



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica
Biológica

**Análisis de métodos de inmovilización
de DNA para la construcción de
biosensores**

Presenta:

Tapia Espitia Diana Gabriela

Matrícula: 2162044011

Asesores:

Alarcón Ángeles Georgina

Gómez Hernández Martín

CDMX, México

Fecha de inicio y término

23 de septiembre 2021 - 23 de septiembre de 2022

Índice

Capítulo I: Introducción	3
Capítulo II: Antecedentes	4
1. Biosensores	4
2. Electroodos voltamperométricos	5
2.1 Electroodos serigrafiados	5
2.2 Electroodos de pasta de carbono	6
3. Electroquímica	6
3.1 Voltamperometría	6
3.1.1 Voltamperometría cíclica (CV)	6
3.1.2 Voltamperometría diferencial de pulso (DPV)	6
4. Propiedades electroquímicas del DNA	7
5. Técnicas de inmovilización de DNA	7
5.1 Adsorción	7
5.2 Unión covalente	8
5.3 Atrapamiento	8
6. Contribución de las nanopartículas de oro en biosensores electroquímicos	9
6.1 Como potenciadores	9
Capítulo III: Planteamiento del problema	9
7. Objetivo general	10
8. Objetivos específicos	100
Capítulo IV: Material y método	10
Reactivos	10
Screen printing	10
Pasta de grafito	11
Síntesis de AuNPs	11
Capítulo V: Resultados y discusión	12
Biosensor screen printing	¡Error! Marcador no definido.
Bisensor pasta de grafito	15
Repetibilidad	18
Estabilidad	18
Capítulo VI: Conclusiones	19
	2

Capítulo I: Introducción

En este trabajo se utilizará al ácido desoxirribonucleico (DNA) como elemento de reconocimiento molecular. El ADN es el portador de la información genética, de la herencia biológica, se forma por secuencias de ácido nucleico, las cuales son diferentes para cada organismo vivo, sea un virus o patógeno, La caracterización del ADN ayuda al reconocimiento y diferenciación de distintas enfermedades (Liu et al., 2012).

Los laboratorios de diagnóstico molecular se han dado a la tarea de desarrollar nuevos fármacos y de buscar alternativas prometedoras que permitan realizar un diagnóstico clínico basado los eventos de reconocimiento relacionados con el DNA, siendo estas estrategias confiables, asequibles y de bajo costo. Se basa en un análisis *in vitro* utilizando en sensores permitiendo un seguimiento simple a un menor costo en comparación con un análisis *in vivo*.

La búsqueda de estrategias más generales partiendo del conocimiento asociado a la secuenciación del DNA, permite el desarrollo de sensores electroquímicos basados en el DNA.

Un biosensor es un dispositivo analítico que incorpora un elemento de reconocimiento biológico con un transductor, la señal producida se utiliza para evaluar la concentración de un analito (Lei et al., 2006). Los biosensores basados en DNA proporcionan una detección rápida, simple, económica, sensible y selectiva utilizando genes como una sonda específica, por lo tanto, los biosensores de DNA basados en la hibridación de DNA juegan un papel cada vez más importante en el análisis del daño que puede sufrir el DNA (Sohrabi et al., 2016).

El sistema transductor de DNA electroquímico utiliza comúnmente el sistema convencional de tres electrodos, un electrodo de referencia, un contraelectrodo y un electrodo de trabajo; este último actúa como transductor y es en su superficie donde se realiza la inmovilización del DNA (Rashid & Yusof, 2017).

Las estrategias de inmovilización del DNA y el mecanismo de detección electroquímica son dos de los aspectos más importantes que deben considerarse antes de desarrollar un sensor de DNA electroquímico que sea altamente selectivo y sensible (Rashid & Yusof, 2017).

Por ese interés, en este trabajo se presenta la información asociada a las estrategias de modificación en los métodos de inmovilización de DNA para la construcción de biosensores electroquímicos, la calidad del sensor se obtiene al evaluar la reproducibilidad y estabilidad del DNA inmovilizado sobre el sustrato. Así mismo se incluyen métodos experimentales, incluyendo el diseño y procedimiento de los métodos de inmovilización, así como las pruebas de estabilidad y reproducibilidad que se realizaron para mostrar un panorama en cuanto al comportamiento electroquímico de los métodos empleados. Finalmente se discute y analiza los resultados obtenidos en los estudios preliminares y perspectivas que completarán el trabajo realizado.

Capítulo II: Antecedentes

1. Biosensores

Los dispositivos analíticos que proporcionan información sobre un proceso biológico a través de un transductor se denominan biosensores, se basan en el principio básico de un biosensor en el que combina un componente biológico con un componente detector donde captura la reacción objetivo entre elementos base y sensibles a través de una variedad de transductores físicos o químicos (Xiang, 2011).

Así mismo se hace uso de un potenciostato, el cual es un equipo utilizado para diferentes análisis químicos, el sistema se conforma de la parte electrónica y la celda química la cual consiste en un sistema de electrodos introducidos en un electrolito ácido o alcalino a pH conocido, donde ocurren reacciones de oxidación y reducción que son capaces de utilizar o generar corriente eléctrica que es detectada produciendo una señal electroquímica. En estas celdas se utiliza un electrodo de trabajo cuyo potencial electroquímico se puede variar linealmente en el tiempo con respecto al potencial del electrodo de referencia, el cual mantiene un potencial constante. La señal obtenida se representa como un voltamperograma, en el eje x se registra el potencial eléctrico del electrodo de trabajo (TE) medido con respecto al electrodo de referencia (RE), este último se mantiene un un potencial constante(sistema de alta impedancia con una corriente casi nula entre los dos electrodos), mientras que la corriente eléctrica se mide entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo (CE) que se mantiene como un material inerte. (figura 1)

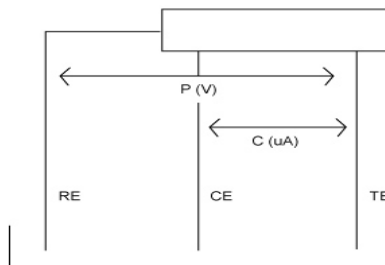


Figura 1. Esquema básico de una celda electroquímica de 3 electrodos, denotando el registro de potencial dado por el TE y el RE y la corriente dada por el TE y el CE (Allen, 1980).

Existen biosensores que reúnen todos los componentes anteriores, en un solo dispositivos, estos biosensores están formados por tres elementos, (Figura 2) principalmente el componente biológico; seguido de un transductor electroquímico que transforma la señal en una salida cuantificable y legible; y el procesador de señal que muestra esta señal transformada de una manera fácilmente detectable para obtener la información básica de análisis, útil para demostrar las interacciones de ácido nucleico con las membranas celulares y para poder aclarar los mecanismos de interacción entre los fármacos. (Kurbanoglu et al., 2016)

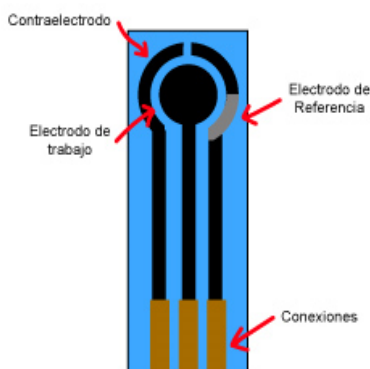


Figura 2. Componentes básicos del biosensor electroquímico. (Sensor serigrafiado)
 Nota: Elaboración propia

La aplicación más común de los biosensores electroquímicos es la detección temprana, a bajas concentraciones, de señales asociadas con determinados biomarcadores, cuya concentración se asocia objetivamente a procesos biológicos normales, procesos patológicos, a estudios farmacodinámicos de dosis-respuesta, biomarcadores que son sustancias de bajo peso molecular como la glucosa en la sangre, hasta sustancias de alto peso molecular como son las proteínas o los ácidos nucleicos (Aronson, J.K., & Ferner, R.E., 2017). El empleo de estos biomarcadores para el diagnóstico oportuno de enfermedades ayuda a la reducción de costos en los tratamientos que están asociados con etapas más avanzadas de la enfermedad.

Con el desarrollo de la tecnología electrónica, estos sistemas de detección pueden proveer resultados analíticos en un menor tiempo, como ejemplo se tiene el glucómetro, para facilitar la eficacia en los tratamientos de la diabetes y así reducir los riesgos en etapas posteriores. Así mismo, los biosensores electroquímicos también pueden facilitar nuevos conocimientos para la comprensión de las interacciones de los nuevos fármacos con proteína, enzimas y con DNA que puede repercutir en un daño.

Los biosensores electroquímicos son los más adecuados para cumplir todos los requisitos de desarrollo de biosensores. El biosensor electroquímico detecta señales eléctricas o electroquímicas derivadas de la reacción entre las moléculas objetivo y las sondas de detección. Una ventaja de los biosensores electroquímicos es que se pueden utilizar varias técnicas de electroquímico para la detección, dependiendo del entorno y de las moléculas objetivo, se puede utilizar la voltamperometría cíclica (CV) y la voltamperometría diferencial de pulso (DPV) que tiene buena selectividad y alta sensibilidad. (Singh, A., *et al.*, 2021).

2. Electrodos voltamperométricos

2.1 Electrodos serigrafiados

Para el desarrollo de métodos analíticos que respondan a la necesidad de análisis rápidos y prescindir de las celdas electroquímicas, la nanotecnología y la explotación de nuevas técnicas de fabricación, que ofrezcan sistemas de detección simples, más pequeños, adecuados y portátiles. Aunque un electrodo serigrafiado no menos robusto que que un

electrodo de grafito, muestra una ventaja al ser más flexibles, que ha demostrado ser reproducibles, desechables, estables y de costo bajo. La tecnología de serigrafía, químicamente demuestran ser inerte, conteniendo bajos ruidos de fondo, así como una elevada ventana de señal y amplificación voltamperométrica (Yamanaka, K., et al., 2016).

2.2 Electrodo de pasta de carbono

Los electrodos de pasta de carbono consisten en un hueco de teflón del cual se inserta un contacto eléctrico, ya sea platino o cobre, haciendo énfasis en el contacto de grafito, estos se pueden conseguir fácilmente llenando el hueco con una pasta semisólida mezclando polvo de carbono y un disolvente adecuado, que debe disponer una baja volatilidad, baja solubilidad como lo es el aceite mineral (nujol), lo particular de este disolvente se basa en el carácter hidrofóbico del nujol para garantizar el atrapamiento de las moléculas de bioconocimiento en el medio acuoso, ya que este permite la introducción de mediadores electroquímicos y así favorecer los procesos de transferencias de electrones. En cuanto a la elección del polvo de grafito, sólo se considera importante resaltar el no emplear polvo de tipo arenoso ya que este presenta una superficie rugosa, que conlleva a un problema a la hora de las lecturas del electrodo. (Cespedes, F., Alegret, S., 1996)

3. Electroquímica

3.1 Voltamperometría

Son técnicas electroquímicas, a través de las cuales se obtiene información sobre el analito de interés, variando el potencial del electrodo de trabajo, para después medir la corriente resultante. Existe una amplia gama de formas de generar las señales a las que se puede someter al electrodo de trabajo de los biosensores electroquímicos, lo que da lugar a la variedad de técnicas voltamperométricas existentes como la voltamperometría cíclica y la diferencial de pulso, las cuales se utilizan considerablemente en plataformas de detección debido a su bajo costo, buena selectividad y alta sensibilidad. (Allen, 1980)

3.1.1 Voltamperometría cíclica (CV)

Voltamperometría cíclica es la técnica más utilizada para la obtención de información cualitativa acerca de las reacciones electroquímicas ya que esta va relacionada con la capacidad para proporcionar información considerable sobre la termodinámica del proceso redox en un amplio intervalo de potencial. siendo la CV el primer experimento que se presenta en un estudio electroquímico de un compuesto, de un material biológico, o de una superficie de electrodo. (Allen, 1980): El potencial se varía linealmente conforme al tiempo y se varía en forma cíclica en dirección anódica y en dirección catódica. La respuesta es una corriente eléctrica que es positiva para proceso de oxidación y es corriente negativa en proceso de reducción,

3.1.2 Voltamperometría diferencial de pulso (DPV)

La DPV está basada en el hecho de que, tras un cambio repentino en el potencial aplicado se origina un aumento en la corriente, se aplica un potencial inicial y después un potencial

mayor o menor, en forma de escalera. Lo que se registra es la diferencia entre la corriente final y la corriente inicial originando un voltamperograma en forma de pico, es un área diferencial consistente en un pico de corriente, cuya altura es directamente proporcional a la concentración de analito. (Ambel, 1999)

4. Propiedades electroquímicas del DNA

Se ha dado a conocer que el DNA es electroquímicamente activo y una sustancia tensioactiva que presenta comportamientos distintos en diferentes electrodos (Brabec et al., 1996). Las bases de DNA como la guanina, adenina y citosina producen señales redox en los electrodos de amalgama sólida de plata (AgSAE) y mercurio (ME). La adenina produce una onda única, grande, dependiente del pH y controlada por difusión (con un potencial (V) entre -0.975 y 0.084, para valores de pH entre 1.0 y 6.0). La guanina se puede reducir a potenciales negativos que están cerca del muro de reducción. (Kurbanoglu et al., 2016)

Los estudios electroquímicos demostraron que todas las bases de DNA 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 citosina y timina. (Kurbanoglu et al., 2016)

5. Técnicas de inmovilización de DNA

Para diseñar los biosensores electroquímicos que incorporan la parte de bioreconocimiento, se necesita de la inmovilización del elemento biológico sobre la superficie del transductor. Un aspecto importante para la preparación del biosensor es que se debe implementar una tecnología de diagnóstico adecuado que puede detectar los biomarcadores en el sudor, orina y sangre. Las combinaciones de técnicas de inmovilización óptimas con transductores eficaces darán lugar a un biosensor eficaz, donde se garantice la preservación de la estructura, función, y actividad biológica de las biomoléculas inmovilizadas durante el uso del biosensor. Para el desarrollo de un método de detección de DNA que sea sensible, específico y económico, se lleva a cabo la aplicación de distintos métodos que ayuden a monitorear las sondas de DNA inmovilizadas en el electrodo. (Nivens, D. A., & Conrad, D. W., 2002)

5.1 Adsorción

La estrategia más antigua y sencilla inmovilización de DNA fue simplemente dispersando las moléculas de DNA sobre un sustrato de electrodo hasta que fueron adsorbidas físicamente sobre la superficie del electrodo (Hirayama et al., 1996).

Las sondas de DNA son inmovilizadas en la superficie del electrodo por adsorción electrostática que se emplea en el grupo fosfato del DNA cargado negativamente y la película del electrodo cargado positivamente, en la Figura 3, se muestra la base de la adsorción electrostática para la inmovilización de DNA.

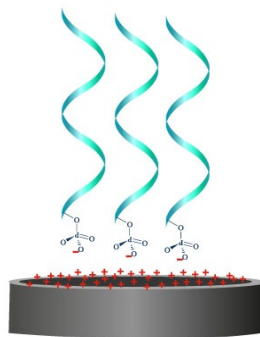


Figura 3. Representación esquemática de la inmovilización de sonda de DNA por adsorción electrostática. Nota: Elaboración propia

Sin embargo, dicha estrategia presenta un inconveniente en cuanto a la reversibilidad y variabilidad, con ello se presenta un problema cuando las condiciones del ambiente varían, estos son el pH, temperatura, disolventes empleados, etc.

Se conoce, así mismo que esta técnica basada en la adsorción electrostática, la monocapa de sondas de DNA tiene un elevado riesgo de desorción de la superficie del electrodo bajo el dominio del buffer de pH, con ello se asocia a que las sondas de DNA se inmovilizan de manera aleatoria en múltiples sitios de la superficie del electrodo que afecta directamente en la eficiencia de la hibridación del DNA. (Rashid & Yusof, 2017).

Este método no requiere un catión especial químicamente modificado de DNA en la superficie del electrodo; por lo tanto, da como resultado la simplicidad y facilidad de uso. Sin embargo, la adherencia de las bases de DNA al sustrato puede llevar a una inaccesibilidad del DNA inmovilizado durante la hibridación (Moser et al., 1997).

5.2 Unión covalente

La técnica de inmovilización de DNA por enlace covalente proporciona una estabilidad y alta fuerza de unión la sonda de DNA se deposita en la superficie del electrodo debido a la orientación vertical donde do lo que resulta en una alta eficiencia en la hibridación de DNA. La sonda sintetizada se une con el grupo de tioles (S-H) o aminas (NH₂) al final de la cadena 3' o 5' para unirse covalentemente a la superficie del electrodo o grupo funcional específico inducido, como ejemplo el oro (Au) (Nivens, D. A., & Conrad, D. W., 2002)

5.3 Atrapamiento

Este método consiste en la retención física del elemento de reconocimiento dentro de una matriz sólida o semisólida porosa. Este método emplea el atrapamiento mediante electropolimerización, así como el uso de pasta de carbono y composites conductores. Para los electrodos de carbono se puede obtener mezclando polvo de carbono con un conglomerante como el aceite de parafina, esto hace que el carácter hidrofóbico del conglomerante garantiza el atrapamiento de las moléculas de reconocimiento en medio acuoso. (Nivens, D. A., & Conrad, D. W., 2002)

6. Contribución de las nanopartículas de oro en biosensores electroquímicos

Al igual que en otros biosensores, las nanopartículas de oro (AuNPs) pueden desarrollar una pieza clave tanto en la inmovilización del DNA directamente en la superficie del electrodo, así como en la mejora de etiquetas para detectar los eventos de hibridación. un ejemplo del autoensamblaje es donde las AuNPs en el electrodo facilitan la fijación de un grupo mercapto hexilo con el extremo 5-fosfato de la cadena de DNA (Jiang, P., et al., 2018)

6.1 Como potenciadores

En los biosensores electroquímicos, las propiedades que posee las AuNPs desempeñan un papel importante al facilitar un microambiente idóneo mejorando la sensibilidad y la especificidad, así como para la inmovilización de biomoléculas que retiene su actividad biológica y facilita la transferencia de electrones entre las proteínas inmovilizadas y las superficies de los electrodos para mejorar la conductividad. Todo esto ha llevado al uso de este nanomaterial que brinda una mejor respuesta a los análisis analíticos mediante la inmovilización de AuNPs donde la superficie del electrodo y así mostrar una mejor sensibilidad por la mejora de transferencia de electrones y el aumento de la cantidad inmovilizada del agente de bioreconocimiento. El tamaño de las AuNPs influye en el rendimiento del biosensor que llega a afectar la reproducibilidad y linealidad de la señal de salida (Jiang, P., et al., 2018). Cuando se controla la relación entre el citrato y el Au^{3+} , al momento de emplear el método de síntesis de AuNPs, donde el citrato funciona como agente reductor y como agente estabilizador, se puede controlar el tamaño de las partículas de AuNPs, que varía de un tamaño de partícula de 15 a 150 nm. A medida que aumenta la concentración del citrato, el tamaño de las partículas disminuirá debido al proceso de estabilización del citrato. A bajas concentraciones de citrato, la cobertura del citrato sobre las AuNPs es incompleta y el proceso de agregación lleva a formar partículas más grandes. (Alex, S., & Tiwari, A., 2015)

Capítulo III: Planteamiento del problema

Actualmente existe la necesidad de métodos y dispositivos analíticos rápidos y fiables para el diagnóstico temprano de la enfermedad, que sean capaces de monitorear continuamente, para reducir los costos de un tratamiento asociado con etapas posteriores

Es por ello, que se ha trabajado en la construcción de biosensores electroquímicos potencialmente, que, no solo debe tener una alta confiabilidad, sensibilidad y reproducibilidad, sino que también debe ser económico y accesible, permitiendo que el mayor número posible de usuarios acceda a él. (Monošík, R., et al., 2012).

Para dicha construcción se requiere desarrollar métodos de inmovilización que permiten el reconocimiento en la superficie del transductor, ya que este es un paso necesario para el desempeño del biosensor, ya que se compromete la estabilidad y la estructura y función de las biomoléculas utilizadas como marcadores de reconocimiento biológico.

7. Objetivo general

7.1 Analizar los resultados de la inmovilización de DNA sobre la superficie de distintos sustratos para la construcción de biosensores.

8. Objetivos específicos

8.1 Cuantificar la concentración de DNA inmovilizada en el electrodo.

8.2 Evaluar la reproducibilidad de la concentración de DNA inmovilizada en el electrodo.

8.3 Evaluar la estabilidad del electrodo

8.4 Comparar los diferentes métodos en términos de su funcionalidad.

Capítulo IV: Material y método

Reactivos

DNA from salmon testes

Elaboración de buffer de fosfatos pH

Bifosfato de sodio (NaH_2PO_4)

Fosfato de sodio (Na_2HPO_4)

Elaboración de buffer de acetatos pH

Ácido acético (CH_3COOH)

Acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}$)

Elaboración de AuNPs

Ácido tetracloroaurico (HAuCl_4)

Citrato trisódico

Elaboración de biosensores de grafito

Grafito grado microcristal

Aceite mineral (nugol)

Screen printing

Los biosensores, bajo el esquema de screen printing (SPE), se realizaron con diluciones de DNA (single stranded (DNAss) from salmon testes), donde se utilizó una solución pesando 10 mg de DNA y homogeneizando en un agitador térmico para microtubos Thermo-Shaker TS-100 Biosan®, en un 1 mL de buffer de fosfatos pH 7.5; a partir de una solución stock de 1 mg/mL preparada con el procedimiento anterior, se realizó una primera disolución donde se tomaron 300 μL de DNA en 700 μL de solución buffer de fosfatos pH 6.1, y se estableció lo mismo para las concentraciones 4 mg, 5 mg, 6 mg y 7 mg y completar 1000 μL de solución y se mezclaron en el agitador térmico hasta su homogeneización completa. Dichas soluciones fueron almacenadas y etiquetadas en tubos Eppendorf® y se mantuvieron a una

temperatura constante de refrigeración a 4° C. Sobre el electrodo de trabajo se colocó una gota del DNA (concentración deseada) y se esperó a que esta se adsorbiera. Los biosensores electroquímicos basados en la electrodeposición de DNA sobre la superficie del electrodo se prepararon colocando 1 gota de solución de DNA (concentración deseada) sobre SPE aplicando un potencial y tiempo de deposición de 1.4 V y 100 s respectivamente.

Pasta de grafito

Para la construcción del biosensor electroquímico, se utilizó el mismo procedimiento de preparación de DNA, el biosensor DNA se preparó una pasta semisólida de 250 mg de grafito grado microcristal con 400 µL de aceite mineral y 1 mg/0.5 mL, 2 mg/0.5 mL y 3 mg/0.5 mL de DNA, respectivamente. Cada electrodo, por separado, se colocó en la celda electroquímica de 50 mL (solución reguladora de acetatos más NaCl 1M, a un pH de 4.45 y temperatura de 25°C). Se realizó un barrido de potencial entre 0 a 1.3V y a una velocidad de 50 mV/s.

Biosensor DNA / AUNPs

Se pesó en una balanza analítica 250 mg de polvo de grafito grado microcristal (partículas de 5-20 um de diámetro) con un conglomerante como el nujol (aceite mineral) en proporción 1:1, posteriormente se pesaron 10 mg de DNA el cual está a una concentración 1 mg/0.5 mL, y posterior se pesaron 20 y 30 mg de la misma concentración de DNA, ya en los electrodos de pasta de carbono se agregaron 25µL de AuNPs. Todo lo anterior se mezcló homogéneamente hasta formar una pasta de trabajo semi sólido (Figura 3b).

Síntesis de AuNPs

El método utilizado para la síntesis de AuNPs esféricas es la reducción del tetracloruro de hidrógeno (III) (HAuCl_4) en agua utilizando citrato trisódico. En esta técnica, se hirvió una solución acuosa de HAuCl_4 y, en ella se añadió rápidamente una solución de citrato trisódico dihidratado siempre manteniendo una agitación vigorosa. Posteriormente, se obtuvo una suspensión de oro de color rojo vino con un tamaño aproximado de 20 nm.

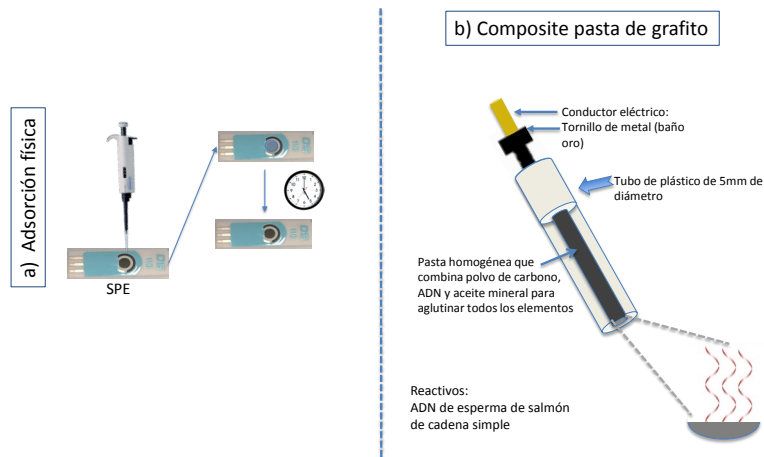


Figura 4. Representación esquemática de la construcción de los biosensores

Mediciones electroquímicas

Para la estrategia de adsorción se elaboraron 5 electrodos serigrafados de carbono Ω Metrohm® DropSens 110, este sensor posee 3 electrodos integrados: uno de trabajo y un auxiliar de carbono, y uno de referencia que es de plata (Figura 2). Cada electrodo se leyó en un potenciostato portable por la técnica de adsorción colocando 100 μ L de la solución problema de DNA [3mg/mL], [4mg/mL], [5mg/mL], [6mg/mL] y [7mg/mL], sobre el electrodo de trabajo y se esperó a que esta se absorbiera; posteriormente se colocó una gota de solución buffer de acetatos pH 4.5 sobre toda la superficie del electrodo y se aplicó un potencial de +1.3 V utilizando el software Dropview 8400®.

Las mediciones del biosensor de pasta de grafito, se hicieron usando un sistema electroquímico de 3 electrodos El sistema se conformó por una celda de vidrio con un electrodo de trabajo (pasta de grafito), uno de referencia (Ag/AgCl) y un auxiliar (Pt), Todas las mediciones voltamperometricas se hicieron empleando un potenciostato Autolab PGSTAT302N. Las mediciones se hicieron en 10 mL de una solución buffer de acetatos en pH 4.45 y 1 mL de NaCl 1M.

Capítulo V: Resultados y discusión

Como material esencial de la herencia biológica, el DNA es el portador de la información genética y desempeña un papel fundamental en el control de procesos biológicos, además es una diana objetivo en el uso de los fármacos, los cuales pueden tener una actividad farmacológica conducida a dañar o preservar la molécula de DNA. Estos fármacos pueden afectar los procesos de replicación del DNA y a su vez los procesos de transcripción y desencadenar en mutaciones de genes. Estas interacciones DNA-fármaco se relacionan con actividad cancerígena y toxicológica. (Hai, X., et al., 2020)

Para dar una respuesta a esta actividad, los métodos electroquímicos son útiles para registrar respuestas debidas a la interacción fármaco-DNA, a través del registro de los diferentes potenciales, esto se realiza con ayuda de los biosensores electroquímicos, que, basados en DNA crean dispositivos emergentes, herramientas confiables, simples, eficaces de bajo costo y portátiles. Sin embargo, para poder lograr estos dispositivos es necesaria la inmovilización de sondas de ADN monocatenario (ssDNA), promover la alta reactividad y orientación de la sonda inmovilizada (Hirayama et al., 1996).

Biosensor screen printing

En la Figura 5 a) se observa el voltamperograma de barrido lineal para la solución standard (20 μ g/mL) de las bases púricas de ADN el primer pico definido correspondiente a la guanina en +0.8V, seguido del pico correspondiente a la adenina a un potencial de +1.12 V. en comparación con la inmovilización del DNA por adsorción, se observa un ligero corrimiento hacia potenciales mayores.

Por otra parte, se observó que el biosensor se pasiva, pues después de la limpieza con agua y al realizar una 2da lectura Figura 5 b), ya no se observaron las señales de guanina y adenina, a las mismas condiciones de temperatura y pH, sin embargo, después de 30min de reposo, el biosensor se vuelve a activar. Lo que supondría tener un biosensor de un sólo uso.

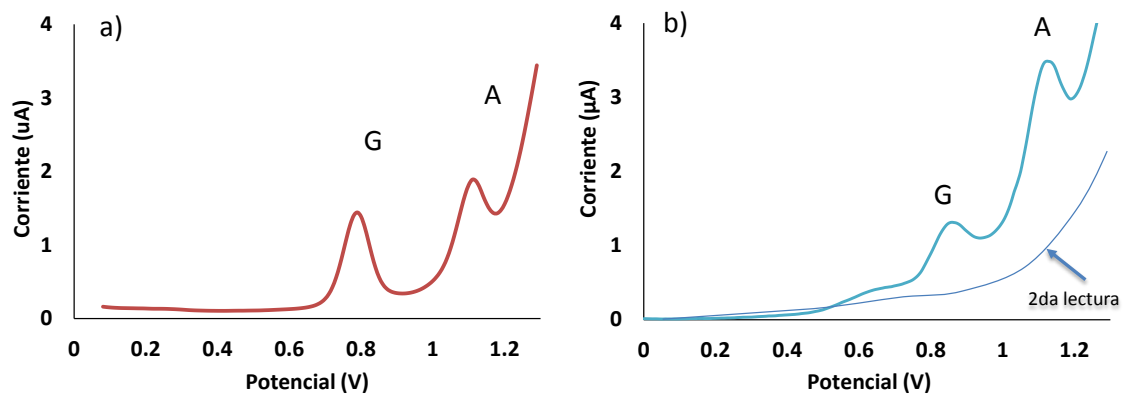


Figura 5. Voltamperogramas a) de la solución estándar de las bases nitrogenadas de ADN (20 μ g/mL), b) del biosensor de ADN (5mg/mL), la inmovilización fue sobre SPE. Ambos en buffer de acetatos pH 4.5

Para evaluar la respuesta de la señal analítica en función de la concentración de DNA del biosensor, se corrieron los voltamperogramas a las diferentes concentraciones y se construyó una curva de calibración expresada como la intensidad de corriente (μ A) vs la concentración DNA inmovilizada. Los resultados experimentales se muestran en la Figura 6 a. La linealidad del sistema se determinó por mínimos cuadrados, con coeficiente de regresión (R^2) para guanina de 0.956 y para adenina de 0.899. Como se observa el

aumento de la concentración en la señal de la guanina no es significativa y esto puede ser apreciado con el valor de la sensibilidad tan pequeño ($0.037\mu\text{A}/\text{mg}$), mientras que para adenina la sensibilidad es 3 veces superior, Figura 6 b. Dado que la sensibilidad y la linealidad de biosensor de DNA es pobre, se probó otro método de inmovilización, con el fin de mejorar sus parámetros analíticos.

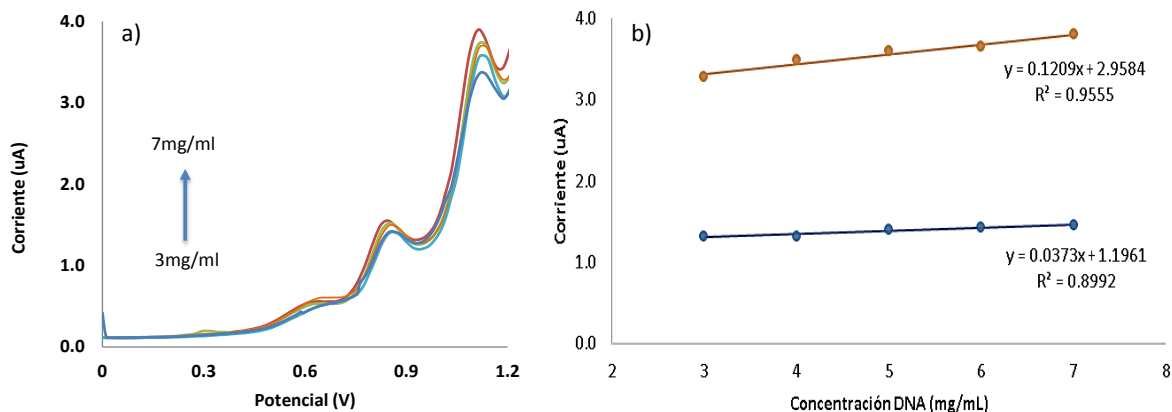


Figura 6. Voltamperogramas de los biosensores de ADN (3, 4, 5, 6, y 7mg/mL), inmovilizado sobre SPE en buffer de acetatos pH 4.5. b) Curva de calibración de guanina y adenina de las señales del biosensor

Inmovilización DNA por electrodeposición

De acuerdo con Moser (1997), una estrategia para mejorar la adsorción de los biosensores electroquímicos consiste en electrodepositar el DNA sobre la superficie del electrodo, para lo cual se aplica un sobrepotencial durante un tiempo establecido, lo que permitirá realizar una deposición selectiva.

La evaluación del biosensor mostró a través del voltamperograma la señal de guanina (0.7 V) y adenina (0.95V), se puede observar que la inmovilización es más efectiva, lo cual se muestra con el incremento de intensidad de corriente hasta en 10 veces. Cabe señalar que al realizar una segunda se presenta la misma dificultad que con el biosensor anterior, esto es el biosensor se pasiva y no es posible observar las señales de las bases púricas.

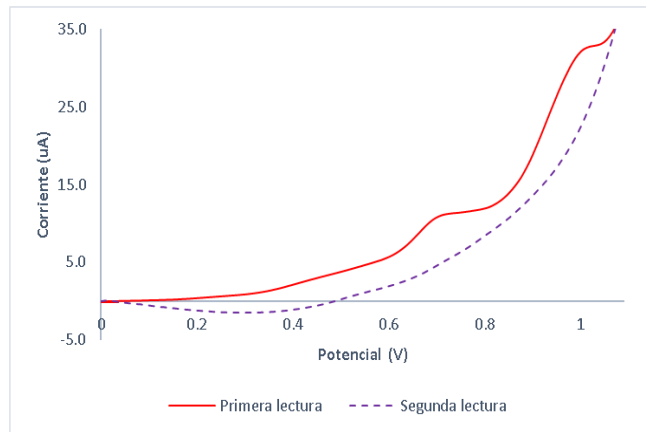


Figura 7. Voltamperograma diferencial de pulso de procesos redox del biosensor de DNA por adsorción pasiva con tiempo de deposición de DNA sobre un electrodo nuevo y después de lavado.

Bisensor pasta de grafito

De acuerdo con los resultados arrojados con biosensores de SPE, se optó por la elaboración de biosensores basados en pasta de grafito donde se realiza la inmovilización por atrapamiento.

La celda (figura 8), dispuso de un electrodo de trabajo de pasta de grafito + DNA, junto a un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) y un contraelectrodo de platino, en 10 mL de una solución buffer de acetatos en pH 4.45 y NaCl 0.1M.

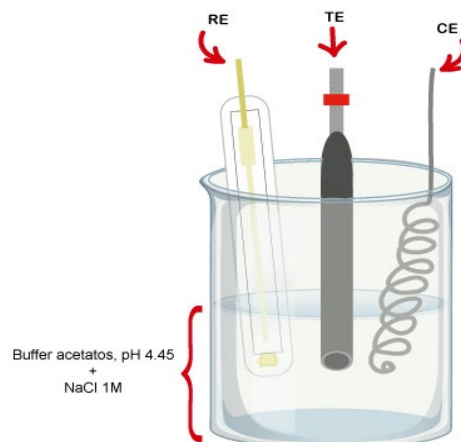


Figura 8. Celda electroquímica utilizada para la evaluación del biosensor de pasta de grafito, electrodo de trabajo (biosensor, TE), contraelectrodo (CE) y electrodo de referencia (RE)
Nota: Elaboración propia

El comportamiento redox del DNA inmovilizado en el electrodo de grafito mostró dos picos de oxidación relacionados con las bases guanina (+0.8 V) y adenina (+1.1V), que, de acuerdo con Brett, A., et al., la guanina se oxida a un potencial más bajo, es la base más fácil de oxidar de todas las bases de DNA. En el voltamperograma registrado de DNA [1 mg/0.5 mL] (Figura 9) sólo se observan los picos de las bases púricas, bajo las condiciones

de trabajo. Cabe señalar que la señal de guanina y adenina persisten aun después del lavado y son observables en el barrido inmediato, manteniendo la misma señal.

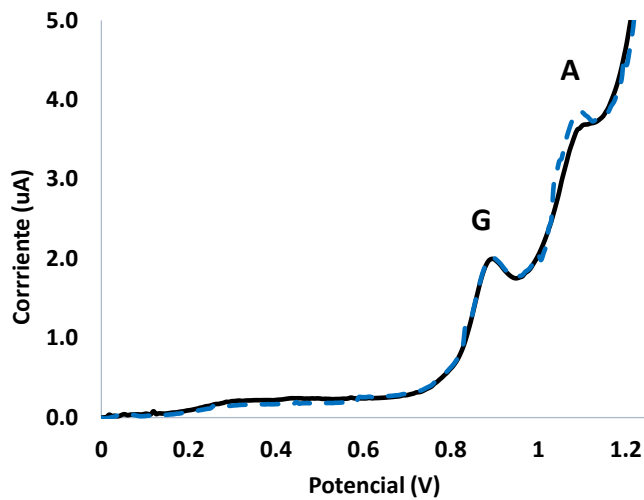


Figura 9. Voltamperograma diferencial de pulso de procesos redox del biosensor de DNA obtenido en un electrodo de grafito en concentración de 1 mg/0.5 mL.

Para analizar la respuesta analítica en función de la concentración, se elaboraron por triplicado electrodos preparados con 250 mg de grafito + 2 mg, 4 mg y 6 mg de DNA a una concentración de 1 mg/mL dando tres concentraciones (C) distintas, $C_1 = 2$ mg/mL, $C_2 = 4$ mg/mL y $C_3 = 6$ mg/mL de DNA, respectivamente. Cada electrodo, por separado, se colocó en la celda electroquímica y se aplicó previamente un barrido de potencial de 0 a 1.4 V durante 120s.

La evaluación de la respuesta de los biosensores de las tres concentraciones de DNA se presenta en los voltamperogramas de la Figura 10. Cada biosensor muestra la señal típica de guanina y adenina, sin embargo, cuando se hace el análisis de la respuesta vs concentración se observa que solo la señal de adenina aumenta con la concentración, mientras que la señal de guanina tiene un comportamiento aleatorio, lo que impide una cuantificación confiable.

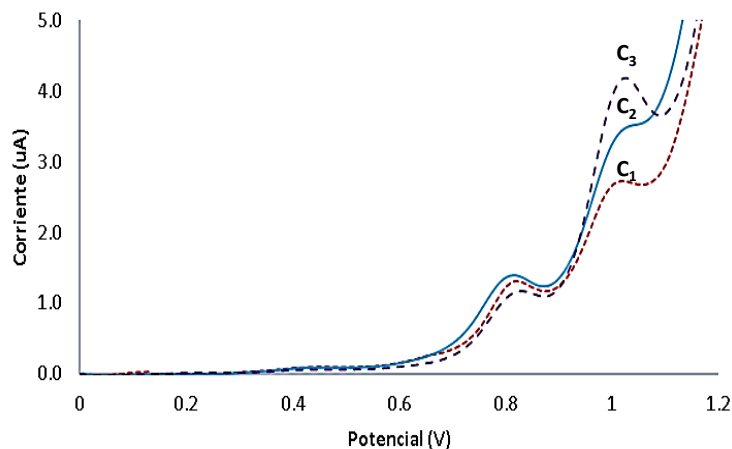


Figura 10. Voltamperograma diferencial de pulso para evaluar los procesos redox del biosensor de DNA en concentraciones de $C_1 = 2$ mg/mL, $C_2 = 4$ mg/mL y $C_3 = 6$ mg/mL en una celda electroquímica de 3 electrodos en buffer de acetatos a pH 4.45.

Una cuantificación más adecuada es a través de considerar las señales de guanina y adenina como fragmentos de DNA, por lo que usualmente se hace una curva de calibración de las bases púricas y se usa para determinar la cantidad de guanina y adenina en la muestra. Ya que las lecturas del biosensor se ven influenciadas por la composición de la molécula de DNA, como lo es el grupo fosfato en el ácido fosfórico que se encuentra unido a la desoxirribosa a través de un enlace fosfodiéster y así formar un nucleótido, lo que supone que 1mg/mL de DNA no representa necesariamente 1mg/mL de guanina, adenina, timina ó citocina, debido a su composición como se ha mencionado.

Para poder hacer una cuantificación apropiada, se realizaron curvas de calibración a partir de los estándares de guanina y adenina. La figura 11 muestra las curvas de calibración en el intervalo lineal de $2\mu\text{g/mL}$ a $30\mu\text{g/mL}$ y de $1\mu\text{g/mL}$ a $30\mu\text{g/mL}$, para guanina y adenina respectivamente, para ambos casos el coeficiente de determinación (r^2) es superior a 0.99. La ecuación que se ajusta al modelo lineal para guanina es $i (\mu\text{A}) = 0.1526C - 0.1959$; y para adenina es $i (\mu\text{A}) = 0.1673C - 0.0117$.

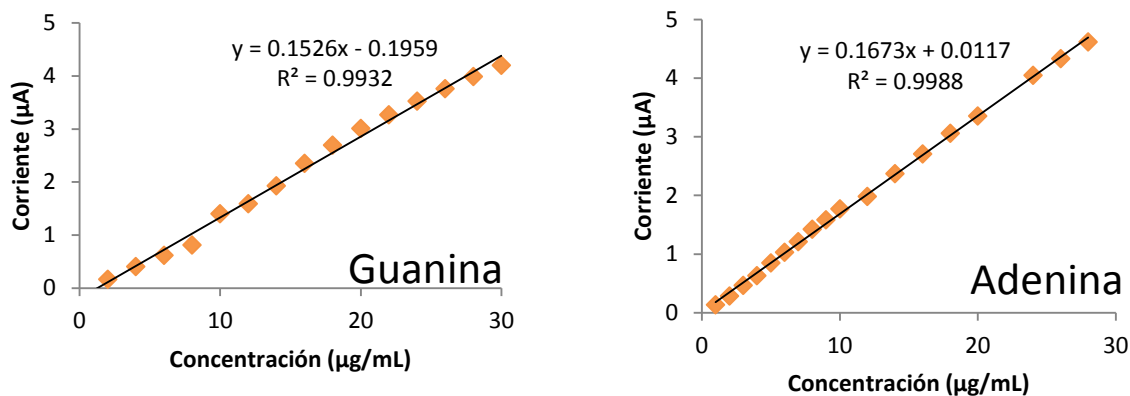


Figura 11. Curvas de calibración estandar de guanina y adenina

A partir de la Curva de calibración de adenina, se calculó la concentración de adenina en la superficie del biosensor. Es necesario recordar que el ADN se inmovilizó en un tubo de longitud de 3cm y que la lectura del biosensor representa la cantidad de adenina o guanina sobre la superficie del biosensor, es decir una fracción del total de la cantidad del material biológico. La cuantificación empleando las lecturas del biosensor asociadas a la señal de adenina y su correspondiente ecuación, arrojaron los datos de la tabla 1.

Tabla 1. Cuantificación del nucleótido adenina.

Adenina	
Corriente (μA)	Cocentración(μg/mL)
2.6	15.47
3.6	21.45
4.2	25.03

Sería aventurado decir que la cantidad de adenina en los biosensores corresponde al valor mostrado en la Tabla 1. Sin antes validar la respuesta de los biosensores, por lo que a continuación se presenta la estabilidad y la validación del biosensor.

Repetibilidad

La repetibilidad de las mediciones de un mismo electrodo se presenta en la Tabla2, como se observa las mediciones presentan una desviación estándar relativa (DSR) en la corriente menor al 10%. Por otra parte, la reproducibilidad de 3 electrodos con 3 mediciones arrojó una DSR del 12%.

Tabla 2. Repetibilidad de la seña del biosensor de DNA matriz de grafito (mismo electrodo, ADN 0.9mg/ml)

Repetición	Guanina (uA)	Adenina(uA)
R1	1.89	3.31
R2	2.00	3.69
R3	1.81	3.51
R4	1.91	3.28
R5	2.01	3.85
R6	1.77	3.86
Promedio	1.90	3.58
DE	0.10	0.26
DSR	5.20	7.23

La evaluación de la estabilidad de los biosensores mostro que después de 4 semanas de almacenamiento la señal del ADN pierde entre el 15 y 20%, Tabla 2.

Estabilidad

Para validar el tiempo de vida media del biosensor, se siguió la respuesta analítica (corriente) de un mismo biosensor de concentración 4 mg/mL, manteniendo en refrigeración 4°C, cuando estaba fuera de uso.

Para verificar el periodo de vida útil del biosensor se siguió la lectura durante 4 semanas consecutivas (Figura 12).

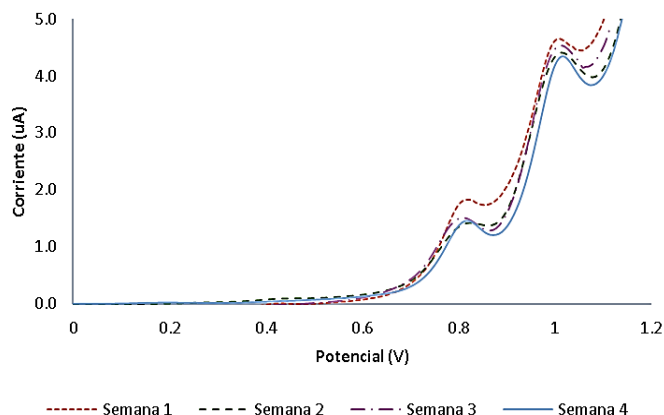


Figura 12. Voltamperogramas del biosensor para evaluar su estabilidad durante 4 semanas

La Tabla 3, presenta la estabilidad de los biosensores a través de la señal de las bases púricas, donde se muestra que la variación

La evaluación de la estabilidad de los biosensores mostro que después de 4 semanas de almacenamiento la señal del ADN pierde entre el 15 y 20%.

Tabla3. Estabilidad durante 4 semanas de los biosensores (ADN 1.81mg/mL), considerando las señales de Guanina y Adenina.

Estabilidad 4 semanas				
Biosensor	Guanina		Adenina	
	Corriente / μ A	% señal	Corriente / μ A	% señal
B1	1.76	78.72	5.015	97.37
B2	1.84	84.96	5.237	83.69
B3	1.46	79.87	4.65	93.44
Promedio	1.68	81.18	4.97	91.50
DE	0.20	3.32	0.30	7.04
DSR	12.02	4.09	5.97	7.69

Capítulo VI: Conclusiones

En el presente trabajo se elaboraron biosensores electroquímicos con diferentes técnicas de inmovilización de los fragmentos de ADN, así como usando distintos

soportes para el biosensor como lo es el electrodo por “screen printing” (SPE) y el electrodo de pasta de carbono. El SPE permite la inmovilización de biomoléculas, como lo fue el DNA y permitió fabricar un biosensor selectivo y desechable de un solo uso. El biosensor se basa en la monitorización de la cantidad de DNA inmovilizado, unión en la superficie del electrodo, y evaluando el flujo de electrones. Por lo tanto, este biosensor se considera un electrodo que puede aplicarse y ser desechable, barato, reproducible, sensible y convirtiéndolo en un dispositivo portátil. El biosensor se puede adaptar a aplicaciones concretas que, con base en la caracterización del diseño propuesto en el presente trabajo, se puede mejorar este modelo.

El uso de microestructuras para la detección de elementos de bioreconocimiento a bajas concentraciones, prometen ser una excelente alternativa. En el presente trabajo se diseñó un biosensor basado en pasta de grafito que incluye los fragmentos de ADN, y se demostró que a las condiciones experimentales establecidas se puede monitorear la oxidación de las bases de DNA, y de forma indirecta la cuantificación de la concentración superficial de DNA y las bases púricas de interés. La cantidad de ADN en la superficie (o en la concentración por gramo de pasta) es proporcional a la señal voltamperométrica que se obtiene como respuesta. Considerando los resultados obtenidos, para una mayor reproducibilidad en la respuesta del biosensor se requiere mejorar la técnica de homogeneización del DNA en la pasta de grafito. La caracterización electroquímica del biosensor permite establecer que el proceso de oxidación de las bases púricas es irreversible, por lo que es necesario renovar la superficie del electrodo (pulir) para la regeneración superficial de los fragmentos de ADN y recuperar la señal voltamperométrica, esto se debe hacer antes de empezar a trabajar a diferentes días (al menos durante 4 semanas) y entre cada medición por medio de la técnica de voltamperométrica.

Referencias

1. Alex, S., & Tiwari, A. (2015). Functionalized gold nanoparticles: synthesis, properties and applications—a review. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 15(3), 1869-1894.
2. Allen, B.J. (1980); *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Canadá: John Wiley & Sons.
3. Ambel M. (1999); Desarrollo de técnicas electroanalíticas aplicables a metales en fluidos biológicos de interés biosanitario. Determinación de Cu en LCR. (líquido cefalorraquídeo). Tesis doctoral. Universidad de Extremadura, Badajoz, España
4. Aronson, J.K., & Ferner, R.E. (2017). Biomarkers—A general review. *Current Protocols in Pharmacology*, 76, 9.23.1-9.23.17.)
5. Brett, A. M. O., Serrano, S. H., & Piedade, A. J. P. (1999). Electrochemistry of DNA. In *Comprehensive Chemical Kinetics* (Vol. 37, pp. 91-119). Elsevier.
6. Cespedes, F., Alegret, S. (1996): New materials for electrochemical sensing: glucose biosensors based on rigid carbonpolymer bio-composites. *Food Technol. Biotechnol.* 34, 143–146.
7. Hai, X., Li, Y., Zhu, C., Song, W., Cao, J., & Bi, S. (2020). DNA-based label-free electrochemical biosensors: From principles to applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 133, 116098.
8. Hirayama, H., Tamaoka, J., and Horikoshi, K. (1996): Improved immobilization of DNA to microwell plates for DNA-DNA hybridization. *Nucleic Acids Res.* 24: 4098– 4100.
9. Ivanova, O. S., & Zamborini, F. P. (2010). Electrochemical size discrimination of gold nanoparticles attached to glass/indium– tin-oxide electrodes by oxidation in bromide-containing electrolyte. *Analytical chemistry*, 82(13).
10. Jiang, P., Wang, Y., Zhao, L., Ji, C., Chen, D., & Nie, L. (2018). Applications of Gold Nanoparticles in Non-Optical Biosensors. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 8(12), 977
11. Kissinger, P., & Heineman, W. R. (Eds.). (2018). *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, revised and expanded*. CRC press.
12. Kurbanoglu S., Dogan-Topal B., Plata E., Bozal-Palabiyik B., Sibel A.Ozkan A. S., & Uslu B. (2016); *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 775: 8-26
13. Lei Y., Chen W., Mulchandani A. (2006); Microbial biosensors. *Analytica Chim Acta*. 568:200–210.
14. Liu A., Wang K., Weng S., Lei Y., Lin L., Chen W., (2012) Development of electrochemical DNA biosensors. *TrAC Trends Analytica Chem.* 37: 101–111.
15. Monošík, R., Stred'anský, M., & Šturdík, E. (2012). Application of electrochemical biosensors in clinical diagnosis. *Journal of clinical laboratory analysis*, 26(1), 22–34.

16. Nivens, D. A., & Conrad, D. W. (2002). Photoactive poly (ethylene glycol) organosilane films for site-specific protein immobilization. *Langmuir*, 18(2), 499-504.
17. Rashid J. I. A., Yusof N. A. (2017); The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. *Sensing and Bio-Sensing Research*. 16: 19-31
18. Singh, A., Sharma, A., Ahmed, A., Sundramoorthy, A. K., Furukawa, H., Arya, S., & Khosla, A. (2021). Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope. *Biosensors*, 11(9), 336.
19. Sohrabi N., Alireza Valizadeh A., Farkhani M. S., & Akbarzadeh A., (2016); Basics of DNA biosensors and cancer diagnosis. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 44 (2): 654-663
20. Xiang Q. (2011); The Development and Application of Electrochemical Biosensor. *Information and Management Engineering*. 235: 215-220
21. Yamanaka, K., Vestergaard, M. D. C., & Tamiya, E. (2016). Printable electrochemical biosensors: a focus on screen-printed electrodes and their application. *Sensors*, 16(10), 1761.

Anexo. Respuestas de cada uno de los biosensores construidos y evaluados

Electrodo 1

Tabla 4. Electrodo 1 (DNA 2 mg/0.5 mL)		
	Guanina	Adenina
Semana 1	1.247	3.370
Semana 2	2.115	5.015
Semana 3	1.571	4.346
Semana 4	2.037	4.883
PROMEDIO		
	1.742	4.404
DE		
	0.408	0.747
CV		
	23.4%	17.0%

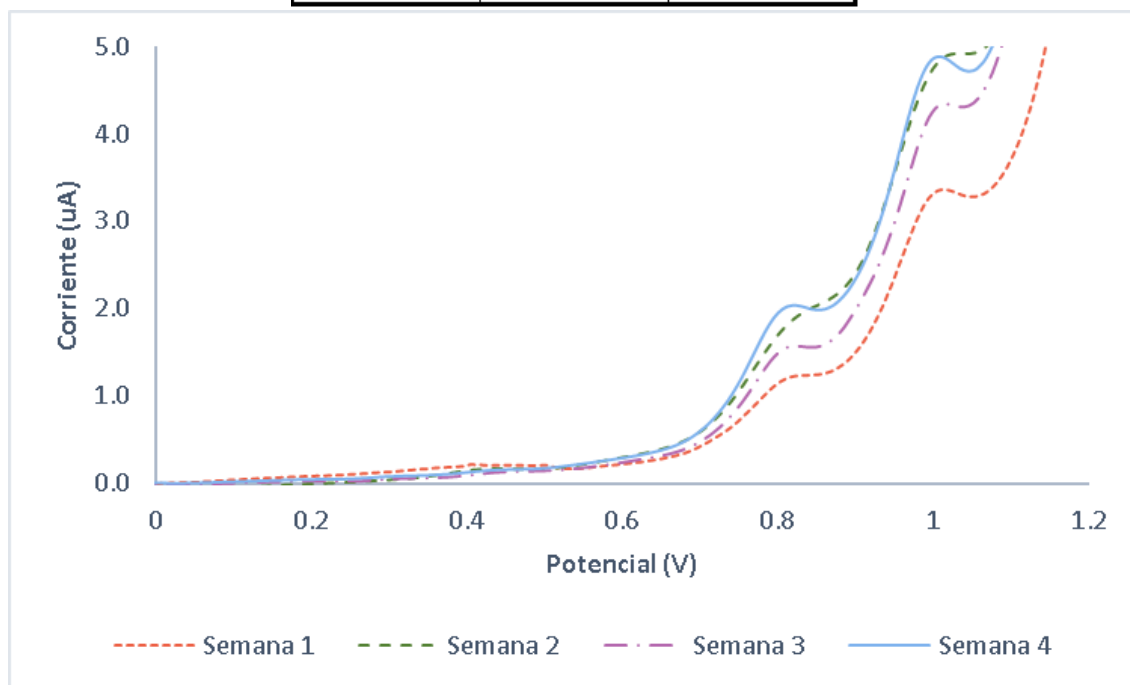


Figura A1. Voltamperograma diferencial de pulso de procesos redox del biosensor de DNA [2 mg/0.5 mL] del electrodo 1 a la semana 1, 2, 3 y 4 de valoración, en una celda electroquímica de 3 electrodos en buffer de acetatos a pH 4.45.

La respuesta arrojada en el electrodo 1 no entra en los valores < al 5% de CV ya que en la figura A1 se muestra el voltamperograma realizados en las 4 semanas de análisis, donde se observa que hacia la semana 4 la intensidad de señal se elevó en comparación de la semana 1, dando como resultados un CV de 23.4% y 17.0% para guanina y adenina respectivamente.

Electrodo 2

Tabla 5. Electrodo 2 (DNA 2 mg/0.5 mL)		
	Guanina	Adenina
Semana 1	1.648	2.312
Semana 2	1.301	1.581
Semana 3	1.096	1.609
Semana 4	1.856	3.307
PROMEDIO		
	1.475	2.202
DE		
	0.341	0.810
CV		
	23%	36.8%

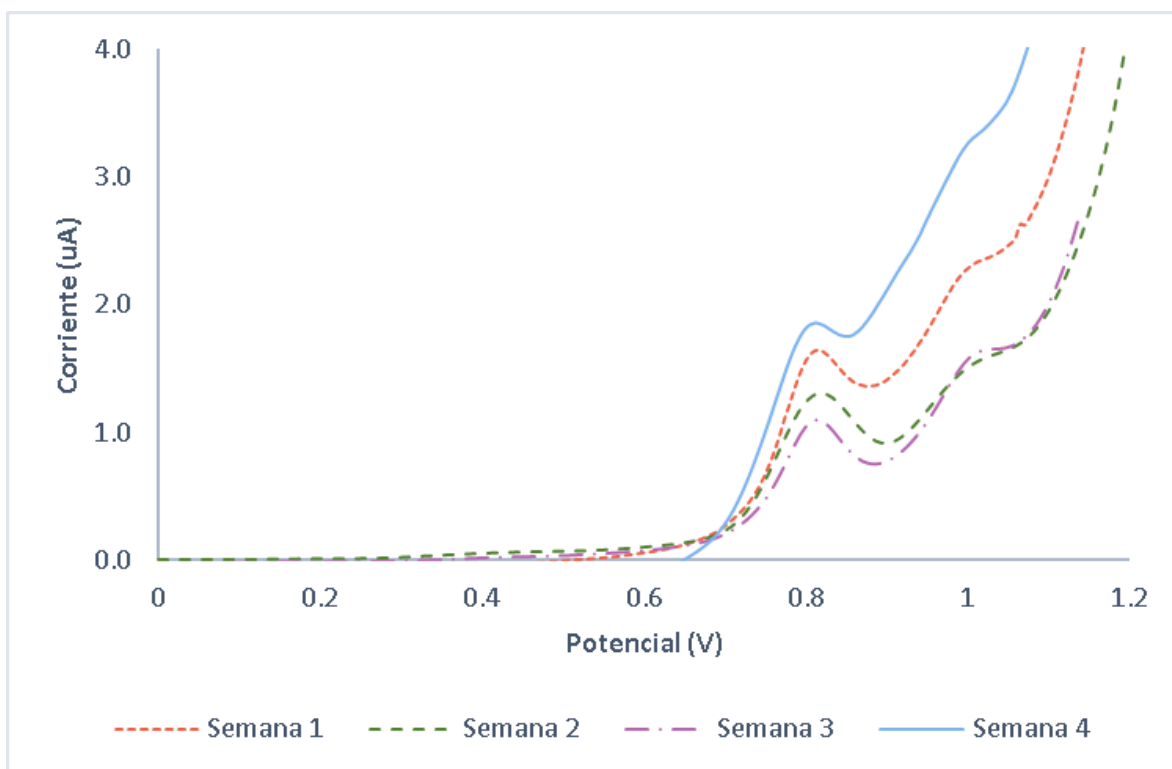


Figura A2. Voltamperograma diferencial de pulso de procesos redox del biosensor de DNA [2 mg/0.5 mL] del electrodo 2 a la semana 1, 2, 3 y 4 de valoración, en una celda electroquímica de 3 electrodos en buffer de acetatos a pH 4.45.

Para la figura A2, el voltamperograma realizados en las 4 semanas de análisis, se observa que la hubo variación significativa en las señales dadas para la adenina, mientras que para la guanina se mantuvo en picos definidos aunque existió una variación mayor en la intensidad de la corriente durante las semanas 3 y 4. Debido a los altos CV del electrodo 2 queda excluido del intervalo de aceptación, siendo mayores al 5%.

Electrodo 3

Tabla 6. Electrodo 3 (DNA 2 mg/0.5 mL)		
	Guanina	Adenina
<i>Semana 1</i>	2.483	7.688
<i>Semana 2</i>	2.313	6.858
<i>Semana 3</i>	2.071	7.845
<i>Semana 4</i>	1.644	4.892
PROMEDIO	2.128	6.821
DE	0.364	1.357
CV	17%	19.9%

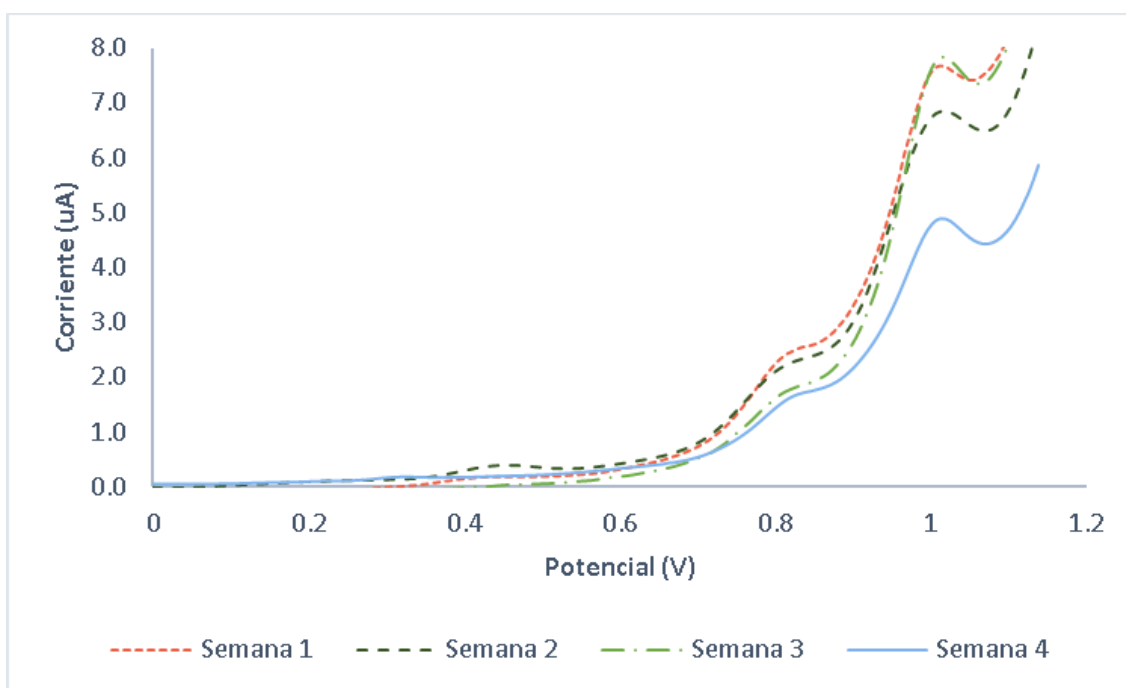


Figura A#. Voltamperograma diferencial de pulso de procesos redox del biosensor de DNA [2 mg/0.5 mL] del electrodo 3 a la semana 1, 2, 3 y 4 de valoración, en una celda electroquímica de 3 electrodos en buffer de acetatos a pH 4.45.

El mayor coeficiente de variación lo demuestra la adenina en el electrodo 3 que aunque tiene picos más definidos existe mayor variación al ir disminuyendo la intensidad de la corriente a lo largo de las 4 semanas, por su parte, la guanina mantiene un CV de 17% en picos menos definidos, dando por hecho un rechazo al porcentaje de recobro establecido.

Electrodo 4

Tabla 7. Electrodo 4 (DNA 2 mg/0.5 mL)		
	Guanina	Adenina
Semana 1	2.232	7.398
Semana 2	1.463	4.205
Semana 3	1.714	4.505
Semana 4	1.757	6.285
PROMEDIO		
	1.791	5.598
DE		
	0.321	1.511
CV		
	17.9%	27.0%

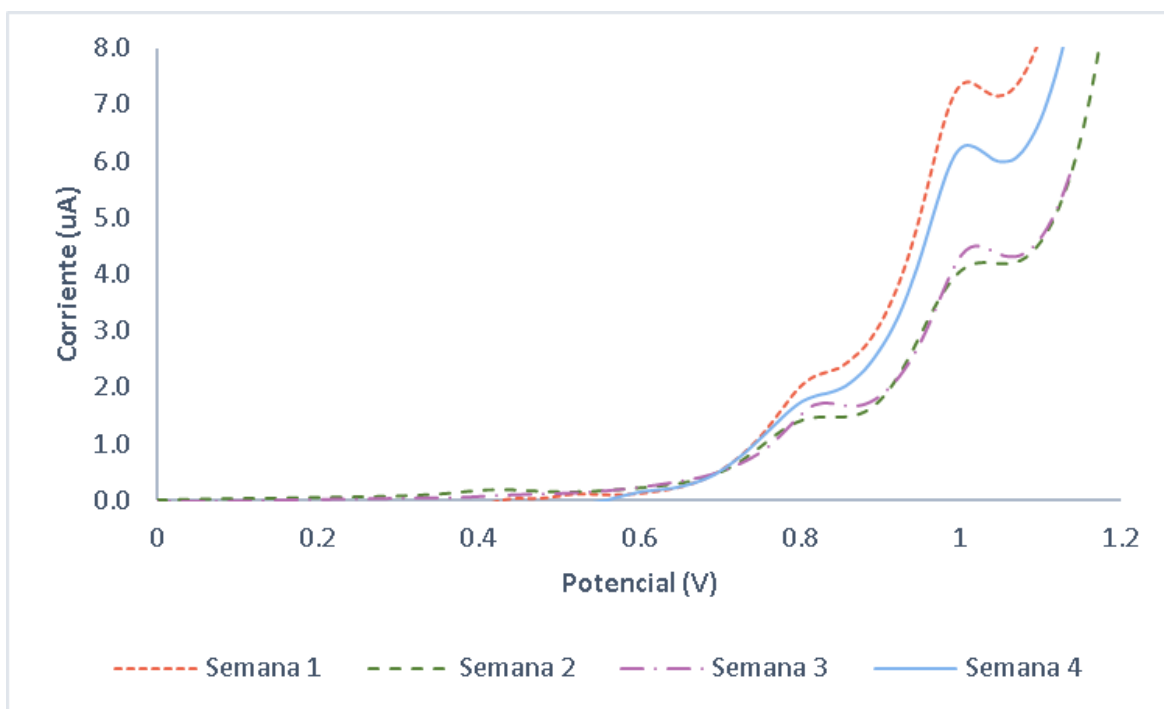


Figura A4. Voltamperograma diferencial de pulso de procesos redox del biosensor de DNA [2 mg/0.5 mL] del electrodo 4 a la semana 1, 2, 3 y 4 de valoración, en una celda electroquímica de 3 electrodos en buffer de acetatos a pH 4.45.

Para el caso del electrodo 4 (Figura A4) la guanina demostró una disminución de la intensidad de corriente de la semana 1 a la semana 2 y 3, mientras que para la semana 4 se establece un aumento en la intensidad de corriente, arrojando un CV de 17.9%. El mayor incremento de CV fue para la adenina con un 27% en el mismo caso con una disminución de la corriente en la semana 2 a comparación de la semana 1. Ambas bases de DNA no cumplen con un coeficiente de varianza menor al 5% en métodos biológicos.

Electrodo 5

Tabla 8. Electrodo 5 (DNA 2 mg/0.5 mL)		
	Guanina	Adenina
Semana 1	2.167	5.237
Semana 2	1.506	3.442
Semana 3	1.669	4.237
Semana 4	1.841	4.383
PROMEDIO	1.796	4.325
DE	0.283	0.735
CV	15.8%	17.0%

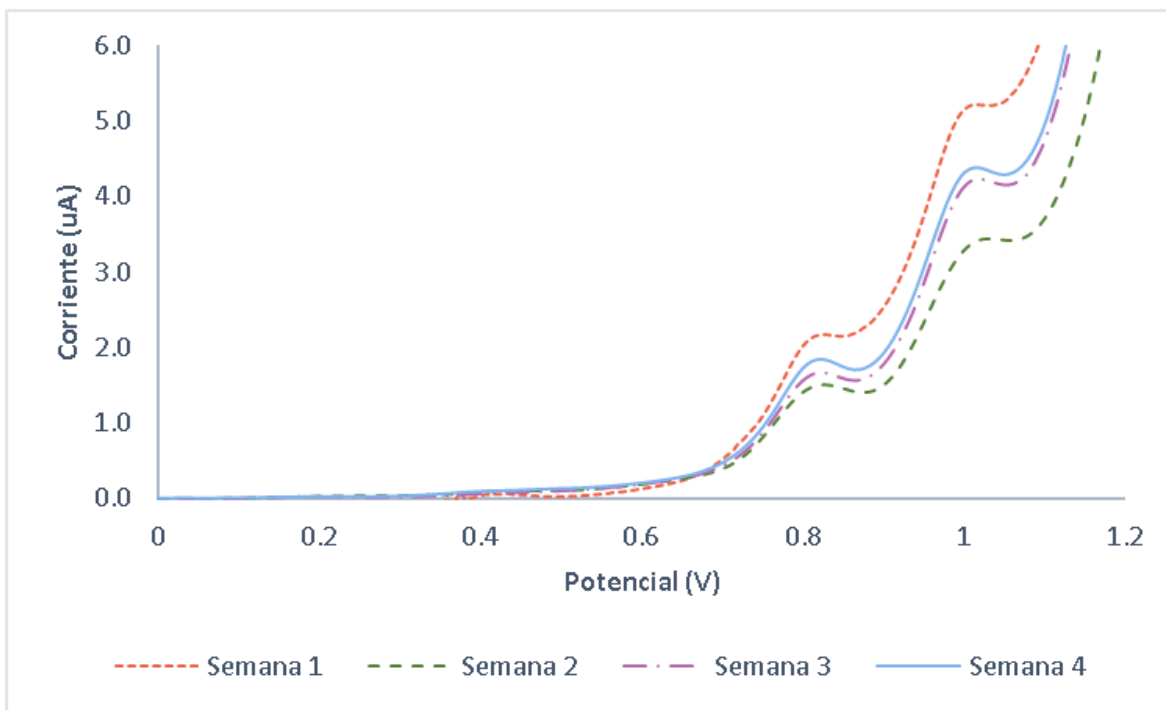


Figura A5. Voltamperograma diferencial de pulso de procesos redox del biosensor de DNA [2 mg/0.5 mL] del electrodo 5 a la semana 1, 2, 3 y 4 de valoración, en una celda electroquímica de 3 electrodos en buffer de acetatos a pH 4.45.

El electrodo 5 (Figura A5) no entra en el intervalo de variación < al 5% ya que obtuvo un CV de 15.8% para la guanina, con mayor variación de la semana 1 a la semana 2, mientras que en la semana 3 y 4 mantuvo muy cercanos el nivel de intensidad de la corriente, mientras que para la adenina en la semana 3 y 4 de evaluación hubo similitud en las lecturas de corrientes, con variación en semana 1 y 2 y esto conlleva a una CV mayor que la guanina con 17%.

Electrodo 6

Tabla 9. Electrodo 6 (DNA 2 mg/0.5 mL)		
	Guanina	Adenina
Semana 1	1.823	4.650
Semana 2	1.414	4.406
Semana 3	1.508	4.530
Semana 4	1.456	4.345
PROMEDIO		
	1.550	4.483
DE		
	0.186	0.136
CV		
	12.0%	3.0%

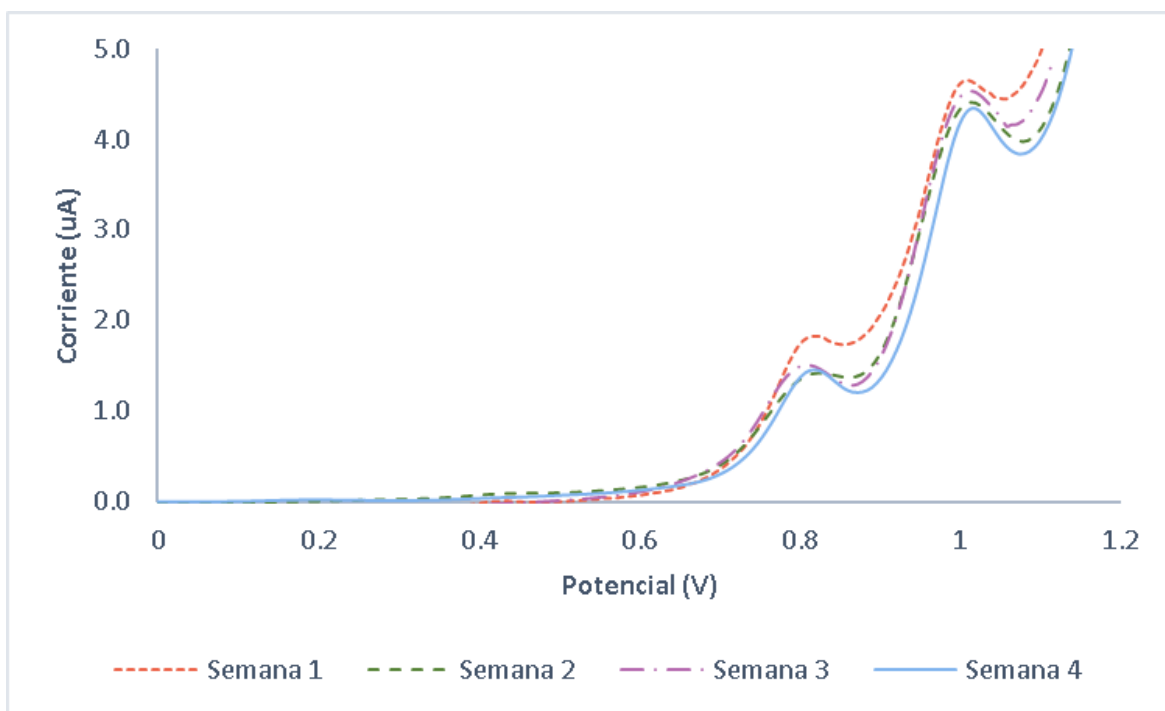


Figura A6. Voltamperograma diferencial de pulso de procesos redox del biosensor de DNA [2 mg/0.5 mL] del electrodo 6 a la semana 1, 2, 3 y 4 de valoración, en una celda electroquímica de 3 electrodos en buffer de acetatos a pH 4.45.

Vo. Bo. del (la) o los (las) asesores (as) respecto a los contenidos académicos

Georgina Alarcón Angeles

Dra. Alarcón Ángeles Georgina

Nombre y firma del asesor interno

No. económico: 34432



Dr. Gómez Hernández Martín

Nombre y firma del asesor externo

No. económico: 30641