



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

NOMBRE DEL PROYECTO ESPECÍFICO:

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE LAS TENDENCIAS EN EL
ANÁLISIS DE GLUTATIÓN.

PROYECTO GENÉRICO DEL DEPARTAMENTO SISTEMAS BIOLÓGICOS:

EVALUACIÓN DE PRODUCTOS RELACIONADOS CON LA SALUD.

DESARROLLO DE MÉTODOS Y TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL
CONTROL FÍSICO, QUÍMICO, BIOLÓGICO Y/O MICROBIOLÓGICO
DE PRODUCTOS RELACIONADOS CON LA SALUD.

PRESENTA:

OSAMI SALVADOR BARÓN KONO

ASESORES:

DRA. GEORGINA ALARCÓN ÁNGELES

DR. MARTÍN GÓMEZ HERNÁNDEZ

Índice

Índice	2
1. Resumen	3
2. Objetivos.....	3
General:.....	3
Particular:	3
3. Introducción	4
4. Antecedentes.....	5
Estrés oxidativo	5
Defensas antioxidantes	8
Glutación.....	8
Importancia y el funcionamiento del glutación.....	9
Técnicas convencionales para el análisis del glutación.	11
<i>Métodos Biológicos de análisis</i>	12
<i>Métodos Fluoro métricos de análisis</i>	12
<i>Cromatografía HPCL</i>	13
5. Las nuevas tecnologías en el análisis de glutación	14
Galvanoplastia.....	15
Potenciometría.....	16
Celdas electroquímicas.....	17
Sensores electroquímicos.....	18
Biosensores.	19
Electrodos.....	20
<i>Electrodos utilizados en la determinación de Glutación</i>	22
La nanotecnología como herramienta para incrementar la eficiencia de un biosensor.....	29
6. Conclusión.....	36
7. Referencias.....	37

1. Resumen

El estrés oxidativo es el estado celular en el cual existe un desequilibrio, este desbalance causa efectos tóxicos a nivel celular, lo que conlleva a la disfunción de los mecanismos de control y señalización celular promoviendo cientos enfermedades.

La molécula del glutatión (GSH) tiene un rol central en la protección contra el estrés oxidativo y la detoxificación, siendo fundamental para la supervivencia celular. Por lo tanto, la disponibilidad de glutatión es un factor clave para el mantenimiento de la salud e indicador del riesgo de enfermedad. La disminución de GSH está asociada con el envejecimiento y con la patogénesis de varias enfermedades, por lo tanto, la determinación de la concentración de GSH en muestras biológicas puede ser utilizada como un indicador del status del organismo y de riesgo de enfermedades.

La determinación de GSH puede realizarse por diferentes metodologías tales como: HPLC, UV/vis, fluorescencia, métodos biológicos, etc., con sus ventajas y limitaciones cada uno de ellas, en donde la mayoría de ellos sufren de las dificultades para la detección certera de GSH. Es así, que hoy en día se utilizan novedosas técnicas electroquímicas para la determinación de GSH buscando aminorar las interferencias he inconvenientes que se presentan durante el proceso.

2. Objetivos

General:

Resumir la tendencia en las nuevas tecnologías para el análisis de glutatión

Particular:

Describir la importancia y el funcionamiento del glutatión en el sistema biológico.

Revisar las técnicas convencionales para el análisis de glutatión.

Revisar las nuevas tecnologías en el análisis de glutatión (sensores y biosensores electroquímicos/ópticos).

Resaltar la importancia de la nanotecnología en nuevos dispositivos para el análisis de glutatión.

3. Introducción

El estrés oxidativo se define como el estado celular en el cual existe un desequilibrio entre moléculas oxidantes y moléculas antioxidantes o reductoras, el exceso de oxidantes produce daño macromolecular (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y la distorsión de los circuitos redox, lo que conlleva a la disfunción de los mecanismos de control y señalización celular mediados por estos sistemas (Herero R. 2015). Hay una serie de procesos patológicos atribuibles al ataque de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que estaría implicado en algunas de sus fases o secuencias bioquímicas, como en la aterosclerosis, cataratas, enfermedades renales, diabetes mellitus, hipertensión, cirrosis, parkinson, y una de mucho interés como el cáncer.

Los antioxidantes son las sustancias encargadas de oponerse a la acción del oxígeno y de ciertas especies oxidantes. Hay sistemas enzimáticos antioxidantes capaces de metabolizar ROS generadas en los procesos redox celulares se incluye la catalasa de los peroxisomas, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa. También hay multitud de antioxidantes no enzimáticos, los llamados rastillos de radicales son especies químicas cuya posibilidad antioxidante reside en su capacidad para destruir directamente ROS, entre ellos el glutatión, ácido ascórbico y alfa tocoferol son los principales (Parrilla D. 2011).

El glutatión (GSH) es una molécula muy importante ya que participa en aspectos esenciales de la homeostasis celular, teniendo un rol central en la defensa contra el daño oxidativo. El GSH (L-g-glutamil-L-cisteinil-glicina) es un tripéptido hidrosoluble formado por los aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina que se encuentra presente en el citoplasma de todas las células. La forma oxidada de la molécula, GSSG, se encuentra principalmente en forma extracelular. Las concentraciones de GSH y GSSG (**Figura 1**) y su relación molar son indicadores de la funcionalidad celular y su alteración está relacionada con varios procesos patológicos (Gavin E. 2001).

El análisis exacto y preciso de GSH y GSSG en muestras biológicas no es sencillo debido a diversos factores como lo es su facilidad a oxidarse durante la preparación de la muestra, contaminación de las muestras biológicas, se requieren equipos muy sensibles para su detección, existen muchas enzimas en las muestras biológicas que pueden degradar el GSH, etc. El análisis y determinación del GSH puede realizarse por diferentes metodologías, tales como: HPLC, UV/vis, fluorescencia y métodos biológicos, con sus ventajas y limitaciones cada uno de ellas por los factores mencionados.

En la actualidad se utilizan novedosas técnicas electroquímicas para la determinación de GSH buscando aminorar las interferencias e inconvenientes que se presentan durante el proceso (Raouf J. 2009). La electroquímica se enfoca en el uso de las reacciones químicas para producir electricidad y el uso de la electricidad para producir cambios químicos, estudiando la conversión entre la energía eléctrica y la energía química. Los métodos electroanalíticos ofrecen ventajas de simplicidad, reducción de costo y alta sensibilidad por esto es un camino más atractivo, así como optimizable en su aspecto de especificidad mediante el uso de sensores y biosensores, por lo que la investigación se ha dirigido hacia la implementación de métodos analíticos que sean compatibles con cada necesidad que se presente (Harfield J. 2012).

En estos últimos años, los biosensores electroquímicos han llegado a tener gran importancia, debido a la capacidad tecnológica de miniaturización en la fabricación de electrodos, lo que facilita la producción en masa de biosensores, reduciendo así los costos en su fabricación, y asegurando una gran reproducibilidad. De esta manera, es posible la integración en un área de electrodo pequeña para la realización de medidas voltamperométricas. Otras de las ventajas que presenta es el mínimo consumo de reactivos, menos cantidad de material biológico en la fabricación, a la vez que permite trabajar con volúmenes de muestra más pequeños, permitiendo realizar análisis rápidos y hacer un seguimiento de los productos. (Cano L. 2008).

4. Antecedentes

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un fenómeno dinámico y complejo que puede experimentar cualquier sistema biológico, caracterizado por un desbalance entre una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) u otros agentes oxidantes contra la disponibilidad y acción de los antioxidantes (Hung M. 2015).

Los radicales libres, son moléculas con alta capacidad de difusión y de pequeño tamaño, que poseen un electrón desapareado en su orbital más externo. Los radicales libres de oxígeno son muy oxidantes y reactivos. Entre ellos se incluyen el anión superóxido (O_2^\bullet), el radical hidroxilo (HO^\bullet), el radical perhidroxilo (HO_2^\bullet), el radical alquil (RO^\bullet) y el radical peroxil (ROO^\bullet) (Herrero R. 2015).

Todos los componentes celulares son susceptibles al ataque por ROS, por ejemplo, las proteínas cuando son atacadas por ROS pueden dar lugar a la modificación de aminoácidos, la oxidación de grupos sulfhidrilo por ROS da lugar a cambios conformacionales que alteran la actividad de las enzimas. Las ROS también son responsables de modificaciones en los carbohidratos de glicoproteínas, a la pérdida de metaloproteínas e incremento de la susceptibilidad proteolítica; las ROS pueden llegar a causar rupturas de las cadenas de DNA. Los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido araquidónico, parecen ser particularmente susceptibles al ataque de

las ROS ya que contribuyen a la formación de radicales peroxilo (ROO) y dan lugar a una cadena autocatalítica de reacciones que convierten a los lípidos en hidroperóxidos lipídicos, lo que puede alterar la fluidez y causar, eventualmente, la ruptura de la membrana celular (Parrilla D. 2011).

Hay una gran serie de procesos patológicos atribuibles razonablemente al ataque de ROS, donde al menos estarían implicadas en algunas de sus fases, algunos de estos procesos patológicos más significativos son:

Aterosclerosis: Es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la acumulación de lípidos y células inflamatorias en las paredes de las arterias medianas y grandes. La patogenia de la aterosclerosis implica la activación de vías de señalización proinflamatorias, expresión de citocinas / quimiocinas y aumento del estrés oxidativo. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se oxidan para formar LDL oxidadas (ox-LDL) en estados patológicos las partículas de lipoproteínas modificadas aumentan la expresión de moléculas de adhesión celular en las células endoteliales que conducen al reclutamiento de leucocitos (linfocitos T y mastocitos) en el sub-espacio endotelial. Los linfocitos T y los mastocitos que migran hacia la íntima, liberan una variedad de citocinas que promueven la inflamación y la generación de ROS. Los factores de crecimiento liberados por estas células, así como las ROS, estimulan la migración de las células del músculo liso y la deposición de colágeno, lo que conduce al desarrollo de una placa ateromatosa (Ajo J. 2017).

Cáncer: Se ha sugerido la implicación de los radicales libres en el desarrollo tumoral. En el cáncer se encuentran radicales libres en abundancia, que atacan los tejidos y destruyen las sustancias protectoras presentes en ellos, estimulando el crecimiento de las células musculares lisas, lo que sugiere un papel del estrés oxidativo. También se ha observado la activación de algunos genes tempranos que podrían participar en el control de la transcripción de factores de crecimiento necesarios para el desarrollo tumoral. Además, se presenta la transformación oncogénica que viene condicionada por la presencia de genes mutados que controlan funciones celulares clave, y esto también puede influenciarse por el estado redox celular. Se han detectado niveles disminuidos de enzimas antioxidantes en diversos tipos de células tumorales (Guerra J. 2001).

Catarata senil: Las ROS generadas en el cristalino (estructura del ojo humano que está situado tras el iris y delante del humor vítreo, su principal función consiste en permitir enfocar objetos situados a diferentes distancias) causan daños como la modificación de proteínas, peroxidación lipídica y fragmentación del ADN. De las fuentes exógenas, la luz ultravioleta es la fuente que probablemente genera mayor cantidad de ROS en el ojo debido a que la localización anatómica del cristalino lo hace más vulnerable a la producción de estas especies por la acción de la luz durante el tiempo de vida del individuo. La agregación de las proteínas aumenta con la edad. Las proteínas del cristalino que constituyen aproximadamente el 90 % de su

estructura aumentan y muestran muchos cambios oxidantes relacionados con la edad. Estos cambios incluyen la formación de disulfuro, otros enlaces inter e intramoleculares y la oxidación de metionina, los cuales resultan en la agregación de moléculas de elevado peso molecular, por consiguiente, el estado redox de las proteínas es fundamental para mantener la función del cristalino y su transparencia (Ferrer F. 2009).

Insuficiencia renal: Los ROS producen la activación de la enzima xantina oxidasa y de los neutrófilos, mecanismos importantes del daño renal por isquemia/reperfusión. El NO (óxido nítrico) aumenta en la fase isquémica y los ROS en la de reperfusión, por lo que el balance NO/RLO condiciona la magnitud del daño. La pérdida de nefronas conduce a una mayor producción de ROS y al estrés oxidativo, por una inadecuada eliminación de los radicales libres continuamente generados. En los pacientes trasplantados de riñón también hay evidencia de aumento de oxidación de LDL. Este hecho facilita la progresión de la aterosclerosis, contribuyendo al rechazo del órgano trasplantado (Guerra J. 2001).

Diabetes mellitus: Es sabido que la autooxidación de azúcares genera ROS. A concentraciones altas de glucosa, típicas de estados diabéticos, la producción de ROS se incrementa en presencia de metales de transición. Pero el aumento de estrés oxidativo descrito en los diabéticos no está únicamente relacionado con la aceleración en la producción de ROS, sino también por la disminución de antioxidantes como el NADPH y los niveles de glutatión (Guerra J. 2001).

Cirrosis, insuficiencia hepática y hepatopatía alcohólica: Un hígado expuesto a cantidades excesivas de alcohol sufre numerosos cambios como consecuencia del estrés oxidativo y la inflamación. Una de las vías de degradación del etanol es a través del sistema microsomal catalizado por las enzimas del citocromo P450. La isoforma 2E1 del citocromo P450 (CYP2E1) es específicamente responsable de la descomposición del alcohol en condiciones de consumo crónico. El CYP2E1 activado provoca la liberación de ROS específicamente aniones superóxido y radicales hidroxilos, lo que provoca estrés oxidativo y muerte celular. Además, una reacción en cadena enzimática que conduce a la formación de acetato a partir del etanol aumenta la relación NADH / NAD + en las mitocondrias y el citoplasma (Cichoż L. 2014).

Se ha revelado que las mitocondrias que están crónicamente expuestas al etanol muestran una mayor producción de ROS y sufren varios cambios irreversibles. Las alteraciones incluyen la lesión del ADN y los ribosomas que da como resultado una síntesis de proteínas alterada e incluso inhibida. Además, las partículas oxidantes contribuyen a las alteraciones de la permeabilidad y el potencial de transición de la membrana mitocondrial. Estos trastornos provocan la liberación de factores proapoptóticos (citocromo C y caspasa-3) y se acompañan de una disminución de la síntesis de ATP. El estrés oxidativo dentro de las mitocondrias también está relacionado con un proceso inflamatorio en el hígado (Cichoż L. 2014).

Defensas antioxidantes

Las estrategias fisiológicas y farmacológicas para la defensa antioxidante se organizan en tres categorías: prevención, interceptación y reparación.

La primera línea de defensa contra las especies reactivas es la prevención contra su formación física o bioquímica.

El punto principal de interceptar un daño, una vez formado, es excluirlo antes de que llegue más lejos. Además, la interceptación a menudo conduce a la transferencia del pro-oxidante lejos de los compartimentos más sensibles.

La protección contra los efectos del estrés oxidativo también puede ser mediante la reparación del daño una vez que ha ocurrido, como reparación del DNA, cambio de lípidos modificados, y proteólisis que son capaces de proporcionar las funciones de restitución o reposición (Gavin E. 2001).

En el cuerpo humano, la capacidad de glutatión para eliminar los radicales libres es bien reconocida, proporcionando una importante barrera antioxidante. Los cambios en las concentraciones fisiológicas de glutatión se correlacionan con los pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, diabetes mellitus, aterosclerosis, artritis, epilepsia, envejecimiento, así como numerosos tipos de cáncer, etc (Harfield J. 2012).

Glutatión

El glutatión (L-g-glutamil-L-cisteinil-glicina) es un tripéptido hidrosoluble formado por 3 aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina. Es un antioxidante celular esencial, que está presente en todos los órganos y tejidos, actúa como un cofactor esencial en muchos procesos biológicos y es un agente radioprotector (Denzoin L. 2013).

La molécula se encuentra unida a proteínas y libre. La fracción libre está integrada por la forma tiol reducida llamada glutatión reducido (GSH) y la forma oxidada o disulfuro llamada glutatión oxidado (GSSG) **Figura 1**.

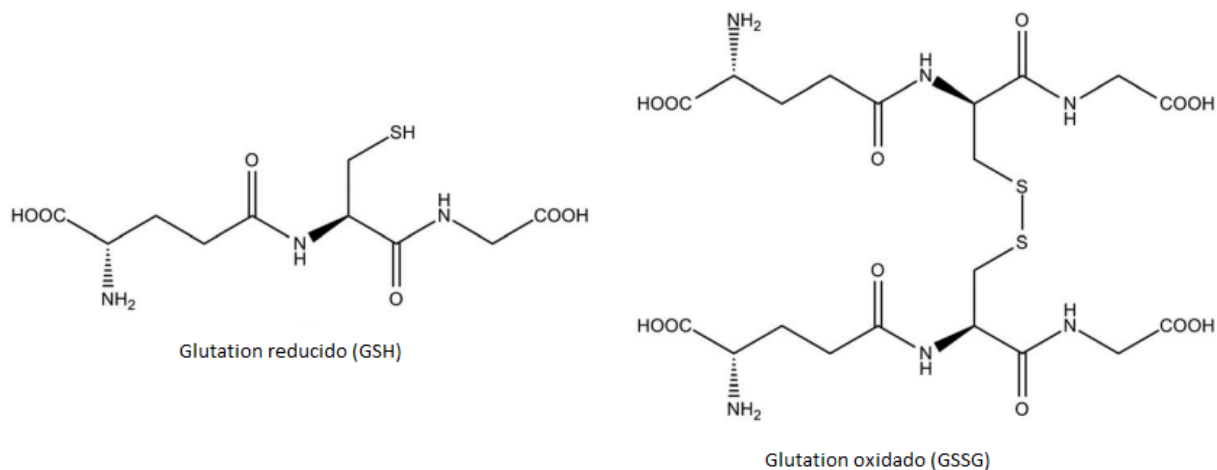


Figura 1. Estructura química de glutatión reducido y glutatión oxidado.

Fuente: Harfield J., McAuley C. and Compton R. (2012).

La forma reducida GSH es la forma activa de la molécula, es la más abundante y se encuentra en el interior de las células en concentraciones milimolares en el rango de 0.1 a 10 mM, extracelularmente el GSH se encuentran niveles micromolares. El grupo activo de la molécula está representado por el grupo tiol (-SH), **Figura 2**, del residuo de cisteína (Denzoin L. 2013).

Importancia y el funcionamiento del glutatión.

Las alteraciones en la síntesis del GSH o en su contenido se han asociado con una variedad de enfermedades. El estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial desempeñar un papel crucial en la muerte de las neuronas dopaminérgicas lo que puede dar el comienzo y la progresión de la degeneración del sistema nervioso provocando enfermedades neurodegenerativas, como la esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Hung M. 2015). El estrés oxidativo puede ser causado por diversas enfermedades como isquemia, metástasis, neurodegenerativas, diabetes, radiaciones y procesos inflamatorios mediados por citoquinas, enfermedades cardiovasculares (Martínez S. 2006); estas últimas constituyen una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en México y a nivel mundial, el GSH ha mostrado ser una de las primeras líneas de defensa, reduciendo las consecuencia y daño provocado por estas enfermedades (Martínez S. 2011).

Enfermedades más graves como lo es el cáncer y SIDA presentan alteraciones de la regulación del GSH; una persistente carga oxidativa conduce a un aumento del consumo de GSH que no se compensa. El hecho de que el nivel de GSH esté comprometido en individuos con este tipo de patologías juegue un rol muy importante durante la enfermedad (Martínez S. 2006).

La concentración de GSH con respecto al glutatión total puede considerarse como un índice del estado redox y un indicador útil de los riesgos de enfermedad. Se demostró que en pacientes con cáncer de mama los niveles de GSH disminuyeron significativamente en sangre, hasta un 2.5 veces en comparación con los de los

sujetos de control (Yeh C. 2005). También se puede encontrar más evidencia de que los niveles de GSH están implicados en la función celular anormal en la enfermedad de Parkinson donde se observa una disminución del 60-65% en la concentración de GSH en relación con los controles para aquellos que padecen la enfermedad (Aoyama K. 2007).

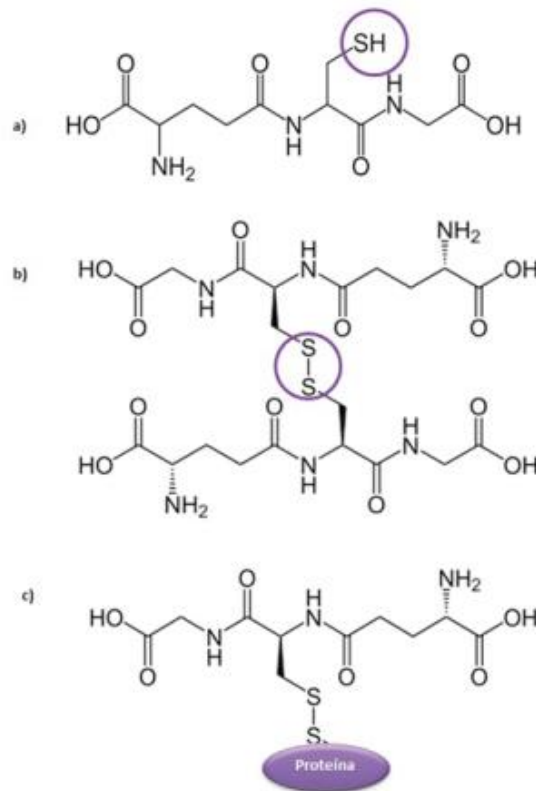
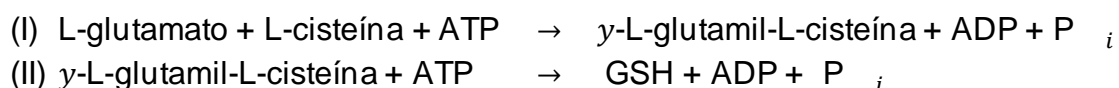


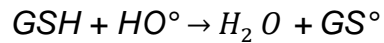
Figura 2. Estructura química de las distintas formas de glutatión. a) GSH donde se muestra su grupo activo SH del residuo de cisteína (círculo). b) GSSG formado por dos moléculas de GSH unidas por un enlace disulfuro (círculo). c) Glutatión unido a proteínas.

Fuente: Denzoin L., Soraci A., Tapia M. (2013).

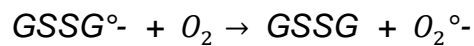
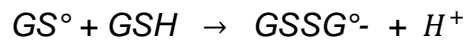
La formación de GSH ocurre en dos reacciones donde en una primera reacción (I), la enzima glutamato cisteína ligasa usa como sustratos a los aminoácidos glutamato y cisteína y forma el dipéptido γ -L-glutamilcisteína que en una segunda reacción (II) es combinado con glicina en la reacción catalizada por la enzima glutatión sintetasa formando GSH. En condiciones normales, la tasa de formación de GSH se encuentra determinada en gran parte por dos factores: Uno de ellos es la actividad de enzima glutamato cisteína ligasa y el otro es la disponibilidad del sustrato cisteína (Denzoin L. 2013).



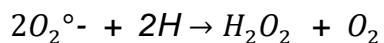
La reacción de GSH con muchos prooxidantes es una forma favorable de defensa antioxidante. Para ejemplo, la reacción de GSH con especies de radicales, tales como radical hidroxilo, produce un radical tiilo (GS°):



Mientras que los radicales tiilo pueden a su vez reaccionar entre sí, formando disulfuro de glutatión (GSSG), otra reacción favorable es la del radical tiilo con otro GSH, formando el radical disulfuro de glutatión ($GSSG^\circ$ -), que a su vez puede reaccionar con moléculas oxígeno para producir superóxido ($O_2^{\circ-}$) (Gavin E. 2001).



En compartimentos donde el superóxido dismutasa (SOD) está presente (mitocondrias y el citosol), favorecerá la siguiente reacción:



El resultado neto de las reacciones es reducir especies de radicales reactivos y formar productos que se metabolizan fácilmente.

La protección del GSH contra el estrés oxidativo no está limitado a reacciones directas con prooxidantes. GSH también juega un papel como reductor celular general, como glutatión peroxidasa (GPx). La cual es una selenoproteína que actúa sobre fosfolípidos peroxidados en las membranas biológicas. Otras proteínas antioxidantes auxiliar en el sistema GSH es GSSG reductasa (GR), que mantiene el grupo reducido de GSH a expensas de NADPH, Selenoproteína P y Selenometionina que actúan de manera similar a la GPx promoviendo la protección antioxidante del GSH (Gavin E. 2001).

Como resultado de la correlación entre la concentración de glutatión con numerosas enfermedades y afecciones médicas, es evidente la importancia de controlar y cuantificar los niveles de glutatión en los sistemas fisiológicos para el diagnóstico y tratamiento proporcionado por el médico (Harfield J. 2012).

Técnicas convencionales para el análisis del glutatión.

El análisis exacto y preciso de GSH en plasma y GSSG no es sencillo debido a varios factores:

1. El GSH se puede oxidar fácilmente durante la preparación de la muestra dando resultados erróneos.

2. Los valores plasmáticos se incrementan fácilmente por fuga incidental y no reproducible de glóbulos rojos (hemólisis) lo que conlleva a una concentración de GSH 1000 veces.
3. La concentración de GSSG en plasma es probablemente muy baja en el rango de nM y no puede ser detectado fácilmente.
4. La gama glutamil transpeptidasa (GGT) puede degradar el GSH si la enzima no se inhibe durante la preparación de la muestra (Amrit K. 2006).

El análisis de GSH puede realizarse por diferentes metodologías, tales como: HPLC, UV/vis, fluorescencia y métodos biológicos.

Métodos Biológicos de análisis

Entre ellas, uno de los primeros métodos más utilizado anteriormente es el ensayo basado en el reciclaje enzimático de Tietze F. (1969) la técnica es simple, pero se requieren dos medidas separadas para determinación de GSH y GSSG. También sufre interferencias por parte de la cisteína oxidada o reducida, xenobióticos, sustratos endógenos desconocidos. Las concentraciones medidas de GSH y GSSG por este método de reciclaje enzimático en plasma muestran variaciones de GSH hasta de 2.79 a 11.36 $\mu\text{mol/L}$ y GSSG de 0.2 a 5.4 $\mu\text{mol/L}$ (Amrit K. 2006). En este ensayo el grupo sulfhidrilo del GSH reacciona con ácido 5-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) produciendo ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB); la tasa de producción del TNB es directamente proporcional a la reacción de reciclaje del GSH y a su vez proporciona la concentración de GSH en la muestra. Debido a que el GSH es fácilmente oxidado a GSSG, para poder cuantificar GSSG se añade 2-vinilpiridina la cual se une al grupo sulfhidrilo del GSH, evitando su oxidación (Águila V. 2017). Después del reciclaje enzimático la muestra se puede acoplar a un detector de resonancia magnética nuclear (RMN) ya que ayuda a detectar moléculas en la región intracelular de forma no invasiva; cuando los materiales supramoleculares se encuentran en un entorno químico con variables y condiciones ideales, los diferentes protones en una molécula al ser excitadas por una fuente de energía en este caso electromagnética resuenan a frecuencias ligeramente diferentes, ya que estas se puede desplazar directamente proporcionales a la fuerza del campo magnético en la que se encuentre los electrones que interactúan con la superficie y el complejo con el cual se encuentra funcionalizado (Parra M. 2020).

Métodos Fluorométricos de análisis

Los ensayos fluorométricos se basan en la reacción con un fluorocromo como: ortotaldialdehído (OPA), diacetato de 5-clorometilfluoresceína (CMFDA), yoduro de propidio (IP), etc, que forma un derivado altamente fluorescente (Herrero R. 2015). La Fluorescencia molecular es una técnica espectroscópica que, desde el punto de vista analítico, resulta interesante y atractiva, debido a la sensibilidad y selectividad que la caracterizan, suelen ser muy superiores a la absorción molecular Uv/Vis. Sin

embargo, su aplicación se ve restringida a un número limitado de sistemas químicos que presentan fluorescencia nativa. Por ello, en muchos casos, se requiere la conversión previa del analito en una nueva especie química con características que favorecen el proceso fluorescente (Buitrago A. 2010).

La detección de GSH por método espectrofluorimétrico tiene como inconveniente la cisteína (Cys) ya que es uno de sus precursores suele estar presente junto con GSH en muchas muestras biológicas, la cual también reacciona con zonas de fluorescencia para GSH e interfiere con el análisis. Esto se puede resolver con reactivos de derivatización novedosos con buena selectividad para GSH en presencia de Cys lo que implicaría un aumento significativo en el costo del procedimiento para el análisis de GSH (Liang S 2002).

La mayoría de los métodos anteriores se centran solo en detener la oxidación de GSH, ya sea acidificando la muestra o bloqueando el grupo $-SH$ de GSH con un reactivo apropiado por ejemplo utilizando 2-vinilpiridina o ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB). Los grupos $-SH$ reaccionan con estos compuestos quedando así bloqueados y formando un compuesto colorimétrico capaz de cuantificarse por espectrofotometría, determinando el glutatión oxidado (GSSG). Las muestras que no hayan sido tratadas con 2-vinilpiridina o DTNB determinarían la concentración total de GSH. La concentración de GSH libre en la muestra se puede calcular a partir de la diferencia entre el GSH total determinado y el GSH generado a partir del glutatión oxidado en las muestras tratadas (Cisneros R. 2011).

Pero es necesario tener en cuenta todos los factores mencionados anteriormente para determinar con precisión la concentración *in vivo* de GSH y GSSG en plasma y obtener así una metodología adecuada y reproducible.

Cromatografía HPCL

La HPLC es uno de los tantos métodos de cromatografía para la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla. En este método participan las fases móviles, estacionaria y la muestra de interés. La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla. Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes (Suarez O. 2018).

Actualmente, los métodos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son los más utilizados para la determinación de GSH y GSSG en muestras biológicas.

Los sistemas de detección utilizados luego de la separación por HPLC incluyen detección por absorbancia UV, detección por fluorescencia, detección electroquímica (Denzoin L. 2013). Lo que se busca es evitar la oxidación artificial y degradación del GSH durante el manejo y preparación de la muestra; para esto se utilizan tubos estabilizadores con anticoagulante de citrato ácido para obtener un pH final de 5.3 estabilizando el GSH durante su extracción, posteriormente se utiliza un inhibidor de glutamil transpeptidasa (GG) como borato de serina (Amrit K. 2006), para finalmente colocarlo en un buffer con agentes bloqueadores de grupos tiólicos (N-etilmaleimida (NEM) o butionin sulfoximina (BSO)) y metales pesados (Cd^{2+} y As^{5+}) (Denzoin L. 2013).

5. Las nuevas tecnologías en el análisis de glutatión

Existen numerosos métodos para la detección de GSH; sin embargo, la mayoría de ellos sufren de las dificultades de preparación de la muestra, la necesidad de derivatización, o falta de sensibilidad suficiente, lo que limita su utilidad. Hoy en día se utilizan novedosas técnicas electroquímicas para la determinación de GSH buscando aminorar las interferencias e inconvenientes que se presentan (Raouf J. 2009).

La electroquímica es la parte de la química que se enfoca en el uso de las reacciones químicas para producir electricidad y el uso de la electricidad para producir cambios químicos. Es decir, estudia la conversión entre la energía eléctrica y la energía química. Los procesos electroquímicos son reacciones redox, en las cuales, la energía liberada por una reacción espontánea se convierte en electricidad o viceversa: la energía eléctrica se aprovecha para provocar una reacción química no espontánea (Irene V. 2007).

Los métodos electroanalíticos tienen ventajas de simplicidad, bajo costo y alta sensibilidad por esto la medición electroquímica directa de GSH en muestras no tratadas es un camino más atractivo, así como optimizable mediante el uso de sensores y biosensores, que ha dirigido la investigación hacia la implementación de métodos analíticos que sean compatibles con cada necesidad que se presente (Harfield J. 2012). La electroquímica es considerada una técnica científica y tecnológica, derivada de la fisicoquímica, esta técnica permite el estudio de reacciones en un material conductor, como por ejemplo un metal y un electrolito. Las técnicas electroquímicas específicamente se enfocan en las reacciones de óxido-reducción, permitiendo la transferencia de electrones entre sustancias, la solución de la muestra y otras características que intervienen (Gonzalez G. 2018).

Una de las aplicaciones más importantes de la electroquímica está relacionada con el análisis químico, donde se hace uso de sensores electroquímicos cuya respuesta analítica se basa en la medición de diferencias de potencial (potenciométricos), del flujo de corriente eléctrica (amperométricos), u otras magnitudes relacionadas (Saavedra O. 2018). Dependiendo con el tipo de perturbación (amperométrica o potenciométrica) que se imponga, las reacciones al electrodo, la cantidad de analito y la forma en que acontece dicha transformación será el tipo de respuesta que se manifestará y de ella dependerá el tipo de información que se obtendrá. Si se impone una diferencia de potencial se obtendrá una corriente de electrólisis; en cambio, si se impone una corriente constante la respuesta se manifestará por medio de un cambio de potencial en la interfase conductor–disolución. Las técnicas electroquímicas pueden dividirse de acuerdo en la manera en que realizan mediciones y la perturbación del sistema **Figura 3** (Reyes B. 2011).

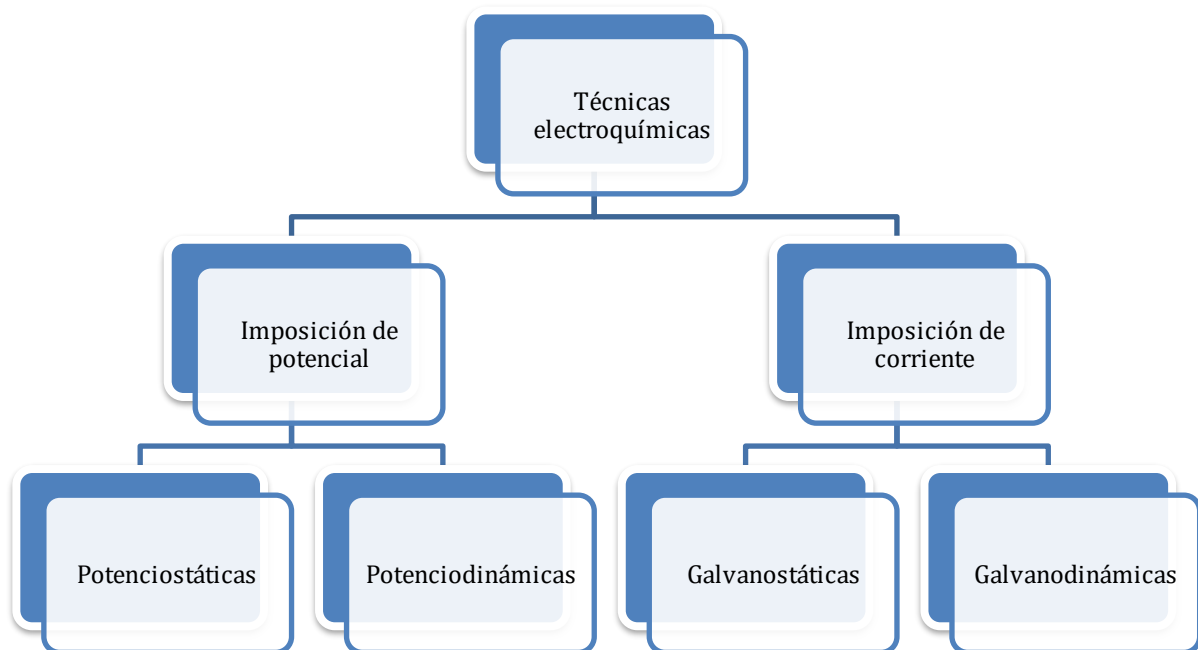


Figura 3 Clasificación de técnicas electroquímicas.

Fuente: Reyes B., García M. (2011).

Galvanoplastia.

Es una técnica electroquímica de gran interés en el tratamiento de metales, permitiendo recubrir, proteger o decorar diferentes materiales; el proceso se basa en la descarga de un ion metálico, presente en una disolución e incorporar al electrodo en forma de átomo metálico; ya sea un metal con otro metal, un no metal o con un metal. El recubrimiento electrolítico de un material se da por introducción en un baño compuesto por un electrolito, al cual se le aplica corriente permitiendo cubrir y secar el material.

Potenciometría.

Es una de las técnicas de la electroquímica que hoy en día son utilizadas para la determinación de principios activos de medicamentos. Los métodos generalmente utilizados son los de voltametría de barrido lineal. La voltametría comprende varias técnicas analíticas y químicas, que se encargan de medir la corriente que circula dentro de una celda electroquímica al existir un potencial que varía en el tiempo (señal de excitación) bajo parámetros que favorecen la polarización de los electrodos (de trabajo). El equipo a utilizar es un potenciostato y una celda electroquímica en donde la disolución de la muestra a analizar (analito) y tres electrodos (trabajo, referencia y contraelectrodo) interactúan para generar una intensidad de corriente (González G. 2018).

Técnicas potenciométricas.

Voltamperometría cíclica Figura 4.

Se aplica sobre el sistema una variación lineal del potencial, a partir de un potencial inicial (E_1). $E = E_1 + vt$

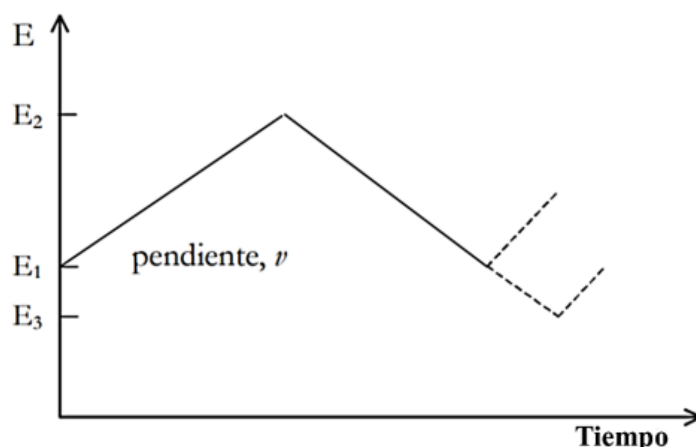


Figura 4. Perfil de potencial en función del tiempo para voltamperometría cíclica.

Se muestra la forma que puede variarse el potencial aplicado al electrodo de trabajo (ET), en función del tiempo. El potencial se varía linealmente con el tiempo (a una dada velocidad de barrido) desde un valor E_1 a un valor E_2 , luego se puede regresar al mismo valor inicial E_1 u otro valor E_3 .

Fuente: Saavedra O., Albert U. (2018).

La voltamperometría cíclica (CV) suele utilizarse como técnica previa de estudios electroquímicos, ya que puede dar una primera información acerca del proceso de ET (electrodo de trabajo) con el electrolito, ya que dependiendo de la forma de la curva voltamperométrica se podrá conocer por ejemplo la reversibilidad redox.

Cronoamperometría Figura 5.

Es una técnica en la cual el potencial del electrodo de trabajo se cambia instantáneamente y se mide la corriente en función del tiempo.

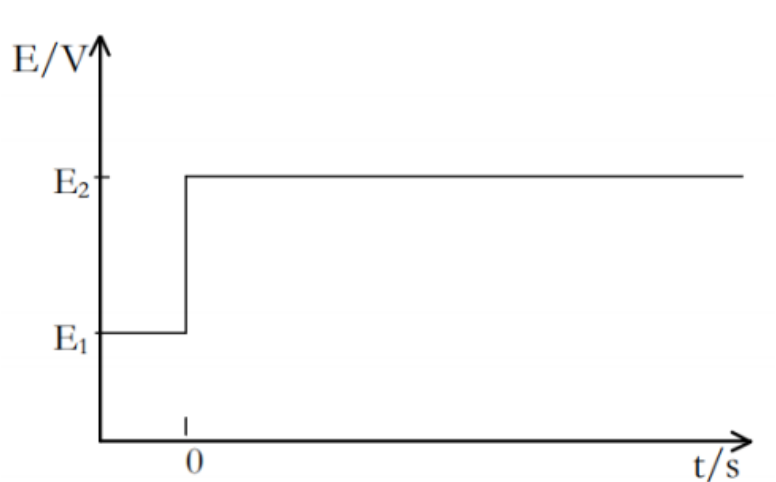


Figura 5. Potencial en función del tiempo para un experimento de cronoamperometría. Se muestra esquemáticamente la perturbación de potencial aplicada al electrodo de trabajo en función del tiempo.

Fuente: Saavedra O., Albert U. (2018).

Voltamperometría diferencial de pulso **Figura6.**

El barrido de potencial no se realiza de forma lineal como se ha descrito para la voltamperometría cíclica, sino que se aplica un perfil caracterizado por pulsos de potencial de baja amplitud.

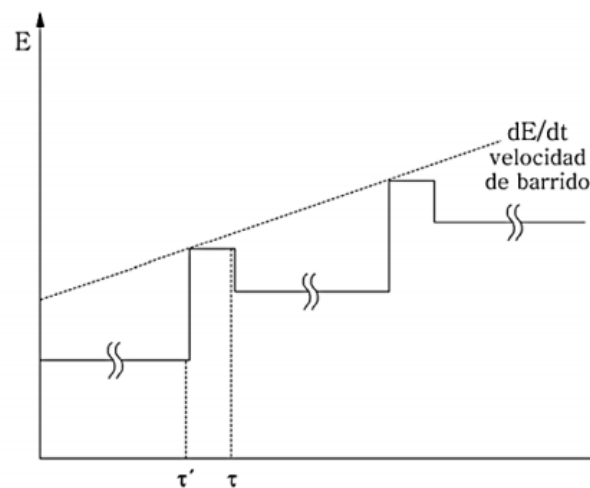


Figura 6. Potencial aplicado en el tiempo para la técnica de voltamperometría diferencial de pulso. Se toman dos medidas de corriente por cada pulso de potencial aplicado. Uno a tiempo τ' , inmediatamente antes del pulso, y el segundo a tiempo τ , justo antes de la finalización del pulso.

Fuente: Saavedra O., Albert U. (2018).

Celdas electroquímicas.

Una celda electroquímica es el conjunto de electrodos (dos o tres) y una solución electrolítica. Un electrodo es un conductor eléctrico y la carga es transportada a través del material de los electrodos mediante el movimiento de electrones (Saavedra O. 2018).

Cada uno de los electrodos del sistema, requiere presentar ciertas características básicas:

- Electrodo de trabajo (ET): Sirve para la caracterización de las reacciones electroquímicas de interés. Sobre este electrodo se realiza la imposición de potencial o corriente. Suelen ser de Pt, Au, Pd, u otro material inerte (carbón), o también materiales semiconductores, como los minerales.
- Electrodo auxiliar (EA): Sirve para cerrar el circuito eléctrico de la celda. Sobre este electrodo acontece el proceso electroquímico contrario al que pasa sobre el ET. Los ET comúnmente empleados son el denominado de calomel, Hg/Hg₂Cl₂/KCl, de manera abreviada, SCEsat, y el de plata/cloruro de plata, Ag/AgCl/KCl, de manera abreviada, Ag/AgCl_{sat}.
- Electrodo de referencia (ER): El potencial del electrodo de referencia es fijo, por lo que cualquier cambio en la celda es atribuible al electrodo de trabajo. De esta manera, decimos que observamos o controlamos el potencial del electrodo de trabajo con respecto a la referencia. Suele ser un metal inerte (típicamente de Pt, acero inoxidable, grafito u otros) (Reyes B. 2011). Además, este electrodo sirve para fijar la variación de los parámetros que se utilizan para caracterizar las reacciones electroquímicas como producto de la medición del potencial que se genera en el electrodo de trabajo. En consecuencia, su composición debe ser constante y conocida.

Sensores electroquímicos.

De manera general se podría definir a un sensor químico como cualquier dispositivo miniaturizado que fuera capaz de responder de manera inequívoca a un analito concreto en el seno de una muestra compleja. Consta esencialmente de dos partes: el elemento de reconocimiento que interactúa con el analito y concede selectividad al sensor y el transductor que permite convertir esa interacción en una señal analítica

Figura 7 (García G. 2010).

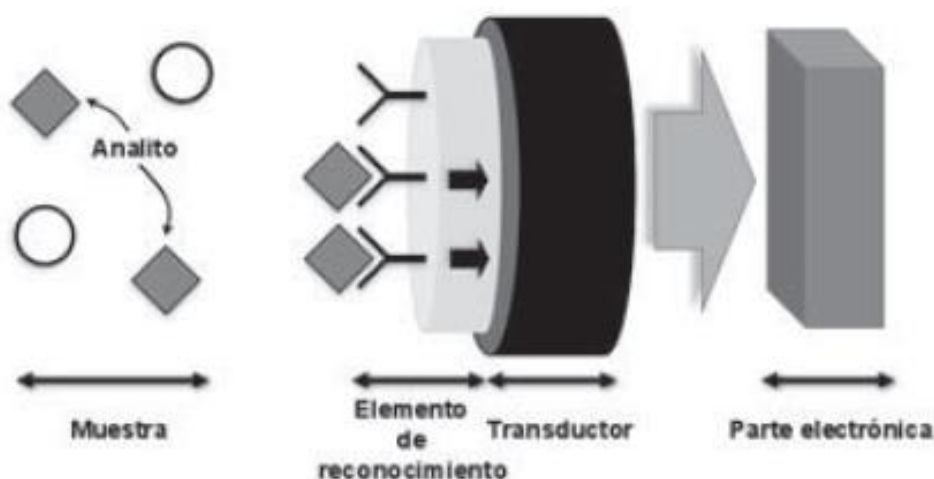


Figura 7. Esquema de un biosensor.

Fuente: (García G. 2010).

Existen dos clases de sensores, clasificados según el tipo de información que sean capaces de transformar:

- Físicos: Dispositivos que detectan cambios en parámetros físicos (temperatura, presión, flujo de masa, etc.)
- Químicos: Detectan cambios de pH, concentración, composición, etc (Cano L. 2008).

Biosensores.

En el caso de los sensores químicos cuando la reacción química involucra un proceso o una especie de origen biológico, en estos casos los dispositivos son llamados biosensores. La IUPAC define un biosensor como un dispositivo capaz de proporcionar una información analítica específica cuantitativa o semicuantitativa, utilizando un receptor o elemento de reconocimiento biológico que está en contacto directo con el elemento transductor. Los biosensores pueden diferenciarse en función de los elementos biológicos de reconocimiento utilizados. Éstos pueden ser: anticuerpos, células, enzimas, microorganismos, etc. Asimismo, pueden tener varios sistemas enzimáticos acoplados que sirven para la amplificación de la señal (Saavedra O. 2018).

Otra forma de clasificación de los sensores se puede realizar atendiendo a diferentes criterios, como son el tipo de receptor utilizado, la metodología empleada para inmovilizar este receptor o el tipo de transductor utilizado **Tabla 1**, siendo ésta la más aceptada.

Tabla 1. Clasificación de sensores químicos y biosensores según el tipo de transductor.

Tipos de transductores	Descripción
Ópticos	Transforman los cambios producidos en una señal óptica por la interacción de un analito con el receptor
Electroquímicos	La señal transformada es debida a una interacción electroquímica entre el analito y el electrodo.
Piezoeléctricos	Dispositivos que transforman un cambio de masa que se da sobre el electrodo modificado con materiales con propiedades piezoelectrónicas.
Térmicos	Dispositivos capaces de medir el cambio de calor sobre la superficie del electrodo.

La naturaleza de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito constituye el factor determinante para la selección del sistema de transducción, sin el cual no es posible obtener, amplificar, registrar, sistematizar, almacenar e interpretar las señales producto de la interacción entre estos (Jiménez C. 2009).

Transductores ópticos.

Entre estos se destacan los sensores de fibra óptica, caracterizados por tener inmovilizado en sus extremos el elemento de reconocimiento y el elemento de detección, así mismo la presencia de marcadores que permitan detectar cambios entre el analito y el elemento de reconocimiento y difundirlos a través de la fibra. Al igual que los transductores de fibra óptica, los de onda evanescente-EW requieren marcaje y se fundamentan en la reflexión interna total de fluorescencia por la absorción y emisión de fotones. La concentración del analito de interés se relaciona con los cambios en las características de luz propagada a través de la guía de ondas (Jiménez C. 2009).

Transductores piezoeléctricos.

Conocidos también con el nombre de sistemas de transducción másicos, gravimétricos o acústicos, constituyen un material piezoeléctrico (cristales), caracterizado por entrar en resonancia ante la exposición a un campo electromagnético y soportar el elemento de reconocimiento (proteínas). Su funcionamiento se rige por la detección de cambios másicos del complejo antígeno-anticuerpo, con frecuencias de oscilación de tipo: paquete de onda acústica-BAW, en los cuales la resonancia cubre toda la masa del cristal y de onda acústica de superficie-SAW, donde la resonancia solo ocupa la superficie del cristal (Jiménez C. 2009).

Transductores termométricos.

De gran robustez en reacciones enzimáticas y proceso exotérmicos, en las cuales la transferencia de calor se puede relacionar con la concentración del analito de interés (Jiménez C. 2009).

Transductores electroquímicos.

Caracterizados por su capacidad de convertir la señal obtenida en una señal eléctrica, son utilizados en sistemas de reconocimiento biocatalíticos. Los biosensores más comúnmente utilizados son los de tipo impedimétrico, conductimétrico, potenciométrico y amperométrico. Entre las aplicaciones más recientes se destacan la utilización de los biosensores amperométricos para el monitoreo de la fermentación maloláctica, determinante de las características de acidez en vinos y monitoreo de concentraciones de glucosa y etanol en procesos de fermentación; monitoreo mediante biosensores impedimétricos de concentraciones de α -solanina y α -chaconina, presentes en papa y tomate; detección de carbofuran y carbaril en aguas utilizando biosensores conductimétricos y biosensores potenciométricos para la determinación de butirilcolinesterasa, como sensor para glicósidos, organofosforados, carbamatos y metales pesados en papa (Jiménez C. 2009).

Electrodos

Un electrodo puede definirse como un material que consta de al menos una fase conductora en conjunción con, al menos, una fase aislante, siendo el caso más usual

un material que contiene una fase conductora y una fase aislante. Los electrodos se pueden clasificar según el modo en el que el conductor y el aislante están distribuidos dentro del material. La superficie del electrodo en contacto con la disolución consiste en regiones de conductoras separadas por regiones de aislante. La primera clasificación está basada en si la disposición del conductor y del aislante está altamente ordenada (array) o es aleatorio (conjunto) (Cano L. 2008).

Los electrodos de array **Figura 8** pueden clasificarse, dependiendo de si el conductor está confinado en la superficie de un aislador (o de un aislante en la superficie de un conductor), o el conductor ordenado penetra en el seno del material. Estos arrays tienen geometrías bien definidas, pero, sin embargo, sus superficies a menudo no son planas y pueden ser también bastantes delicadas de pulir, requiriéndose otra forma de regeneración superficial (Cano L. 2008).

Los electrodos de conjunto **Figura 8**, se clasifican dependiendo de la distribución del conductor a través de la matriz del electrodo. Cuando los materiales en los que las partículas de conductor están distribuidas aleatoriamente por todo el aislante cubriendo totalmente se denominan electrodos de conjunto dispersos. En cambio, los electrodos de conjunto consolidados están formados de tal manera que el conductor se extiende a través del electrodo de modo reticulado, aleatorio, con regiones de aislante puro y de conductor puro que no están entremezcladas (Cano L. 2008).

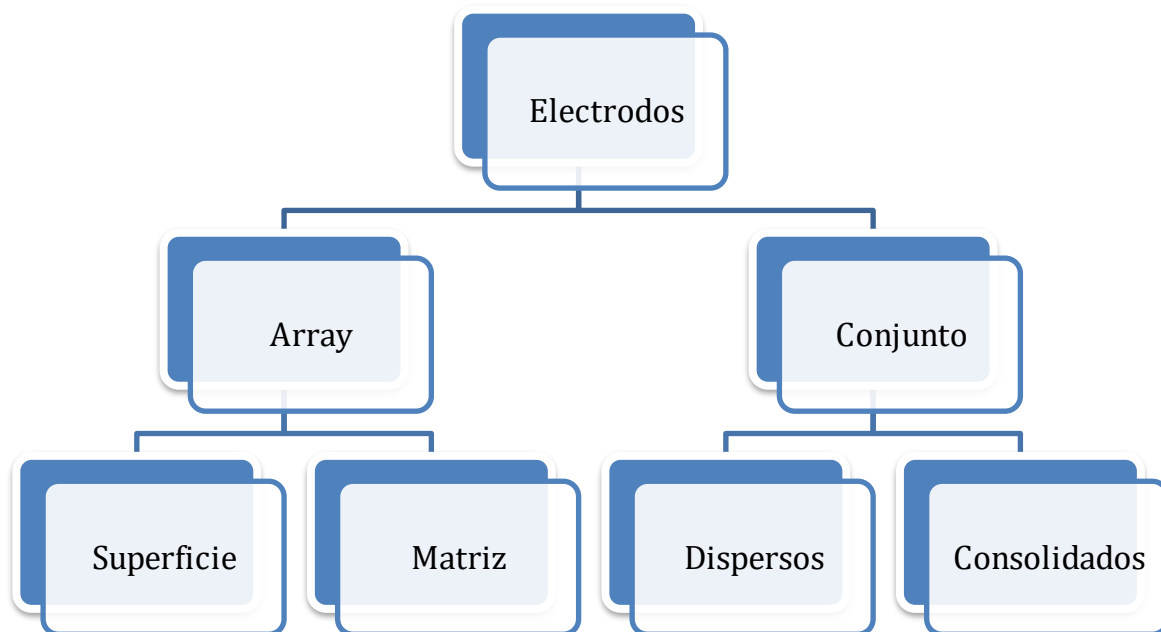


Figura 8. Clasificación de los electrodos por su composición.
Fuente: Cano L. (2008).

En estos últimos 30 años, los biosensores electroquímicos han cobrado gran importancia. Esto ha sido debido a la aplicación de tecnologías de miniaturización en la fabricación de electrodos, lo que facilita la producción en masa de biosensores, reduciendo así los costes en su fabricación, y asegurando una gran reproducibilidad. De esta manera, es posible la integración en un área pequeña de los dos o tres electrodos requeridos habitualmente para la realización de medidas voltamperométricas. Otra de las ventajas que presenta es el mínimo consumo de reactivos. Disponer de un área de trabajo mucho menor requiere menos cantidad de material biológico en la fabricación, a la vez que permite trabajar con volúmenes de muestra más pequeños. Lo que permite realizar análisis rápidos y hacer un seguimiento de los productos incluso en continuo (“on-line”) e in situ (Cano L. 2008).

Electrodos utilizados en la determinación de Glutación.

El GSH puede reaccionar con electrodos comunes desnudos como el carbono, platino, oro y plata, pero es un proceso lento que requiere un alto sobrepotencial, a excepción del electrodo de mercurio. El mercurio, obviamente, no es ideal para su uso como sensor debido a su toxicidad. Los electrodos con metales nobles hacen que la detección de GSH sea insatisfactorio por su gran adherencia a estos, lo que resulta en un bloqueo grave y ensuciamiento de estos electrodos. Otro de los obstáculos a resolver para que este método sea viable; en particular, es la compleja composición de la mayoría de los fluidos fisiológicos que presenta problemas importantes en términos de ensuciamiento de los electrodos (Harfield J. 2012).

Electrodos desnudos

Los electrodos de carbón han sido de gran interés en distintas aplicaciones electroquímicas ya que presentan distintas formas alótropas, las cuales proporcionan diferentes propiedades que lo hacen un material electródico único (Armendáris V. 2012).

Las superficies de los materiales de carbón son reactivas debido a la presencia de valencias disponibles, las cuales son propensas a quimiadsorber una gran cantidad de moléculas, particularmente, aquellas que contienen oxígeno. Se conocen diversos métodos para producir óxidos superficiales en el carbón. Estos compuestos carbono-oxígeno se forman en los carbonos por oxidación en fase gaseosa empleando diversos agentes oxidantes (O_2 , N_2O , CO_2 , H_2O) y por oxidación química en disolución ($Kmno_4$, HNO_3 , $KClO_3$, H_2SO_4). Después de la oxidación, las superficies adquieren propiedades hidrofílicas, mejorando la afinidad con disolventes polares (como el agua) y aumentando la reactividad de la superficie. Asimismo, estos grupos funcionales pueden funcionar como sitios de anclaje para la inmovilización de partículas metálicas o moléculas más grandes (Armendáris V. 2012).

Existen tres tipos de óxidos superficiales (ácidos, básicos y neutros). Los ácidos se forman cuando el carbón se trata con oxígeno a temperaturas cercanas a su punto de ignición o mediante la reacción con una disolución oxidante a temperatura ambiente. Los óxidos superficiales básicos se forman cuando la superficie con todos los compuestos superficiales se calienta al vacío en una atmósfera inerte, para después ponerse en contacto con oxígeno sólo después de haberse enfriado a bajas temperaturas. Los neutros son formados por la adsorción irreversible de oxígeno en valencias insaturadas de carbono (Armendáris V. 2012).

La principal limitación de la utilización de electrodos simples para la detección de GSH es su limitada selectividad. Ya que el GSH se encuentra en baja concentración en presencia de una amplia gama de sustancias que pueden interferir en los resultados del análisis. Los electrodos de carbono modificados con nanopartículas de oro, mejoran la sensibilidad de detección y reduce los límites de detección de sustancias orgánicas (Perevezentseva D. 2015). Típicamente un electrodo de este tipo para la detección de GSH, se prepara a partir de los siguientes pasos 1) Para la limpieza de un electrodo de carbono se debe realizar mecánicamente con un papel filtro denso, seguido de una limpieza electroquímica. 2) Para la preparación de nanopartículas de oro por reducción química de HauCl_4 con NaBH_4 y citrato de sodio (Perevezentseva D. 2012). 3) La modificación de la superficie del electrodo se realiza al colocar lo en una celda electroquímica con 10 ml de solución de HCl 0.1 M y una adición de 0.1 ml de solución de oro preparado. Las nanopartículas de oro se deben depositar electroquímicamente sobre la superficie de electrodo al potencial de acumulación $E_{\text{acc}} = -1.0 \text{ V}$ durante el tiempo de acumulación $t = 30 - 300 \text{ s}$. 4) Finalmente, el electrodo se debe enjuagar y colocar en electrolito de soporte NaOH 0.1 M para la determinación voltamperometría de GSH.

Se puede observar la comparación **Figura 9** entre un electrodo simple y electrodos modificados buscando mejorar su sensibilidad para la detección de GSH a bajas concentraciones ($1.3 \times 10^{-12} \text{ M}$) donde el electrodo de carbono (GE) no muestra señal (**Curva 1, Figura 9**), el GE modificado con nanopartículas de oro (AuNP-GE) muestra olas a -0.2 V y 0.15 V (**Curva 2, Figura 9**) y un pico catódico inverso en el electrodo GE modificado con oro (Au-GE) (**Curva 3, Figura 9**) (Perevezentseva D. 2015).

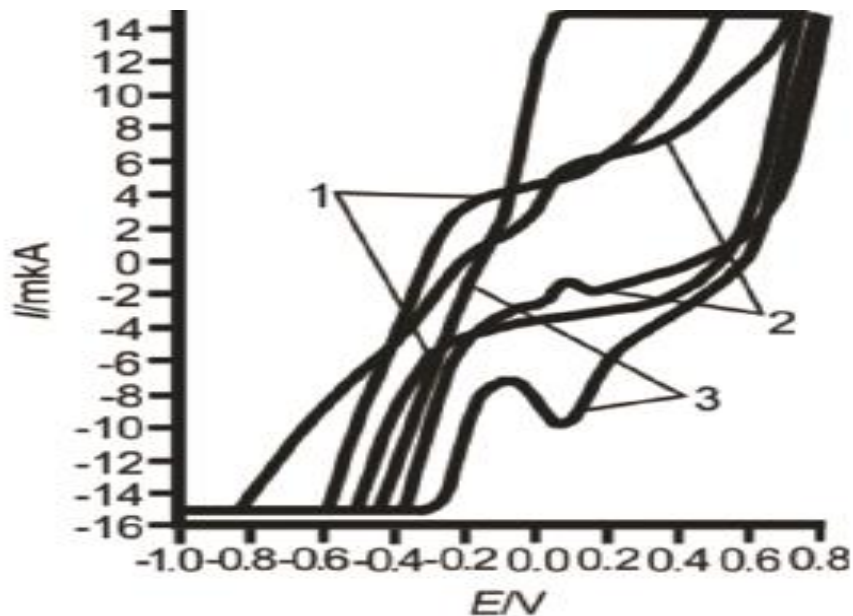
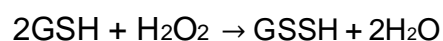


Figura 9. Comparación de voltamogramas cíclicos GSH en: Electrodo de carbono (GE) desnudo (1), GE modificado con nanopartículas de oro (AuNP-GE) (2) y GE modificado con oro (Au-GE) (3). Fuente: (Perevezentseva D. 2015).

Electrodos con enzimas

Al día de hoy la Inmovilización de enzimas sobre sensores para el análisis de GSH, se realiza a través de una gran variedad de estrategias basadas esencialmente en las interacciones de afinidad entre biomoléculas. Estas estrategias de inmovilización conllevan en muchos casos la fusión o modificación de proteínas con biomoléculas o dominios específicos de unión mediante ingeniería genética. Estas estrategias destacan esencialmente por la orientación del bioelemento de reconocimiento, que implica habitualmente la obtención de mayor sensibilidad y menor consumo de reactivos, además del empleo de protocolos de modificación más sencillos y rápidos, los cuales se deben realizar correctamente para evitar la desnaturalización de las enzimas y al ser altamente específicos solo pueden cumplir una función (Rodríguez J. 2020).

Un electrodo enzimático consiste en una capa de enzima inmovilizada vecina a la superficie de un electrodo, que puede ser una monocapa o multicapa (Battaglini F. 1991). Uno de los Métodos enzimáticos más utilizados para la detección de GSH esta basados en GPx inmovilizando sobre la superficie de un electrodo, la enzima cataliza la oxidación de GSH a la forma de disulfuro (GSSG) en presencia de hidroperóxidos (H_2O_2 o ROOH) como se muestra en la siguiente reacción (Ülkü A. 2015).



Para la fabricación de un electrodo enzimático se puede usar como base un electrodo de pasta de carbón vitreo (GCPE) ya que tienen una alta reactividad química, una amplia ventana potencial con baja corriente de fondo, son económicos y fáciles de preparar, modificar y renovar (Ülkü A. 2015). Estos electrodos se han mejorado con la inclusión de nonomateriales como las nanopartículas de platino (Pt-NP), para la

preparación de electrodos se debe depositar electrolíticamente PtNP en la superficie del GCPE desnudo mediante un proceso de voltámetro cíclica, donde se aplican entre -0.70 V y $+0.80$ V a 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ durante 50 ciclos utilizando una solución 0.1 M KCl que contiene 1 mM H_2PtCl_6 . El perfil voltamperométrico a partir de la modificación del electrodo se presenta en la **Figura 10**.

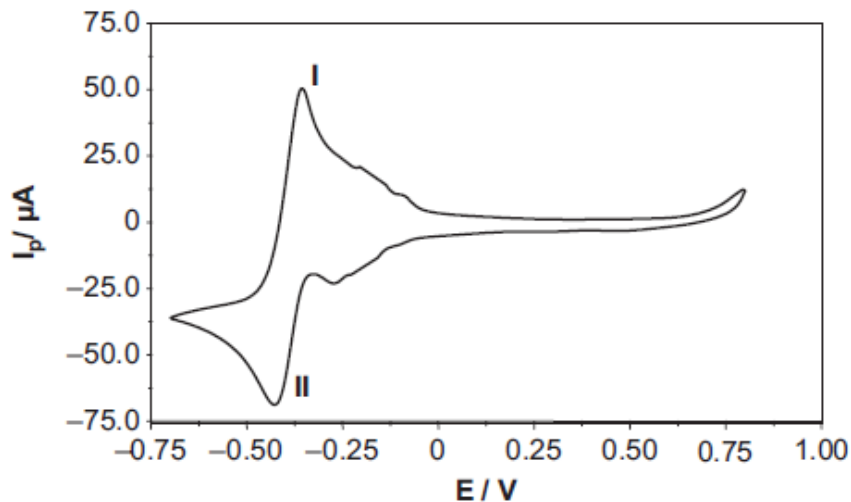


Figura 10. Voltamograma cíclico obtenido en la deposición de Pt-NP después de 50 ciclos. Se muestran sus dos estados redox a -0.356 V y -0.424 V correspondientes a $\text{PtCl}_6^{2-} / \text{PtCl}_4^{2-}$ (I) y $\text{PtCl}_4^{2-} / \text{Pt}^0$ (II), respectivamente. Fuente: (Ülkü A. 2015).

Los autores reportan que, para la inmovilización de GPx se debe diluir 0.2 mg de GPx en 1 ml de solución de fosfato (PBS) (pH 7.0), luego se mezclan 5 U de GPx y gelatina (3 mg) a 38° C en tapón de fosfato de potasio (pH 7.0 , 50 μL). Se deben esparcir 50 ml de la solución de inmovilización sobre la superficie de GCPE modificado con Pt-NP y se deja secar a 4° C durante 1 hora. Finalmente se sumerge en glutaraldehído al 2.5% en tapón de fosfato (50 mM, pH 7.0) durante 5 min **Figura 11** (Ülkü A. 2015). Los resultados obtenidos mostraron que el biosensor es sensible, reproducible, estable y robusto, fue probado en plasma con buena selectividad ya que fue probado con ácido ascórbico y cisteína como interferentes, mientras que el recobro fue al rededor del 100% , por lo que puede ser usado para la detección de muestras reales.

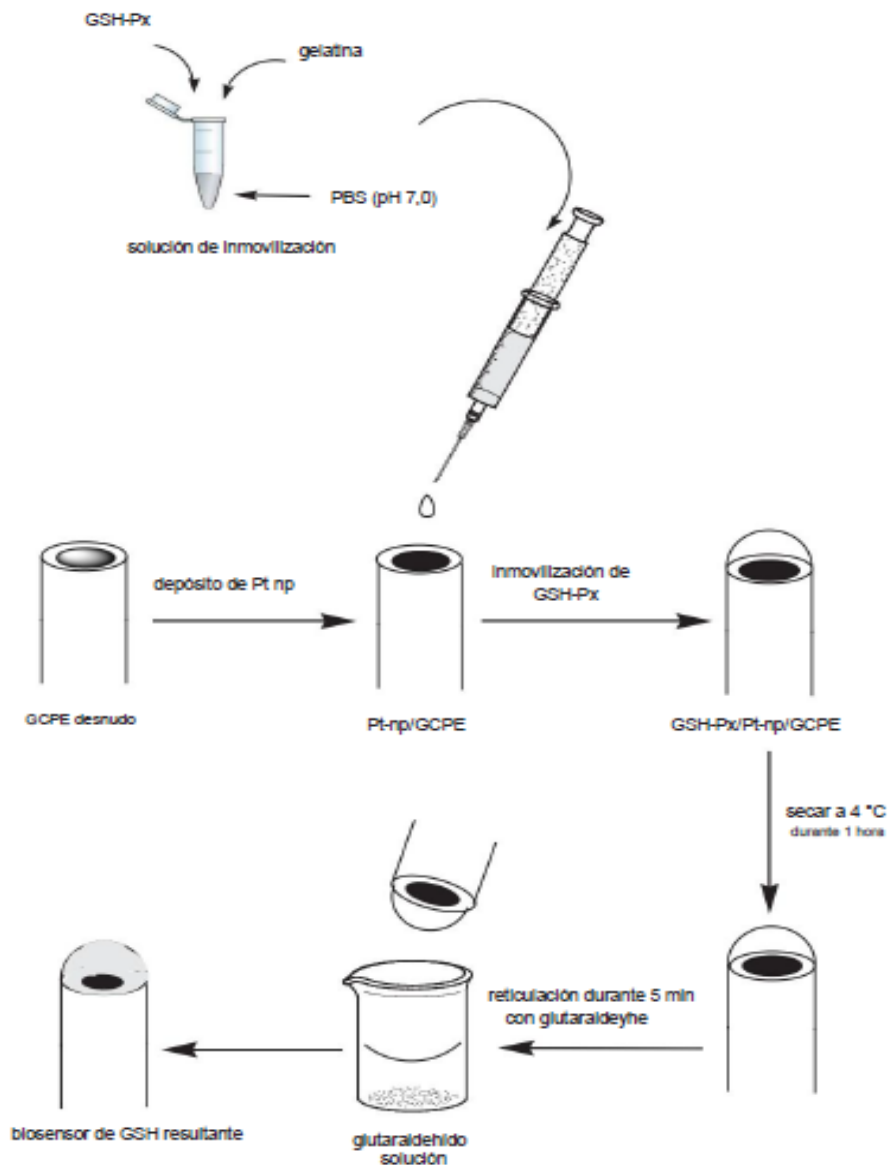


Figura 11. Representación de la fabricación de un electrodo enzimático. Fuente: (Ülkü A. 2015).

Electrodos con oligonucleótidos

Uno de los métodos más utilizados para la obtención de electrodos con ADN es la inmovilización por absorción, donde la molécula de ADN o de oligonucleótido se une irreversiblemente debido a interacciones entre la superficie transductora y el esqueleto de fosfato del ADN (Osorio P. 2008).

Los electrodos más utilizados para ser modificados son los de carbono vitreo, pasta de carbono y aquellos con nanomateriales, entre estos últimos las nanopartículas de cobre con plantilla de ADN (CuNP) han generado mayor interés, en virtud de su procedimiento de síntesis simple, excelente biocompatibilidad y fácil incorporación con reconocimiento molecular basado en ADN.

Las plantillas de ADN se inmovilizan en un electrodo de oro a través de la interacción del oro y azufre. Para su uso, el electrodo de oro del sustrato se debe limpiar con una

solución de piraña recién preparada durante 5 minutos para luego ser pulido con una microtela con suspensión de alúmina. Después de esto, el electrodo se debe limpiar electroquímicamente en 0.5 M H_2SO_4 con escaneos sucesivos de voltamperometría cíclica (CV) de 0 a 1,6 V durante 30 ciclos, seguido de levantamiento con agua bidestilada. posteriormente, el electrodo se debe sumergir en 200 μL de plantillas de ADN 1 M en tampón de inmovilización (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, TCEP 10 mM, NaCl 0,1 M y pH 7,4) durante 16 h. Posteriormente, el electrodo resultante se debe rellenar con MCH 1 mM durante 1 h para de esta forma obtener una monocapa de plantilla de ADN bien alineada una vez obtenida la monocapa se debe incubar con una solución que contenga ascorbato de sodio 1 mM y las concentraciones deseadas de Cu^{2+} durante 20 min para promover la formación de CuNP. Finalmente, el electrodo se debe enjuagar a fondo con tampón de lavado (Tris-HCl 20 mM, MgCl 5 mM², NaCl 0,1 M y Tween-20 al 1,0 %, pH 7,4) para eliminar el Cu^{2+} no absorbido (Wanga Z. 2017).

Para la detección de GSH con electrodos modificados con nanopartículas de cobre con plantilla de ADN está diseñado para inmovilizar en el electrodo a través de la química de oro y azufre, en tal interfaz de electrodo en ausencia de GSH permite que el Cu^{2+} sea reducido por el ascorbato de sodio en el medio, lo que da como resultado la formación de CuNP con plantilla de ADN, que presenta una respuesta notable **Figura 12**. Sin embargo, una vez que se presenta GSH en el sistema de detección, la fuerte interacción entre GSH y Cu^{2+} puede provocar la formación de GSH- Cu^{2+} -complejo. En consecuencia, la reducción de Cu^{2+} por ascorbato de sodio se inhibe, lo que finalmente conduce a una disminución significativa en la respuesta **Figura 12** (Wanga Z. 2017).

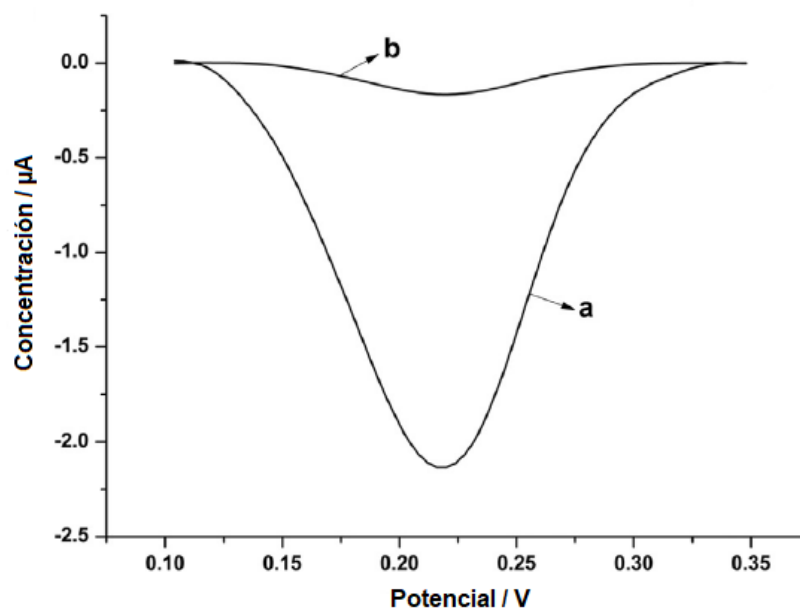


Figura 12. Respuestas del electrodo modificado con nanopartículas de Cu con plantillas de ADN para detectar GSH. (a) 0 μM de GSH. (b) 10 μM de GSH.

Fuente: (Wanga Z. 2017). Con permiso de: ScienceDirect,

Electrodos con anticuerpos

Los inmunosensores son una técnica prometedora para la detección de patógenos, ya que los anticuerpos son receptores naturales destinados a la unión de antígenos dañinos para el organismo. Por tanto, la selectividad y la eficacia de la unión son naturalmente elevadas.

Los anticuerpos naturales se pueden retener en las superficies construidas con nanopartículas de oro. La deposición de anticuerpos en la capa de oro coloidal depende de la atracción electrostática de los iones. Las nanopartículas de oro coloidal se forman en presencia de sal de citrato; por lo tanto, estas nanopartículas están rodeadas por aniones citrato que están cargados negativamente. Para una inmovilización eficaz de las moléculas de anticuerpos, es necesaria una carga positiva. Esto se puede lograr proporcionando una condición de pH adecuada (Radecka H. 2016).

Uno de los enfoques para la inmovilización de anticuerpos orientados y estables se basa en la proteína A. Esta proteína es una proteína de la pared celular que consta de una sola cadena polipeptídica producida por la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* y es extremadamente adecuado para la inmovilización directa de anticuerpos debido a su afinidad natural hacia la región Fc de la inmunoglobulina, como la IgG (Radecka H. 2016).

Su preparación consiste en sucesivas etapas de modificación de electrodos de carbono vítreo:

1. Creación de grupos COOH
2. Inmovilización covalente de proteína A
3. Recubrimiento con anticuerpo monoclonal IgG
4. Inmovilización del recombinante
5. Llenar el espacio libre

La comparación de diferentes biosensores electroquímicos y electrodos destinados a la determinación de GSH, es necesaria para desarrollar un trabajo experimental; optando por un camino que se acople mejor a las necesidades de tipo muestra, concentración, pureza, estabilidad, costo, reproductibilidad de la investigación, etc. En la **Tabla 2** se muestran algunos parámetros de diferentes biosensores destinados a la detección de GSH en diferentes tipos de muestras.

Tabla 2. comparación de biosensores electroquímicos para la detección de GSH.

Material del electrodo	Variante electroquímica del sensor	Límite de detección	Desviación estándar relativa (RSD)	Tipo de muestra	referencia
------------------------	------------------------------------	---------------------	------------------------------------	-----------------	------------

Pt-NP incorporado a GPx(inmmb)/GCP E	Electrodo enzimático / inmuno	10 μ M	2.92 %	Plasma sintético	Ülkü A. 2015
AuNP-GE	Electrodo modificado con nanopartículas	1.3 μ M	-	Solución	Perevezents eva D. 2015
Amalgama Hg/Au	Electrodo recubierto	25 μ M	2.0%	Glóbulos rojos	Antwi C. 2011
GPx(inmmb) EDAC ^a /PGE ^b	Electrodo enzimático	19 μ M	7.0%	Suero	Ülkü A. 2015
SPCE	Electrodo de grafeno	8.1 μ M	2.95%	Solución	The 4th IOP. 2018
RuHCF/rGO	Electrodo de grafeno modificado	0.66 μ M	2.2%	Saliva	Saranya S. 2019.
GR ^f -Sox/Chit ^g /SGR ^h bienzymatic	Electrodo enzimático	200 μ M	1.9%	Solución	Timur S. 2008
GO _x /BO _x	Electrodo autoalimentado	51 μ M	2.9%	Solución	Roy G. 2020
CuNPs con platillas de ADN	Electrodos con oligonucleótidos	10 μ M	2.39%	Solución	Wanga Z. 2016

^aEDAC: clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

^bPGE: electrodo de grafito pirolítico

SO_x: sulfhidrilo oxidasa

^fGR: glutatión reductasa

^gChit: quitosano

^hSGR: barras de grafito espectrografico

SPCE: electrodo de carbono serigrafado modificado con grafeno

GO_x: ánodo de glucosa oxidasa

BO_x: bilirrubina oxidasa

La nanotecnología como herramienta para incrementar la eficiencia de un biosensor.

La nanotecnología electroquímica (nTEQ) estudia fenómenos, propiedades, comportamiento, transformaciones, estructuras de la materia (diseño, caracterización, producción y aplicaciones), dispositivos y sistemas, mediante el control del tamaño y

forma, a escala nanométrica y dentro de su área de aplicación. Las propiedades de los materiales nanoestructurados están determinadas por su estructura a escala nanométrica, por lo que una de las claves para desarrollar materiales de nueva generación es la habilidad de controlar su estructura a escalas cada vez más pequeñas (Márquez P. 2015).

La nTEQ ofrece ventajas significativas en el diseño y desarrollo de materiales utilizados en biosensores electroquímicos cuando son usados para la detección de biomarcadores, diagnóstico clínico o médico, pruebas *in vivo* o *in vitro* en una amplia variedad de sensores electroquímicos para la detección directa e indirecta de iones metálicos, proteínas, ARN, ADN, a niveles de zepto-moles, y en bioensayos electroquímicos para proteínas con base en nanopartículas (Márquez P. 2015), neurociencia, diagnóstico de enfermedades, control del estado clínico de los pacientes, etc. Utilizando nanomateriales basados en metales nobles, óxidos metálicos, materiales basados en carbón, polímeros y biomateriales (García M. 2018).

1. Nanotubos de carbono – enzima

Entre los múltiples tipos de biosensores, los electroquímicos representan una de las alternativas más populares debido a su bajo costo, la capacidad de miniaturizarlos, la portabilidad y su tiempo de respuesta prácticamente instantáneo. Por otro lado, los biosensores acoplados a otras moléculas (enzimas, anticuerpos, oligonucleótidos) si bien son más recientes y menos desarrollados que los electroquímicos, presentan la gran ventaja de ser extremadamente sensibles a eventos de reconocimiento específico ligando-biomolécula y que la detección es directa y en tiempo real. En este sentido, la utilización de nanomateriales de carbono en el desarrollo de sistemas electroquímicos de detección es una de sus principales aplicaciones debido a la mejora en el rendimiento analítico que les imparten (Nicolas P. 2016).

A pesar de que el costo y complejidad de las síntesis de algunos nanomateriales de carbono suele ser similar al de otras nanoestructuras (nanopartículas metálicas o quantum dots), el hecho que deriven de uno de los elementos de mayor abundancia en la corteza terrestre hace que su fuente sea casi ilimitada, algunas de sus ventajas son:

- Disminución de los sobrepotenciales de oxidación y reducción de un gran número de compuestos de interés analítico.
- Aumento del área expuesta del transductor electroquímico.
- Mejora en la transferencia de carga entre el transductor y el analito.
- Biocompatibilidad y alta capacidad de inmovilización de biomoléculas.
- Facilidad de ser funcionalizados y derivatizados mediante metodologías covalentes y no covalentes.
- Elevada capacidad de adsorción de diversos tipos de moléculas.

El autoensamblado capa por capa LBL (layer-by-layer) es una metodología simple, eficiente, reproducible, robusta y extremadamente versátil para modificar superficies y fabricar electrodos multicapa compuestos de polímeros altamente ordenadas, mediante la cual se puede lograr un control estricto del espesor de las películas, la composición y la morfología. La forma más común de ensamblar capa por capa es mediante interacciones electrostáticas atractivas entre polielectrolitos de carga opuesta. De esta manera, la película crece como consecuencia de la inmersión sucesiva de un sustrato sólido en soluciones del polication o polianión. La fuerza impulsora del crecimiento de la multiestructura sobre la superficie del sustrato está dada por la atracción electrostática entre el polielectrolito inmovilizado y el de la solución de la etapa siguiente. Para cada capa, el proceso de adsorción finaliza cuando las cargas de la superficie son sobrecompensadas por las cargas de la capa del polielectrolito subsiguiente (Nicolas P. 2016).

Las estrategias de inmovilización de enzimas sobre sustratos sólidos (nanotubos de carbono) es uno de los factores cruciales debido a las interacciones de las mismas con el soporte, la inmovilización altera el microentorno de la enzima pudiendo provocar cambios en la actividad, selectividad y reactividad. La incorporación enzimas, y nanotubos de carbono (CNT) en estructuras autoorganizadas representa una interesante alternativa debido a la facilidad del proceso de ensamblado y a su versatilidad. El uso de CNT para construir arquitecturas supramoleculares por autoensamblado se basa en dos estrategias distintas: servir de plataforma para autoensamblar posteriormente la enzima con la ayuda de otro polielectrolito; o ser parte activa de la arquitectura mediante la inmovilización alternada de películas del elemento de bio-reconocimiento y CNT (Nicolas P. 2016).

Los CNT sirven como plataforma para ensamblar un polielectrolito como poli(dialildimetilamonio) (PDDA) que sirve como anclaje para la enzima. Se realiza la inmersión del electrodo en el polielectrolito durante un aproximado de 5 min, para posteriormente llevarlo a inmersión en una solución que contenga la enzima. Después de cada inmersión de enjuaga el electrodo en el medio apropiado y el procedimiento anterior se repite n veces para obtener el electrodo CNT/enzima. Finalmente se realizan estudios de absorción del polielectrolito y la enzima sobre el electrodo y la caracterización de este (Nicolas P. 2016).

2. Quantum dots-inmuno

Los quanta dots (QDs) son nanopartículas cristalinas de materiales semiconductores con propiedades ópticas, químicas y electrónicas únicas, que presentan fotoluminiscencia. Están compuestos de cientos o miles de átomos de una mezcla de elementos de los grupos de la tabla periódica II – VI (CdSe, CdTe), III – V (GaN, InAs) o IV – VI (PbSe, Pbs) (Martín Y. 2016).

La construcción de electrodos se lleva a cabo garantizando que el electrodo esté

limpio, posteriormente se pone en un baño ultrasónico en una solución de acetona y alcohol isopropílico durante 30 minutos. Una vez que está limpio se procede al depósito de las tres capas de óxido de titanio (TiO_2) sobre él, para así tener el fotoelectrodo a sensibilizar (Sánchez S. 2016).

El electrodo con la tricapa de TiO_2 se puede unir al Quantum Dot mediante la técnica de adsorción iónica y capa de reacción (SILAR) se basa principalmente en la adsorción y reacción de los iones a partir de las soluciones y el crecimiento entre cada inmersión en diferentes solventes para evitar una precipitación homogénea en la solución. En el método SILAR, sólo interesa la adsorción en el sistema líquido-sólido, la misma es un proceso exotérmico, por lo que se tiene un fenómeno de superficie entre los iones y la superficie de sustrato y es posible debido a la fuerza de atracción entre los iones en la solución y la superficie del sustrato. Estas fuerzas pueden ser de cohesión, Van-der Waals o fuerza química atractiva. Los factores como la temperatura de la solución, la presión, la naturaleza del sustrato, la concentración de la solución, el área del sustrato, etc. afectan el proceso de adsorción (Sánchez S. 2016).

Los Quantum Dots se han utilizado para detectar sustancias intracelulares, siendo biosensores proteolíticos para la monitorización de liberación de fármacos, marcadores de detección, detección de reacciones inmunológicas, enzimoimmunoanálisis, etc.

Los biosensores, especialmente los biosensores Quantum dots-inmuno pueden ser diseñados de diferentes formas que pueden ofrecer ventajas y sensibilidad en la detección del sistema. Dos de los formatos utilizados es la inmovilización del anticuerpo y la inmovilización del antígeno (Martín Y. 2016).

- Anticuerpo inmovilizado.

El anticuerpo es inmovilizado en el transductor y funciona como elemento de reconocimiento del sensor (Martín Y. 2016).

- Formato A: El antígeno de la muestra compete por los sitios de unión del anticuerpo con el mismo antígeno funcionalizado con una marca de detección (ensayo competitivo). Cuanto mayor sea la concentración del antígeno en la muestra, menor cantidad de antígeno en la muestra reacciona, produciendo una respuesta menor (inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra). Utilizado para antígenos pequeños que solo poseen un sitio de unión.
- Formato B: En este formato tipo Sándwich, donde el antígeno reacciona con el anticuerpo de la fase censora y a continuación, un anticuerpo secundario marcado reacciona por otro sitio de unión del antígeno. Es un formato que mejora la selectividad ya que debe reaccionar con dos anticuerpos diferentes, pero solo es para antígenos que poseen por lo menos dos epítomos para la unión de dos anticuerpos. Un ensayo muy conocido de este tipo es el llamado enzyme linked immunosorbent

- assay (ELISA).
 - Formato C: en este formato el antígeno reacciona con el elemento de reconocimiento directamente, y esta reacción se monitoriza mediante una detección sin marca.
- Antígeno inmovilizado.
 - Formato A: El antígeno inmovilizado en la fase censora y el antígeno de la muestra compiten por sitios de unión en el anticuerpo marcado. Al haber mayor concentración de antígeno en la muestra reacciona en mayor medida con el anticuerpo marcado en disolución, y menos anticuerpo está disponible para reaccionar con la fase censora. Por esta razón la respuesta será inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra.
 - Formato B: Es un formato tipo sándwich con el fin de detectar anticuerpos. La fase censora está compuesta por el antígeno que reacciona con el anticuerpo específico de la muestra y a continuación un anticuerpo secundario marcado reacciona con ese anticuerpo para llevar a cabo la detección de la reacción inmunológica.
 - Formato C: El anticuerpo en disolución, reacciona directamente con el antígeno inmovilizado. La respuesta se obtiene sin utilizar marcador de detección (Martín Y. 2016).

3. Grafeno 2D.

El material de carbono más recientemente descubierto ha sido el grafeno 2D. El grafeno se define como una fina lámina plana de átomos de carbono con hibridación sp^2 en dos dimensiones (2D) fueron Geim y Novoselov quienes, en 2004, reportaron la preparación de grafeno mediante exfoliación mecánica del grafito, trabajo que les valió el Premio Nobel de Física en 2010 (Araque C. 2015).

La comunidad científica ha incluido el grafeno 2D dentro de los nanomateriales de carbono, en los cuales están incluidos; grafeno dopado, óxido de grafeno, grafeno, fluorografeno, grafina, grafono, grafeno poroso, y entre otros alótropos de carbono. La síntesis de grafeno y sus derivados se refiere a cualquier proceso o extracción de grafeno que pueda prepararse en diferentes formas y en diferentes sustratos en función del tamaño, forma, la pureza, eflorescencia y volumen de producción deseado (Pereyra L. 2020). El Grafeno es de interés debido a las características únicas del material, como la excelente conductividad eléctrica, su amplia superficie, dureza y una gran conductividad térmica. Además, al proceder de una sustancia natural como el grafito, tiene menor riesgo ambiental que los materiales inorgánicos (Rodríguez V. 2016).

El grafeno es el precursor de muchas otras formas de carbono, es la unidad elemental básica en 2D para construir todos los materiales grafiticos de las

demás dimensiones. Por ejemplo, si las capas de átomos de carbono las envolvemos a modo de forro de un balón, arqueadas en estructuras de cero dimensiones (0D), obtenemos fullerenos; si las enrollamos cilíndricamente en estructuras 1D, darán lugar a los nanotubos; finalmente, si superponemos más de 10 capas tridimensionalmente (3D), obtendremos el grafito (Rodríguez V. 2016).

Para la obtención de grafeno se utilizan nuevas técnicas de síntesis aplicables a gran escala. Una de ellas es la denominada “Solución de exfoliación” (Solution based exfoliation of Graphene Oxide) a partir del cual obtenemos Oxido de Grafeno (GO). En esta técnica se parte de polvos de grafito, estos son posteriormente oxidados utilizando el método de Hummer que consiste en primer lugar en oxidar este polvo con NaNO_3 y H_2SO_4 a continuación se le añade KmnO_4 y agua desionizada, y, finalmente, se agrega H_2O_2 para eliminar los residuos de KmnO_4 , de manera que obtenemos GO dispersable en agua. Una vez obtenido, se somete a un proceso mecánico (ultrasonido, sonicación) que permite la interacción de los grupos funcionales con oxígeno, obtenidos en el proceso de oxidación, con el agua. A continuación, se tiene que separar el GO obtenido de las trazas de grafito mediante un proceso de centrifugado. Este GO puede ser reducido o restaurado por procesos térmicos o químicos utilizando agentes reductores obteniendo así un compuesto conocido como “Oxido de grafeno reducido” (rGO) (Rodríguez V. 2016).

Electrodos modificados con GO:

- 1.- El GO se sónica en etanol durante 30 min. Posteriormente se debe colocar sobre la superficie del electrodo de grafito impregnado en parafina (PIG) dejando lo secar.
- 2.- El electrodo modificado con GO debe ser sometido a un potencial de -1.2 V usando cronoamperometría en condiciones de agitación en solución tampón de fosfato (pH 7), para obtener un electrodo designado como, electrodo rGO/PIG.
- 3.- Se debe usar una solución que contenga nitrato de sodio 0,5 M, ácido clorhídrico 0,05 M, ferricianuro de potasio 1 mM y cloruro de rutenio 1 mM para llevar a cabo una electrodeposición de RuHCF.
- 4.- La película debe depositarse en la superficie del electrodo rGO/PIG mediante voltamperometría cíclica estableciendo límites de potencial de - 0.5 V a 1.0 V durante 50 ciclos **Figura 13** (Saranya S. 2019).

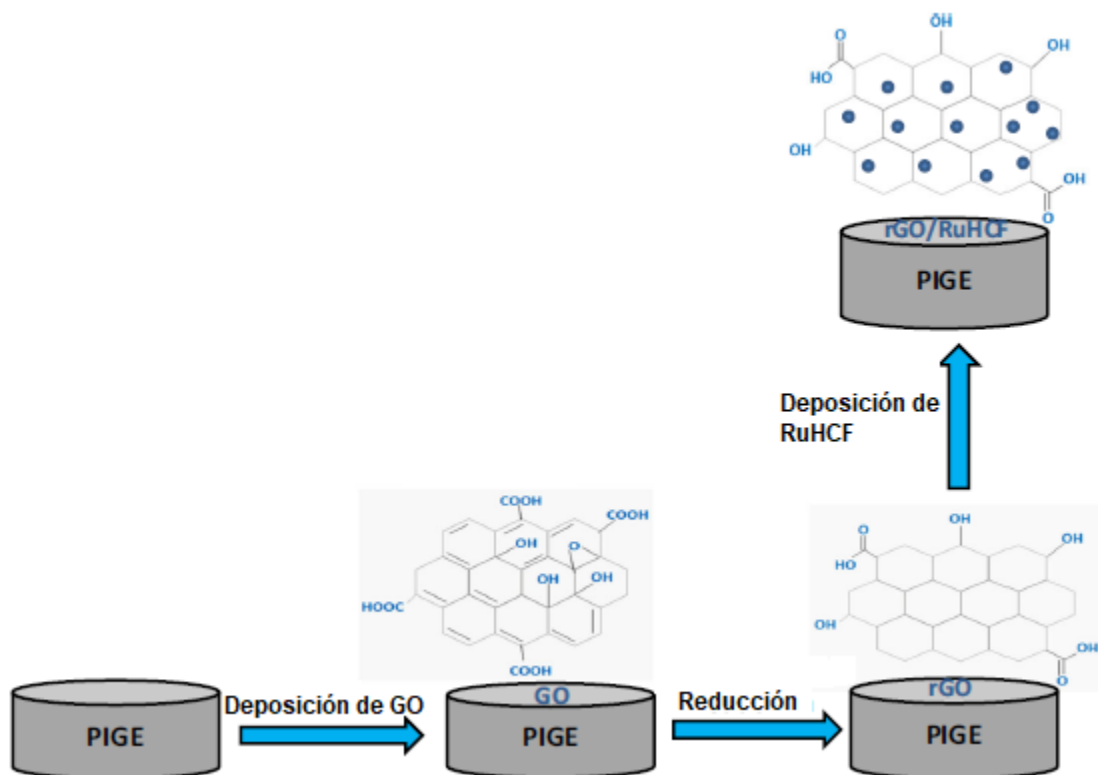


Figura 13. Fabricación de electrodos modificados con GO

Fuente: Saranya S. 2019.

La oxidación electrocatalítica de glutatión, se lleva a cabo utilizando voltamperometría de onda cuadrada, para obtener potenciales de oxidación alrededor de 0.73 V para el Glutatión utilizando electrodos RuHCF/rGO PIG **Figura 14** (Saranya S. 2019).

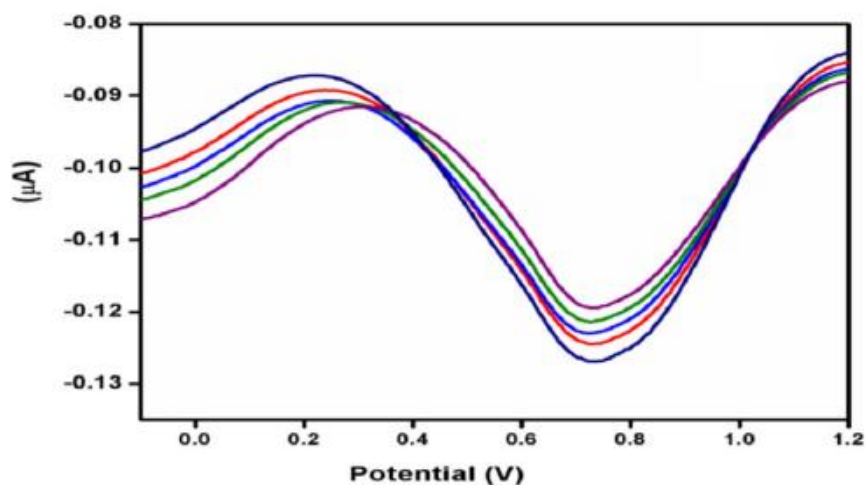


Figura 14. Voltamogramas de onda cuadrada con electrodo modificado con RuHCF/rGO en presencia de a glutatión.

Fuente: Saranya S. 2019.

6. Conclusión

El estrés oxidativo es el estado celular en el que existe un desequilibrio entre especies oxidantes y especies reductoras, este desbalance causa efectos tóxicos, lo que conlleva a cientos enfermedades. El glutatión reducido (GSH) tiene un papel muy importante en protección contra el estrés oxidativo siendo fundamental para la supervivencia celular. Por lo tanto, la monitorización del GSH en el organismo es un factor clave como un indicador del status oxidante de éste y del riesgo de enfermedades.

Para el análisis preciso de GSH en muestra biológicas; existen muchas limitantes como lo es la preparación de la muestra y su pronta descomposición, la sensibilidad del método utilizado, la necesidad de realizar derivaciones, la complejidad del método o la toxicidad de este. El GSH se puede hacer reaccionar con electrodos comunes para su análisis, ya que estos son más sencillos el costo para su producción es menor; como lo son los electrodos de carbono, platino, oro o plata, pero para que estos reaccionen con el GSH es un proceso lento que requiere un alto sobrepotencial y una gran adherencia del GSH a estos.

Existe sensores más complejos para el análisis de GSH que incorporan la nanotecnología, lo que implica un mayor costo y metodologías más complejas con especificaciones para su utilización; pero gracias a esto nos brindan una especificidad muy alta que puede usarse en muestras biológicas de sangre, saliva o lágrimas. Estas estrategias destacan esencialmente por la orientación del bioelemento de reconocimiento, que implica habitualmente la obtención de mayor sensibilidad y menor consumo de reactivos, además del empleo de protocolos de modificación más sencillos y rápidos, los cuales se deben realizar correctamente para evitar la desnaturalización de las enzimas y al ser altamente específicos solo pueden cumplir una función.

Los métodos electroanalíticos presentan ventajas de simplicidad, bajo costo y alta sensibilidad para el análisis de GSH por esto la medición electroquímica es un camino atractivo, así como optimizable mediante el uso de sensores y biosensores, que ha dirigido la investigación hacia la implementación de métodos analíticos que sean compatibles con cada necesidad que se presente. En cada estudio para la determinación de GSH la mejor opción de electrodos, transductores, materiales, equipo, etc., va a ser distinta dependiendo del enfoque de este; por ejemplo si se busca reducir costos y rapidez se pueden usar electrodos desnudos pero tienen baja selectividad y dependiendo el tipo de muestra pueden o no funcionar, en cambio si lo que se busca es selectividad y precisión se pueden utilizar electrodos modificados con oligonucleótidos o nanotecnología pero este proceso es costoso, más tardado y se necesita de equipo y conocimientos especializados. La mejor selección de equipo y materiales siempre va a depender de las necesidades del estudio.

7. Referencias

1. Águila V. (2017). *Respuesta antioxidante a la exposición a cadmio en mioblastos de mamíferos marinos y mamíferos terrestres*. Centro de investigación del noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur.
2. Ajo J., Naga V., Deepak P., Jawahar L. (2017). *Oxidative Stress in Atherosclerosis*. Genetics and genomics , 19 , pp. 42.
3. Amrit K., Kjell M., Sigbjørn S., Rune B., Gundersen E. (2006) . *Simultaneous quantification of reduced and oxidized glutathione in plasma using a two-dimensional chromatographic system with parallel porous graphitized carbon columns coupled with fluorescence and coulometric electrochemical detection*. Journal of Chromatography A, 1104 , pp. 179–189.
4. Antwi C., Johnson A., Selimovic A., Martin S. (2011). *Use of microchip electrophoresis and a palladium/mercury amalgam electrode for the separation and detection of thiols*. Analytical Methods, 3, pp. 1072-1078.
5. Aoyama K., Matsumura N., Watabe M., & Nakaki T. (2008). *Oxidative stress on EAAC1 is involved in MPTP-induced glutathione depletion and motor dysfunction*. European Journal of Neuroscience, 27, pp. 20–30.
6. Araque C. (2015). *Nanomateriales híbridos de óxido de grafeno y polímeros hidrosolubles para el diseño de plataformas biosensoras electroquímicas*. Departamento de Química Analítica. Facultad de ciencias químicas. Universidad Complutense de Madrid.
7. Armendáris V. (2012). *Diseño, construcción y caracterización de electrodos de grafito modificados con materiales compósitos para la detección de dopamina en líquido cefalorraquídeo*. Centro de investigación y desarrollo tecnológico en electroquímica, S.C.
8. Battaglini F. (1991). *Estudio electroquímico de electrodos enzimáticos amperométricos*. Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
9. Buitrago A., Calderón L., León A., Brunetto R., Gallignani M. (2010). *Desarrollo y validación de un método espectrofluorométrico para la determinación de furosemida en formas farmacéuticas sólidas*. Avances en Química, 5 , pp. 15-25.
10. Cano L. (2008) . *Diseño y Aplicación de Sensores Electroquímicos basados en Moléculas Orgánicas Conductoras*. Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales.
11. Catalán G., Redondo C., Palomares J., Nucciarelli F., Pau L. (2017). *Tunable plasmonic resonance of gallium nanoparticles by thermal oxidation at low temperatures*, IOP Publishing Ltd Nanotechnology.
12. Cichoż L., Michalak A. (2014). *Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases*. World J Gastroenterol , 20 , pp. 8082-8091.
13. Cisneros R., Oré R., Arnao I. & Suárez S. (2011). *Value of reduced / oxidized glutathione (GSH / GSSG) in diabetic rats treated with maca (Lepidium meyenii Walp)*. Departamento de Ciencias Dinámicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
14. Denzoin L., Soraci A., Tapia M. (2013). *Homeostasis del glutatión*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 47, pp. 529-539.
15. Ferrer F., Martínez S., Leroy W., Thndiwe C. (2009). *Oxidative stress: its impact on cataracts*. Rev Cubana Farm , 43 , pp. 3.

16. García G., Garcia C. (2010) *Los biosensores electroquímicos: herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico Grupo de Inmuno electroanálisis*. Departamento de Química Física y Analítica. Universidad de Oviedo. Asturias. España.
17. García M., Olivas A. & Rodríguez G. (2018). *Aplicación de nanotecnología en el diseño de biosensores electroquímicos: Revisión general y aplicaciones en diagnóstico clínico*. Academia Journal.
18. Gavin E. & Sies H. (2001). *The biochemistry of selenium and the glutathione system*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 10, pp. 153–158.
19. Gonzalez G., Japón T., Díaz B., Cabrera Z. (2018). *Electrochemical Techniques and methods: Galvanoplastia and Potentiometry*. Universidad Técnica de Machala, Ecuador, 19, pp. 80-87.
20. Guerra J. (2001). *Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes*. Anales de Medicina Interna, 18, pp. 326-335.
21. Harfield J., McAuley C. and Compton R. (2012). *Electrochemical determination of glutathione: a review*. The Royal Society of Chemistry, 137, pp. 2285–2296
22. Herrero R. (2015). *Metabolismo del glutatión y enzimas antioxidantes frente al estrés por metal(oid)es y otros agentes, en el ciliado-modelo "Tetrahymena thermophila"*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Biológicas Departamento de Microbiología III.
23. Hung M, Dra. Fraguera M, DrC. Lezcano L. (2015). *El sistema antioxidante del glutatión en la etiopatología de la disfunción nigro-estriatal*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 34 (2), pp. 168-186.
24. Irene V. (2007) *Química general. Unidad 10: electroquímica*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste.
25. Jimenez C., Daniel E. (2009) *Biosensors: implementation and outlook in the control and process quality and foodstuffs*. VITAE, Revista de la facultad de química farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.16, pp.144-154.
26. Liang S., Wang H., Zhang Z., Zhang X. and Zhang H. Direct (2002). *Spectrofluorimetric determination of glutathione in biological samples using 5-maleimidyl-2-(m-methylphenyl)benzoxazole*. Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan, 451, pp. 211-219.
27. Márquez P. & Olga M. (2015). *Nanotecnología y electroquímica*. Laboratorio de Electroquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
28. Martín Y. (2016). *Aplicaciones electroanalíticas de Quantum Dots y nanopartículas de fosfato de titanio*. Departamento de química física y analítica. Universidad de Oviedo.
29. Martínez S., Andrés B., Zubillaga M., Hager A., Paoli T., Boccio J. (2006). *Conceptos actuales del metabolismo del glutatión Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 40, pp. 45-51.
30. Martínez S., Torres D., Juárez O. (2011). *El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral*. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, 30, pp. 56-67.
31. Nada F., Ahmed G., Shereen M. (2012). *Novel sensor based on carbon paste/Nafion modified with gold nanoparticles for the determination of glutathione*. Anal Bioanal Chem, 404, pp. 1661–1672.

32. Nicolas P. (2016). *Electrodos modificados con nanotubos de carbono y grafeno. Caracterización y desarrollo de biosensores electroquímicos y plasmonicos para la detección de biomarcadores de relevancia*. Departamento de fisicoquímica. Facultad de ciencias químicas. Universidad Nacional de Córdoba.
33. Osorio P. (2008). *Estudio de las interacciones de peroxinitrilo con oligonucleótidos de secuencia conocida mediante biosensores electroquímicos*. Universidad de Chile. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Yeh C., Hou M., Wu S., Tsai S., Lin S., Hou L., Hsu M. & Tsai L. (2005). *A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer*. *Cell Biochem Funct*, 24, pp. 555–559.
34. Parra M. (2020). *Propuesta para el desarrollo de un quimiosensor colorimétrico partiendo de nanopartículas de oro modificadas con ligandos l-cisteína y l-glutación, para la detección de iones mercurio (hg+2) en medio acuoso*. Fundación Universidad de América facultad de ingenierías programa de ingeniería química Bogotá D.C.
35. Parrilla D. (2011). *Actividad enzimática y estrés oxidativo en camarón blanco (Litopenaeus vannamei) infectado con el virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB)*. La Paz, Baja California Sur: Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C
36. Perevezentseva O., Gorchakov E. (2012). *Voltammetric determination of cysteine at a graphite electrode modified with gold nanoparticles*. *J Solid State Electrochem*. 16, pp. 2405–2410.
37. Perevezentseva O., Skirdin K., Gorchakov E., Bimatov V. (2015). *Electrochemical Activity of Glutathione at a Graphite Electrode Modified with Gold Nanoparticles*. *Oriental Journal of Chemistry*. 31, pp. 837-844.
38. Pereyra L. (2020). *Materiales híbridos a base de grafeno, polianilina y nanopartículas de oro para bioceldas de combustible*. Instituto de investigación de ciencias básicas aplicadas. Universidad Autónoma del estado de Morelos.
39. Rabenstein D., Brown d., and McNeil C. (1985). *Determination of Glutathione in Intact and Hemolyzed Erythrocytes by Titration with tert-Butyl Hydroperoxide with End Point Detection by ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry*. Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Canada, 57 , pp. 2294-2299.
40. Radecka H., Radecki J. (2015). *Label-free Electrochemical Immunosensors for Viruses and Antibodies Detection-Review*. Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Science , 59 , pp. -269-275.
41. Raouf J., Ojani R. & Karimi H. (2009). *Electrocatalytic oxidation of glutathione at carbon paste electrode modified with 2,7-bis (ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one: application as a voltammetric sensor*. Springer Science+Business Media, 39, pp. 1169–1175.
42. Reyes B., García M. (2011). *Principios de electroquímica analítica* Universidad Nacional Autonoma de México.
43. Rodríguez J. (2020). *Biosensores basados en cisteína y análogos. Aplicados en la detección de metales pesados en fluidos biológicos*. Facultad de ciencias, Universidad de Cáliz, Puerto Rico.
44. Rodríguez V. (2016). *Grafeno: síntesis, propiedades y aplicaciones biomédicas*. Facultad de farmacia. Universidad Complutense Madrid.

45. Roy G., Rutherford L., Weaver E., Beaver K., Rasmussen M. (2020). *A Self-Powered Biosensor for the Detection of Glutathione*. Department of Chemistry, Lebanon Valley College, Annville.
46. Saavedra O., Albert U. (2018) *Diseño y desarrollo de sensores y biosensores para monitoreo de procesos biohidrometalúrgicos*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
47. Sánchez S. (2016). *Síntesis y caracterización de puntos cuánticos de PbSe con aplicaciones en celdas fotovoltaicas con configuración FTO/TiO₂/CdS/PbSe/ZnS*. Centro de investigaciones en óptica, A. C.
48. Saranya S., Feminus J., Geetha B., Deepa P. (2019). *Simultaneous detection of glutathione, threonine, and glycine at electrodeposited RuHCF/rGO-modified electrode*. Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature, 25, pp. 5537-5550.
49. Suarez O., Morales H. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. Fundación Universidad de América Revista Semilleros: Formación Investigativa, 4.
50. The 4th International Seminar on Sciences IOP Publishing. (2018). *Graphene Modified Screen Printed Carbon Electrode for Voltammetric Detection of Glutathione as Oxidative Stress Biomarker*. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, 187, DOI:10.1088/1755-1315/187/1/012078.
51. Tietze F. (1969). *Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues*. Analytical biochemistry , 27 , pp. 502-522.
52. Timur S., Odacı Y., Dincer A., Zihnioglu F., Telefoncu A. (2008). *Biosensing Approach for Glutathione Detection Using Glutathione Reductase and Sulfhydryl Oxidase Bienzymatic System*. Talanta 817, pp. 239–246
53. Ülkü Anik, Meliha Çubukçu & F. Nil Ertaş (2016). *An effective electrochemical biosensing platform for the detection of reduced glutathione, Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44, pp. 971-977, DOI: 10.3109/21691401.2015.100850
54. Urrejola M., Liliam V., Consuelo C., Peñaloza P., Álvarez B., Fuentevilla I. (2018). *Polymer Nanoparticle Systems: from Biodetection and Glucose Monitoring in Diabetes to Bioimaging, Nano-Oncology, Gene Therapy, Tissue Engineering / Regeneration to Nano-Dentistry*. Int. J. Morphol., 36 : 4 :1490-1499.
55. Wanga Z., Hana B., Maa X., Yinc Y., Caoa Y., (2017). *Sensitive detection of glutathione by using DNA-templated copper nanoparticles as electrochemical reporters*. Sensors and Actuators, 238, pp. 325–330.
56. Yeh C., Hou M., Wu S., Tsai S., Lin S., Hou L., Hsu M. and Tsai L. (2005) *A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer*. Cell Biochem Funct 24, pp. 555–559.