



Universidad
Zaragoza



DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA DE ACETILCOLINA. PRIMEROS PASOS HACIA EL DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ÓPTICO

Trabajo Fin de Grado en Química

Paloma López González



Departamento de Química Analítica

Grupo de Biosensores Analíticos (GBA)

Directora: Susana de Marcos Ruiz

A mis padres y Rebe, por estar siempre. A Mario, Cris y todos mis compañeros de biblioteca.

A Susana y al resto del grupo de Biosensores Analíticos, gracias por ayudarme y enseñarme tanto.

Este trabajo ha sido subvencionado con cargo a los proyectos CTQ 2016-76846-R del
MINECO.

Abstract

The main target of this work is the optimization of an enzymatic optical biosensor for the determination of acetylcholine. The method is based on the coupling of two enzymatic reactions. First, acetylcholine is hydrolyzed to choline and then choline is oxidized. Choline oxidase is the responsible for the oxidation step. As long as this enzyme is a flavoenzyme, its fluorescent properties will be used as an analytical parameter for acetylcholine detection.

This method allows the determination of acetylcholine in batch within a linear range from $2,86 \cdot 10^{-6}$ M to $1,60 \cdot 10^{-5}$ M for and a range from $8,39 \cdot 10^{-7}$ M to $1,6 \cdot 10^{-5}$ M for continuous monitoring.

Once it has been demonstrated that the analytical method is optimized, it can be used to develop an enzymatic biosensor for acetylcholine determination, first steps towards its development have been given through the immobilization of choline oxidase in a polyacrylamide film. It has been probed to activity of the immobilised enzyme (detecting hydrogen) but without the desired sensitivity.

Therefore, studies of the fluorescence variation for FAD shall be done with modifications in the immobilization protocol of choline oxidase.

Resumen

El objetivo del presente trabajo es la optimización de un método analítico para la determinación del neurotransmisor acetilcolina y dar los primeros pasos hacia su implantación en un biosensor óptico. El método está basado en el acoplamiento de dos reacciones enzimáticas. La primera es una hidrólisis del analito en la que se obtiene colina y la segunda la oxidación de la colina. La enzima responsable de la oxidación, la colina oxidasa, es una flavoenzima y son sus propiedades de fluorescencia las que se utilizan como parámetro analítico de cuantificación.

Se han obtenido características analíticas del método tales como el rango lineal: para trabajar en continuo (desde $9,54 \cdot 10^{-6}$ M hasta $1,60 \cdot 10^{-5}$ M) y en discontinuo (desde $3,70 \cdot 10^{-6}$ M hasta $1,6 \cdot 10^{-5}$ M).

Una vez optimizado el método analítico de determinación de acetilcolina en disolución y comprobado que es posible utilizar esta metodología para el desarrollo de un biosensor enzimático para la determinación de acetilcolina, se han dado los primeros pasos en el desarrollo de una lámina sensora mediante el entrapamiento de colina oxidasa en una lámina de poliacrilamida. Se ha comprobado la actividad de la enzima inmovilizada en la lámina mediante la detección de peróxido de hidrógeno (que es un subproducto de su reacción), pero sin la sensibilidad adecuada.

Por ello, estudios posteriores deberán abordar la modificación del procedimiento de inmovilización de la enzima para el correcto seguimiento de los cambios en la señal fluorescente del FAD de la ChOx en la lámina sensora.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Acetilcolina	1
1.2. Determinación enzimática de acetilcolina	1
1.3. Colina oxidasa: seguimiento de la reacción por el FAD	2
1.4. Acetilcolina esterasa	2
1.5. Biosensor	3
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO	5
3. PARTE EXPERIMENTAL	6
3.1. Reactivos y disoluciones.....	6
3.1.1. Reactivos y disoluciones generales	6
3.1.2. Enzimas	6
3.1.3. Analitos	6
3.2. Instrumentación y material.....	6
3.2.1. Instrumentación y material general.....	6
3.2.2. Instrumentos:	6
3.3. Celda de flujo	7
3.3.1. Preparación de la lámina de enzima inmovilizada	7
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
4.1. Estudios previos: determinación de colina	9
4.2. Acoplamiento de las dos reacciones enzimáticas.....	11
4.3. Optimización del pH.....	12
4.4. Optimización de la concentración de enzima.....	13
4.4.1. Recta de calibrado: una alícuota	15
4.4.2. Recta de calibrado: varias alícuotas	16
4.4.3. Comparación rectas 5U: una alícuota y varias.....	17
4.5. Desarrollo del biosensor óptico.....	18
4.5.1. Variar el espesor de la lámina	20
4.5.2. Variar las condiciones de flujo	21
5. CONCLUSIONES	23
6. BIBLIOGRAFÍA	24
7. ANEXOS	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Acetilcolina

La acetilcolina (ACh en adelante) es un éster de colina y ácido acético. Juega un papel importante como neurotransmisor en el sistema nervioso central. Se almacena en las células del cerebro y se libera en el espacio sináptico por estimulación. ACh está relacionada con el aprendizaje y la memoria. La determinación de ACh es clínicamente muy importante pues está relacionada con desórdenes neuronales como el Alzheimer (AD) o la demencia¹.

La monitorización en tiempo real de los cambios de concentraciones extracelulares de ACh podrían permitir entender su función en el sistema nervioso y su relación con el AD, examinar la degradación de los sistemas neurales colinérgicos en el AD y evaluar los fármacos que afectan a la actividad colinérgica a nivel celular. Los métodos actuales para hacer esta determinación, como ELISA, muestreo por microdiálisis acoplado con análisis offline mediante cromatografía líquida y detección por espectroscopía de masas; son laboriosos, caros, lentos e inadecuados para la monitorización in situ².

1.2. Determinación enzimática de acetilcolina

Los métodos enzimáticos más utilizados para la detección de la acetilcolina combinan la acción de dos enzimas. Estas enzimas son la acetilcolina esterasa y la colina oxidasa.

La reacción transcurre pues en varios pasos. Primero tiene lugar la hidrólisis de la acetilcolina, catalizada por la acetilcolina esterasa, para dar colina y acetato. Posteriormente, la colina se oxida a betaína cediendo sus electrones al FAD de la colina oxidasa. Esta última se regenera a la forma oxidada gracias al oxígeno presente en disolución, dando lugar a peróxido de hidrógeno.

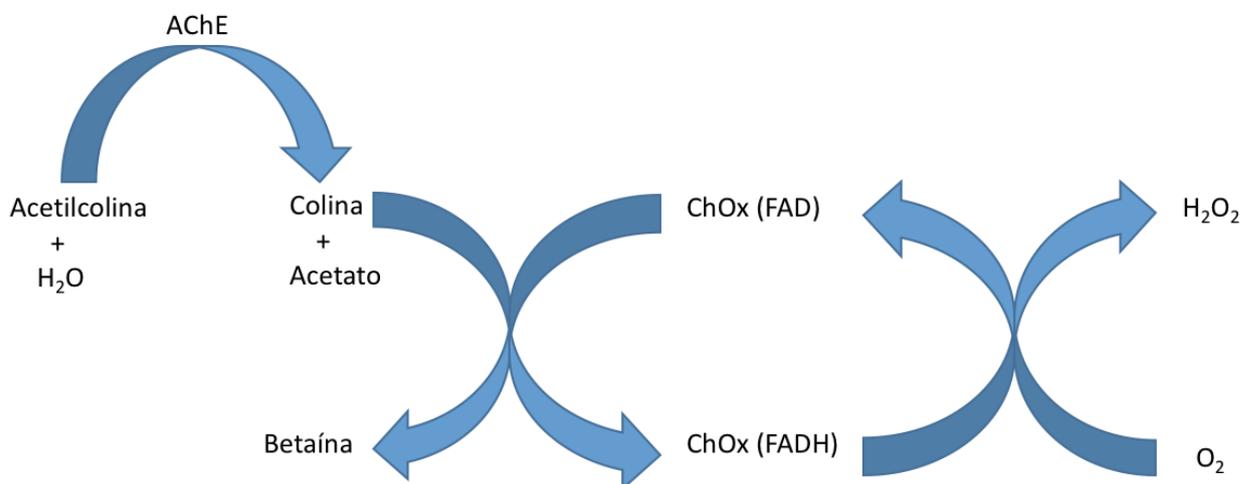


Figura 1.1. Reacciones acopladas para la determinación enzimática de acetilcolina.

1.3. Colina oxidasa: seguimiento de la reacción por el FAD

Las flavoenzimas son una familia de enzimas que poseen un grupo flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor y catalizan reacciones de oxidación usando O_2 como aceptor de electrones. En general³:

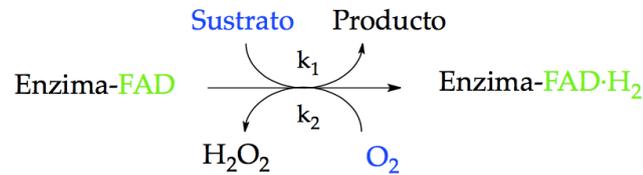


Figura 1.2. Esquema general de la reacción de flavoenzimas

Las flavoenzimas presentan absorción y fluorescencia en la zona del visible debido al cofactor FAD.

Estas propiedades dependen del estado de oxidación del cofactor (FAD o FADH₂) y, en menor medida, del entorno. Desde el punto de vista analítico, son especialmente interesantes las propiedades de fluorescencia. A grandes rasgos, se puede resumir en que la forma oxidada del FAD es fluorescente, mientras que la forma reducida lo es muy débilmente. En consecuencia, la reducción del FAD y su posterior reoxidación durante la reacción enzimática con el sustrato inducen unas variaciones en la intensidad de fluorescencia que se pueden relacionar empíricamente con la concentración de sustrato, y emplear como base de un biosensor óptico.

El mecanismo de variación de fluorescencia está directamente relacionado con el mecanismo a través del cual varían las concentraciones de FAD y FADH₂ (o FAD_{red}) durante la reacción enzimática y, por lo tanto, con la relación entre las constantes cinéticas k_1/k_2 (figura 1.1.)⁴.

La ChOx es la enzima que se va a utilizar para seguir la variación de la fluorescencia y por tanto la reacción. Sigue un mecanismo tipo I, lo que supone que la reacción de reducción es considerablemente más rápida que la de regeneración ($k_1 \gg k_2$), de tal forma que mientras haya sustrato presente todo el FAD está reducido. A partir del momento en el que el sustrato se haya consumido completamente, se observará la oxidación del FAD.

1.4. Acetilcolina esterasa

Es una enzima que actúa en el sistema nervioso central y periférico que actúa junto al receptor de acetilcolina (ACh) en la transmisión de potenciales de acción a través de las sinapsis nervio-nervio y las sinapsis neuromusculares. Su tarea fisiológica es la destrucción del neurotransmisor catiónico ACh.

Para su sustrato fisiológico, ACh, tiene un número de recambio $K_{ES} > 10^8 M^{-1} s^{-1}$, es decir, la difusión de ACh al centro activo de la enzima es probablemente el paso determinante de la velocidad de reacción⁵.

1.5. Biosensor

Un sensor químico es un dispositivo capaz de transformar la información química sobre un compuesto (analito) en información analítica útil⁶. Será sensor óptico cuando esta transformación se lleva a cabo a través de las propiedades ópticas del sistema sensor. Si la información química está basada en un mecanismo bioquímico, como es el caso, el sensor recibe el nombre de biosensor. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define biosensor⁷ como un dispositivo basado en las reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células completas para detectar compuestos químicos a través de señales eléctricas, térmicas u ópticas).

En la siguiente figura, podemos observar esquemáticamente el funcionamiento de un biosensor.

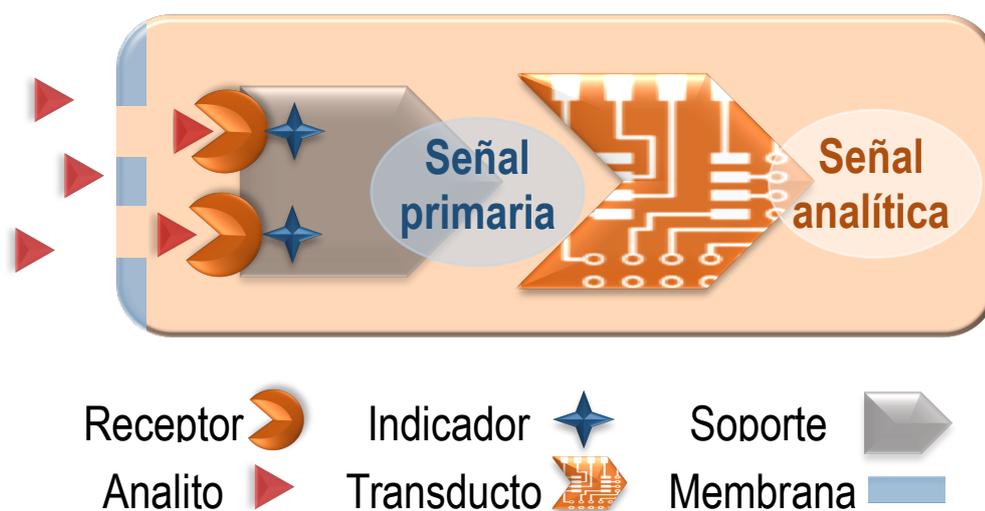


Figura 1.4. Esquema de un biosensor óptico⁸

- Primera etapa: el analito reacciona de forma selectiva con el receptor generando una señal específica que es transmitida al transductor físico-químico.
- Segunda etapa: la señal que proviene de la interacción con el analito es convertida en señal eléctrica, que es el modo de entrada al siguiente componente.
- Tercera etapa o *etapa de conversión* a señal analítica útil.
- Cuarta etapa o *etapa de regeneración*, el dispositivo retorna a la situación química inicial, de tal forma que puede ser empleado para un nuevo ciclo de reacción con el analito.

Las principales características que se buscan a la hora de seleccionar un receptor son selectividad, estabilidad y rango amplio de respuesta. Además será determinante su capacidad autoindicadora, que sea simple, robusto y reutilizable.

El proceso de inmovilización del biorreceptor sobre el soporte sólido va a determinar, principalmente, el tiempo de respuesta y la estabilidad del biosensor⁹.

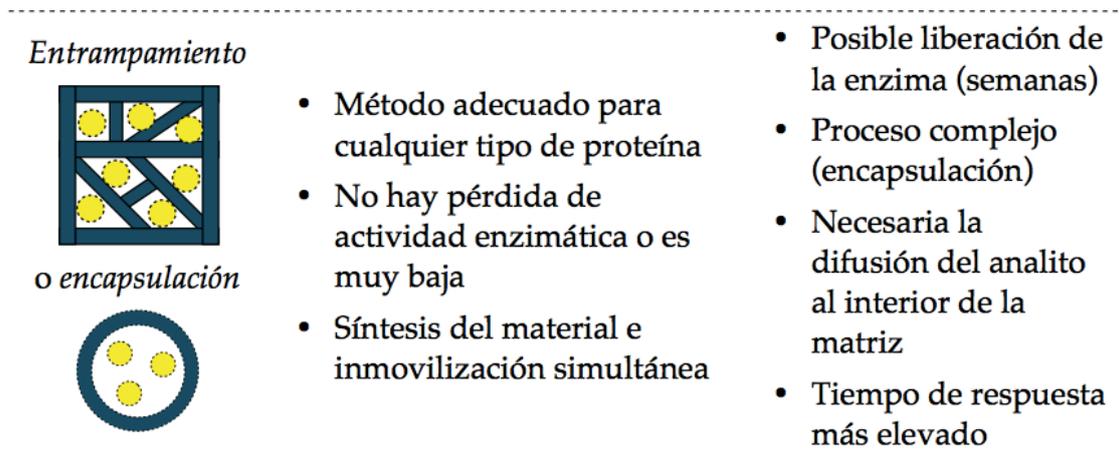


Figura 1.4. Esquema de las propiedades del método de entrapamiento o encapsulación de la enzima

Una de las principales ventajas de las matrices poliméricas está en que la inmovilización del biorreceptor se puede realizar de forma simultánea a la formación del material lo cual implica menos etapas de síntesis e inmediatez.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

Tal y como se ha descrito en la introducción, la determinación de acetilcolina de forma rápida, sencilla y continua es un tema de interés bioclínico. Así pues, el objetivo principal de este trabajo es la puesta a punto de una metodología analítica adecuada para la determinación del neurotransmisor acetilcolina y dar los primeros pasos hacia su implantación en un biosensor óptico. El método estará basado en el acoplamiento de dos reacciones enzimáticas, la primera una reacción de hidrólisis para liberar colina y la segunda para la oxidación enzimática con colina oxidasa, una flavoenzima, cuyas propiedades de fluorescencia se utilizarán como parámetro analítico de cuantificación.

En concreto se propone:

1. Estudio de la reacción enzimática en disolución de ChOx con colina y el seguimiento de la reacción a través de las propiedades espectroscópicas del FAD de la ChOx.
2. Acoplar la reacción enzimática de la ChOx y la AChE para la determinación de acetilcolina y la posibilidad de realizar el seguimiento de la reacción a partir de las propiedades espectroscópicas de la ChOx.
3. Optimización de los parámetros de la reacción en disolución: tamaño de la cubeta, pH, concentración de enzima.
4. Evaluar las características analíticas del método que se desarrolle.
5. A partir de la metodología que presente mejores prestaciones analíticas, desarrollar una lámina sensora, mediante la inmovilización de la enzima seleccionada, que sirva como base para el desarrollo del biosensor.
6. Acoplar la lámina sensora para la determinación en continuo de la acetilcolina.
7. Evaluar las posibilidades analíticas de la lámina sensora para la determinación del analito.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos y disoluciones

3.1.1. Reactivos y disoluciones generales

- Disolución amortiguadora CO_3^{2-}/HCO_3^- 0,1M pH=9 y pH=10. Se prepara disolviendo 3,18g de Na_2CO_3 (105,99g/mol) en 300 mL de H_2O miliQ y ajustando el pH con una disolución HCl 1M.
- Disolución amortiguadora $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0,1M pH=6, pH=7 y pH=8. Se prepara disolviendo 2,13g de NaH_2PO_4 (120g/mol) en 50mL de H_2O miliQ y se ajusta el pH con una disolución de NaOH 2M.
- Disolución de persulfato amónico ($(NH_4)_2S_2O_8$) 4% (w/v): Se prepara disolviendo 40mg de persulfato amónico (A3678 Sigma) en 1mL de H_2O miliQ.
- Disolución comercial de N,N,N',N'-Tetrametietilenodiamina (TEMED), Biorad.

3.1.2. Enzimas

- Colina oxidasa (ChOx), 15U/mg sólido (Alcaligenes sp.) (EC 1.1.3.17) (Sigma-Aldrich 56485-1G)
- Colina esterasa (AChE) tipo V-S, 987U/mg sólido (Electrophorus electricus, electric eel) (Sigma-Aldrich C2888)

3.1.3. Analitos

- Cloruro de Colina, $(CH_3)_3N(Cl)CH_2CH_2OH$, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich C7017)
- Cloruro de Acetilcolina $(CH_3)_3N^+ CH_2CH_2OCO CH_3Cl^-$, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich A6625)

3.2. Instrumentación y material

3.2.1. Instrumentación y material general

- pH-metro CRISON, Basic 20, para la realización de las medidas del pH
- Balanza analítica de precisión. GR-202-EC (máximo 210mg, mínimo 1mg)
- Agitador magnético A-01, SBS.
- Micropipetas de volumen variable: Socorex (5 – 50 μ L, 10 – 100 μ L y 100 – 1000 μ L), Pipetman Gilson (2 – 20 μ L, 50 – 200 μ L y 200 – 1000 μ L), Eppendorf Research plus (10 – 100 μ L, 30 – 300 μ L y 100 – 1000 μ L)
- Matraces de 10mL y 25mL
- Vasos de precipitados de 100mL y 300mL.
- Material desechable: tubos eppendorf, pipetas pasteur, puntas de micropipetas.

3.2.2. Instrumentos:

Espectrofotómetros de fluorescencia:

Las medidas de fluorescencia se hicieron con un espectrofotómetro Time Master Photon Technology International (PTI) modelo TM-2/2003-PTI que permite medir entre 190-900nm. Dicho espectrofotómetro se muestra en la figura 3.1, así como los adaptadores intercambiables que permiten medir en cubeta (a) y en celda de flujo (b).

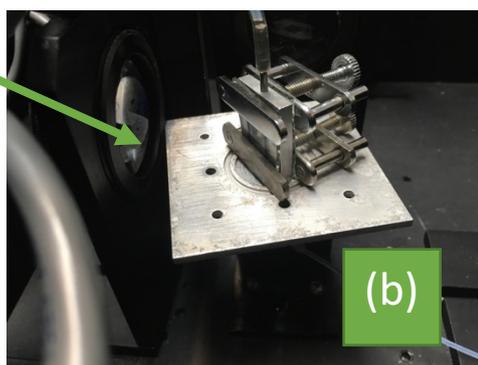
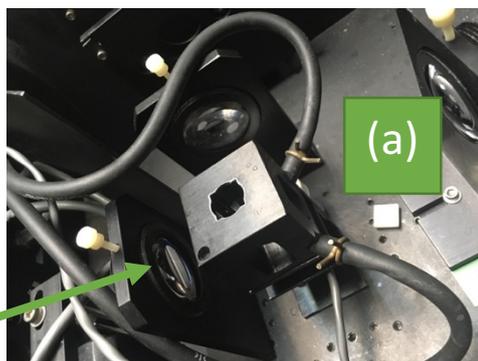
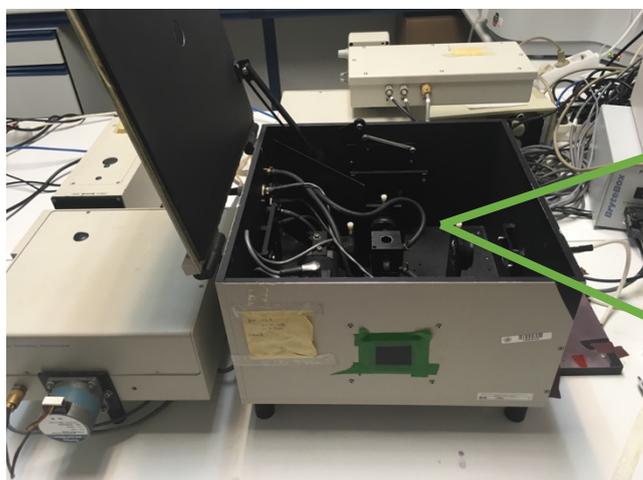


Figura 3.1. *Espectrofotómetro con adaptadores intercambiables para (a) cubeta (b) celda de flujo*

Puntualmente se hicieron medidas de fluorescencia en Cary Fluorescence Spectrophotometer de Agilent technologies, modelo Eclipse, que permite medir entre 190-900nm.

3.3. Celda de flujo

Las medidas en continuo se realizan en una celda de flujo (b). En el compartimento de muestra, se sustituyó el compartimento de cubeta por la celda de flujo (Figura.3b) en el espectrofotómetro para medir con este dispositivo. La entrada y salida a la celda es mediante tubos controlados por una bomba que permite regular el flujo de disolución que se hace pasar a través de la lámina. Así se consigue realizar las medidas en continuo.

3.3.1. Preparación de la lámina de enzima inmovilizada

Para preparar el biosensor de medida en flujo continuo se lleva a cabo el entrapamiento de la enzima de interés en una lámina de poliacrilamida. De todos los métodos de inmovilización de enzimas (adsorción, unión covalente, entrapamiento...), se ha visto que el mejor resultado tanto por eficacia de inmovilización como por accesibilidad al centro activo, es el entrapamiento de la proteína en una lámina de poliacrilamida (PAA). El protocolo seguido es el siguiente:

- En un eppendorf se pesan 75mg de acrilamida (A3553 Sigma), 5 mg de N,N'-Metilenbisacrilamida (M7279 Sigma), 4mg de colina oxidasa y se disuelven con
- 400 μ L de disolución amortiguadora de carbonatos pH=9.
- Se añaden 5 μ L de persulfato amónico 4% (w/v).
- Se desoxigena la muestra borboteando N₂ durante 2 minutos.
- Se añaden 2 μ L de TEMED.
- Se deposita la mezcla en el molde y se tapa con un porta para evitar la entrada de O₂ en la mezcla de reacción.
- Se deja polimerizar durante 2h.
- Se recoge la lámina obtenida en un vial con tampon de carbonatos de pH=9 y se guarda en la nevera.
- Se deja reposar 24h para que el exceso de enzima que no ha sido entrampada pase a la disolución.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudios previos: determinación de colina

Teniendo en cuenta que el objetivo principal del trabajo es dar los primeros pasos hacia el desarrollo de un biosensor óptico enzimático para la determinación de acetilcolina mediante dos reacciones enzimáticas acopladas, se va a comenzar con el seguimiento de la reacción de la ChOx. Son las propiedades espectroscópicas de esta enzima las que nos van a permitir el seguimiento. Así pues, estos estudios previos se basarán en trabajos previos en los cuales se determinaron las condiciones óptimas de reacción de la ChOx.

Estas condiciones son pH=9 y una concentración de enzima de 2U/mL.

En primer lugar, se hacen espectros de excitación y de emisión de fluorescencia para comprobar cuáles son los valores óptimos de longitud de onda para cada uno de estos parámetros.

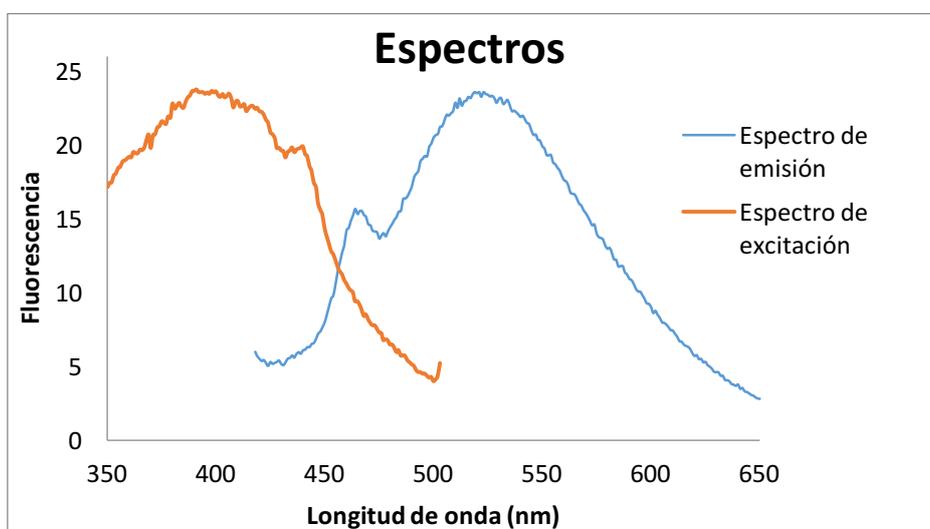


Figura 4.1. Espectro de excitación ($\lambda_{em}=520nm$) y de emisión ($\lambda_{ex}=400nm$) de fluorescencia de ChOx 2U/mL

En la figura se observa que ChOx presenta un máximo de excitación a 400nm y un máximo de emisión a 520nm. Concierten con las longitudes de onda que se esperan para el FAD presente en la enzima.

Una vez establecidas las condiciones de medida, se hace un estudio cinético con una disolución de colina de $3,93 \cdot 10^{-5}M$.

En primer lugar se elegirá el tipo de cubeta a utilizar. Para ello se va a probar una cubeta de $50\mu L$ y otra de 3mL. Este estudio pretende comprobar si se puede trabajar en una cubeta más pequeña de lo habitual y así conseguir reducir el consumo de reactivos en cada ensayo. El resultado fue el siguiente:

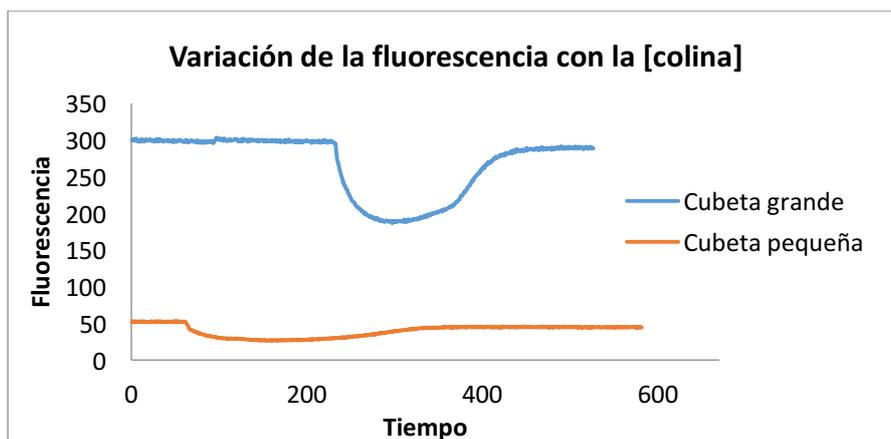


Figura 4.2. Estudio cinético en diferentes cubetas ($\lambda_{em}=520nm$) ($\lambda_{ex}=400nm$)

En la figura se observa que en cubeta grande se obtiene una respuesta óptima del sistema: una mayor intensidad de la señal de fluorescencia, un descenso de la fluorescencia en función del tiempo más rápido y una mayor altura de la curva que se dibuja.

El principal problema en la cubeta de $50\mu L$ es la imposibilidad de agitación. Esto lleva a una dependencia de la velocidad de difusión de los reactivos para que tenga lugar la reacción y, como se ha visto, a peores resultados.

Así mismo, con el fin de buscar una minimización de la cantidad de reactivos utilizados, también se hicieron una serie de pruebas en placas de 96 pocillos. Debido a la fluorescencia emitida por la propia placa en el rango de longitudes de onda de interés, se descarta esta posibilidad.

Finalmente se elige la cubeta de 3mL para trabajar y se da por comprobada el tipo de variación de la fluorescencia en el tiempo para la reacción de ChOx con colina.

A partir de estas condiciones se realizó un estudio de calibración para saber el rango de respuesta lineal del método y la capacidad de regeneración de la enzima.

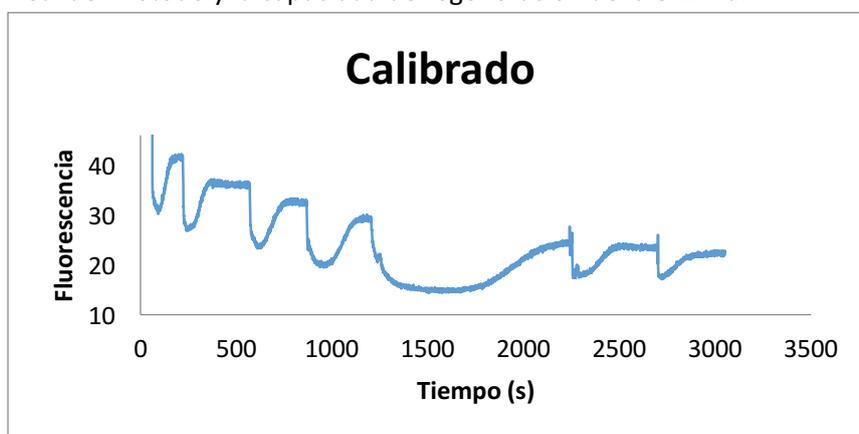


Figura 4.3. Calibración de ChOx en una alícuota ($\lambda_{em}=520nm$) ($\lambda_{ex}=400nm$)

PUNTO	CONCENTRACIÓN EN CUBETA
1	$3,93 \cdot 10^{-6}$
2	$5,24 \cdot 10^{-6}$
3	$7,86 \cdot 10^{-6}$
4	$1,57 \cdot 10^{-5}$
5	$3,93 \cdot 10^{-5}$
6	$1,97 \cdot 10^{-6}$
7	$9,83 \cdot 10^{-7}$

Tabla 4.1. Concentraciones para la calibración con colina

En la figura 4.3 se trabajó con una única alícuota de enzima. En estas condiciones, lo que vemos es la disminución de la señal del FAD. Su capacidad de regeneración viene dada por el oxígeno en disolución. Al aumentar la concentración de analito sobre la misma alícuota, el tiempo de regeneración es mayor porque se va agotando el oxígeno disuelto. Esto ocurre sobre todo a partir de que se consume el oxígeno disuelto, que está en una concentración de $2,2 \cdot 10^{-4} \text{M}$. De esta forma se pueden evaluar las posibilidades de desarrollar una lámina sensora biosensora que sea la base de un biosensor enzimático reversible.

De esta recta de calibrado se concluye que:

- Es posible realizar distintas medidas sobre una misma alícuota de la muestra
- Al llegar a concentraciones del orden de $4 \cdot 10^{-5} \text{M}$, la actividad de la enzima no se llega a saturar (vemos recuperación), pero la reacción se vuelve mucho más lenta.

4.2. Acoplamiento de las dos reacciones enzimáticas

A partir de aquí, se va a comprobar que se puede determinar acetilcolina mediante sus reacciones acopladas con ChOx y AChE. Para ello se mantienen las condiciones óptimas comprobadas para ChOx: pH=9, 2U/mL y longitudes de onda de medida: . Además se añaden 5U/mL de AChE. La concentración de acetilcolina a ensayar es $1,37 \cdot 10^{-5} \text{M}$.

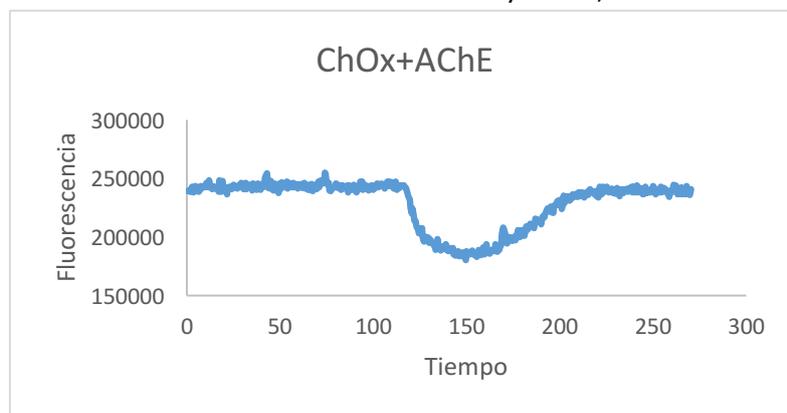


Figura 4.4 Estudio de la variación de fluorescencia con el tiempo para la reacción de acetilcolina en presencia de ChOx y AChE ($\lambda_{em}=520\text{nm}$) ($\lambda_{ex}=400\text{nm}$)

4.3. Optimización del pH

Una vez se ha comprobado el comportamiento de ChOx y de AChE+ChOx, se va a proceder a optimizar el pH para la determinación de la acetilcolina mediante las reacciones acopladas de estas dos enzimas. Se elige un rango de pH desde 6 hasta 10, teniendo en cuenta que en trabajos anteriores del grupo de investigación se ha visto que el pH óptimo para ChOx es 9.

A continuación, se ve la respuesta que dio una muestra de acetilcolina $1,3 \cdot 10^{-5} \text{M}$ en presencia de ChOx 2U/mL y AChE 5U/mL.

En una primera aproximación cualitativa, comparamos la evolución de la fluorescencia en el tiempo de 5 alícuotas de acetilcolina puestas a reaccionar con ChOx y AchE a los pHs antes citados.

Para pH tanto 6 como 7, no se observa una variación de la fluorescencia de la enzima en el momento de añadir el analito, comprobando que la reacción enzimática no tiene lugar, por lo que estos dos pH se descartan.

Para los demás se puede observar a simple vista como, siendo el pH 9 el óptimo, pH 8 y 10 implican un ralentizamiento de la reacción.

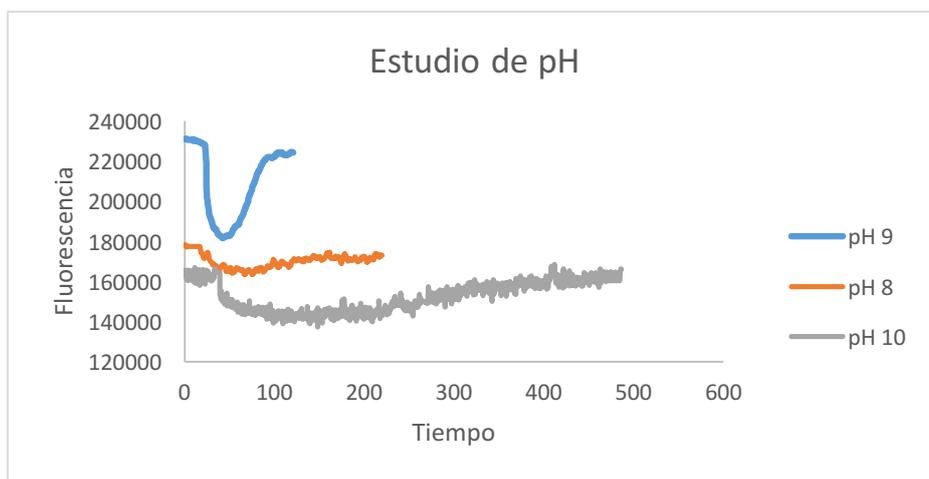


Figura 4.5 Estudio de la variación de señal con el pH ($\lambda_{em}=520\text{nm}$) ($\lambda_{ex}=400\text{nm}$)

De todas formas, dado que el objetivo final es diseñar un método robusto y sensible, además de comparar las velocidades de reacción se van a comparar las intensidades de las señales obtenidas.

La aproximación cuantitativa de este método consiste en la asociación del área de la curva de reacción a una determinada concentración. Más área implica mayor señal y por tanto mayor sensibilidad.

En la tabla 4.2, podemos ver las comparaciones de las áreas de los 3 pH con sus respectivas desviaciones estándar.

	Alícuota 1	Alícuota 2	Alícuota 3	Media	DSR
pH=8	3,88E+05	5,31E+05	5,39E+05	4,86E+05	17,52%
pH=9	2,02E+06	2,14E+06	2,58E+06	2,25E+06	13,23%
pH=10	5,61E+06	4,34E+06	4,04E+06	4,66E+06	17,82%

Tabla 4.2. Áreas de las curvas obtenidas en el estudio de la disminución de fluorescencia frente al tiempo para diferentes pHs.

Se observa un aumento del área conforme se aumenta el pH, siendo un aumento mayor al pasar de pH 8 a 9. La desviación estándar menor la encontramos a pH 9.

Todo esto sumado al hecho de que pH 9 nos ofrece la velocidad de reacción más rápida, hace que se seleccione 9 como pH óptimo de trabajo. Es decir, el mismo pH óptimo que para ChOx a pesar de que no es el pH óptimo de trabajo de AChE.

4.4. Optimización de la concentración de enzima

Es importante que se llegue a un compromiso entre maximización de señal y ahorro de reactivo. Es decir, se quiere seleccionar la mínima concentración de enzima que de una intensidad de señal buena.

Se van a estudiar a pH 9 concentraciones de enzima de 0,5U, 1U, 2U,4U, 5U y 10U para determinar una concentración de acetilcolina de 10^{-5} M. Se presenta la relación de los resultados así como sus desviaciones estándar relativas (Tabla 4.3).

	Área 1	Área 2	Media	DSR (%)
0,5U	2,07E+06	1,86E+06	1,97E+06	7,56
1U	1,60E+06	2,05E+06	1,83E+06	17,44
2U	2,02E+06	2,14E+06	2,08E+06	4,08
4U	1,96E+06	2,20E+06	2,08E+06	8,16
5U	1,79E+06	1,95E+06	1,87E+06	6,05
10U	1,98E+06	2,10E+06	2,04E+06	4,16

Tabla 4.3. Áreas de las curvas obtenidas en el estudio de la disminución de fluorescencia frente al tiempo para diferentes concentraciones de enzima.

Los resultados obtenidos se compararon mediante el test ANOVA y se comprobó que a una probabilidad del 0,05 no hay diferencias significativas entre ellos (Anexo 1).

Para las alturas de los descensos de fluorescencia no se encuentra una relación lógica entre su variación y el número de unidades (Tabla 4.4). En vista a los resultados obtenidos se eligieron las áreas como parámetro analítico por el que seguir la reacción.

	Altura 1	Altura 2	Media	DSR (%)
0,5U/mL	30861	33168	32014	5,10
1U/mL	41009	38708	39858	4,08
2U/mL	35400	42000	38700	12,06
4U/mL	39834	40655	40244	1,44
5U/mL	45029	36573	40801	14,65
10U /mL	61095	55824	58459	6,38

Tabla 4.4. Alturas de las curvas obtenidas en el estudio de la disminución de fluorescencia frente al tiempo para diferentes concentraciones de enzima.

Teniendo en cuenta que se desea utilizar la mínima cantidad de enzima y dado que no había diferencias significativas entre las áreas al variar la concentración de la misma, se decidió hacer un estudio de repetibilidad con 2U/mL y 5U/mL (Tabla 4.5). Se eligió 2U/mL porque dentro de las concentraciones bajas era la que daba las respuestas más rápidas. Se eligió 5U/mL como concentración alta porque la diferencia de velocidad con 10U/mL era muy pequeña y el gasto de reactivo menor. Se comparan las dos concentraciones estudiadas con 10 U/mL en la Figura 4.6.

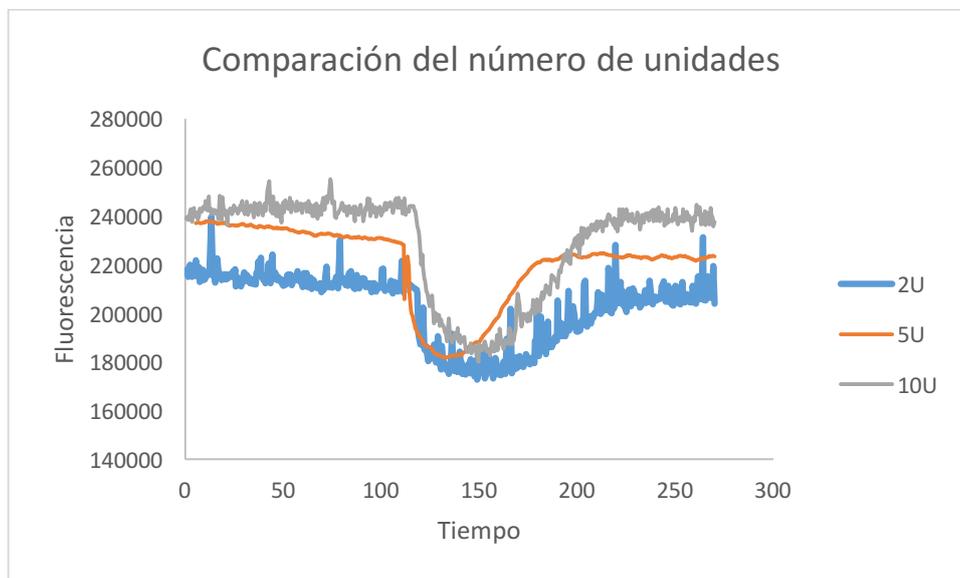


Figura 4.6 Estudio de la variación de señal con la concentración de AChE ($\lambda_{em}=520nm$) ($\lambda_{ex}=400nm$)

	5U/mL	2U/mL
	4,24E+05	3,23E+05
	3,49E+05	4,38E+05
	4,05E+05	4,13E+05
	3,42E+05	3,82E+05
	4,45E+05	5,65E+05
DSR	11,61	21,15

Tabla 4.5. Estudio de repetibilidad a dos concentraciones diferentes de enzima ($\lambda_{em}=520nm$) ($\lambda_{ex}=400nm$). [acetilcolina]= $10^{-6}M$

Se hizo un estudio estadístico de los datos que se muestran en la Tabla 4.5. El test F (Anexo 2) indicó varianzas iguales. El test t (Anexo 3) indicó que no difieren significativamente. Así se demuestra que para concentraciones bajas de analito utilizando concentraciones de AChE de 2 y 5U/mL los resultados no difieren significativamente.

4.4.1. Recta de calibrado: una alícuota

Se quiso comprobar si los resultados difieren significativamente para concentraciones más altas de analito. Por ello se hicieron las calibraciones completas para 2U/mL y 5U/mL.

Cada mezcla enzimática se usa para realizar una calibración entera, es decir, no se reemplaza la mezcla de reacción cada vez que se quiere ensayar una nueva alícuota de analito.

Las concentraciones de analito ensayadas en ambos estudios no fueron exactamente las mismas. En la tabla se indican las que se utilizaron en cada caso.

5U/mL	2U/mL
8,04E-07	/
1,60E-06	1,60E-06
3,20E-06	3,20E-06
7,27E-06	7,27E-06
1,28E-05	1,20E-05
1,60E-05	1,60E-05

Tabla 4.6. Puntos de la recta de calibrado en una alícuota (M)

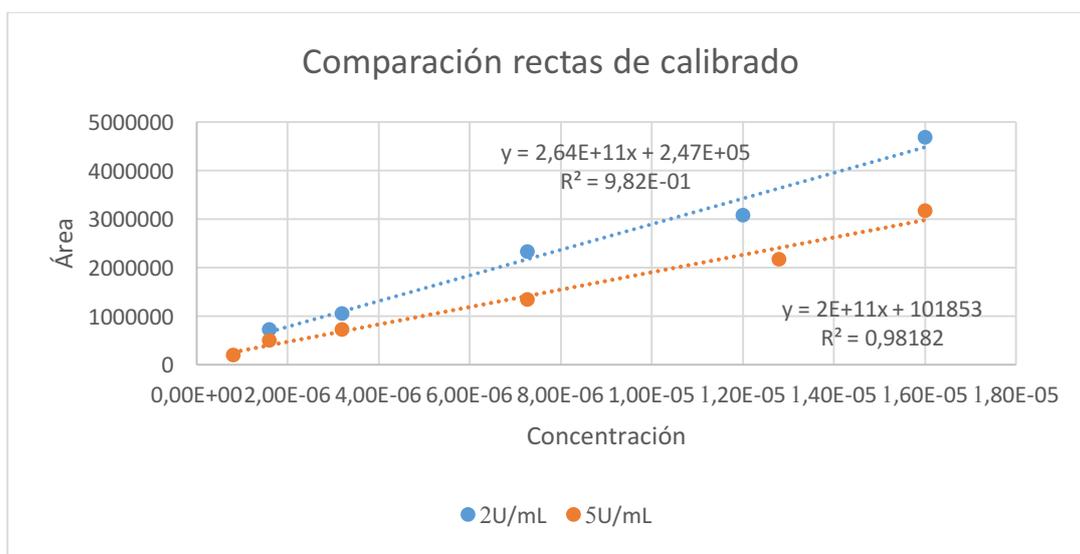


Figura 4.7 Comparación de las rectas de calibrado con diferentes [AChE] ($\lambda_{em}=520nm$) ($\lambda_{ex}=400nm$)

Se observa gráficamente como valores altos de concentración dan valores de área más diferentes que las concentraciones iniciales más parecidas a lo que se habían estudiado en el apartado anterior. No obstante se hizo un estudio de regresión, por mínimos cuadrados, de los resultados obtenidos con ambas concentraciones de enzima (ver figura 4.8). En el Anexo 4 se

puede comprobar que el 1 no se encuentra en el intervalo de confianza de la pendiente de esta recta y por tanto, se puede concluir que son significativamente diferentes.

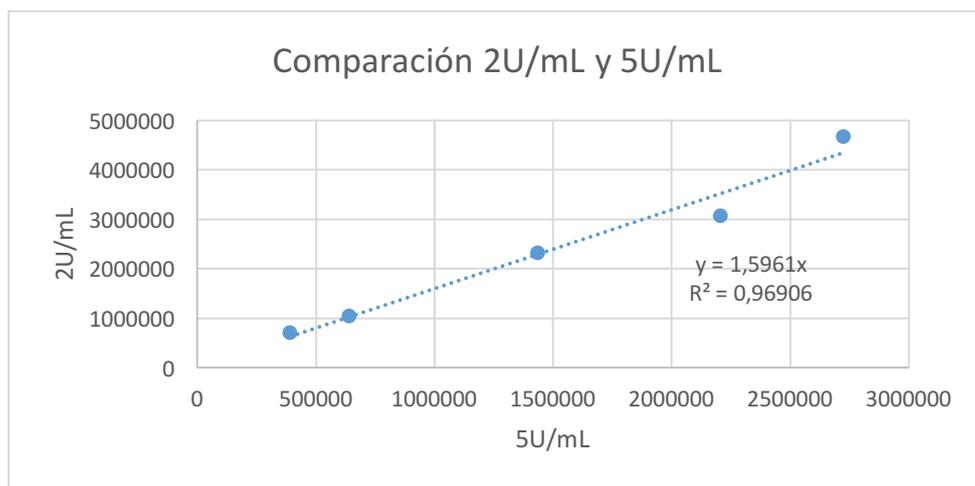


Figura 4.8 Comparación de las áreas de calibrado con diferentes [AChE] ($\lambda_{em}=520nm$) ($\lambda_{ex}=400nm$)

Se hace un estudio de la regresión para la recta de 5U/mL para establecer sus parámetros analíticos en una misma alícuota (Anexo 5). Así, se quiere demostrar la validez del método en cuanto a reversibilidad pues nos interesa a la hora de trabajar en continuo con el biosensor.

LD	LC	Error típico	Rango lineal	
			Desde	Hasta
2,86E-06	9,54E-06	1,71E+05	9,54E-06	1,60E-05

Tabla 4.7. Parámetros analíticos de la recta de calibrado 5U/mL en una alícuota

4.4.2. Recta de calibrado: varias alícuotas

Una vez elegidos estos parámetros, se vuelve a hacer la calibración completa utilizando 5U de AChE. Esta vez, cada punto de la calibración se ensaya en una mezcla de reacción diferente. De esta manera se consigue ver cual es el comportamiento real de la enzima en cada punto, evitando la influencia que tienen alícuotas anteriores en la actividad enzimática relativa.

Así mismo, estos datos servirán para el trabajo en continuo siempre y cuando se deje un tiempo de regeneración entre alícuotas a analizar.

A continuación se presenta la recta obtenida:

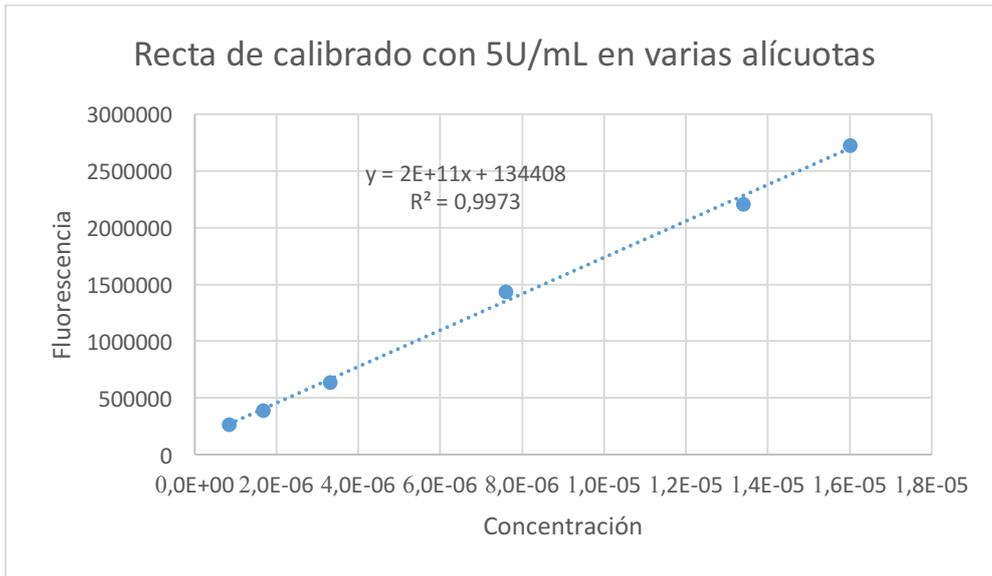


Figura 4.9 Recta de calibrado con diferentes alícuota ($\lambda_{em}=520nm$) ($\lambda_{ex}=400nm$)

Se hace un estudio de la regresión para la recta de 5U/mL para establecer sus parámetros analíticos en diferentes alícuotas (Anexo 6).

LD	LC	Error típico	Rango lineal	
			Desde	Hasta
1,11E-06	3,70E-06	5,92E+04	3,70E-06	1,60E-05

Tabla 4.8. Parámetros analíticos de la recta de calibrado 5U/mL en varias alícuotas

4.4.3. Comparación rectas 5U: una alícuota y varias

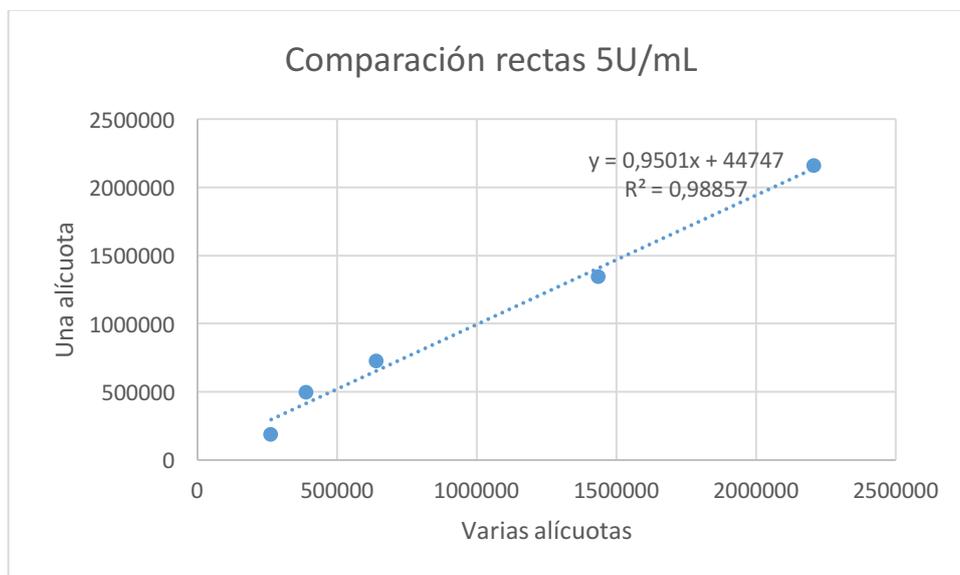


Figura 4.10 Comparación de las áreas de calibrado para una alícuota y varias ($\lambda_{em}=520nm$) ($\lambda_{ex}=400nm$)

Se hizo un estudio de regresión, por mínimos cuadrados, de los resultados obtenidos con ambas concentraciones de enzima (ver figura 4.10). En el Anexo 7 se puede comprobar que tanto el 1 como el 0 se encuentran en el intervalo de confianza de la pendiente de esta recta y por tanto, se puede concluir que son significativamente iguales.

Esto nos permite afirmar que se puede trabajar en continuo tanto en condiciones de regeneración de enzima como no.

4.5. Desarrollo del biosensor óptico

Una vez puesto a punto el método en disolución, se van a dar los primeros pasos hacia el desarrollo del biosensor óptico. Para ello, se debe inmovilizar la enzima en un soporte sólido.

El objetivo es desarrollar una lámina de acrilamida-bisacrilamida en la que estén entrampadas las dos enzimas necesarias para la detección de acetilcolina. El grupo de investigación tiene experiencia en este tipo de inmovilizaciones, por tanto hay detallado protocolos para la formación de láminas¹⁰.

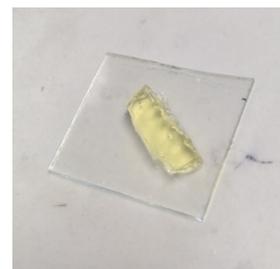


Figura 4.11. Lámina sensora

Se eligió proceder por etapas, de forma que en primer lugar se quiso comprobar la eficiencia de una lámina en la que sólo estuviera entrampada la enzima responsable de la señal analítica. Para ello, se hizo una lámina de ChOx siguiendo el procedimiento optimizados en los estudios anteriores.

El proceso de formación de la lámina consiste en una reacción de polimerización a través de radicales libres. El iniciador utilizado es persulfato amónico y el catalizador es TEMED. El oxígeno tiene una mayor tendencia a formar radicales libre que las amidas, por lo que hay que trabajar en condiciones de ausencia de oxígeno para conseguir que la lámina se forme correctamente.

Inicialmente, se comprobó cualitativamente el funcionamiento de la lámina de la siguiente forma: se depositó una gota de colina a un lado de la lámina y al otro lado se colocó una tira reactiva de peróxidos para comprobar la formación de este compuesto, que como se ha mencionado al principio, es un producto de la reacción enzimática ChOx-colina. De esta manera, se esperaba comprobar la permeabilidad de la lámina y en qué medida tiene lugar la reacción del analito con las enzimas entrampadas. Se observó un color azul en la tira, indicador positivo de peróxidos. De forma que se puede afirmar que la lámina funciona correctamente.

Para la determinación de acetilcolina, se mezcla previamente la AChE y la acetilcolina, de forma que cuando la disolución llega a la lámina ya se ha transformado en colina, esta es la razón por la que este experimento cualitativo se desarrolló de este modo.

El siguiente paso fue comprobar las longitudes de onda de excitación y de emisión del FAD de ChOx. Al analizar la enzima entrampada en un polímero, estos parámetros sufren desviaciones con respecto a los valores observados en disolución. Se vio un máximo de emisión a 530nm y

dos máximos de excitación a 340 y 430nm. Se decidió estudiar ambas longitudes de onda de emisión para comprobar cual proporcionaba mejores resultados.

En los primeros estudios, se colocó la lámina en una cubeta que disponía de una pinza para sostener la lámina en un punto fijo. No se utilizó agitación. La cubeta se rellenó con 3mL de AChE 5U/mL en disolución amortiguadora pH 9. En la figura 4.12 se puede ver la variación de la fluorescencia frente al tiempo que se observó excitando a 430nm para una concentración de analito de $4 \cdot 10^{-4} M$.

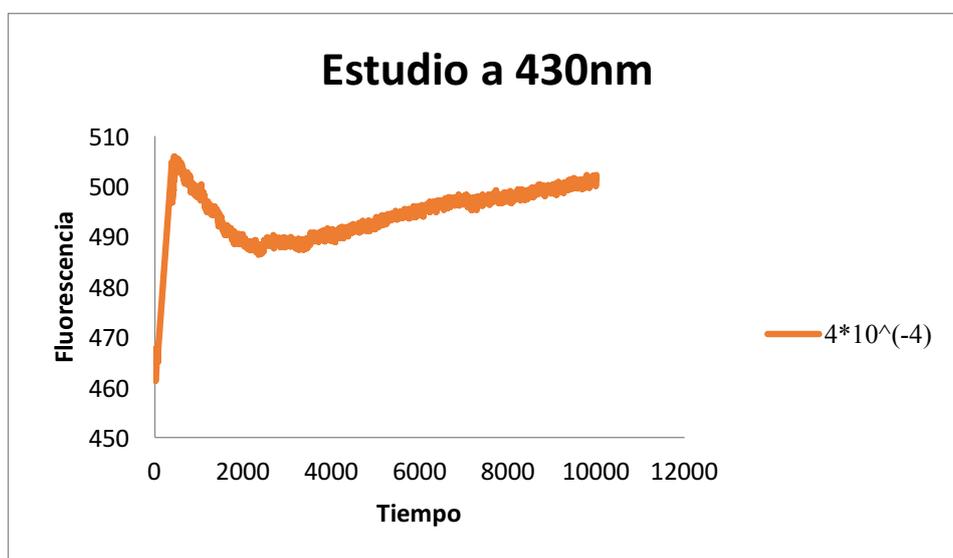


Figura 4.12. Estudio de la variación de la fluorescencia frente al tiempo ($\lambda_{em}=530nm$) ($\lambda_{ex}=430nm$)

En ambas longitudes de onda (340 y 430 nm) se observó el mismo tipo de respuesta. Se ven tiempos muy largos de reacción.

La siguiente etapa de los estudios fue incorporar la lámina en un sistema de Flujo continuo (FIA). Para ello se introdujo la lámina en el dispositivo que se observa en la siguiente figura.



Figura 4.13. Celda de soporte para la lámina

Es un dispositivo que permite acoplarla al espectrofotómetro y a una bomba peristáltica que hace circular disolución amortiguadora de forma continua en el cual se inyecta puntualmente el analito.

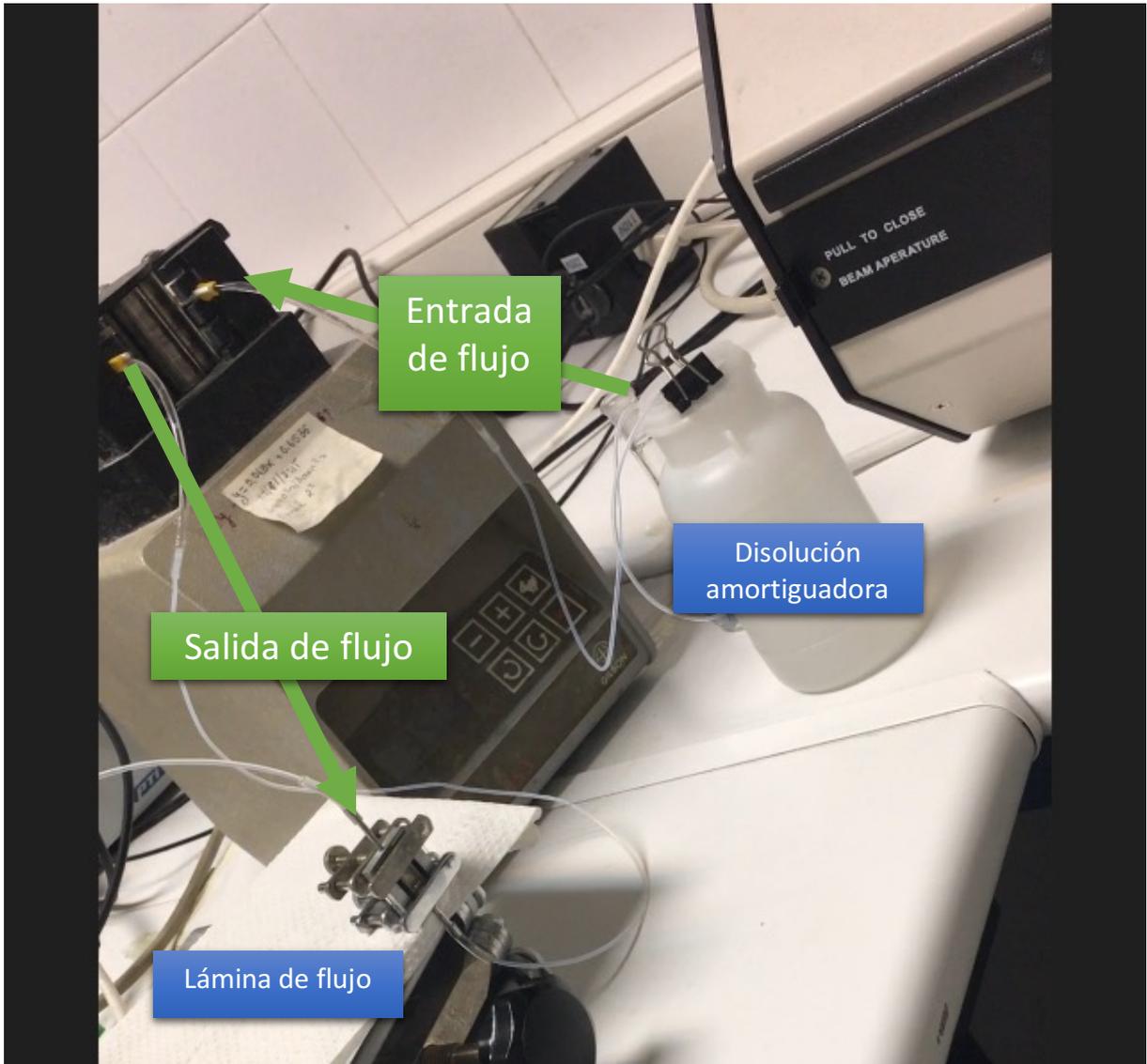


Figura 4.14. Lámina de flujo conectada a la bomba peristáltica

Las primeras medidas de la variación de fluorescencia frente al tiempo, no dieron buenos resultados ya que no se observaron variaciones significativas con la concentración de colina. Para mejorar los resultados se estudiaron las siguientes opciones.

4.5.1. Variar el espesor de la lámina

El molde inicial permitía obtener una lámina de un grosor tal que ocupaba la mitad de la celda. Es decir, la disolución podía atravesar la celda por los márgenes huecos de la lámina además de por el interior, por lo que para aumentar la sensibilidad, se pensó en aumentar el grosor de la misma.

4.5.1.1. Molde de lámina grueso

Se diseñó un nuevo molde de forma que la lámina ocupaba la totalidad de la celda, así el único camino que podía seguir la disolución era atravesando la lámina. Este sistema generaba una

mayor presión en el interior de la celda, por lo que el sistema sellado por pinzas Hoffman no era suficiente para evitar pérdidas de flujo. En las condiciones estudiadas no se consiguió trabajar así sin pérdidas de flujo.

4.5.1.2. Molde de lámina grueso recortado

El siguiente paso fue sustituir la lámina que ocupaba toda la celda, se recortaba manualmente de forma que ocupara casi la totalidad de la celda. De esta forma se evitaban grandes sobrepresiones, pero el grueso del flujo seguía pasando por dentro de la lámina. En este caso se consiguió que el flujo circulara por el sistema sin pérdidas, por lo que fue el elegido para realizar los siguientes ensayos.

4.5.2. Variar las condiciones de flujo

Siempre se utilizó un caudal de 0,5mL/min. En estas condiciones se estudiaron opciones de flujo continuo y de parada de flujo:

4.5.2.1. Flujo continuo

Para trabajar en estas condiciones, se ha de tener en cuenta el tiempo que tarda el líquido que estamos haciendo circular por los tubos en llegar a la lámina y en salir del sistema. En nuestro montaje, estos tiempos eran 1 minuto y medio en llegar a la lámina y 3 minutos en abandonar el sistema. Es necesario medir estos tiempos previamente pues la lámina se encuentra encerrada en el espectrofotómetro y es la única forma de establecer cuando esperar cambios en la fluorescencia.

Así pues, inicialmente se hace circular disolución amortiguadora durante 5 minutos para asegurar que esta recorre todos los tubos e impregna bien la lámina. Después se para la bomba, se conecta el tubo de entrada a una disolución de analito de la concentración deseada y se hace circular durante 4 minutos. Dado que el analito tarda en llegar a la lámina 1 minuto y medio se debería observar una disminución de la fluorescencia a partir de 1 minuto y medio. Para regenerar el sistema se hace pasar disolución amortiguadora de nuevo.

4.5.2.2. Parada de flujo durante 1 minuto

La estrategia es la misma que en flujo continuo sólo que esta vez, cuando ha pasado la mitad de la disolución de analito que se quiere medir, se para la bomba y se deja durante 1 minuto la disolución en contacto con la lámina para asegurarnos de que la difusión tiene lugar correctamente y que la reacción ocurre en una fracción mayor de analito.

Entonces, el procedimiento a seguir es hacer circular la disolución amortiguadora inicial. Después hacer circular el analito 2 minutos, para asegurar que ha llegado hasta la lámina y la ha impregnado bien. Parar el flujo durante 1 minuto. Circular analito 2 minutos más y después disolución amortiguadora otra vez. Se debería observar disminución de la fluorescencia durante la parada de flujo

4.5.2.3. Parada de flujo durante 30 minutos

El mismo procedimiento de parada de flujo que para 1 minuto, pero esta vez la parada de 30 minutos.

4.5.2.4. Parada de flujo durante 1 hora

El mismo procedimiento de parada de flujo visto anteriormente, pero esta vez la parada de 1 hora.

En ninguno de los casos se consiguió ver la disminución de la fluorescencia frente al tiempo esperada. En cada ensayo, se hicieron los ensayos cualitativos pertinentes anteriormente comentados para comprobar el correcto funcionamiento de la lámina. Siempre se observó formación de peróxidos y por tanto, en cada ensayo que se realizó la reacción tuvo lugar.

Estos resultados confirman que aunque la enzima está atrapada y sigue siendo activa, el sistema de medida en flujo no tiene la sensibilidad adecuada para poder realizar el seguimiento de la reacción a través de los cambios en la fluorescencia de ChOx, posiblemente porque no se produce el intercambio de oxígeno suficiente para poder ver los cambios en la forma oxidada y reducida de la enzima. El desarrollo y perfeccionamiento de este biosensor será objeto de posteriores investigaciones.

Como prueba adicional, se decidió sintetizar una lámina en la que estuviera atrapada la ChOx y la AChE para comprobar cualitativamente su funcionamiento. En una primera medida se observa la formación de peróxidos, pero en los ensayos siguientes se observa como la concentración de este compuesto parece que va disminuyendo, lo que puede indicar que la AChE no se queda bien atrapada y se va perdiendo con las medidas. Estos resultados apuntan a que el atrapamiento no es del todo correcto y por tanto se requiere una modificación de las características de la lámina.

5. CONCLUSIONES

A lo largo de la memoria se han visto los resultados más relevantes de cada apartado. A modo de resumen y en base a los objetivos generales que se planteaban al comienzo del trabajo, se concluye que:

1. Se ha comprobado la determinación de colina a partir de las propiedades fluorescentes de la ChOx (FAD): longitud de onda de excitación 450nm y longitud de onda de emisión a 520nm.
2. Se ha comprobado que es posible la determinación de acetilcolina mediante el acoplamiento de la reacción enzimática de la AChE y la ChOx y utilizando las variaciones en la señal fluorescente de la ChOx.
3. Se ha optimizado el método analítico de determinación en disolución de acetilcolina:
 - a. Se ha comprobado que el pH óptimo para llevar a cabo la determinación es 9.
 - b. Se ha estudiado el efecto de la concentración de ACh en la determinación, comprobando que los mejores resultados se obtienen con 5U/mL.
 - c. Se han obtenido las características analíticas del método para trabajar en discontinuo (1 alícuota por medida) o en continuo (medidas sobre una misma alícuota).
 - d. Como característica analítica en discontinuo, un rango lineal de $3,70 \cdot 10^{-6} \text{M}$ hasta $1,60 \cdot 10^{-5} \text{M}$.
 - e. Como característica analítica en continuo, un rango lineal de $9,54 \cdot 10^{-6} \text{M}$ hasta $1,60 \cdot 10^{-5} \text{M}$.
4. Estos resultados han confirmado que es posible utilizar esta metodología para el desarrollo de un biosensor enzimático para la determinación de acetilcolina por lo que se han dado los primeros pasos en el desarrollo de una lámina sensora mediante entrapamiento de la enzima poliacrilamida.
5. Se ha comprobado que la ChOx queda inmovilizada en la lámina de PAA y sigue manteniendo su actividad
6. Se han dado los primeros pasos en el desarrollo de una lámina sensora mediante entrapamiento de la enzima en poliacrilamida siguiendo la reacción por formación de peróxidos.
7. No se ha conseguido la sensibilidad adecuada para el seguimiento de los cambios en la señal fluorescente del FAD de la ChOx en la lámina por lo que estudios posteriores deberán abordar la modificación del procedimiento de inmovilización de la enzima.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. E. Aynaci, A. Yasar, F. Arslanb. *Sensors and actuators*, 202, 1028-1036, **2014**.
2. F. T.C. Moreira, M. G.F. Sale, M. Di Lorenzo. *Biosensors and bioelectronics*. 87, 607-614 **2016**.
3. A. Taneoka, A. Sakaguchi-Mikami, T. Yamazaki, K. Sode, W. Tsuwaga W, *Biosensors and Bioelectronics* 25,76-81, **2009**.
4. M. E. Ortega Castell, *Tesis doctoral*, **2014**.
5. D. M. Quinn, *Chemical Reviews*, 87, 955-979, **1987**.
6. D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson. *Biosensors and Bioelectronics*; 16, 121-131, **2001**
7. A.D. McNaught, A. Wilkinson. *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*: Blackwell Science Oxford; **1997**.
8. J. Galban, V. Sanz, E. Mateos, I. Sanz-Vicente, A. Delgado-Camon, S.d Marcos, *Protein and peptide letters*; 15, 772-778, **2008**
9. A. Sassolas, L.I. Blum, B.D. Leca-Bouvier. *Biotechnology advances*; 30, 489-511. **2012**
10. S. de Marcos, E. Callizo, E. Mateos, J. Galbán, *Talanta*. 122, 251-256. **2014**,

7. ANEXOS

Anexo 1

Análisis de varianza de un factor							
RESUMEN							
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
Fila 1	2	3,93E+06	1,97E+06	2,21E+10			
Fila 2	2	3,65E+06	1,83E+06	1,01E+11			
Fila 3	2	4,16E+06	2,08E+06	7,20E+09			
Fila 4	2	4,16E+06	2,08E+06	2,88E+10			
Fila 5	2	3,74E+06	1,87E+06	1,28E+10			
Fila 6	2	4,08E+06	2,04E+06	7,20E+09			
ANÁLISIS DE VARIANZA							
				F	Probabilidad	crítico para F	
Entre grupos	1,1977E+11	5	2,3953E+10	0,8015616	0,58679956	4,38737419	
Dentro de lo	1,793E+11	6	2,9883E+10				
Total	2,9907E+11	11					
		1,97E+06	1,83E+06	2,08E+06	2,08E+06	1,87E+06	2,04E+06
	1,97E+06	0,00E+00	1,40E+05	-1,15E+05	-1,15E+05	9,50E+04	-7,50E+04
	1,83E+06	-1,40E+05	0,00E+00	-2,55E+05	-2,55E+05	-4,50E+04	-2,15E+05
	2,08E+06	1,15E+05	2,55E+05	0,00E+00	0,00E+00	2,10E+05	4,00E+04
	2,08E+06	1,15E+05	2,55E+05	0,00E+00	0,00E+00	2,10E+05	4,00E+04
	1,87E+06	-9,50E+04	4,50E+04	-2,10E+05	-2,10E+05	0,00E+00	-1,70E+05
	2,04E+06	7,50E+04	2,15E+05	-4,00E+04	-4,00E+04	1,70E+05	0,00E+00
						Mínima diferencia	
						1,04E+06	

Anexo 2

	5U/mL	2U/mL
	4,24E+05	3,23E+05
	3,49E+05	4,38E+05
	4,05E+05	4,13E+05
	3,42E+05	3,82E+05
	4,45E+05	5,65E+05
Varianza	2,09E+09	8,04E+09
S	4,57E+04	8,97E+04
n	4	4
Media	3,93E+05	4,24E+05
Test F	3,85	
Fcrítico	9,60	
Fcrítico > Fexperimental		

Anexo 3

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Variable 1	Variable 2
Media	4,24E+05	3,93E+05
Varianza	8,04E+09	2,09E+09
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	5,06E+09	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	0,69	
P(T<=t) una cola	0,25	
Valor crítico de t (una cola)	1,86	
P(T<=t) dos colas	0,51	
Valor crítico de t (dos colas)	2,31	
El valor crítico es mayor que el experimental por tanto no difieren significativamente		

Anexo 4

Resumen						
Estadísticas de la regresión						
Coefficiente de correlación múltiple	0,9844359					
Coefficiente de determinación R ²	0,969114					
R ² ajustado	0,9588186					
Error típico	325602,8					
Observaciones	5					
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
Regresión	1	9,97953E+12	9,97953E+12	94,131237	0,002325441	
Residuos	3	3,18052E+11	1,06017E+11			
Total	4	1,02976E+13				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	21098,444	282230,6216	0,074756041	0,9451146	-877085,3551	919282,24
Variable X 1	1,5856447	0,163432711	9,702125404	0,0023254	1,065528828	2,1057605
				Si comparamos dos métodos para ver que no tienen diferencias la ordenada en el origen tiene que ser 0 y la pendiente 1. Al menos tiene que salir que el 0 y el 1 están dentro de su intervalo de confianza.		
Análisis de los residuales				Resultados de datos de probabilidad		
<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para</i>	<i>Residuos</i>	<i>Residuos estándares</i>		<i>Percentil</i>	<i>Y</i>
1	640924,02	73687,19869	0,261320378		10	714611,22
2	1035608,7	10031,28999	0,035574435		30	1045640
3	2297440	30370,00219	0,107702567		50	2327810
4	3518974,8	-447614,7894	-1,587397379		70	3071360
5	4340753,7	333526,2985	1,182799998		90	4674280

Anexo 5

Resumen						
Estadísticas de la regresión						
Coefficiente de correlación múltiple	0,990870306					
Coefficiente de determinación R ²	0,981823963					
R ² ajustado	0,977279954					
Error típico	171118,8591					
Observaciones	6					
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
Regresión	1	6,3269E+12	6,32689E+12	216,0699805	0,000124646	
Residuos	4	1,1713E+11	29281663923			
Total	5	6,444E+12				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	101852,5719	109828,825	0,927375595	0,406222726	-203081,1317	406786,2755
Variable X 1	1,79353E+11	1,2201E+10	14,69931905	0,000124646	1,45476E+11	2,1323E+11
Análisis de los residuales						
<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>Residuos estándares</i>			
1	246052,4373	-57487,747	-0,375605909			
2	388817,4781	108682,455	0,710095192			
3	675782,3843	48138,1109	0,314518484			
4	1405749,364	-63269,364	-0,413381087			
5	2397571,821	-236021,82	-1,542088464			
6	2971501,634	199958,366	1,306461783			
			SUMA			
				-5,10703E-15		

Anexo 6

Resumen							
<i>Estadísticas de la regresión</i>							
Coefficiente de correlación múltiple	0,998649717						
Coefficiente de determinación R ²	0,997301257						
R ² ajustado	0,996626571						
Error típico	59228,24427		LD	1,1097E-06			
Observaciones	6		LC	3,6991E-06			
ANÁLISIS DE VARIANZA							
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>		
Regresión	1	5,1854E+12	5,1854E+12	1478,17156	2,73367E-06		
Residuos	4	14031939679	3507984920				
Total	5	5,19944E+12					
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i> <i>superior 95,0%</i>
Intercepción	134407,8755	38308,46144	3,508568877	0,02470385	28046,53527	240769,2158	28046,535 240769,22
Variable X 1	1,60114E+11	4164525704	38,44699679	2,7337E-06	1,48551E+11	1,71676E+11	1,486E+11 1,717E+11
Análisis de los residuales				Resultados de datos de probabilidad			
<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>Residuos estándares</i>	<i>Percentil</i>	<i>Y</i>		
1	268743,1074	-4489,388342	-0,084744851	8,333333333	264253,7191		
2	401797,4312	-10899,27441	-0,205742368	25	390898,1568		
3	662782,4466	-22973,1025	-0,433656438	41,66666667	639809,3441		
4	1351270,524	84323,22523	1,591744496	58,33333333	1435593,749		
5	2279928,861	-73964,02743	-1,396196994	75	2205964,834		
6	2696223,978	28002,56745	0,528596155	91,66666667	2724226,545		

Anexo 7

Resumen							
<i>Estadísticas de la regresión</i>							
Coefficiente de correlación múltiple	0,994268713						
Coefficiente de determinación R ²	0,988570274						
R ² ajustado	0,984760365						
Error típico	101148,1408						
Observaciones	5						
ANÁLISIS DE VARIANZA							
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>		
Regresión	1	2,65466E+12	2,65466E+12	259,47348	0,000520401		
Residuos	3	30692839156	10230946385				
Total	4	2,68535E+12					
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	
Intercepción	-35272,91191	77949,55267	-0,452509485	0,6816211	-283343,1778	212797,354	
Variable X 1	1,040469807	0,064592634	16,10818053	0,0005204	0,834907218	1,246032396	
Análisis de los residuales				Resultados de datos de probabilidad			
<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>Residuos estándares</i>	<i>Percentil</i>	<i>Y</i>		
1	160922,9555	103330,7636	1,179617217	10	264253,7191		
2	482360,7478	-91462,59097	-1,044130937	30	390898,1568		
3	717944,506	-78135,1619	-0,891985881	50	639809,3441		
4	1361536,995	74056,75482	0,845427054	70	1435593,749		
5	2213754,599	-7789,765528	-0,088927452	90	2205964,834		

