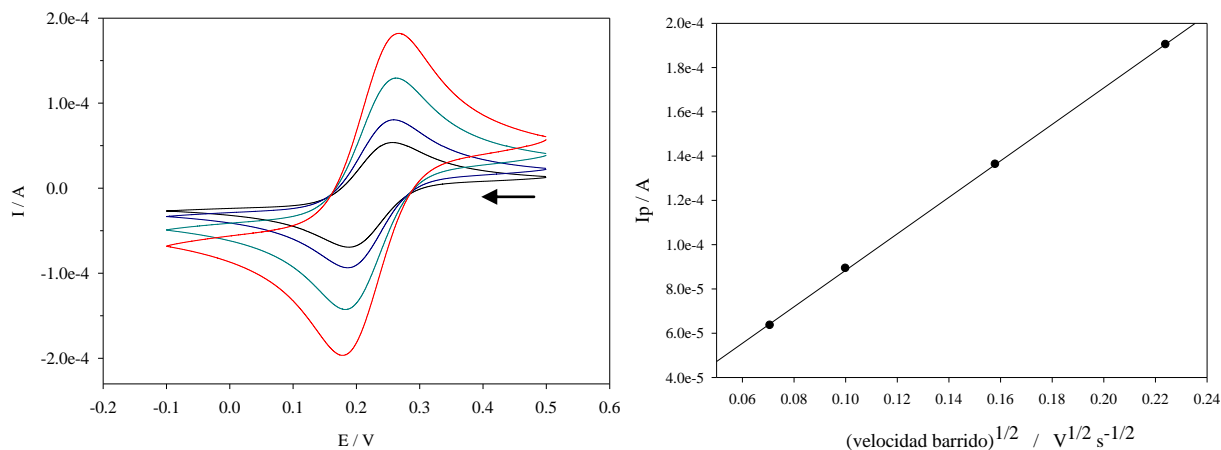


Figura 6.2. A) Voltametrías cíclicas de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 1 mM en medio KCl 0,1 M, a distintas velocidades de barrido, utilizando como electrodo de trabajo el biosensor amperométrico para evaluación de infección toxoplásmica. La flecha indica la dirección de barrido. B) Dependencia de I_p (en valores absolutos) con la raíz de la velocidad de barrido, el valor de pendiente de la recta de regresión se utilizó para determinar el área real del electrodo de trabajo.

6.3.2 Cubierta del biosensor selectivo para glicerol y soluciones amortiguadoras

Se ensayaron distintos polímeros para cubrir el biosensor de pasta de carbono B, utilizamos polímeros de 4-vinilbenzilimine copolimerizados con cloruro de 4-vinilbencil-trietilamonio y sulfonato de vinilfenilo (portadores de carga neta, positiva y negativa, respectivamente). Si bien los polímeros permitían operar con complejos de hierro utilizados como mediadores redox ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ y ferrocenometanol), no resultaron útiles en el ensamblado del biosensor, por el elevado ruido de fondo que generaron.

Se evaluaron distintas soluciones amortiguadoras de pH como fosfatos y amoníaco/amonio. Se optó por las soluciones de carbonato porque estas resultaron más sencillas de preparar y manipular que las amoniacaes y presentaron mayor capacidad reguladora en el pH óptimo de la enzima GIDH que las de fosfato.

6.3.3 Ensayos preliminares de voltametrías de onda cuadrada

Los ensayos preliminares de voltametría de onda cuadrada consistieron en establecer los valores más convenientes de la amplitud de pulso, el escalón de potencial y la frecuencia, para los futuros ensayos de cuantificación. Se realizaron los voltagramas en tres series de ensayos a seis valores de frecuencia: 10, 20, 30, 40, 60 y 70 Hz.

Los valores de salto de potencial (ΔE_s) y amplitud de pulso (ΔE) utilizados en las tres series de ensayos realizados se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 6.7. Valores de salto de potencial y amplitud de onda cuadrada utilizados en los ensayos voltamétricos.

	Serie 1	Serie 2	Serie 3
ΔE_s (mV)	5	5	10
ΔE (mV)	25	50	50

En las 3 series de ensayos, se observó que al aumentar la frecuencia, la corriente de pico no se incrementaba y el pico de corriente se deformaba, aumentando considerablemente el ruido. Las mejores relaciones señal/ruido en las tres series de ensayos se obtuvieron trabajando a 10 Hz. Por su parte, cuando se utilizó un escalón de potencial de 10 mV, el pico de corriente se deformó levemente, por lo que se optó por trabajar con un $\Delta E_s = 5$ mV. Cuando la amplitud del pulso fue 50 mV, se obtuvieron mayores intensidades de corriente sin deformación de pico, escogiéndose en consecuencia este valor. En la Fig. 6.3 se muestran los voltamperogramas obtenidos en los ensayos de la serie 2 a una frecuencia de 10 Hz.

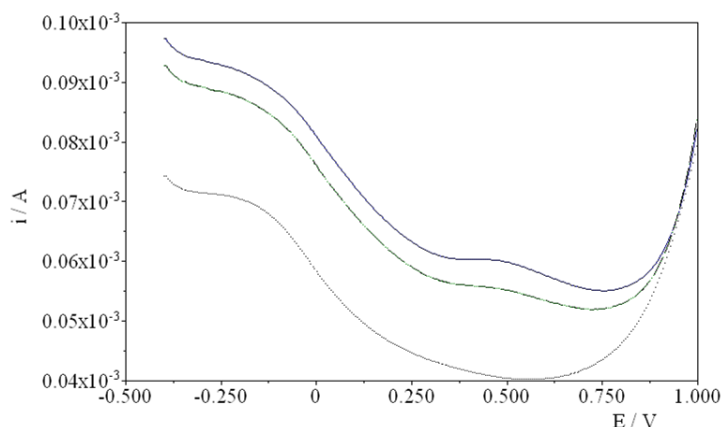


Figura 6.3. Voltamperogramas de onda cuadrada obtenidos utilizando bioelectrodos de pasta de carbono vítreo modificada con GlDH y MWCNT. En línea clara se muestra el voltamperograma de la solución NAD^+ 0,5 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 mM, $\text{K}_2\text{CO}_3 / \text{KHCO}_3$ 100 mM, pH 10,5 con medio Middelbrook 7H9. Superpuestos se detallan los voltamperogramas de la misma solución luego del agregado de glicerol 1,00 M para llevar a concentración final 25 mM (- - -) y 50 mM (—).

6.3.3.1 Selección de un método apropiado para establecer la línea de base

Se buscó establecer una línea de base para corregir los voltamperogramas obtenidos utilizando algoritmos presentes en el programa GPES. Se intentó con algoritmos de corrección que permiten establecer una línea polinómica *ad-hoc* para cada voltamperograma utilizando entre 2 y 5 puntos de la curva experimental. Sin embargo, las señales corregidas presentaban picos de corrientes con valores de ancho a la altura media, $W_{1/2}$, entre 0,180 y 0,220 V, valores que resultan elevados comparados con 0,123 V/n, el valor de referencia para este parámetro en VOC, donde n es el número de electrones

intercambiados en la reacción. Finalmente, a cada VOC se les restó la VOC del blanco, buscándose el pico de corriente con un algoritmo de búsqueda semiautomática del programa GPES, con una línea de base recta y marcando manualmente el inicio y final del pico, estableciéndose los mismos valores de potencial de inicio y finalización del pico de corriente en todos los voltamperogramas. De este modo, se obtuvieron picos cuyos $W_{1/2}$ eran próximos al valor teóricamente predicho.

Conclusiones

7 Conclusiones

1- Se pudo encontrar cual de los programas de libre acceso para predecir epítopes lineales reconocidos por células B es el más conveniente al momento de seleccionar antígenos con fines diagnósticos.

2- Se pudieron clonar, expresar en forma soluble y marcar con biotina, fragmentos de antígenos de toxoplasmosis de fase aguda que presentan alta concentración de determinantes antigénicos.

3- Se verificó la utilidad de los antígenos obtenidos para su posterior uso en el ensamblado de bioelectrodos para diagnóstico de infección aguda de toxoplasmosis.

4- Se pudo cuantificar glicerol en muestras sencillas con un electrodo versátil de oro policristalino, por medio de una metodología amperométrica a 0,1 V en medio NaOH 0,1 M y con un tiempo de análisis de 8 min, límite de detección 10 μ M y un intervalo de linealidad de 0,024 a 2,00 mM.

5- Se pudo cuantificar glicerol en medios de cultivo de micobacterias. El método consiste en una amperometría que emplea un bioelectrodo selectivo para glicerol compuesto de pasta de C modificada con glicerol deshidrogenasa y lleva un tiempo de análisis de 10 min, límite de detección 20 μ M y un rango de linealidad de 0,060 a 1,75 mM. Este método podría en un futuro ser útil para identificar muestras de pacientes con tuberculosis activa, en un menor tiempo de análisis al actualmente empleado.

6- Los métodos para cuantificar glicerol, aquí presentados, fueron validados frente a un equipo enzimático disponible comercialmente.

Bibliografía

8 Bibliografía

- Álvarez-González, M.I., Saidman, S.B., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tunón-Blanco, P. Electrocatalytic Detection of NADH and Glycerol by NAD⁺-Modified Carbon electrodes. *Anal. Chem.* (2000) **72**: 520-527.
- AOAC International, Official Methods of Analysis of AOAC International, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, 2005.
- Armbruster, D.A. y Pry, T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* (2008) **29 (I)**: 49-52.
- American Society for Testing and Materials (ASTM International), página web: <http://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/Q207/q207aprmccwes.html>.
- Atias, A. Toxoplasmosis. *Parasitol. Méd., Mediterráneo*. Santiago de Chile. (1998): 265-279.
- Arcavi, M., Orfus, G., Griemberg, G. Diagnosis of Toxoplasmosis by Joint Detection of Immunoglobulin A and Immunoglobulin M. *J. Clin. Microbiol.* (1997). **35 (6)**: 1450–1453.
- Aubert, D., Maine, G.T., Villena, I., Hunt, J. C., Howard, L., Sheu, M., Brojanac, S. Chovan, L.E., Nowlan, S.F., Pinon, J.M. Recombinant Antigens To Detect Toxoplasma gondii-Specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in Human Sera by Enzyme Immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* (2000) **38(3)**: 1144–1150.
- Babaie, J., Amiri, S., Mostafavi, E., Hassan, N., Lotfi, P., Esmaeili Rastaghi, A.R., Golkar, M. Seroprevalence and risk factors for Toxoplasma gondii infection among pregnant women in Northeast Iran. *Clin. Vaccine Immunol.* (2013) **20(11)**: 1771-1773.
- Bard, A.J. & Faulkner, L.R. Electrochemical Methods Fundamentals and Applications (2nd ed). Editorial John Wiley & Sons, Inc. (2001) ISBN: 0-471-04372-9.
- Beghetto, E., Buffolano, W., Spadoni, A., Del Pezzo, M., Di Cristina, M., Minenkova, O., Petersen, E., Felici, F., Gargano, N. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary Toxoplasma gondii infection during pregnancy. *J. Clin. Microbiol.* (2003) **41**: 5414.
- Belluzo, S. Desarrollo de biosensores amperométricos de utilidad para el diagnóstico de la enfermedad de chagas. Tesis doctoral Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Rosario (2009).

- Belluzo, M.S., Ribone, M.E., Lagier, C.M. Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics. *Sensors* (2008) **8**: 1366-1399.
- Bondioli, P. & Bella, L.D. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* (2005) **107**: 153-157.
- Camussone C., Gonzalez V., Belluzo M.S., Pujato, N., Ribone, M.É., Lagier, C.M., and Marcipar I.S. Comparison of Recombinant Trypanosoma cruzi Peptide Mixtures versus Multiepitope Chimeric Proteins as Sensitizing Antigens for Immunodiagnosis. *Clin. Vaccine Immunol.* (2009) **16**: 899-905.
- Centers of Diseases Control and Prevention (CDC). Páginas web:
a) <http://www.cdc.gov/toxoplasmosis/>
b) <http://www.cdc.gov/TB/>
- Costa, J.G., Faccendini, P.L., Sferco, S.J., Lagier, C.M., Marcipar, I.S. Evaluation and comparison of the ability of online available prediction programs to predict true linear B-cell epitopes. *Prot. Pept. Letters.* (2013) 20(6):724-30.
- Davydov, I.I y Tonevitskii, A.G. Linear B-cell epitope prediction. *Mol. Biol.(Mosk).* (2009) **43**: 166-174.
- da Silveira, J.F., Umezawa, E.S., Luquetti, A.O. Chagas disease: recombinant Trypanosoma cruzi antigens for serological diagnosis. *TRENDS Parasitol.* (2001) **17**: 286.
- Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C., Gilbert. R., Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counselling. *Lancet* (1999) **353**: 1829.
- Durlach R., Kaufer, F., Carrall, L., Freuler, C., Ceriotto, M., Rodriguez, M., Freilij, H., Altchek, J., Vazquez, V., Corazza, R., Dalla Fontana, M., Arienti, H., Sturba, E., Gonzalez Ayala, S., Cecchini, E., Salomon, C., Nadal, M., Gutierrez, N., Guarnera, E. Consenso argentino de toxoplasmosis congénita. *Medicina.* (2008). **68**: 75-87.
- Eco Chemie B.V. User manual for electrochemical methods for Windows vs. 4.8 Autolab. The Netherlands, 2000.
- El-Manzalawy, Y., Dobbs, D., Honavar, V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J. Mol. Recognit.* (2008) **21(4)**: 243-255.

- Faccendini, P.L., Ribone, M.E., Lagier, C.M., Selective application of two rapid, low-cost electrochemical methods to quantify glycerol according to the sample nature. *Sens. Actuat. B.* (2014) **193**: 142–148.
- Fuentes, I., Rubio, J.M., Ramirez C. y Alvar, J. Genotypic Characterization of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Human Toxoplasmosis in Spain: Direct Analysis from Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* (2001). **39(4)**: 1566-1570.
- Freij, B.J. & Sever J.L. Toxoplasmosis. *Pediatrics in review.* (1991) **12**: 227.
- Gamella, M., Campuzano, S., Reviejo, A.J., Pingaron, J.M. Integrated multienzyme electrochemical biosensors for the determination of glycerol in wines. *Anal. Chim. Acta* (2008) **609**: 201-209.
- Ghica M.E. & Brett, C.M.A. Development and Applications of a Bienzymatic Amperometric Glycerol Biosensor Based on a Poly(Neutral Red) Modified Carbon Film Electrode. *Anal. Lett.* (2006) **39**: 1527-1542.
- Goriushkina, T.B., Shkotova, L.V., Gayda, G.Z., Klepach, H.M., Gonchar, M.V., Soldatkin, A.P., Dzyadevych, S.V. Amperometric biosensor based on glycerol oxidase for glycerol determination. *Sens. Actuat. B* (2010) **144**: 361-367.
- Harning, D., Spenter, J., Metsis, A., Vuust, J., Petersen, E. Recombinant *Toxoplasma gondii* Surface Antigen 1 (P30) Expressed in *Escherichia coli* Is Recognized by Human *Toxoplasma*-Specific Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (1996) **3(3)**: 355–357.
- Hiszczyńska-Sawicka, E., Kurl, J., Pietkiewicz, H., Holec, L., Gsiorl, A., Myjak, P. Efficient production of the *Toxoplasma gondii* GRA6, p35 and SAG2 recombinant antigens and their applications in the serodiagnosis of toxoplasmosis *Acta Parasitol.* (2005) **50(3)**: 249–254.
- Hopp, T.P. & Woods, K.R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1981) **78(6)**: 3824-3828.
- Iost, R.M., da Silva, W.C., Madurro, J.M., Madurro, A.G., Ferreira, L.F., Crespilho, F.N. Recent advances in nano-based electrochemical biosensors: application in diagnosis and monitoring of diseases. *Front Biosci. (Elite Ed.)*. (2011) **1(3)**: 663-89.
- Jirovec, O. y Jindrich, J. A contribution to the technique of intracutaneous testing with toxoplasmin. *J. Clin. Path.* (1961) **14**: 522-524.

- Joselevich, E., Dai, H., Liu, J., Hata, K Windle, A.H. Carbon nanotube Synthesis and Organization en Jorio, A., Dresselhaus, M., Dresselhaus, G: (Editores) *Carbon Nanotubes*. Editorial Springer (2008) ISBN: 978-3-540-72864-1. e-ISBN: 978-3-54072864-8.
- Kahyaoglu, A., Beden, B., Lamy, C. Oxydationn electrocatalytique du glycerol sur elctrodes d'or et de platine en miles aqueux. *Electrochem. Acta*. (1984). **29(10)**:1489-1492.
- Kronka, E.A., Borges, P.R., Latanze, R., Paim, A.P., dos Reis, B.F. Multicommutated Flow System for Glycerol Determination in Alcoholic Fermentation Juice Using Enzymatic Reaction and Spectrophotometry. *J. Flow Injection Anal.* (2001) **18(2)**: 132-138.
- Kwon, Y. & Koper, M.T.M. Combining Voltammetry with HPLC: Application to Electro-Oxidation of Glycerol. *Anal. Chem.* (2010) **82 (13)**: 5420–5424.
- Kolaskar, A.S. & Tongaonkar, P.C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens *FEBS Lett.* (1990) **276(1,2)**: 172-174.
- Lapenaite, I., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A. Current Trends in Enzymatic Determination of Glycerol. *Crit. Rev. Anal. Chem.* (2007) **36(1)**: 13-25.
- Larsen, J.E., Lund, O., Nielsen, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome. Res.* (2006) **2**: 2-9.
- Lau, Y.L. & Fong, M.Y. *Toxoplasma gondii*: Serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Experim. Parasitol.* (2008) **119**: 373–378.
- Li, R., Keymeulen, B., Gerlo, E. Determination of glycerol in plasma by an automated enzymatic spectrophotometric procedure. *Clin. Chem. Lab Med.* (2001) **39**: 20-24.
- Lima, M.B., Insausti, M., Domini, C.E., Pistonesi, M.F. de Araujo, M.C., Fernández Band, B.S. Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction. *Talanta* (2012) **89**: 21-26.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* (1951) **193(1)**: 265–75.
- Lourenço, L.M. & Stradiotto, N.R. Determination of free glycerol in biodiesel at a platinum oxide surface using potential cycling technique. *Talanta* (2009) **79**: 92-96.

- Lu, B., Wu, S., Shi, Y., Zhang, R., Zou, L., Gao, S., Lin, M., Zhou, Y. *Toxoplasma gondii*: Expression pattern and detection of infection using full-length recombinant P35 antigen. *Experim. Parasitol.* (2006) **113**: 83–90.
- Martín-Hernández, I. Toxoplasmosis congénita: una mirada al problema. *Rev. Biomed.* (2004). **15**:181-190.
- Maruta, A.H. & Paixao, T.R.L.C. Flow injection analysis of free glycerol in biodiesel using a copper electrode as an amperometric detector. *Fuel* (2012) **91**: 187-191.
- McNerney, R., Kambashi, B.S., Kinkese, J., Tembwe, R., Faussett, P.G. Development of a Bacteriophage Phage Replication Assay for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* (2004) **42(5)**: 2115–2120.
- Monteiro, M.R., Ambrozín, A.R.P., Lião, L.M., Ferreira, A.G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization, *Talanta* (2008) **77**: 593-605.
- Montoya, J.G. y Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *Lancet* (2004) **363**: 1965-1976.
- Musameh, M., Wang, J., Merkoci, A., Lin, Y. Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. *Electrochem. Comm.*(2002) **4**: 743–746.
- Namrata, T. y Rajat, K.D. Immunoinformatics: an integrated scenario. *Immunology.* (2010) **131(2)**: 153-168.
- Organización Mundial para la Salud OMS. Página web: <http://www.who.int/topics/tuberculosis/es/>
- Osteryoung, J.G. y Osteryoung, R.A. Square wave voltammetry. *Anal. Chem.* (1985) **57** 101A-110A.
- Parmley, S.F., Sgarlato, G.D., Mark, J., Prince, J.B., Remington, J.S. Expression, Characterization, and serologic Reactivity of Recombinant surface Antigen P22 of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.* (1992) **30(5)**: 1127-1133.
- Park, D. J., Drobniewski, F.A., Meyer, A., Wilson, S.M. Use of a Phage-Based Assay for Phenotypic Detection of Mycobacteria Directly from Sputum. *J. Clin. Microbiol.* (2003) **41(2)**: 680–688.
- Perotti, J.P. Optimización del diagnóstico de toxoplasmosis en la embarazada mediante la utilización de un antígeno recombinante de fase aguda de *Toxoplasma gondii*. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Litoral; Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas; Instituto de Tecnología Biológica. Santa Fe. (2007).

- Pop, A., Manea, F., Remes, A., Baciú, A.M., Orha, C., Vaszilcsin, N., Picken, S. Silver-functionalized multi-wall carbon nanotubes composite electrode for non-enzymatic detection of glycerol. *IEEE Sensors* (2011) 581-584.
- Remington, J.S., McLeod, R., Desmonts, G. Toxoplasmosis. En *Infectious diseases of the fetus and newborns infant*, Remington, J.S. and Klein, J.O. (eds.), 4ta Ed. Philadelphia. The W.B. Saunders Company. (1995):140.
- Rodríguez Acar, M., Lizárraga García, C., Jurado Santa Cruz, F. Intradermorreacciones en dermatología. *Dermatol. Rev. Mex.* (2008).**52(4)**:160-74
- Rubianes, M. D. y Rivas, G.A. Carbon nanotubes paste electrode. *Electrochem. Comm.* (2003) 5: 689–694.
- Saha, S., Bhasin, M., Raghava, G.P. Bcipep: A database of B-cell epitopes. *BMC Genomics.* (2005) **6**: 79-76.
- Saha, S. & Raghava, G.P. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins.* (2006) **65**: 40-48.
- Sawyer, D.T. y Roberts, J.L. *Experimental Electrochemistry for Chemists.* (1976). Editorial Jonh Wiley & Sons, Inc.
- Shin, D.S., Kim, D. H., Chung, W. J., Lee, Y.S. Combinatorial Solid Phase Peptide Synthesis and Bioassays. *J. Biochem. Mol. Biol.* (2005) **38(5)**: 517-525.
- Silva, S.G. & Rocha, F.R. A flow injection procedure based on solenoid micro-pumps for spectrophotometric determination of free glycerol in biodiesel. *Talanta* (2010) **83**: 559-564.
- Stradiotto, N.R., Xiao, L., Moshar, A., Compton, R.G. The fabrication and characterization of a nickel nanoparticle modified boron doped diamond electrode for electrocatalysis of primary alcohol oxidation. *Electroanalysis* (2009) **21**: 2627-2633.
- Swain, G. M. Solid Electrode Materials: Pretreatment and Activation en *Handbook of Electrochemistry.* Zoski, C.G. (Editora). Editorial: Elsevier (2007) ISBN-13: 978-0-444-51958-0.
- Sweredoski, M.J., Baldi, P. COBEpro: a novel system for predicting continuous B-cell epitopes *Protein Eng. Des. Sel.* (2009) **22(3)**: 113-120.
- Tehrani, R.M.A. & Ghani, S.A. Electrocatalysis of free glycerol at a nanonickel modified graphite electrode and its determination in biodiesel. *Electrochim. Acta* (2012) **70**: 153-157.

- Trabattoni, E., Lavaroni, O., Vera, E., García, N., Dalla Fontana, M., Achkar, G., Rossi, A. Prevalencia de anticuerpos anti *toxoplasma gondii* y *trypanosoma cruzi* en alumnos de ciencias veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, 2006. *FAVE - Ciencias Veterinarias*. (2008). **7(1-2)**: 83-90.
- Trasatti, A y Petrii, O. A. Real surface area measurements in electrochemistry. *Pure Appl. Chem.* (1991). **63(5)**: 711-734.
- Verdini R.A. y Lagier C.M. Voltammetric Iodometric Titration of Ascorbic Acid with Dead-stop End-point Detection in Vegetable and fruit samples *J. Agric. Food Chem.* (2000) **48**: 2812.
- Vo-Dinh, T. & Allain, L. Biosensors for Medical Applications en *Biomedical Photonics Handbook*. Vo-Dinh, T. (Editor). Editorial CRC Press (2003) Print ISBN: 978-0-8493-1116-1. eBook ISBN: 978-0-203-00899-7.
- Wang, H. W., Lin, Y.C., Pai, T.W., Chang, H.T. Prediction of B-cell linear epitopes with a combination of support vector machine classification and amino acid propensity identification. *J. Biomed. Biotechnol.* (2011), **2011**: 432830.
- Wang, J. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanalysis*. (2005) **17**: 7-21.
- Wu, L.C. & Cheng, C.M. Flow-injection enzymatic analysis for glycerol and triacylglycerol. *Anal. Biochem.* (2005) **346**: 234-240.