

Desarrollo de un biosensor para el análisis de la inhibición enzimática causada por fisostigmina

Alarcón Angeles Georgina^{1*}, Santana Hernández Aaron Andrés¹, Castañeda Briones María Teresa², Gómez Hernández Martín¹.

¹Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos. Calzada del Hueso 1100, Coyoacán, Ciudad de México, 04960, México

²Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Ciencias Básicas. Av. San Pablo No. 180, Azcapotzalco, Ciudad de México. C.P. 02200. México.

*Autor para correspondencia: galarcon@correo.xoc.uam.mx

Recibido:

08/julio/2018

Aceptado:

20/septiembre/2018

Palabras clave:

Biosensor,
nanopartículas,
fármaco

Keywords:

Biosensor,
nanoparticles,
drug

RESUMEN

La inhibición enzimática se considera el punto clave en aplicaciones clínicas y farmacoterapia, es por ello que el uso de biosensores enzimáticos es una buena alternativa en la evaluación de los fármacos. En este trabajo se presenta el desarrollo de un biosensor enzimático, basado en la inmovilización de nanopartículas de oro-Acetilcolinesterasa vía crosslinking. La actividad enzimática se evaluó por amperometría, parámetros como concentración de la enzima y del sustrato, pH y potencial de trabajo aplicado (E_a) fueron optimizados. Los resultados mostraron que la respuesta del biosensor es lineal con $r^2 = 0.999$, con sensibilidad de $27.621 \mu\text{A}/\text{mM}$. $\text{LOD} = 0.022 \text{ mM}$ y $\text{LOQ} = 2.29 \text{ mM}$, el coeficiente de variación fue de 1.72% , el tiempo de respuesta fue inferior a 0.1 s , además se encontró que no hay diferencias significativas intra e inter biosensores. El biosensor fue viable para la evaluación del efecto farmacológico de fisostigmina a través de la inhibición enzimática, causada por el fármaco.

ABSTRACT

Enzyme inhibition is considered the key point in clinical applications and the pharmacotherapy, so, use of enzymatic biosensors is a good alternative for drug evaluation. This paper presents development of enzymatic biosensor, based on the immobilization of gold nanoparticles-Acetylcholinesterase via crosslinking. The enzymatic activity was evaluated by amperometry, parameters such as enzyme, and substrate concentration, pH and applied work potential (E_a), were optimized. Results show a linear response of the biosensor with $r^2 = 0.999$, and sensitivity of $27.621 \mu\text{A}/\text{mM}$. $\text{LOD} = 0.022 \text{ mM}$ and $\text{LOQ} = 2.29 \text{ mM}$, the coefficient of variation was 1.72% , while the response time was less than 0.1 s . It was found that there are no significant differences intra and inter biosensors. The biosensor was suitable for the evaluation of the pharmacological effect of physostigmine through enzymatic inhibition, caused by the drug by cross-linking with glutaraldehyde in a multi-layer deposition.

Introducción

La química analítica tiene un papel importante en el desarrollo y aplicación de métodos analíticos para el análisis de diversas sustancias de interés biológico. Sustancias químicas tóxicas, metales pesados, microorganismos patógenos y fármacos, son analizados con el fin de evitar enfermedades e incluso la muerte, el aseguramiento de la calidad tanto de los medicamentos, alimentos, así como el medio ambiente, es de gran importancia para la preservación de la salud. Por lo que surge la exigencia de nuevos métodos que sean confiables, rápidos con alta sensibilidad, alta selectividad, de fácil manejo, de bajo costo y en tiempo real (Alarcón et al., 2016).

En particular uno de los retos en la industria farmacéutica es la evaluación de los efectos farmacológicos, aspectos como la inhibición enzimática se considera el punto clave en aplicaciones clínicas y farmacoterapia. Para lo cual, se requiere del desarrollo de nuevos métodos analíticos con límites de detección muy bajos, con alta selectividad, ser simples, de fácil operación y económicos, de allí que el uso de biosensores electroquímicos surge como alternativa para la evaluación de los fármacos y sus efectos.

Varios medicamentos como fisostigmina, neostigmina, codeine, alopurinol, metimazol y moclobemida inducen la inhibición de las enzimas diana implicadas en diversas enfermedades (Medyantseva et al., 2017; Felz et al., 2015; Mohiuddin et al., 2016). En consecuencia, los biosensores basados en la inhibición enzimática se perfilan como una herramienta esencial para el monitoreo los fármacos.

Entre los ejemplos de biosensores destacan aquellos se basan en la interacción enzimática, como es el caso de aquellos que funcionan a través de la acetilcolinesterasa, una enzima necesaria para el funcionamiento normal del sistema muscular y nervioso periférico y central en los seres vivos, esta es utilizada en la detección de pesticidas como el paraoxón y fármacos como la fisostigmina que inhiben su actividad (Jha and Ramaprabhu, 2010; Vandeput et al., 2015).

Es importante señalar que las sustancias que pudiesen actuar como inhibidores de la acetilcolinesterasa son potencialmente tóxicas, por lo que es necesario conocer su concentración en el agua, los alimentos, así como para la fabricación de fármacos (Vandeput et al., 2015; LeDoux, 2011).

Los estudios destinados a la determinación y cuantificación de sustancias inhibitoras de la acetilcolinesterasa permiten prevenir daños en la salud de los seres vivos que puedan mantener contacto con

éstas y mejorar los estándares de calidad relacionados a la liberación de productos que las contengan, por lo que el uso de biosensores es una buena alternativa al ser un método de análisis rápido.

En este sentido, el éxito en la evaluación farmacológica de diversos fármacos en sistemas biológicos dependerá del biosensor usado, para lo cual se debe considerar que la construcción de un biosensor, la elección de una matriz apropiada (electrodo-transductor-enzima) y el procedimiento de inmovilización de la enzima como los factores más importantes que afectan o favorecen el rendimiento analítico.

Otro factor importante radica en el transductor, por lo que, la modificación de los electrodos con materiales adecuados facilita las reacciones electroquímicas de los compuestos redox, este fenómeno generalmente aumenta la selectividad y la sensibilidad de las determinaciones. Como ya es sabido ciertos complejos metálicos pueden catalizar la electro-oxidación ó electro-reducción de algunos compuestos química y biológicamente importantes. Se ha reportado que los procesos electroquímicos pueden mimetizar el comportamiento redox realizado por enzimas a nivel biológico por lo que resulta interesante el análisis de los fármacos por técnicas electroquímicas. Recientemente el uso de nanomateriales (NMs), ha potenciado el desarrollo de los biosensores electroquímicos (Kurbanoglu et al., 2017), al incluir los NMs se mejora la conductividad, la estabilidad y los límites de detección.

En este trabajo se presenta el desarrollo de un biosensor electroquímico basado en películas de nanopartículas de oro-acetilcolinesterasa (ACh) inmovilizando via crosslinking con glutaraldehído, este biosensor fue usado para el monitoreo de la actividad enzimática de ACh, se presenta el efecto farmacológico de fisostigmina.

Metodología

Materiales y reactivos

Materiales y reactivos: La acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* (anguila eléctrica), la albúmina bobina sérica, el glutaraldehído, el yoduro de Acetilcolina (ACh), las sales necesarias para la elaboración de las soluciones buffer de fosfatos (PBS) así como el HAuCl_4 fueron adquiridas de Sigma Aldrich. Las mediciones voltamperométricas cíclicas y cronoamperométricas fueron llevadas a cabo en un potenciostato AUTOLAB PSGSTAT-12 controlado por el software NOVA 1.6, usando una celda Cell Stand C3. Los estudios amperométricos se llevaron a cabo con

electrodos serigrafiados de carbono que consistían en un electrodo de trabajo de tinta de grafito, con un diámetro de 3 mm, un pseudoelectrodo de referencia de Ag/AgCl y un contraelectrodo igualmente de tinta de grafito.

Mediciones Electroquímicas

Para la determinación del potencial óptimo se realizaron pruebas cronoamperométricas en las que se sometió al electrodo a potenciales de 0.1 a 1 V en intervalos de 120 s con variaciones del potencial de 0.1 V y registrando la respuesta analítica (Amperios), para este fin se utilizó una solución ACh 0.5, mM en buffer de fosfatos 0.01 M. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Preparación de la solución de NPsAu

Se utilizó la técnica de Turkevich para la producción de nanopartículas de oro (AuNPs); la síntesis se realizó a partir de una solución de H₂AuCl₄ 25 mM, una vez que sal de oro disuelta en agua se llegó a ebullición se hizo la adición del agente reductor (citrato de sodio, 1 % m/v), y se dejó ebullicir hasta la formación coloidal (cambio en la coloración de amarillo tenue a rojo carmín).

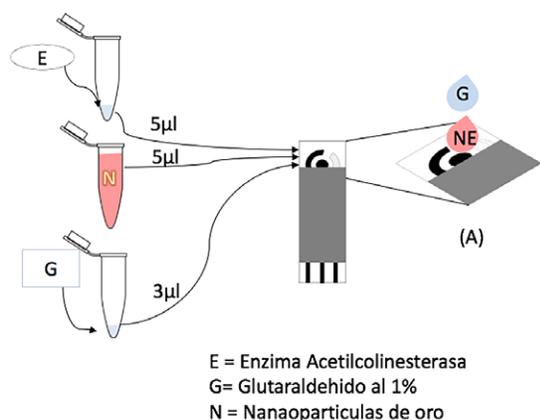


Figura 1. Representación esquemática del biosensor.

Para el análisis de precisión de la señal, las mediciones se hicieron por sextuplicado en buffer de fosfatos 0.01 M, pH 7, a temperatura ambiente y considerando un tiempo de estabilización de 5 min y uno de aplicación de potencial de 2 min, a una concentración de ACh 0.5 mM.

Una vez determinado el potencial óptimo, se determinó el pH óptimo del biosensor por cronoamperometría, para lo que se prepararon buffers de fosfato calibrados del pH 4 al 10, todos los experimentos de pH se realizaron con una solución de ACh de concentración 0.5 mM, para lo cual se usó una celda típica de 3 electrodos con capacidad de 10 mL.

Las curvas de calibración y la determinación de la constante de Michaelis-Menten (*K_m*) se llevaron a cabo por cronoamperometría, con un tiempo de estabilización de 5 min y uno de aplicación de 2 min para la curva de calibración (0.1 mM - 0.7 mM).

La determinación de la inhibición de la enzima se llevó a cabo dejando incubar el biosensor en una solución de fisostigmina 0.2 mM durante 10 min y comparando las corrientes obtenidas antes y después de su interacción con el fármaco. Para lo cual se usó una solución de ACh de concentración 5 mM (concentración de saturación).

Resultados y discusión

La caracterización de las AuNPs se realizó en la región espectral del ultravioleta-visible, donde el espectro de absorción de éstas, muestra una banda con un máximo de absorción en $\lambda = 520$ nm (Figura 2), este máximo es característico de AuNPs cuyo tamaño se encuentra en el orden de 20 nm (Yunjie, 2004), con el análisis espectral.

La determinación del tamaño de las AuNPs se realizó utilizando microscopía de transmisión, electrónica, TEM por sus siglas en inglés, la imagen muestra que las AuNPs sintetizadas presentan un tamaño de alrededor de los 20 ± 2.0 nm (Figuras 3a y 3b).

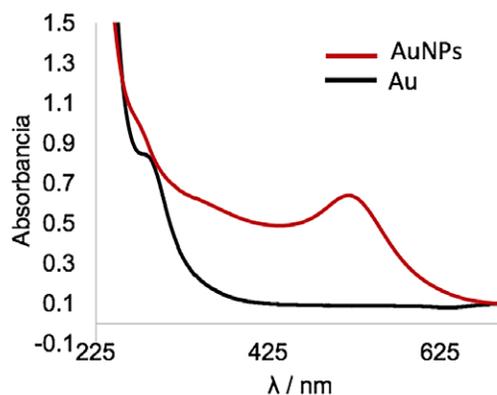


Figura 2. Espectros de absorción UV-Vis de oro (línea negra) y nanopartículas de oro (línea roja).

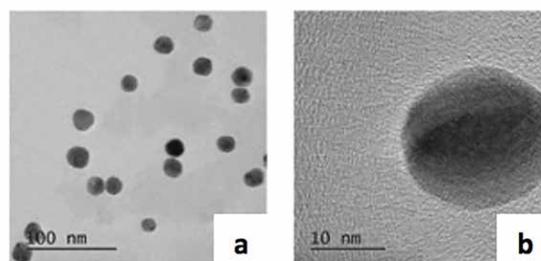


Figura 3. Imágenes del TEM de nanopartículas de oro.

Para las pruebas de determinación de potencial, se obtuvo que el valor óptimo fue de 0.8 V (Figura 4a); el análisis de precisión del sistema arrojó un coeficiente de variación de 1.72 %, para lo cual se usó una concentración de ACh de 0.3 mM. La prueba F se realizó para la evaluación de la respuesta entre los electrodos, F_{cal} 1.2 con $n=6$, con lo que se considera que no hay diferencias significativas entre las lecturas, para las pruebas de pH el óptimo fue de 7.5 (Figura 4b). A partir de las condiciones óptimas se evaluó la linealidad del sistema en función de la concentración del sustrato, se determinó $r^2 = 0.999$, con sensibilidad de 27.621 $\mu A/mM$. LOD = 0.022 mM y LOQ = 2.29 mM (Figura 4c),

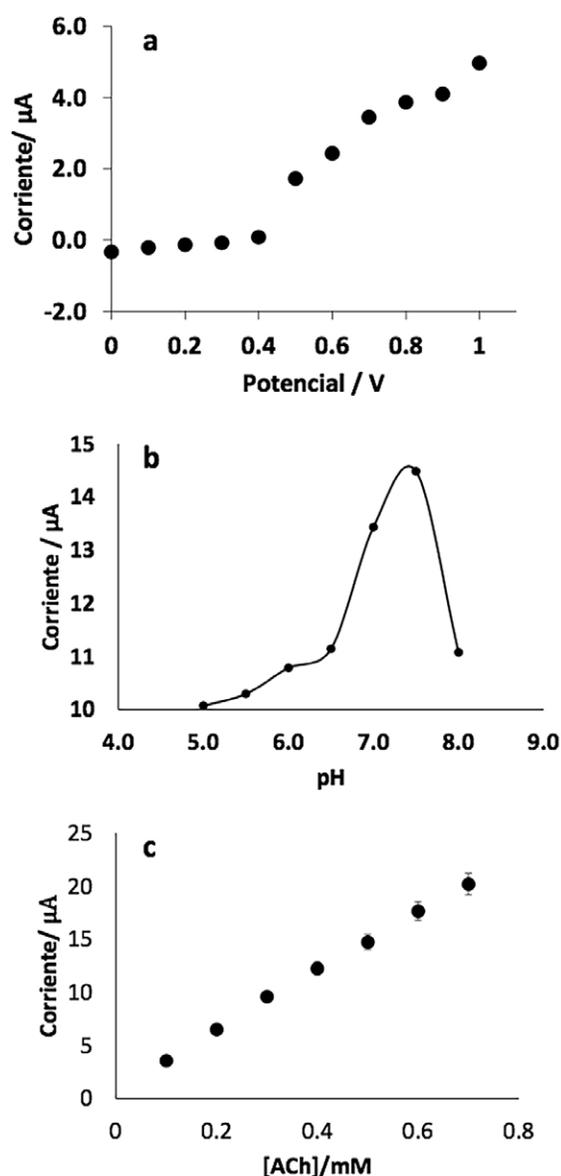


Figura 4. Factores que afectan la respuesta del biosensor a) Potencial aplicado, b) pH y c) concentración de sustrato.

Por otra parte, el valor de la K_m y la corriente máxima (I_{max}) se calculó usando la ecuación de Lineweaver-Burk (Figura 5a), obteniendo un valor de 0.027 mM, 10 veces por debajo de lo reportado por Pohanka et al., 2011.

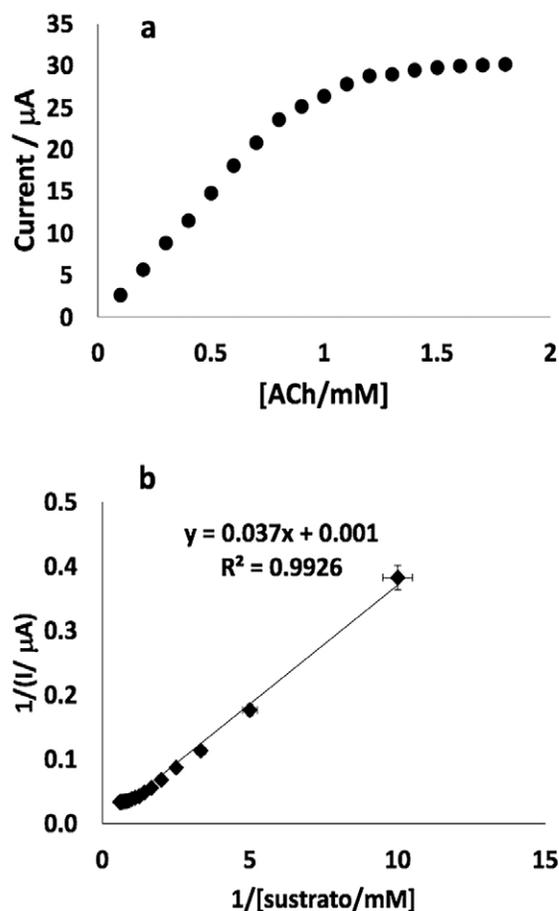


Figura 5. a) Curva de calibración con la que se obtuvo el modelo de Lineweaver-Burk b) Gráfico del modelo de Lineweaver-Burk para la determinación de la constante de Michaelis-Menten.

Para la determinación de la inhibición fue necesario alcanzar la saturación de la enzima por lo que determinó una concentración de sustrato de 1 mM.

La inhibición se midió como:

$$\%I = (I_0 - I) / I_0$$

Donde I_0 es la corriente del sustrato inicial, I la corriente del sustrato después de la inhibición.

Entre los resultados preliminares se obtuvo la curva de calibración en el intervalo de concentración de 12 a 200 μM de fisostigmina, la cual mostró linealidad en función

del logaritmo de la concentración de fármaco, con $r^2 = 0.998$ (Figura 6), un límite de detección (LOD) de 1.18 μM . Cabe señalar que estos resultados son favorables en comparación con lo reportado en la literatura donde se ha reportado la determinación hasta 50 μM (Milkani et al., 2011).

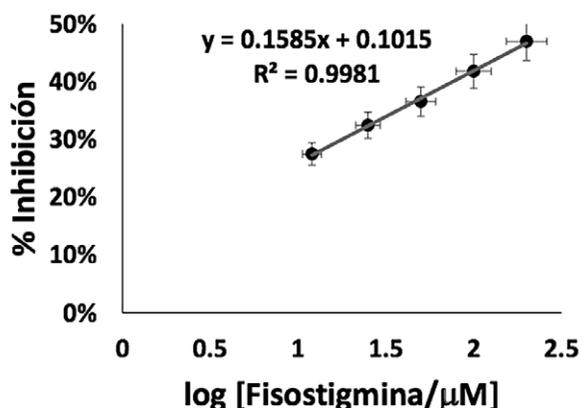


Figura 6. Porcentaje de inhibición de fisostigmina a partir de la inhibición de la enzima ACh.

Además, cabe señalar que los resultados preliminares muestran que para alcanzar el 90 % de la inhibición de la acetilcolinesterasa por fisostigmina se requiere un tiempo de incubación de 180 min, para 19 mU de enzima.

Conclusiones

Los resultados obtenidos contribuyeron a la optimización del método y composición del biosensor a fin de obtener las señales más estables, reproducibles y con menor tiempo de respuesta. Se encontró que el método empleado en la fabricación del biosensor es óptimo, ya que no existen diferencias significativas entre los biosensores. Se encontró que el uso de las nanopartículas mejoró la señal y estabilidad del biosensor. Los estudios preliminares muestran la factibilidad de uso del biosensor para el análisis del efecto del fármaco sobre la enzima, mostrando que a mayor concentración de fármaco y tiempo de interacción fármaco-enzima, la inhibición producida puede llegar hasta un 90 %. Algunas perspectivas de este trabajo son: Evaluar la cinética y caracterizar la inhibición enzimática, así como aplicar el biosensor en muestras reales.

Agradecimientos

Aaron Andrés Santana Hernández desea dar las gracias a la Academia Mexicana de Ciencias y al Instituto Tecnológico de Mérida, Ingeniería bioquímica por la beca otorgada.

Referencias

- Alarcón-Angeles G., Álvarez-Romero G. A., Merkoci A. (2016). Emerging Nanomaterials for Analytical Detection, *Comprehensive Analytical Chemistry*. 1ra Ed. Elsevier, p.195-240.
- Hai A., Ben-aim D., Korbakov N., Cohen A., Shappir J., Oren R., Spira M. E., Yitzchaik S., (2006). Acetylcholinesterase-ISFET Based System for Detection of Acetylcholine and Acetylcholinesterase inhibitors. *Biosens. Bioelectron.*, 22: 605-612.
- Medyantseva E. P., Brusnitsyn D. V., Varlamova R. M., Maksimov A. A., Konovalova O. A., Budnikov H. C. (2017). Surface modification of electrodes by carbon nanotubes and gold and silver nanoparticles in imonoaminoxidase biosensors for the determination of some antidepressants. *J. Anal. Chem.*, 72: 362-370.
- Milkani E., Lambert C. R., Mc Gimpsey W. G. (2011). Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor. *Anal. Biochem.*, 408: 212-219.
- Fenzl C., Genslein C., Zöpfl A., Baumner A. J., Hirsch T. (2015). A photonic crystal based sensing scheme for acetylcholine and acetylcholinesterase inhibitors. *J. Mater. Chem. B*, 3: 2089-2095.
- Jha N., Ramaprabhu S. (2010). Development of Au nanoparticles dispersed carbon nanotube-based biosensor for the detection of paraoxon. *Nanoscale*, 2: 806-810.
- Kurbanoglu S., Ozkan S. A., Merkoçi A. (2017). Nanomaterials-based enzyme electrochemical biosensors operating through inhibition for biosensing applications. *Biosens. Bioelectron.*, 89: 886-898.
- Mohiuddin M., Arbain D., Islam A. K. M. S., Ahmad M. S.; Ahmad M. N. (2016). Alpha-Glucosidase Enzyme Biosensor for the Electrochemical Measurement of Antidiabetic Potential of Medicinal Plants. *Nanoscale Res. Lett.*, 11: 95.
- Pohanka M., Hrabínova M., Kuca K., Simonato J. P., (2011). Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method. *Int. J. Mol. Sci.*, 12: 2631-2640.