

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Nanociencias**

---

**Evaluación de biosensores amperométricos basados en  
mutantes de la Arg 181 de la lactato oxidasa de *Aerococcus  
viridans***

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Irma Yomira Palomares Ruiz**

Ensenada, Baja California, México  
2024

Tesis defendida por  
**Irma Yomira Palomares Ruiz**

y aprobada por el siguiente Comité

**Dr. Andrés Zárate Romero**  
Director de tesis

**Dr. Alejandro Huerta Saquero**

**Dr. José Enrique Íñiguez Pacheco**

**Dr. Hugo Javier Serrano Posada**



**Dra. Catalina López Bastidas**  
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Irma Yomira Palomares Ruiz** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

**Evaluación de biosensores amperométricos basados en mutantes de la Arg 181 de la lactato oxidasa de *Aerococcus viridans***

Resumen aprobado por:

Dr. Andrés Zárate Romero  
**Director de tesis**

El lactato es un biomarcador importante en la industria, salud y deporte, pero su cuantificación presenta desafíos debido a métodos tradicionales costosos y laboriosos. Esta investigación desarrolló biosensores amperométricos basados en mutantes de Lactato Oxidasa (LOx) para medir lactato en el sudor, ofreciendo una alternativa más eficiente. Se crearon biosensores de segunda generación con mediadores para mejorar la transferencia de electrones y de tercera generación con núcleos de platino para la transferencia directa de electrones (DET), ampliando así el rango de detección de lactato. Para conseguirlo, se decidió utilizar mutantes de la enzima LOx de *Aerococcus viridans* donde se sustituyó la Arg181 por los residuos hidrofóbicos Valina, Isoleucina y Alanina, (R181V, R181I y R181A). Esto permitió la formación de núcleos de platino en el sitio activo, actuando como nanocables para la DET. Todas las mutantes se expresaron en *E. coli* BL21 y se purificaron en un solo paso mediante cromatografía de afinidad a níquel. Los ensayos mostraron que los biosensores de segunda generación con quitosano y azul de Prusia resultaron efectivos para detectar lactato. A pH 5.0, las mutantes no mostraron un incremento de corriente, sugiriendo su posible inactivación debido a la protonación del residuo His265. En cuanto a los biosensores de tercera generación, la formación de nanocúmulos de platino se caracterizó por DLS, mostrando partículas de entre 500 y 1000 nm, indicando una DET. Los resultados indicaron que la enzima silvestre en pH 5.0 como 7.0, no exhibió una transferencia de electrones. En contraste, R181V mostró una DET a pH 7.0. En la amperometría, se observó un aumento continuo de potencial a una concentración de 30 mM de lactato, indicando estabilidad y superando el umbral de concentraciones de lactato en el sudor. Sin embargo, a pH 5.0 se perdió totalmente la transferencia de electrones, posiblemente debido a la inactivación de la enzima en este ambiente ácido. Estos hallazgos subrayan la necesidad de modificar la enzima para mejorar la transferencia de electrones en biosensores de tercera generación y la importancia del pH en la actividad enzimática y transferencia de electrones para el diseño de biosensores para sudor humano.

**Palabras clave: Lactato oxidasa, biosensor, nanocúmulo de platino, DET y MET.**

Abstract of the thesis presented by **Irma Yomira Palomares Ruiz** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

**Evaluation of amperometric biosensors based on Arg 181 mutants of lactate oxidase from *Aerococcus viridans***

Abstract approved by:

Dr. Andrés Zárate Romero  
**Thesis Director**

Lactate is an important biomarker in industry, health, and sports, but its quantification presents challenges due to traditional methods being costly and labor-intensive. This research developed amperometric biosensors based on Lactate Oxidase (LOx) mutants to measure lactate in sweat, offering a more efficient alternative. Second-generation biosensors were created with mediators to enhance electron transfer, and third-generation biosensors with platinum nuclei for direct electron transfer (DET), thus expanding the lactate detection range. To achieve this, mutants of the LOx enzyme from *Aerococcus viridans* were used, where Arg181 was replaced by the hydrophobic residues Valine, Isoleucine, and Alanine (R181V, R181I, and R181A). This allowed the formation of platinum nuclei in the active site, acting as nanowires for DET. All mutants were expressed in *E. coli* BL21 and purified in a single step using nickel affinity chromatography. Assays showed that second-generation biosensors with chitosan and Prussian blue were effective in detecting lactate. At pH 5.0, the mutants did not show an increase in current, suggesting their possible inactivation due to protonation of the His265 residue. Regarding the third-generation biosensors, the formation of platinum nanoclusters was characterized by DLS, showing particles between 500 and 1000 nm, indicating DET. The results indicated that the wild-type enzyme at pH 5.0 and 7.0 did not exhibit electron transfer. In contrast, R181V showed DET at pH 7.0. In amperometry, a continuous potential increase was observed at a lactate concentration of 30 mM, indicating stability and surpassing the threshold of lactate concentrations in sweat. However, at pH 5.0, electron transfer was completely lost, possibly due to enzyme inactivation in this acidic environment. These findings underscore the need to modify the enzyme to improve electron transfer in third-generation biosensors and the importance of pH in enzymatic activity and electron transfer for the design of biosensors for human sweat.

**Keywords:** Lactate oxidase, biosensor, platinum nanocluster, DET y MET.

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por financiar mis estudios de posgrado, impulsando así el desarrollo de la ciencia y tecnología en México. Su inversión en la educación y la investigación impulsa el crecimiento del conocimiento y la innovación en nuestro país, beneficiando a futuras generaciones de científicos.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN-UNAM) por aceptarme y proporcionar el espacio necesario para el desarrollo de esta investigación.

De igual manera, agradezco a mi asesor, el Dr. Andrés Zárate, por la oportunidad de realizar este trabajo y por su disposición durante todo el proceso. También extendo mi gratitud al Dr. Alejandro Huerta Saquero, al Dr. José Enrique Íñiguez Pacheco y al Dr. Hugo Javier Serrano Posada por sus correcciones, atenciones y seguimiento en este proyecto.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes.....	3
1.1.1 Lactato un biomarcador clave.....	3
1.1.2 Fundamentos de los biosensores.....	3
1.1.3 Economía de los biosensores.....	5
1.1.4 Enzimas.....	6
1.1.5 Enzima lactato oxidasa.....	7
1.1.6 Transferencia electrónica enzimática.....	9
1.1.7 Inmovilización.....	10
1.1.8 Avances en el campo de los biosensores.....	12
1.1.9 Técnicas de detección electroquímicas.....	15
1.1.10 Voltametría cíclica.....	16
1.1.11 Amperometría.....	17
1.2 Justificación.....	17
1.3 Hipótesis.....	18
1.4 Objetivos.....	18
1.4.1 Objetivo general.....	18
1.4.2 Objetivos específicos.....	19

<b>Capítulo 2. Metodología</b> .....	<b>20</b>
2.1 Producción de las mutantes.....	20
2.2 Purificación por cromatografía de afinidad a níquel.....	20
2.3 Diálisis.....	21
2.4 Electrodo de trabajo.....	21
2.5 Inmovilización en electrodos de segunda generación.....	21
2.6 Crecimiento de nanocúmulos de platino.....	22
2.7 Inmovilización en electrodos de tercera generación.....	22
2.8 Técnicas de detección electroquímicas.....	23
2.9 Sensibilidad.....	23
2.10 Límite de detección.....	24
2.11 Límite de cuantificación.....	24
2.12 Regresión no lineal modelo Michaelis-Menten.....	25
<b>Capítulo 3. Resultados</b> .....	<b>26</b>
3.1 Purificación por cromatografía de afinidad a níquel.....	26
3.2 Técnicas de detección electroquímicas.....	27
3.3 Biosensores de segunda generación.....	27
3.3.1 Voltametría cíclica de biosensores de 2ª generación a pH 7.0.....	27
3.3.2 Voltametría cíclica de biosensores de 2ª generación a pH 5.0.....	29
3.3.3 Amperometría de biosensores de 2ª generación a pH 7.0.....	30
3.3.4 Amperometría de biosensores de 2ª generación a pH 5.0.....	31
3.3.5 Estudio de la respuesta lineal del biosensor enzimático.....	32
3.3.5.1 Regresión lineal a pH 7.0.....	32
3.3.5.2 Regresión lineal a pH 5.0.....	33
3.3.6 Regresión no lineal modelo Michaelis-Menten.....	34
3.3.6.1 Michaelis Menten de biosensores de 2ª generación a pH 7.0.....	35



3.3.6.2	Michaelis-Menten de biosensores de 2ª generación a pH 5.0 .....	36
3.3.7	Reutilización en biosensores enzimáticos.....	36
3.4	Evaluación de biosensores de 3ª generación .....	38
3.4.1	Nucleación de platino (R181A, R181V, R181I) .....	38
3.4.2	Voltametría cíclica de biosensores de 3ª generación a pH 7.0 .....	39
3.4.3	Voltametría cíclica de biosensor de 3ª generación a pH 5.0.....	40
3.4.4	Amperometría de biosensores de 3ª generación a pH 7.0.....	40
3.4.5	Amperometría del biosensor R181V de 3ª generación a pH 5.0.....	41
3.4.6	Regresión lineal y Michaelis Menten de R181V de 3ª generación a pH 7.0 .....	42
3.4.7	Reutilización en biosensores enzimáticos.....	43
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>44</b>
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>52</b>
<b>Literatura citada .....</b>		<b>54</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Vías de reacción de L-lactato oxidasa donde E-Fl <sub>ox</sub> y E-Fl <sub>red</sub> son las formas enzimáticas que contienen FMN oxidado y reducido, imagen modificada (Stoisser et al, 2016). .....	7
2. Representación gráfica del primer plano del sitio activo de la estructura LOx tipo silvestre a pH 8.0 (Stoisser et al., 2014). .....	8
3. Representación esquemática de la DET y la MET en una enzima sobre un electrodo, imagen modificada (Leecha et al., 2012). .....	9
4. Imagen correspondiente a las configuraciones el electrodo PtNC-GOx/MPCNP sintetizado enzimáticamente de adentro hacia afuera, imagen modificada (Trifonov et al., 2019). .....	12
5. Túnel de acceso al sitio activo de la AvLOx. Medición de la apertura e hidrofobicidad del túnel de acceso al sitio activo después de las mutaciones in silico, imagen modificada. a) AvLOx tipo silvestre, b) R181A, c) R181V y d) R181I (Morales, 2022). .....	13
6. Distribución de tamaños por volumen de las Pt-AvLOx obtenidas para cada mutante, imagen modificada. a) Control con la AvLOx tipo silvestre, b) R181A, c) R181V y c) R181I (Morales 2022). .....	15
7. Celda de tres electrodos, imagen modificada (Rezaei, & Irannejad, 2019). .....	16
8. Cromatogramas de la purificación de AvLOx silvestre y tres mutantes. a) AvLOx silvestre, con el peso molecular marcado en rojo a 41 kDa. b) AvLOx de la mutante R181V, con el peso molecular marcado en rojo a 41 kDa. c) AvLOx de la mutante R181A, con el peso molecular marcado en rojo a 41 kDa. y d) AvLOx de la mutante R181I, con el peso molecular marcado en rojo a 41 kDa. ....	26
9. Mecanismo de transferencia de electrones mediado por AP en receptor biológico basados en AvLOx para la detección de L-lactato, imagen modificada (García et al, 2023). .....	27
10. Voltagramas cíclicos de electrodos enzimáticos con mediador AP a pH 7.0, a) Electrodo con la enzima silvestre a concentraciones de 0 y 3 mM. b) Electrodo con enzima R181V a concentraciones entre 0 y 20 mM. c) Electrodo con enzima R181A a concentraciones de 0 y 200 mM. d) Electrodo con enzima R181I a concentraciones entre 0 a 200 mM. ....	28
11. Voltagramas cíclicos de electrodos enzimáticos con mediador AP a pH 5.0, a) Electrodo con la enzima silvestre a concentraciones de 0 y 3 mM. b) Electrodo con la enzima R181V a concentraciones de 0 y 20 mM. c) Electrodo con la enzima R181A a concentraciones entre 0 y 200 mM. d) Electrodo con la enzima R181I a concentraciones de 0 y 200 mM. ....	29
12. Amperogramas de electrodos enzimáticos con mediador AP a pH 7.0. a) Electrodo con silvestre con concentraciones entre 0 a 3 mM. b) Electrodo con enzima R181V con concentraciones entre 0 a 200 mM. c) Electrodo con enzima R181A con concentraciones entre 0 a 200 mM. 30	30

13. Amperograma de electrodos enzimáticos con mediador AP a pH 5. a) Electrodo con enzima silvestre con concentraciones entre 0 a 3 mM. b) Electrodo con enzima R181V con concentraciones entre 0 a 20 mM. c) Electrodo con enzima R181A con concentraciones entre 0 a 200 mM. d) Electrodo con enzima R181I con concentraciones entre 0 a 200 mM. .... 31
14. Análisis de regresión lineal a pH 7.0. a) Regresión lineal obtenida por la enzima en su forma silvestre, b) Regresión lineal de la enzima R181A. c) Regresión lineal de la enzima R181I. .... 32
15. Análisis de regresión lineal a pH 5.0. a) Regresión lineal de la enzima AvLOx en su forma silvestre. b) Regresión lineal de la enzima R181A. .... 34
16. Ajuste al modelo de Michaelis-Menten de tres variantes en un biosensor amperométrico a pH 7.0 a) Michaelis-Menten obtenida por la enzima silvestre, b) Michaelis-Menten obtenida por la enzima R181A y c) Michaelis-Menten obtenida por la enzima R181I. .... 35
17. Ajuste de Michaelis-Menten de dos variantes en un biosensor amperométrico a pH 5.0. a) Michaelis-Menten obtenida por la enzima en su forma silvestre y b) Michaelis-Menten obtenida por la enzima R181A. .... 36
18. Estabilidad de almacenamiento de biosensores enzimáticos. a) silvestre, b) R181A. c) R181I. .... 37
19. Amperograma de reutilización de un pulso de los electrodos enzimáticos a) silvestre, b) R181A. c) R181I. .... 38
20. Distribución de tamaños por volumen de las Pt-AvLOx obtenidas para cada mutante. a) Control con la AvLOx tipo silvestre, b) R181V, c) R181A y c) R181I. .... 39
21. Respuesta voltamétrica de enzimas AvLOx Silvestres y R181V en electrodos de papel de carbón a pH 7.0. Las gráficas muestran a) Voltamograma cíclico obtenido por la enzima en su forma silvestre, b) Voltamograma cíclico obtenido por la enzima R181V. .... 39
22. Respuesta voltamétrica de enzimas AvLOx R181V en electrodos de papel de carbón a pH 5.0. Las gráficas muestran. a) Voltamograma cíclico obtenido por la enzima en su forma silvestre. .... 40
23. Respuesta amperométrica de enzimas silvestre y mutante R181V en electrodos de papel de carbón a pH 7.0. a) Amperograma obtenido por la enzima silvestre. b) Amperograma obtenido por la enzima R181V. .... 41
24. Respuesta amperométrica de R181V en electrodos de papel carbón a pH 5.0. .... 42
25. Análisis de la regresión lineal y Michaelis Menten a pH 7.0. a) Regresión lineal obtenida por la enzima R181V, b) Michaelis-Menten obtenida por la enzima R181V. .... 42
26. Reutilización de biosensores de 3ª generación AvLOx R181V a pH 7.0. a) Estabilidad almacenamiento de actividad biosensor. b) Amperograma característico en su primera medición. .... 43

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Parámetros cinéticos de AvLOx silvestre y mutantes .....	14
2. Parámetros analíticos de la detección de lactato a pH 7.0.....	33
3. Parámetros analíticos de la detección de lactato a pH 5.0.....	34
4. Cinética enzimática aparente de los electrodos silvestre, R181A y R181I a pH 7.0 .....	35
5. Cinética enzimática aparente de los electrodos silvestre y R181A a pH 5.0.....	36
6. Cinética enzimática aparente del electrodo R181V de 3ª generación a pH 7.0.....	43

## Capítulo 1. Introducción

---

Los biosensores enzimáticos brindan la capacidad de detectar y cuantificar moléculas específicas con una sensibilidad y selectividad excepcionales. Dentro de la amplia variedad, los biosensores amperométricos han demostrado ser particularmente valiosos y versátiles en la detección de biomoléculas de interés. Estos dispositivos se basan en la detección de corrientes eléctricas generadas por reacciones enzimáticas, aprovechando las capacidades catalíticas de las enzimas para facilitar reacciones específicas que generan o consumen especies electrónicamente activas, lo que se traduce en una medida directa de la concentración del analito objetivo (Rathee et al., 2016).

Sin embargo, la utilización efectiva de enzimas en biosensores no siempre ha sido una tarea sencilla. Aunque las enzimas pueden disminuir significativamente la barrera de activación en las reacciones, al aislarse, no siempre se presentan la combinación ideal de características y funcionamiento requerido para aplicaciones industriales. Por tanto, se ha vuelto esencial el diseño y optimización de estas proteínas para mejorar su rendimiento y eficiencia en los biosensores (Morales, 2022).

Una de las estrategias más prometedoras para lograr esta optimización es la modificación de los genes que codifican para las enzimas y la introducción de cambios específicos en los aminoácidos que componen su estructura. A través de estos enfoques, los científicos pueden rediseñar enzimas y crear variantes con propiedades mejoradas, como una mayor estabilidad, selectividad y sensibilidad, lo que incrementa su capacidad para detectar y medir biomoléculas con mayor precisión (Umena et al., 2006).

En el contexto de los biosensores amperométricos, la enzima juega un papel fundamental al catalizar la reacción que involucra la generación o consumo de especies electrónicamente activas. Esta reacción se relaciona directamente con una medida de la concentración del analito objetivo, lo que facilita la obtención de resultados precisos y rápidos. Además, para el caso de las enzimas que producen peróxido, que es una especie electroquímicamente activa, su detección permite que la concentración del analito se traduzca en un flujo de electrones equivalente (Hiraka et al., 2021).

Entre los analitos de mayor relevancia en el campo de los biosensores amperométricos se encuentra el lactato, un metabolito clave en la vía metabólica anaeróbica. La concentración de lactato aumenta en situaciones de alta demanda energética y ausencia de oxígeno, lo que puede llevar a la acidosis láctica y tener implicaciones clínicas importantes. Por lo tanto, la detección precisa de lactato es de gran interés

para el diagnóstico médico, la supervisión de enfermedades metabólicas y el control de calidad en la industria alimentaria (Taurino et al., 2013).

Los estudios cinéticos y estructurales de las enzimas han brindado una comprensión más profunda de los residuos que intervienen en la especificidad del sitio activo y son fundamentales para la catálisis. La modificación de algunos de estos residuos puede afectar la reacción enzimática y contribuir a una enzima con una reactividad y selectividad mejoradas, en algunos casos permitiendo una transferencia directa de electrones (DET) más eficiente en el biosensor (Hiraka et al., 2021).

A lo largo del tiempo, la investigación y desarrollo de biosensores amperométricos ha evolucionado hacia tres generaciones distintas. La primera generación se fundamenta en el uso de enzimas como biocatalizadores, lo que permite una detección directamente proporcional a la concentración del analito de interés. Estos biosensores se han utilizado tradicionalmente en aplicaciones biomédicas y análisis clínicos (Leecha et al., 2012).

Los de segunda generación incorporan sistemas mediadores para mejorar la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo, lo que ha permitido ampliar el rango de detección y ha brindado aplicaciones en campos como el monitoreo ambiental y la detección de contaminantes en alimentos (Leecha et al., 2012).

Los biosensores de tercera generación continúan en constante evolución con la incorporación de nanomateriales y tecnologías avanzadas, lo que permite mejorar aún más su sensibilidad y selectividad. Estos biosensores son clave en campos emergentes como la medicina personalizada, la detección de biomarcadores específicos y la monitorización en tiempo real de procesos biológicos y químicos (Leecha et al., 2012).

Para lograr una detección más eficiente de lactato y otros biomarcadores, se ha explorado el uso de materiales conductores que permiten la inmovilización de enzimas en los biosensores que han demostrado facilitar la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo, mejorando así la sensibilidad y selectividad de los biosensores (Morales, 2022). La enzima L-lactato oxidasa de *Aerococcus viridans* (AvLOx) ha despertado un gran interés debido a su potencial aplicación en la detección de esta biomolécula.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Lactato un biomarcador clave

El lactato es un biomarcador que indica la oxigenación de los tejidos y se estudia en el entrenamiento físico de deportes de alto rendimiento. Ayuda a evaluar el esfuerzo durante el ejercicio y a ajustar los entrenamientos para mejorar el rendimiento. Un aumento en la concentración de lactato puede causar acidosis láctica, lo que lleva al cuerpo a requerir más energía y puede provocar dolor muscular (Beker et al., 2022).

Los niveles normales de lactato en sangre oscilan entre 0.5 – 2 mM, pero durante el ejercicio pueden aumentar significativamente, alcanzando valores de entre 12 – 25 mM. En contraste, el contenido de lactato en el sudor varía entre 5 y 40 mM en reposo, incrementándose durante el ejercicio intenso. Es importante tener en cuenta que el sudor humano es una mezcla fisiológica compleja que contiene diferentes tipos de iones, como sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), así como compuestos como lactato, glucosa y amonio (Alvear et al., 2005; Alam et al., 2018).

El lactato se produce de forma natural en el citoplasma cuando el piruvato se convierte en ácido láctico bajo condiciones anaeróbicas, gracias a la enzima lactato deshidrogenasa. En solución acuosa, el ácido láctico se disocia en iones  $\text{H}^+$  y lactato. Las mediciones relacionadas con el lactato a menudo se realizan a través de mediciones de absorbancia, espectrometría de masas, espectroscopía multidimensional y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) pero poder utilizar cualquiera de estos métodos de detección se requiere que la muestra sea tratada previamente en el laboratorio (Goodwin et al., 2007; Azzouzi et al., 2015; Beker et al., 2022).

### 1.1.2 Fundamentos de los biosensores

Los biosensores son los dispositivos que han tenido un mayor desarrollo en los últimos tiempos. Estos dispositivos analíticos constan de un elemento biológico de reconocimiento y un transductor capaz de convertir una señal biológica en una señal física medible.

Los sistemas de reconocimiento molecular en los biosensores son capaces de detectar selectivamente un

compuesto específico mediante una reacción que produce un cambio, como en la concentración, pH, masa, calor y propiedades ópticas (Umena et al., 2006).

El transductor, por su parte, detecta este cambio y lo transforma en una señal física más fácilmente medible, como una señal eléctrica. La información analítica obtenida de esta señal puede proporcionar datos precisos y relevantes sobre la muestra en estudio (Umena et al., 2006).

Los biosensores, pueden ser clasificados en función del elemento de reconocimiento, el sistema de transducción o el tipo de interacción. En cuanto al elemento de reconocimiento, existen dos diferentes tipos, los catalíticos y los de afinidad. Los biosensores catalíticos utilizan una enzima u otro catalizador biológico, el cual reacciona con un analito en específico, desencadenando una reacción química, sin consumo de materia lo que permite ser utilizado nuevamente. Mientras que los biosensores de afinidad pueden utilizar anticuerpos, ácidos nucleicos o moléculas específicas para el analito de interés. Estos elementos interactúan con el sustrato deseado formando un complejo con éste. Debido a que no hay un cambio catalítico, normalmente se necesitan marcadores para medir la interacción y así ser detectado por el transductor (Rathee et al., 2016).

Otra forma de clasificar los biosensores es a partir de los transductores, los cuales pueden clasificarse en diferentes categorías, tales como ópticos, termométricos, piezoeléctricos, nanomecánicos y electroquímicos. En particular, los transductores electroquímicos se colocan en contacto directo con el sensor y se encargan de transformar los cambios detectados en una señal eléctrica. Este tipo de transductor es muy utilizado en la detección de elementos biocatalíticos.

Entre los transductores electroquímicos, se pueden distinguir varios tipos en función del mecanismo de detección utilizado como los conductimétricos los cuales miden cambios en la conductividad eléctrica; los potenciométricos, que miden las diferencias de potencial eléctrico; los amperométricos, que se basan en las reacciones de oxidación-reducción (redox) (Rathee et al., 2016).

Es importante destacar que los biosensores enzimáticos amperométricos han sido clasificados en tres generaciones según el método utilizado para medir la reacción bioquímica. En los de primera generación la transferencia de electrones ocurre entre el producto de la reacción enzimática y el electrodo, mientras que los de segunda generación utilizan receptores de electrones artificiales, los cuales confieren una mayor sensibilidad, además de una mayor selectividad en la detección de analitos específicos, y los de tercera generación se consideran ideales porque utilizan enzimas capaces de realizar DET, lo que hace que



la señal del sensor no se vea afectada por fluctuaciones y la difusión limitada de oxígeno o mediadores en la solución (Leecha et al., 2012).

A pesar de sus notables ventajas, los biosensores de tercera generación también presentan desafíos en términos de costo, estabilidad, regulación y aceptación en el mercado. Estas desventajas deben ser consideradas cuidadosamente en el desarrollo y aplicación de esta tecnología (Hiraka et al., 2020).

Para superar estas limitaciones, algunas investigaciones se han centrado en desarrollar biosensores de segunda generación con enzimas modificadas genéticamente, reduciendo la distancia del centro activo al electrodo y ofreciendo ventajas cruciales. Estas mejoras incrementan la eficiencia de transferencia de electrones, acelerando las reacciones bioquímicas, permitiendo respuestas más rápidas y precisas (Hiraka et al., 2020).

Además, la menor distancia aumenta la sensibilidad del biosensor, posibilitando la detección de concentraciones bajas con mayor eficacia y mejorando la selectividad al enfocarse específicamente en el analito, evitando interferencias no deseadas. Estas mejoras también aumentan la estabilidad y prolongan la vida útil del biosensor, haciéndolo versátil en aplicaciones médicas, ambientales e industriales y promoviendo avances tecnológicos y científicos (Hiraka et al., 2020).

### 1.1.3 Economía de los biosensores

El creciente interés en el avance y perfeccionamiento de los biosensores ha generado avances significativos en todo el mundo. Estos avances han mejorado la eficiencia, precisión y accesibilidad de los procesos de diagnóstico, acelerando los experimentos y permitiendo la recopilación de datos en tiempo real para tomar decisiones rápidas (Naresh et al., 2021; Bhatia et al., 2024).

Según un informe de Straits Research sobre las tendencias del mercado de biosensores, se estima que para el período 2021-2030, el tamaño del mercado crecerá de 22,409 millones de dólares a 44,794 millones de dólares, con un crecimiento promedio anual del 8% (Straits Research, 2024).

Las principales regiones involucradas en este mercado incluyen Norte América, que representa el 44% con una cifra de 9,731 millones de dólares en 2021, con un crecimiento anual esperado del 7.63%, llegando a un valor de 18,941 millones de dólares en 2030. Por otro lado, la región Asia-Pacífico, representa el 21.75%

con un valor de 4,874 millones de dólares en 2021, con un crecimiento anual esperado del 8.6%, alcanzando un valor de 10,327 millones de dólares en 2030 (Naresh et al., 2021; Strairs Research, 2024).

En términos de tipo de tecnologías, los biosensores electroquímicos dominan el mercado mundial con una cuota de 17,355 millones de dólares en 2021 representando el 77.4 % del mercado y se espera que crezca anualmente 8.18% durante el período previsto, para alcanzar un valor estimado de 35,217 millones de dólares en 2030 (Bhatia et al., 2024; Strairs Research, 2024).

#### 1.1.4 Enzimas

Las enzimas son macromoléculas que actúan como catalizadores en las reacciones químicas que tienen lugar en los organismos vivos. Su función es indispensable para la vida, dado que todos los procesos metabólicos necesitan de la aceleración que ofrecen las reacciones enzimáticas (Conix, 2005).

Existen diversas formas de nombrar a las enzimas, algunas aluden al tejido u órgano en el que fueron descubiertas, mientras que otras se basan en el sustrato o la actividad que llevan a cabo. Desde 1961, la Unión Internacional de Bioquímica ha adoptado un sistema de clasificación y nomenclatura que divide a las enzimas en seis grupos principales: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (Leiros et al., 2006).

Dentro de los seis grupos enzimáticos identificados, el de mayor importancia son las oxidorreductasas debido a su papel fundamental en la transferencia de electrones, estos tipos de reacción son conocidos como reacciones redox y esta función es especialmente relevante en la construcción de biosensores electroquímicos (Leiros et al., 2006).

Las enzimas redox constan de una apoenzima, es decir, el componente proteico de la enzima, y un cofactor, que es una especie electroactiva no proteica. La presencia del cofactor garantiza la transferencia de electrones entre la enzima y su sustrato/cosustrato. El cofactor puede estar fuertemente unido a la estructura de la enzima o liberarse del sitio activo de la enzima durante la reacción. Algunos cofactores comunes para las enzimas oxidantes incluyen la flavina adenina dinucleótido (FAD), el mononucleótido de flavina (FMN), el dinucleótido de nicotinamida adenina ( $\text{NAD}^+$ ) y la pirroloquinolina quinona (PQQ) (Leecha et al., 2012).

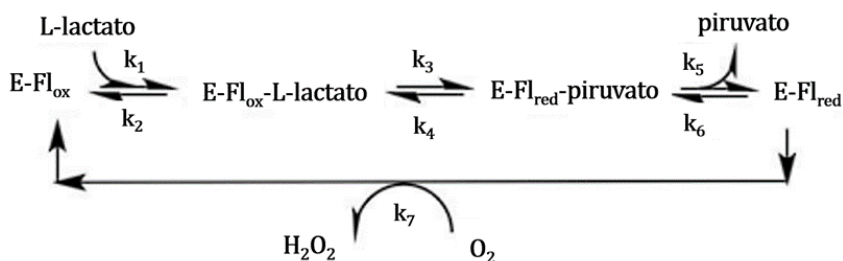
Las enzimas oxidorreductasas son catalizadores muy eficientes para el uso en biosensores amperométricos, gracias a su gran especificidad de sustrato el cual ha demostrado en muchos casos ser excelente para detectar ciertos metabolitos de una mezcla compleja (Taurino et al., 2013).

Además, estas enzimas tienen la capacidad de actuar en condiciones fisiológicas y se pueden diseñar e inmovilizar de manera fácil y efectiva. La diversidad de oxidorreductasas disponibles también hace que sean una opción muy versátil para este tipo de biosensores (Taurino et al., 2013).

### 1.1.5 Enzima lactato oxidasa

De las enzimas redox, la lactato oxidasa de *Aerococcus viridans*, (AvLOx) es de interés para este proyecto. Esta enzima que es perteneciente a la familia de las flavoenzimas, actúa como oxidasa de los  $\alpha$ -hidroxiácidos, incluyendo el lactato. En esta reacción, se requiere oxígeno para producir piruvato y peróxido ( $H_2O_2$ ). La actividad de estas enzimas depende del cofactor mononucleótido de flavina (FMN), la estructura es un homotetrámero y los monómeros presentan un plegamiento de barril  $(\alpha/\beta)_8$  (Taurino et al., 2013; Stoisser et al., 2016).

La conversión global de LOx se produce en dos semirreacciones (Figura 1), típicas de las enzimas de esta familia. La primera consiste en que el lactato reduce el cofactor FMN, produciendo el complejo E-Fl<sub>red</sub> y liberando piruvato. Posteriormente la segunda semirreacción, constituye el complejo oxidado por el oxígeno ( $O_2$ ), lo que forma de nuevo el complejo E-Fl<sub>ox</sub> y libera  $H_2O_2$  (Taurino et al., 2013; Stoisser et al., 2016).

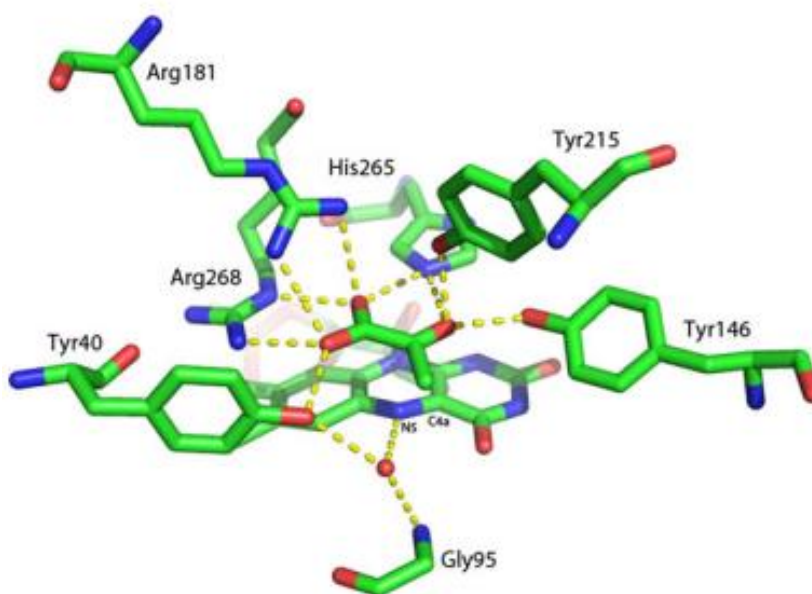


**Figura 1.** Vías de reacción de L-lactato oxidasa donde E-Fl<sub>ox</sub> y E-Fl<sub>red</sub> son las formas enzimáticas que contienen FMN oxidado y reducido, imagen modificada (Stoisser et al, 2016).

La estructura de la enzima LOx a pH 8.0 revela la presencia de una triada en su sitio activo, compuesta por los residuos conservados: Tyr40, Tyr146 y Arg268 en la LOx (Figura 2). La cual se caracteriza por tener un

papel crítico en la catálisis al posicionar el sustrato de L-lactato de manera adecuada para la reacción. Es importante destacar que la posición precisa de los residuos en la triada es esencial para la función catalítica de la enzima (Stoisser et al., 2016).

Bajo el mismo contexto en estudios previos se analizaron los efectos de la eliminación de la carga positiva en los residuos Arg181 y Arg268. Se encontró que estas mutaciones en estos residuos redujeron significativamente la eficiencia de reducción de la flavina oxidada por L-lactato, especialmente en las Arg268. Esto sugiere que los residuos de arginina, Arg181 y Arg268, desempeñan un papel importante en la unión del sustrato y su interacción con la flavina, además de neutralizar la carga en el estado de transición de la deshidrogenación del sustrato (Yorita et al., 2000).



**Figura 2.** Representación gráfica del primer plano del sitio activo de la estructura LOx tipo silvestre a pH 8.0 (Stoisser et al., 2014).

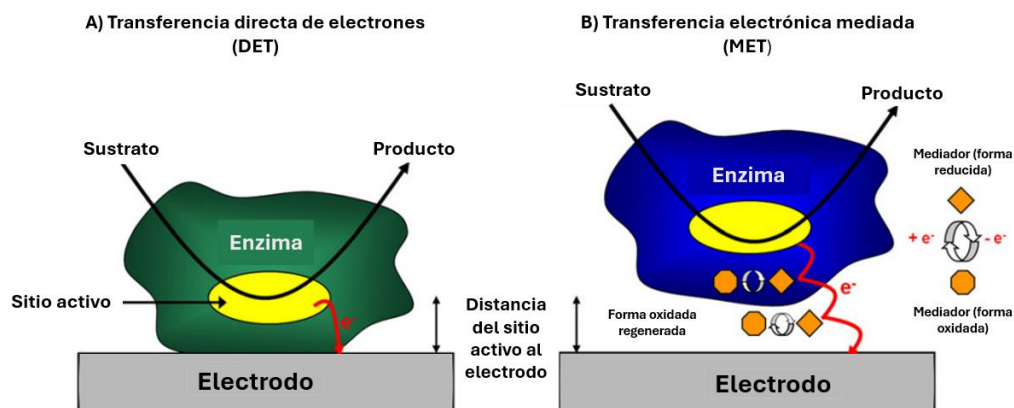
La importancia de estos residuos radica en su participación en la semirreacción reductora y en la interacción de sustratos y ligandos con el grupo prostético FMN. Se propone que Arg181 y Arg268 podrían formar parte del sitio de unión del sustrato, y que su conservación en la familia de enzimas estudiada sugiere que juegan un papel crucial en la función catalítica de estas enzimas. Además, estos residuos parecen estar involucrados en la neutralización de la carga negativa desarrollada en el estado de transición al eliminar el protón de la posición de carbono (Yorita et al., 2008).

Asimismo, se examinó la estructura de la enzima LOx a pH 4.5, lo que proporcionó más información sobre

cómo funciona. En este pH, se observó que un residuo His265 se aleja del lugar donde se une al sustrato, en comparación con su posición a pH 8.0. Esto podría ser por la protonación del residuo. Este cambio en la posición de His265 provoca un gran reordenamiento en la estructura de la enzima, creando una nueva red de enlaces de hidrógeno con otros residuos, además de introducir oxígeno molecular en el medio. En esta nueva posición, His265 intercambia lugares con Asp174 y forma enlaces de hidrógeno con una molécula de agua y otro residuo llamado Lys221 del monómero contiguo, atribuyéndolo a la protonación de His265. Estas estructuras muestran que His265 se protona a pH inferiores a 5.0 sin la presencia de lactato, lo que causa que se mueva lejos del sitio activo de la enzima (Furuichi et al., 2008).

### 1.1.6 Transferencia electrónica enzimática

Existen diferentes vías para efectuar la transferencia electrónica en un biosensor. Una alternativa es utilizar mediadores, que son moléculas electroactivas que actúan como intermediarios en la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo. Este proceso se conoce como transferencia de electrones mediada (MET) (Figura 3), y se requiere un potencial redox más positivo para la biocatálisis oxidativa (ánodo) y negativo para la biocatálisis reductora (cátodo) para maximizar la potencia de salida. Sin embargo, esto puede provocar pérdidas de voltaje en una reacción electroquímica (Leecha et al., 2012).



**Figura 3.** Representación esquemática de la DET y la MET en una enzima sobre un electrodo, imagen modificada (Leecha et al., 2012).

Otra opción es aprovechar el potencial natural de algunas enzimas redox de transferir directamente los electrones de la enzima al electrodo sin la necesidad de un mediador; esto solo lo pueden llevar a cabo las enzimas que poseen cofactores estrechamente unidos al sitio activo. Este proceso se denomina DET (Figura 3). Esta estrategia puede ser más eficiente, pero requiere que el electrodo esté lo suficientemente

cerca del cofactor enzimático y en la orientación correcta para mantener la distancia de aproximación más cercana (Leecha et al., 2012).

Aunque la DET se ha observado en una amplia variedad de enzimas, hay varios desafíos que se deben superar para lograr tasas significativas de DET entre sitios activos y superficies de electrodo sólido, para que den lugar a apreciables densidades de corriente. Por ejemplo, la tasa de transferencia de electrones está relacionada exponencialmente con la distancia de aproximación más cercana entre un donante y un aceptor de electrones, lo que resulta en tasas despreciables para distancias superiores a 20 angstroms (Leecha et al., 2012).

Debido a las limitaciones de estabilidad y funcionalidad de las enzimas naturales, se han desarrollado diversas estrategias para estabilizarlas en la creación de biosensores, lo que ha llevado a numerosos estudios de investigación. Estos enfoques incluyen el uso de condiciones experimentales adecuadas para facilitar el manejo de las enzimas. También se emplean herramientas genéticas para realizar modificaciones que mejoren su actividad en condiciones extremas de pH o les otorguen habilidades específicas. Otra estrategia es la reticulación física o química de las subunidades enzimáticas. Además, se puede recurrir a la estrategia de inmovilización para mejorar la estabilidad y funcionalidad de las enzimas en los biosensores (Fernández, 2009; Leecha et al., 2012; Stoisser et al., 2016).

### 1.1.7 Inmovilización

Las enzimas utilizadas en los biosensores presentan problemas de estabilidad y eficiencia, así como también es difícil recuperarlas y reutilizarlas. Para resolver estos problemas se han creado diversas técnicas de inmovilización. Estas técnicas ayudan a mejorar la estabilidad, aumentar la actividad y selectividad, tener una buena resistencia, mejorar la separación y purificación de algunos productos y la posibilidad de reutilización (Choi et al., 2015; Rueda et al., 2016; Monteiro et al., 2019; Cavalcante et al., 2021).

La técnica de inmovilización consiste en atrapar una molécula de enzima en una fase que permita el intercambio o difusión de sustancias. Es importante realizar este proceso de forma que se conserve la estructura tridimensional activa del receptor biológico y su orientación espacial. Además, tanto el analito como los productos derivados de la reacción biológica deben poder moverse entre el sitio activo, donde ocurre la reacción, y la matriz de la muestra, lo que puede alterar las propiedades físicas y químicas de la

enzima. Estos cambios incluyen la estabilidad, los efectos conformacionales y estéricos, las propiedades cinéticas y los efectos en la transferencia de masa y difusión (Eş et al., 2015).

Los métodos de inmovilización se clasifican en métodos físicos y químicos según cómo interactúan las enzimas con los soportes. Los métodos físicos incluyen la adsorción por captura polimérica, donde las enzimas se unen al soporte mediante interacciones débiles como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals o enlaces iónicos; mediante una matriz como quitosano y nafión que serán los materiales utilizados durante el desarrollo de este proyecto (Poorakbar et al., 2018; Liu et al., 2018; Cavalcante et al., 2021).

El quitosano es un polisacárido natural con propiedades únicas, como la capacidad de gelificación en soluciones ácidas, adhesión a superficies cargadas negativamente, quelación de metales pesados y biocompatibilidad. Estas características lo hacen ideal para biosensores implantables, clínicos y alimentarios, además de ser ecológico, biodegradable y seguro para los humanos (Klotzbach et al., 2008).

Por otro lado, el Nafion es una resina polimérica perfluorada con grupos sulfonatos que, en contacto con el agua, forman canales con cargas negativas que permiten el paso de cationes, pero excluyen los aniones, eliminando interferencias en la medida del biosensor. Además, el Nafion es químicamente inerte, estable térmicamente y resistente mecánicamente, por lo que es ampliamente utilizado en biosensores enzimáticos electroquímicos (Klotzbach et al., 2008).

En la categoría de métodos químicos se encuentra la formación de enlaces covalentes, los cuales provocan cambios estructurales en los sistemas catalíticos inmovilizados. Sin embargo, lograr esta unión no es fácil ya requiere varias etapas. En la primera etapa, se modifican los grupos funcionales de la superficie del elemento para permitir la inmovilización. Posteriormente se realiza la funcionalización de superficies de forma electroquímica, así se producen grupos funcionales que permiten crear enlaces covalentes como las aminas primarias ( $\text{NH}_2$ ), carboxilos ( $\text{COOH}$ ), alcoholes ( $\text{OH}$ ) y tioles ( $\text{SH}$ ), finalmente, se realizan etapas adicionales como purificación, caracterización y evaluación de la actividad, las cuales dependen del sistema y la aplicación específica deseada (Rueda et al., 2016; Cavalcante et al., 2021).

Dentro de la configuración covalente también se encuentran las técnicas de entrecruzamiento, el cual se basa en el acoplamiento a la carbodiimida empleando EDC y NHS para unir grupos carboxilos a aminas primarias (Rueda et al., 2016; Cavalcante et al., 2021).

### 1.1.8 Avances en el campo de los biosensores

Diversos autores han descrito casos de proteínas diseñadas específicamente para su uso en biodispositivos, con mejoras significativas en términos de estabilidad, sensibilidad y selectividad. Todos estos parámetros dependen en gran medida de cómo la biomolécula se une a la superficie del electrodo y de la eficiencia con la que se transfieren los electrones (Stoisser et al., 2016).

Algunas investigaciones que permiten ver el progreso de las enzimas como biosensores que enfrentan los desafíos antes mencionados es el de Hiraka et al. (2021) los cuales desarrollaron un sensor multiplexado de lactato que utilizaba una enzima doble mutante AvLOx Ala96Leu/Asn212Lys como base, esta enzima había sido creada por el mismo grupo, el cual construyó un biosensor con una enzima que reaccionaba con arPES (amino-reactivo etosulfato de fenazina) e inmovilizada en electrodos serigrafados de carbono.

Este biosensor presentaba una respuesta amperométrica hasta 12 veces mayor que la enzima silvestre, gracias a que muestran una baja interferencia de oxígeno y otros compuestos electroactivos, del mismo modo que manifestaba una alta actividad deshidrogenasa, lo que sugiere una cuasi-transferencia directa de electrones (Hiraka et al., 2020).

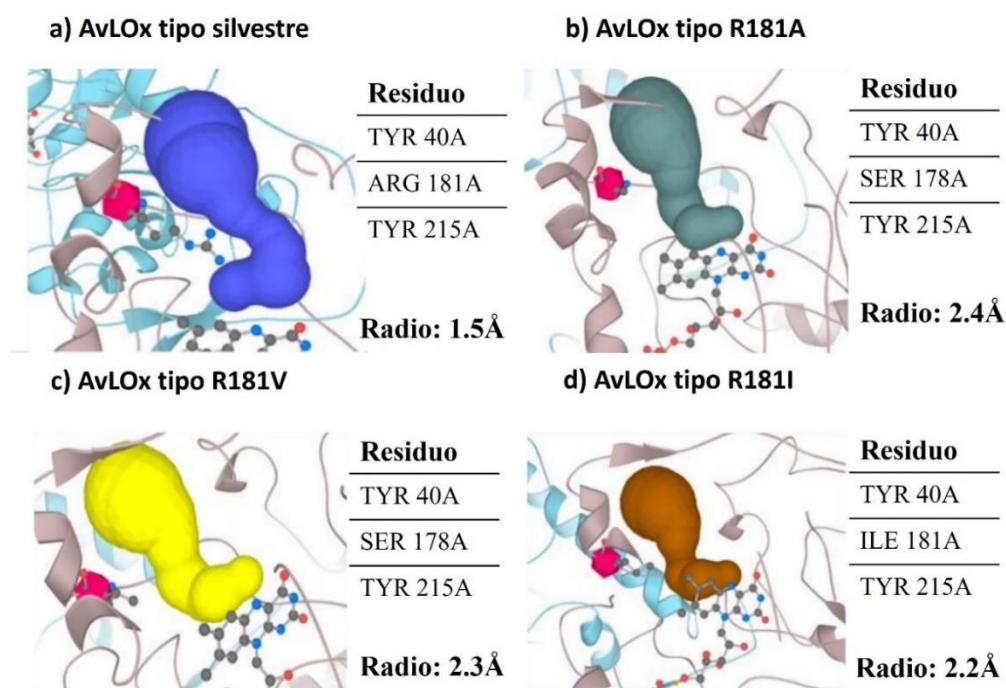
Otra estrategia innovadora, es la propuesta por Trifonov et al. (2019), quienes desarrollaron un sistema de auto cableado enzimático para la DET implantando nanocúmulos de platino (PtNC) en la enzima glucosa oxidasa (GOx), esto mediante el uso de un precursor hexacloroplatinato ( $\text{PtCl}_6$ ), estas se inmovilizaron sobre nanopartículas de carbono mesoporoso (MPCNP). Los poros presentes en las nanopartículas limitan el crecimiento de los PtNC y al mismo tiempo permiten la conexión eléctrica con la matriz, efectuando la DET.



**Figura 4.** Imagen correspondiente a las configuraciones el electrodo PtNC-GOx/MPCNP sintetizado enzimáticamente de adentro hacia afuera, imagen modificada (Trifonov et al., 2019).



De manera similar a la GOx, la enzima AvLOx es considerada una potencial candidata para realizar la DET mediante la estrategia de nucleación de platino (Pt). Sin embargo, una limitación es que el sitio activo de la GOx se encuentra expuesto al solvente, mientras que el de la AvLOx se presenta dentro de un túnel con acceso limitado. Para abordar este desafío, en un trabajo previo realizado en nuestro grupo de investigación por Morales (2022), se diseñaron tres mutantes de la enzima AvLOx denominados R181A, R181V y R181I las cuales fueron diseñados para abrir el sitio activo, sustituyendo la arginina 181 por residuos hidrofóbicos de cadena más corta. Como resultado de estas modificaciones, se incrementó el radio del túnel, lo que favoreció la entrada del  $PtCl_6$ . Estas mutantes, aportan hidrofobicidad al área circundante del túnel y mejoran la DET facilitando así la formación de nanocúmulos de platino (Morales, 2022).



**Figura 5.** Túnel de acceso al sitio activo de la AvLOx. Medición de la apertura e hidrofobicidad del túnel de acceso al sitio activo después de las mutaciones in silico, imagen modificada. a) AvLOx tipo silvestre, b) R181A, c) R181V y d) R181I (Morales, 2022).

Es importante destacar que estas enzimas mutantes no solo ofrecen ventajas en la transferencia de electrones para biosensores de tercera generación, sino que también representan un potencial para mejorar las características y capacidades de biosensores de segunda generación. La aplicación de estas enzimas mutantes en ambos tipos de biosensores presenta una oportunidad para optimizar su funcionamiento y eficiencia, abriendo nuevas posibilidades en el desarrollo de tecnologías de detección analítica más avanzadas y precisas.

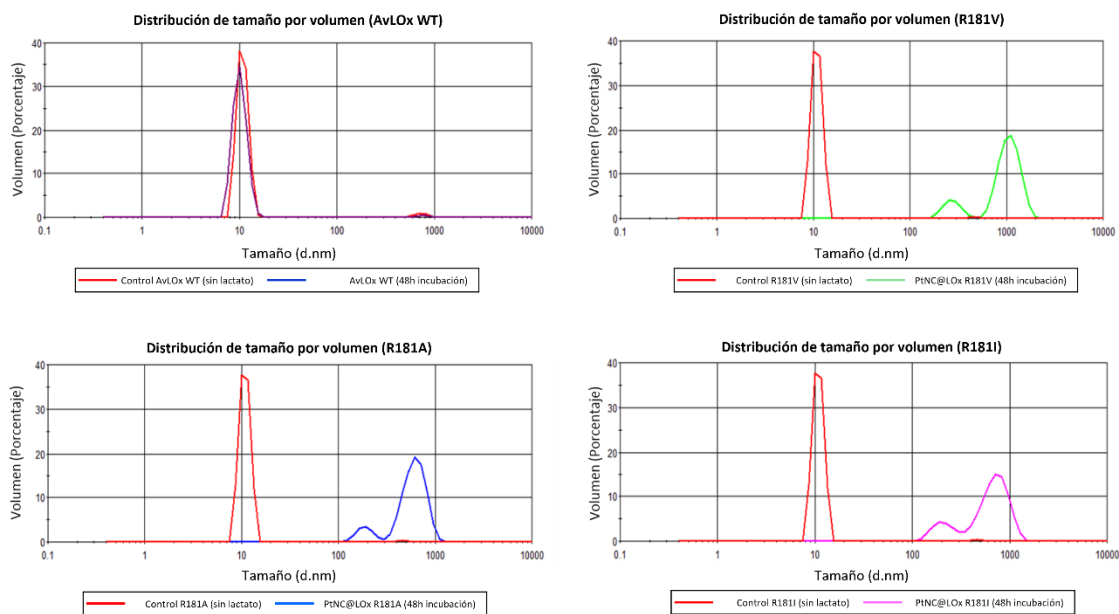
Este trabajo representa un avance significativo en la investigación y aplicación de enzimas mutantes para biosensores. Aunque se enfocaron en mejorar la funcionalidad de los biosensores de tercera generación, también abre la puerta para desarrollar estrategias innovadoras que mejoren los biosensores de segunda generación. Para el diseño de las mutantes se realizó una mutación *in silico* del residuo seleccionado utilizando el software Chimera (Pettersen et al., 2004) y se minimizó la estructura para analizar los cambios conformacionales de las cadenas laterales alrededor del sitio activo y medir la apertura del canal de acceso utilizando el servidor MOLEonline. Los resultados obtenidos sugerían un incremento en el diámetro del canal de acceso, los resultados se resumen en la Figura 5.

Además, se caracterizó la cinética enzimática de cada mutante de AvLOx, Tabla 1, observando que en el caso de las mutantes R181A y R181I no se llegó a saturación usando una concentración de 100 mM de lactato, lo que muestra una disminución en la afinidad del sustrato; en el mismo sentido, la  $K_m$  de ambas mutantes aumentó considerablemente en comparación con la AvLOx tipo silvestre, mientras que sus  $V_{max}$  disminuyeron hasta 250 veces. La mutante R181V mostró la mejor actividad, aunque su  $V_{max}$  disminuyó en comparación con la de tipo silvestre, su  $K_m$  está en el mismo orden de magnitud que esta, por lo que la afinidad al sustrato no ha sido afectada en gran medida, además la mutante llega a saturación en 10 mM de lactato un valor cercano a lo reportado para la enzima silvestre. Cabe mencionar que en mutantes R181K y R181M los valores de  $K_m$  reportados fueron de 7.5 mM y 103 mM respectivamente, mientras que los valores de  $k_{cat}$  disminuyeron 12 y 121 veces respectivamente.

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de AvLOx silvestre y mutantes

AvLOx	$V_{max}$ (U/mg)	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )
<b>Silvestre</b>	27.966 ± 1.089	0.155 ± 0.018	19.11 ± 0.740
<b>R181A</b>	0.15 ± 0.018	29.97 ± 9.143	0.10 ± 0.012
<b>R181I</b>	0.11 ± 0.011	85.71 ± 14.488	0.07 ± 0.007
<b>R181V</b>	0.19 ± 0.005	0.80 ± 0.176	0.13 ± 0.003

Dentro de los resultados obtenidos en la nucleación de platino utilizaron el método Dispersión Dinámica de Luz (DLS) para comprobar la formación de nanocúmulos de platino, el cual consistió en comparar cada solución que contenía la enzima silvestre o las mutantes Pt-AvLOx con su control donde había ausencia de sustrato.



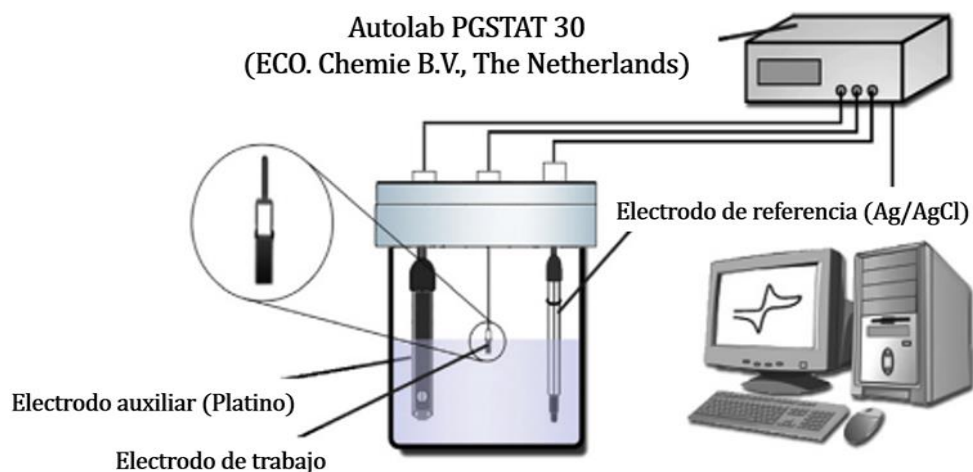
**Figura 6.** Distribución de tamaños por volumen de las Pt-AvLOx obtenidas para cada mutante, imagen modificada. a) Control con la AvLOx tipo silvestre, b) R181A, c) R181V y c) R181I (Morales 2022).

Las mezclas de reacción iniciales eran completamente traslúcidas, al transcurrir 48 h de incubación, las soluciones que contenían a la enzima mutante, el sustrato y el precursor de platino se tornaron turbias. El control con la enzima silvestre presentó, un pico en 10.21 nm, tras 48 h no apreció ninguna formación de nanopartícula permaneciendo el pico el mismo tamaño (Figura 6 a). En las mutantes, las mediciones iniciales presentaron el mismo tamaño  $\approx 10$  nm. En la muestra R181A tras añadir lactato y dejar incubar por 48 h, aparecen partículas de 625 nm, dando indicios de una formación de nanocúmulos metálicos. (Figura 6 b). La mutante R181V tuvo un pico de tamaño de 1087 nm, mientras que la R181I de 728 nm (Figura 6 c y d respectivamente). Estos resultados sugieren que durante la reacción hubo formación de nanocúmulos de platino (Morales, 2022).

### 1.1.9 Técnicas de detección electroquímicas

Las técnicas de detección electroquímica son fundamentales para evaluar y mejorar los biosensores, y varían según la aplicación y la información requerida. Las principales técnicas incluyen la voltametría y la amperometría. Estas técnicas suelen emplear una celda de tres electrodos (Figura 7), que consta de un electrodo de trabajo (o indicador), un contraelectrodo y un electrodo de referencia (Ronkainen, et al., 2010; Rezaei & Irannejad, 2019).

El electrodo de trabajo actúa como transductor en la reacción electroquímica, convirtiendo la señal química en una señal eléctrica. El contraelectrodo, sumergido en la solución electrolítica, controla la posibilidad de aplicar corriente al electrodo de trabajo. Por su parte, el electrodo de referencia se coloca a una distancia determinada del sitio de reacción y cerca del electrodo de trabajo para proporcionar un potencial conocido y estable (Rezaei & Irannejad, 2019).



**Figura 7.** Celda de tres electrodos, imagen modificada (Rezaei & Irannejad, 2019).

Entre los electrodos de referencia disponibles se encuentran el de hidrógeno estándar, los calomelanos ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}$ ) y los electrodos de plata/cloruro de plata ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ). Este último es el preferido en sistemas bioelectroquímicos, ya que no requiere necesariamente control de temperatura (Rezaei & Irannejad, 2019).

### 1.1.10 Voltametría cíclica

La Voltametría es una técnica electroanalítica que implica variar el potencial y medir la corriente resultante. Una forma común de detección es la voltametría cíclica (VC), utilizada para estudiar potenciales redox y para investigar los mecanismos de reacción en soluciones con analitos electroactivos. En la VC, se escanea el voltaje desde un valor inicial ( $V_1$ ) hasta un valor final predeterminado ( $V_2$ ) antes de regresar a su valor inicial. La velocidad de barrido  $(V_2 - V_1) / (t_2 - t_1)$  es un parámetro crítico, ya que afecta los resultados (Ronkainen, et al., 2010; Rezaei & Irannejad, 2019).

Durante la VC, el potencial del electrodo de trabajo se controla mediante el electrodo de referencia, mientras se registra la corriente entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. Los voltamogramas se

obtienen trazando la corriente en función del voltaje. La corriente aumenta hacia el potencial de reducción electroquímica del analito y disminuye hacia  $V_2$ , indicando una disminución en la concentración del analito cerca del electrodo debido a un potencial de oxidación excesivo. El perfil del voltamograma depende de la velocidad de barrido y de la concentración del catalizador, entre otros factores. Por ejemplo, la corriente aumenta con la concentración de una enzima específica a una velocidad de barrido particular (Ronkainen, et al., 2010; Rezaei & Irannejad, 2019).

### 1.1.11 Amperometría

La amperometría es una técnica electroquímica que se utiliza para medir la corriente eléctrica producida por la oxidación o reducción de sustancias en un electrodo. En un biosensor amperométrico, se mide la corriente eléctrica generada por una reacción específica entre una enzima y su sustrato (Salazar et al., 2011; Rezaei, & Irannejad, 2019).

Para llevar a cabo la medición, se aplica un potencial eléctrico constante entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. A medida que la enzima reacciona con su sustrato, se produce una corriente eléctrica proporcional a la concentración del sustrato en la muestra. Esta corriente se registra como una medida de la concentración del analito en la muestra (Salazar et al., 2011; Rezaei & Irannejad, 2019).

Los biosensores amperométricos son altamente selectivos porque la corriente eléctrica generada es única para cada analito, lo que permite una detección precisa y específica. Esta técnica es ampliamente utilizada en diversas aplicaciones, de monitorización de procesos bioquímicos en tiempo real (Salazar et al., 2011; Rezaei & Irannejad, 2019).

## 1.2 Justificación

La detección precisa y confiable de lactato en solución es de gran importancia en muchas áreas, como en el monitoreo del estado de salud, rendimiento físico, y monitoreo en procesos industriales. Una opción para la medición de lactato son los biosensores electroquímicos que utilizan LOx como elemento de reconocimiento molecular. Entre los biosensores electroquímicos basados en LOx, los de primera generación limitan la especificidad del biosensor, mientras que los de segunda generación se ven limitados en algunas aplicaciones por la difusión de los mediadores que pueden ser tóxicos. Estas problemáticas se

pueden resolver mediante varios sistemas entre los más destacados están el desarrollo de un biosensor de tercera generación que permita la DET. Otra alternativa prometedora para mejorar las capacidades de los biosensores de segunda generación es la introducción de modificaciones genética en las enzimas. Al realizar modificaciones genéticas en los componentes del biosensor, se pueden lograr mejoras significativas en su rendimiento y selectividad, optimizando su desempeño en diferentes aplicaciones.

En este trabajo se propone obtener y evaluar biosensores basados en las tres mutantes de LOx R181A, R181V y R181I, las cuales fueron modificadas para permitir la formación de núcleos de platino en el sitio activo capaces de funcionar como nanocables en la transferencia de electrones. Adicionalmente, estas mismas mutantes presentan potencial para el desarrollo de biosensores de segunda generación con un mejor rango de detección lineal.

Es importante seguir trabajando en el desarrollo y optimización de biosensores basados en modificaciones genéticas en los residuos, además de los nanocúmulos de platino y estructuras mesoporosas de carbono, ya que tienen el potencial de superar las limitaciones de los métodos tradicionales de detección de lactato, ofreciendo ventajas como alta sensibilidad, selectividad y estabilidad. Además, la tecnología de biosensores es altamente versátil, permitiendo su adaptación a diferentes aplicaciones y su integración en sistemas de análisis en tiempo real.

### **1.3 Hipótesis**

Las mutantes del residuo R181 de la LOx de *Aerococcus viridans* exhibirán un intervalo de detección lineal ampliado en biosensores de segunda generación y demostrarán capacidad para la DET en biosensores de L-lactato en comparación con la enzima silvestre.

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo general**

Evaluar las aplicaciones de las mutantes de R181 de LOxAv para incrementar el intervalo de detección de L-lactato y realizar transferencia directa de electrones en biosensores amperométricos de L-lactato.

### 1.4.2 Objetivos específicos

1. Purificar la enzima silvestre y las mutantes de AvLOx.
2. Evaluar la capacidad de la enzima en solución para la producción de núcleos de platino metálico.
3. Ensamblar electrodos enzimáticos fijados con quitosano y mediadores inorgánicos en condiciones aeróbicas para evaluar la transferencia de electrones.
4. Ensamblar electrodos enzimáticos con nanocúmulos de platino en condiciones anaeróbicas para evaluar transferencia directa de electrones.
5. Caracterizar los electrodos enzimáticos con mediadores, en condiciones aeróbicas, para evaluar su aplicación en la detección de concentraciones de L-lactato.
6. Caracterizar los electrodos enzimáticos con nanocables de platino en la detección de diferentes concentraciones de L-lactato.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Producción de las mutantes

El proceso de producción de las mutantes de AvLOx se llevó a cabo en células de *Escherichia coli* (*E coli*) BL21 (DE3) transformadas con la construcción AvLOx-Pet-28(+) o las construcciones que llevan las mutantes siguiendo el protocolo descrito a continuación.

La inoculación de las células transformadas con AvLOx-Pet-28(+) en 80 mL de caldo Lauria Bertani (LB) suplementado con kanamicina a una concentración de 35 µg/mL el cual se incubó a 37 °C con agitación constante a 200 rpm durante 16 h.

Una vez pasadas las 16 h se transfirió el cultivo a 1 litro de medio líquido LB suplementado con kanamicina 35 µg/mL y se incubó a 37 °C con agitación constante a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm (OD600). Se indujo la producción de la proteína mediante la adición de IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 200 µM. Posteriormente se incubó a una temperatura de 20 °C durante 20 h.

Consecutivamente se recolectaron las células, al cabo de 20 h, centrifugando el cultivo celular a 7000 rpm durante 30 minutos para recolectarlas. Las pastillas celulares obtenidas se almacenaron a -80 °C para su uso posterior en la purificación de la proteína.

Para verificar la producción de las proteínas de tipo silvestre o mutantes, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, lo que permitió visualizar la presencia de la proteína en el cultivo celular.

### 2.2 Purificación por cromatografía de afinidad a níquel

La purificación de la fracción soluble se realizó por cromatografía de afinidad a níquel en una columna His-Trap (Cytiva). La pastilla celular se suspendió con un buffer de unión (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 2mM β-mercaptoetanol, 10 mM imidazol), para la lisis celular se añadió 1mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y 0.1 mg/mL lisozima y se incubó a 37 °C por 30 minutos.



Posteriormente, se sónico durante 25 minutos efectivos a 40% con pulsos constantes de 10 s activos y 5 s de relajación. La solución se centrifugó a 7000 rpm durante 1 h a 8 °C y el sobrenadante se filtró usando una membrana con corte de 0.46  $\mu\text{m}$ , posteriormente se cargó en la columna de níquel equilibrada con 10 volúmenes de columna del buffer de unión. Se utilizó una bomba peristáltica a un flujo de 2 mL/min y se realizó un lavado de la columna con 50 mL de buffer de unión.

Subsiguientemente, la enzima se eluyó en 3 pasos de 10 mL cada uno con la misma solución buffer suplementada con imidazol a 100, 300 y 500 mM, respectivamente. Finalmente, las fracciones que se obtuvieron se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12 %.

### **2.3 Diálisis**

Para eliminar el imidazol utilizado para la elución de la enzima, las fracciones de mayor pureza se mezclaron y se dializaron contra una solución buffer de 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.0, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 2mM  $\beta$ -mercaptoetanol por 16 h a 4 °C. Posteriormente, la solución de la enzima se filtró en un tubo de celulosa concentrador amicon ultra con corte de 30 kDa, centrifugando a 3500 rpm a 8 °C por 5 minutos.

### **2.4 Electrodo de trabajo**

Para la elaboración de electrodos de trabajo de segunda y tercera generación, se utilizó papel de carbono con un área electroactiva de 25 mm<sup>2</sup>. Posteriormente, cada electrodo fue recubierto con una capa de parafina en su superficie externa para preservar el área electroactiva del dispositivo.

### **2.5 Inmovilización en electrodos de segunda generación**

Para la preparación del electrodo de segunda generación, se preparó una solución de mediador Azul de Prusia (AP) a una concentración de 2.5 mg/mL. Esta solución fue sometida a ultrasonido durante 5 minutos para asegurar una mezcla homogénea antes de aplicarla sobre el electrodo de papel de carbono.

Posteriormente, se preparó la matriz de inmovilización en proporción 1:3 de quitosano y enzima. La

enzima silvestre se utilizó a una concentración de 3.5 mg/mL, mientras que las mutantes se emplearon a una concentración de 10 mg/mL.

Antes de agregar la enzima, el quitosano sometido a ultrasonido durante 30 minutos para garantizar su óptima actividad. Se colocaron 10  $\mu$ L de la mezcla sobre el electrodo y se dejó secar a temperatura ambiente.

## 2.6 Crecimiento de nanocúmulos de platino

Se utilizaron 3 mL de una solución purgada con nitrógeno ( $N_2$ ), de buffer 100mM HEPES (ácido 4- (2-hidroxiethyl) -1-piperazinetanosulfónico) pH 7.0, 10% glicerol, 100 mM NaCl que además contenía 0.5 mg/mL AvLOx (R181A, R181V, R181I, cada una por separado), hexacloroplatinato de potasio ( $K_2PtCl_6$ ) a 5 mM y L-lactato a 20 mM.

Posteriormente se agitó suavemente bajo atmósfera de  $N_2$  por 48 h para llevar a cabo la formación de los nanocúmulos de platino (Trifonov et al., 2019). Se utilizaron como controles las soluciones exactamente iguales en cada mutante con excepción de la adición de lactato.

Para la caracterización de los nanocúmulos de platino se utilizó la técnica de DLS, la cual es una técnica simple, rápida, no invasiva ni destructiva. Las suspensiones se midieron por DLS y se analizaron los tamaños de partícula obtenidas.

## 2.7 Inmovilización en electrodos de tercera generación

La inmovilización del electrodo de tercera generación se realizó en varias etapas. Primero, se activaron las propiedades electroquímicas del papel carbono (CP) sumergiendo el electrodo en una solución 0.1 M  $H_2SO_4$  y se realizó un escaneo durante 3 ciclos desde -0.1 V hasta 1.5 V a una velocidad de escaneo de 100 mV/s, utilizando el método de voltamperometría cíclica (VC). Posteriormente, se limpió el electrodo con agua desionizada y se secó a temperatura ambiente.

Consecutivamente, se preparó una solución enzimática a 0.1 mg/mL de 0.1 M HEPES pH de 7.0 y utilizando los agentes de acoplamiento EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) y NHS (N-

hidroxisuccinimida,)), la solución se depositó en el electrodo y se dejó reaccionar durante 16 h a 16 °C.

Posteriormente, en condiciones libres de oxígeno, se depositó 5 mM  $K_2PtCl_6$  y 15mM lactato para llevar a cabo la nucleación durante 10 minutos, finalizando con el depósito de 0,4% Nafion.

## 2.8 Técnicas de detección electroquímicas

Para realizar las mediciones de VC y amperometría de los electrodos de segunda y tercera generación se realizó en varias etapas. Primero, se limpiaron los electrodos con agua MilliQ (MQ) con mayor atención en los electrodos de referencia y el contraelectrodo para eliminar cualquier contaminante o residuo. Posteriormente, se recubrió el cuerpo del electrodo con parafina como aislante, consecutivamente se montó la celda de tres electrodos compuesto por un electrodo de referencia de calomel de mercurio y un contraelectrodo de platino. Estos se llevaron a cabo en un potenciostato  $\mu$ stat400 marca Metrohm DropSens, el cual es operado mediante el programa Dropview.

Para ambos tipos de biosensores en la prueba de VC se realizaron 3 ciclos con velocidad de barrido de 100 mV/s, los electrodos de trabajo de papel carbón, en una celda que contenía buffer 0.2M  $Na_2PO_4$  y 0.1M ácido cítrico ajustados a pH 7.0 y pH 5.0.

Para el biosensor de segunda generación se utilizó un potencial inicial -0.5 V y final de 0.5 V, mientras para el electrodo de tercera generación, que se mantuvo en una atmósfera libre de oxígeno a temperatura ambiente, se utilizó un potencial inicial de -0.6 V y final de 0.6 V.

Para la amperometría, en ambas generaciones se aplicó un potencial de 0.1 V/s al electrodo de trabajo y se registró la corriente durante 3000 s. Antes de iniciar la medición, se permitió un tiempo de equilibrio de 10 s para asegurar la estabilización de la corriente. Durante la medición, se registró la corriente en intervalos de 0.5 s.

## 2.9 Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés), se define como la pendiente de la curva de calibración obtenida a partir de la

respuesta del instrumento en función de la concentración del analito. En esta investigación, usamos amperogramas para medir esta respuesta y calcular la sensibilidad. Esta pendiente indica cómo varía la señal del método en respuesta a cambios en la concentración del analito, la cual se calcula a partir de la siguiente ecuación. Aunque la sensibilidad proporciona una medida clara y directa, se recomienda complementar el análisis calculando el límite de detección (LOD) (Rezaei & Irannejad, 2019).

$$P = \frac{\Delta C}{\Delta S} \quad (1)$$

Donde la P es la Pendiente,  $\Delta C$  es el cambio de la corriente y  $\Delta S$  es el cambio en la concentración del sustrato.

## 2.10 Límite de detección

El límite de detección (LOD por sus siglas en inglés), es un método analítico que representa la cantidad mínima de una sustancia que puede ser detectada, aunque no necesariamente cuantificada con precisión, bajo las condiciones experimentales específicas del método analítico. Este concepto es fundamental en química analítica y otras ciencias, ya que determina la capacidad del método para identificar la presencia de trazas de un analito en una muestra. Se calcula utilizando la siguiente fórmula (Romero et al., 2019).

$$\text{LOD} = \frac{3(\text{SD})}{m} \quad (2)$$

Donde LOD es el Límite de detección, SD es la desviación estándar del blanco y m es la pendiente.

## 2.11 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ por sus siglas en inglés), es un método analítico que simboliza la cantidad más baja de una sustancia que puede ser cuantificada con precisión bajo las condiciones específicas del método. Se calcula utilizando la siguiente fórmula (Romero et al., 2019).

$$\text{LOQ} = \frac{10(\text{SD})}{m} \quad (3)$$

Donde LOD es el Límite de detección, SD es la desviación estándar del blanco y m es la pendiente.

## 2.12 Regresión no lineal modelo Michaelis-Menten

La regresión no lineal del modelo Michaelis-Menten, es una técnica utilizada para describir la cinética enzimática típica, asociada a la velocidad de una reacción enzimática en función de la concentración de sustrato. Representa la correlación entre el incremento de corriente y la concentración de L-lactato introducido en el sistema.

$$J = \frac{J_{\max}[\text{S}]}{[\text{S}] + K_m} \quad (4)$$

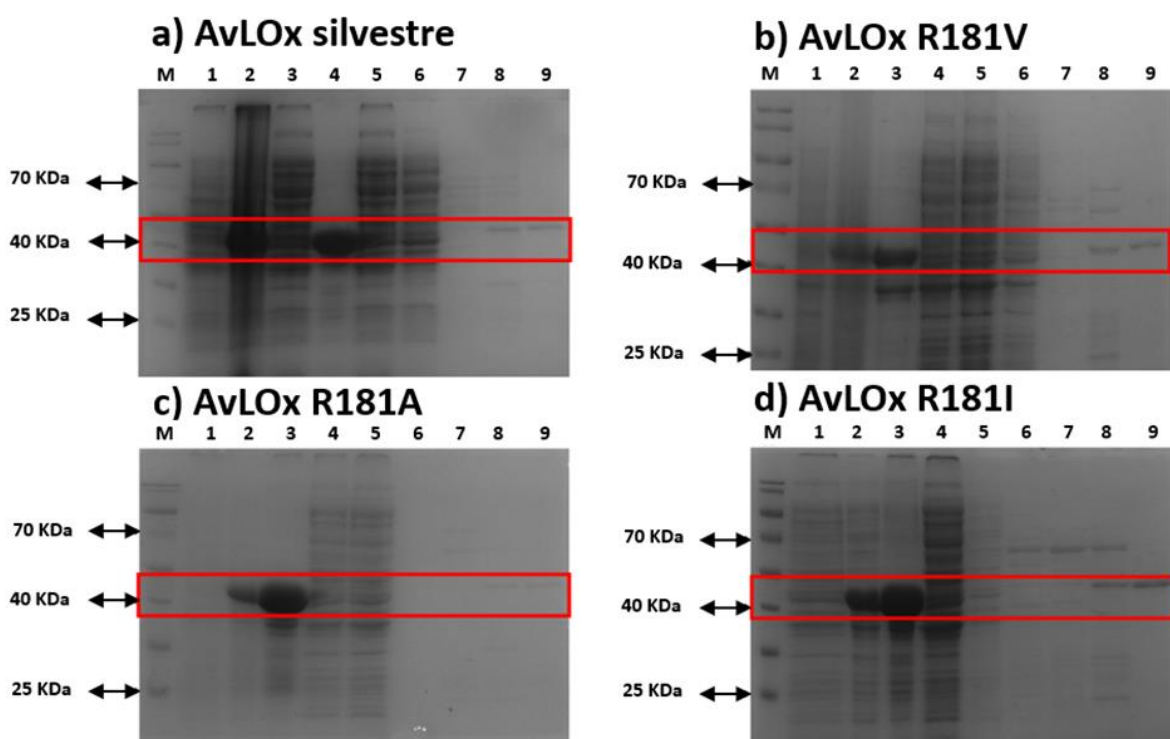
Donde  $J$  es la densidad de corriente,  $k_m$  es la constante de Michaelis-Menten aparente que cuantifica la afinidad enzimática por el sustrato,  $J_{\max}$  es la densidad de corriente máxima y S es el sustrato (Janata, 2009; Reshetilov et al., 2013).

La determinación de la  $J_{\max}$  y  $K_m$  puede ayudar a optimizar el diseño y las condiciones de funcionamiento del biosensor. Por ejemplo, puede guiar la selección de la enzima adecuada, la modificación de las condiciones de pH o temperatura, y la elección de los sustratos y cofactores adecuados para mejorar la sensibilidad y el rango de detección del biosensor (Janata, 2009; Reshetilov et al., 2013).

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Purificación por cromatografía de afinidad a níquel

La Figura 8 muestra los resultados de la purificación de una enzima AvLOx silvestre y tres mutantes AvLOxR181(V, A, I), incluyendo la comparación de los pesos moleculares obtenidos con los reportados para el lactato oxidasa (41 kDa). También se evalúa visualmente la pureza de las muestras, indicando la eficiencia de la purificación y la necesidad de pasos adicionales.



**Figura 8.** Cromatogramas de la purificación de AvLOx silvestre y tres mutantes. a) AvLOx silvestre, con el peso molecular marcado en rojo a 41 kDa. b) AvLOx de la mutante R181V, con el peso molecular marcado en rojo a 41 kDa. c) AvLOx de la mutante R181A, con el peso molecular marcado en rojo a 41 kDa. y d) AvLOx de la mutante R181I, con el peso molecular marcado en rojo a 41 kDa.

Los resultados de la purificación de la enzima silvestre y sus mutantes R181V, A, I muestran que los pesos moleculares obtenidos coinciden con los reportados. Además, es importante destacar que, en este caso, la fracción obtenida con una concentración de 500 mM de imidazol mostró una alta pureza, con pocas proteínas contaminantes visibles, lo que sugiere que la purificación fue efectiva, eliminando la necesidad

de realizar pasos de purificación adicionales después de la cromatografía de afinidad de níquel. Posteriormente, esta enzima purificada se utilizó en obtención de biosensores enzimáticos de segunda generación AvLOx.

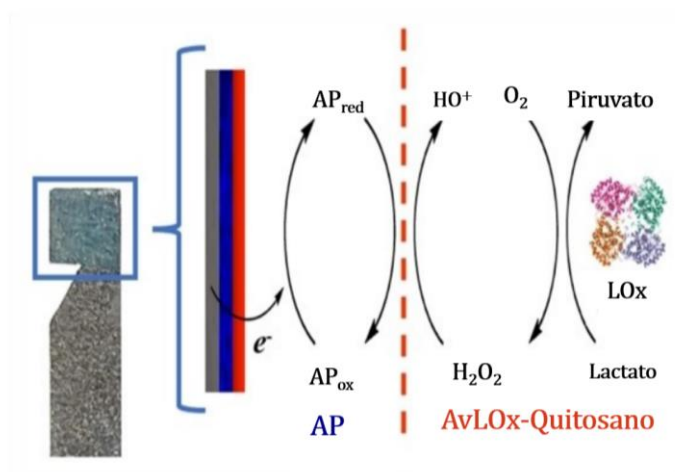
## 3.2 Técnicas de detección electroquímicas

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de los experimentos de VC y amperometría. Estos análisis electroquímicos evaluaron la respuesta de electrodos de segunda generación, tanto modificados como no modificados con el mediador AP, a diferentes valores de pH (5.0 y 7.0). Además, se analizó la respuesta del electrodo de tercera generación de la mutante R181V comparado con el electrodo de la enzima silvestre.

## 3.3 Biosensores de segunda generación

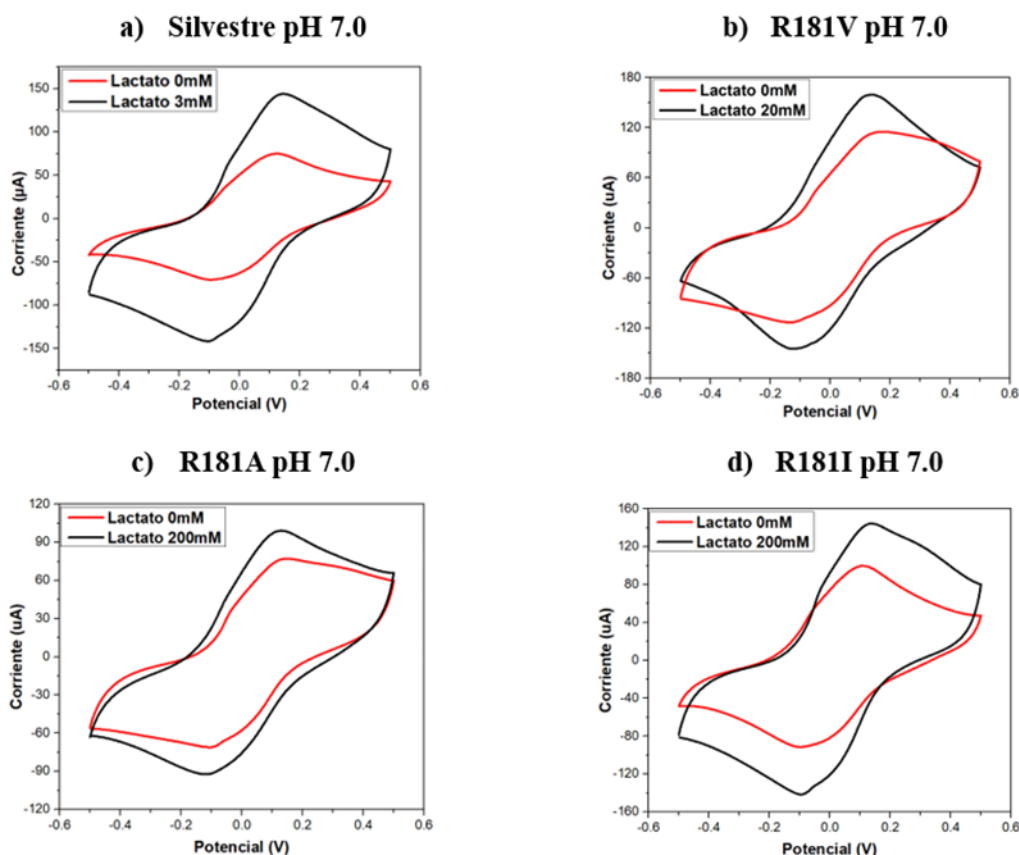
### 3.3.1 Voltametría cíclica de biosensores de 2ª generación a pH 7.0

Los voltamogramas cíclicos son cruciales en el análisis, ya que nos permiten obtener información cuantitativa y cualitativa sobre la respuesta del sistema a diferentes potenciales y proporcionan conocimientos detallados sobre la reversibilidad, estabilidad y cinética de las reacciones (Figura 9).



**Figura 9.** Mecanismo de transferencia de electrones mediado por AP en receptor biológico basados en AvLOx para la detección de L-lactato, imagen modificada (García et al, 2023).

Los resultados que se obtuvieron de la enzima silvestre y mutantes a diferentes pH se visualizan en las Figuras 10 y 11. En la Figura 10 se presentan los resultados obtenidos de los electrodos enzimáticos de segunda generación AvLOx, a pH 7.0. En todos los casos presentados, en ausencia de lactato, En todos los casos presentados, la línea roja indica que en ausencia de lactato no se observa una respuesta redox, mientras que la línea negra representa la reacción con lactato. En ambos procesos se aprecia que se trata de una reacción cuasireversible.



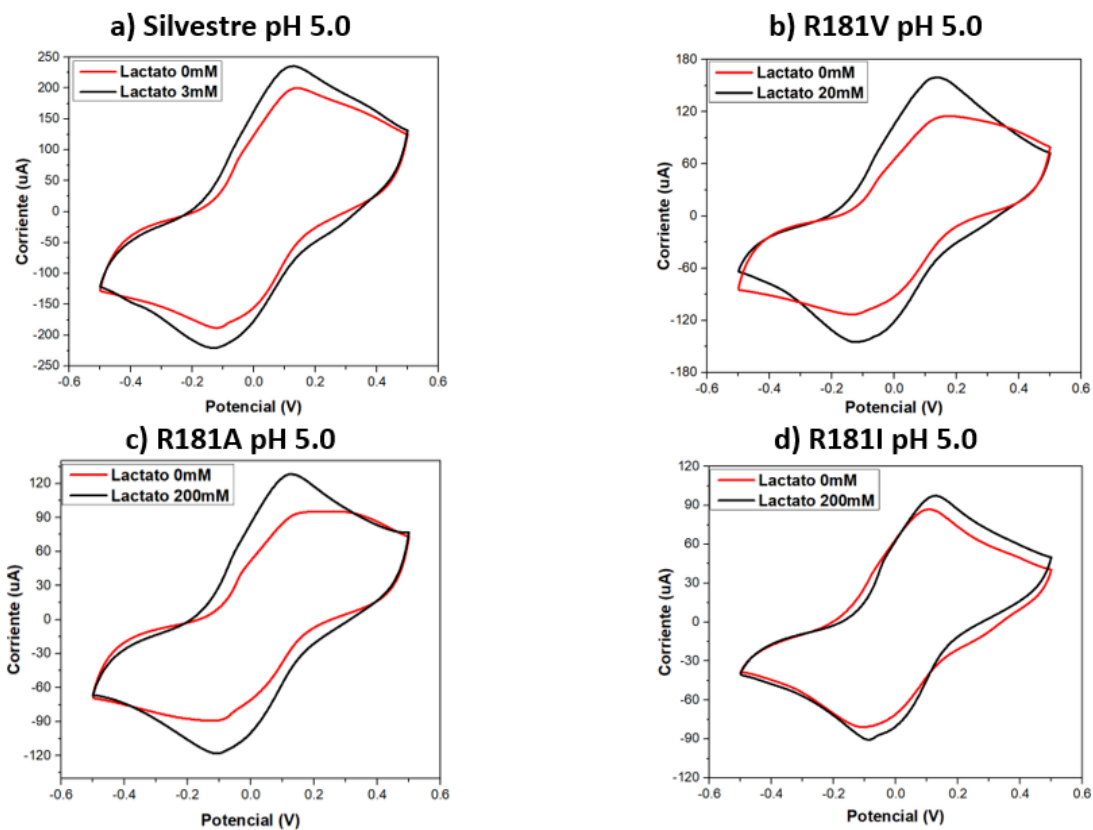
**Figura 10.** Voltagramas cíclicos de electrodos enzimáticos con mediador AP a pH 7.0, a) Electrodo con la enzima silvestre a concentraciones de 0 y 3 mM. b) Electrodo con enzima R181V a concentraciones entre 0 y 20 mM. c) Electrodo con enzima R181A a concentraciones de 0 y 200 mM. d) Electrodo con enzima R181I a concentraciones entre 0 a 200 mM.

En la Figura 10a se muestran la reacción de la enzima silvestre a 3 mM de lactato, los cuales se encuentran entre 150 y -150 µA. Además, en la Figura 10b se utilizó la enzima R181V, observándose una respuesta de 120 a -120 µA con 20 mM de lactato. Asimismo, en el voltamograma de la Figura 10c se utilizó la enzima R181A, observándose una respuesta de 100 a -100 µA con 200 mM de lactato. Por último, en el voltamograma de la Figura 10d se utilizó la enzima R181I, observándose una respuesta de 150 a -150 µA con 200 mM de lactato.



### 3.3.2 Voltametría cíclica de biosensores de 2ª generación a pH 5.0

En la Figura 11 se presentan los resultados de la VC obtenidos de los electrodos enzimáticos de segunda generación AvLOx, a pH 5.0. En todos los casos, la línea roja representa la ausencia de lactato, mientras que la línea negra es la reacción con lactato, también se aprecia que se trata de una reacción cuasireversible.

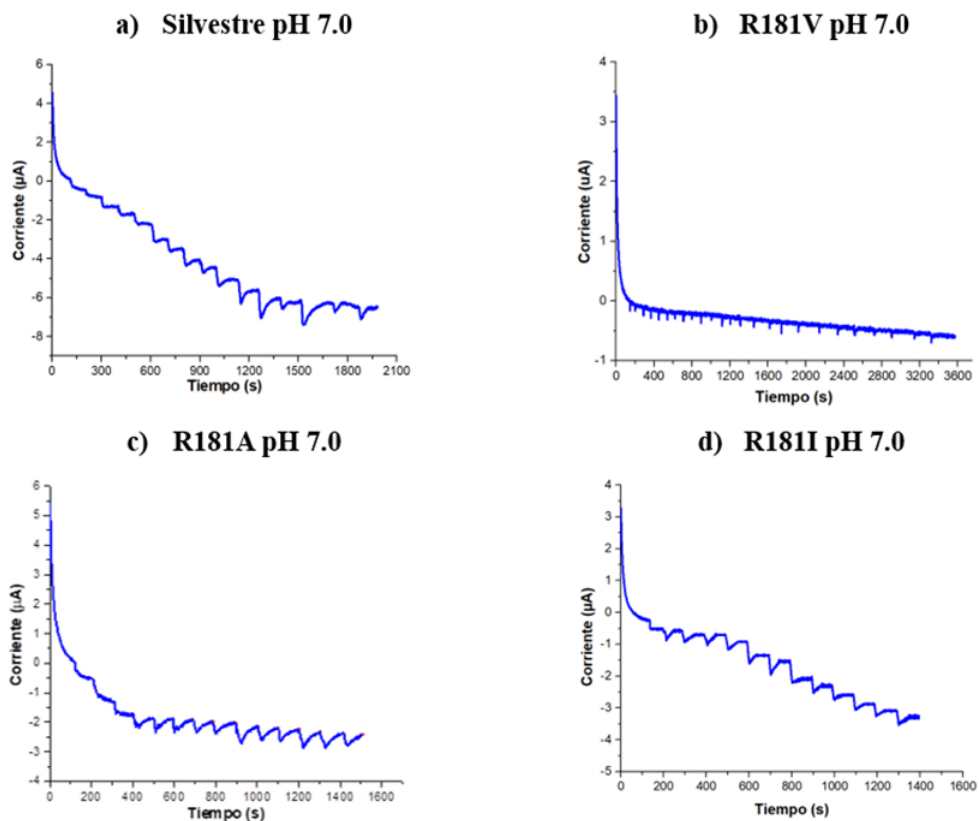


**Figura 11.** Voltagramas cíclicos de electrodos enzimáticos con mediador AP a pH 5.0, a) Electrodo con la enzima silvestre a concentraciones de 0 y 3 mM. b) Electrodo con la enzima R181V a concentraciones de 0 y 20 mM. c) Electrodo con la enzima R181A a concentraciones entre 0 y 200 mM. d) Electrodo con la enzima R181I a concentraciones de 0 y 200 mM.

En la Figura 11a se muestran los potenciales picos anódicos y catódicos de la reacción a 3 mM de lactato para la enzima silvestre, los cuales se encuentran entre 225 y -225  $\mu\text{A}$ . Además, en la Figura 11b se utilizó la enzima R181V, observándose una respuesta de 160 a -160  $\mu\text{A}$  con 20 mM de lactato. Asimismo, en la Figura 11c se utilizó la enzima R181A, observándose una respuesta de 120 a -120  $\mu\text{A}$  con 200 mM de lactato. Por otro lado, en el VC de la Figura 11d se utilizó la enzima R181I, observándose una respuesta de 90 a -90  $\mu\text{A}$  con 200 mM de lactato, observándose que la enzima se inhibió, posiblemente debido al pH 5.0.

### 3.3.3 Amperometría de biosensores de 2ª generación a pH 7.0

Los amperogramas registraron la corriente eléctrica generada por las reacciones electroquímicas catalizadas por las enzimas mutantes o la silvestre, frente a diferentes concentraciones de lactato. En las Figuras 12 y 13 se presentan los resultados para comprender el comportamiento de los biosensores en cada condición estudiada.



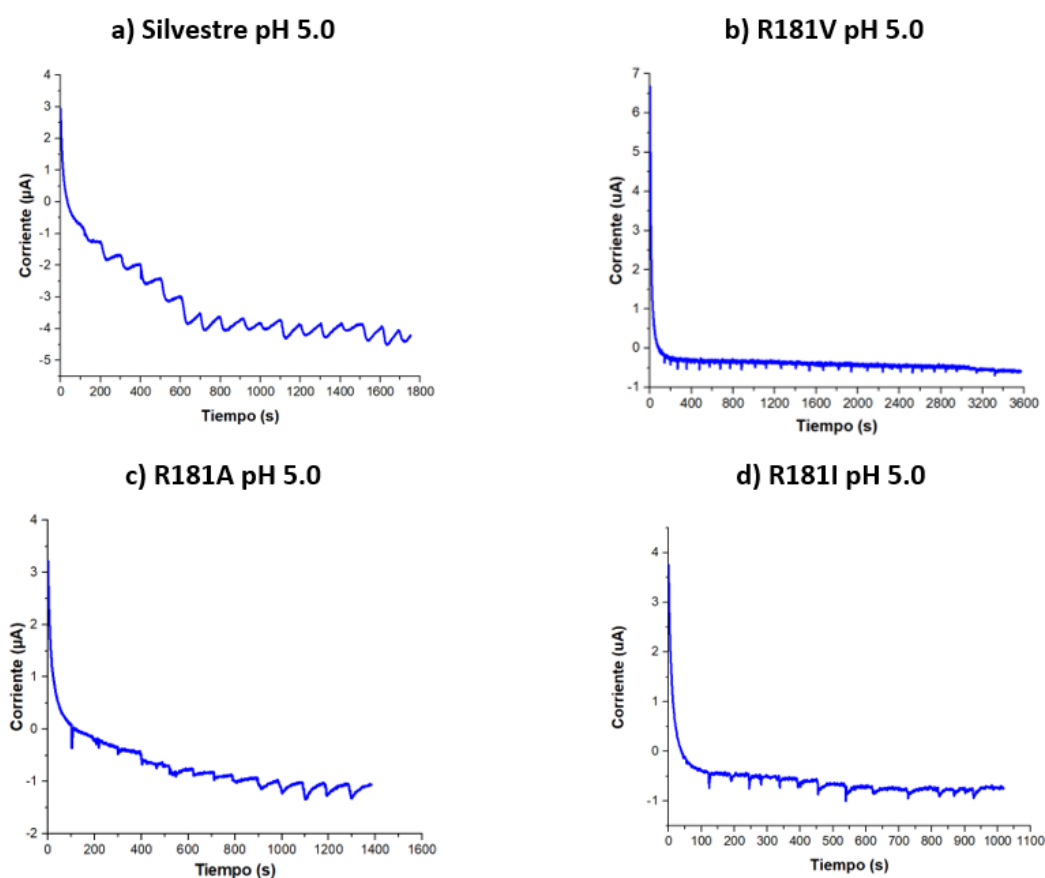
**Figura 12.** Amperogramas de electrodos enzimáticos con mediador AP a pH 7.0. a) Electrodo con silvestre con concentraciones entre 0 a 3 mM. b) Electrodo con enzima R181V con concentraciones entre 0 a 200 mM. c) Electrodo con enzima R181A con concentraciones entre 0 a 200 mM.

En la Figura 12 se observan los cronoamperogramas de los biosensores de segunda generación a pH 7.0, donde en cada caso se añadió lactato de manera continua, presentando cambios en la corriente mostrando retornos continuos simétricos. En la Figura 12a se presenta el amperograma del biosensor con la enzima silvestre, este mostró una corriente de  $-6.1608 \mu\text{A}$  para una concentración de 0.8 mM. Además, en la Figura 12b se utilizó la enzima R181V, no se observó incremento en la corriente registrada, lo que podría deberse a una inactivación de la enzima. Para la Figura 12c se muestra la enzima modificada R181A, obteniéndose una corriente de  $-2.2493 \mu\text{A}$  utilizando una concentración de 120 mM de lactato.

Finalmente, en la Figura 12d, se observó la enzima modificada R181I, presentando un pico máximo de -3.4353  $\mu\text{A}$  utilizando una concentración de 120 mM de lactato.

### 3.3.4 Amperometría de biosensores de 2ª generación a pH 5.0

En la Figura 13 se observan los cronoamperogramas de los biosensores de segunda generación evaluados a pH 5.0, con resultados similares a los presentados a pH 7.0 en la Figura 12, con un retorno continuo representativo del suministro constante de lactato.



**Figura 13.** Amperograma de electrodos enzimáticos con mediador AP a pH 5. a) Electrodo con enzima silvestre con concentraciones entre 0 a 3 mM. b) Electrodo con enzima R181V con concentraciones entre 0 a 20 mM. c) Electrodo con enzima R181A con concentraciones entre 0 a 200 mM. d) Electrodo con enzima R181I con concentraciones entre 0 a 200 mM.

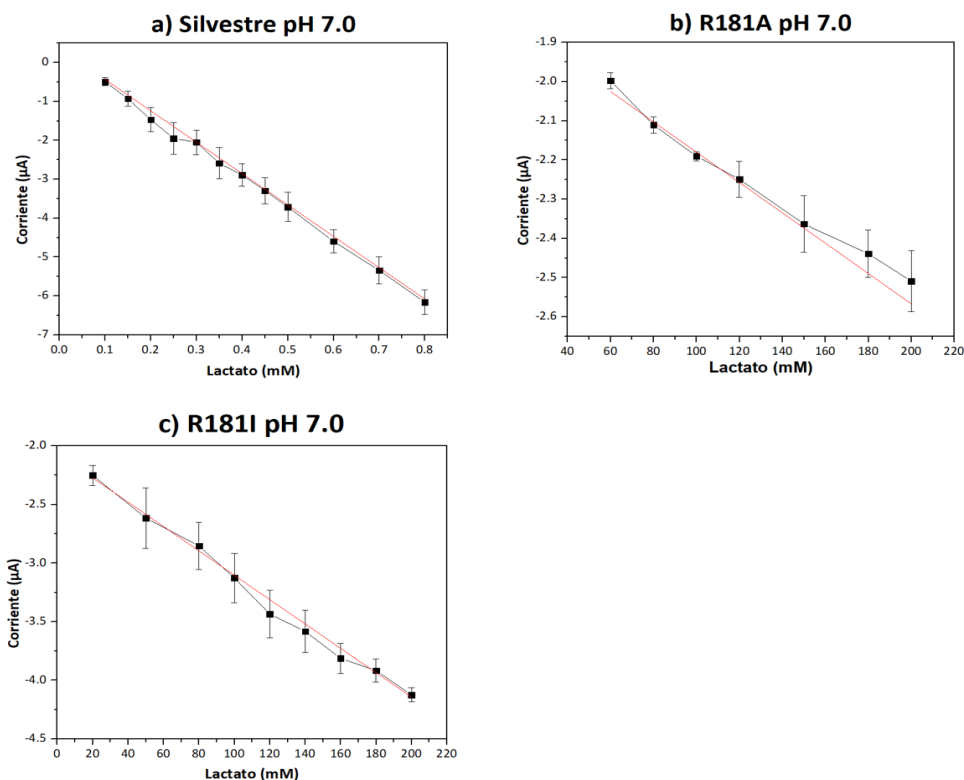
En la Figura 13a, la enzima silvestre presentó una corriente de -2.5996  $\mu\text{A}$ , a una concentración de 0.8 mM de lactato. Por otro lado, en la Figura 13b, se utilizó la enzima R181V, donde no presento incremento de corriente, indicando una inactivación de la enzima. Además, en la Figura 13c se recopilaron los resultados

de la enzima modificada R181A, donde se obtuvo una corriente de  $-1.0659 \mu\text{A}$  utilizando una concentración de 120 mM de lactato. Finalmente, en la Figura 13d, se observó la enzima modificada R181I, la cual no presentó un incremento de corriente, indicando una inactivación de la enzima.

### 3.3.5 Estudio de la respuesta lineal del biosensor enzimático

La regresión lineal o linealidad es un aspecto crucial en la caracterización de biosensores enzimáticos, ya que garantiza la precisión y confiabilidad de las mediciones. Proporciona información importante sobre la relación entre la señal de salida del biosensor y la concentración del analito que se está midiendo. Esto es fundamental para aplicaciones prácticas donde es necesario medir con precisión concentraciones desconocidas de un analito. Además, los datos obtenidos durante el análisis de regresión lineal incluyen la pendiente de la curva de calibración, el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y el rango lineal de la concentración.

#### 3.3.5.1 Regresión lineal a pH 7.0



**Figura 14.** Análisis de regresión lineal a pH 7.0. a) Regresión lineal obtenida por la enzima en su forma silvestre, b) Regresión lineal de la enzima R181A. c) Regresión lineal de la enzima R181I.

Los datos de linealidad como el LOD, y el LOQ, son críticos para determinar la sensibilidad y la capacidad de detección del biosensor en aplicaciones prácticas. Un LOD y LOQ bajos son indicativos de un biosensor altamente sensible y capaz de detectar concentraciones muy bajas del analito de interés, también va de la mano el hecho de tener una alta sensibilidad o pendiente (García et al., 2023).

**Tabla 2.** Parámetros analíticos de la detección de lactato a pH 7.0.

	<b>Silvestres</b>	<b>R181V</b>	<b>R181A</b>	<b>R181I</b>
<b>Rango lineal (mM)</b>	0-3	0.1-20	1-200	1-200
<b>Sensibilidad (<math>\mu\text{A}/\text{mMcm}^2</math>)</b>	34.3597	ND	0.0509	0.0422
<b>LOD (mM)</b>	0.0542	ND	4.6954	4.8579
<b>LOQ (mM)</b>	0.1807	ND	15.6515	16.1932
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9931	ND	0.9764	0.9925

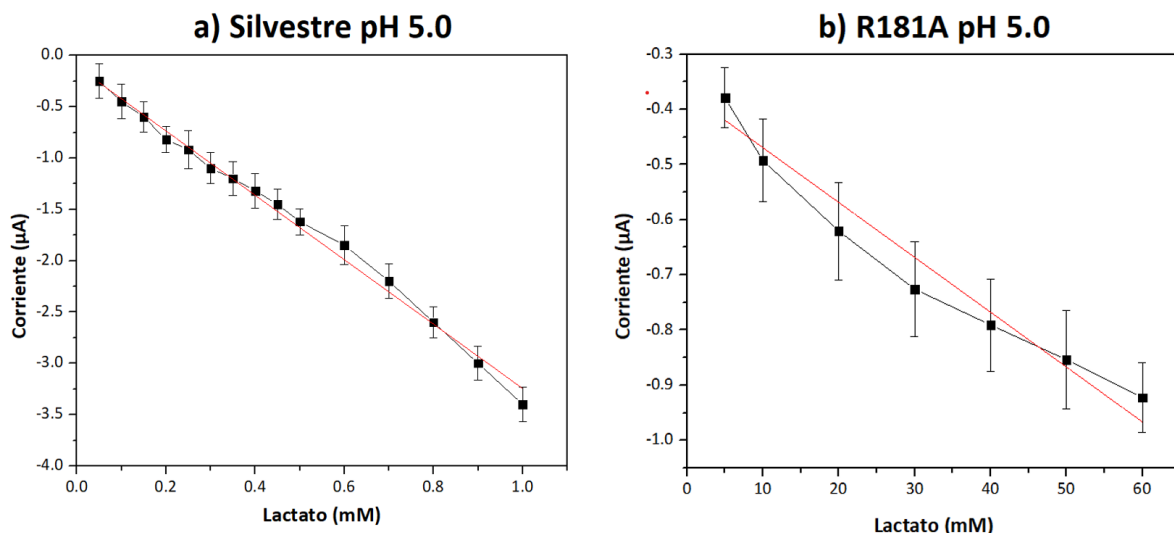
En la Figura 14 se observan las regresiones lineales de los biosensores realizados con las enzimas silvestre R181A y R181I. En la Tabla 2 se observan los datos derivados de la regresión lineal. Para el caso de la enzima silvestre, se encontró que el rango lineal es de 0 a 3 mM, además de una LOD de 0.0542, una LOQ de 0.1807 mM y una sensibilidad por área del electrodo es de  $34.3597 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ . En comparación, las mutantes R181A y R181I presentaron un rango lineal de 1 a 200 mM, con una LOD de 4.6954 y 4.8579 mM, respectivamente, y una LOQ de 15.6515 y 16.1932 mM. Sin embargo, mientras que para la enzima R181V no se tuvieron datos disponibles (ND).

### 3.3.5.2 Regresión lineal a pH 5.0

En la Figura 15 se observan las linealidades resultantes de los biosensores realizados con las enzimas silvestre y R181A. Debido a que no se obtuvieron resultados favorables con las enzimas R181 y R181V, no es posible realizar estos análisis.

En la Tabla 3, se observa la enzima silvestre, donde se encontró que el rango lineal es de 0 a 3 mM, con una sensibilidad  $12.544 \mu\text{A}/\text{mMcm}^2$  además de una LOD de 0.0353 y una LOQ de 0.1177 mM. En comparación, la mutante R181A presenta un rango lineal de 1 a 200 mM, con una LOD de 7.8895 y una LOQ de 26.2983 mM. Estos resultados indican que la mutante R181A es la única que retiene la capacidad

de procesar el lactato a pH 5.0, siendo la forma más estable entre las mutantes. Sin embargo, mientras que para la enzima R181V y R181I no se tuvieron datos disponibles (ND).



**Figura 15.** Análisis de regresión lineal a pH 5.0. a) Regresión lineal de la enzima AvLOx en su forma silvestre. b) Regresión lineal de la enzima R181A.

**Tabla 3.** Parámetros analíticos de la detección de lactato a pH 5.0

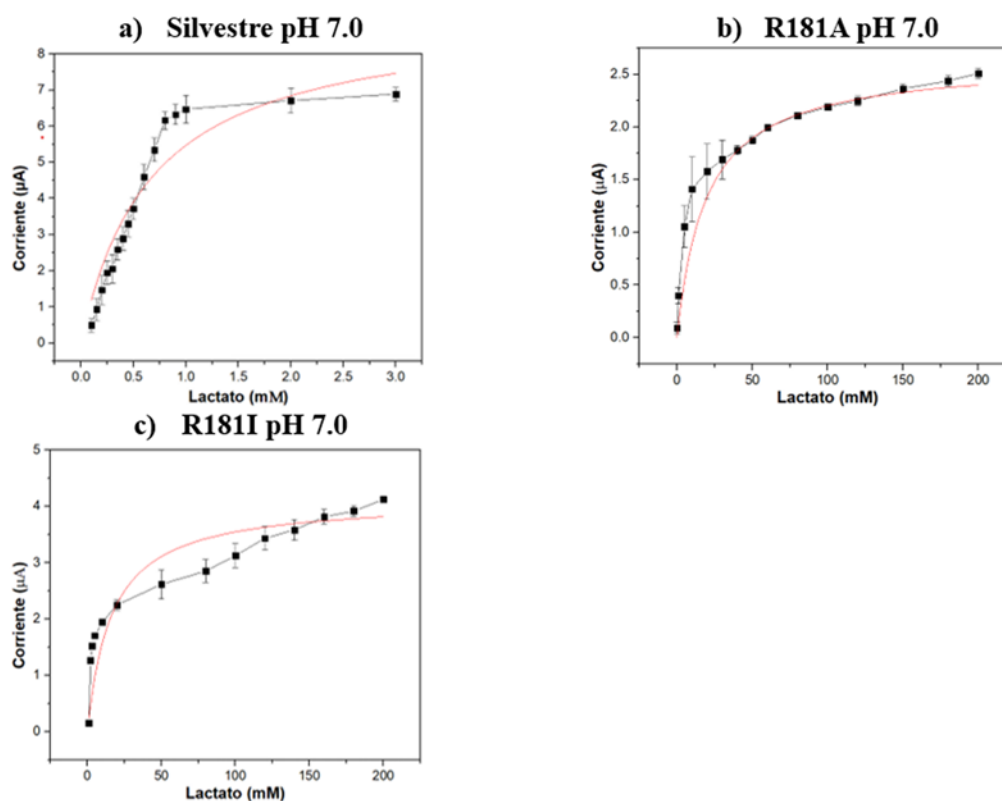
	<b>Silvestre</b>	<b>R181V</b>	<b>R181A</b>	<b>R181I</b>
<b>Rango lineal (mM)</b>	0-3	0.1-20	1-200	1-200
<b>Sensibilidad (<math>\mu\text{A}/\text{mMcm}^2</math>)</b>	12.544	ND	0.0434	ND
<b>LOD (mM)</b>	0.0353	ND	7.8895	ND
<b>LOQ (mM)</b>	0.1177	ND	26.2983	ND
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9929	ND	0.9528	ND

### 3.3.6 Regresión no lineal modelo Michaelis-Menten

Las Figuras 16 y 17 presentan la regresión no lineal del modelo Michaelis-Menten, que muestra la correlación entre el incremento de corriente y la concentración de L-lactato. Estos datos permiten evaluar la cinética enzimática de los electrodos preparados con las enzimas silvestres R181A, R181I y R181V, bajo condiciones de pH 7.0 y 5.0, respectivamente. (Janata, 2009; Reshetilov et al., 2013).

### 3.3.6.1 Michaelis Menten de biosensores de 2ª generación a pH 7.0

En la Figura 16 se observan la Michaelis Menten resultantes de los biosensores realizados con las enzimas silvestre, R181A y R181I. No se obtuvieron resultados favorables para la enzima R181V. Los resultados que se observan en la Tabla 4, indican que entre las mutantes la R181I tiene una  $J_{\max}$  mayor de  $4.3509 \mu\text{A}$  a  $2.4848 \mu\text{A}$ , además de una menor  $K_m$  de  $16.3132 \text{ mM}$  a  $19.3860 \text{ mM}$ , lo cual nos muestra que es la que se comporta de manera más eficiente con alta capacidad de reacción y baja afinidad por el sustrato. Para la R181V no se pudieron determinar los datos.



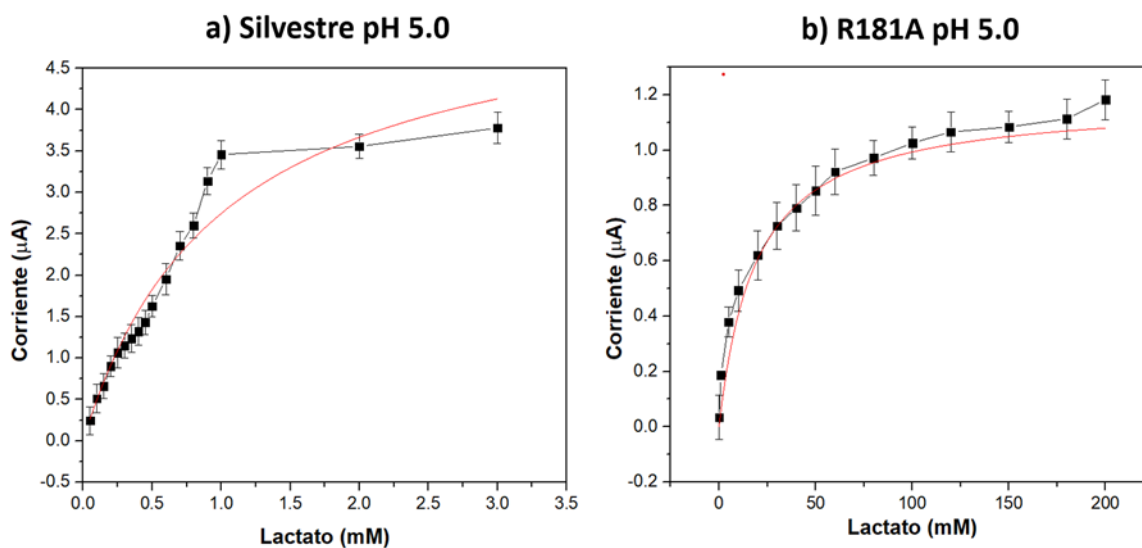
**Figura 16.** Ajuste al modelo de Michaelis-Menten de tres variantes en un biosensor amperométrico a pH 7.0 a) Michaelis-Menten obtenida por la enzima silvestre, b) Michaelis-Menten obtenida por la enzima R181A y c) Michaelis-Menten obtenida por la enzima R181I.

**Tabla 4.** Cinética enzimática aparente de los electrodos silvestre, R181A y R181I a pH 7.0

Enzima	$J_{\max}$ (nA/cm <sup>2</sup> )	$K_m$ (mM)	$V_{\max}$ (µA/s)
Silvestre	$9.3516 \pm (1.3715)$	$0.6698 \pm (0.1520)$	2.4303
R181A	$2.7046 \pm (0.1462)$	$19.3860 \pm (2.3953)$	2.6308
R181I	$4.3509 \pm (0.5049)$	$16.3132 \pm (1.5453)$	4.1240

### 3.3.6.2 Michaelis-Menten de biosensores de 2ª generación a pH 5.0

Los resultados que se observan en la Tabla 5, indican la única mutante que se analizó a pH 5.0, la mutante la R181A tiene una  $J_{max}$  menor que la silvestre de 1.0168  $\mu\text{A}$  a 2.4848  $\mu\text{A}$  además de una mayor  $K_m$  de 19.0577 mM a 1.0101 mM respecto a la silvestre, lo que indica una menor afinidad por el lactato en comparación con la silvestre. Esto sugiere que la mutante R181A requiere concentraciones más altas de lactato para alcanzar su velocidad máxima de reacción, pero este comportamiento se esperaba.



**Figura 17.** Ajuste de Michaelis-Menten de dos variantes en un biosensor amperométrico a pH 5.0. a) Michaelis-Menten obtenida por la enzima en su forma silvestre y b) Michaelis-Menten obtenida por la enzima R181A.

**Tabla 5.** Cinética enzimática aparente de los electrodos silvestre y R181A a pH 5.0.

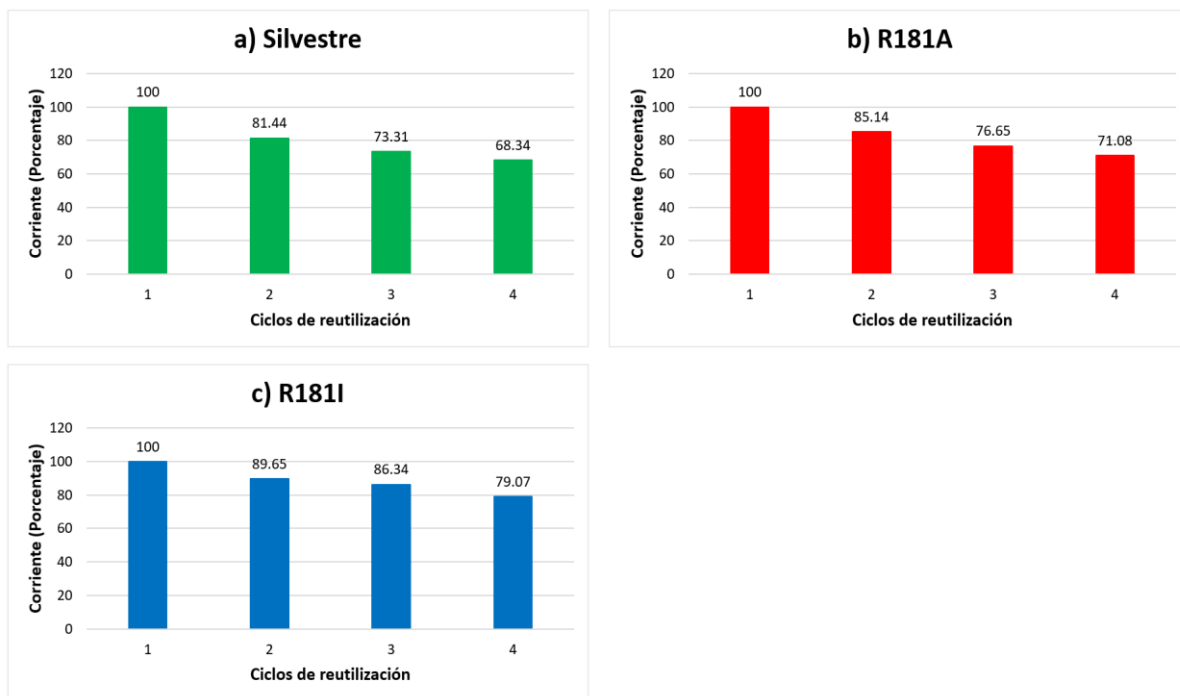
Enzima	$J_{max}$ (nA/cm <sup>2</sup> )	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (μA/s)
Silvestre	5.3926 ± (0.6394)	1.0101 ± (0.1819)	5.5195
R181A	1.2277 ± (0.0710)	19.0577 ± (1.5231)	1.1828

### 3.3.7 Reutilización en biosensores enzimáticos

La reutilización en el contexto de los biosensores enzimáticos se refiere a la capacidad de utilizar el mismo dispositivo para realizar múltiples mediciones en diferentes muestras o en el mismo analito a lo largo del tiempo. Esto implica que el biosensor pueda mantener su funcionalidad y sensibilidad después de cada uso. La capacidad de reutilización de un biosensor enzimático depende de varios factores, como la



estabilidad de la enzima, la robustez de la matriz del biosensor y las condiciones de operación y almacenamiento.



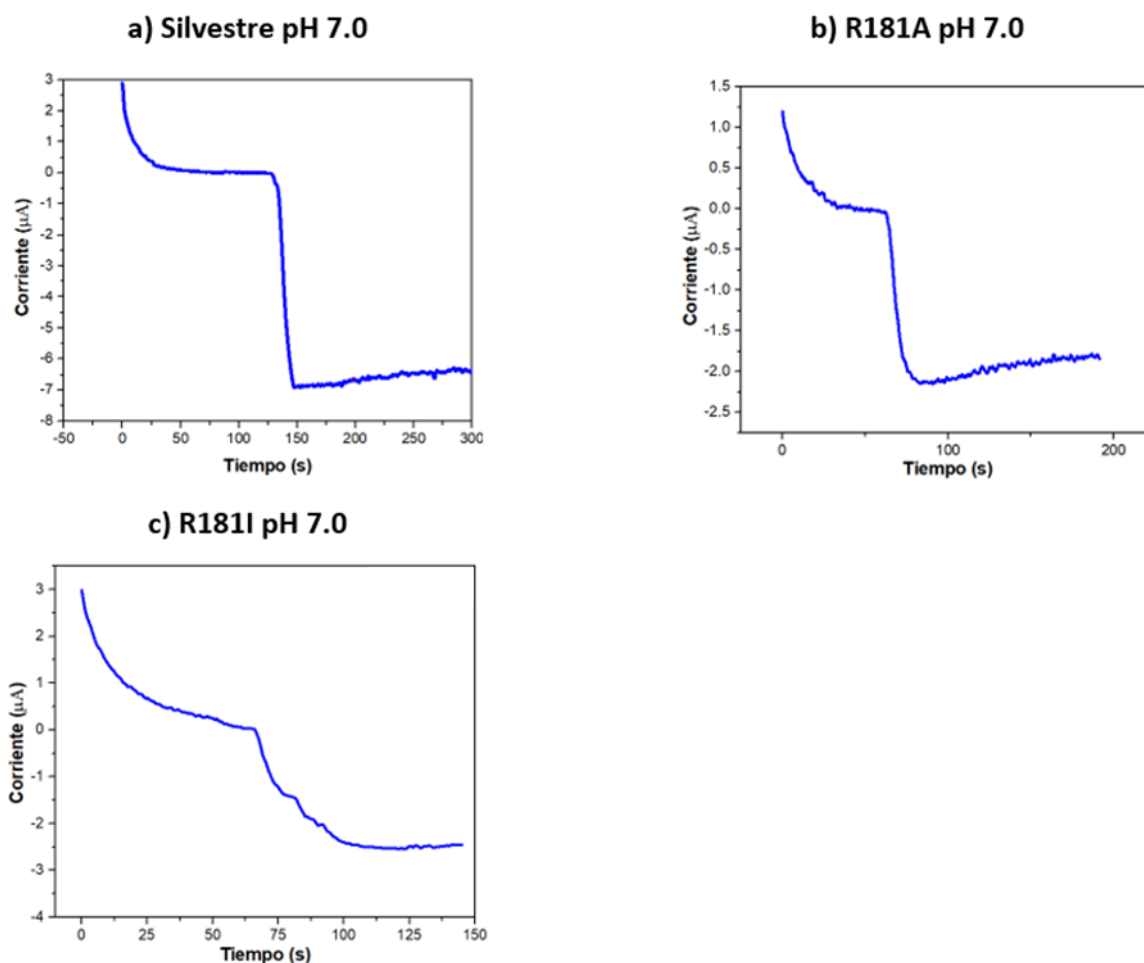
**Figura 18.** Estabilidad de almacenamiento de biosensores enzimáticos. a) silvestre, b) R181A. c) R181I.

En la Figura 18 se muestran los resultados de reutilización de biosensores fabricados con las enzimas Silvestre, R181A y R181I. Se seleccionó el valor máximo de corriente producido a una concentración de lactato específica como referencia (100%) y se observó cómo este valor disminuía con el tiempo en los mismos parámetros. Se observó que el biosensor que presentó la menor disminución en su capacidad de detección es aquel fabricado con la enzima R181I, que mantuvo el 79.07 % de su capacidad inicial en la cuarta medición, lo que sugiere una mayor estabilidad en sus lecturas a lo largo del tiempo.

La Figura 19 muestra los amperogramas obtenidos durante los ciclos de reutilización. Donde se evaluó la estabilidad y el desempeño de los biosensores a lo largo de múltiples ciclos de uso. Se observó una caída gradual de la actividad enzimática con cada ciclo de reutilización. Esta disminución en la actividad enzimática puede atribuirse a la desnaturalización de la enzima debido a las condiciones de reutilización, así como a la posible pérdida de enzima durante el proceso de limpieza y regeneración del electrodo.

A pesar de la caída en la actividad enzimática y la eficiencia electroquímica con los ciclos de reutilización, los biosensores aún mantuvieron una respuesta lineal dentro del rango de concentraciones analizadas.

Esto sugiere que, a pesar de la disminución en la actividad, los biosensores siguen siendo útiles en aplicaciones donde se requiere una detección cuantitativa o cualitativa.



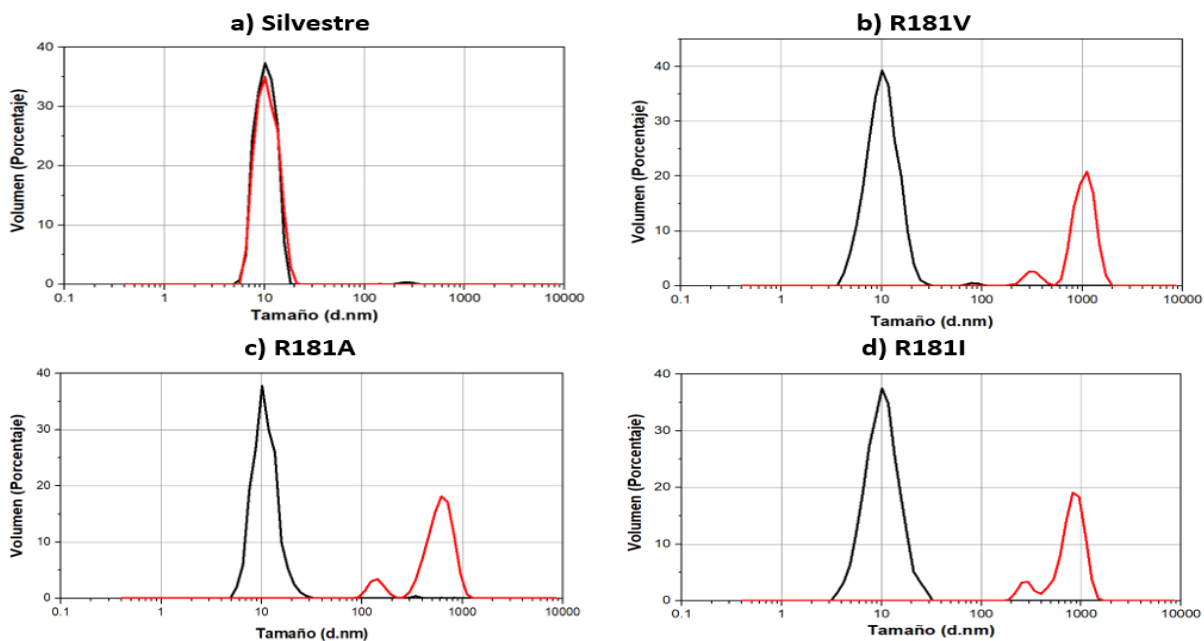
**Figura 19.** Amperograma de reutilización de un pulso de los electrodos enzimáticos a) silvestre, b) R181A. c) R181I.

### 3.4 Evaluación de biosensores de 3ª generación

#### 3.4.1 Nucleación de platino (R181A, R181V, R181I)

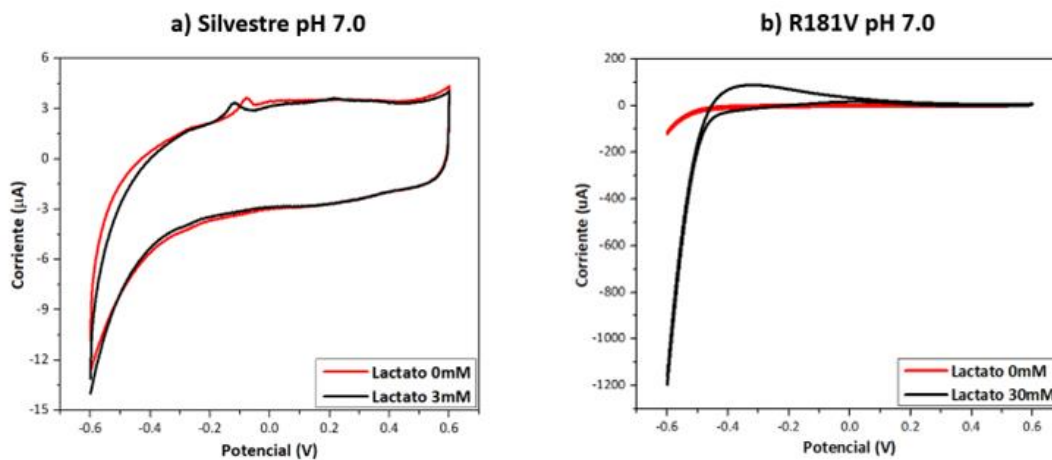
Los resultados de la nucleación de platino se obtuvieron utilizando el método de DLS para verificar la formación de nanocúmulos de platino. Se compararon las soluciones que contenían la enzima silvestre y las mutantes R181A, R181I y R181V. El control con la enzima silvestre mostró un pico a 10.1 nm (línea negra). Después de agregar lactato, no se observó ninguna formación de nanopartículas, ya que el pico mantuvo el mismo tamaño (línea roja) (Figura 20a). En las mutantes, las mediciones iniciales mostraron

un tamaño similar de aproximadamente 10 nm (línea negra). La mutante R181V tuvo un pico de tamaño de 1110 nm (Figura 20b), mientras que la muestra R181A mostró partículas de 615 nm después de añadir lactato, lo que sugiere una formación de nanocúmulos metálicos (Figura 20c). La muestra R181I mostró un tamaño de 825 nm (Figura 20d). Estos resultados sugieren la formación de nanocúmulos de platino durante la reacción.



**Figura 20.** Distribución de tamaños por volumen de las Pt-AvLOx obtenidas para cada mutante. a) Control con la AvLOx tipo silvestre, b) R181V, c) R181A y c) R181I.

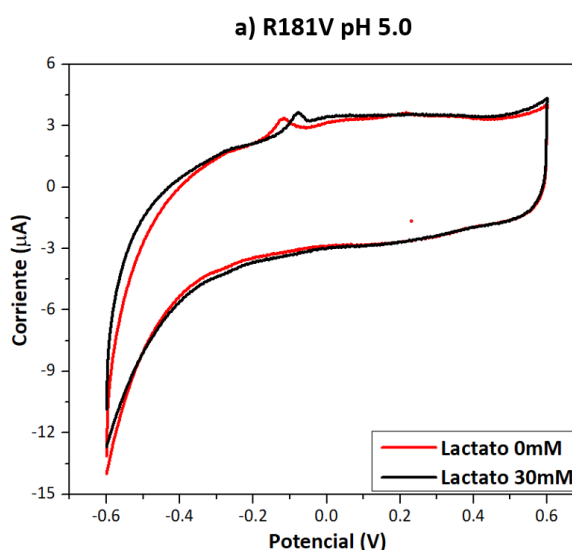
### 3.4.2 Voltametría cíclica de biosensores de 3<sup>a</sup> generación a pH 7.0



**Figura 21.** Respuesta voltamétrica de enzimas AvLOx Silvestres y R181V en electrodos de papel de carbón a pH 7.0. Las gráficas muestran a) Voltamograma cíclico obtenido por la enzima en su forma silvestre, b) Voltamograma cíclico obtenido por la enzima R181V.

En la Figura 21 se presentan los resultados de VC de los electrodos enzimáticos de tercera generación AvLOx, a pH 7.0. En los electrodos silvestre y R181V, en ausencia de lactato, no se observa una respuesta redox (línea roja). En presencia de lactato, el electrodo silvestre continúa sin mostrar una respuesta redox (línea negra) (Figura 21a), mientras que el electrodo con la mutante R181V muestra un cambio significativo (Figura 21b), indicando la presencia de una reacción redox. La respuesta observada corresponde a un cambio de 100 a -850  $\mu\text{A}$  con 30 mM de L-lactato.

### 3.4.3 Voltametría cíclica de biosensor de 3ª generación a pH 5.0

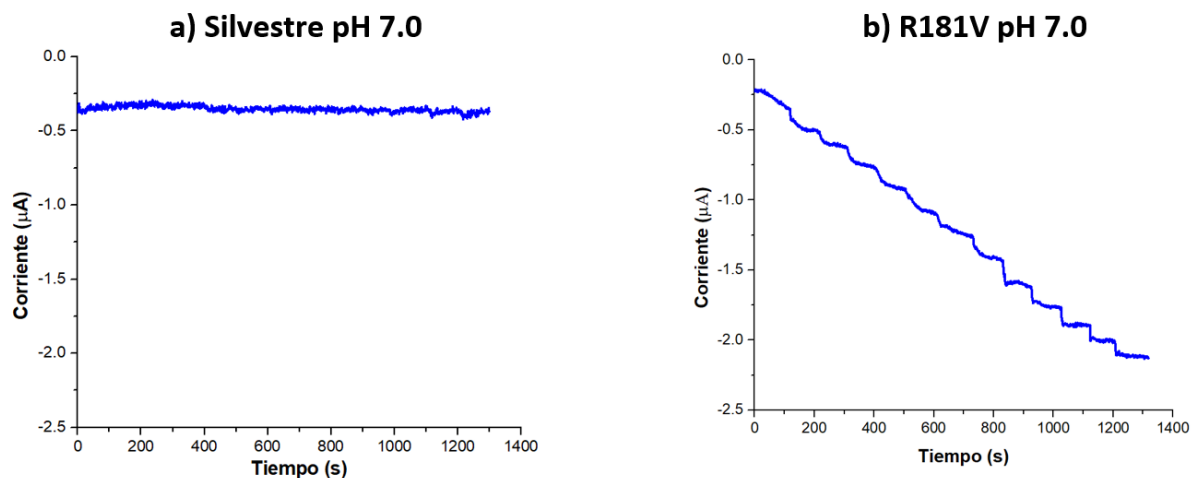


**Figura 22.** Respuesta voltamétrica de enzimas AvLOx R181V en electrodos de papel de carbón a pH 5.0. Las gráficas muestran. a) Voltamograma cíclico obtenido por la enzima en su forma silvestre.

En la Figura 22 se observa el VC de tercera generación con R181V a pH 5.0 y 30 mM de lactato. El electrodo R181V, en ausencia de lactato, no muestra una respuesta redox (línea roja). De manera similar, en presencia de lactato, el electrodo continúa sin mostrar una respuesta redox (línea negra), en ambos casos no es posible determinar si se presentan reacciones reversibles.

### 3.4.4 Amperometría de biosensores de 3ª generación a pH 7.0

En la Figura 23 se presentan los resultados de la amperometría enzimáticos de tercera generación de LOx, con enzima silvestre y R181V, ambos en un ambiente libre de oxígeno, en una atmósfera de nitrógeno.



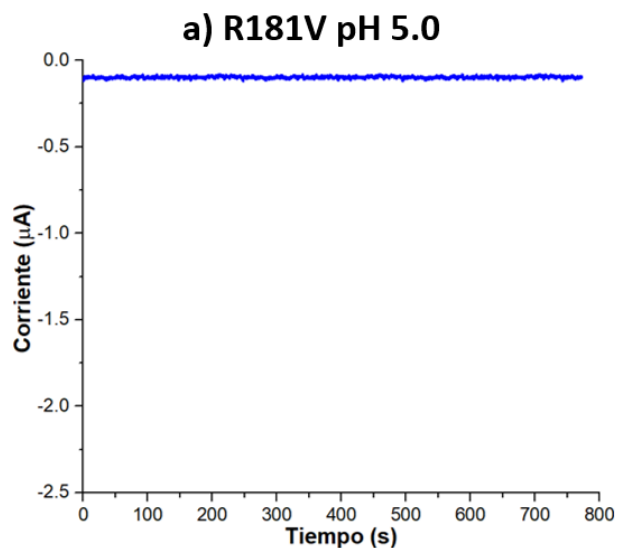
**Figura 23.** Respuesta amperométrica de enzimas silvestre y mutante R181V en electrodos de papel de carbón a pH 7.0. a) Amperograma obtenido por la enzima silvestre. b) Amperograma obtenido por la enzima R181V.

El amperograma de la (Figura 23a) muestra los resultados del biosensor enzimático silvestre con suministro constante de lactato hasta llegar a una concentración de 3 mM. Se observó un registro electroquímico caracterizado por fluctuaciones abruptas e irregulares en la corriente, presentando una tendencia levemente descendente con el aumento de la concentración. Además, la (Figura 23b) corresponde a un electrodo con R181V con lactato en el rango de 0 – 30 mM, mostrando una actividad estable, reflejando una serie de procesos electroquímicos discretos y bien definidos, debido a que no existe competencia con el oxígeno y la reacción catalítica puede ocurrir sin interferencias.

### 3.4.5 Amperometría del biosensor R181V de 3ª generación a pH 5.0

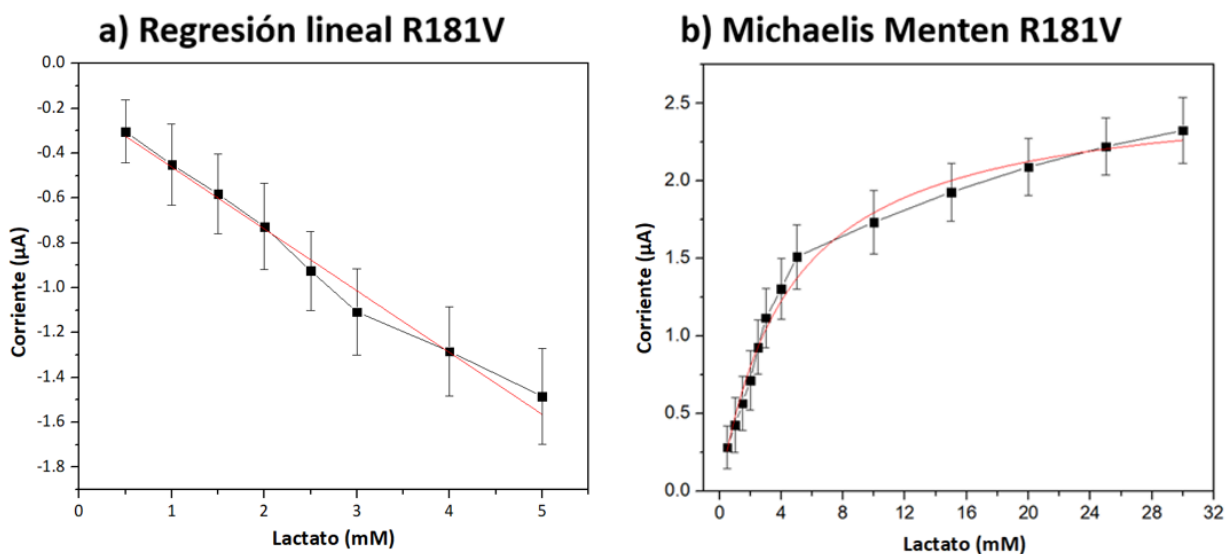
En la Figura 24 se observa el amperograma del receptor biológico de tercera generación AvLOx R181V, en concentraciones que varían de 0 – 30 mM de lactato. Se observó un registro electroquímico caracterizado por falta de fluctuaciones en la corriente, presentando una tendencia estable a pesar del aumento de la concentración, lo que sugiere que el receptor biológico no responde a cambios de concentración en ausencia de oxígeno a pH 5.0.

Es importante destacar que en estudios previos los amperogramas R181V a pH 7.0 y pH 5.0 han mostrado comportamientos distintos. Esto sugiere que el pH tiene un impacto significativo en la actividad y el comportamiento electroquímico de la enzima. Estos cambios en el comportamiento en función del pH podrían deberse a alteraciones en la estructura de la enzima.



**Figura 24.** Respuesta amperométrica de R181V en electrodos de papel carbón a pH 5.0.

### 3.4.6 Regresión lineal y Michaelis Menten de R181V de 3ª generación a pH 7.0



**Figura 25** Análisis de la regresión lineal y Michaelis Menten a pH 7.0. a) Regresión lineal obtenida por la enzima R181V, b) Michaelis-Menten obtenida por la enzima R181V.

En la Figura 25 se presentan los resultados obtenidos del análisis de regresión lineal y del modelo de Michaelis-Menten para el biosensor desarrollado con la enzima mutante R181V. Los parámetros derivados de estos análisis se resumen en la Tabla 6. El biosensor posee un rango lineal de 0 a 30 mM, lo cual permite una medición precisa y proporcional de concentraciones de lactato dentro de este intervalo. La sensibilidad por área del electrodo fue de  $11.018 \text{ mA/mM}\cdot\text{cm}^2$ , indicando una alta eficiencia del biosensor

en la conversión de la interacción con el sustrato en una señal eléctrica medible. Se identificó un LOD de  $1.8028 \mu\text{M}$ , asimismo, el LOQ fue de  $6.0094 \text{ mM}$ , lo que demuestra la capacidad del biosensor para detectar concentraciones muy bajas de lactato, asegurando la precisión y exactitud.

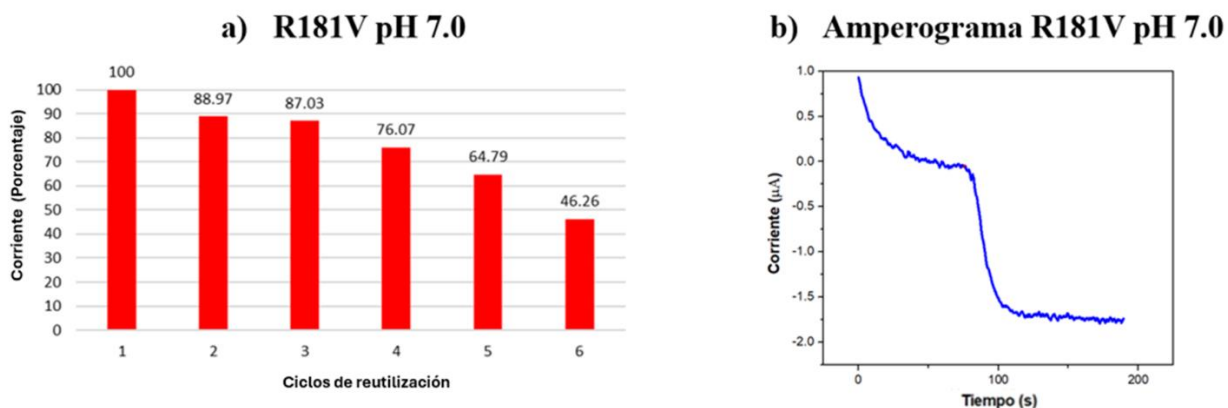
Adicionalmente, el biosensor mostró una  $J_{\text{max}}$  de  $2.5859 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  y una  $K_m$  de  $4.4891 \text{ mM}$ , lo que indica la capacidad máxima de generación de señal eléctrica, con una afinidad razonable de la enzima por el lactato.

**Tabla 6.** Cinética enzimática aparente del electrodo R181V de 3ª generación a pH 7.0.

	Rango lineal (mM)	Sensibilidad ( $\mu\text{A}/\text{mMcm}^2$ )	LOD (mM)	LOQ (mM)	$R^2$	$J_{\text{max}}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$K_m$ (mM)	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{A}/\text{s}$ )
<b>R 181V</b>	0-30	0.011018	1.8028	6.0094	0.98	2.5859	4.4891	2.6015

### 3.4.7 Reutilización en biosensores enzimáticos

En la Figura 26 se muestran los resultados de reutilización de biosensores fabricados con la enzima R181V. Se seleccionó el valor máximo de corriente producido a una concentración de lactato específica como referencia (100%) y se observó cómo este valor disminuía con el tiempo en los mismos parámetros. Se observó que el biosensor R181V mantuvo el 46.26% de su capacidad inicial en la sexta medición, indicando una estabilidad en su capacidad de detección a lo largo del tiempo.



**Figura 26.** Reutilización de biosensores de 3ª generación AvLOx R181V a pH 7.0. a) Estabilidad almacenamiento de actividad biosensor. b) Amperograma característico en su primera medición.

## Capítulo 4. Discusión

---

La detección de lactato es de gran interés en medicina deportiva, ya que la concentración es un indicador de la condición física de un atleta. Actualmente, el lactato se mide mediante muestras de sangre, los niveles normales oscilan entre 0.5 a 2.0 mM en un estado de reposo aumentando de 12 a 25 mM durante el ejercicio moderado a intenso, representando una limitación significativa, ya que la obtención de muestras de sangre puede resultar invasiva, dolorosa y poco práctica, especialmente durante competiciones deportivas (Goodwin et al., 2007; Azzouzi et al., 2015).

En contraste, el contenido de lactato en el sudor varía entre 5 a 40 mM en reposo, aumentando durante el ejercicio. Esto representa una limitación significativa, para el desarrollo de biosensores enzimáticos, debido a que las enzimas reportadas se saturan a concentraciones más bajas que las presentes en el sudor, haciéndolas inviables para su análisis (Goodwin, et al, 2007; Azzouzi, et al., 2015; Beker et al., 2022).

Como se estableció previamente, la medición del lactato en el sudor con los métodos tradicionales representa un desafío debido a la presencia de otros componentes, lo que limita la confiabilidad de los resultados. Sin embargo, los biosensores pueden superar esta restricción gracias a la especificidad de las enzimas, lo que permite monitorear los niveles de lactato durante el ejercicio, ofreciendo información crucial sobre el metabolismo y la condición física. El lactato, un subproducto del metabolismo anaeróbico, es clave para determinar el umbral, evaluar el rendimiento, prevenir el sobre entrenamiento, personalizar el entrenamiento y monitorear la condición física (Ferguson et al., 2017).

En este trabajo, se desarrollaron biosensores amperométricos de segunda y tercera generación utilizando tres mutantes de la enzima AvLOx del residuo 181 con Alanina, Valina e Isoleucina (R181A, R181V y R181I) previamente desarrolladas en nuestro grupo de investigación. Estas enzimas fueron modificadas para ampliar el túnel de acceso al sitio activo (Morales, 2022).

Las modificaciones en la enzima de los dispositivos de segunda generación permitieron ampliar su rango de detección permitiendo detectar cambios de corriente a concentraciones de L-lactato de hasta 200 mM. Con la inclusión de un mediador, se logró una mayor eficiencia en la transferencia de electrones, lo que mejoró la precisión y la sensibilidad del dispositivo. En los biosensores de tercera generación, el uso de las mutantes permitió la formación de núcleos de platino del sitio activo a la superficie del electrodo, permitiendo funcionar como nanocables en la DET.



Las tres mutaciones afectan la función de la enzima porque el residuo 181 está en una región flexible que conduce al sitio activo de la enzima, y esta región interactúa indirectamente con el lactato (Umena et al, 2006). La arginina en la posición 181 es fundamental para unir el sustrato y para modificar las propiedades y la reactividad del sitio activo. Estudios previos han demostrado que, al cambiar este residuo por una metionina, que no tiene carga positiva, la actividad enzimática disminuye (Yorita et al., 2000).

Para incrementar el tamaño del canal de acceso al sitio activo y facilitar la apertura, en las mutaciones se usaron aminoácidos hidrofóbicos de diferentes tamaños de cadena, al usar residuos hidrofóbicos se favorece el fenómeno de tunelamiento. Aunque la actividad de las mutantes disminuyó en ensayos que miden la concentración de  $H_2O_2$  formado en el segundo paso de la reacción, esta disminución no siempre se correlaciona con la señal electroquímica de un biosensor. En un biosensor de lactato de tercera generación, la formación de  $H_2O_2$  no es esencial, ya que la señal se genera durante la oxidación del L-lactato y la liberación del piruvato (Morales, 2022), de manera que la especie electroactiva es el FMN reducido.

Además, Vázquez et al. (2014) y Morales (2022) resaltan que para la DET se debe considerar la distancia entre el FMN y la superficie del electrodo. La distancia ideal es de 14 Å o menor, mientras que en este caso específico es de 20.5 Å. Surgiendo el problema de tener una mayor distancia que no favorece la DET, sin embargo, la formación de los nanocúmulos de platino permitiría superar dicha dificultad.

Los resultados de los voltamogramas de los biosensores de segunda generación a pH 7.0 se presentan en la Figura 10. La enzima silvestre presenta los potenciales de oxidación y reducción de la reacción a 3 mM de lactato, entre 150 y -150  $\mu A$ . De igual manera la enzima R181V, se muestra una respuesta de 120 a -120  $\mu A$  con 20 mM de lactato. Para las enzimas R181A e R181I, se observan respuestas similares, de 100 a -100  $\mu A$  y de 150 a -150  $\mu A$  respectivamente, con una concentración de lactato de 200 mM. El aumento del rango de detección se atribuye principalmente a la mutación realizada en la enzima, algo que se apreciaba desde los datos de Morales (2022) por el incremento en la  $K_m$ , lo que sugería la afectación de la afinidad por el sustrato. Además, el mediador AP, acepta electrones de la enzima en un estado reducido y transferirlos al electrodo. Esta capacidad del mediador de facilitar la transferencia de electrones amplía significativamente el rango de detección del biosensor (García et al., 2023).

Los resultados amperométricos mostraron que el biosensor enzimático silvestre y las mutantes R181A y R181I tuvieron corrientes de -6.16  $\mu A$ , -2.24  $\mu A$  y -3.45  $\mu A$ , respectivamente, sin un incremento de corriente para la mutante R181V.

Los resultados obtenidos son consistentes con los reportados en la literatura García et al. (2023) quienes reportaron para un caso similar un biosensor silvestre a pH 7.0 mostró una corriente de  $-6 \mu\text{A}$  a una concentración de 0.8 mM.

Los resultados obtenidos durante el análisis de linealidad para la enzima silvestre mostraron un rango lineal de 0 a 3 mM, además de una LOD de 54.2349, una LOQ de 180.7829 mM y una sensibilidad de  $34.3597 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ . En contraste, las mutantes R181A y R181I exhibieron un rango lineal de 1 a 200 mM, con una LOD de 4.6954 y 4.8579mM, además un LOQ de 15.6515 y 16.1932 mM y una sensibilidad de 0.0509 y 0.04224  $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$  respectivamente.

Al comparar estos resultados con datos reportados en la literatura para biosensores enzimáticos de lactato de segunda generación a pH 7.0, se observan diferencias significativas en el rango lineal, la sensibilidad y el límite de detección (LOD). Daboss et al. (2022), quienes investigaron la incorporación de membranas limitadoras de difusión, basado en AP combinado con un ionómero perfluorosulfonado (PFSI, semejante al Nafion). Estas membranas evitan el contacto directo de la enzima con la muestra, permitiendo una difusión controlada. Como resultado, obtuvieron un rango lineal de 5 a 100 mM con una sensibilidad promedio de  $0.096 \pm 0.005 \text{ mA}/\text{mMcm}^2$ . Los resultados obtenidos fueron positivos, afirmando que representan una solución prometedora para la detección continua y no invasiva de lactato.

En otra investigación García et al. (2023), quienes investigaron como mejorar la actividad de LOx a pH 5.0, reportaron un biosensor enzimático tipo silvestre con un rango lineal de 0.2 – 0.8 mM, con una sensibilidad de  $29.12 \pm 6.72 \mu\text{A}/\text{mMcm}^2$  y un LOD de 65 mM y una mutante S175A, con resultados semejantes un rango lineal de 0.2 – 0.8 mM,  $42.52 \pm 7.88 \mu\text{A}/\text{mMcm}^2$  y 40 mM

En otro estudio, Xiu et al. (2009), enfocaron su investigación para desarrollar un biosensor para medir lactato en muestras de suero de atletas, propusieron un biosensor de LOx con mediador de ferricianuro con nanopartículas de platino, los resultados que obtuvieron fue un rango lineal de 1 a 20 mM de lactato, una sensibilidad de  $1.43 \mu\text{A}/\text{mM}$  y un coeficiente de variación de 0.0549.

Por su parte, Azzouzi et al. (2015), desarrollaron un biosensor basado en nanopartículas de oro ancladas en óxido de grafeno reducido y lactato deshidrogenasa. El biosensor se calibró a un pH de 7.5 mostrando una respuesta lineal al lactato en el rango de 0.1 mM – 5 mM, con una sensibilidad de  $154 \text{ mA}/\text{mMcm}^2$  y un límite de detección de 0.13 mM. Se concluyó que la respuesta del biosensor en suero artificial demostró

que el lactato se puede determinar prácticamente sin interferencias de otras sustancias, haciéndolo un dispositivo atractivo para la detección temprana de cáncer.

Continuando con los resultados de esta tesis, se evaluaron los biosensores enzimáticos de segunda generación a un pH de 5.0, presentado en la Figura 11 de la sección de resultados se presentan las voltametrías cíclicas a pH 5.0. En la enzima silvestre los potenciales picos anódicos y catódicos de la reacción a 3 mM de lactato se ubicaron entre 225 y -225  $\mu\text{A}$ . Con la enzima R181V, se registró una respuesta de 160 a -160  $\mu\text{A}$  con 20 mM de lactato, en una reacción cuasireversible. Por otro lado, la enzima R181A, se observó una respuesta de 100 a -100  $\mu\text{A}$  con 200 mM de lactato, finalmente la enzima R181I, se detectó una respuesta de 150 a -150  $\mu\text{A}$  con 200 mM de lactato.

Con respecto a las amperometrías de los biosensores de segunda generación a pH 5.0, presentes en la Figura 8 de la sección resultados, la enzima silvestre mostró un pico de 2.69  $\mu\text{A}$  utilizando una concentración de 0.8 mM de lactato, con un retorno continuo representativo del suministro constante de lactato. Por otro lado, la enzima R181V, no presentó reacción alguna, lo que podría deberse a una inactivación de la enzima. Además, la mutante R181A, obtuvo 2.59  $\mu\text{A}$  utilizando una concentración de 120 mM de lactato. Finalmente, se observó la enzima modificada R181I, presentando un pico de 2.4  $\mu\text{A}$  utilizando una concentración de 120 mM de lactato. Al igual que en los casos anteriores, se observaron retornos continuos representativos del suministro constante de lactato.

La inactivación de la enzima R181V y la disminución de la actividad enzimática en las otras variantes plantean interrogantes sobre la estabilidad de las enzimas. Estudios previos han demostrado que el pH juega un papel crucial en la actividad enzimática, especialmente en la conformación de la His265. A pH 8.0, la histidina está cerca del FMN, pero a pH 4.5, se protona y cambia de posición, alejándose a una distancia de 7.65 Å, formando enlaces de hidrógeno con otros aminoácidos. Estos cambios conformacionales afectan la estructura activa de la enzima, además las mutaciones en los aminoácidos clave causan una pérdida parcial o total de actividad. Esto sugiere que la posición y conformación de la histidina son esenciales para la función enzimática (Furuichi et al., 2008).

Asimismo, se identificaron dos fenómenos que contribuyen significativamente a la inactivación de las enzimas. En primer lugar, la protonación de la histidina catalítica afecta directamente a la actividad enzimática. En segundo lugar, se observó la formación de agregados debido a cambios estructurales globales en la enzima. Estos cambios exponen otros grupos y disminuyen la estabilidad de la enzima, lo

que finalmente conduce a la agregación y, por lo tanto, a la pérdida de actividad como resultados de mecanismos dependientes del pH promovido por altas concentraciones de sustrato (Furuichi et al., 2008).

Para determinar cómo se ve afectada la estructura con las mutaciones, en particular His265, que desempeña un papel crucial en la reacción de oxidación del L-lactato, sería necesario realizar un análisis estructural detallado. Este análisis podría incluir técnicas como difracción de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Cabe destacar que esta pérdida de actividad por la inmovilización no se observa en las mutantes de alanina e isoleucina, lo que sugiere que las modificaciones específicas pueden mitigar los cambios estructurales adversos.

Al comparar los resultados obtenidos para la enzima silvestre con previas investigaciones se encontraron coincidencias. García et al. (2023) estudiaron biosensores enzimáticos de AvLOx a pH 5.0 y encontraron que la enzima silvestre produjo una corriente de  $-2.5 \mu\text{A}$  a una concentración de 1 mM.

Además, se realizaron estudios de linealidad en los cuales se observa en la Figura 13, donde solo se obtuvieron resultados para los biosensores con la enzima silvestre y la mutante R181A. Para el caso de la enzima silvestre, se trabajó con un rango lineal de 0 a 3 mM, además de una LOD de 35.338 y una LOQ de 0.117 mM. En comparación, la mutante R181A presenta un rango lineal de 1 a 200 mM, con una LOD de 7.889 y una LOQ de 26.298 mM. Estos resultados indican que la mutante R181A es la única que retiene su capacidad de procesar el lactato a condiciones de pH 5.0, siendo la enzima más estable entre las mutantes.

Los resultados sugieren que los biosensores producidos podrían ser inadecuados, ya que generalmente se busca valores de LOD bajos para detectar concentraciones más bajas del analito de interés y una sensibilidad alta para detectar cambios más pequeños en la concentración. Sin embargo, un rango lineal más amplio, es ideal en aplicaciones donde se tienen muestras con concentraciones altas de lactato, como es el caso del sudor (Hiraka et al., 2021).

Es fundamental evaluar el propósito de los biosensores antes de determinar su funcionalidad. En el caso de la detección de lactato en el sudor, solo uno de los biosensores mencionados en la revisión bibliográfica es funcional en los rangos necesarios. Sin embargo, entre las tres enzimas mutantes producidas, las mutantes R181I y R181A demostraron ser superiores en sus límites de detección. La mutante R181I no se satura a una concentración de 200 mM de lactato, mientras que la mutante R181A se satura a 200 mM. Exceptuando a la mutante R181V, todas las demás mutantes eran capaces de operar eficazmente en las condiciones necesarias para la detección de lactato en el sudor.

Debido al aumento en la cantidad de aplicaciones que emplean enzimas, ha aumentado la comprensión de los factores que las afectan. Los más estudiados son el pH, la temperatura, la concentración de sustrato y la presencia de inhibidores. Sin embargo, se han dejado de lado muchos factores que afectan, como el entorno de la enzima. Debido a que la enzima ha evolucionado para funcionar bajo ciertas condiciones donde la actividad y estabilidad son un reflejo de ese entorno (Talbert & Goddard, 2012).

Para retener o mejorar la actividad enzimática, es primordial comprender los sistemas enzimáticos de inmovilización, ya que juegan un papel importante, la modificación de múltiples componentes en el sistema puede tener un efecto combinado en la tasa de formación del producto. Como la unión de la enzima a la matriz de quitosano puede provocar cambios en su estructura tridimensional y microambiente, lo que podría afectar la accesibilidad al sustrato al sitio activo de la enzima. Además, la unión a la matriz sólida podría restringir el movimiento y la flexibilidad de la enzima, lo que también podría influir en su actividad catalítica (Talbert & Goddard, 2012).

La interacción entre la enzima, el quitosano y el mediador de AP podría haber alterado la conformación de las enzimas, lo que podría explicar las diferencias en la actividad observadas entre las variantes. Algunas estrategias como la optimización de las condiciones de inmovilización y la selección adecuada de la matriz y el mediador podrían ayudar a minimizar estos efectos y mejorar el rendimiento del biosensor. Los resultados obtenidos en este estudio respaldan la utilidad de los biosensores enzimáticos fijados con quitosano y mediadores inorgánicos para aplicaciones de detección de L-lactato en condiciones aeróbicas (Leyva et al., 2013).

Otro efecto para considerar es la interferencia causada por la competencia del receptor con el oxígeno y el mediador de electrones en la semirreacción oxidativa. Esta interferencia ha motivado el desarrollo de biosensores de tercera generación con mejoras significativas, como la utilización de materiales más eficientes en la transferencia de electrones, como nanopartículas de oro o platino. Estos biosensores ofrecen una mayor sensibilidad y estabilidad, lo que los convierte en una opción más prometedora para aplicaciones analíticas (Hiraka et al., 2021).

Para los biosensores enzimáticos de tercera generación, se descartaron las mutantes R181A y R181I, utilizando en los ensayos solo la enzima silvestre y la mutante R181V. Estas enzimas se seleccionaron porque eran las más adecuadas para trabajar a concentraciones bajas de L-lactato, facilitando la evaluación de la DET. En cambio, las mutantes R181A y R181I, necesitaban concentraciones mucho más

altas para alcanzar la saturación, lo que representaba un gasto excesivo de reactivo para comprobar la DET.

En estos biosensores, la reacción enzimática comienza con la oxidación del lactato por la AvLOx R181V. A continuación, los iones de platino se reducen a platino metálico y el centro activo redox de la enzima se regenera, pasando de FMN<sub>red</sub> a FMN<sub>ox</sub>. Este proceso de regeneración del centro activo es crucial para mantener la actividad enzimática y, por ende, la sensibilidad del biosensor (Leyva et al., 2013).

En la Figura 20 de la sección de resultados se evaluaron los voltogramas cíclicos de los biosensores de tercera generación a pH 7.0. Para la enzima silvestre se usó una concentración de 3 mM de lactato, dando picos anódicos y catódicos entre 5 y -15  $\mu$ A. Además, se observó la respuesta de la mutante R181V encontrando picos de 100 a -850  $\mu$ A con 25 mM de lactato.

Con respecto a las amperometrías de los biosensores, en la Figura 22 se presentan los resultados de la amperometría enzimáticos de tercera generación de LOx, para la enzima silvestre presento un registro electroquímico caracterizado por fluctuaciones abruptas e irregulares en la corriente, presentando una tendencia descendente con una concentración de 0 a 3 mM de lactato. Además, la enzima mutante R181V con lactato en el rango de 0 a 30 mM, mostro una actividad estable, reflejando una serie de procesos electroquímicos discretos y bien definidos, debido a que no existe competencia con el oxígeno y la reacción catalítica puede ocurrir sin interferencias.

Los electrodos preparados con la LOx silvestre no mostraron un aumento en la corriente, lo cual sugiere que el precursor de platino no pudo acceder al sitio activo, evitando así la formación de nanocables de platino. Por otro lado, la mutante R181V mostró un rango lineal de detección de 1-30 mM con una alta sensibilidad de 11.018 mA/mM $\cdot$ cm<sup>2</sup> y un bajo LOD de 1.8028  $\mu$ M, y un LQO de 6.0094 mM, lo que indica una detección exitosa de lactato y una DET eficiente. Estos resultados respaldan la hipótesis de que la modificación de la enzima puede mejorar su actividad y su capacidad de detectar lactato. Un antecedente relevante en la literatura reporta un biosensor de tercera generación con valores de sensibilidad de 0.41  $\mu$ A/mMcm<sup>2</sup> y un intervalo lineal de 0 a 20 mM de L-lactato (Hiraka et al, 2021), por lo que la estrategia aquí presentada es exitosa en mejorar tanto el intervalo de detección como la sensibilidad, con una estrategia un poco más sencilla al utilizar la mutante de un solo residuo en el canal de acceso y combinarla con la nucleación con platino. A diferencia de este trabajo de tesis, en el artículo citado los experimentos se realizaron en presencia de oxígeno. Esto se debe a que la enzima reportada contiene la mutación A96L, la cual presenta baja afinidad por el oxígeno limitando así la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La primera semirreacción (oxidación del lactato) produce el cofactor  $\text{FMN}_{\text{red}}$ , que actúa como fuerte agente reductor, este impulsa la reducción química de los iones de platino, para formar un núcleo metálico nanométrico que se extiende del centro activo hacia la superficie de la enzima. Como la etapa de crecimiento se realiza en condiciones casi anaeróbicas en las que el  $\text{O}_2$ , el aceptor natural de LOx, se elimina del sistema a través de una extensa purga de  $\text{N}_2$ ; la segunda semirreacción de la AvLOx se vuelve desfavorable respecto a la reducción de iones  $\text{PtCl}_6$  utilizándolos como el único aceptor de los electrones (Morales, 2021).

La corriente de oxidación bioelectrocatalítica se atribuye al proceso de DET en el electrodo descrito en la ecuación regenerando el cofactor de LOx para la oxidación enzimática continua de lactato. La respuesta catalítica disminuida, está evidenciada por las curvas que indican que solo la presencia combinada de lactato y iones  $\text{PtCl}_6$  y AvLOx durante la etapa sintética produce la nucleación desde el sitio activo hasta la superficie de carbono catalítico necesario para la bioelectrocatalisis y la DET.

Las enzimas llevan a cabo la reacción en ausencia de oxígeno por lo tanto no se puede producir peróxido. La técnica empleada en este estudio ha proporcionado valiosos indicios preliminares sobre la formación de nanocúmulos de platino. No obstante, para obtener una caracterización más precisa de estas estructuras, resulta imperativo complementar estos resultados con técnicas analíticas adicionales de mayor resolución, como la microscopía electrónica de transmisión (TEM) o la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la espectroscopía de fotoemisión. Estas técnicas permitirán una evaluación más detallada de la morfología, distribución, tamaño y estructura de los nanocúmulos de platino, lo que enriquecerá nuestra comprensión de los procesos subyacentes y fortalecerá las conclusiones de este estudio.

Los resultados de la actividad electroquímica confirman que la mutación del residuo R181V de la enzima AvLOx, permite una DET eficiente entre la enzima y el electrodo. Aunque no se evaluaron las mutantes R181A y R181I en biosensores de tercera generación, los resultados de los ensayos de DLS sugieren que ambas enzimas tendrían comportamientos similares. Además, la señal redox observada en la VC y la respuesta de corriente dependiente de la concentración de lactato, sin la presencia de mediadores apoyan la hipótesis de que la modificación de la enzima R181V mejora la actividad y la capacidad de detección de lactato en biosensores de tercera generación, destacando su potencial en aplicaciones prácticas.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

En este trabajo se abordaron los desafíos que presentan los biosensores en la detección de lactato en el sudor humano. Se presentaron propuestas para mejorar la capacidad de detección mediante la utilización de la DET entre la enzima y el electrodo.

Los biosensores enzimáticos de segunda generación, desarrollados con quitosano y el mediador AP en condiciones aeróbicas, demostraron ser efectivos para detectar lactato. Se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática entre pH 7.0 y pH 5.0. Tanto la enzima silvestre como las variantes R181A y R181I, mostraron una notable disminución de actividad a pH 5.0. Para el caso de la R181V, no se observó un incremento de potencial, lo que sugiere su inactivación debido a la protonación del residuo His265.

La técnica de caracterización DLS se utilizó para evaluar la producción de núcleos de platino metálico con enzima en solución, mostrando partículas de 500-1000 nm después de 48 h de reacción. Los resultados obtenidos por las mutantes R181A, R181V, R181I sugieren que estas facilitaron la formación de las nanopartículas de  $K_2PtCl_6$  a los sitios catalíticos al entrar en contacto con la matriz de la enzima y la matriz carbonosa, permitiendo la DET.

Los resultados de los biosensores de 3 generación revelaron que la enzima silvestre no mostró una transferencia de electrones tanto a pH 5.0 como a pH 7.0. Esta falta de actividad se confirmó en los amperogramas, donde no se observó un potencial estable. Este comportamiento era esperado, ya que la enzima silvestre no presenta la modificación que permite la apertura del canal, permaneciendo cerrado al ingreso de cualquier cosa que no sea el sustrato, evitando la formación del nanocable.

En contraste, R181V mostró una clara reducción y oxidación a pH 7, lo que confirma la DET. Además, en la amperometría se observó un aumento continuo de potencial y una corriente promedio de 2.150  $\mu A$  con una concentración de 30 mM de lactato, indicando estabilidad y superando el umbral de concentraciones de lactato en el sudor. Sin embargo, a pH 5.0 se observó una pérdida total de la transferencia de electrones, posiblemente o a la inhibición de la enzima en este ambiente ácido.

Los resultados sugieren que una opción prometedora para diseñar un biosensor eficaz y sensible para medir lactato en el sudor humano es la creación de una doble mutante que combine la DET con la resistencia a pH 5.0. En particular, se propone combinar la mutación R181V presentada en este trabajo



con la mutación S175A descrita por García et al. (2022). Esta estrategia considera la influencia del pH en la actividad enzimática y la DET, ofreciendo una herramienta eficaz y sensible para la monitorización en tiempo real de lactato en muestras biológicas. Además, implicaría seguir explorando nuevas variantes enzimáticas y condiciones de funcionamiento que permitan alcanzar niveles de detección más bajos y una mayor sensibilidad. Estos avances podrían tener aplicaciones industriales significativas en áreas como la medicina y el deporte, donde la monitorización precisa de lactato es crucial.

## Literatura citada

- Alam, F., Roy, S., Jalal, A., Umasankar, Y., Forouzanfar, S., Akter, N., Bhansali, S., & Pala, N. (2018). Lactate biosensing: The emerging point-of-care and personal health monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 117(15), 818–829. DOI:[10.1016/j.bios.2018.06.054](https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.06.054)
- Alvear, I., García, D., De Paz, J., & González, J. (2005). Sweat Lactate, Ammonia, and Urea in Rugby Players. *Physiology & Biochemistry*, 26(8), 632-637. DOI:[10.1055/s-2004-830380](https://doi.org/10.1055/s-2004-830380)
- Azzouzi, S., Rotariu, L., Benito, A., Maser, W., Ali, M., & Bala, C. (2015). Anovel amperometric biosensor based on gold nanoparticles anchored on reduced graphene oxide for sensitive detection of L-lactate tumor biomarker. *Biosensors and Bioelectronics*, 69(15), 280–286. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.012>
- Beker L., Engel M., & Wolfe A. (2022). Sweat biomarkers for sports science applications. Sports Science Exchange. *Sport Science Exchange*, 35(226), 1–9. <https://www.gssiweb.org/latam/sports-science-exchange/art%C3%ADculo/sse-226-biomarcadores-del-sudor-y-sus-aplicaciones-en-las-ciencias-del-deporte>
- Bhatia, D., Paul, S., Acharjee, T., & Ramachairy, S. (2024). Biosensors and their widespread impact on human health. *Sensors International*, 5, 100257. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2023.100257>
- Cavalcante, F., Falcão, I., Souza, J., Rocha, T., Sousa, I., Cavalcante, A., Oliveira, A., Sousa, M., & Dos Santo, J. (2021). Designing of Nanomaterials-Based Enzymatic Biosensors: Synthesis, Properties, and Applications. *Electrochem*, 2(1), 149–184. <https://doi.org/10.3390/electrochem2010012>
- Choi, J., Han, S., & Kim, H. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33(15), 1443 – 1454. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014>
- Conix, S. (2005). Enzyme classification and the entanglement of values and epistemic standards. *Studies in History and Philosophy of Science*, 36, 37 – 45. <https://doi.org/10.1016/j.shpsa.2020.05.005>
- Daboss, E., Tikhonov, D., Shcherbacheva, E., & Karyakin, A. (2022). Ultrastable Lactate Biosensor Linearly Responding in Whole Sweat for Noninvasive Monitoring of Hypoxia. *Analytical Chemistry*, 94(25), 9201-9207. <https://DOI.10.1021/acs.analchem.2c02208>
- Eş, I., Gonçalves, J., & Corrêa, A. (2015) Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(5), 2065 – 2082. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6390-y>
- Ferguson B., Rogatzkit M., Goodein M., Kane D., Rightmires Z., & Gladden B. (2017). Lactate metabolism: historical context, prior misinterpretations, and current understanding. *European Journal of Applied Physiology*, 118(10), 691 – 728. <http://doi.org/10.1007/s00421-017-3795-6>
- Fernandez, R. (2009). Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(6), 405 – 418. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.009>
- Furuichi, M., Suzuki, N., Dhakshnamoorthy, B., Minagawa, H., Yamagishi, R., Watanabe, Y., Goto, Y., Kaneko, H. Yoshida, Y., Yagi, H., Waga, I., Kumar, P., & Mizuno, H. (2008) X-ray Structures of

- Aerococcus viridans* Lactate Oxidase and Its Complex with D-Lactate at pH 4.5 Show an  $\alpha$ -Hydroxyacid Oxidation Mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 378(2), 436 – 446. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.02.062>
- García, R., Zárate, A., Wang, J., & Vázquez R. (2023). Bioengineered Lactate Oxidase Mutants for Enhanced Electrochemical Performance at Acidic pH. *ChemElectroChem*. 10(22), e202300296, 1 – 9. <https://doi.org/10.1002/celec.202300296>
- Goodwin, M., Harris, J., Hernández, A., & Gladden B. (2007). Blood lactate measurements and analysis during exercise: a guide for clinicians. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 1(4) 558 – 569. <https://doi.org/10.1177/193229680700100414>
- Hiraka, K., Kojima, K., Tsugawa, W., Asano, R., Ikebukuro, K., & Sode, K. (2020). Rational engineering of *Aerococcus viridans* L-lactate oxidase for the mediator modification to achieve quasi-direct electron transfer type lactate sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 151(1), 111974. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111974>
- Hiraka, K., Tsugawa, W., Asano, R., Yokus, M., Ikebukuro, K., & Daniele, M. (2021). Rational design of direct electron transfer type L-lactate dehydrogenase for the development of multiplexed biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 176(1), 112933. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112933>
- Janata, J. (2009). Potentiometric sensors. En J. Janata (Ed.), *Principles of Chemical Sensors* (pp. 119–199). Springer. [http://dx.doi.org/10.1007/b136378\\_6](http://dx.doi.org/10.1007/b136378_6)
- Koyani, R., & Vázquez R. (2016). Laccase encapsulation in chitosan nanoparticles enhances the protein stability against microbial degradation. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23(18), 18850-18857. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7072-8>
- Klotzbach, T., Watt, M., Ansari, Y., & Minteer, S. (2008). Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion® polymers. *Journal of Membrane Science*, 311(1-2), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.11.043>
- Leecha D., Kavanagha P., & Shuhmannb W. (2012). Review Enzymatic fuel cells: Recent progress. *Electrochimica Acta*, 84, 223– 234. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.02.087>
- Leiros, I., Wang, E., Rasmussen, T., Oksanen, E., Repo, H., Petersen, S., Heikinheimoa, P., & Houghb, E. (2006). The 2.1Å structure of *Aerococcus viridans* L-lactate oxidase (LOX). *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 62(12), 1185–1190. <https://doi.org/10.1107/s1744309106044678>
- Leyva, J., Lizardi, J., Ramírez, J., Garcia G., & Ezquerro, J., (2013). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1). 129 – 150. <https://portal.issn.org/resource/ISSN-L/1665-2738>
- Liu, D., Chen, J., & Shi, Y. (2018). Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102, 332-342. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>
- Mohamada, N., Marzukia, N., Buanga, N., Huyopb, F., & Wahab, R. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes.

*Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29 (2), 205-220.  
<https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>

- Monteiro, R., Neto, D., Fechine, P., Lopes, A., Gonçalves, L., Dos Santos, J., Souza, M., & Lafuente, R. (2019). Ethyl Butyrate Synthesis Catalyzed by Lipases A and B from *Candida antarctica* Immobilized onto Magnetic Nanoparticles. Improvement of Biocatalysts Performance under Ultrasonic Irradiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5807. <https://doi.org/10.3390/ijms20225807>
- Morales, D. (2022). *Optimización de la lactato oxidasa de Aerococcus viridans para la transferencia directa de electrones en biosensores*. [Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. 79 pp. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3758>
- Naresh, V., & Lee, N. (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors*, 21(4), 1109. <https://doi.org/10.3390/s21041109>
- Nguyen, H., & Kim, M. (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157-163. <https://doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157>
- Pettersen, E., Goddard, T., Huang, C., Couch, G., Greenblatt, D., Meng, E., & Ferrin, T. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Poorakbar, E., Shafiee, A., Saboury, A., Rad, B., Khoshnevisan, K., Ma'mani, L., Derakhshankhah, H., & Hosseini, G. (2018). Synthesis of magnetic gold mesoporous silica nanoparticles core shell for cellulase enzyme immobilization: Improvement of enzymatic activity and thermal stability. *Process Biochemistry*, 71, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.012>
- Rathee K., Dhull V., Dhull R., & Singh S. (2016). Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 5, 35–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.11.010>
- Reshetilov, A., Zyrina, N., & Zheleznyaya, L. (2013). Capítulo 9. De Novo DNA Synthesis and Its Biosensor Detection., (1ª ed). *Portable Biosensing of Food Toxicants and Environmental Pollutants*, 243–258. Nikolelis, D., Varzakas, T., Erdem, A., Nikolei G. <https://doi.org/10.1201/b15589>
- Rezaei, B., & Irannejad, N. (2019). Chapter 2, Electrochemical detection techniques in biosensor applications, (1ª ed) *Electrochemical Biosensors*, 11–43. Ensafi, A. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816491-4.00002-4>
- Romero H., Vera T., Redrovan F., Jumbo J., & Franco F. (2019). Aplicación de Voltamperometría de redisolución anódica para la determinación de antimonio. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 85(3), 293 – 304. <https://portal.issn.org/resource/ISSN/1810-634X>
- Ronkainen, N., Halsall, H., & Heinman, W. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39, 1747-1763. <http://dx.doi.org/10.1039/b714449k>
- Rueda, N., Dos Santos, J., Ortiz, C., Torres, R., Barbosa, O., Rodrigues, R., Murcia, A., & Lafuente, R. (2016). Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. *The Chemical Record*, 16(3), 1436–1455. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600007>

- Salazar, P., O'Neill, R.; Martín; M., Roche, R. & González, J. (2011). Amperometric glucose microbiosensor based on a Prussian Blue modified carbon fiber electrode for physiological applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 152(2), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.11.056>
- Straits Research (2024). Informe de análisis de tendencias, participación y tamaño del mercado de biosensores por tecnología (térmica, electroquímica, piezoeléctrica, óptica), por aplicación (médica, toxicidad alimentaria, biorreactor, agricultura, medio ambiente), por usuario final (diagnóstico de atención médica en el hogar, pruebas POC, industria alimentaria, laboratorios de investigación, seguridad y biodefensa) y por región (América del Norte, Europa, APAC, Medio Oriente y África, LATAM) Pronósticos, 2024-2032. *Biosensors Market*. SRMD1555DR. <https://exactitudeconsultancy.com/es/informes/24967/mercado-debiosensores/>
- Stoisser T., Brunsteiner M., Wilson D. & Nidetzky B. (2016). Conformational flexibility related to enzyme activity: evidence for a dynamic active-site gatekeeper function of Tyr215 in *Aerococcus viridans* lactate oxidase. *Scientific Reports*, 6(1), 27892, 1 – 13. <http://dx.doi.org/10.1038/srep27892>
- Talbert, J. & Goddard, J. (2012). Enzymes on material surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 93, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.003>
- Taurino, I., Reissb, R., Richterb M., Fairheadb M., Thöny, L., De Michelia G., & Carrara, S. (2013). Comparative study of three lactate oxidases from *Aerococcus viridans* for biosensing applications. *Electrochimica Acta*, 93, 72– 79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.01.080>
- Trifonov, A., Stemmer, A., & Tel-Vered, R. (2019). Enzymatic self-wiring in nanopores and its application in direct electron transfer biofuel cells. *Nanoscale Advances*, 1(1), 347 – 356. <https://doi.org/10.1039/C8NA00177D>
- Umena Y., Yorita K., Matsuoka T., Kita A., Fukui K., & Morimoto Y. (2006). The crystal structure of L-lactate oxidase from *Aerococcus viridans* at 2.1 Å resolution reveals the mechanism of strict substrate recognition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350(2), 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.09.025>
- Vazquez, R., Aguila, A., Arrocha, A., & Ayala, M. (2013). QM/MM Molecular Modeling and Marcus Theory in the Molecular Design of Electrodes for Enzymatic Fuel Cells. *ChemElectroChem*, 1(3), 496–513. <https://doi.org/10.1002/celec.201300096>
- Yorita, K., Matsuoka, T., Misaki, H., & Massey, V. (2000). Interaction of two arginine residues in lactate oxidase with the enzyme flavin: Conversion of FMN to 8-formyl-FMN. *Biochemistry PNAS*, 97(24), 13039 – 13044. <https://doi.org/10.1073/pnas.250472297>
- Zhu, C., Wu, Q., Yuan, F., Liu, J., Wang, D., & Zhang, Q. (2023). Novel Electrochemical Sensor Based on MnO<sub>2</sub> Nanowire Modified Carbon Paper Electrode for Sensitive Determination of Tetrabromobisphenol A. *Chemosensors*, 11 (9), 482, 1 – 12. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11090482>