



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Carrera: Químico Farmacéutico Biólogo

Reporte de servicio Social

**Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados
en ADN para la detección de fármacos.**

Georgina Alarcón Ángeles

Asesora responsable interna: Dra. Georgina Alarcón Ángeles



Asesora responsable externa: Dra. Marisol Espinoza Castañeda

Alumno: Sergio Juarez Ricardo

Matrícula: 2172033075

Fecha: 07/09/2022

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

Resumen	3
Introducción	3
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
Justificación	5
Metodología	6
Marco teórico	6
Biosensores	6
Transductores	7
Transductores ópticos	7
Transductores Térmicos	7
Transductores piezoeléctricos	8
Transductores electroquímicos	8
Materiales de reconocimiento	10
Inmovilización del ADN	11
Membranas poliméricas	11
Inmovilización no-covalente sobre superficies sólidas	12
Nanomateriales	12
Configuración covalente	13
Electrodos	16
Sensores electroquímicos de ADN	17
Interacciones ADN-analito	18
Unión covalente	18
Unión no covalente	18
Selección y descripción de los componentes del biosensor	19
Procedimiento	22
Funcionalización de MWCNT	22
Anclaje de una TioI-PEG-Amina (TPA)	22
Inmovilización de ADN	23
Modificación de electrodos serigrafiados	24
Conclusiones	24
Bibliografía	25

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

Resumen

El mejoramiento continuo en los procesos de fabricación de biosensores ha hecho que al momento de diseñar un biosensor surja un número muy elevado de posibles biosensores y para que un biosensor sea fácil de preparar y sobre todo de una respuesta rápida, hay que tener en cuenta varios factores con respecto a sus componentes y estructura, ya que son críticos para el correcto funcionamiento del dispositivo final. Es por ello que, en este documento se ha tratado de proponer el diseño de un biosensor de ADN electroquímico con la teoría básica a seguir para su desarrollo. Todo esto a partir de la utilización de nanotubos de carbono de pared múltiple que modifica la superficie de un electrodo de carbono con un método de detección amperométrica por presentar mayor sensibilidad, previamente funcionalizados, inmovilizado en ellos las fracciones de ADN provenientes del esperma de salmón, por medio de la formación de enlaces covalentes obtenidos entre una tiol-PEG-amina (TPA), para un mejor resultado de biosensores altamente sensibles y menos susceptibles al ruido que sean selectivos para fármacos y que su función final sea la de poder detectar cualquier fármaco que tenga alguna interacción con el ADN capaz de producir algún cambio en sus propiedades eléctricas.

Palabras clave: Biosensor; electrodos; nanobiosensor; nanotubos de carbono

Introducción

Mediante amplios estudios bioquímicos y químicos, se han caracterizado varias moléculas (fármacos) que reaccionan con el Ácido Desoxirribonucleico (ADN), algunas de las cuales se utilizan clínicamente como para el tratamiento de enfermedades o mediante su uso de biosensores, mientras que otras aún se encuentran en procedimientos de prueba (Kurbanoglu et al., 2016). La detección de estos fármacos es crucial para evitar riesgos en la salud de la población. Actualmente, existen métodos tradicionales para evaluar la presencia de los mismos, sin embargo, uno de los principales inconvenientes es que frecuentemente se requiere una serie completa de pruebas antes de que cualquier identificación sea confirmada, además, la mayoría de las técnicas son costosas, requieren personal capacitado, alta tecnología y no permiten la monitorización frecuente de los contaminantes muestra sin purificación o preparación previa.

El uso de biosensores brinda ciertas características que son ideales para el monitoreo de fármacos con el potencial de acortar el tiempo de análisis y obtener resultados en tiempo real. Entre las ventajas de los biosensores se destacan: su bajo costo, alta sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, la posibilidad de ampliar la vida media del dispositivo utilizando materiales estables y resistentes; lo que los

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

hace versátiles en el control de procesos; eficientes, ya que disminuyen los tratamientos de las muestras; fáciles de operar y transportar (Fagúndez, 2015).

Dentro de los diferentes tipos de biosensores se encuentran los electroquímicos, siendo la electroquímica una técnica bastante atractiva para desarrollar un sistema analítico a microescala, ya que se puede miniaturizar e integrar fácilmente sin comprometer sus capacidades, incluida la alta sensibilidad, el bajo costo y requerimiento de energía y con ello podemos obtener dispositivos miniaturizados analíticos electroquímicos basados en ADN portátiles deseados para un ensayo más rápido, simple y económico (Zhang, et. al. 2016).

Por otra parte, los nanomateriales se utilizan con frecuencia en la detección electroquímica, ofreciendo importantes oportunidades para la transducción electroquímica de eventos de unión de proteínas y ADN. Su actividad electrocatalítica, gran área superficial y propiedades electrónicas favorables han facilitado el desarrollo de biosensores electroquímicos sensibles. Además, estos biosensores exhiben novedosas propiedades ópticas, electrónicas y mecánicas gracias a su dimensión nanométrica (Artigues & Margalida, 2019).

Dentro de los nanomateriales se encuentran los nanotubos de carbono (CNT, siglas por su nombre en inglés), los cuales han recibido mucha atención para la inmovilización de biomoléculas y en la modificación del electrodo, así como por facilitar la inmovilización del ADN y amplificar la señal de transducción de la interacción. Una gran ventaja de los dispositivos de ADN que tienen CNT ordenados es que solo necesitan una pequeña cantidad de muestra (500µL) (Rafique et al., 2019).

Los biosensores electroquímicos de ADN además de presentar las ventajas mencionadas anteriormente, permiten la realización de un diagnóstico molecular basado en la interacción de fármacos con el ADN ofreciendo así métodos sensibles y cuantitativos para la detección de nuevos fármacos dirigidos al ADN (Kurbanoglu et al., 2016). Además de la detección de fármacos, los biosensores tienen amplias aplicaciones en el monitoreo ambiental, partículas contaminantes, microorganismos, toxinas, virus, enfermedades inmunológicas, procesos enzimáticos, medición de otros analitos, entre otros (Rafique et al., 2019).

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

Objetivo general

Proponer un tutorial (manual de procedimientos) para el diseño y fabricación de un sistema de detección de fármacos.

Objetivos específicos

- Describir el material biológico (ADN) utilizado como sistema de identificación en biosensores electroquímicos y su interacción con fármacos.
- Identificar diferentes tipos de detección electroquímica y evaluar sus ventajas en función de su sensibilidad.
- Comparar los diferentes materiales utilizados en la modificación del electrodo y evaluar su mejora en las características de análisis del dispositivo.
- Discutir la conveniencia del uso de biosensores modificados con nanomateriales.
- Indagar y comprender los principales métodos de inmovilización de ADN utilizados para modificar la superficie del electrodo.
- Mencionar los criterios a considerar para la selección de la técnica de inmovilización del ADN.
- Resaltar las áreas de aplicación para el uso de los biosensores con mayor interés y necesidad.
- Proponer un manual de procedimientos teóricos básicos para el desarrollo de un biosensor de ADN electroquímico mediante la selección de sus componentes.

Justificación

En las últimas décadas, se han desarrollado múltiples fármacos con diferentes efectos farmacológicos, por lo que el estudio de la interacción entre el fármaco y el ADN es de gran importancia debido a la relación que guarda con la actividad carcinogénica, toxicológica o farmacológica de la sustancia de prueba (Kurbanoglu, et al. 2016). En la actualidad los métodos usados para analizar y cuantificar los fármacos requieren de tiempos de análisis largos, personal calificado, además de ser costosos y no respetuoso con el ambiente (Parzanese, 2014). Por otra parte, el desarrollo de dispositivos como los biosensores significa un importante avance tecnológico, ya que en la sociedad en la que vivimos, es cada vez más necesario desarrollar equipos analíticos que sean baratos, portátiles, fiables, selectivos, fáciles de usar y que solo requieren unos pocos microlitros de muestra para determinar parámetros específicos (Jurado, 2015).

Por ello, el objetivo de este proyecto es proponer una metodología teórica básica para el diseño y fabricación de un biosensor electroquímico basado en la interacción de ADN/fármaco, con el fin de presentar una herramienta de gran

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

utilidad en el sector farmacéutico, tanto para el desarrollo de fármacos como para el monitoreo de la terapia de fármacos.

Metodología

Al ser un trabajo de investigación documental, la metodología empleada en la elaboración de este trabajo consistirá en realizar una búsqueda y revisión bibliográfica de publicaciones científicas, utilizando base de datos como BidiUAM, Google Scholar, SCOPUS, Science Direct, SciELO, Science Finder, entre otras.

Se buscarán y utilizarán artículos recientes con no más de 7 años de antigüedad dando prioridad a editoriales de revistas reconocidas. Se incluirán palabras clave en las búsquedas, en inglés y español de acuerdo con nuestros objetivos específicos como: fármacos, ADN, biosensores electroquímicos, electrodos, nano-biosensor, nanotubos de carbono y biosensor.

Marco teórico

Biosensores

Un biosensor es definido en términos generales como un dispositivo analítico capaz de traducir la reacción de reconocimiento molecular del analito, con su receptor específico en una señal que es medida y cuantificada (Torres, 2020). Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, siglas por el nombre en inglés), los biosensores se definen como dispositivos que utilizan reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células enteras, aislados, para determinar compuestos químicos, normalmente con una señal eléctrica, térmica u óptica (Artigues & Margalida, 2019).

Son dispositivos compuestos de tres partes básicas; elementos de reconocimiento biológico unido a un elemento de transducción o sistema detector y el procesador de señales. En conjunto forman una unidad funcional (Fig 1), cuya selectividad viene dada por la parte biológicamente activa (Rafique et al., 2019).

Cuando se lleva a cabo el reconocimiento biológico entre el receptor y el ligando, se producen cambios en diferentes parámetros fisicoquímicos, como cambios de masa, de potencial, de intensidad luminosa, etc, que pueden ser registrados por el sistema transductor, generando una señal asociada a dicha magnitud y es proporcional a la concentración del analito a analizar (Torres, 2020). Por tanto, un biosensor permite medir, cuantificar y analizar en tiempo real un proceso de interacción entre biomoléculas.

Pueden ser clasificados según en función del tipo de receptor inmovilizado; moléculas de ADN, proteínas (enzimas, anticuerpos, péptidos...), molécula artificial

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

(polinucleótidos basados en enlace peptídico (APN)), ribozimas, polímeros de huella molecular o un sistema biológico complejo (célula o tejido) y según el tipo de sistema transductor empleado; Ópticos, Termométricos, Piezoeléctricos y Electroquímicos (Torres, 2020; Artigues & Margalida, 2019).

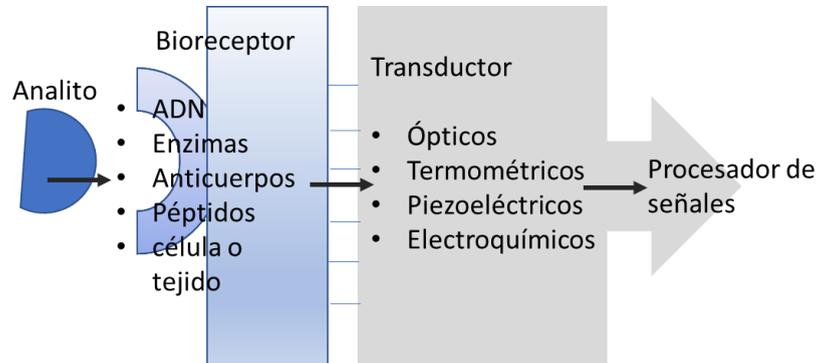


Fig 1. Mecanismo de funcionamiento de un biosensor, incorporando los diferentes componentes que pueden integrarlo. Elaboración propia.

En el siguiente apartado, se explican de forma detallada los distintos tipos de transductores que existen para el desarrollo de biosensores, así como las características de cada uno de ellos.

Transductores

El elemento detector o transductor puede funcionar de forma fisicoquímica (óptica, piezoeléctrica y electroquímica) (Dhar, 2017) y es la parte más cara del dispositivo. Tiene la capacidad de transformar las señales resultantes de la interacción del analito con el material de reconocimiento en una señal fácilmente medible y cuantificable. Están asociados con la electrónica o procesadores de señales y adaptados a los diferentes principios de funcionamiento de los biosensores (Artigues & Margalida, 2019).

Transductores ópticos

Tienen la capacidad de detectar los cambios de intensidad basándose en medir uno o más haces de luz para convertirlos en señales electrónicas (Brasa, 2019). De entre todos los transductores optométricos disponibles, destacan los colorimétricos, los de fluorescencia y los de resonancia del plasmón superficial (SPR, siglas por su nombre en inglés). Éstos proporcionan medidas directas, rápidas y en tiempo real de un gran número de sustancias químicas y biológicas, pero es difícil integrar el bioreceptor y el transductor en un dispositivo miniaturizado, además de su costo elevado (Dhar, 2017).

Transductores Térmicos

Miden los cambios en la temperatura al producirse la reacción biológica entre el analito y el bioreceptor. Se puede correlacionar el cambio de temperatura con la

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

cantidad de reactivos consumidos o con la cantidad de productos formados. Son estables, pero poco específicos (Artigues & Margalida, 2019).

Transductores piezoeléctricos

Reconocen un cambio de peso producido como consecuencia de la reacción biológica de interés y lo convierte en un campo eléctrico. El transductor es un cristal piezoeléctrico (ej: cristales de α -cuarzo), que al ser sometido a una tensión mecánica vibra a una frecuencia determinada y adquiere polarización eléctrica (Uddin Ahmed et. al., 2016).

Transductores electroquímicos

Registran el cambio electroquímico que se produce como consecuencia de la reacción de reconocimiento molecular que es igual a la concentración del analito y se puede medir como corriente o voltaje. Son económicos, portables, de construcción sencilla, permiten la miniaturización del dispositivo y permiten trabajar con muestras complejas sin necesidad de tratar la muestra (Uddin et al., 2016). Su rendimiento depende principalmente del material elegido, la modificación de la superficie y las dimensiones de los electrodos para su capacidad de detección. Se diferencian varios tipos (Torres, 2020):

- A. Amperométricos: Determinan corrientes eléctricas asociadas con los electrones involucrados en los procesos de óxido-reducción. Son los más utilizados por su alta sensibilidad. En él se emplean tres tipos de electrodos, un electrodo de trabajo que generalmente es de oro, carbón o platino (el sensor); un electrodo de referencia de Ag/AgCl el cual sirve para referir y controlar el potencial del electrodo de trabajo, éste se mantiene alejado del sitio de reacción para mantener el potencial conocido y estable. El tercer electrodo, al cual se le conoce como contraelectrodo o electrodo auxiliar, suelen estar fabricados de un material inerte (metal noble o grafito) para evitar su disolución (Torres, 2019). En una reacción bioquímica, el elemento de transducción es el electrodo de trabajo y el contraelectrodo se usa para predecir la conexión de la solución electrolítica (Rafique et al., 2019). Las medidas de corriente siempre se dan entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo (Torres, 2020).

- B. Potenciométricos: Emplean electrodos selectivos a ciertos iones para determinar cambios en la concentración de los iones escogidos (ej. electrodo selectivo a H^+). Está formado por un electrodo selectivo de iones como electrodo de trabajo. Los electrodos más usados son el electrodo de pH, electrodos selectivos a iones como el Na^+ , el K^+ o el NH_4^+ , y electrodos de gases como el de CO_2 (Torres, 2020).

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

- C. Conductimétricos: Miden cambios en la conductancia asociados con cambios en el ambiente iónico de las soluciones utilizando dos electrodos que están separados una cierta distancia. Tienen baja especificidad de la determinación conductimétrica (Dhar, 2017).

Algunas de las ventajas de los biosensores electroquímicos son (Fagúndez, 2015):

- Las medidas electroquímicas pueden ser realizadas en volúmenes pequeños, hasta nanolitros, con relativa facilidad debido a la naturaleza interfacial de la medida electroquímica. Esto hace que tales dispositivos sean especialmente apropiados para la monitorización “*in vivo*”.
- La señal obtenida es eléctrica, y permite la transducción directa de la reacción en la señal de lectura.
- Los límites de detección que se obtienen, (normalmente entre 10^{-9} y 10^{-6} molL⁻¹), son suficientes y adecuados para la detección de numerosos analitos de interés.
- La relativa simplicidad y el bajo coste de la instrumentación electroquímica permiten una fácil disponibilidad de estos dispositivos.

Los transductores electroquímicos tienen dos componentes, la interfase electroquímica y el sistema electrónico:

Interfase electroquímica.

Material o materiales que constituyen el propio transductor y en el que se inmoviliza el bioreceptor sobre su superficie. El uso de nanomateriales metálicos o semiconductores en la interfase electroquímica facilitan el paso de corriente eléctrica por presentar elevada superficie específica aumentando la sensibilidad del biosensor (Artigues & Margalida, 2019).

Sistema electrónico.

El sistema electrónico permite la amplificación y el procesamiento de la respuesta electroquímica generada en la interfase electroquímica proveniente de las reacciones de interés. De este modo, se convierte la respuesta del biosensor en una señal que puede ser interpretada por los analistas. Se compone de un amplificador de señal, un procesador y un monitor en el que se representa la señal medida. Consiste en un instrumento capaz de aplicar un potencial controlado sobre un electrodo (potenciostato) o bien una corriente conocida en la celda electroquímica (galvanostato), permitiendo controlar y medir voltaje, intensidad y cargas, todo conectado a la celda electroquímica en la que tiene lugar la reacción (Artigues & Margalida, 2019).

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

Materiales de reconocimiento

Los elementos de detección o bioreceptores utilizados son derivados de material biológico como tejidos, orgánulos, microorganismos, ácidos nucleicos, anticuerpos, receptores celulares, enzimas, etc., que se unen con el analito de interés (Artigues & Margalida, 2019). Estos elementos de detección forman una capa incorporada a un transductor por inmovilización a través de diferentes medios físicos o químicos (Rafique et al., 2019).

En el caso de biosensores que suelen ser electroquímicos de ácido nucleico los elementos de detección son oligonucleótidos con una secuencia de bases conocida o una cadena relativamente corta de ADN de una sola hebra o de doble hélice en la superficie de un transductor. Estos biosensores se basan en la hibridación de cadenas complementarias altamente específicas de moléculas de ADN o ARN o la unión del analito (especies químicas/bioquímicas) presente en la muestra, en una región específica de la secuencia de la cadena de ADN inmovilizada (Artigues & Margalida, 2019). Las capas de reconocimiento de ácidos nucleicos se pueden sintetizar fácilmente a diferencia de las enzimas o los anticuerpos (Rafique et al., 2019).

El ADN es una biomacromolécula relativamente estable, capaz de sufrir múltiples transformaciones químicas, incluidas las redox. La actividad electroquímica del ADN se basa en la presencia de sitios redox potencialmente disponibles en las bases nitrogenadas (Gobi et al., 2017).

El daño oxidativo en el ADN ocurre fácilmente en la base de guanina porque tiene un alto potencial de oxidación en relación con la citosina, la adenina y la timina. De las cuatro bases que se encuentran en el ADN, solo la oxidación de las bases de purina se puede monitorear electroquímicamente. La razón principal es que, en comparación con las bases de pirimidina, las bases de purina se pueden oxidar a un potencial más bajo. Cuando se añaden radicales hidroxilos a estas bases se forman radicales aductos C4-OH-, C5-OH- y C8-OH-. De estos, los radicales de aducto C4-OH- y C5-OH- pueden sufrir deshidratación y, como resultado, se forman radicales de purina oxidados. Estos radicales nuevamente se pueden convertir en purinas por reducción. El radical aducto C8-OH- sufre una reacción de oxidación-reducción de un electrón y forma 8-hidroxiapurinas y formamidopirimidinas, respectivamente. Cuando la adenina sufre reacciones de oxidación y reducción, se forman 8-hidroxiadenina y 4-6-diamino-5-formamidopirimidina, respectivamente. Se encontró que estos productos se forman en presencia y ausencia de oxígeno. Sin embargo, en presencia de oxígeno se favoreció la formación de 8-hidroxipurinas. El papel principal de estos radicales hidroxilos es generar múltiples productos en el ADN (Gobi et al., 2017). Dos de los cambios más comunes como resultado del daño oxidativo del ADN son la 8-hidroxiguanina y la 2,6-diamino-4-formamidopirimidina.

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

Estudios electroquímicos demostraron que todas las bases de ADN bicatenario (dsADN) se oxidan en electrodos de carbono (CE), dependiendo del pH. Las bases de guanina y adenina se oxidan a potenciales positivos mucho más bajos en comparación con los de la citosina y la timina. Las dos últimas bases se oxidan a potenciales positivos muy altos, cercanos al potencial correspondiente al desprendimiento de oxígeno (Kurbanoglu et al., 2016).

En el siguiente apartado se abordarán los principales métodos de inmovilización de ADN utilizados para modificar la superficie del electrodo.

Inmovilización del ADN

Para obtener dispositivos selectivos y sensibles, la inmovilización del fragmento de cadena de ADN tiene que realizarse de tal modo que mantenga su estabilidad, reactividad, orientación óptima, afinidad intrínseca y accesibilidad frente al analito de interés. Además, las condiciones experimentales de trabajo, como temperatura, fuerza iónica o el pH del medio deben controlarse meticulosamente para que el rendimiento de la reacción sea elevado (Artigues & Margalida, 2019).

Muchas veces los métodos de inmovilización más importantes y utilizados terminan por modificar la superficie del electrodo para un mejor resultado. Dichos métodos se clasifican en dos grupos: métodos físicos (adsorción y captura polimérica) y métodos químicos (formación de enlaces covalentes) (Artigues & Margalida, 2019). A continuación, se describirán cada uno de ellos con los diferentes materiales utilizados en la modificación del electrodo para finalmente compararlos evaluando su mejora en las características de análisis del dispositivo.

Membranas poliméricas

Método físico de inmovilización sencillo en donde el elemento bioreceptor queda retenido entre la superficie del elemento transductor y una fina película de un material polimérico capaz de retenerlo sin modificar su estructura ni su actividad biológica, y que sea permeable al analito de interés, para que la reacción biológica se lleve a cabo. Forma biosensores con vida útil elevada (Artigues & Margalida, 2019).

Dentro de los polímeros utilizados se encuentra el Nafion; resina perfluorada químicamente inerte con elevada estabilidad térmica, resistencia mecánica y propiedades antiincrustantes, contiene grupos sulfonatos que en contacto con el agua permite el paso de cationes, pero discrimina los aniones. Otro ejemplo es el acetato de celulosa presenta huecos de un tamaño determinado, que retiene moléculas con un tamaño superior a 5000 Da y permite el paso de moléculas pequeñas. Por otra parte, el polipirrol que es uno de los polímeros conductores más utilizados en el desarrollo de biosensores electroquímicos, se obtiene por electropolimerización a partir de su monómero, el pirrol. Una ventaja de esta

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

membrana polimérica es que durante la polimerización, es posible introducir las moléculas del bioreceptor en la propia estructura polimérica. De este modo, el bioreceptor queda copolimerizado en la misma membrana, que después se deposita sobre la superficie del electrodo (Artigues & Margalida, 2019).

Inmovilización no-covalente sobre superficies sólidas

Métodos de inmovilización físicos; adsorción, implica una unión física directa del bioreceptor sobre una superficie adsorbente (soporte insoluble, ej: carbón activo), gracias a interacciones hidrofóbicas, electroestáticas, fuerzas de van der Waals o puentes de hidrógeno. Sin embargo, el tiempo de vida útil de estos biosensores es bajo en comparación con otras técnicas de inmovilización, debido a que las interacciones entre el bioreceptor y el soporte físico son débiles, llegando a revertirse fácilmente cambiando las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, temperatura o polaridad del disolvente). Además, la orientación de las moléculas inmovilizadas es aleatoria (Artigues & Margalida, 2019).

Otra técnica de inmovilización no covalente es el uso de membranas de intercambio iónico. Polímeros porosos que contienen grupos cargados que interactúan con moléculas que presentan una carga opuesta. La inmovilización del bioreceptor se da por interacciones electroestáticas, pero presentan baja reproducibilidad (Artigues & Margalida, 2019).

El encapsulamiento en hidrogeles consiste en la restricción física del bioreceptor en una matriz tipo red, pero permite el paso del analito y de los productos. Tiene ventajas como facilidad de aplicación, hidrofilia y biocompatibilidad, pero también tiene algunos inconvenientes, el analito debe superar la barrera física del hidrogel y llegar hasta la zona correcta del bioreceptor, la distribución del bioreceptor es irregular y la inmovilización no presenta orientación, incrementando la dificultad de que el analito encuentre al bioreceptor. Por estos motivos, algunos autores se decantan por utilizar metodologías de inmovilización más complejas, como la formación de enlaces covalentes (Younes et al., 2015).

Por otra parte, hay referencias en las que se habla del uso y de la conveniencia del uso de biosensores modificados con nanomateriales por presentar propiedades que se explican a continuación.

Nanomateriales

Los nanomateriales, por ej: sílice, carbón activo, el policloruro de vinilo (PVC) o los CNT permiten aumentar el área activa del transductor por presentar mayores sitios de unión correspondientes en la superficie de soporte (adsorbente), permitiendo la inmovilización de un mayor número de moléculas bioreceptoras (adsorbato). Obteniendo biosensores más sensibles y con mejor rendimiento analítico general del dispositivo final (Bhakta, et. Al. 2015).

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

Los CNT son uno de los materiales más utilizados en el desarrollo de biosensores por adsorción. Esto se debe a que el carbono es un excelente adsorbente, tienen la capacidad de promover las reacciones de transferencia de electrones, alta conductividad eléctrica, robustez mecánica, excelente estabilidad química y la posibilidad de inmovilización de biomoléculas (Bravo, 2017). Lo que los convierte en un material muy utilizado en el desarrollo de biosensores electroquímicos. Las longitudes de los CNT pueden estar dentro del rango de varios cientos de nanómetros a varios milímetros; sus diámetros, en cambio, dependen de sus variedades. Los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT, siglas por su nombre en inglés) tienen un diámetro de 0.4 a 3 nm y los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT, siglas por su nombre en inglés) tienen un diámetro de 2 a 500 nm (Kurbanoglu et al., 2016).

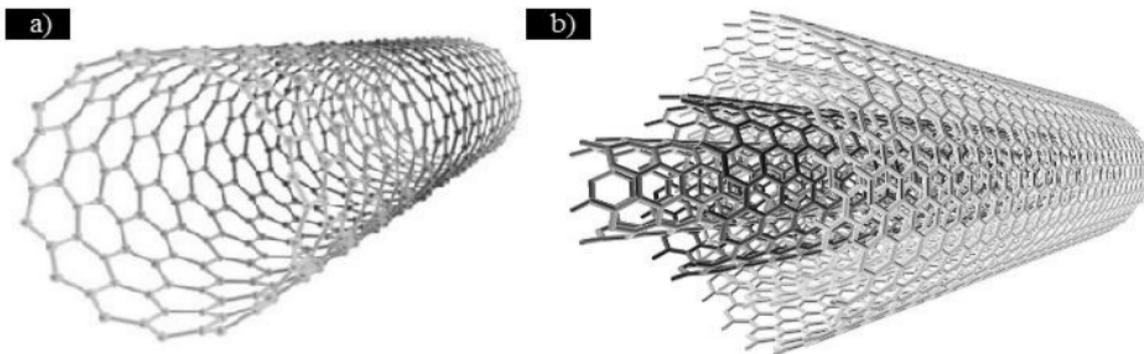


Fig 2. Tipos de nanotubos de carbono: a) nanotubo de carbono de pared simple, b) nanotubo de carbono de pared múltiple (Martinez 2021).

Configuración covalente

Las técnicas de inmovilización covalente consisten en la formación de enlaces covalentes entre el elemento bioreceptor y el elemento transductor, pero la formación de estos enlaces no es sencilla. Normalmente, es necesario llevar a cabo una o varias etapas en las que se modifica la superficie del elemento transductor con grupos funcionales apropiados para la inmovilización del bioreceptor (Dhar Malhotra, 2017).

Para incorporar grupos funcionales a los CNT se han utilizado diferentes métodos de oxidación, en los que intervienen algunos agentes oxidantes, como: H_2SO_4 , HNO_3 , HCl , H_2O_2 , O_2 , etc., que introducen diferentes grupos funcionales oxidativos (carbonilo, carboxilo e hidroxilo). Debido a la naturaleza oxidativa de los reactivos anteriores, algunos generan preferentemente grupos ácidos ($-\text{COOH}$), mientras que otros generan preferentemente grupos hidroxilo ($-\text{OH}$). Estas modificaciones son las más utilizadas porque mejoran la dispersabilidad de los CNT y sus propiedades eléctricas se mantienen inalteradas, aunque en la mayoría de los casos se observa una reducción de la longitud de los nanotubos. (Cañete, 2011).

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

La presencia de grupos carboxilo permite una segunda funcionalización de los CNT, como las reacciones de amidación. Esto se puede lograr activando el grupo carbonilo con SOCl y luego haciéndolo reaccionar con la amina, o por condensación directa del grupo carboxilo con la amina. Este tipo de reacción permite unir diferentes moléculas, como polipéptidos y ácidos nucleicos, a los nanotubos. (Cañete, 2011).

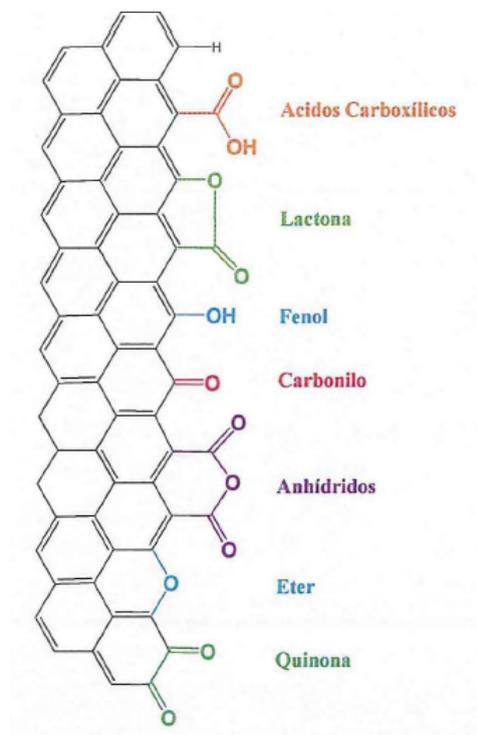


Fig 3. Grupos superficiales posibles de ser incorporados en la estructura de carbono (Cañete, 2011).

Una técnica utilizada es la de recubrir con oro la superficie del transductor y enlazar un mercaptano (ej: ácido mercaptoacético o ácido mercaptopropiónico), mediante enlaces entre el oro y el azufre. Quedando libre el grupo carboxílico para que se enlace a él una amina (presente en el bioreceptor) formando un enlace amida (Artigues & Margalida, 2019).

Otra técnica de modificación de superficie es la generación por plasma de una película polimérica que recubre de forma homogénea la superficie del transductor.

La polimerización por plasma ha demostrado ser un método relativamente simple, rápido y seco para la modificación de diferentes superficies sin afectar las propiedades mecánicas del material a granel. Mediante este método, se puede lograr la funcionalización de los CNT dando lugar a una superficie altamente reactiva capaz de formar complejos eficientes con el material genético y también se puede ajustar para mejorar la humectabilidad, la dispersabilidad, la estabilidad y la

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

biocompatibilidad, junto con la retención de su integridad estructural (Cifuentes et al., 2014).

Por ejemplo, el polímero metacrilato de pentafluorofenilo (PFM, siglas por su nombre en inglés) presenta grupos éster altamente reactivos que pueden enlazar covalentemente biomoléculas, así como promover la adhesión y la proliferación celular. Los grupos éster que quedan expuestos en el PFM reaccionan con los grupos amino, que deben estar presentes en el elemento a inmovilizar, formando enlaces amida. En el caso de que el bioreceptor de interés no tenga grupos amino en su estructura será necesario añadir algún paso intermedio en el proceso de modificación de superficie para que se genere otro tipo de enlace covalente. Por ejemplo, es posible utilizar PFM para inmovilizar cadenas de ADN sobre la superficie de nanotubos de carbono. En este caso particular, se tiene una suspensión de nanotubos de carbono sobre un soporte de poliestireno y se recubren de una fina película de PFM, polimerizado por plasma. A continuación, se enlaza covalentemente al PFM un polietilenglicol (PEG) funcionalizado con un grupo amina y un grupo tiol; Tiol-PEG-Amina (TPA), de modo que se forma un enlace amida y el tiol queda expuesto para seguir reaccionando. Finalmente, se forma un puente disulfuro entre el grupo expuesto del TPA y la cadena de ADN. En la Figura 4 se muestra una representación esquemática de la inmovilización covalente de ADN sobre nanotubos de carbono (Artigues & Margalida, 2019).

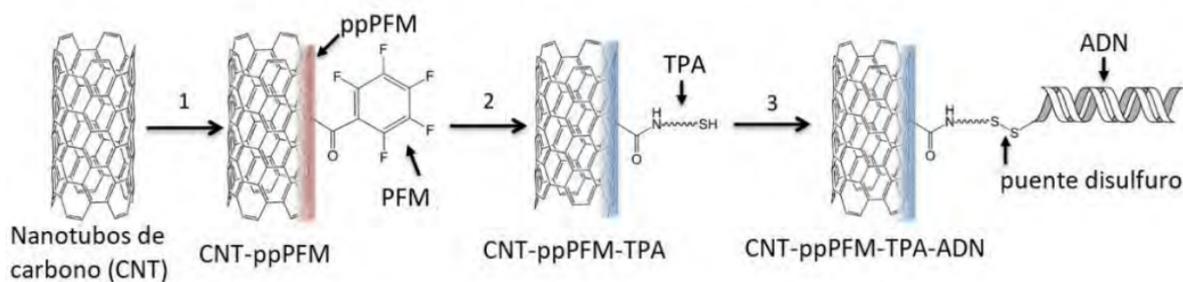


Figura 4. Reacción a través de la polimerización por plasma de metacrilato de pentafluorofenilo (ppPFM), que sigue: (1) deposición de ppPFM, (2) anclaje de TPA a través de su grupo amina e (3) inmovilización de ADN a través de un enlace disulfuro. (Artigues & Margalida, 2019).

La polimerización por plasma es una técnica que puede utilizarse con distintos polímeros, en función del grupo funcional que más convenga para la correcta inmovilización de la biomolécula de interés.

Otra técnica es llamada crosslinking (Dhar Malhotra, 2017) que es la unión de dos o más moléculas (ej: aldehídos) mediante enlaces covalentes, para obtener una matriz polimérica con cierto grado de reticulación inmovilizando el bioreceptor en ella (Mikhailov, 2016).

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

Por otra parte, las monocapas autoensambladas (SAM, siglas por su nombre en inglés) modificadas con tiol también tienen una estabilidad térmica significativa, ya que no cambian con un aumento de temperatura de hasta 70 °C (Rafique et al., 2019).

El proceso de inmovilización suele ser laborioso y requiere mucho tiempo. Se requiere una serie de optimizaciones hacia las condiciones de inmovilización para un biosensor específico. Además, los pasos de lavado son necesarios para eliminar las especies adsorbidas no específicas, lo que también aumenta el tiempo de ensayo. En segundo lugar, la sonda inmovilizada debe modificarse con grupos químicos de enlace como tiol, amino, grupos carboxilo o biotina, lo que sin duda aumenta el costo de los reactivos. En tercer lugar, la reacción heterogénea podría disminuir la repetibilidad y reproducibilidad entre diferentes electrodos. Al mismo tiempo, provoca una menor bioactividad. Cuando la interacción entre los objetivos y la sonda de ADN inmovilizado ocurre en la interfaz heterogénea entre el electrodo (sólido) y la solución (líquido), la eficiencia y la velocidad de reconocimiento disminuyen debido al impedimento estérico y la pérdida de libertad de configuración del ADN inmovilizado. Y el cuarto problema es que el electrodo inmovilizado no puede almacenarse durante mucho tiempo, ya que la unión entre la sonda de ADN y la superficie del electrodo se debilitará con el tiempo (Zhang et al., 2016).

En resumen, la preferencia de diferentes métodos de funcionalización depende del sensor y su mecanismo de detección; la adsorción electroquímica y física, la unión covalente, el uso de los monómeros electropolimerizados como el pirrol que unen el ADN al electrodo.

Electrodos

Los ácidos nucleicos suelen estar fuertemente adsorbidos en los electrodos. Quizás, la técnica de inmovilización más simple es la acumulación por adsorción del biopolímero en la superficie que es muy aplicable para electrodos de amalgama sólida de plata (AgSAE, siglas por su nombre en inglés), electrodos de mercurio (ME, siglas por su nombre en inglés), o electrodos de carbono (CE, siglas por su nombre en inglés). Los ME y CE modificados con ADN se pueden preparar fácilmente sumergiendo el electrodo desnudo en la solución de ADN durante un breve período de tiempo, seguido del lavado del electrodo. La adsorción de ácidos nucleicos en electrodos de oro, óxido de indio y estaño (ITO) es mucho más débil en comparación con los ME y los CE, y no hay informes de electrodos de oro modificados con ADN, preparados por adsorción física espontánea de ADN no modificado. La adsorción de ADN en los CE se puede lograr en un circuito de corriente abierta (Kurbanoglu et al., 2016).

Los CE tiene características favorables como su producción en masa, bajo costo y amplia ventana de potencial disponible electroquímicamente, lo que trajo de la mano la introducción de los electrodos de CNT, pero tienen un desarrollo aleatorio

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

de la inmovilización en la superficie de carbono a través de múltiples interacciones del transductor con la columna vertebral de fosfato o las bases nitrogenadas hidrofóbicas de los oligonucleótidos (Bravo, 2017).

El electrodo de carbono vítreo (GCE, siglas por su nombre en inglés) pretratado electroquímicamente se puede modificar usando las sondas de ácido nucleico peptídico (PNA, siglas por su nombre en inglés) (Chao et al., 2015).

En los electrodos de oro, la inmovilización por autoensamblaje se usa ampliamente para la detección piezoeléctrica y electroquímica debido a las fuertes quimisorciones que se establecen entre la superficie del metal y las moléculas tioladas (Chao et al., 2015).

La conductividad y la estabilidad química son aspectos importantes para el rendimiento de estos electrodos. Por lo tanto, la mayoría de los electrodos de carbono (por ejemplo, grafito), silicio, platino y oro se utilizan dependiendo del analito.

Sensores electroquímicos de ADN

Un biosensor electroquímico basado en ADN generalmente se compone de un electrodo que se usa como transductor y está cubierto por una capa de ADN como elemento de reconocimiento biológico que modifica químicamente la superficie del electrodo. El analito se detecta traduciendo los cambios en las estructuras físicas y químicas del ADN que se reflejan en su comportamiento redox y las propiedades electroquímicas en la interfaz conductora del biosensor en una señal eléctrica (Zhang et al., 2016).

El método sin marcaje más utilizado es midiendo la oxidación de las bases nitrogenadas guanina, en parte debido a su simplicidad y en parte debido a su versatilidad. Todo esto sin la necesidad de utilizar algún marcador (Artigues & Margalida, 2019). Por lo general, se controla una corriente a un potencial fijo durante la detección electroquímica de la hibridación o interacción del ADN.

Con la tecnología avanzada y la miniaturización de los dispositivos es posible diseñar biosensores de forma sencilla para la detección de moléculas pequeñas que interactúan con la capa de ácidos nucleicos inmovilizada, ofreciendo respuestas precisas, sensibles y rápidas, como por ejemplo drogas o carcinógenos. La acumulación de estas moléculas sobre el ADN confinado sobre la superficie del electrodo se puede utilizar para medir la concentración de éstas a nivel de trazas. Además, los hacen una herramienta excepcional con una rápida respuesta y alta sensibilidad (Artigues & Margalida, 2019).

Los biosensores de ADN tienen aplicaciones en los campos del diagnóstico molecular, farmacogenómica, diagnóstico médico, detección de drogas, análisis de

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

alimentos, bioterrorismo, monitoreo ambiental, contaminación, etc (Rafique et al., 2019).

Para mejorar la sensibilidad en biosensores electroquímicos basados en ADN se consigue por un mecanismo de transducción adecuado como el uso de nanopartículas que amplifican su señal (Torres, 2020; Zhang et al., 2016).

Interacciones ADN-analito

Hasta ahora se han estudiado varios tipos de interacciones que mostraron la asociación de ligandos con el ADN. Estos incluyen la escisión del ADN, la unión covalente, la unión no covalente del surco, el entrecruzamiento, la intercalación y la incorporación de análogos de nucleósidos. Se producen cambios en el ADN y en las moléculas del fármaco como resultado de estas interacciones para adaptarse a la formación del complejo. En la mayoría de los casos, los cambios estructurales en el dúplex de ADN dieron como resultado cambios en la estabilidad de su termodinámica. Como consecuencia, las propiedades funcionales del ADN también cambiaron (Ramotowska et al., 2021).

Unión covalente

La unión covalente de fármaco-ADN es irreversible y conduce directamente a la muerte celular porque ocurren cambios en la estructura y en los componentes del ADN dando lugar a la inhibición de los procesos del ADN, llegando a provocar distorsión de la columna vertebral de la misma. Hay tres métodos de unión covalente al ADN: (1) entrecruzamiento entre hebras y dentro de ellas, (2) alquilación de bases nitrogenadas y (3) reemplazo de bases nitrogenadas (Kurbanoglu et al., 2016).

Unión no covalente

El modo no covalente de unión de los fármacos al ADN es reversible, pero pueden cambiar la conformación del ADN y su tensión de torsión. La unión no covalente incluye:

- Encuadernación externa

También conocido como de naturaleza electrostática, unión capaz de formar enlaces no específicos. En esta interacción, los ligandos quedan fuera de las interacciones de apilamiento de bordes con el esqueleto de fosfato del ADN (Kurbanoglu et al., 2016).

- Unión del surco menor

Algunos fármacos que se unen al surco menor del ADN a través de enlaces de hidrógeno y de Van der Waals suelen ser específicos de las regiones Adenina-Timina. Dado que las regiones Adenina-Timina son más estrechas que las regiones del surco Guanina-Citosina. Suelen ser fármacos que tienen varios anillos aromáticos típicos, como pirrol, furano o benceno, conectados por enlaces, que

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

poseen libertad de torsión. Estos fármacos producen poco o ningún reordenamiento estructural de la hélice del ADN (Kurbanoglu et al., 2016).

- Intercalación

Por lo general, los compuestos heterocíclicos planos actúan como intercaladores que se insertan entre los pares de bases adyacentes de forma rígida y perpendicular al eje de la doble hélice, lo que lleva a una superposición significativa de electrones p . haciendo que los pares se separen verticalmente y que el esqueleto de azúcar-fosfato que forma la doble hélice se distorsione. El complejo intercalador de ADN se estabiliza mediante la interacción de apilamiento π - π . Las interacciones de apilamiento entre los intercaladores y las bases son los factores estabilizadores más importantes para el complejo establecido. Por ejemplo, existen enlaces de hidrógeno directos entre los grupos funcionales del fármaco que son esenciales para la acción del fármaco y los grupos funcionales N_2 y N_3 de la guanina, o el O_2 de la citosina en el sitio de intercalación (Kurbanoglu et al., 2016).

Selección y descripción de los componentes del biosensor

De las combinaciones de diferentes bioreceptores y transductores surgen un número muy elevado de posibles biosensores, por lo tanto, en este documento se ha tratado de proponer el diseño de un biosensor de ADN electroquímico con la teoría básica a seguir para su desarrollo, que sea selectivo para fármacos, fácil de preparar y que de una respuesta rápida.

Al diseñar un biosensor, hay que tener en cuenta varios factores con respecto a sus componentes y estructura, ya que son críticos para el correcto funcionamiento del dispositivo final. Todos estos puntos se abordarán a continuación.

Selección de:

- Tipo de detección electroquímica

Los dispositivos electroquímicos son los más utilizados como transductores en biosensores. Ya que si analizamos las ventajas que tiene frente a otros transductores, los biosensores electroquímicos implican la medida de cambios de las propiedades eléctricas de una disolución al producir o consumir electrones o iones por medio de reacciones químicas (Torres, 2020).

Para hacer la selección del tipo de detección electroquímica que realizará el biosensor a elaborar se analizaron las ventajas de los diferentes tipos de detección electroquímica que en la actualidad cuentan los biosensores, en función de su sensibilidad. Analizando este punto y comparándolos entre ellos, se determinó que el mejor método de detección es el amperométrico finalmente por presentar una mejor sensibilidad frente a los otros, además de ser los más utilizados (Artigues & Margalida, 2019).

- Ácidos desoxirribonucleicos

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

En este caso se propone el uso de ADN de esperma de salmón obtenido comercialmente, ya que en la actualidad existen marcas que se dedican a la extracción de ADN de organismos, como es en el caso del salmón, la gracia del semen de los salmones es que el contenido de ADN es muy abundante, superior al 10% de su peso en seco y su proceso de extracción es sencillo (Cabrera. 2019).

Para el proceso de bioreconocimiento y dependiendo del fármaco objeto de estudio que tiene interacción con el ADN, se pueden utilizar segmentos de ADN monocatenario (ssADN) o Ácido Ribonucleico (ARN) de 15-40 bases de secuencias largas o aptámeros, o segmentos de ADN bicatenario (dsADN) compuestos de 20-40 pares de bases cortos que son altamente selectivos a los objetivos de bajo peso molecular, es decir, orgánicos, inorgánicos o proteicos.

Las características ideales del medio de medida son en condiciones fisiológicas, nos referimos a un pH de 7.4 y a una temperatura de 36.35 °C. Es necesario establecerlas, ya que estas deben ser propicias para que el bioreceptor presente actividad biológica. Aunque lo ideal es que el bioreceptor genere una reacción independiente de parámetros físicos tales como el pH o la temperatura, ya que de este modo se evita realizar un pretratamiento a la muestra antes de realizar la determinación analítica.

Preparación de la disolución stock de ssADN o dsDNA de esperma de salmón.

Las especificaciones del ADN del esperma de Salmón vienen dadas por parte de cada fabricante, indicando la estructura presenta el ADN, el peso molecular y la concentración dada.

Se disuelve 35 mg de dsDNA liofilizado en 2 mL de disolución tampón fosfato (0.1M) a pH 7.4 Posteriormente se mantuvo en sonicación durante 20 minutos y se adicionaron 0.5mL más del mismo medio de disolución agitando la solución durante un minuto. La concentración final de esta disolución es aproximadamente 14 mg/mL, la cual se determina a través de mediciones por UV-visible. La muestra final es almacenada a -20 °C (Cabrera. 2019; Cifuentes-Rius *et al.*, 2014).

Método de obtención del ssADN

El ssADN se obtiene calentando a 100 °C, en baño de agua, viales cerrados que contengan dsADN en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4 durante 30 minutos. En seguida, los viales cerrados se sumergen en un baño de hielo rapidadamente, esto con el objetivo de prevenir la renaturalización espontánea de la reacción. Las muestras desnaturalizadas se conservan a -20 °C (Bravo, 2017).

Para la determinación de la concentración de ADN se utilizan medidas espectrofotométricas a un coeficiente de absortividad molar a 260 nm de 6600 M⁻¹.

→ Técnica de inmovilización

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

El proceso de inmovilización debe realizarse de tal modo que el bioreceptor mantenga la estructura tridimensional activa, orientación espacial óptima, estabilidad, reactividad y afinidad intrínseca. Además, tanto el analito como los productos derivados de la reacción biológica tienen que poder difundirse entre el sitio activo en el que tiene lugar la reacción y la matriz de la muestra para el correcto funcionamiento de un biosensor selectivo y sensible (Artigues & Margalida, 2019).

La técnica de inmovilización del ssADN o dsADN sobre la superficie del transductor más conveniente a utilizar son las que tienen como mecanismo la formación de enlaces covalentes obtenidos entre el bioreceptor y el transductor. Además, no presenta dentro de su conformación impedimento estérico que impida la difusión del analito y el receptor.

Para ello, se presenta la inmovilización del ácido nucleico por medio de un enlace covalente a través de un enlazador de PEG, con los MWCNT ya funcionalizados, esto porque son resistentes, pueden controlarse mejor y las moléculas no específicas, que están unidas débilmente a la superficie, pueden eliminarse con facilidad.

Este enfoque consiste en el anclaje covalente de una tiol-PEG-amina (TPA) a través de las fracciones del grupo carbonilo activado con SOCl₂ (COCl) del recubrimiento. El enlace de la molécula de polietilenglicol con una amina libre en su estructura (PEG-amina) en los vectores CNT-COCl puede mejorar la solubilidad y dispersabilidad del complejo final. Además, si la PEG-amina utilizada tiene un grupo tiol en el otro extremo, permite la conjugación con el oligonucleótido de interés a través de un enlace disulfuro. El entorno reductor del citoplasma celular conduce a la escisión del enlace disulfuro formado, liberando el material genético en la célula (Cifuentes-Rius et. al., 2014).

→ Transductor

El transductor, además de ser capaz de reconocer la señal bioquímica generada, debe garantizar la estabilidad del bioreceptor, es decir, que éste mantenga su actividad biológica a lo largo del tiempo. Los componentes biológicos a menudo son poco estables fuera de su entorno natural, por lo que es muy importante generar entornos en los que el bioreceptor sea lo más estable posible. De este modo, se alarga el tiempo de vida útil del dispositivo final y se aumenta su sensibilidad. Para lograrlo, también es necesario diseñar una matriz de inmovilización propicia para el bioreceptor, que mantenga la estructura activa de este y lo proteja de los agentes agresivos del medio de medida.

Se utilizarán electrodos serigrafados de carbono que se modifican con MWCNT, ya que facilita la inmovilización del ADN, promueve reacciones de transferencia de electrones, tiene alta área superficial, alta conductividad eléctrica, robustez mecánica, excelente estabilidad química y le brinda la propiedad de

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

amplificar la señal de transducción de la unión, mejorando la sensibilidad del dispositivo y generar un entorno propicio en los que el ADN es lo más estable posible a lo largo del tiempo.

Previo a utilizar los electrodos serigrafados de carbono se deben activar en HCl 0.1M mediante la aplicación de 10 barridos cíclicos de potencial a 100 mV s^{-1} entre +0.5 y -1.0 V y se aclaran con agua destilada.

El agua empleada para la preparación de soluciones y lavado de electrodos debe ser de calidad ultrapura (mili Q).

Entonces, finalmente elegido el material biológico, el método de inmovilización y el electrodo a utilizar procederemos con describir la elaboración del biosensor.

Procedimiento

Funcionalización de MWCNT

Para la funcionalización de MWCNT se lleva a cabo con una mezcla sulfo-nítrica según el procedimiento descrito por Cañete Rosales (Cañete Rosales, P.A., 2011).

1. Una pequeña cantidad de MWCNT (< 100 mg) son puestos a reflujo en 80 mL de una mezcla $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (3:1 v/v, 3 M), durante 6 h. El tiempo de reflujo empieza cuando cae la primera gota.
2. Luego de transcurrido el tiempo de reacción, las muestras se filtran y lavan hasta pH neutro.
3. Las muestras se secan a 50°C por 12 h.
4. Se formará una fina película de -COOH que recubre de forma homogénea la superficie de los MWCNT y así obtener un resultado final de MWCNT-COOH (Fig 5).



Fig 5. Reacción de la oxidación de los MWCNT.

Anclaje de una Tiol-PEG-Amina (TPA)

La inmovilización del enlazador químico en la superficie de MWCNT-COOH se lleva a cabo a través de una amidación conjuntando el procedimiento descrito por

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

Cifuentes-Rius (Cifuentes-Rius et. al., 2014) y Cañete Rosales (Cañete Rosales, P.A., 2011).

1. 100 mg de MWNT oxidados con mezcla sulfo-nítrica se hacen reaccionar con SOCl_2 (20 mL) por 24 h a reflujo. El tiempo de reflujo empieza cuando cae la primera gota. La temperatura del sistema fue mantenida entre 65-70 °C.
2. Pasado el tiempo de reacción, el SOCl_2 residual es extraído utilizando un rotavapor, obteniendo así MWNT-COCl
3. Inmediatamente después se adicionan 20 mL de tiol-PEG-amina (TPA) y se hacen reaccionar por 12 h, se incuban a 30-40 °C en agitación y con atmósfera de Argón (Ar) para minimizar su oxidación.
4. Los MWCNT-COCl ahora funcionalizados con TPA se lavan tres veces por centrifugación (16200 rcf, 5 min), resuspendiendo cada vez en agua purificada.
5. Finalmente se secan al vacío durante la noche. Se obtiene un resultado final de MWCNT-CO-TPA. Los pasos de la funcionalización se resumen en la figura 6.

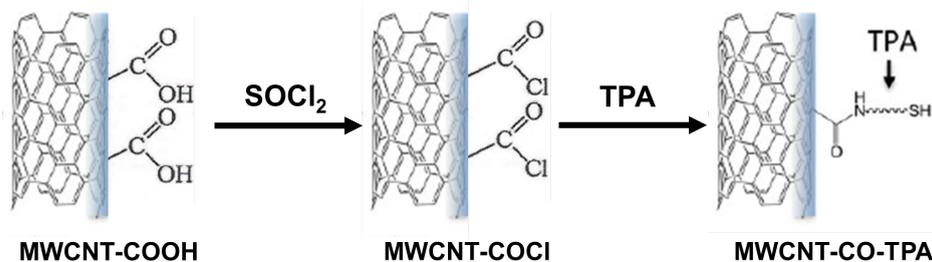


Fig 6. Reacción de anclaje de TPA sobre los MWCNT funcionalizados.

Inmovilización de ADN

1. Sobre los MWCNT-CO-TPA se depositará 10 μL de una disolución stock de ds-DNA de esperma de salmón. Se forma un puente de disulfuro entre el grupo tiol expuesto del TPA y la cadena de ADN.
2. Tras la evaporación del disolvente se lava con agua esterilizada durante 30 minutos para eliminar el ADN débilmente adsorbido. Se obtiene un resultado final de MWCNT-CO-TPA-ADN.
3. En la Figura 7 se muestra una representación esquemática de la inmovilización de ADN sobre MWCNT-CO-TPA a través de un enlace covalente.

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

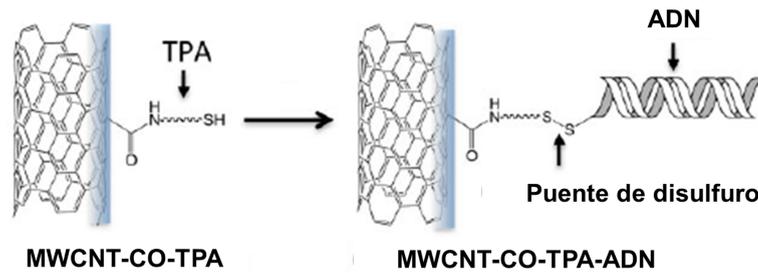


Fig 7. Reacción de la inmovilización de ADN sobre MWCNT-CO-TPA.

Modificación de electrodos serigrafiados

1. Finalmente, se depositan sobre el electrodo de trabajo 4 μL de una mezcla 1:1 de la dispersión stock de MWCNT-CO-TPA-ADN (1 mg mL^{-1}) en agua.
2. Se lleva a sequedad y se lava con agua.

Este sensor electroquímico MMWCNT-CO-TPA-ADN preparado debería mostrar una mayor selectividad hacia las moléculas del fármaco objetivo a cuantificar y producir una señal eléctrica al momento en que el analito se une al ADN diana.

Para constatar la presencia de -CO-TPA-ADN en los MWCNT luego de la inmovilización, se debe realizar un análisis de la superficie del electrodo mediante mediciones de voltamperometría cíclica (CV) en pH 7.4 y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) realizada entre potenciales de -0.5V y +0.5, a una velocidad de barrido de 0.05V/s durante cuatro ciclos.

- Aplicación

Cómo se ha descrito, los biosensores electroquímicos de ADN tienen aplicaciones en los campos del diagnóstico molecular, farmacogenómica, diagnóstico médico (Tereshchenko et al., 2016), detección de drogas (Nick et al., 2015), evaluando las interacciones ADN-fármaco y también en la detección de secuencias genéticas específicas de biomarcadores de cáncer, patógenos, así como en el análisis de alimentos.

Conclusiones

A manera de conclusión se puede decir que en este trabajo se exponen brevemente los procesos de diseño, estructura, funcionamiento y fabricación de biosensores electroquímicos de ADN que pretende servir como guía introductoria para su elaboración, básicamente que su función final sea la de detectar fármacos, pudiendo analizar cualquier fármaco que tenga alguna interacción con el ADN.

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

En la actualidad y en un futuro seguirán siendo un producto con gran utilidad dentro del campo farmacéutico, además de ser prometedor para otras aplicaciones dentro de varias áreas de trabajo, debido a las notables ventajas que presentan como: gran selectividad, especificidad, poca cantidad de muestra, fácil manejo, portátiles, automatizables, respuesta rápida, menor requerimiento de energía, compatibilidad para la miniaturización y bajo costo, entre otras características, claramente evaluando las características de cada uno de los elementos que componen el biosensor seleccionando el mejor en base a la utilidad que se le dará.

Se desarrolló un manual de procedimientos teóricos básicos para la elaboración de un biosensor electroquímico de ADN a base de esperma de salmón inmovilizado covalentemente sobre electrodos de carbono modificados con MWCNT funcionalizados, con detección amperométrica de fármacos que mediante la teoría recabada y presentada presenta excelentes propiedades analíticas y de estabilidad con la detección de fármacos en general.

Bibliografía

- Artigues, C., Margalida, E. (2019). Estudio de biosensores electroquímicos basados en inmovilización enzimática. Universitat Ramon Llull. <http://hdl.handle.net/10803/667847>
- Bhakta, S., Evans, E., Benavidez, T, Garcia, C. (2015). Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: A review. *Anal. Chim. Acta*, 872, 7–25, doi:10.1016/j.aca.2014.10.031.
- Brasa Marqués A. (2019). Sensores electroquímicos basados en ácidos nucleicos para la detección de contaminantes microbianos en alimentos. Trabajo de investigación. UNED.
- Bravo, I. (2017). Interacción de nanoestructuras de carbono o metálicas con (bio)moléculas y su aplicación al desarrollo de sensores. UAM. Madrid. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/681443/bravo_segura_iria.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cabrera Vega, E. (2019). Diseño de un biomaterial basado en la inmovilización de ADN por la técnica de sol-gel. UAM, <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/2359/1/183482.pdf>
- Cañete Rosales, P.A. (2011). "Biosensores de ADN basados en nanotubos de carbono modificados químicamente". [Tipo de tesis para optar al grado de Doctor en Química]. Universidad de Chile.
- Chao, Jie; Zhu, Dan; Zhang, Yinan; Wang, Lianhui; Fan, Chunhai (2015). DNA nanotechnology-enabled biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, S0956566315302578–. doi:10.1016/j.bios.2015.07.007 <https://bidi.uam.mx:3276/science/article/abs/pii/S0956566315302578>

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

- Cifuentes-Rius, A.; de Pablo, A.; Ramos-Perez, V.; Borros, S. (2014). Tailoring carbon nanotubes surface for gene delivery applications. *Plasma Process. Polym.* 11, 704–713, doi:10.1002/ppap.201300167.
- Dhar Malhotra, B., Mouli Pandey, C. (2017). First Edit.; Smithers Rapra Technology Ltd: Shawbury. ISBN 978-1-91024-278-0.
- Ermiş, N., Tinkiliç, N. (2021). Development of an Electrochemical Sensor for Selective Determination of Dopamine Based on Molecularly Imprinted Poly(p-aminothiophenol) Polymeric Film. *Electroanálisis.* 33, 1491. <https://bidi.uam.mx:8026/doi/10.1002/elan.202060556>
- Fagúndez, P. (2015). Desarrollo de un biosensor para la cuantificación de anticuerpos anti-ADNdc en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico. UDELAR. colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/8200/1/uy24-17674.pdf
- Gobi, S., Bergantini, A. and Kaiser, R.I. (2017). “Degradation of adenine on the martian surface in the presence of perchlorates and ionizing radiation: a reflectron time-of-flight mass spectrometric study”, *The Astrophysical Journal*, Vol. 838 No. 2, p. 84.
- Jurado, D. N. (2015). Desarrollo de inmunobiosensores y sistemas de diagnóstico para aplicaciones biomédicas: análisis de la interacción ICAM-1/LFA-1 y detección de aspergilosis invasiva (Doctoral dissertation, Universidad de Zaragoza). <http://hdl.handle.net/10261/124038>
- Kavita, V. (2017), “DNA biosensors-a review”, *Journal of Bioengineering & Biomedical Science*, Vol. 7 No. 2, pp. 222-226.
- Kurbanoglu, S. Topal, B. D. Rodriguez, E. P. Palabiyik, B. B. Ozkan, S. A. Uslu, B. (2016). Advances in electrochemical DNA biosensors and their interaction mechanism with pharmaceuticals, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 775, pp 8-26. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.05.022>
- Lee, S.R., Kim, D.S. and Choi, S.H. (2017), “The conjugated phenylene polymer-modified photoanodes for quantum dot-sensitized solar cells”, *Journal of Nanomaterials*, Vol. 2017.
- Li, S., Shang, X., Liu, J., Wang, Y., Guo, Y. and You, J. (2017), “A universal colorimetry for nucleic acids and aptamer-specific ligands detection based on DNA hybridization amplification”, *Analytical Biochemistry*, Vol. 528, pp. 47-52.
- Martínez Huitle U.A. (2021). "Fabricación y purificación de nanotubos de carbono para el desarrollo y caracterización de conductores eléctricos transparentes". [Tipo de tesis para optar al grado de maestro en ciencias con especialidad en ingeniería mecánica]. Instituto Politécnico Nacional.
- Martínez, S. R. (2020). Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas. Obtenido de: http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Sroyan o/Royano_Martinez_Silvia_TFM.pdf

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

- Mendes, C., Montenegro, J., Queiroz, N., Moreira, T., Nascimento, V., Oliveira, S. (2020). Electrochemical Detection of Guanine-methylation Using Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis*. Vol. 32, No. 1. pp. 19-28
- Mikhailov, S., Zakharova, A., Drenichev, M., Ershov, A., Kasatkina, M., Vladimirov, L., Novikov, V., Kildeeva, N. (2016). Crosslinking of Chitosan with Dialdehyde Derivatives of Nucleosides and Nucleotides. Mechanism and Comparison with Glutaraldehyde. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 35, 114–129, doi:10.1080/15257770.2015.1114132.
- Nick, C., Yadav, S., Joshi, R., Schneider, J.J. and Thielemann, C. (2015), "A three-dimensional microelectrode array composed of vertically aligned ultra-dense carbon nanotube networks", *Applied Physics Letters*, Vol. 107 No. 1, pp. 013101-013102.
- Parzanese, M. (2014). Biosensores. En *Alimentos Argentinos*. pp. 56. República Argentina: SAGyP.
- Rafique, B., Iqbal, M., Mehmood, T. and Shaheen, M.A. (2019), "Electrochemical DNA biosensors: a review", *Sensor Review*, Vol. 39 No. 1, pp. 34-50. <https://bidi.uam.mx:5556/insight/content/doi/10.1108/SR-08-2017-0156/full/html>
- Ramotowska, S.; Ciesielska, A.; Makowski, M. (2021). What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions? *Molecules*, 26, 3478. <https://doi.org/10.3390/molecules26113478>
- Tereshchenko, A., Bechelany, M., Viter, R., Khranovskyy, V., Smyntyna, V., Starodub, N. and Yakimova, R. (2016), "Optical biosensors based on ZnO nanostructures: advantages and perspectives. A review", *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 229, pp. 664-677.
- Torres Gámez, J. (2019). Desarrollo de un biosensor amperométrico bienzimático para la cuantificación simultánea de glucosa y colesterol en alimentos. [Tesis de maestría]. UAEH. <https://www.uaeh.edu.mx/docencia/Tesis/icbi/maestria/2020/jessica-torres-gamez.pdf>
- Torres, J., (2020). Trabajo fin de grado ácidos peptidonucleicos (APNs) en el desarrollo de biosensores electroquímicos. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/JORGE%20TORRES%20C HAVES.pdf>
- Tüylek, Z. (2021). Biyoteknolojide Biyosensör ve Biyoçip Uygulamaları. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*. 4(3): p. 468-490. DOI:10.38001/ijlsb.876231 <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ijlsb/issue/62833/876231>
- Uddin Ahmed, M, Zourob, M., Tamiya, E. (2016). *Food Biosensors - Food Chemistry, Function and Analysis*; The Royal Society of Chemistry: Croydon; ISBN 9781782623908.
- Xiong, E., Zhang, X., Liu, Y., Zhou, J., Yu, P., Li, X. and Chen, J. (2015), "Ultrasensitive electrochemical detection of nucleic acids based on the

Tutorial: Diseño y fabricación de nano-biosensores basados en ADN para la detección de fármacos

dual-signaling electrochemical ratiometric method and exonuclease III-assisted target recycling amplification strategy”, *Analytical Chemistry*, Vol. 87 No. 14, pp. 7291-7296.

Zhang, FT. Cai, LY. Zhou, YL. Zhang, XX. (2016). Immobilization-free DNA-based homogeneous electrochemical biosensors. 85. pp. 17-32.