

Efecto de nanopartículas de oro y nanoestructuras de carbono sobre la respuesta electroquímica de biosensores para la detección de ADN

Julián René Cobos Suárez

Trabajo de investigación para optar por el título de Magíster en Ingeniería Química

Directores

José Luis Roperó Vega

Doctor en Química

Viviana Sánchez Torres

Doctora en Ingeniería Química

Co-Director

Julio Andrés Pedraza Avella

Doctor en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Maestría en Ingeniería Química

Bucaramanga

2021

Dedicatoria

To God, to the love's force.

A Dios, a la fuerza del amor. A mí madre, a mí padre, a mis hermanos y a Juana María, mi hermosa sobrina. De todos tengo un pedacito del que me siento orgulloso y afortunado de pertenecer.

A mis nonitos, que durante este tiempo superaron el covid y precisamente por esa fortaleza que poseen, siempre me han inspirado para alcanzar las metas y perseverar.

A mis mejores amigos, gracias por permanecer firmes con el pasar de los años.

Gracias de corazón porque son el mejor regalo de mi vida y me acompañan en descubrir y dar la mejor versión de mí.

A quien lea este documento, mientras lo hacía solo pensaba: ojalá sea visto y de utilidad.

Nada es casualidad, todo lo pedimos y llega en su debido momento, disfrute el camino.

Ante estos tiempos, sembremos esperanza, la ciencia es una buena forma de hacerlo.

Vamos a empezar las veces que sean necesarias, vamos a sanar de nuevo.

Con mucho cariño,

Julián René

We are what we love. Ts

Agradecimientos

A mi Dios, que nunca falla y me enseña a amar, siempre, bajo cualquier circunstancia.

A Minciencias, por la beca de sostenimiento otorgada mediante la convocatoria 777 de 2017 dentro del marco del proyecto de investigación “Desarrollo de un aptasensor electroquímico para la detección de *E. coli* presente en matrices acuosas”.

A la Universidad Industrial de Santander, por su apoyo en la homologación del pago de liquidación de matrícula en medio de la pandemia que afrontamos actualmente.

A mi director, el Profesor José Luis Roperio de la UDES, por permitirme y confiarme ser parte de su equipo de trabajo, de quien me llevo muchas enseñanzas, especialmente a ver el vaso medio lleno. Por su gran empatía, por contagiarnos de su ingenio, por su espontaneidad, por su colaboración y por toda su paciencia. Gracias por su entrega y esmero de inicio a fin en este proyecto, fue estupendo conocerlo.

Al Profesor Julio A. Pedraza por su confianza apoyándome una vez más y recomendarme para la realización de este proyecto, sin él nada de esto hubiese pasado. En esta ocasión, como mi codirector siempre dispuesto y pendiente de todo.

A mi directora, la Profesora Viviana Sánchez por su confianza y recibirme como su estudiante de maestría, por su colaboración, asesoramiento y consejos desde cualquier parte.

Al Profesor Wilfredo Valdivieso de la UDES, quien fue un pilar fundamental en toda la etapa experimental de este proyecto, por sus enseñanzas, su paciencia y todo lo compartido.

Al Profesor Ignacio Borón, de la Universidad Nacional de San Martín de Argentina, por su acompañamiento en parte del desarrollo experimental del proyecto.

Al Laboratorio de Espectroscopia del Parque Tecnológico de Guatiguará (PTG), por su colaboración en la caracterización de las muestras obtenidas en este trabajo.

A Carlos Villareal del Laboratorio de Microscopia del Parque Tecnológico de Guatiguará (PTG), por su excelente servicio siempre en cada análisis de todas las muestras del trabajo.

Al magíster Sebastián Cajigas, quien generosamente me brindó asesorías virtuales en una parte crucial de la etapa experimental del proyecto.

A mis profesores de la maestría (Ramiro Martínez, Arlex Chávez, Luis Javier López, Emiliano Ariza, Ángel Meléndez, Ana Coy, José Henao, Liliana Castro, Gustavo Ramírez, Viviana Sánchez y Débora Nabarlatz), con quienes tuve la fortuna de recordar y enriquecer más mis conocimientos de la carrera y elaboración de mi proyecto de investigación.

A las profesoras del CIBAS-UES: Johanna Flórez por su liderazgo e impulsarnos en apostarle a la ciencia, e Indira Hernández por todas sus recomendaciones sobre las prácticas de bioseguridad del laboratorio. A las dos, por sus valiosos aportes en los seminarios.

Al grupo de investigación y laboratorio del GIMBA-UIS, por abrirme las puertas una vez más y sus valiosos aportes en los seminarios, especialmente a Yury López, Sthefanie Espinosa, Diana Cañas, Tania García y Juvencio Vázquez.

A los encargados del laboratorio de Biotecnología de la UES, Don Pedro Patiño, Aracely Rodríguez, Edna Guzmán, Jahir Vargas y Paula Vargas. Agradezco especialmente a Aracely, con quien más compartí durante los dos años de maestría, acompañándonos y creando siempre un ambiente armonioso.

Al grupo de investigación CIBAS-UES, fue un placer conocer y crecer con tantas personas durante este tiempo, en su orden cronológico de conocerlos: Nathalia Ardila, Sergio Prada, William Peña, Natalia Parra, Gloria Ramírez, Felipe Redondo, Laura Farelo, César Echeverría, Mónica Rivera, Camila Barragán, Nicole Polania, Wendy León, Juliana Rodríguez, Katerine Morantes, María Delmar, Carlos Osorio y Yuly Galvis.

A mis compañeros de la maestría, Wendy Valdéz, Nathalia Lizarazo, Mery Hernández, Laura Mantilla y Julián Guerrero, siendo fuente de moral y apoyo mutuo en nuestros proyectos.

A mi mejor amiga Flor A. Villamizar, quien me acompañó en la revisión de la redacción de este documento y escuchó muchas veces mis dilemas a pesar de no conocer al respecto.

A mi mejor amigo Jhoan F. Téllez, quien me motivó a realizar una pasantía en la Universidad de Córdoba, apreciable gesto que no dejó pasar por alto, la cual fue cancelada a causa de la pandemia.

A mi amigo Raphael López, quien me animó muchas veces cuando lo necesité.

A mi familia, por su apoyo y confianza incondicional en cada nuevo reto que afronto.

CONTENIDO

	Págs.
Introducción.....	6
1. Marco Teórico.....	10
1.1 Biosensores Electroquímicos.....	10
1.1.1 Biosensores.....	10
1.1.2 Transductor.....	11
1.1.3 Receptor.....	12
1.1.4 Tipo De Interacción.....	13
1.2 Transducción Electroquímica	13
1.2.1 Celda De Tres Electrodos.....	13
1.2.2 Electrodos Serigrafiados (SPE: <i>Screen Printed Electrodes</i>).....	14
1.2.3 Tipos De Detección Electroquímica De ADN.....	15
1.3 Integración De Nanomateriales En Biosensores.....	18
1.3.1 Nanoestructuras De Carbono.....	18
1.4 Técnicas Electroquímicas	20
1.4.1 La Doble Capa Eléctrica.....	20
1.4.2 Voltamperometría Cíclica (CV).....	21
1.4.3 Cronoamperometría (CA).....	22
1.4.4 Voltametría De Onda Cuadrada (SWV).....	23
1.4.5 Espectroscopia De Impedancia Electroquímica (EIS).....	24
2. Estado Del Arte.....	27
2.1 Los Nanomateriales Y Sus Potenciales Aplicaciones En Sistemas De Detección Electroquímica.....	29
3. Objetivos	37

3.1 General.....	37
3.2 Específicos.....	37
4. Esquema Metodológico	38
5. Efecto De Las Nanopartículas De Oro Obtenidas Por Métodos De Electrodeposición En La Respuesta De Los Biosensores Electroquímicos Basados En ADN.....	39
5.1 Proceso De Electrodeposición Química De Aunps	39
5.1.1 Formación De Nanopartículas De Oro De Dimensional Cero Por Electrodeposición.....	40
5.2 Proceso De Autoensamblado De Sondas De ADN Tioladas.....	41
5.2.1 Enlace Covalente Entre El ADN Y Aunps.....	41
5.2.2 Tratamiento De Capas Autoensambladas De ADN.....	42
5.3 Desarrollo Experimental	44
5.3.1 Materiales Y Equipos.....	44
5.3.2 Síntesis De Aunps Por Electrodeposición Química.....	47
5.3.3 Caracterización Electroquímica Del Biosensor Construido.....	52
5.4 Resultados Y Discusión	54
5.4.1 Síntesis De Aunps.....	54
5.4.2 Caracterización De Aunps.....	65
5.4.3 Selección Del Método De Síntesis De Aunps Para La Construcción Del Biosensor.....	66
5.4.4 Evaluación Del Área Electroactiva Y La Conductividad.....	68
5.4.5 Optimización De Los Parámetros Del Biosensor.....	69
5.4.6 Construcción Del Biosensor Electroquímico.....	73
5.5 Conclusiones Parciales.....	77
6. Evaluación De La Influencia De Nanoestructuras De Carbono Sobre La Respuesta Electroquímica De Electrodos Serigrafiados Aplicados En Biosensores Electroquímicos Para La Detección De Adn Modelo.....	78
6.1 Método De Deposición <i>Dropcasting</i>	79

6.2 Desarrollo Experimental	80
6.2.1 Materiales Y Reactivos.....	80
6.2.2 Dispersión De Nanoestructuras De Carbono.....	80
6.2.3 Determinación De Las Concentraciones A Depositar De Nanoestructuras De Carbono.....	81
6.2.4 Caracterización De Las Nanoestructuras De Carbono.....	82
6.2.5 Construcción Del Biosensor.....	84
6.3 Resultados Y Discusión	85
6.3.1 Caracterización De Las Nanoestructuras De Carbono.....	85
6.3.2 Caracterización Electroquímica De Los Electrodos Modificados Con Las Nanoestructuras De Carbono.....	93
6.3.3 Evaluación De Los Biosensores Para La Detección Del ADN Complementario.....	99
6.3.4 Caracterización Electroquímica Del Biosensor Seleccionado.....	
100	
6.4 Conclusiones Parciales	103
7. Análisis de los parámetros de detección del biosensor electroquímico frente al reconocimiento de adn en matrices acuosas	104
7.1 Introducción.....	104
7.2 Criterios Para Tener En Cuenta En La Respuesta De Un Biosensor.....	104
7.2.1 Curva De Calibración.....	104
7.2.2 Rango De Linealidad.....	104
7.2.3 Sensibilidad.....	105
7.2.4 Límite De Detección (LOD).....	105
7.2.5 Selectividad.....	106
7.2.6 Repetibilidad.....	106
7.2.7 Reproducibilidad Y Estabilidad.....	107

7.3 Desarrollo Experimental.....	108
7.3.1 Sensibilidad.....	108
7.3.2 Selectividad.....	108
7.3.3 Pruebas De Estabilidad.....	109
7.4 Resultados Y Discusión	109
7.4.1 Sensibilidad.....	109
7.4.2 Selectividad.....	112
7.4.3 Estabilidad.....	113
7.5 Conclusiones Parciales	114
8. Conclusiones Generales	115
9 . Recomendaciones.....	117
Referencias Bibliográficas.....	¡Error! Marcador no definido.
Apéndices	139

lista de tablas

Tabla 1 Resumen de estudios realizados en la detección de patógenos por medio de biosensores electroquímicos	29
Tabla 2 Estudios realizados a nivel nacional relacionados con biosensores electroquímicos	35
Tabla 3 Estudio de la velocidad de barrido para síntesis de AuNPs	48
Tabla 4 Estudio de la concentración del precursor de oro	48
Tabla 5 Estudio del rango de potencial para la síntesis de oro	48
Tabla 6 Estudio del rango de potencial para la síntesis de oro	49
Tabla 7 Estudio de los parámetros de la técnica de cronoamperometría para síntesis de AuNPs	49
Tabla 8 Variación de la relación ADN:MCH	51
Tabla 9 Caracterización de las AuNps seleccionadas de cada método para la inmovilización de aptámeros	65
Tabla 10 Elementos del circuito equivalente de Randles de las medidas de EIS que hacen referencia al paso a paso de cada modificación del electrodo serigrafiado	76
Tabla 11 Evaluación de muestras variando el porcentaje en peso del oxido grafeno	81
Tabla 12 Composición de los electrodos modificados con nanoestructuras de carbono	81
Tabla 13 Comparación de los parámetros de medición y área electroactiva de los electrodos serigrafiados sin modificar y modificado con nanoestructuras de carbono	95
Tabla 14 Cambio de la resistencia a la transferencia de carga R_{et} de configuraciones de las nanoestructuras de carbono	97
Tabla 15 Límites de detección	112
Tabla 16 Valores de estabilidad	113

Lista De Figuras

	Págs.
Figura 1. Componentes de un biosensor.....	10
Figura 2. Esquema de un biosensor electroquímico basado en ADN modificado con nanomateriales	14
Figura 3. Modos de interacción de los indicadores redox con una superficie con ADN.....	16
Figura 4. Estructura molecular de A) Óxido de grafeno y B) Nanotubos de carbono multipared funcionalizados	20
Figura 5. Técnica de voltamperometría cíclica. Barrido del potencial (A la izquierda) y voltamperograma cíclico típico (A la derecha).....	22
Figura 6. Técnica de voltamperometría de onda cuadrada. Aplicación de un ciclo de potencial (a la izquierda) y voltamperograma de onda cuadrada típico (a la derecha).....	24
Figura 7. Técnica de Espectroscopia de impedancia electroquímica. Diagrama de Nyquist (A la izquierda) y Circuito equivalente de Randles	26
Figura 8. Tendencia de las publicaciones de biosensores basados en ADN tomando como referencia la base de datos Scopus.....	28
Figura 9. Esquema general de la metodología para el desarrollo del trabajo de investigación	38
Figura 10. Esquema general del proceso de síntesis de AuNps por electrodeposición	41
Figura 12. Esquema de sondas de ADN tiolado inmovilizadas por el método de quimisorción	42
Figura 13. Esquema de la inmovilización de MCH actuando como agente de bloqueo y separados de los bioreceptores	43
Figura 14. Electrodo serigrafiado (SPE) y sus partes: electrodo trabajo (WE), electrodo de referencia (RE) y contraelectrodo (CE). A) Marca Italsense y B) BVT	45
Figura 15. Voltamperogramas lineales de A) 0.5 M de H ₂ SO ₄ , B) 1 mM de H _{AuCl₄} en 0.5 M de H ₂ SO ₄ para la síntesis de AuNPs	54
Figura 16. Voltamperogramas cíclicos variando la velocidad de barrido a A) 25 mV/s, B) 50 mV/s y C) 100 mV/s; en 1 mM de H _{AuCl₄} con 0.5 M de H ₂ SO ₄ para la síntesis de AuNPs	55
Figura 17. Micrografías SEM (12000X) de las AuNPs obtenidas por voltamperometría cíclica variando la velocidad de barrido a A) 25 mV/s, B) 50 mV/s y C) 100 mV/s; en 1 mM de H _{AuCl₄} con 0.5 M de H ₂ SO ₄	56
Figura 18. Voltamperogramas cíclicos variando la concentración a A) 0.5 mM y B) 1 mM del precursor H _{AuCl₄} con 0.5 M de H ₂ SO ₄ para la síntesis de AuNPs	57
Figura 19. Micrografías SEM (a 12000X) de las AuNPs obtenidas por voltamperometría cíclica variando la concentración a A) 0.5 mM y B) 1 mM del precursor H _{AuCl₄} con 0.5 M de H ₂ SO ₄	58

- Figura 20. Voltamperogramas cíclicos variando el rango de potencial entre A) +0.6 - -0.2 V, B) +0.5 - -0.2 V, C) +0.4 - -0.2 V, D) +0.6 - -0 V y E) +0.6 - +0.1 V; en 1 mM de H_{AuCl}₄ con 0.5 M de H₂SO₄ para la síntesis de AuNPs59
- Figura 21. Micrografías SEM (a 50000X) de las AuNPs obtenidas por voltamperometría cíclica variando el rango de potencial entre A) +0.6 - -0.2 V, B) +0.5 - -0.2 V, C) +0.4 - -0.2 V, D) +0.6 - 0 V y E) +0.6 - +0.1 V; en 1 mM de H_{AuCl}₄ con 0.5 M de H₂SO₄.....60
- Figura 22. Voltamperogramas cíclicos variando el número de ciclos del potencial de barrido a A) 1 ciclo y B) 2 ciclos; en 1 mM de H_{AuCl}₄ con 0.5 M de H₂SO₄ para la síntesis de AuNPs.....61
- Figura 23. Micrografías SEM (a 50000X) de las AuNPs obtenidas por CV variando el número de ciclos del potencial de barrido a A) 1 ciclo y B) 2 ciclos; en 1 mM de H_{AuCl}₄ con 0.5 M de H₂SO₄62
- Figura 24. Cronoamperogramas variando el potencial y tiempo de electrodeposición en 1 mM de H_{AuCl}₄ con 0.5 M de H₂SO₄ para la síntesis de AuNps.....63
- Figura 25. Micrografías SEM (a 50000X) de AuNps obtenidas por cronoamperometría variando el potencial y tiempo de electrodeposición en 1 mM de H_{AuCl}₄ con 0.5 M de H₂SO₄.....64
- Figura 26. Diagrama de barras que relaciona la carga acumulada del Au electrodepositado.....66
- Figura 27. Evaluación de A) Intensidad de corriente máxima de SWV y B) Detección de ADN complementario de cada electrodo modificado con AuNps a las condiciones de A) 0.15 V – 50 s, B) 0.05 V – 50 s, C) -0,05 V – 50 s, D) 0.05 V – 100 s, E) 1 ciclo y F) 2 ciclos67
- Figura 28. Relación lineal de la intensidad del pico anódico redox versus la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de un electrodo serigrafiado A) Sin modificar y B) modificado con AuNPs.....69
- Figura 29. Resultados de la respuesta de los cambios de corriente $\Delta I = (I_{Au} - I_{apt}) / I_{Au}$ después de la inmovilización de aptámero tiolado sobre electrodos modificados con AuNPs en medidas de SWV de aptámero tiolado a A) diferentes concentraciones y B) diferentes tiempos de inmovilización.....70
- Figura 30. Voltamperogramas de onda cuadrada (SWV) para la comprobación de la inmovilización de 500 nM de aptámero tiolado sobre electrodos modificados con Au (curva roja). A la izquierda SWV utilizando solo DTT en la solución (actuando como blanco) y a la derecha SWV utilizando DTT + Aptámero tiolado.....71
- Figura 31. Diagramas de Nyquist de EIS, variando la concentración de inmovilización de MCH...73
- Figura 32. Voltamperograma cíclico de electrodos serigrafiado sin modificar (curva negra), modificado con AuNPs (curva roja), con 500 nM de aptámero tiolado (curva azul), con 5 μ M MCH (curva fucsia) y la detección de 100 nM de sonda complementaria (curva verde).....74
- Figura 33. Voltamperograma de onda cuadrada de electrodos serigrafiado sin modificar (curva negra), modificado con AuNPs (curva roja), con 500 nM de aptámero tiolado (curva azul), con 5 μ M MCH (curva fucsia) y la detección de 100 nM de sonda complementaria (curva verde).....75
- Figura 34. Diagrama de Nyquist de EIS del electrodo serigrafiado sin modificar (curva negra), modificado con AuNPs (curva roja), con 500 nM de aptámero tiolado (curva azul), con 5 μ M MCH

(curva fucsia) y la detección de 100 nM de sonda complementaria (curva verde). En la parte inferior se muestra el circuito equivalente de Randles de las medidas de EIS.....	75
Figura 35. Esquema de la técnica de deposición por la técnica dropcasting	79
Figura 36. Fotografía de una suspensión 1 mg/mL de óxido de grafeno en agua A) Sin dispersar y B) Dispersados	85
Figura 37. Fotografía de suspensiones 1 mg/mL de nanotubos de carbono multipared A) en agua sin dispersar, B) en agua dispersados y C) en solución 1% de SDS dispersados	86
Figura 38. Estabilidad de las dispersiones de las nanoestructuras de carbono	87
Figura 39. Espectros de absorción UV-Vis de dispersiones de las nanoestructuras de carbono	88
Figura 40. Espectroscopia Raman de la dispersión con óxido de grafeno	89
Figura 41. Espectroscopia Raman de nanotubos de carbono multipared	90
Figura 42. Micrografías SEM (a 50000x) de electrodos modificados con A) AuNPs, B) GO/AuNPs, C) MWCNT/AuNPs, D) GO/MWCNT/AuNPs y E) MWCNT/GO/AuNPs.....	91
Figura 43. Micrografía SEM (a 100000x) de un electrodo modificado con MWCNT	92
Figura 44. Micrografías SEM (a 50000x) de electrodos modificados con A) AuNPs, B) GO/AuNPs, C) MWCNT/AuNPs, D) GO/MWCNT/AuNPs y E) MWCNT/GO/AuNPs.....	93
Figura 45. Voltamperogramas cíclicos de electrodos modificados con nanoestructuras de carbono A) Con GO, B) Con MWCNT, C) Con GO-MWCNT y D) MWCNT-GO.....	94
Figura 46. Diagrama de Nyquist de electrodos modificados con nanoestructuras de carbono con A) GO, B) GO-MWCNT y C) MWCNT-GO.....	96
Figura 47. Diagrama de Nyquist del electrodo serigrafado sin modificar y modificado con nanotubos de carbono multipared.....	98
Figura 48. Modelo del circuito equivalente para las superficies modificadas con MWCNT	99
Figura 49. Comparación de los biosensores modificados con nanoestructuras de carbono para la detección de 1 nM de ADN complementario	100
Figura 50. Caracterización electroquímica de la plataforma biosensora con nanotubos de carbono multipared por las técnicas de CV, SWV y EIS	102
Figura 51. Voltamperogramas de onda cuadrada variando la concentración de ADN complementario.....	110
Figura 52. Curvas de calibración de los biosensores	111
Figura 53. Selectividad de los biosensores	113

Lista De Anexos

A. Definición de los parámetros de las condiciones de trabajo de la técnica SWV	139
B. Determinación de la concentración de MCH.....	143
C. Determinación de las concentraciones de las nanoestructuras de carbono	146

Abreviaturas

ADN	<i>Desoxirribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucleico
AuNps	<i>Gold nanoparticles</i> - Nanopartículas de oro
CA	<i>Chronoamperometry</i> - Cronoamperometría
CN	<i>Carbon nanostructures</i> - Nanoestructuras de carbono
CV	<i>Cyclic voltammetry</i> - Voltamperometría cíclica
EIS	<i>Electrochemical impedance spectroscopy</i> - Espectroscopia de impedancia electroquímica
ETA	Enfermedades de transmisión alimentaria
GO	<i>Graphene oxide</i> - Óxido de grafeno
MCH	6-Mercapto-1-hexanol
MWCNT	<i>Multiwall carbon nanotubes</i> - Nanotubos de carbono multipared
OMS	Organización mundial de la salud
SEM	<i>Scanning electron microscope</i> - Microscopía electrónica de barrido
SPE	<i>Screen-printed electrode</i> – Electrodo serigrafiado
SWV	<i>Square wave voltammetry</i> - Voltamperometría de onda cuadrada

Resumen

Título: Efecto de nanopartículas de oro y nanoestructuras de carbono sobre la respuesta electroquímica de biosensores para la detección de ADN*

Autor: Julián René Cobos Suárez**

Palabras claves: Biosensor electroquímico. Nanopartículas de oro. Nanoestructuras de carbono. Aptámero tiolado. Electrodo serigrafiado.

Descripción:

En este trabajo se estudiaron diferentes configuraciones en la deposición por adsorción de nanoestructuras de carbono tales como óxido de grafeno (GO), nanotubos de carbono multipared (MWCNT) y la sinergia entre ellos, sobre electrodos serigrafiados con el fin de estudiar el efecto del transporte eléctrico en la señal electroquímica para la detección de ADN modelo de *E. coli*. Entre los materiales empleados están: ácido tetracloroaúrico, nanotubos de carbono multipared y óxido de grafeno funcionalizados, sondas de ADN y electrodos serigrafiados. Se sintetizaron por cronoamperometría nanopartículas de oro (AuNPs) sobre los electrodos para la inmovilización del receptor (Aptámero tiolado) mediante grupos tiol. La dispersión de las nanoestructuras de carbono se caracterizó por espectroscopía Raman y espectroscopía UV-Vis. La morfología de las nanoestructuras fue analizada por microscopía electrónica de barrido (SEM). Para el proceso de cada modificación de los electrodos se aplicó una caracterización electroquímica mediante las técnicas de Voltamperometría cíclica (CV), Voltamperometría de onda cuadrada (SWV) y Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) en soluciones del par redox $K_4[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$; monitoreadas en un potenciostato / galvanostato VersaSTAT 3.

Los resultados mostraron que el biosensor con la incorporación de MWCNT alcanzó la respuesta electroquímica más alta. Este biosensor basado en ADN, logró detectar concentraciones de ADN complementario en el rango de 1.0×10^{-11} a 1.0×10^{-7} M con alta reproducibilidad, alcanzando un límite de detección de 0.21 nmol/L. Los resultados revelaron el impacto de modificar los transductores con nanomateriales de carbono en el mejoramiento de los parámetros analíticos de los biosensores.

*Trabajo de investigación

**Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas: Escuela de Ingeniería Química.

Directores: Dr. José Luis Ropero Vega. PhD. Viviana Sánchez Torres.

Co-Director: Dr. Julio Andrés Pedraza Avella.

Abstract

Title: Effect of gold nanoparticles and carbon nanostructures on the electrochemical response of biosensors for DNA detection*

Author: Cobos Suárez, Julián René**

Key Word: Electrochemical biosensor. Gold nanoparticles. Carbon nanostructures. Screen printed electrodes. Thiolated aptamer.

Description:

In this work, different configurations in the deposition by adsorption of carbon nanostructures such as graphene oxide (GO), multi-walled carbon nanotubes (MWCNT), and the synergy between them were studied on screen-printed electrodes to study the effect of electrical transport in the electrochemical response for detection of *E. coli* model DNA. Among the materials used were tetrachloroauric acid, multi-walled carbon nanotubes, functionalized graphene oxide, DNA probes, and screen-printed electrodes. Gold nanoparticles (AuNPs) were synthesized by chronoamperometry on the electrodes to immobilize the receptor (thiolated aptamer) through thiol groups. Carbon nanostructures dispersions were characterized by Raman spectroscopy and UV-Vis spectroscopy. The morphology of the nanostructures was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). For each modification on the electrodes, an electrochemical characterization was applied using cyclic voltammetry (CV), square wave voltammetry (SWV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) techniques in solutions of the redox pair $K_4[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$; monitored on a VersaSTAT 3 potentiostat/galvanostat.

The results showed that the biosensor with the incorporation of MWCNT achieved the highest electrochemical performance. This biosensor based on DNA detected target DNA concentrations in the range of 1.0×10^{-11} to 1.0×10^{-7} M with high reproducibility, with a detection limit of 0.21 nmol / L. The results revealed the impact of modifying the transducers with carbon nanomaterials to improve the biosensors' analytical parameters.

*Research work – Master's degree in Chemical Engineering

**Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas: Escuela de Ingeniería Química.

Directors: Dr. José Luis Ropero Vega. PhD. Viviana Sánchez Torres.

Co-Director: Dr. Julio Andrés Pedraza Avella.

Introducción

Las infecciones por microorganismos continúan siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, siendo la población infantil la más afectada (OMS, 2020). Los microorganismos pueden estar presentes en los alimentos, el agua y el medio ambiente. Según la OMS cada año 77 millones de personas se enferman y más de 9.000 mueren tan solo en el continente americano a causa de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) (OMS, 2015). Además, las ETA tienen un impacto socioeconómico negativo para cada país, por la disminución en la productividad y aumento tanto de medicamentos como de atención en salud. Esto se ha convertido en un problema creciente a nivel mundial para la salud pública, la calidad del agua y la seguridad alimentaria (Ojeda, 2009; Ríos-Tobón, Agudelo-Cadavid, & Gutiérrez-Builes, 2017; Varela, Lavalle, & Alvarado, 2016). Por esta razón, se requiere la identificación en el menor tiempo de estos microorganismos a través de métodos rápidos y sensibles para su respectivo tratamiento, control y prevención de infecciones (González-Carrato, 2015).

Actualmente existen métodos tradicionales para la identificación de microorganismos, como el recuento de colonia y número más probable, considerados como las pruebas estándar de detección. Sin embargo, estos métodos son limitados por su prolongado tiempo para la confirmación en la identificación del tipo de microorganismo (72-120 h) (Abdhalhi et al., 2014; Amiri, Bezaatpour, Jafari, Boukherroub, & Szunerits, 2018). Dentro de las técnicas no convencionales se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que, aunque permite una detección con alta especificidad y sensibilidad para fragmentos de ADN, esta técnica implica elevados costos y complejidad en los ensayos (Amiri et al., 2018; Dominguez Fernandez, Pérez-Pérez, Turbon, & Arroyo-Pardo, 2008). Un desafío en este campo es la búsqueda de estrategias que sean rápidas, técnicamente factibles y reproducibles.

Los biosensores se están convirtiendo en una novedosa alternativa que se ha destacado en el diagnóstico de enfermedades, detección de drogas, prevención de epidemias y protección ambiental; dado a que logran respuestas en tiempos más cortos y en el caso de los microorganismos se minimiza la manipulación de sus muestras (Jiménez, C. León, 2009; Ortega, Russo, Acero, Lorén, & Ruiz, 2015).

La tecnología de los biosensores se basa en sistemas compactos de análisis, compuestos de un elemento de reconocimiento biológico (ADN, anticuerpo, aminoácidos, enzimas, células) inmovilizado en un transductor que, en contacto con el analito (o diana), transformará la señal bioquímica producida de dicha interacción en una señal eléctrica u otro tipo de señal analítica (Ortega et al., 2015).

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes elementos de reconocimiento biológico, donde los basados en ADN aumentan la selectividad a moléculas o receptores específicos; estos consisten en sistemas de detección de ácidos nucleicos, proteínas y otras moléculas a partir de un aptámero que está conformado por cadenas sencillas de ADN (Bock Gu & Hak-Sung, 2014). En el caso de los transductores, existen de tipo electroquímico, óptico, másico y térmico. De estos, el sensor electroquímico está siendo el más estudiado por sus ventajas tales como producir métodos analíticos precisos, rápidos y económicos (Moreno et al., 2009).

Para el diseño de un biosensor electroquímico, se comienza con la superficie del transductor, conformado por soportes conductores como electrodos de oro, platino o carbono (González-Carrato, 2015). La superficie del transductor deber ser inerte, biocompatible y poseer grupos funcionales para la inmovilización de aptámeros que permiten detectar la diana. Existen diferentes estrategias para detectar y cuantificar ADN mediante técnicas voltamperométricas, entre ellas, se destaca el uso de indicadores electroquímicos los cuales aprovechan los cambios en las

propiedades de transporte eléctrico del biosensor cuando ocurre la hibridación (Joseph Wang, 2003).

Adicionalmente, se han propuesto novedosos transductores electroquímicos mediante la modificación de la superficie con nanoestructuras de carbono y nanopartículas de oro, gracias a sus excelentes propiedades (alta área superficial, su reactividad y la transferencia rápida de electrones) (Agüí, Yáñez-Sedeño, & Pingarrón, 2008; Bock Gu & Hak-Sung, 2014; Grieshaber, MacKenzie, Vörös, & Reimhult, 2008; Hernandez & Ozalp, 2012), que le otorgan al biosensor alta sensibilidad, estabilidad, amplio rango lineal de concentración y bajo límite de detección; brindando de esta manera una mayor amplificación en la señal a la hora de detectar la diana (Bravo Segura, 2017).

Otro factor importante para tener presente en el diseño de un biosensor es la química de la superficie puesto que no solo se debe enfocar en la vinculación del elemento de reconocimiento biológico en la superficie de detección, sino también para evitar interacciones con moléculas no específicas en el momento de la detección (Amiri et al., 2018).

Si bien se han reportado diferentes biosensores electroquímicos modificados con nanoestructuras de carbono tales como nanotubos de carbono, grafeno, óxido de grafeno; algunos estudios desarrollan biosensores basados en un solo tipo de estas nanoestructuras, o hacen la combinación sin detenerse en el análisis de cómo podría influir cada nanoestructura en la respuesta electroquímica. Por lo descrito anteriormente, esta propuesta de investigación está encaminada en estudiar las propiedades de transporte eléctrico y observar el efecto de cada nanomaterial en los biosensores electroquímicos para la detección de ADN en matrices acuosas con diferentes configuraciones en la deposición de nanoestructuras de carbono y nanopartículas de oro sobre electrodos serigrafiados.

Justificación

Los métodos tradicionales para la detección de microorganismos requieren de una serie completa de pruebas que toma varios días para obtener un resultado confiable. Por esta razón, para reducir el riesgo en la salud pública y otros campos de aplicación con microorganismos se necesitan nuevos métodos para la detección rápida y simple de estos, siendo los biosensores electroquímicos una alternativa que promete resolver esta problemática.

Un biosensor electroquímico estudia reacciones biológicas o químicas que comúnmente se detectan cerca de la superficie de un electrodo, generando una señal medible por técnicas electroquímicas. Para aumentar la sensibilidad de los dispositivos es indispensable el uso de nanomateriales.

Se emplearon electrodos serigrafiados en el diseño de biosensores ya que presentan ventajas tales como bajo costo, fabricación simple, uso de muestras con volúmenes muy reducidos y al mismo tiempo su fácil modificación con nanomateriales. De esta manera se tendría un dispositivo de forma portable, que lo volvería oportuno para su aplicación en campo.

En este trabajo se utilizaron aptámeros como receptores debido a su reducido tamaño comparado con el de anticuerpos o células, puesto que esta característica ayuda a aumentar la unión en un sustrato sólido cuando se trata de dimensiones micro y nano del soporte sólido.

Este proyecto tuvo como finalidad proponer una plataforma biosensora mediante el estudio de nanoestructuras de carbono depositadas sobre electrodos serigrafiados para tener una

certeza sobre las condiciones de operación requeridas al momento de diseñar biosensores con alta selectividad y sensibilidad

1. Marco Teórico

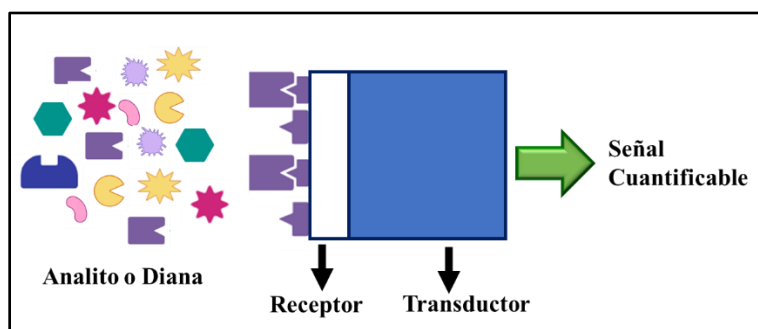
1.1 Biosensores electroquímicos

1.1.1 Biosensores.

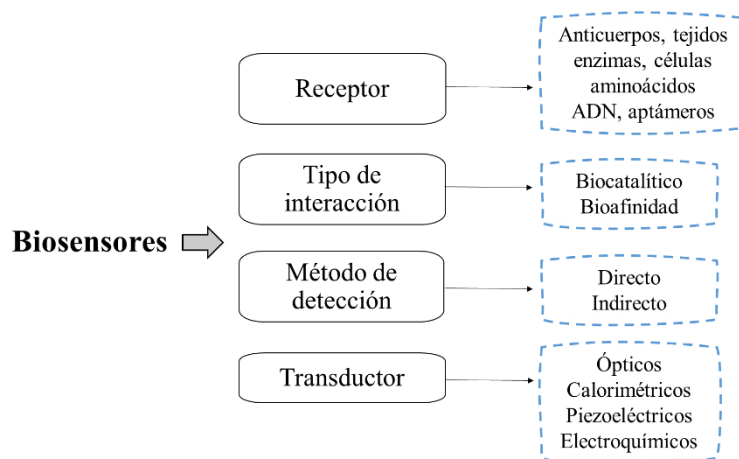
Los biosensores son dispositivos analíticos compuestos por un elemento de reconocimiento conectado a un transductor, que relacionan la concentración de un analito con una respuesta medible. Inicialmente el elemento de reconocimiento interactúa con el analito y a medida en que se reconoce el analito, es detectado por el transductor (Ver Figura 1) (Abdalthai et al., 2014; Yamanaka, Vestergaard, & Tamiya, 2016).

Figura 1.

Componentes de un biosensor



Los biosensores se pueden clasificar dependiendo de las siguientes variables:



Los biosensores electroquímicos sobresalen actualmente en el campo de los métodos de detección por la posibilidad de miniaturización y la capacidad de construcción de dispositivos de detección electroquímicos flexibles, desechables y de bajo costo, por la sensibilidad, simplicidad de operación y tiempo de respuesta rápido. La señal de detección enviada desde el transductor puede ser de corriente, resistencia o potencial, lo que proporciona gran variedad de pruebas (Y. Zhao et al., 2018).

1.1.2 Transductor.

Los transductores de los biosensores electroquímicos pueden clasificarse en

- **Potenciométricos:** Cuando la propiedad que mide es la carga acumulada o potencial entre el electrodo en el que se inmoviliza el biorreceptor y un electrodo de referencia, involucrando un equilibrio de intercambio de iones entre la solución y un material conductor.
- **Amperométricos:** Cuando la propiedad que miden es la intensidad de corriente resultante de la oxidación o reducción de una especie electroactiva en una reacción bioquímica.

- **Conductimétricos:** Cuando miden la variación de la modificación de las propiedades de conductividad de un medio electrolítico. No son muy empleados, se han utilizado principalmente como biosensores de gas para determinar la calidad del aceite de motor (Moran, Fitzgerald, Mcpartlin, & Loftus, 2016).
- **Impedimétricos:** La impedancia es la oposición al flujo de corriente alterna en un sensor. Cuando se mide la combinación entre la resistencia y la reactancia causada por la unión del analito al receptor inmovilizado en la superficie del electrodo, se obtiene como resultado una variación de impedancia. Técnica muy empleada en la detección de bacterias patógenas (Moran et al., 2016).

1.1.3 Receptor.

Existe una variedad de elementos de reconocimiento o receptores que incluyen enzimas, anticuerpos, aptámeros, ssDNA, RNA, microorganismos, tejidos biológicos y orgánulos. Es la unidad sensible específica del biosensor, predica la eficacia del sistema de transducción y, por tanto, la utilidad del biosensor para fines de detección (Ortega et al., 2015).

- **Aptámeros.**

Son oligonucleótidos (ADN o ARN) cortos de cadena sencilla con capacidad de reconocer una molécula particular (ADN objetivo). Cada aptámero posee una estructura tridimensional particular que le permite unirse con alta afinidad y especificidad a la molécula diana. Por la naturaleza de su composición tienen ventajas significativas en cuanto a su tamaño, producción y modificación. Entre sus principales ventajas se encuentran la baja toxicidad e inmunogenicidad y la facilidad para producirlos y modificarlos. Uno de los

métodos para la generación de aptámeros es por medio de la técnica SELEX. Este método utiliza la química combinatoria para la selección de ácidos nucleicos sintéticos con alta afinidad por su molécula diana (Hernández, Frank J., Botero-Hincapié, 2012).

1.1.4 Tipo de interacción.

- **Biocatalítico:** Su funcionamiento se basa en la inmovilización de una enzima para ayudar a reconocer el sustrato diana sin consumo del biocatalizador, que se regenera y puede ser utilizado de nuevo (Jiménez, C. León, 2009; Murugaiyan, Ramasamy, Gopal, & Kuzhandaivelu, 2014).
- **Bioafinidad:** Los biosensores de bioafinidad se basan en la separación y detección de biomoléculas que incluyen la detección de anticuerpos, péptidos, proteínas, virus, ácidos nucleicos, aptámeros y polímeros impresos molecularmente para interactuar con nanomateriales (Piroozmand, Mohammadipanah, & Faridbod, 2020).

1.2 Transducción electroquímica

1.2.1 Celda de tres electrodos.

Un biosensor que utiliza transducción electroquímica normalmente se conforma por una celda de tres electrodos: un electrodo de trabajo, un contraelectrodo (o auxiliar) y un electrodo de referencia. El electrodo de referencia compuesto típicamente de plata o cloruro de plata, sirve como punto de referencia para controlar el potencial relativo del electrodo de trabajo con la ayuda de un potencióstato (Mirceski, Skrzypek, & Stojanov, 2018).

El electrodo de trabajo actúa como el transductor donde ocurren las reacciones redox, mientras que el contraelectrodo mide la corriente y facilita el suministro de solución electrolítica para permitir la transferencia de corriente al electrodo de trabajo. Ambos tipos

de electrodos deben ser conductores y químicamente estables y en su mayoría están compuestos de carbono o metales inertes como oro y platino (Moran et al., 2016).

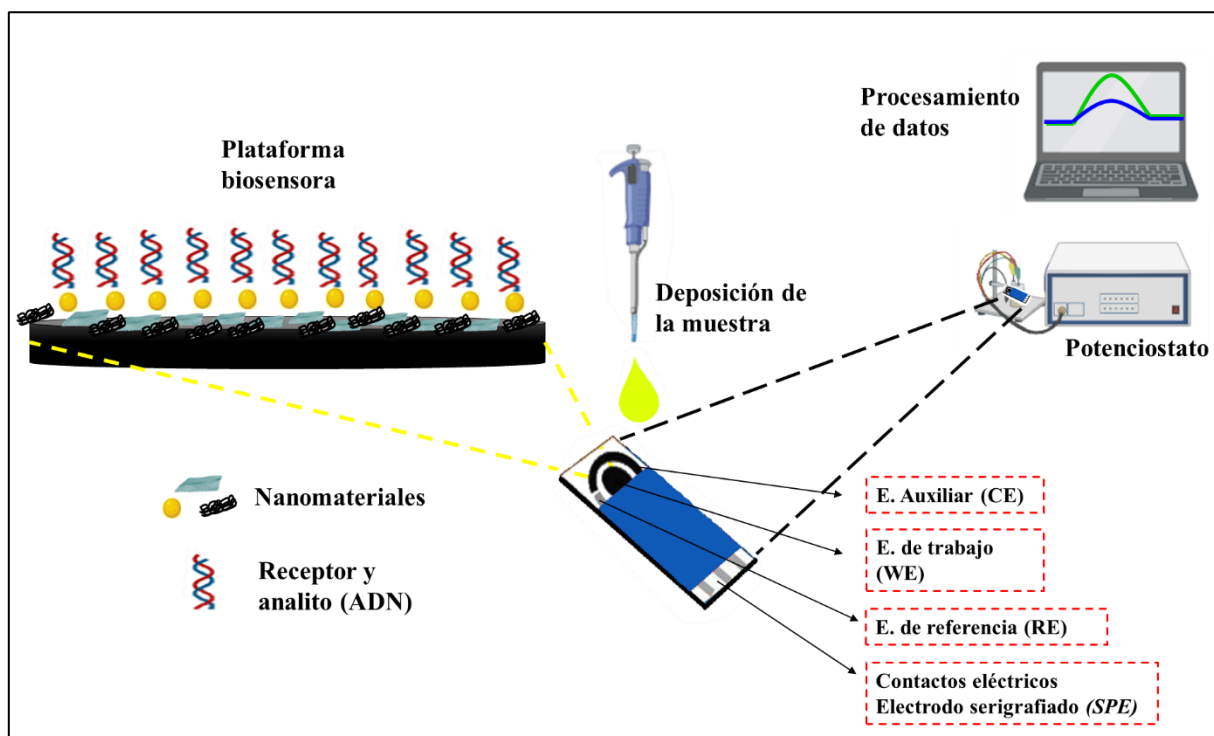
1.2.2 Electrodos serigrafiados (SPE: *Screen printed electrodes*).

Actualmente, los electrodos serigrafiados están siendo una herramienta adecuada para el análisis electroquímico debido a sus propiedades únicas, como tamaño pequeño, bajo límite de detección, tiempo de respuesta rápido y alta reproducibilidad. Además, los electrodos serigrafiados son plataformas adecuadas bien conocidas para el desarrollo de biosensores (Martínez, 2012).

Su preparación implica el uso de varios sustratos, como cerámica, plástico, papel o vidrio. Se pueden producir diferentes sistemas de celdas de electrodos, entre estos, sobresalen las celdas convencionales de tres electrodos (Ver Figura 2).

Figura 2.

Esquema de un biosensor electroquímico basado en ADN modificado con nanomateriales



Una de sus ventajas es la fabricación personalizable, la modificación de la superficie para lograr aplicaciones deseables en la detección de analitos específicos en campos tales como la industria, la investigación clínica o académica. Entre las formas de modificar la superficie del electrodo, se puede realizar por tres métodos: mezcla de la tinta con el agente modificador, por deposición electroquímica o por deposición por gota de un material nanoparticulado preformado (Antuña-Jiménez, González-García, Hernández-Santos, & Fanjul-Bolado, 2020).

1.2.3 Tipos de detección electroquímica de ADN.

1.2.3.1 Detección directa.

Los métodos directos para la detección de la hibridación del ADN consisten en diferenciar cambios de la estructura flexible del ssDNA (ADN monocatenario) a la estructura más rígida dsDNA (ADN doble hélice) debido a cambios en las propiedades interfaciales del electrodo modificado con ADN, como la capacitancia, la conductividad o la impedancia. Otra forma es mediante la detección directa de la oxidación electroquímica de las bases de guanina (Amiri, Bezaatpour, Jafari, Boukherroub, & Szunerits, 2018; Pardo, 2016; Rashid & Yusof, 2017).

1.2.3.2 Detección indirecta.

Los métodos indirectos o etiquetados son significativamente más populares que los métodos directos, debido a que proporcionan más alternativas en las que la transducción se puede configurar con una alta sensibilidad y selectividad. En biosensores de ADN electroquímicos, las etiquetas son típicamente moléculas redox activas que actúan como

indicadores que se intercalan entre los pares de bases del ADN de doble hélice, y por lo tanto, no interactúan significativamente con el ssDNA, o bien son moléculas que se unen preferentemente a cualquiera forma ya sea de ssDNA o dsDNA (Amiri et al., 2018; Pardo, 2016; Rashid & Yusof, 2017).

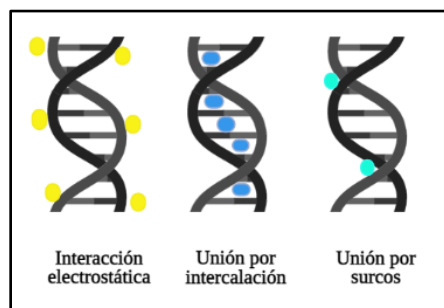
1.2.3.3 Indicadores electroquímicos.

El método indirecto para la detección de hibridación de ADN se basa en el uso de intercaladores electroquímicos activos del ADN, como por ejemplo el azul de metileno, mediadores activos redox, marcadores enzimáticos o nanopartículas que amplifican la respuesta de las secuencias de ADN o ADN hibridado para generar una señal electroquímica (Amiri et al., 2018b).

La incorporación de un indicador activo redox es el método más empleado. Estas moléculas con actividad redox pueden unirse a la superficie del ADN con diferentes modos de interacción: electrostática, unión por intercalación, unión por surcos y alta afinidad por una secuencia de ADN específica (Ver Figura 3) (Rashid & Yusof, 2017).

Figura 3.

Modos de interacción de los indicadores redox con una superficie con ADN

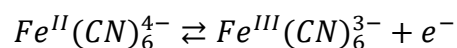


Nota. Creado en Biorender.com

Por ejemplo, en algunos estudios previos se empleó un complejo metálico catiónico, $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, que puede interactuar con un esqueleto de fosfato de ADN hibridado cargado negativamente mediante una interacción electrostática. Por lo tanto, la señal electroquímica del $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, reflejará la cantidad de hebras de ADN disponibles en la superficie del electrodo (Rashid & Yusof, 2017).

Otro caso, es la cupla redox del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, indicador redox muy utilizado, basado en el principio de repulsión electrostática donde la respuesta de corriente del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ es mayor en el electrodo sin modificar (sin la presencia de ADN) que después de la hibridación (Rashid & Yusof, 2017). Esto es debido a que se produce una alta repelencia electrostática entre el fosfato cargado negativamente de las cadenas de ADN y el $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

Asimismo, el indicador electroquímico se encarga de facilitar la transferencia de electrones entre la especie a reaccionar y la superficie del electrodo, permitiendo emplear un potencial bajo en la detección. Por otro lado, los indicadores no deben interactuar con el oxígeno molecular ni con otras especies que puedan estar presentes. Para el caso de la cupla redox de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, el ferrocianuro (Fe^{II}) se oxida de manera altamente reversible a ferricianuro (Fe^{III}). Su capacidad como mediador de transferencia electrónica se da a partir de la siguiente reacción (Amor, 2015):



1.3 Integración de nanomateriales en biosensores

1.3.1 Nanoestructuras de carbono.

1.3.1.1 El grafeno y óxido de grafeno.

El carbono es reconocido por ser el elemento más importante que se encuentra en los organismos vivos. Entre sus características particulares se destaca la alotropía, con lo cual se pueden encontrar diversas estructuras basadas en carbono con propiedades muy variadas, algunas de estas son el grafeno y los nanotubos de carbono.

El grafeno consiste en una monocapa de átomos de carbono con hibridación sp^2 ordenados de manera hexagonal. Se puede considerar como una capa simple de grafito. Sus propiedades intrínsecas entre las cuales se destacan su dureza y conductividad pueden ser aprovechadas en diferentes aplicaciones como las películas delgadas, sensores, electrónica, fotónica y optoelectrónica. Además, como derivado del grafeno se encuentra el óxido de grafeno, obtenido a partir del óxido de grafito y se caracteriza por poseer oxígeno en su estructura. La presencia de dichos grupos funcionales facilita la inmovilización de moléculas o nanoestructuras en la superficie del grafeno mediante la formación de enlaces covalentes (Ver figura 4) (Bock Gu & Hak-Sung, 2014; Lucarelli, Marrazza, Turner, & Mascini, 2004).

1.3.1.2 Los nanotubos de carbono.

Los nanotubos de carbono (CNT) son estructuras tubulares cuyo diámetro es del orden del nanómetro, clasificadas como nanoestructuras tipo 1D que le otorga grandes propiedades tales como eléctricas, mecánicas y térmicas (Díaz del Castillo, 2012). Su estructura es procedente del enrollamiento de las láminas de grafeno (ARIKSOYSAL,

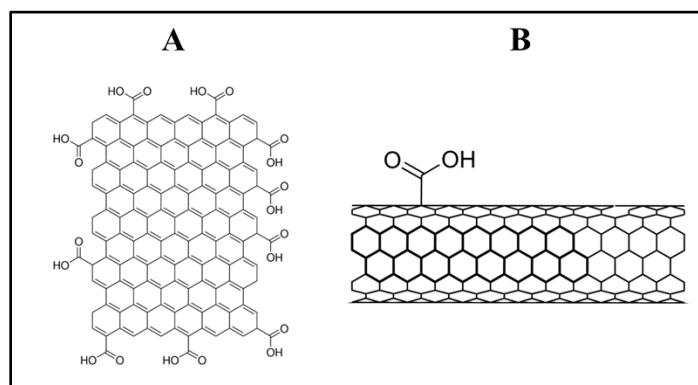
2019). Los tipos de nanotubos que existen se pueden clasificar a partir de dos criterios: del número de capas que posee y la forma en que se enrolla la lámina. Con relación al número de capas se tienen nanotubos de pared simple (SWCNT) y nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT) (Loos, 2007). Se pueden obtener por medio de métodos de síntesis de descarga de aro o deposición química de vapor.

Acerca de su rol en el campo de los biosensores, la modificación con estos nanomateriales permite interacciones tanto con el receptor como con la transducción de señales electrónicas proporcionando una mayor área de superficie activa del electrodo, que da lugar a respuestas electroquímicas mejoradas. Para que esto se lleve a cabo y se puedan aprovechar y ampliar sus propiedades, es necesario la dispersión y funcionalización de estas nanoestructuras (Bravo Segura, 2017). Un ejemplo son los nanotubos de carbono de paredes múltiple funcionalizado mostrado en la Figura 4.

La modificación generalmente se puede realizar por recubrimiento o preparando electrodos compuestos de aglutinante de CNT. También se pueden obtener diseños de electrodos modificados simples mediante la incorporación de un pequeño volumen de una dispersión de CNT sobre el electrodo de trabajo (Agüí et al., 2008).

Figura 4.

Estructura molecular de A) Óxido de grafeno y B) Nanotubos de carbono multipared funcionalizados



Nota. Adaptado de (Sigma-Aldrich, 2020)

1.4 Técnicas electroquímicas

A continuación, se presenta la definición de las técnicas electroquímicas que se aplicaron en este proyecto de investigación.

1.4.1 La doble capa eléctrica.

Es importante tener en cuenta en las reacciones de transferencia de electrones la naturaleza de la interfaz electrodo / electrolito (Biotechnology, 2013). Estas reacciones se denominan procesos faradaicos. Sin embargo, existen fenómenos interfaciales que no implican una transferencia de carga interfacial, pero que dan lugar a corriente, llamados procesos no faradaicos. Estos procesos están relacionados principalmente con la formación de una doble capa eléctrica en la interfaz electrodo/electrolito, que está inevitablemente presente en cualquier potencial de electrodo dado (Mirceski et al., 2018).

La formación de una doble capa microscópica actúa como un condensador con una capacitancia significativa debido a una distancia extremadamente pequeña entre las dos capas con carga opuesta.

1.4.2 Voltamperometría cíclica (CV).

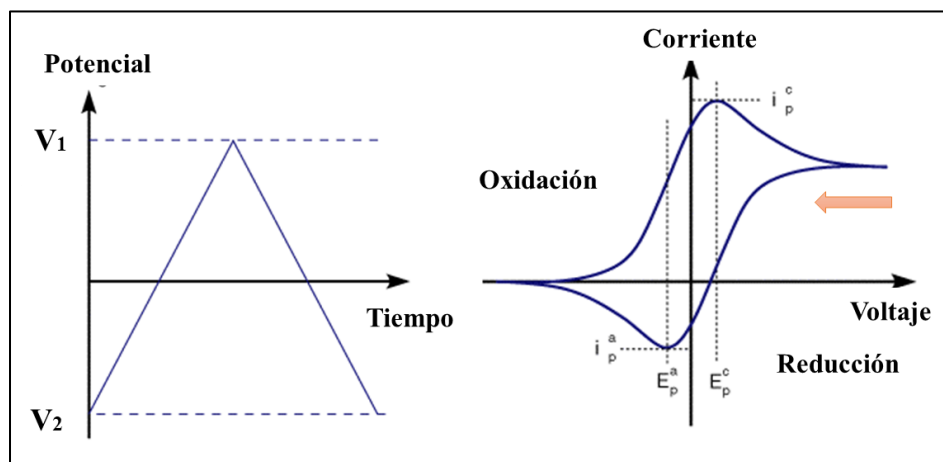
La voltamperometría pertenece a una categoría de métodos electroanalíticos, mediante los cuales se obtiene información sobre un analito variando un potencial y luego midiendo la corriente resultante una oxidación o reducción electroquímica en el electrodo de trabajo (Por lo tanto, se trata de una técnica Amperométrica) (Elgrishi et al., 2018). Al igual que hay muchas formas de variar un potencial, también hay muchas formas de emplear la voltamperometría, como: polarografía, barrido lineal, escalera diferencial, pulso normal, pulso inverso, pulso diferencial y más (Barker & Walsh, 1991).

La voltamperometría cíclica es una de las formas más utilizadas para obtener información sobre el potencial redox y las velocidades de reacción electroquímica. Se recomienda como el primer experimento que se lleva a cabo para un estudio de electroquímica por ser la técnica más versátil para el estudio de las reacciones electródicas (Pingarrón, José M. Sánchez, 1999).

La técnica consiste en aplicar un voltaje de barrido entre dos valores a una velocidad fija. Sin embargo, cuando el voltaje alcanza V_2 , el barrido se invierte y el voltaje vuelve de nuevo a V_1 , (Ver figura 5) (Biotechnology, 2013). La velocidad de barrido es un factor crítico, puesto que la duración de un barrido debe proporcionar tiempo suficiente para permitir que se produzca una reacción química significativa (Grieshaber et al., 2008).

Figura 5.

Técnica de voltamperometría cíclica. Barrido del potencial (A la izquierda) y voltamperograma cíclico típico (A la derecha)



Nota. Adaptado de (Biotechnology, 2013)

Las medidas obtenidas se grafican como corriente vs. voltaje, también conocido como voltamperograma, como se muestra en la Figura 5. A medida que aumenta el voltaje hacia el potencial de reducción del analito, también aumentará la corriente catódica. Al aumentar el voltaje hacia V_2 más allá de este potencial de reducción, la corriente disminuye, formándose un pico por la disminución en la concentración del analito cerca de la superficie del electrodo. A medida que se invierte el voltaje para completar el barrido hacia V_1 , la reacción comenzará a reoxidar el producto de la reacción inicial. Esto produce un aumento en la corriente anódica en comparación con el barrido directo, formándose un segundo pico a medida que el barrido continúa hacia V_1 (Elgrishi et al., 2018; Grieshaber et al., 2008).

1.4.3 Cronoamperometría (CA).

Es también una técnica amperométrica, en la aplicación de uno o varios saltos de potencial al electrodo de trabajo y se mide una corriente de estado estable en función del tiempo. Las alteraciones en la corriente surgen de la expansión o reducción de la capa de difusión en el electrodo (Grieshaber et al., 2008).

1.4.4 Voltametría de onda cuadrada (SWV).

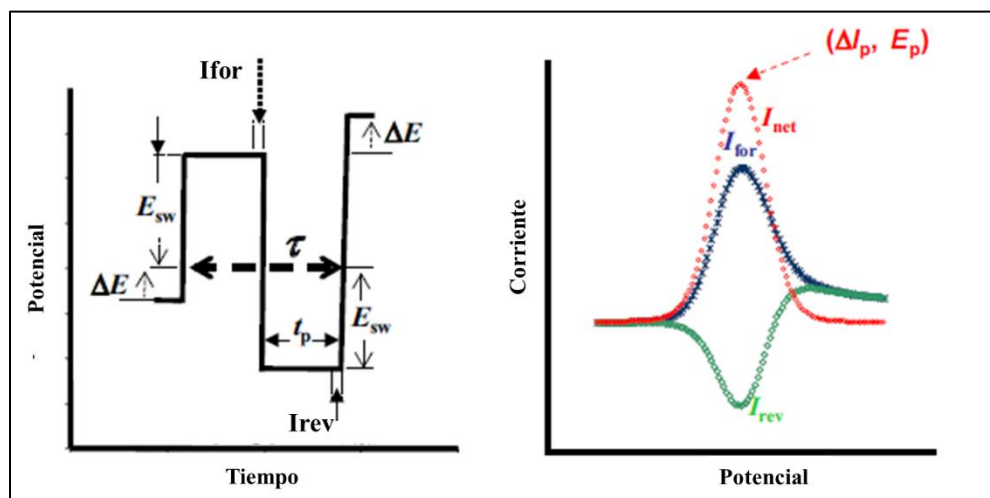
Se caracteriza por ser una técnica rápida comparada con otras técnicas voltamperométricas (Alves Ferreira, 2016). Como en otras formas de voltamperometría de pulsos, el electrodo se lleva a través de una serie de ciclos de medición; sin embargo, no hay renovación de la capa de difusión entre ciclos.

En la Figura 6 se pueden ver los parámetros principales. La onda cuadrada se caracteriza por una altura de pulso (*Pulse height*), ΔE_p , medida con respecto al escalón correspondiente de la escalera, y un ancho de pulso t_p . Alternativamente, el ancho del pulso se puede expresar en términos de la frecuencia de onda cuadrada, $f = 1/2t_p$. La escalera tiene un incremento de barrido (*Step height*) ΔE_s al comienzo de cada ciclo; por tanto, la velocidad de barrido se expresa como $v = \Delta E_s / 2t_p = f \Delta E_s$ (Bard & Faulkner, 2001).

La corriente es medida durante intervalos de tiempo muy cortos en la parte final de la onda positiva, I_{for} , que está en la dirección del barrido de la escalera a un tiempo determinado, y en la parte final de la onda negativa, I_{rev} , a otro tiempo con dirección opuesta. Además, se puede construir otra curva voltamperométrica restando los valores correspondientes de corriente (I_{for} y I_{rev}), denominados corriente neta (ΔI). En consecuencia, el resultado de una sola pasada de SWV son tres voltamperogramas (I_{for} , I_{rev} , ΔI) (Mirceski et al., 2018). La corriente neta representa un voltamperograma de onda cuadrada típico. Durante muchos ciclos, la forma de onda es una onda cuadrada bipolar superpuesta a la escalera, dando lugar al nombre del método (Bard & Faulkner, 2001).

Figura 6.

Técnica de voltamperometría de onda cuadrada. Aplicación de un ciclo de potencial (a la izquierda) y voltamperograma de onda cuadrada típico (a la derecha)



Nota. Adaptado de (Mirceski et al., 2018)

1.4.5 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS).

Esta técnica comparada con las mencionadas anteriormente, el enfoque es distinto, el trabajo de la teoría es interpretar los valores equivalentes de resistencia y capacitancia en términos de fenómenos interfaciales (Bard & Faulkner, 2001). La EIS es útil para caracterizar y monitorear todo tipo de reacciones electroquímicas, dadas por los cambios en las propiedades eléctricas que surgen de los eventos de biorreconocimiento de las superficies de los electrodos modificados (González García, 2015).

A condiciones de equilibrio, la técnica no es destructiva. La EIS generalmente se mide aplicando un potencial de corriente alterna a una celda electroquímica y midiendo la corriente a través de la celda (Gramy Instruments Inc., 2014). La impedancia “Z” de un sistema, se obtiene a partir de la medida de la corriente generada como respuesta a la aplicación de una perturbación sinusoidal del voltaje con una pequeña amplitud y frecuencia angular de variación, ω , que estén relacionadas con las propiedades de dichos materiales

(Olaya & Ulises, 2018). A partir de las mediciones de desfase y de amplitud de la respuesta, mediante una expresión análoga a la Ley de Ohm, se puede calcular la impedancia del sistema como:

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \cos(\omega \cdot t)}{I_0 \cos(\omega \cdot t - \varphi)} = Z_0 \frac{\cos(\omega \cdot t)}{\cos(\omega \cdot t - \varphi)} \quad (E.1.1)$$

Donde E_0 es el potencial, I_0 la intensidad, ω es la frecuencia y φ es el desfase. Además, por medio de una serie de arreglos aritméticos, empleando la expresión de Euler, es posible expresar la impedancia en términos de números complejos, quedando de la forma (Vazquez Gutierrez, 2007):

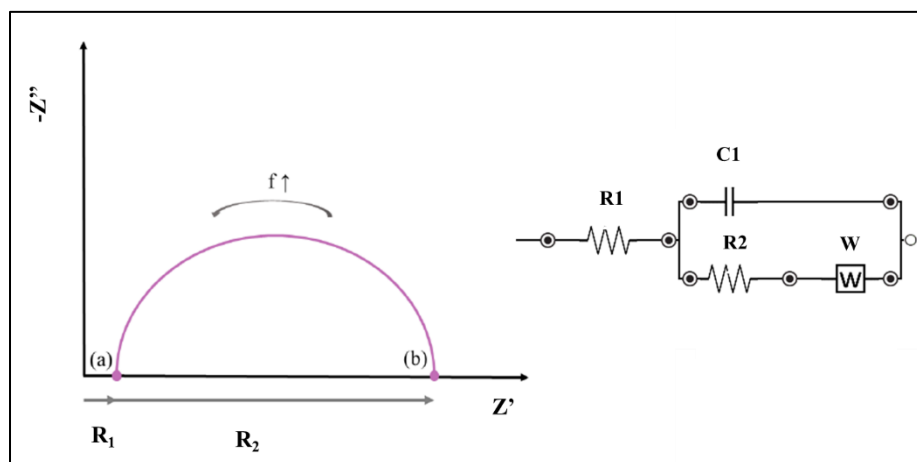
$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = Z_0 \exp(j\varphi) = Z_0 (\cos\varphi + j\sin\varphi) = Z_r + jZ_i \quad (E.1.2)$$

$$\mathbf{Z} = \mathbf{Z}' + j\mathbf{Z}'' \quad (\mathbf{E.1.3})$$

De acuerdo con la ecuación E.1.3, la expresión para $Z(\omega)$ se compone de una parte real y otra imaginaria, trazándose la parte real en el eje X y la parte imaginaria en el eje Y, representados en un "Diagrama de Nyquist". La Figura 7 muestra un ejemplo de este tipo de gráficas, donde el eje Y es negativo, y también, que cada punto del gráfico es la impedancia a una frecuencia aplicada. Respecto al eje x se pueden interpretar los datos como valores de baja frecuencia los que están al lado derecho del gráfico y los de alta frecuencia en el lado izquierdo.

Figura 7.

Técnica de Espectroscopia de impedancia electroquímica. Diagrama de Nyquist (A la izquierda) y Circuito equivalente de Randles



Nota. Adaptado de (Diard, Gorrec, & Le Montella, 2013)

La interpretación de los espectros de impedancia se basa en la selección de un modelo eléctrico que se ajuste a los datos experimentales.

Entre los circuitos más utilizados para modelizar los fenómenos interfaciales es el circuito de Randles, el cual está conformado por una resistencia en serie a un circuito que incluye un condensador (C) en paralelo con una resistencia (R2) más el término de Warburg. El espectro inicia en R1 representa la resistencia a la solución, y el punto final a la suma de R1 y R2, donde R2 es la resistencia a la transferencia de carga entre la solución y la superficie del electrodo. El valor de C es el valor de la capacitancia de la doble capa obtenido del valor máximo de impedancia imaginaria (Ocaña Tejada, 2011). En cuanto la impedancia de Warburg que depende de la difusión de los iones desde el seno de la disolución hacia la interfase del electrodo, representado en la pendiente que se origina al final del semicírculo (González-Carrato, 2015). En resumen, depende de la complejidad del sistema electroquímico estudiado, el circuito equivalente constará también de mayor complejidad.

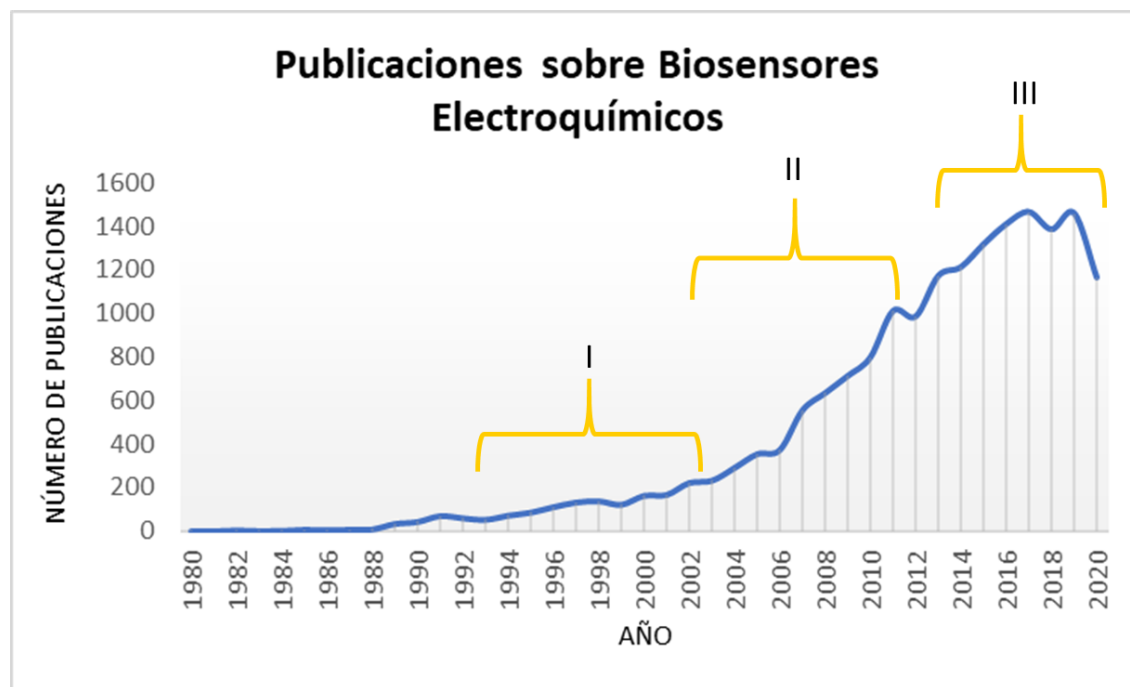
2. Estado Del Arte

Los primeros estudios reportados sobre biosensores electroquímicos fueron en 1956. Fue a partir del año 1995 que surgieron los biosensores electroquímicos basados en ADN. De esta manera, se parte de conocer que el estudio de biosensores se ha venido estudiando de forma activa en las últimas décadas. Según la base de datos *Scopus* a la fecha se han publicado alrededor de 2490 documentos relacionados con los biosensores electroquímicos basados en ADN como se puede ver en la gráfica de la Figura 8, la cual se encuentra distribuida en tres etapas. En la etapa I se estudiaba la forma de poder emplear mayor cantidad de ADN de bacterias a la hora de detección por medio de la técnica de PCR para la detección directa de bacterias. También se estudiaba la señal de oxidación de las guaninas presentes en las sondas inmovilizadas una vez que ocurría el proceso de hibridación. El problema era la baja sensibilidad de los ensayos en muestras reales a la hora de detectar una bacteria objetivo en medio de una matriz acuosa con diferentes microorganismos (Elgrishi et al., 2018).

En la segunda etapa (2002 - 2009) los nanomateriales, particularmente las nanopartículas de metal y materiales semiconductores, se convierten de gran interés como indicadores de hibridación y por otra parte se abre paso al desarrollo de biosensores con detección indirecta a partir de indicadores electroquímicos (Lee, 2008). En la tercera etapa (últimos 10 años) se ha venido trabajado en el diseño y fabricación de biosensores electroquímicos eficientes basados en nanoestructuras de carbono como nanotubos de carbono, grafeno, óxido de grafeno y nanodiamantes (P. Abdul Rasheed & Sandhyarani, 2017), debido que se están volviendo cada vez más útiles como plataformas de biodetección electroquímica.

Figura 8.

Tendencia de las publicaciones de biosensores basados en ADN tomando como referencia la base de datos Scopus



Los biosensores basados en ADN han revolucionado los métodos de análisis debido a su estabilidad y bajo costo para la fabricación de nuevos dispositivos en nanotecnología (Tiwari, Singh, Pandey, & Sumana, 2015). Se basa principalmente, en que un ADN monocatenario (ssDNA), sirve como elemento de reconocimiento al ser inmovilizado sobre una superficie conductora. Después una muestra se introduce a la superficie del sensor, ocurriendo el proceso de hibridación si contiene la hebra complementaria de ADN, formando finalmente la doble hélice de ADN. De esta forma va a ocurrir un cambio en la intensidad de corriente respecto al indicador electroquímico que se esté empleando. El ferrocianuro es de los indicadores redox más utilizados debido a su alta actividad electroquímica.

Como se mencionó anteriormente, la detección electroquímica de ADN se clasifica en dos formas: directa e indirecta. La siguiente tabla presenta un resumen de publicaciones sobre biosensores electroquímicos basados en ADN para la detección de algunos

microorganismos patógenos. Por otra parte, la Tabla 1 también muestra información acerca de las técnicas electroquímicas más empleadas para la detección y cuantificación de microorganismos; y finalmente el límite de detección que alcanza cada dispositivo.

Tabla 1

Resumen de estudios realizados en la detección de patógenos por medio de biosensores electroquímicos

Analito	Técnicas electroquímicas	Límite de detección.	Autores
<i>E. coli</i>	DPV	1×10^{-10} M	(Tiwari et al., 2015)
<i>E. coli</i> O157H7	EIS	2 CFU/mL	(Barreiros dos Santos et al., 2013)
<i>E. coli</i> O111	EIS, SWV	112 CFU/mL	(Luo et al., 2012)
<i>Salmonella</i>	EIS	3 CFU/mL	(Ma et al., 2014a)
<i>S. typhimurium</i>	DPV	28 CFU/mL	(Pei et al., 2017)
<i>H. pylori.</i>	DPV	27 pM	(Hajihosseini, Nasirizadeh, Hejazi, & Yaghmaei, 2016)
<i>S. Aureus</i>	EIS, DPV	3.17×10^{14} M	(Abdalthai et al., 2014)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	SWV	0.093 CFU/mL	(Jinping Wang, Leong, Leong, Kuan, & Leong, 2017)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	SWV	$2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$	(Ligaj, Tichoniuk, Gwiazdowska, & Filipiak, 2014)

2.1 Los nanomateriales y sus potenciales aplicaciones en sistemas de detección electroquímica

Los avances de la nanotecnología en los últimos años han tenido un gran crecimiento desde que se descubrió que las propiedades de los materiales a escala nanométrica tales como térmicas, eléctricas, ópticas, mecánicas y biológicas son diferentes a las propiedades que tienen los materiales a escala microscópica. La morfología es otro aspecto que los hace particulares. Para evaluar su comportamiento se debe tener en cuenta factores como el

tamaño, la forma, estructura cristalina, composición química, entre otros (Bravo Segura, 2017).

Los nanomateriales han tenido gran influencia en el desarrollo de los biosensores sobre todos sus componentes, desde el elemento de reconocimiento hasta el procesamiento de la señal con el fin de obtener dispositivos más selectivos y sensibles (Erdem, 2007). Entre los nanomateriales más empleados en los biosensores se ha enfocado en los nanotubos de carbono y el grafeno y por otro lado en las nanopartículas de oro (AuNps). Cada nanomaterial tiene propiedades únicas, pero en particular, su alta área superficial, su reactividad y la transferencia rápida de electrones heterogéneos los convierten en materiales interesantes para aplicaciones de detección electroquímica (Palchetti & Mascini, 2012). A continuación, se presenta información específica de cada uno de estos nanomateriales.

Las nanopartículas de oro se caracterizan por presentar propiedades ópticas, eléctricas, catalíticas y biocompatibles. Por otra parte, puede inmovilizar sondas de ADN monocatenario, modificado con tiol, generando así una capa autoensamblada, que pueda hibridar la secuencia complementaria (Carrascosa et al., 2014).

La electrodeposición química es uno de los métodos más empleados en la obtención de nanopartículas de oro sobre sustratos conductores principalmente porque permite el control del tamaño y distribución de las nanopartículas por medio de la variación del potencial, tiempo de electrodeposición o concentración de la solución (Abdalthai et al., 2014)(Drahansky et al., 2016). El primer paso en la síntesis electroquímica de AuNps es la reducción electroquímica de la sal de AuCl_4^- , luego la formación de núcleos de oro sobre la superficie, y finalmente el crecimiento de las nanopartículas (Tonelli, Scavetta, & Gualandi,

2019). Varios estudios se han realizado en la síntesis de AuNps (El-deab, Sotomura, & Ohsaka, 2005; Etesami, Karoonian, & Mohamed, 2011; Viet & Takamura, 2016).

El grafeno es un átomo bidimensional con propiedades como alta conductividad térmica y eléctrica debido al pequeño espesor de la capa que se compone y gran área superficial. Además, permite la integración de nanopartículas metálicas en el mejoramiento de las propiedades de los biosensores (Hernandez & Ozalp, 2012). Por su naturaleza hidrofóbica el grafeno tiende a aglomerarse irreversiblemente debido a las fuertes interacciones π entre las láminas. Una solución a esto es la funcionalización del grafeno por métodos covalentes o no covalentes (Rodríguez, Tutor, Jarque, Supervisora, & Segarra Ferrando, 2015). El resultado es la obtención de óxido de grafeno (GO) que consta de una parte hidrofóbica, que conforma la estructura básica del grafeno, y de una parte hidrofílica formada por grupos oxigenados, como hidroxilos, epóxidos, carbonillos y carboxilos. La presencia de tales grupos funcionales lo vuelve un material versátil para una gran variedad de aplicaciones (Bravo Segura, 2017). En el caso de los biosensores a base de electrodos con óxido de grafeno permite mejorar su eficiencia por medio de una transferencia de carga superior puesto que conduce corrientes más grandes y mejora la relación de señal-ruido (Thangamuthu, Hsieh, Kumar, & Chen, 2019).

Acerca de los nanotubos de carbono, poseen un amplio rango de aplicaciones debido a sus propiedades tales como conductividad térmica y eléctrica, estabilidad, resistencia mecánica y la capacidad de interactuar con una variedad de analitos debido a su gran área superficial por medio de la adsorción de moléculas y biomoléculas sobre superficies modificadas con estos. Se pueden distinguir de dos tipos: multipared o de pared simple. Debido a su naturaleza altamente hidrófoba, producto de las interacciones π - π entre los

anillos aromáticos lo hacen insolubles por lo que se requiere de la funcionalización de su estructura para su dispersión en soluciones acuosas. La literatura reporta distintos solventes como agentes dispersantes de estas nanoestructuras (Espinosa, Ortiz-Trujillo, Carlos-Cornelio, Zapata-Hernández, & Hoyos-Palacio, 2017; Jagadish, Srikantaswamy, Byrappa, Shruthi, & Abhilash, 2015; Ozkan-Ariksoysal et al., 2017a; Sun, Liu, & Chen, 2010; Taylor, Hilding, Grulke, Zhang, & Lockwood, 2011). Como resultado se obtienen nanotubos funcionalizados con nuevas propiedades como solubilidad en agua y biocompatibilidad (Sadegh & Shahryari-ghoshekandi, 2015).

Continuando con la búsqueda en la literatura a continuación se presenta información de diferentes estudios en el diseño de biosensores basados en estos tipos de nanomateriales.

Zhu et al, desarrollaron un aptasensor basado en la electrodeposición de AuNps sobre carbón vítreo con deposición de óxido de grafeno con NH_2 reducido para la detección de moléculas de ATP. En este estudio se comparó la actividad electroquímica de la AuNps al comparar aptasensores con AuNps sintetizadas por electrodeposición química y por inmersión. Por medio de voltamogramas cíclicos en solución buffer de PBS con pH 7.0 se observó que los picos característicos por parte de la síntesis de AuNps por inmersión luego de varios ciclos el pico desaparecía prácticamente, lo que indica que las AuNps adsorbidas sobre el electrodo son inestables. Mientras en el caso de las AuNps sintetizadas por electrodeposición exhibieron una excelente actividad electroquímica al producir una señal electroquímica amplificada, que puede usarse como una sonda redox para la detección electroquímica de ATP o moléculas con bajo límite de detección (Zhu, Liu, Yang, & Liu, 2015).

Shahrokhian et al, desarrollaron un biosensor con nanotubos de carbono de paredes múltiples y nanopartículas de oro para la detección de tinidazol. En este caso, realizaron un

estudio de la solución buffer utilizada para las mediciones electroquímicas, variando el pH de 3.0 hasta 8.0, siendo el pH 7.0 el que permite obtener picos máximos catódicos. Además, presentan valores de medidas por cada modificación del electrodo de trabajo del biosensor, en donde el mayor valor de intensidad de corriente ($50\mu\text{A}$) se alcanza cuando está modificado con los nanotubos de carbono de paredes múltiples y nanopartículas de oro (Shahrokhian & Rastgar, 2012).

Wang et al, investigaron la posibilidad de usar óxido de zinc para la fabricación de aptasensores electroquímicos, empleando nanocables de zinc, nanotubos de carbono y nanopartículas de oro sobre electrodos de carbono vítreo para mejorar la sensibilidad del mismo, en el cual obtuvieron un aptasensor capaz de detectar cuantitativamente el ADN objetivo en un rango de 1×10^{-13} hasta 1×10^{-7} M, por medio de medidas de voltamperometría de pulso diferencial y utilizando $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ como indicador electroquímicos, exhibiendo excelente reproducibilidad y estabilidad, y por otra parte en cuanto a la selectividad detectó cadenas no complementarias del ADN objetivo (Jie Wang, Li, & Zhang, 2010). Esto último, da indicio de que el biosensor a pesar de que puede detectar el ADN objetivo puede detectar también el mismo ADN con cambio en algunas de sus bases nitrogenadas, que puede ser una ventaja por el hecho de detectar diferentes ADN objetivo o desventaja si sólo se desea como tal la hebra complementaria del elemento de reconocimiento.

Ma et al construyeron un biosensor electroquímico basado en aptámeros para la detección de *Salmonella entérica serovar Thphimurium*. Emplearon electrodos de carbón vítreo con óxido de grafeno y nanopartículas de oro e inmovilizaron el aptámero de cadena sencilla tiolado. La cuantificación se realizó por la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica, en el rango de $2.4\text{-}2.4 \times 10^3$ CFU/mL la concentración del microorganismo

exhibió una relación lineal con la impedancia y el límite de detección fue de 3 CFU/mL. Los resultados mostraron que, al adicionar más *Salmonella* al sistema de reacción, la corriente entre el electrodo y electrolito decrecía, lo que significa un aumento gradual de la impedancia y alta sensibilidad del dispositivo (Ma et al., 2014b).

Ozkan et al, propusieron la aplicación de ADN cubierto de nanotubos de carbono de paredes múltiples por apilamiento para la detección de *E. coli* a partir de muestras reales de PCR, con un tipo de medición directa a partir de la guanina presente en las secuencias de nucleótidos sintéticos. El aptasensor logró detectar ADN de *E. coli* en un tiempo de detección de 20 min con 0,5 pmol de límite de detección en 30 μ L de muestra de volumen (Ozkan-Ariksoysal et al., 2017).

Housaindkht et al, propusieron un aptasensor electroquímico de marcador libre, basado en una corriente de respuesta derivada del azul de metileno como indicador para detectar *E. coli* O157:H7, por medio de la técnica de voltametría de pulso diferencial. En este caso, la forma de inmovilizar el aptamero fue por medio de las interacciones de apilamiento π - π entre las bases de los ácidos nucleicos con nanotubos de carbono de pared simple. El aptasensor logró detectar el ADN objetivo y recalcan que, el dispositivo por su sensibilidad podría ser aplicado para otros ADN objetivo de detección en muestras de aguas (Housaindokht et al., 2018).

También se reportan diversos estudios de biosensores basados con nanotubos de carbono, óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido, en los cuales se estudia la detección de otros analitos y distintos indicadores redox; como células cancerígenas (Feng, Lu, Dong, Ling, & Zhang, 2013), adenosina desaminasa (Taranejoo & Moghri, 2014), peróxido de

hidrógeno (Li et al., 2017). Cabe resaltar de estas investigaciones la novedosa modificación de la superficie de los sensores.

Eissa et al, desarrollaron una comparación en el rendimiento de aptasensores modificados con distintas formas del carbono como grafeno, oxido de grafeno, nanotubos de carbono de pared simple y nanofibras de carbono con el fin de estudiar el efecto de estas nanoestructuras sobre electrodos serigrafiados por medio de voltamogramas cíclicos empleando la dupla redox de ferrocianuro de potasio. Este estudio tenía como fin obtener información sobre el efecto de cada nanoestructura de carbono en la inmovilización de aptámeros por adsorción física, de cual encontraron que el aptasensor con mejor respuesta electroquímica y selectividad fueron los nanotubos de pared simple (Eissa, Almusharraf, & Zourob, 2019).

En el caso del panorama nacional sobre el desarrollo de biosensores se encontraron los siguientes estudios (Ver Tabla 2).

Tabla 2
Estudios realizados a nivel nacional relacionados con biosensores electroquímicos

Título	Resumen	Autores
Construcción de un electrodo enzimático para la optimización y diseño de biosensores y celdas de biocombustible	Por medio de voltametría cíclica, voltametría de pulso diferencial y amperometría realizaron curvas de calibración para la detección de glucosa.	(Castillo, 2009)
Desarrollo y caracterización de un sensor basado en nanoestructuras de carbono contenido en polímeros conductores para aplicaciones óseas.	Se basa en la electropolimerización de películas compuestas por polipirrol y nanotubos de carbono funcionalizados sobre un electrodo de grafito, a partir de esta se siguieron modificando los electrodos con más compuestos. Finalmente, el objetivo fue estudiar sensores con electropolimerización en la detección de proteína BSA contenida en bufer de PBS,	(Ximena, Velasco, Ximena, & Velasco, 2017)

	con el fin de encontrar muestras que podrían poseer propiedades específicas para una aplicación como biosensor.	
Desarrollo de un biosensor basado en electrodos de nanotubos de carbono modificados con peroxidasa de pasto guinea (<i>Panicum maximun</i>) para la determinación de triclosán (TCS)	Desarrolló un biosensor para la detección de TCS con rango lineal entre la señal de corriente y la concentración de TCS de 20-80 μ M.	(Ordúz, 2017)
Biosensor para la detección del Zika.	Gold nanoparticle/DNA-based nanobioconjugate for electrochemical detection of Zika virus	(Cajigas, Alzate, & Orozco, 2020)

Se puede concluir que el desarrollo de biosensores electroquímicos basados tanto en ADN como en otros elementos de reconocimiento ha sido favorable en el avance por encontrar alternativas de medición de patógenos y otras moléculas de interés. También cabe resaltar la importancia de los nanomateriales por sus propiedades conductoras sobre las superficies de los electrodos que funcionarán como biosensores. Si bien se han reportado diferentes biosensores electroquímicos modificados con nanoestructuras de carbono tales como nanotubos de carbono, óxido de grafeno, entre otros nanomateriales; pocas publicaciones están relacionadas con el efecto de cada nanomaterial o la sinergia entre ellas sobre la señal electroquímica. Aunque sí se han realizado estudios comparando el efecto entre el óxido de grafeno y los nanotubos de carbono se ha realizado para biosensores ópticos o con otro elemento de reconocimiento (Yang et al., 2010; Zheng et al., 2013). El siguiente estudio aportó a esta información, sobre el efecto de los nanomateriales (nanoestructuras de carbono y nanopartículas de oro sobre electrodos serigrafiados) con relación al transporte eléctrico observado por técnicas electroquímicas.

3. Objetivos

3.1 General

- Estudiar el efecto de nanoestructuras de carbono y nanopartículas de oro sobre la respuesta electroquímica del transductor y sobre la selectividad de aptámeros inmovilizados hacia la detección de ADN en matrices acuosas.

3.2 Específicos

- Determinar las condiciones de inmovilización de aptámeros tiolados sobre electrodos serigrafiados modificados con nanopartículas de oro.
- Evaluar la influencia de nanoestructuras de carbono sobre la respuesta electroquímica de electrodos serigrafiados
- Analizar parámetros de detección del biosensor electroquímico frente al reconocimiento de ADN en matrices acuosas.

4. Esquema Metodológico

Figura 9.

Esquema general de la metodología para el desarrollo del trabajo de investigación



5. Efecto de las nanopartículas de oro obtenidas por métodos de electrodeposición en la respuesta de los biosensores electroquímicos basados en ADN

Las AuNPs pueden ser obtenidas por diferentes métodos de síntesis, en una revisión realizada por Alex y colaboradores (Alex & Tiwari, 2015) presentan algunos métodos tales como pulverización catódica de iones, ablación láser, descarga de arco, radiación UV e IR, reducción química, método Brust-Schiffrin, deposición electroquímica, entre otros. La selección del método de síntesis apropiado es crucial para optimizar el tamaño y la forma de las nanopartículas; y así ajustar sus propiedades para una aplicación específica dada.

La electrodeposición ha surgido como una estrategia versátil con la ventaja de controlar el tamaño y la distribución de las nanopartículas variando el potencial, el tiempo o la concentración de la solución (Drahansky et al., 2016; Mohanty, 2011).

5.1 Proceso de electrodeposición química de AuNPs

Para el proceso de electrodeposición se requiere una celda electrolítica, un electrolito, electrodos y una fuente de poder. El electrolito es la solución electroquímica del metal que se deposita en la superficie del cátodo durante la electrólisis. Cuando una fuente de poder es conectada a los terminales de los electrodos, el flujo de corriente fluye a través de ellos. Como resultado de esto, los cationes (iones metálicos M^{z+}) son atraídos al cátodo y depositado sobre este (Mohan Mundotiya & Wahdat, 2016). La continua deposición de los iones metálicos sobre la superficie del cátodo forma una capa uniforme del metal por medio del proceso de reducción. Las reacciones que toman lugar durante la electrodeposición son las siguientes:





Existen dos tipos de ánodos para la electrodeposición: ánodo de sacrificio y ánodo permanente. En el primero, el material se sacrifica entregando en forma de iones metálicos al electrolito; mientras que el segundo es un ánodo inerte usado solo para completar el circuito eléctrico, generalmente hecho de platino o carbón.

Entre los electrolitos usados para la deposición de las nanoestructuras de oro, se destaca el uso del complejo de cloro aniónico $[\text{HAuCl}_4]^{-}$ en solución clorhídrica con estado de oxidación +3 (Mohan Mundotiya & Wahdat, 2016).

5.1.1 Formación de Nanopartículas de oro de dimensional cero por electrodeposición.

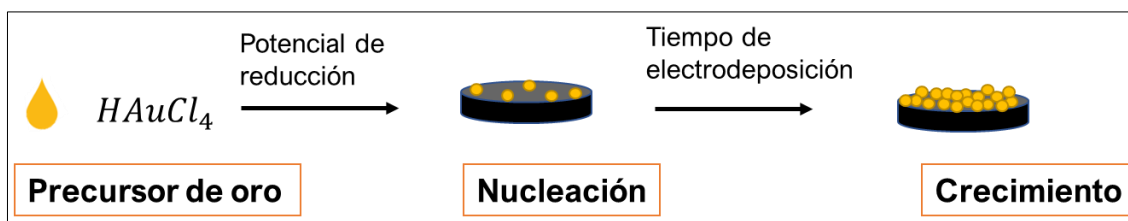
Las nanopartículas de oro son usadas como accesorios fotoeléctricos, biosensores, actividad electrocatalítica, etc. La electrodeposición es una técnica versátil para sintetizar nanoestructuras de oro sobre un sustrato conductor. En este método, la morfología de las nanoestructuras depositadas puede ser fácilmente controladas por variaciones en el proceso en los parámetros de electrodeposición tales como concentración del electrolito, temperatura del electrolito, densidad de corriente, tiempo, etc (Mohanty, 2011).

El proceso de formación de las nanopartículas se puede describir de la siguiente manera (Ver Figura 10). El primer paso en la síntesis electroquímica de AuNps es la reducción electroquímica de la sal de $[\text{AuCl}_4]^{-}$, luego inicia el proceso de nucleación con la formación de núcleos de oro sobre la superficie, la cual es más rápida al principio del proceso de electrodeposición. Luego de un prolongado tiempo de electrodeposición, la superficie del sustrato es cubierta por núcleos de oro por lo que la formación de estos decrece en esta etapa.

Finalmente toma lugar el crecimiento de estos núcleos por proceso de difusión (Tonelli et al., 2019).

Figura 10.

Esquema general del proceso de síntesis de AuNps por electrodeposición



5.2 Proceso de autoensamblado de sondas de ADN tioladas

La inmovilización de sondas de ADN sobre la superficie del electrodo de trabajo para reconocer su ADN complementario o diana por el proceso de hibridación es un paso esencial en la construcción de sensores electroquímico de ADN. Entre las técnicas de inmovilización de sondas de ADN sobresalen los métodos de adsorción y enlace covalente.

5.2.1 Enlace covalente entre el ADN y AuNps.

El enlace covalente ha demostrado una buena estabilidad, flexibilidad, alta fuerza de enlace y previene la desorción de las sondas de ADN inmovilizadas sobre la superficie del electrodo. Además, este tipo de inmovilización brinda la orientación vertical en donde el extremo final de la sonda de ADN es insertado sobre la superficie del electrodo, resultando un montaje que aumenta la eficiencia en la detección del ADN complementario (Pathath Abdul Rasheed & Sandhyarani, 2017).

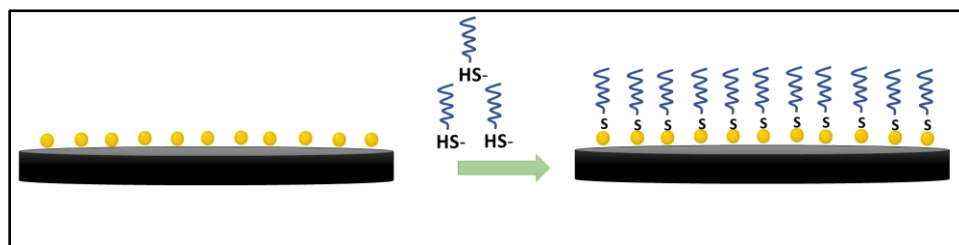
Para que este proceso ocurra, la sonda de ADN puede ser enlazada con grupos tiol (S-H) en el terminal de 3' a 5' para que se una de forma covalente al metal de la superficie del electrodo o el grupo funcional introducido en esta. Un método de inmovilización de

enlace covalente específico es la quimisorción, en el cual la inmovilización sucede entre una sonda de ADN modificada con grupos tiol y una superficie de oro formando una monocapa autoensamblada (SAM: self-assembly monolayer), por la fuerte afinidad que existe en la interacción del grupo tiol con el oro formando el enlace oro-azufre (S-Au) (Rozenblum, Pollitzer, & Radrizzani, 2019).

Por otro lado, la quimisorción se puede llevar a cabo con sondas de ADN sobre nanopartículas de oro, estrategia que ha ganado gran interés en el diseño de biosensores electroquímicos de ADN debido al aumento del área superficial del electrodo que otorga mayor cantidad de sonda de ADN inmovilizada (Ver Figura 12). Entre los avances actualmente, se viene investigando con nanocompositos híbridos basados en AuNps como nueva matriz de inmovilización de ADN, lo que promete amplificar la señal electroquímica de manera que se obtengan biosensores electroquímicos de ADN ultrasensibles para el futuro (P. Abdul Rasheed & Sandhyarani, 2017).

Figura 11.

Esquema de sondas de ADN tiolado inmovilizadas por el método de quimisorción



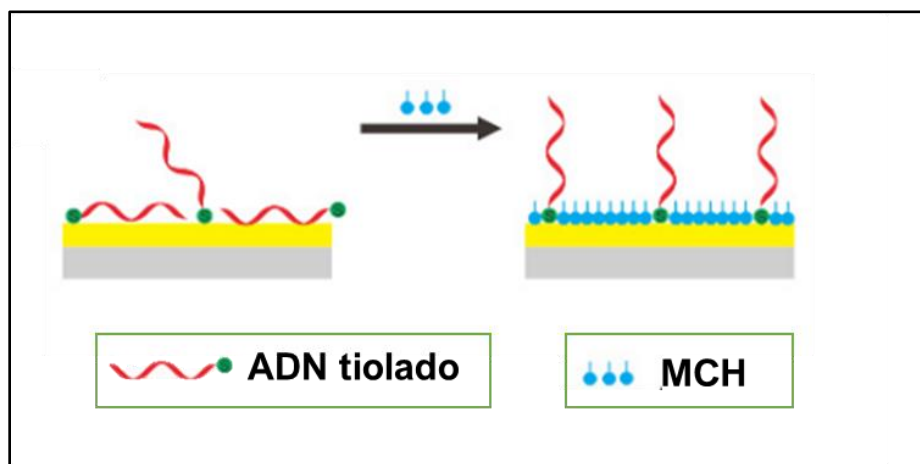
5.2.2 Tratamiento de capas autoensambladas de ADN.

Cuando se tiene superficies de ADN inmovilizado en oro o nanopartículas de oro por quimisorción, generalmente se emplean agentes de bloqueo. Entre estos el mercaptohexanol (MCH) generalmente es muy utilizado, el cual evita interacciones inespecíficas de especies

presentes en la superficie del electrodo (Keighley, Li, Estrela, & Migliorato, 2008). Además, otra función del MCH por ser una molécula muy pequeña (Ver Figura 12), actúa como un espaciador entre los receptores del biosensor orientando las sondas de ADN de forma vertical (90°), lo que mejora la interacción y eficiencia con el ADN objetivo (Pardo, 2016).

Figura 12.

Esquema de la inmovilización de MCH actuando como agente de bloqueo y separados de los bioreceptores



Nota. Adaptado de (X. Wang et al., 2018)

El objetivo de este capítulo fue encontrar las condiciones de inmovilización de aptámero tiolado por quimisorción y el empleo de MCH, que permitan la construcción de un biosensor electroquímico comparando dos métodos de electrodeposición para la síntesis de AuNPs: voltamperometría cíclica y cronoamperometría. Se seleccionó el método que permitió una amplificación significativa en la respuesta electroquímica; empleando las técnicas de voltamperometría cíclica, voltamperometría de onda cuadrada y espectroscopia de impedancia electroquímica.

5.3 Desarrollo experimental

5.3.1 Materiales y equipos.

5.3.1.1 Reactivos.

Los oligonucleótidos utilizados fueron adquiridos comercialmente en Macrogen, pertenecen a un segmento conservado del gen ribosomal 16s rDNA de *E. coli* y ha sido utilizado previamente para la detección de *E. coli* con biosensores electroquímicos (Ozkan-Ariksoysal et al., 2017). A continuación, se presentan las secuencias de bases:

Sonda de ADN receptor (B1Apt2): 5'-Tiol-TTA CAA CCC GAA GGC C-3'

Secuencia de ADN objetivo (B1Comp): 5'-GGC CTT CGG GTT GTA A-3'

Ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) y Ferrocianuro de potasio ($K_4Fe(CN)_6$) ($\leq 100\%$ adquirido de Merck). Cloruro de potasio y Cloruro de Sodio (≤ 100 Comprado en PanReac). Fosfato monopotásico. Fosfato dipotásico. Ácido tetracloroaúrico ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) (99.9% adquirido de Sigma Aldrich). Ácido sulfúrico (H_2SO_4) (98% comprado em PanReac). DTT, 1,4-Ditiotreitol ($\geq 98\%$ adquirido de Sigma Aldrich). MCH, 6-Mercapto-1-hexanol (97% comprado en Sigma Aldrich). Flujo de nitrógeno. Agua libre de nucleasas (Invitrogen) y agua tipo 1 (Resistividad $18.0 M\Omega cm^{-1}$).

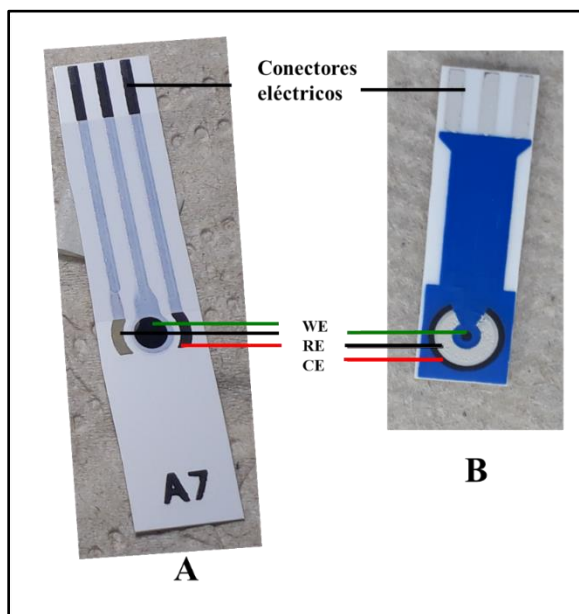
Las soluciones stock de las sondas de ADN fueron respectivamente constituidas en agua libre de nucleasas y almacenadas a $-20^\circ C$. A partir de las soluciones stock, se prepararon las sondas de ADN tioladas empleadas para la etapa de inmovilización con agua tipo 1 y las sondas de ADN objetivo en 0.1 M de solución salina tampón fosfato (PBS) a pH 7.4.

Para analizar el comportamiento de los electrodos modificados, se prepararon soluciones tanto en agua tipo 1 como en PBS pH 7.4, entre 0.5 mM a 10 mM de $K_2[Fe(CN)_6]$ con 0.1 M KCl como electrolito soporte.

Se emplearon dos marcas de electrodos serigrafiados, *BVT technologies* e *Italsens*, cada uno con un electrodo de trabajo (WE) de 1 mm y 3 mm de diámetro respectivamente. Estos, estaban conformados por un sistema de tres electrodos: un WE y un contraelectrodo (CE), ambos de grafito; y un electrodo de pseudoreferencia de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) (Ver Figura 13). En el presente trabajo, todos los potenciales de trabajo están reportados respecto al electrodo de referencia de Ag/AgCl.

Figura 13.

Electrodo serigrafiado (SPE) y sus partes: electrodo trabajo (WE), electrodo de referencia (RE) y contraelectrodo (CE). A) Marca Italsense y B) BVT



5.3.1.2 Equipos.

La evaluación electroquímica de los biosensores fue realizada a temperatura ambiente en un potenciostato marca VersaSTAT3 (*Princeton Applied Research*) conectado a un computador y controlado por el software VERSASTUDIO 2.60.6.

5.3.1.3 Condiciones de trabajo de las técnicas electroquímicas.

- Voltamperometría de onda cuadrada

Se utilizó una solución 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, en 0.1 M de KCl con amplitud de 0.050 V, E step de 0.05 V en un rango de potencial de -0.4 a +0.8 V y frecuencia de 10 Hz. Para la selección de estos parámetros se hizo un estudio preliminar que también permitió predecir las condiciones para la técnica de voltamperometría cíclica (Ver Anexo A).

- Voltamperometría cíclica

Se utilizó una solución 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, en 0.1 M de KCl, a una velocidad de barrido de 50 mV/s, rango de potencial de +0.7 a -0.3 V y un ciclo de barrido.

- Espectroscopia de impedancia electroquímica.

Se utilizó una solución de la cupla redox entre 0.5 a 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en 0.1M de KCl, un rango de frecuencias entre 50000 a 0.5 Hz y amplitud de 10 mV (Brosel-Oliu et al., 2018).

5.3.2 Síntesis de AuNps por electrodeposición química.

Se prepararon soluciones de ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a concentraciones de 0,5 y 1 mM en 0.5 M de ácido sulfúrico (H_2SO_4) como electrolito. Seguidamente se realizó una purga de Nitrógeno durante 5 min para desoxigenar la solución.

Antes de realizar la síntesis se aplicaba una voltamperometría cíclica en una solución 0.5 M de ácido sulfúrico (H_2SO_4) en un rango de potencial de +0.7 - -0.1 V durante tres ciclos con el fin de activar la superficie del electrodo de trabajo. Después, se depositaban 100 μL de la solución sobre los electrodos serigrafiados bajo las condiciones a investigar.

5.3.2.1 Potencial de reducción del Oro.

Inicialmente se determinó el potencial de reducción al cual se da la formación de oro sobre los electrodos modificados. Para lograr esto, se realizó una voltamperometría lineal al electrodo en una solución con 0.5 M de H_2SO_4 como blanco y luego en una solución que contenía el precursor de oro a un rango de potencial entre 0 a +1.0 V vs Ag/AgCl a una velocidad de barrido de 50 mV/s. De esta manera, se encontró el rango de potencial de reducción del precursor de oro para proceder con la síntesis de las AuNps por medio de las técnicas de voltamperometría cíclica y cronoamperometría.

5.3.2.2 Voltamperometría cíclica.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

- **Velocidad de barrido**

Se ajustó un rango de potencial fijo entre +0.6 a -0.2 V, estudiando las velocidades de barrido presentadas en la Tabla 3.

Tabla 3
Estudio de la velocidad de barrido para síntesis de AuNPs

Muestra	Velocidad de barrido [mV/s]
SPE/Au1	25
SPE/Au2	50
SPE/Au3	100

- Concentración del precursor de oro

Se estudiaron dos concentraciones del precursor de oro a un rango de potencial de +0.6 a -0.2 V con la velocidad de barrido seleccionada de 50 mV/s (Ver Tabla 4).

Tabla 4
Estudio de la concentración del precursor de oro

Muestra	Concentración Au [mM]
SPE/Au1	0.5
SPE/Au2	1

- Rango de potencial

Se fijó una concentración del precursor de oro a 1 mM y velocidad de barrido de 50 mV/s. Para el estudio del rango de potencial, primero se dejó constante el potencial inicial, variando el final; y luego en viceversa. Las variaciones del rango de potencial estudiadas se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5
Estudio del rango de potencial para la síntesis de oro

Muestra	Rango de potencial [V]
SPE/Au1	+0.6 - -0.2

SPE/Au2	+0.5 - -0.2
SPE/Au3	+0.4 - -0.2
SPE/Au4	+0.6 - 0
SPE/Au5	+0.6 - 0.1

- **Número de ciclos de barrido**

Además, se estudió la variación del número de ciclos de barrido de potencial (Ver Tabla 6) entre uno y dos ciclos, con las condiciones definidas de los anteriores parámetros.

Tabla 6

Estudio del rango de potencial para la síntesis de oro

Muestra	Número de ciclos
SPE/Au1	1
SPE/Au2	2

5.3.2.3 Cronoamperometría.

Las variables para la síntesis de las AuNPs fueron el potencial y tiempo de electrodeposición (Ver Tabla 7), para analizar cuál condición favorecerá la inmovilización de la concentración de aptámeros, teniendo en cuenta la respuesta de la señal electroquímica.

Tabla 7

Estudio de los parámetros de la técnica de cronoamperometría para síntesis de AuNPs

Muestra	Condiciones	
	Potencial [V]	Tiempo [s]
SPE/Au1	0.15	50
SPE/Au2	0.05	50
SPE/Au3	-0.05	50
SPE/Au4	0.05	10
SPE/Au5	0.05	100
SPE/Au6	0.05	500

5.3.2.4 Caracterización de los electrodos modificados SPE/AuNPs.

Los electrodos modificados con AuNps fueron caracterizados superficialmente de forma cualitativa mediante microscopia electrónica de barrido (SEM). Asimismo, de forma cuantitativa se utilizó el software *Image J 1.52a* para estudiar el tamaño de partícula, la densidad de partícula y el porcentaje de recubrimiento en un área de $7.55 \mu\text{m}^2$ de la superficie analizada por SEM. El error fue calculado tomando tres zonas diferentes de cada micrografía. Además, se utilizaron los voltamperogramas y cronoamperogramas de síntesis correspondientes de cada método para determinar la carga acumulada y masa depositada de oro.

5.3.2.5 Selección del método de síntesis de AuNPs para la construcción del biosensor.

En esta actividad, se estudió las condiciones seleccionadas de cada método de síntesis de AuNPs con la inmovilización de 10 nM de sonda de aptámero tiolado durante 1h. Una vez modificado los electrodos se tiene la conformación de los biosensores (el transductor más el receptor). Posteriormente, se realizó la evaluación con la detección de 30 nM de sonda complementaria durante 1h. Finalmente, se seleccionó el método de síntesis de AuNPs para las siguientes etapas.

5.3.2.6 Definición de las condiciones de inmovilización del receptor.

- **Optimización de la concentración**

Para la optimización de la concentración de aptámero tiolado, se evaluó el rango entre 10 nM a 1000 nM de sonda de aptámero tiolado con el fin de encontrar su punto de saturación.

Para asegurar la inmovilización de la sonda sobre las AuNPs por el método de quimisorción se empleó el agente reductor DTT.

Para que ocurra la reducción del enlace disulfuro del aptámero tiolado se debe guardar una relación de concentración molar ADN:DTT de 1:10 y aplicar un tiempo de incubación de 1h (Liang, Canoura, Yu, Alkhamis, & Xiao, 2018; Sigmaaldrich, 2018; Jinping Wang et al., 2017).

- **Tiempo de inmovilización**

Los tiempos de inmovilización estudiados fueron 2, 4 y 16h.

- **Inmovilización de Mercaptohexanol (MCH)**

Una vez se realizó la inmovilización de la sonda tiolada, se adicionó al electrodo una solución de mercaptohexanol que permitió la reorientación de las sondas y bloqueo de especies inespecíficas. Como pruebas preliminares se estudió la concentración del MCH con ADN, a partir de la relación molar ADN:MCH 1:1000 (Gao, Zhang, Guo, Qi, & Zhang, 2011; Luo et al., 2013) con un tiempo de inmovilización de 1h (Ver Anexo B). De lo anterior, se definió el tiempo de inmovilización y se estudiaron más relaciones ADN:MCH mostrados en la Tabla8.

Tabla 8
Variación de la relación ADN:MCH

Muestra	Relación ADN:MCH
1	1:100
2	1:10
3	1:1
Volumen de la solución inmovilizada: 5 µL	
Tiempo de Inmovilización: 5 min	

- **Detección de la sonda complementaria: Hibridación.**

Para la detección del ADN objetivo o sonda complementaria, se sumergió el biosensor bajo una solución tampón de PBS 0.1 M pH 7.4 con 5 mM de $MgCl_2$ a una concentración determinada de la sonda de ADN complementario. Esta solución se empleó debido a que el $MgCl_2$ otorga estabilidad a las hebras de ADN formadas y permite mayor estabilidad por más tiempo (Špringer, Šípová, Vaisocherová, Štěpánek, & Homola, 2010). Cada muestra se dejó durante 35 min a temperatura ambiente. Después se realizó un lavado con agua para remover el ADN complementario no hibridado y finalmente un secado con flujo de nitrógeno.

5.3.3 Caracterización electroquímica del biosensor construido.

Definidas las condiciones para el diseño del biosensor, cada modificación del electrodo se estudió por las técnicas de voltamperometría cíclica (CV), voltamperometría de onda cuadrada (SWV) y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS).

En el caso de las técnicas voltamperométricas, para los voltamperogramas cíclicos se analizó los cambios de intensidad de corriente y el delta de potencial entre los picos característicos por cada modificación del electrodo.

Para los voltamperogramas de onda cuadrada se analizaron los cambios en la intensidad de corriente, normalizando los valores con la siguiente ecuación:

$$\Delta I = \frac{I_0 - I}{I_0} \quad (E.5.1)$$

Donde,

I_0 = Valor de intensidad de corriente máxima de la señal anterior a la detección de sonda complementaria.

I = Valor de intensidad de corriente máxima de la señal después de la detección de la sonda complementaria.

Por otro lado, los resultados fueron presentados en densidad de corriente, dado que se utilizaron dos áreas diferentes del electrodo de trabajo (1mm y 3 mm).

Para complementar los análisis de las técnicas voltamperométricas se empleó la técnica EIS, la cual permitió establecer los cambios en las propiedades de la superficie del electrodo, mediante una relación entre la impedancia real Z' contra la impedancia imaginaria Z'' utilizando los diagramas de Nyquist. Para la interpretación de los diagramas de Nyquist fue necesario seleccionar un modelo eléctrico apropiado que se ajuste a los datos experimentales, proporcionando información específicamente de la resistencia a la transferencia de carga, que es el parámetro relacionado con las modificaciones realizadas al electrodo.

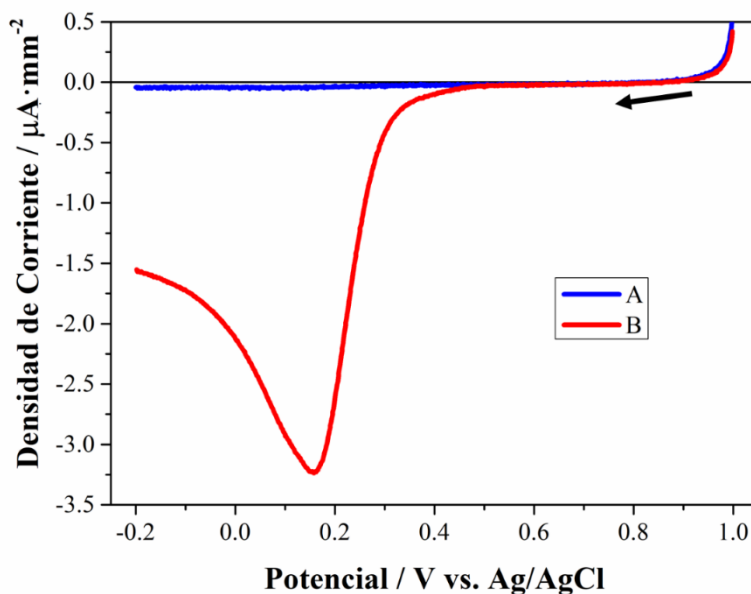
5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Síntesis de AuNPs.

5.4.1.1 Potencial de reducción de Au.

Figura 14.

Voltamperogramas lineales de A) 0.5 M de H_2SO_4 , B) 1 mM de $HAuCl_4$ en 0.5 M de H_2SO_4 para la síntesis de AuNPs



Nota. Velocidad de barrido 50 mVs⁻¹

Inicialmente se determinó el potencial de reducción de oro a partir de una voltamperometría lineal como se muestra en la Figura 14, con un rango de potencial entre +1.0 a -0.2 V (La flecha indica el sentido del barrido, el cual se dio de la misma forma en los voltamperogramas cíclicos posteriores). Se pueden observar dos voltamperogramas lineales, uno en solución de H_2SO_4 como electrolito (A), mientras que el otro contiene 1 mM de $HAuCl_4$ (B), donde se forma un pico catódico en el valor de potencial de 0.2 V vs Ag/AgCl debido a la reducción de Au(III) a Au(0) (Etesami et al., 2011). De acuerdo con este resultado, la aplicación de potenciales más negativos que +0.2 V favorecerán termodinámicamente la reducción del precursor de oro y, por tanto, la electrodeposición de nanopartículas de oro sobre el electrodo

de trabajo. Con base en este resultado se evaluaron diferentes condiciones para la síntesis de AuNPs por voltamperometría cíclica y cronoamperometría.

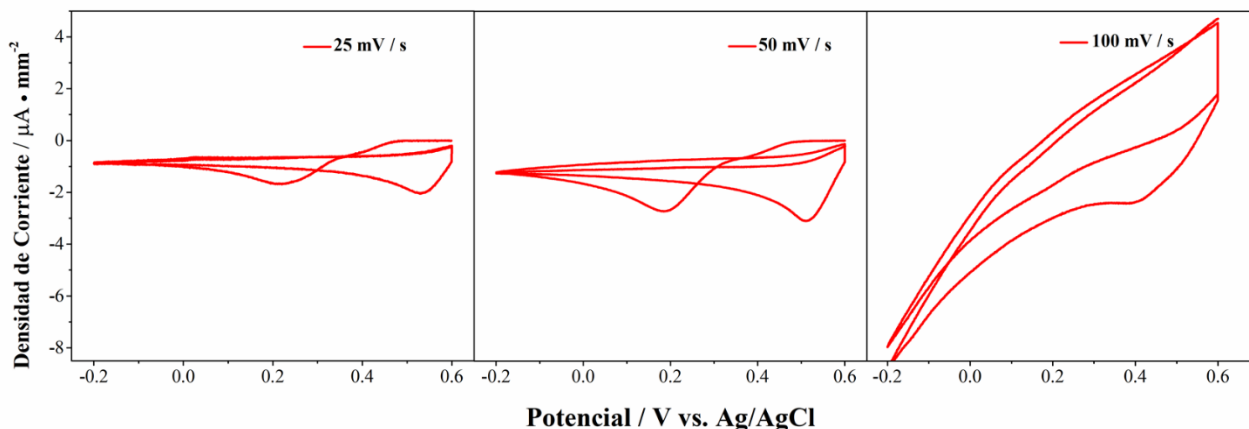
5.4.1.2 AuNps sintetizadas por voltamperometría cíclica.

- Velocidad de barrido

En este caso se puede observar que existe una dependencia directa entre la velocidad de barrido empleada y la corriente que se alcanza (Ver Figura 15). Esto ocurre debido a que la capa de difusión que se forma sobre la superficie del electrodo crecerá más lejos para velocidades de barrido lento comparado con las de barrido rápido (Biotechnology, 2013). En el caso de la velocidad de barrido de 25 mV/s, se alcanza una intensidad de corriente más baja que los voltamperogramas con velocidad de barrido de 50 y 100 mV/s. Sin embargo, al aplicar una velocidad de barrido alta, se afecta el proceso de reacción del electrodo-electrolito, debido a que no existe mayor interacción en esta interfaz (Elgrishi et al., 2018) y como consecuencia no se definieron los picos de reducción. Por lo tanto, se seleccionó la condición de 50 mV/s para los experimentos posteriores.

Figura 15.

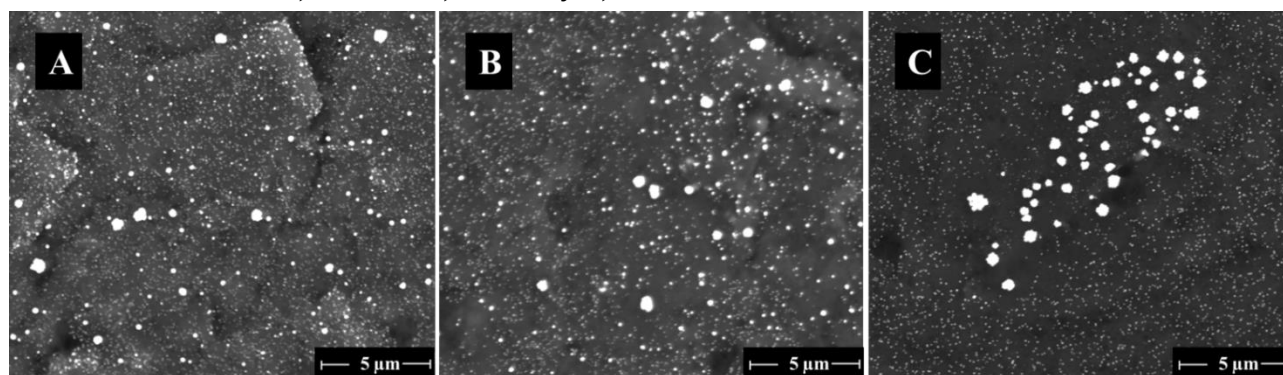
Voltamperogramas cíclicos variando la velocidad de barrido a A) 25 mV/s, B) 50 mV/s y C) 100 mV/s; en 1 mM de HAuCl_4 con 0.5 M de H_2SO_4 para la síntesis de AuNPs



En la Figura 16 se presenta las micrografías SEM de las nanopartículas de oro obtenidas por la variación de la velocidad de barrido. Para la condición de 25 mV/s la cantidad de nanopartículas es menor que en los otros casos. Cabe resaltar que la variedad de tamaños de las nanopartículas se relaciona con lo analizado en los voltamperogramas, puesto que a 100 mV/s se tiene menor homogeneidad.

Figura 16.

Micrografías SEM (12000X) de las AuNPs obtenidas por voltamperometría cíclica variando la velocidad de barrido a A) 25 mV/s, B) 50 mV/s y C) 100 mV/s; en 1 mM de HAuCl_4 con 0.5 M de H_2SO_4

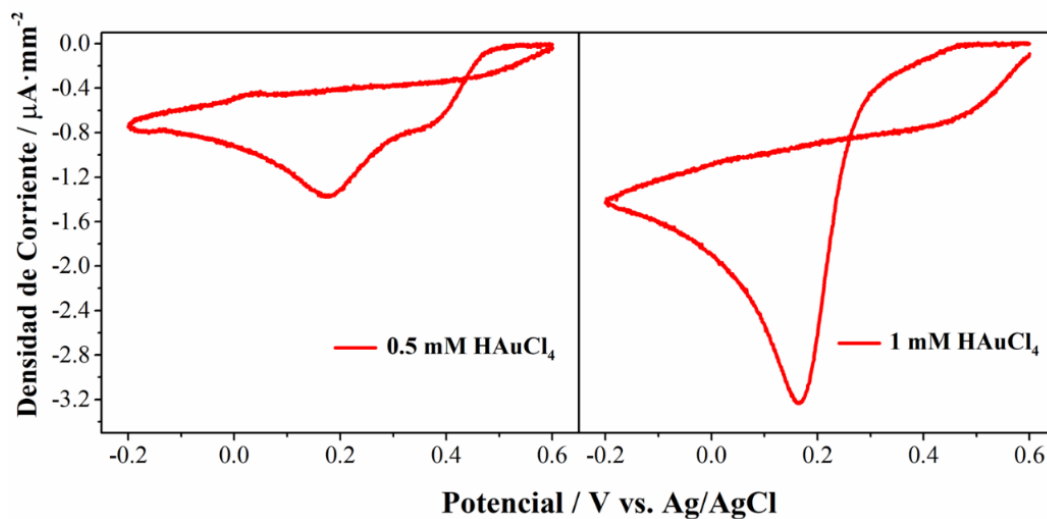


- Concentración

En cuanto al estudio de la concentración se encontró en los voltamperogramas (Ver Figura 17), una relación directamente proporcional entre la concentración del precursor de oro y la intensidad de corriente del potencial de reducción. Lo anterior cumple con las leyes de Faraday de la electrólisis, que consiste en que la cantidad de sustancia depositada a la superficie de un electrodo es consecuencia de cambios electroquímicos producidos por la cantidad de energía eléctrica involucrada, relacionados de forma directamente proporcional (Barker & Walsh, 1991). Con las concentraciones estudiadas de 0.5 mM y 1 mM se obtuvo las densidades de corriente -1.4 y $-3.2 \mu\text{A}\cdot\text{mm}^{-2}$ respectivamente. Por otro lado, las micrografías complementan el resultado, que, a menor densidad de corriente, hay menor cantidad de nanopartículas con menor tamaño (Ver figura 18).

Figura 17.

Voltamperogramas cíclicos variando la concentración a A) 0.5 mM y B) 1 mM del precursor HAuCl_4 con 0.5 M de H_2SO_4 para la síntesis de AuNPs

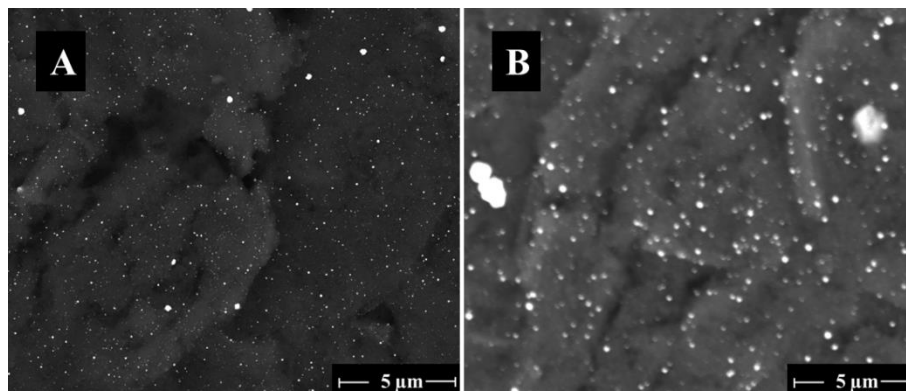


Nota. Velocidad de barrido 50 mV/s

Según la literatura se pueden aplicar concentraciones del precursor de oro desde 0.1 a mayores de 45 mM para la síntesis de AuNps (Hezard, Fajerweg, Evrard, Vincent, et al., 2012; Tonelli et al., 2019; G. Zhao & Liu, 2019). Sin embargo, se encontró que las concentraciones empleadas del precursor de oro para el diseño de biosensores van entre 0.5 a 5 mM (Hartati, Suryani, Agustina, Gaffar, & Anggraeni, 2019; Jie Wang et al., 2010; L. Wang et al., 2011). Por esta razón se analizó las dos concentraciones mencionadas y se seleccionó la concentración de 1 mM de HAuCl_4 que favorece mayor formación de núcleos de oro y cantidad de nanopartículas (Etesami et al., 2011).

Figura 18.

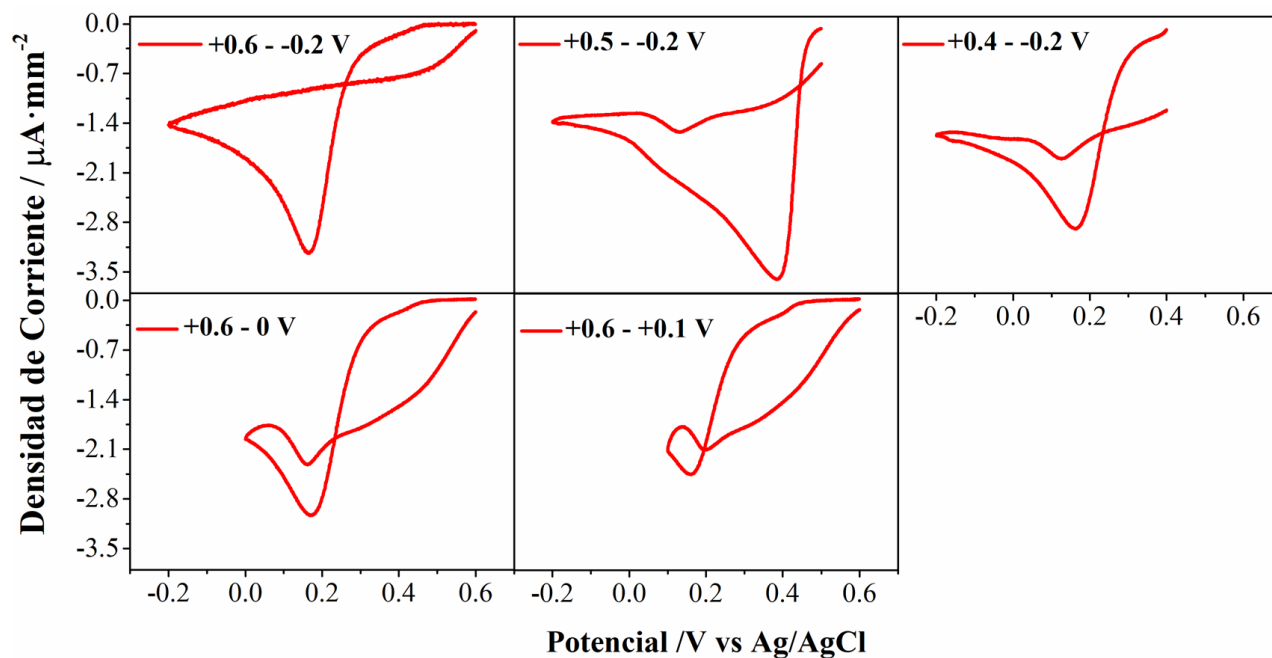
Micrografías SEM (a 12000X) de las AuNPs obtenidas por voltamperometría cíclica variando la concentración a A) 0.5 mM y B) 1 mM del precursor HAuCl_4 con 0.5 M de H_2SO_4

**- Rango Potencial**

Al analizar la variación del rango de potencial para la síntesis de AuNps, en la Figura 19 se puede observar como el pico catódico se desplaza a un determinado potencial generalmente cercano a +0.2 V, excepto en la condición de +0.5 a -0.2 V vs Ag/AgCl cuando se reduce el potencial inicial a 0.5 V. También, se observó una intersección con el barrido de reversa de los voltamperogramas, debido a la termodinámica y cinética de la reacción de la formación del oro, puesto que se requerirá menos energía en el electrodo modificado, comparado al electrodo inicial que estaba conformado de grafito (Grujicic & Pesic, 2002).

Figura 19.

Voltamperogramas cíclicos variando el rango de potencial entre A) +0.6 - -0.2 V, B) +0.5 - -0.2 V, C) +0.4 - -0.2 V, D) +0.6 - -0 V y E) +0.6 - +0.1 V; en 1 mM de HAuCl_4 con 0.5 M de H_2SO_4 para la síntesis de AuNPs

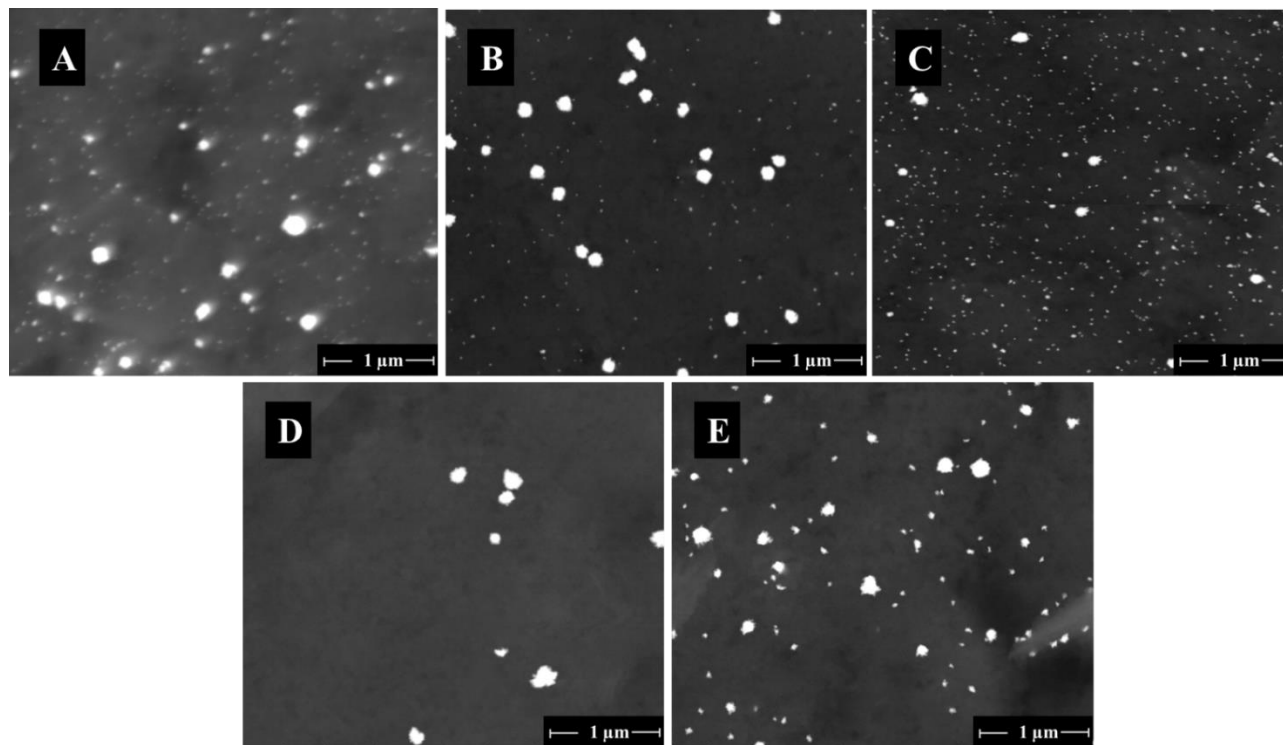


Nota. Velocidad de barrido 50 mV/s

En cuanto a los resultados de las micrografías SEM para estas condiciones (Ver Figura 20 A-E), se puede observar que al fijar el potencial final en -0.2 V (A-C) se forma mayor cantidad de AuNPs, mientras que al fijar el potencial inicial +0.6 V (D-E) la cantidad de AuNPs se ve reducida. Por lo tanto, para este trabajo se seleccionó el rango entre +0.6 a -0.2 V como posible mejor condición para la síntesis de AuNPs aplicado en el diseño de biosensores.

Figura 20.

Micrografías SEM (a 50000X) de las AuNPs obtenidas por voltamperometría cíclica variando el rango de potencial entre A) +0.6 - -0.2 V, B) +0.5 - -0.2 V, C) +0.4 - -0.2 V, D) +0.6 - 0 V y E) +0.6 - +0.1 V; en 1 mM de HAuCl_4 con 0.5 M de H_2SO_4

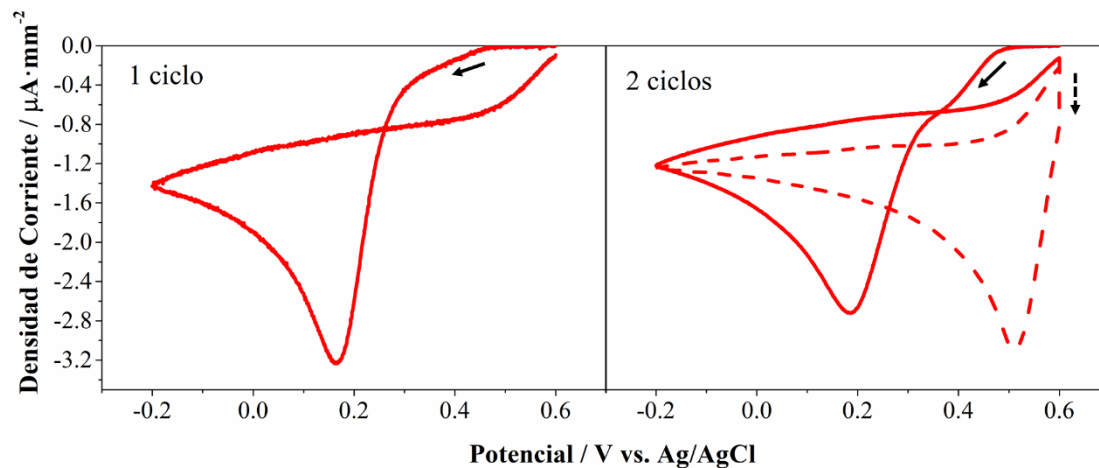


- **Número de ciclos y condiciones seleccionadas para la aplicación en biosensores.**

Finalmente, como último parámetro por analizar de la síntesis de AuNPs por voltamperometría cíclica, se estudió el número de ciclos del potencial de barrido (Ver Figura 21). En el voltamperograma con dos ciclos de barrido, en el barrido inicial se tiene que el pico de reducción ocurre a +0.2 V y el segundo se desplaza a un potencial de +0.5 V, lo que indica que la segunda deposición ocurre sin el mismo requerimiento de energía debido a la modificación del electrodo en el primer barrido. En un estudio realizado por Hezard y colaboradores (Hezard, Fajerweg, Evrard, Vincent, et al., 2012), este comportamiento coincide, pero con potenciales de reducción del oro de 0.48 V para el primer barrido y 0.78 V para el segundo.

Figura 21.

Voltamperogramas cíclicos variando el número de ciclos del potencial de barrido a A) 1 ciclo y B) 2 ciclos; en 1 mM de HAuCl_4 con 0.5 M de H_2SO_4 para la síntesis de AuNPs



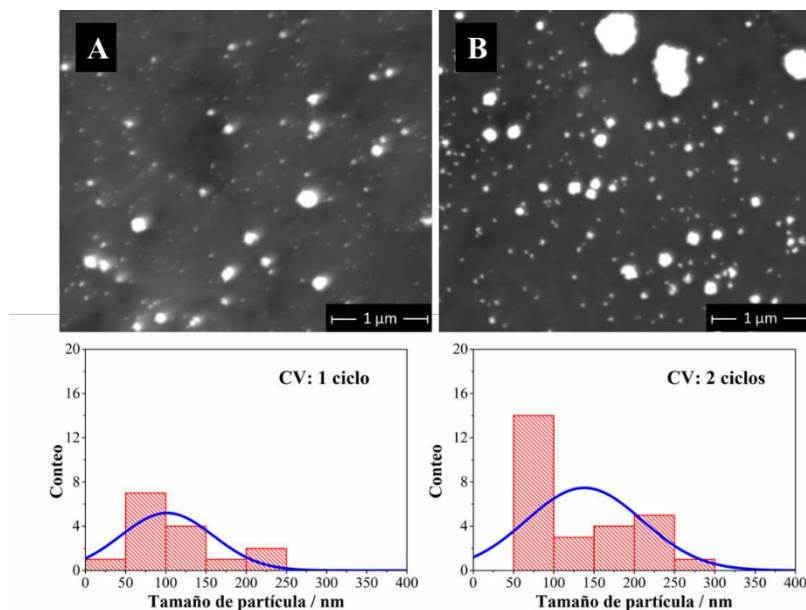
Nota. Velocidad de barrido 50 mV/s

En cuanto a las micrografías SEM (Ver Figura 22) se observó dos tamaños de nanopartículas en ambos casos. Es decir, en el primer ciclo ocurrió la formación de una cantidad de núcleos que en los ciclos posteriores van a crecer más o aumentan su tamaño por aglomeración de las mismas a causa del fenómeno de coalescencia (Arcidiacono, Bieri, Poulikakos, & Grigoropoulos, 2004).

Además, se presenta un histograma correspondiente a cada micrografía que relaciona el tamaño promedio de partícula. De esta manera, se seleccionaron estas condiciones para una caracterización que permitió comparar las nanopartículas de oro obtenidas por cronoamperometría y su posterior evaluación en la inmovilización de aptámeros tiolados.

Figura 22.

Micrografías SEM (a 50000X) de las AuNPs obtenidas por CV variando el número de ciclos del potencial de barrido a A) 1 ciclo y B) 2 ciclos; en 1 mM de HAuCl_4 con 0.5 M de H_2SO_4



Nota. Histogramas de la distribución de tamaño de partícula de las AuNPs de las micrografías SEM tomados a partir de un área de $7,55 \mu\text{m}^2$ respectivamente

5.4.1.3 AuNPs sintetizadas por cronoamperometría (CA).

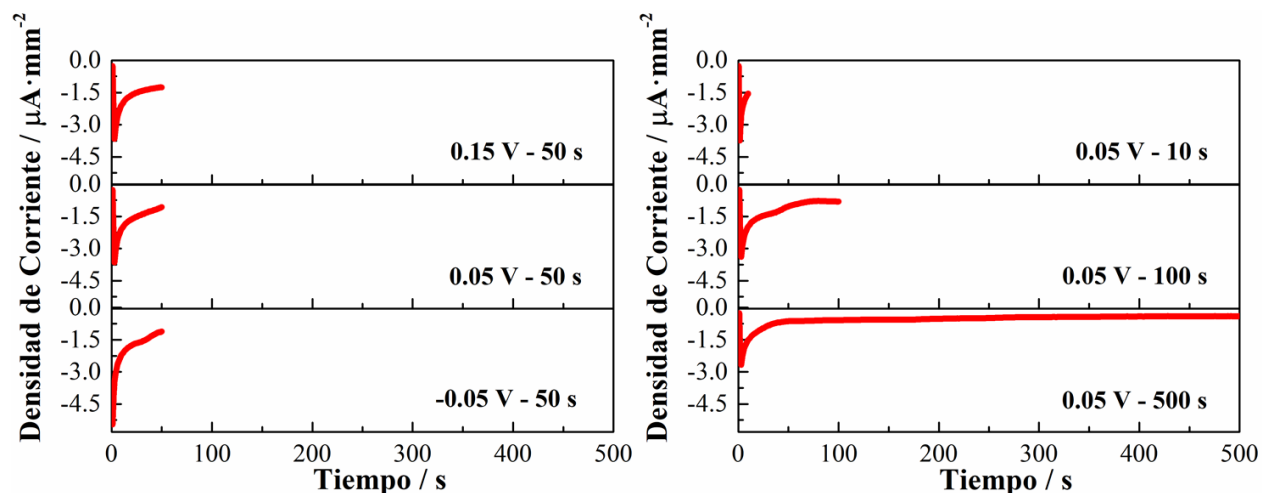
La síntesis de las nanopartículas de oro por cronoamperometría consistió en la variación del potencial de electrodeposición a un tiempo constante de 50 s; y simultáneamente la variación del tiempo de electrodeposición a un potencial constante de +0.05 V (Ver Figura 23). En todos los cronoamperogramas se ve una tendencia a alcanzar una corriente catódica de $-1 \mu\text{A}\cdot\text{mm}^{-2}$, debido a que todos fueron preparados a la misma concentración del precursor de oro.

Para la variación del potencial de electrodeposición, a -0,05 V la condición tiene un comportamiento diferente al de otros cronoamperogramas, comenzando con el crecimiento de una corriente catódica. Esto se debe a que posiblemente esta condición tiene mayor energía, mientras que, las demás necesitan una modificación en la superficie del electrodo antes de que aparezca la corriente catódica. Por otra parte, al aumentar el tiempo de electrodeposición los

cronoamperogramas alcanzaron una mayor área bajo la curva relacionada con la cantidad de carga acumulada.

Figura 23.

Cronoamperogramas variando el potencial y tiempo de electrodeposición en 1 mM de HAuCl_4 con 0.5 M de H_2SO_4 para la síntesis de AuNps



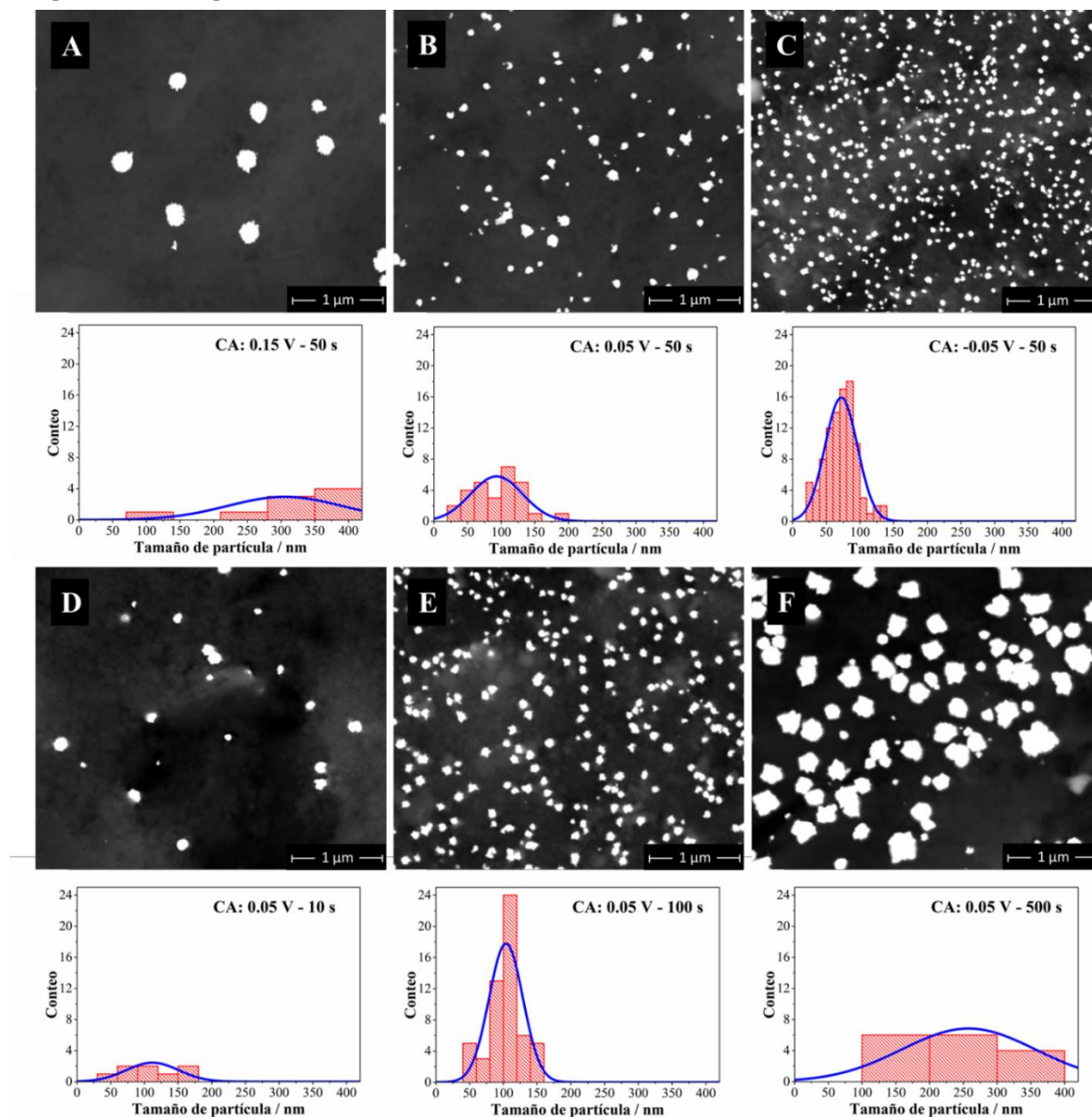
En las micrografías de SEM obtenidas por CA se puede observar más homogeneidad en el tipo de nanopartículas (Ver Figura 24), comparadas con las de voltamperometría cíclica. Esto se debe a que en la CA se aplica un potencial fijo, mientras que en la CV se empleó un rango de potencial.

Respecto al efecto del potencial de electrodeposición, se encuentra que para aplicar un potencial de reducción mayor ($-0,05\text{ V}$), la cantidad de AuNPs formados aumenta y su tamaño disminuye. En cuanto al tiempo de electrodeposición, se conserva una relación directamente proporcional con la cantidad de AuNPs. Sin embargo, la morfología de las nanopartículas se ve afectada cuando se aplica un tiempo de electrodeposición prolongado, presentando nanopartículas más grandes para la condición de 500 s, diferentes a los demás tiempos. Esto se debe a que para tiempos prolongados de síntesis deja de ocurrir la formación de núcleos y se favorece es el aumento de los que ya existen (Hezard, Fajerweg, Evrard, Collière, et al., 2012).

Además, se muestran histogramas correspondientes a cada micrografía que relaciona el tamaño promedio de partícula (Dudin, Unwin, & Macpherson, 2010). Esto permitió hacer una caracterización para comparar las nanopartículas de oro obtenidas por voltamperometría cíclica y su posterior evaluación en la detección de ADN para las condiciones presentadas.

Figura 24.

Micrografías SEM (a 50000X) de AuNps obtenidas por cronoamperometría variando el potencial y tiempo de electrodeposición en 1 mM de HAuCl_4 con 0.5 M de H_2SO_4



Nota. Histogramas de la distribución de tamaño de partícula de las AuNPs de las micrografías SEM

tomados a partir de un área de $7,55 \mu\text{m}^2$ respectivamente

5.4.2 Caracterización de AuNps.

A continuación, se presenta una caracterización de las AuNPs resumido en la Tabla 9. Los parámetros del diámetro promedio, densidad de partícula y porcentaje de recubrimiento fueron calculados mediante una distribución del tamaño de diámetro en los histogramas de cada micrografía SEM (Ver figura 22 y 24). Las nanopartículas obtenidas por CA fueron más homogéneas y definidas con tamaños entre 80 y 250 nm. Para un potencial de -0.05 V se encuentran las de menor tamaño.

Por otro lado, la densidad de partícula más alta fue dada para valores de potencial de reducción mayor (-0.05V), mientras que la densidad de partícula es menor cuando se tiene mayor tiempo de deposición (500 s). En contraste, el porcentaje de recubrimiento para la condición $+0.05 \text{ V}$ y 500s indicó que hubo mayor área de tamaño de partícula cubriendo el área de la superficie.

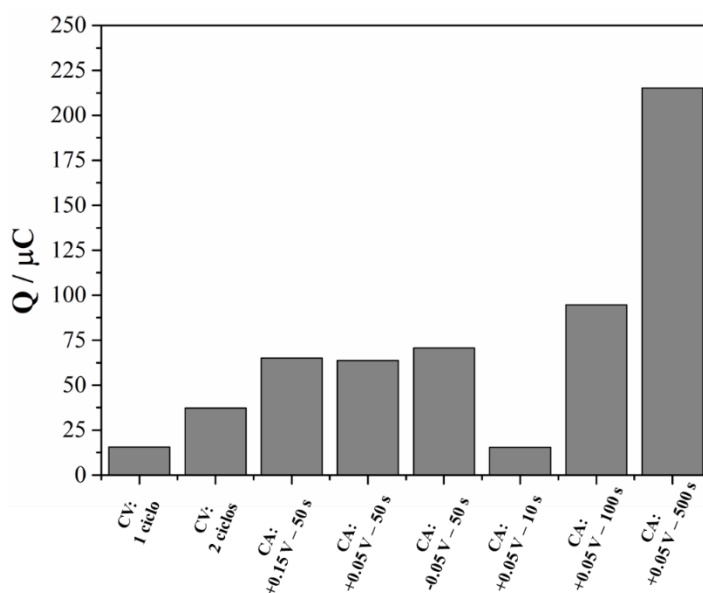
Tabla 9
Caracterización de las AuNps seleccionadas de cada método para la inmovilización de aptámeros

Condición de la muestra	Diámetro promedio [nm]	Densidad de partícula [μm^{-2}]	Masa [ng]	Porcentaje de recubrimiento [%]
0.15 V / 50 s	126.96 ± 12.50	1.05 ± 0.58	88.39	2.55 ± 0.39
0.05 V / 50 s	$116,98 \pm 14.88$	$3.74 \pm 0,58$	86.59	$3.16 \pm 1,08$
-0.05 V / 50 s	82.84 ± 11.33	16.48 ± 1.96	96.09	7.42 ± 0.81
0.05 V / 10 s	125 ± 11.55	0.9357 ± 0.42	21.08	1.81 ± 0.36
0.05 V / 100 s	109.86 ± 17.95	7.88 ± 0.75	128.72	6.59 ± 0.56
0.05 V / 500 s	246.07 ± 97.00	2.39 ± 0.5	292.76	17.15 ± 2.63
+0.6 - -0.2 V / 1 ciclo	137.39 ± 64.18	4.21 ± 2.84	22.31	3.44 ± 1.81
+0.6 - -0.2 V / 2 ciclos	197.05 ± 81.43	5.05 ± 1.69	50.55	4.26 ± 1.56

Adicionalmente, en la tabla se presenta la masa de partícula que se obtuvo a partir de la carga acumulada (Ver Figura 25), la cual se calcula por medio de las áreas bajo la curva tanto de los voltamperogramas como de los cronoamperogramas. Encontrándose que, al aumentar el número ciclos y mayor tiempo de electrodeposición se tiene un aumento de masa, en cada método respectivamente.

Figura 25.

Diagrama de barras que relaciona la carga acumulada del Au electrodepositado



5.4.3 Selección del método de síntesis de AuNPs para la construcción del biosensor.

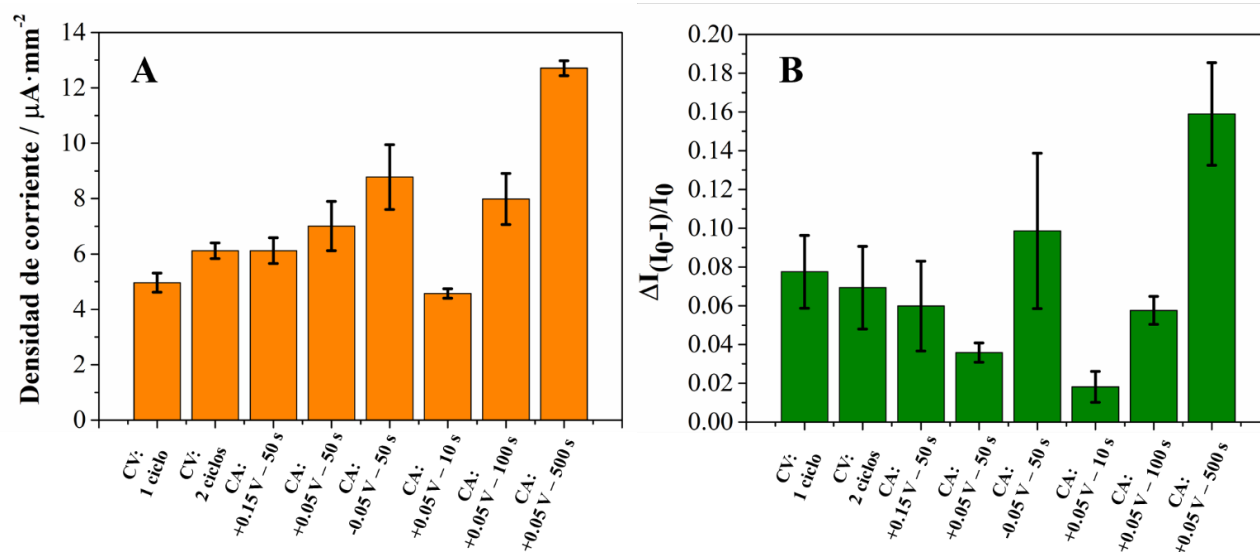
A partir de las condiciones de la Tabla 9, se llevó a cabo una caracterización electroquímica con la cupla redox del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ para evaluar las intensidades máximas de corriente mediante de SWV de electrodos modificados con nanopartículas de oro (Figura 26-A) y su prueba de detección de ADN complementario (Figura 26-B).

Para las condiciones, a -0,05 V con 50 s, y +0,05 V con 500 s se encontraron los picos de corriente más altos de 6,8 μA y 9,9 μM, respectivamente, lo que es atribuido a una mayor conductividad de corriente por el aumento del área electroactiva de las superficies.

Respecto a las medidas de detección, la respuesta electroquímica se calculó con la ecuación (E.5.1), que indica el cambio de corriente normalizado entre la señal de la sonda de ADN complementaria y la señal anterior. De ello se puede interpretar que en el método de CA existe una tendencia de crecimiento de la respuesta electroquímica para la variación del tiempo de detección, pero no para la variación del potencial de electrodeposición; mientras que en el CV también ocurre una disminución de la respuesta electroquímica con el aumento del número de ciclos. Por lo anterior, a las condiciones $-0,05$ V con 50 s, y $+0,05$ V con 500 s, las nanopartículas de oro pueden amplificar la señal tanto para inmovilizar más aptámero tiolado como para detectar más ADN complementario.

Figura 26.

Evaluación de A) Intensidad de corriente máxima de SWV y B) Detección de ADN complementario de cada electrodo modificado con AuNps a las condiciones de A) 0.15 V – 50 s, B) 0.05 V – 50 s, C) $-0,05$ V – 50 s, D) 0.05 V – 100 s, E) 1 ciclo y F) 2 ciclos



Nota. Medidas realizadas usando 10 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Concentración de la sonda complementaria 30 nM. Valores de voltametría de onda cuadrada a una amplitud de 50 mV, frecuencia de 10 Hz y Paso de potencial 5 mV

Finalmente, se seleccionó la condición de $+0,05$ V con 500 s, por las ventajas discutidas anteriormente, la cual se aplicó en los siguientes resultados del biosensor.

5.4.4 Evaluación del área electroactiva y la conductividad.

Se estudió el área superficial y la conductividad del electrodo antes (izquierda) y después de ser modificado con AuNps (derecha) como se puede ver la en la Figura 27, respectivamente. La conductividad y tipo de transporte se determinó mediante los voltamperogramas cíclicos aplicando diferentes velocidades de barrido, y se calculándose el área electroactiva con la ecuación de Randles- Sevcik (Bard & Faulkner, 2001).

$$I_p = 0.446nFAC^0 \left(\frac{nFvD_0}{RT} \right)^{0.5}$$

Si la solución es a 25 °C:

$$I_p = 2.69 \times 10^5 \cdot n^{\frac{3}{2}} \cdot A \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot C \cdot v^{\frac{1}{2}}$$

Donde,

<i>I_p</i> = Intensidad de corriente máxima = [A]	<i>C</i> = Concentración de la especie electroactiva = [mol·cm ³]
<i>n</i> = Número de electrones transferidos en eventos redox (<i>n</i> =1 para Fe ^{+2/+3})	<i>v</i> = Velocidad de barrido V/s
<i>A</i> = Área superficial del electrodo = [cm ²]	<i>R</i> = Constante de los gases J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹
<i>F</i> = Constante de Faraday = [C·mol ⁻¹]	<i>T</i> = Temperatura = [K]
<i>D</i> = Coeficiente de difusión de la cupla redox (<i>D</i> =7.6×10 ⁻⁶ cm ² ·s ⁻¹)	

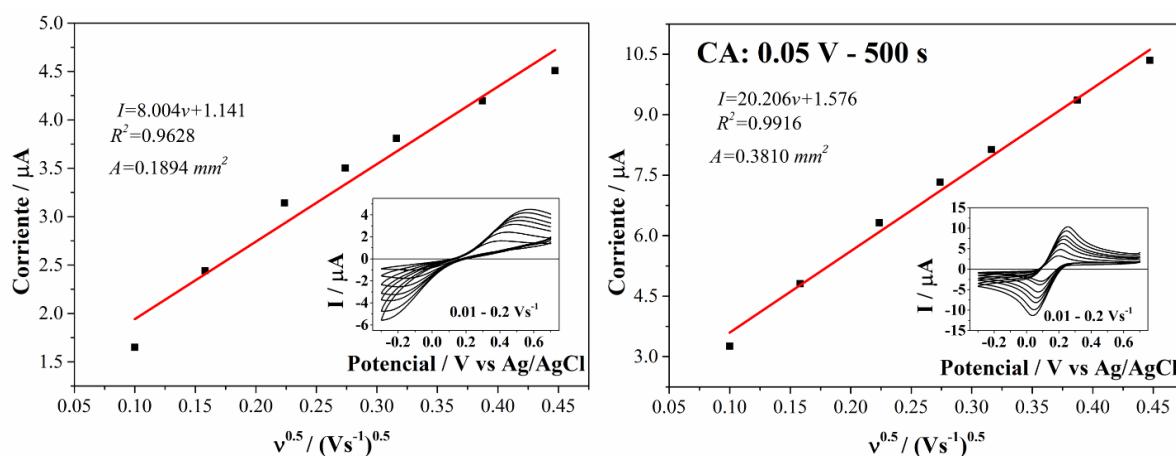
También se puede observar en la Figura 27, las corrientes anódicas de los picos característicos (*I_p*) del electrodo sin modificar y el electrodo modificado con AuNPs, los cuales son proporcionales a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. Linealizado estos

datos se corrige el factor de correlación, debido a las propiedades conductoras que las AuNPs le otorgan al electrodo, resultando un sistema de transporte difusivo (Elgrishi et al., 2018).

Por otra parte, con los parámetros constantes de D , C y n en la ecuación de Randles-Sevcik, se obtuvo los valores aproximados 0.1894 mm^2 y 0.3810 mm^2 correspondientes al área electroactiva, aumentando el área del electrodo modificado con AuNPs aproximadamente dos veces al valor del área del electrodo sin modificaciones. De esta manera, se evidenció el efecto de las AuNPs en la conductividad y área superficial electroactiva del electrodo.

Figura 27.

Relación lineal de la intensidad del pico anódico redox versus la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de un electrodo serigrafiado A) Sin modificar y B) modificado con AuNPs



Nota. Medidas realizadas usando $10 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en 0.1 M KCl medido a diferentes velocidades de barrido desde 10 hasta 200 mVs^{-1} . Las imágenes insertadas muestran los voltamperogramas cíclicos utilizados para la variación de la velocidad de barrido

5.4.5 Optimización de los parámetros del biosensor.

5.4.5.1 Concentración y tiempo de inmovilización del receptor.

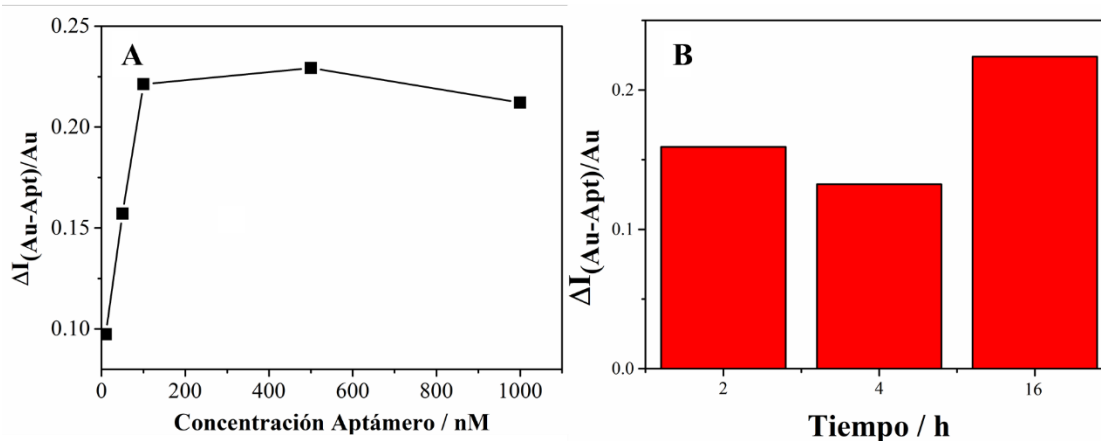
Con el fin de mejorar las condiciones de inmovilización en la construcción del biosensor, se determinó el tiempo y concentración del aptámero tiolado.

Diferentes concentraciones de la sonda de aptámero tiolado fueron empleadas (10, 50, 100, 500 y 1000 nM) en la inmovilización, dejándolas durante 16h (toda la noche) para encontrar el punto de saturación (Ver Figura 28-A). Es decir, se halló la concentración donde los cambios no son tan significativos en las medidas de voltamperometría de onda cuadrada, entre la intensidad de corriente del electrodo modificado con oro y el electrodo con aptámero tiolado inmovilizado.

A partir de concentraciones de 100 nM se encontró que no hay cambios significativos en el delta corriente. Sin embargo, en 500 nM se obtuvo el valor óptimo, el cual se utilizó para los experimentos posteriores en la construcción de los biosensores.

Figura 28.

Resultados de la respuesta de los cambios de corriente $\Delta I = (I_{Au} - I_{apt})/I_{Au}$ después de la inmovilización de aptámero tiolado sobre electrodos modificados con AuNPs en medidas de SWV de aptámero tiolado a A) diferentes concentraciones y B) diferentes tiempos de inmovilización



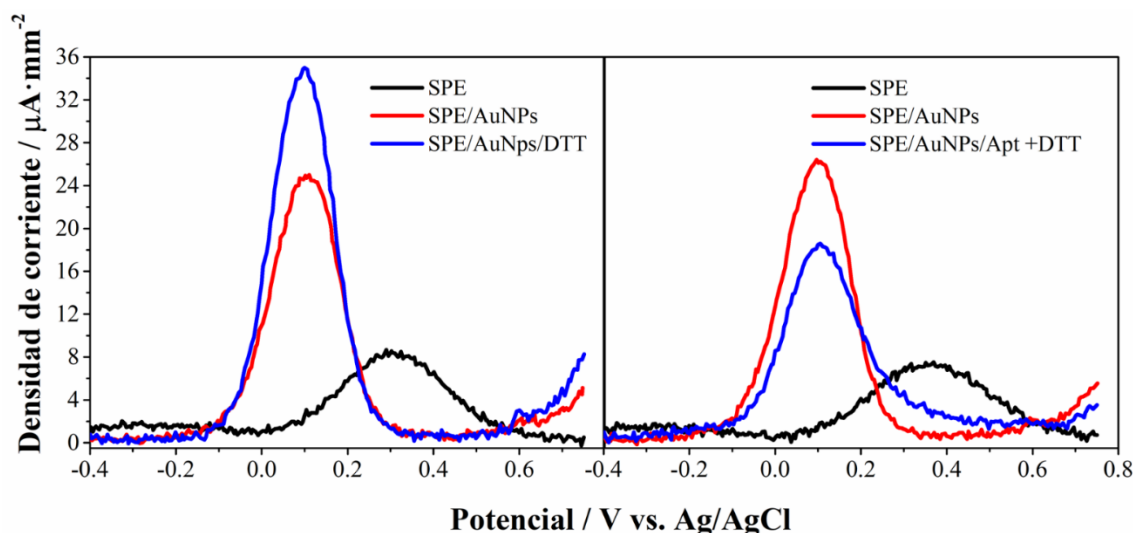
Nota. Medidas realizadas usando 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Condiciones de trabajo de 50 mV de amplitud de 50, 10 Hz de f y 5 mV paso de potencial

Se evaluó el tiempo de inmovilización del aptámero (2,4 y 16 h), puesto que se había dejado toda la noche según lo reportado en la literatura para este análisis (Ver Figura 28-B). Encontrándose en los resultados, que para tiempos de 2h y 4h no se alcanza la respuesta de los cambios de corriente obtenidos a un tiempo de 16 h, corroborándose así esta condición.

Para asegurar la inmovilización por el grupo tiol de los aptámeros con las nanopartículas de oro, se empleó DTT como agente reductor. En la Figura 29 se presenta dos gráficas de voltamperogramas de onda cuadrada con medidas del electrodo sin modificar (negro), modificado con oro (rojo) y después de inmovilizar el aptámero tiolado. El gráfico del lado izquierdo se empleó como blanco de referencia utilizando solo DTT en solución para la etapa de inmovilización, mientras que el gráfico del lado derecho si contiene presencia del ADN. De esto se observó, que en el caso del electrodo con presencia de aptámero tiolado, ocurre una disminución de la señal de corriente, debido a la repulsión de cargas negativas entre los fosfatos que conforma la cadena de ADN y la cupla redox del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (C. Wang et al., 2013; Wu, Gao, He, Chang, & Xu, 2013).

Figura 29.

Voltamperogramas de onda cuadrada (SWV) para la comprobación de la inmovilización de 500 nM de aptámero tiolado sobre electrodos modificados con Au (curva roja). A la izquierda SWV utilizando solo DTT en la solución (actuando como blanco) y a la derecha SWV utilizando DTT + Aptámero tiolado



Nota. Medidas realizadas usando 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Las medidas fueron realizadas a las condiciones de 50 mV de amplitud de 50, 10 Hz de frecuencia y 5 mV paso de potencial

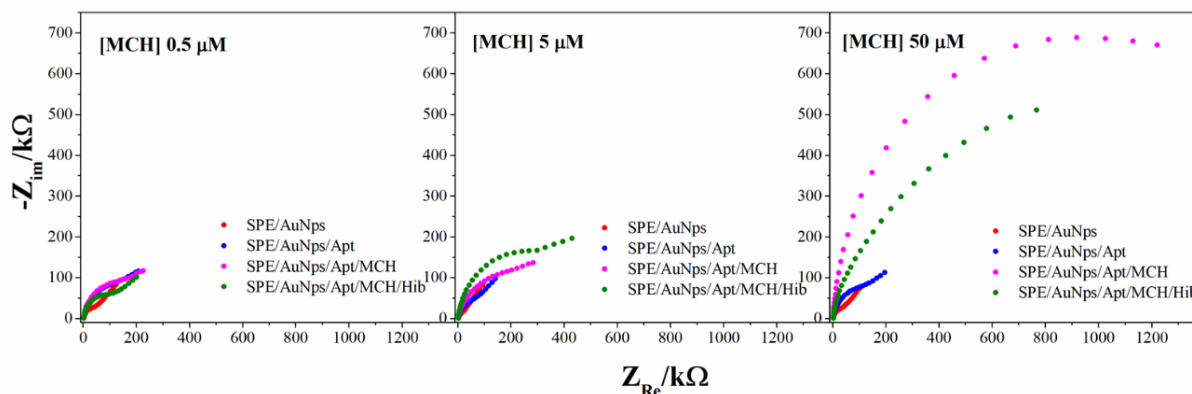
5.4.5.2 Inmovilización de Mercaptohexanol (MCH).

Se estudió la concentración a emplear de MCH, con valores de 50, 5 y 0.5 μM como se ilustra en los diagramas de Nyquist de EIS en la Figura 30 (La caracterización con CV y SWV se encuentra en el Anexo B). Se hizo un análisis cualitativo de los cambios en los semicírculos por cada modificación del electrodo, modificado con AuNps (SPE/AuNps), con Aptámero tiolado (SPE/AuNps/Apt) y con MCH (SPE/AuNps/Apt/MCH). En teoría cada modificación del semicírculo debe aumentar, ya que el eje x indica la resistencia a la transferencia de carga (Keighley et al., 2008).

Se observó que a la concentración de 0.5 μM de MCH la respuesta no cambia con respecto a la medida anterior, por lo que no hubo efecto relacionado del reactivo. Para la concentración de 50 μM se obtuvo un semicírculo muy grande, lo que puede estar siendo un exceso de MCH sobre la superficie que la bloquea completamente, siendo un problema a la hora de detectar la sonda complementaria ya que la señal correspondiente a esta medida estuvo por debajo de la anterior. Mientras que, para la concentración de 5 μM de MCH, sí mostró tanto un cambio respecto a la medida anterior y un aumento del semicírculo para la señal de detección. Por lo tanto, esta concentración se seleccionó como condición para la construcción del biosensor.

Figura 30.

Diagramas de Nyquist de EIS, variando la concentración de inmovilización de MCH



Nota. Medidas realizadas usando 2 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución buffer PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Las medidas fueron realizadas a una amplitud de 10 mV y un rango de barrido de frecuencias desde 0.5-50000 Hz

5.4.6 Construcción del biosensor electroquímico.

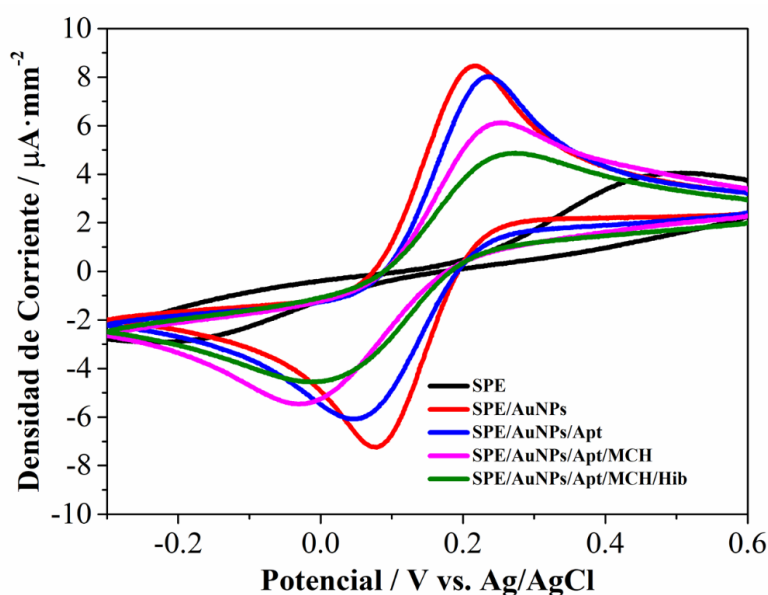
A continuación se presenta de forma detallada el efecto de la cupla $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ por cada modificación en la superficie a partir de las técnicas de CV, SWV y EIS. Inicialmente se observan en los voltamperogramas cíclicos (Ver Figura 31), los picos característicos del electrodo sin modificar, ubicados en los potenciales de -0.2 V para el pico catódico y +0.5 V para el pico anódico. Una vez el electrodo es modificado con AuNPs, la intensidad de corriente de los picos característicos aumenta y el delta de potencial se reduce, debido al aumento en la conductividad de la superficie, facilitando la transferencia de electrones. Después al inmovilizar la sonda de ADN tiolado, disminuye la señal por la resistencia que opone las cargas negativas de las cadenas de fosfato que hacen parte del ADN.

Al inmovilizar el MCH, este actúa como agente de bloqueo sobre la superficie y al mismo tiempo reorienta la estructura del aptámero tiolado, causando una inhibición en la intensidad de corriente de los puntos característicos de la cupla redox y aumentando nuevamente el delta de potencial. Esto ocurre porque el aptámero queda más expuesto para

detectar el ADN complementario. Finalmente, la señal de la sonda de ADN complementario disminuye, por aumento de la presencia de ADN y por tanto mayor repulsión de las cargas, formándose una disminución en los picos característicos de la cupla redox (Keighley et al., 2008).

Figura 31.

Voltamperograma cíclico de electrodos serigrafiado sin modificar (curva negra), modificado con AuNPs (curva roja), con 500 nM de aptámero tiolado (curva azul), con 5 μ M MCH (curva fucsia) y la detección de 100 nM de sonda complementaria (curva verde)



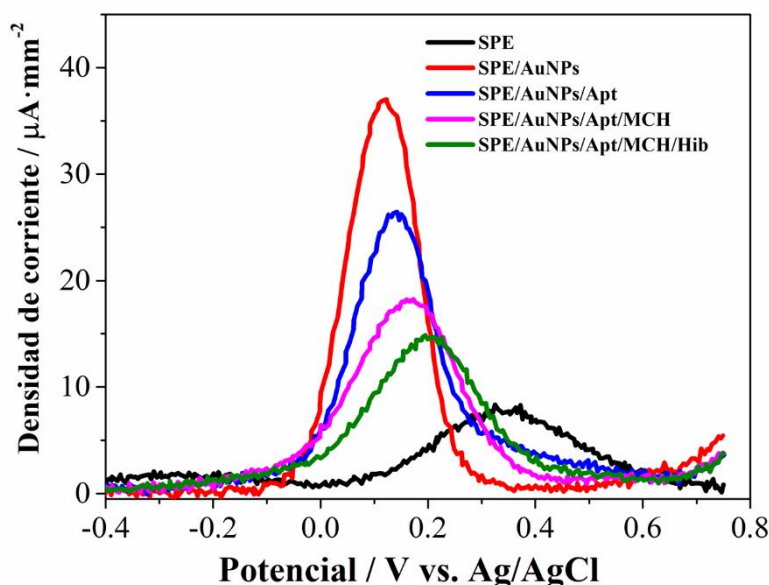
Nota. Medidas realizadas usando 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Las medidas fueron realizadas a una velocidad de barrido de 50 mV/s

La caracterización por SWV (Ver Figura 32), permite apreciar cada pulso de corriente máximo por la modificación del electrodo. En este caso la señal envuelve una carga neta luego de que sucede la reacción redox entre la cupla $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ y el electrodo. Inicialmente el electrodo sin modificar alcanza una densidad de corriente de $7.81 \mu\text{A}\cdot\text{mm}^{-2}$ y al modificarse con Au aumenta hasta $36.94 \mu\text{A}\cdot\text{mm}^{-2}$. Después, esta señal comienza a disminuir por el efecto impartido por el ADN, obteniendo intensidades de densidad corriente

de $26.27 \mu\text{A}\cdot\text{mm}^{-2}$ para el aptámero tiolado inmovilizado, $18.09 \mu\text{A}\cdot\text{mm}^{-2}$ al inmovilizar el MCH y para la detección de la sonda complementaria $14.63 \mu\text{A}\cdot\text{mm}^{-2}$.

Figura 32.

Voltamperograma de onda cuadrada de electrodos serigrafiado sin modificar (curva negra), modificado con AuNPs (curva roja), con 500 nM de aptámero tiolado (curva azul), con 5 μM MCH (curva fucsia) y la detección de 100 nM de sonda complementaria (curva verde)



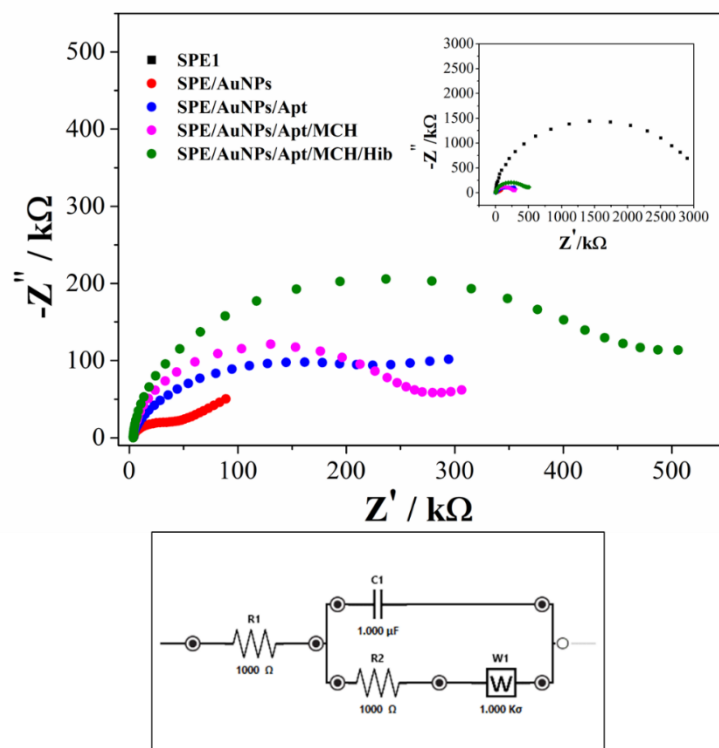
Nota. Medidas realizadas usando 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Las medidas fueron realizadas a las condiciones de 50 mV de amplitud de 50, 10 Hz de frecuencia y 5 mV paso de potencial

Se amplió la información del biosensor con la caracterización de EIS, por medio de los cambios de impedancia en la superficie del electrodo para cada modificación. La Figura 33 muestra los diagramas de Nyquist obtenidos en 2 mM de la cupla redox en un circuito de potencial abierto en un rango de frecuencias desde 0.5 a 50000 Hz. En estos diagramas se puede ver la formación de semicírculos que hacen referencia a la resistencia en la transferencia de electrones (representado como R_{et} para interpretación de los valores en el circuito equivalente de Randles).

Figura 33.

Diagrama de Nyquist de EIS del electrodo serigrafiado sin modificar (curva negra), modificado con AuNPs (curva roja), con 500 nM de aptámero tiolado (curva azul), con 5 μM MCH (curva fucsia) y

la detección de 100 nM de sonda complementaria (curva verde). En la imagen insertada se muestra el electrodo sin modificar. En la parte inferior se muestra el circuito equivalente de Randles de las medidas de EIS



Nota. Medidas realizadas usando 2 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Las medidas fueron realizadas a una amplitud de 10 mV y un rango de barrido de frecuencias desde 0.5-50000 Hz

En la Tabla 10 se puede ver en detalle los valores de la resistencia a la transferencia de carga por cada modificación del electrodo. Para esta técnica, el espectro del electrodo modificado con AuNPs presenta una resistencia de 848.7 Ω , y al detectar el ADN complementario se incrementa a un valor de resistencia final de 391800 Ω .

Tabla 10

Elementos del circuito equivalente de Randles de las medidas de EIS que hacen referencia al paso a paso de cada modificación del electrodo serigrafado

Electrodo	R_s [Ω]	C_{dl} [F]	R_{et} [Ω]	Z_w [Ω]
SPE	4277	0.019	2590000	655.4
AuNPs	150.6	2.897	848.7	3
Apt	4421	0.194	45640	237.7
MCH	3739	0.138	241700	151.4
Hib	3939	0.092	391800	265

5.5 Conclusiones Parciales

Se obtuvieron AuNPs con diferentes tamaños por la técnica de voltamperometría cíclica (Rango de potencial de +0.6 a -0.2 V, entre 1 y 2 ciclos a una velocidad de barrido de 50 mV/s) y más homogéneas por cronoamperometría (Potenciales entre -0.05 V y +0.05 V, y tiempos entre 50 a 500 s).

Las condiciones utilizadas para la construcción del transductor del biosensor fueron electrodos serigrafados modificados con AuNps (+0.05 V y 500 s), permitiendo aumentar un 50% el área electroactiva de los electrodos de trabajo, con intensidad de densidad de corriente de $12.8 \mu\text{A}\cdot\text{mm}^{-2}$ obtenida por medio de medidas electroquímicas de SWV usando la cupla redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$.

A partir de los métodos de síntesis de AuNps estudiados, se seleccionó la técnica de CA, puesto que permitió obtener mayor cambio en la respuesta electroquímica (0.16 μA) para la detección de la sonda complementaria (0.30 nM).

Las condiciones definidas para el receptor fueron 500 nM de aptámero tiolado con un tiempo de inmovilización de 16h. Se complementó la conformación del receptor con la inmovilización del MCH con una concentración de 5 μM durante 5 min de incubación.

6. Evaluación de la influencia de nanoestructuras de carbono sobre la respuesta electroquímica de electrodos serigrafiados aplicados en biosensores electroquímicos para la detección de ADN modelo

El uso de nanoestructuras de carbono para el desarrollo de plataformas biosensoras se ha vuelto un paso crucial para mejorar las características analíticas de estos dispositivos. En cuanto a la construcción de biosensores electroquímicos basados en ADN, el gran efecto que han mostrado estas nanoestructuras en la modificación de la superficie del electrodo proviene de sus propiedades de rápida transferencia electrónica, alta conductividad térmica, excelente flexibilidad mecánica, rápida cinética en la reacción del electrodo, fácil funcionalización y alta área superficial (P. Abdul Rasheed & Sandhyarani, 2017).

La aplicación de estos nanomateriales se lleva a cabo por una etapa de deposición de los materiales sobre la superficie de un electrodo conductor. Este procedimiento juega un rol fundamental para asegurar el contacto adecuado entre el nanomaterial y la superficie del electrodo (Ahmad et al., 2018). La deposición de nanomateriales tiene como fin proporcionar una alta área superficial que permita mejorar la señal en la respuesta electroquímica de los biosensores, contribuyendo además a una inmovilización del receptor más estable, bioafinidad, que termina aumentando la efectividad en la detección del analito.

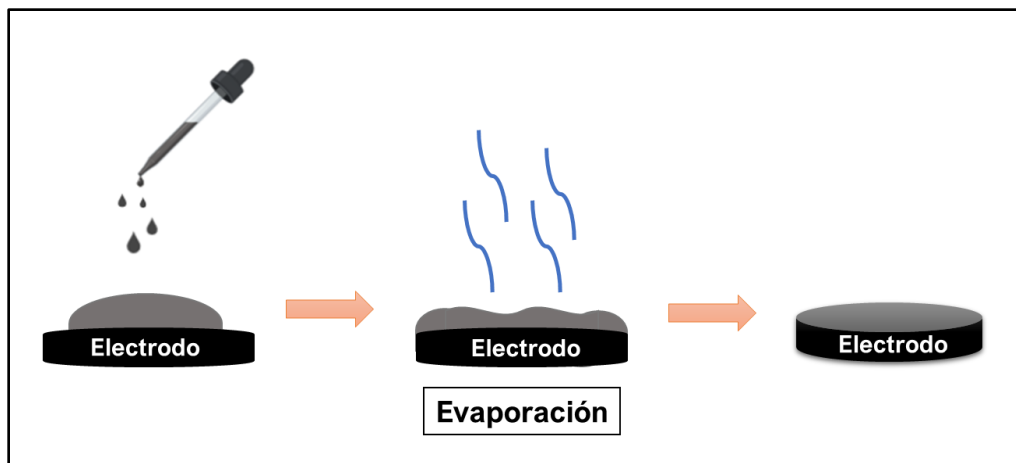
Por lo tanto, la selección de un electrodo adecuado, un tipo de nanomaterial activo y su respectivo método de deposición, son parámetros importantes para obtener una alta sensibilidad con buenos tiempos de respuesta en los biosensores.

6.1 Método de deposición *Dropcasting*

La técnica del *dropcasting* es un método simple y de bajo costo. Consiste en la deposición manual de nanomateriales sobre la superficie de un electrodo para la fabricación de biosensores (Ver Figura 34) (Ahmad et al., 2018). El grosor de la película formada y sus propiedades dependen del volumen de la dispersión y concentración. Otros parámetros para tener en cuenta son la humedad del sustrato, la velocidad evaporación y el proceso de secado. Entre sus ventajas y desventajas está que no se desperdicia tanto material y que difícilmente se puede controlar el grosor de la película respectivamente (Kajal, Ghosh, & Powar, 2018). Una forma de asegurar películas con mayor grado de estabilidad y uniformidad es utilizando aglutinantes (Ahmad et al., 2018).

Figura 34.

Esquema de la técnica de deposición por la técnica dropcasting



En este capítulo, se hizo un estudio del efecto de los nanotubos de carbono multipared y óxido de grafeno funcionalizados, empleados en electrodos serigrafados, sobre la señal electroquímica de biosensores basados en ADN por las técnicas de voltamperometría cíclica, voltamperometría de onda cuadrada y espectroscopia de impedancia electroquímica para

encontrar la configuración de las nanoestructuras más favorable en el diseño de estos dispositivos.

6.2 Desarrollo experimental

Para el desarrollo de esta etapa se propusieron transductores electroquímicos por medio de la modificación de electrodos de trabajo con óxido de grafeno (GO), nanotubos de carbono multipared (MWCNT) y la sinergia entre ambas nanoestructuras.

6.2.1 Materiales y reactivos.

Los materiales y reactivos empleados en este capítulo ya fueron mencionados en el capítulo uno, agregando para este caso las nanoestructuras de carbono. Se adquirió comercialmente *Graphene oxide, flakes, 15-20 sheets, 4-10% edge-oxidized* y *Carbon nanotube, multi-walled, carboxylic acid functionalized*; ambos de marca Sigma Aldrich.

6.2.2 Dispersión de nanoestructuras de carbono.

6.2.2.1 Dispersión del óxido de grafeno.

Se preparó una suspensión de 1 mg/mL de óxido de grafeno en agua tipo 1. Luego se realizó una agitación por 3 min en agitador vortex. Después, para lograr la dispersión completa del óxido de grafeno, se sometió a un baño ultrasónico por 15 min. Finalmente se agitó la dispersión por 2 min en agitador vortex y se repitió el procedimiento dos veces más.

6.2.2.2 Dispersión de los nanotubos de carbono.

La dispersión de los nanotubos de carbono fue evaluada en dos tipos de solución, en agua y en una solución de 1% p/V de SDS como agente dispersante(Duan, Wang, & Collinsa,

2011; Zhang & Gao, 2007). La suspensión tenía una concentración de 1 mg/mL, la cual se colocó en baño ultrasónico durante 15 min por 3 ciclos, empleando agitación en vortex por 2 min por cada ciclo alcanzado.

6.2.3 Determinación de las concentraciones a depositar de nanoestructuras de carbono.

6.2.3.1 Determinación concentración de las nanoestructuras de carbono.

A partir de 0.1 mg/mL de GO y MWCNT se realizaron dos diluciones seriadas como se muestra en el Anexo D, con el fin de determinar la concentración de cada nanoestructura a depositar sobre los electrodos serigrafiados. En la Tabla 11 se presentan las condiciones definidas de concentración para cada nanoestructura.

Tabla 11

Concentración de las nanoestructuras de carbono

Tipo de nanoestructura de C	Concentración [mg/mL]
GO	0.05
MWCNT	0.001

6.2.3.2 Preparación de los transductores modificados con nanoestructuras de carbono.

Seleccionadas las concentraciones a depositar de cada nanoestructura se realizaron las configuraciones de los electrodos modificados (transductores) como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12

Composición de los electrodos modificados con nanoestructuras de carbono

Electrodo base	Composición.
Electrodo 1	SPE/GO
Electrodo 2	SPE/MWCNT
Electrodo 3	SPE/GO/MWCNT

Electrodo 4 SPE/MWCNT/GO

Para la deposición de óxido de grafeno se empleó una alícuota de 3 μL de dispersión aplicada en dos partes, primero se agregó 1.5 μL y se dejó 1h de secado; después se aplicó la cantidad restante y se dejó en secado por más de 4h.

Para la deposición de los nanotubos de carbono multipared se aplicó 1.5 μL de dispersión y se dejó en secado por más de 4h. El proceso de secado se hizo a temperatura ambiente en ambos casos.

Para el caso de la sinergia de las nanoestructuras se agregó cada capa respectivamente. Por ejemplo, para la configuración SPE/GO/MWCNT se aplicó primero 1.5 μL de la dispersión GO dejándola 2h de secado y luego se depositó 1.5 μL de la dispersión de MWCNT por más de 4 h de secado. Para la configuración SPE/MWCNT/GO, se realizó el procedimiento anterior invirtiendo el orden de deposición de las dispersiones de las nanoestructuras.

6.2.4 Caracterización de las dispersiones y deposición de las nanoestructuras de carbono.

Esta actividad, consistió en observar el estado de las nanoestructuras de carbono una vez realizada la dispersión y posteriormente la deposición sobre los electrodos serigrafiados, verificando la conservación de sus propiedades.

6.2.4.1 Estabilidad de las dispersiones.

Se estudió las dispersiones obtenidas por ultrasonido, donde se evaluó de forma cualitativa la estabilidad de las dispersiones de las nanoestructuras por medio de fotografías.

Primero, se compararon las suspensiones antes y después del proceso de dispersión. Luego, se hizo una dilución seriada de cada dispersión y se tomaron fotografías siete días después para analizar el estado de las muestras.

6.2.4.2 Espectroscopia de Absorción UV-vis.

Las medidas de absorbancia de las dispersiones fueron registradas en un espectrofotómetro de fibra óptica marca AvaSepc-ULS2048 Starline conectado a un computador y controlado por el software Avantes. Las muestras fueron medidas en un rango de longitud de onda 180-1000 nm, utilizando celdas plásticas para UV micro volumen 70 - 850 μL .

6.2.4.3 Espectroscopia Raman.

Los espectros Raman se registraron en un equipo Horiba LabRAM HR Evolution, equipado con un láser de 532 nm y rango de adquisición 664-2262 cm^{-1} . Estas medidas permitieron verificar la conservación de las nanoestructuras de carbono una vez dispersados, a partir de la información de sus bandas características.

6.2.4.4 Medidas de microscopia electrónica de barrido.

Una vez depositadas las nanoestructuras de carbono, se sintetizó por cronoamperometría las nanopartículas de oro. Después se procedió a caracterizar las superficies de cada configuración por microscopia de barrido SEM con el fin de analizar cualitativamente la conformación superficial de las nanoestructuras de carbono y observar su morfología, su textura y su tamaño; comparándolos con un electrodo modificado únicamente

con AuNPs como referencia. Las micrografías SEM fueron tomadas en un microscopio FEI Quanta FEG 650 con detector de electrones electrodispersados operando a 15 kV en el vacío.

6.2.4.5 Caracterización electroquímica.

Se realizó una caracterización electroquímica de los transductores por VC (área electroactiva, rango de potencial e intensidad de la densidad de corriente) y EIS (Resistencia a la transferencia de carga), por medio de la cupla redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en 0.1 M PBS (0.1 M KCl).

6.2.5 Construcción del biosensor.

Inicialmente se realizó un lavado por CV con 0.1 M KCl para seguidamente hacer la primera caracterización electroquímica del electrodo serigrafiado sin modificar, medida que fue llamada “SPE”. Segundo, se realizó la deposición de las dispersiones de las nanoestructuras de carbono (CN) para cada configuración (GO, MWCNT, GO-MWCNT, MWCNT-GO), dejando en un tiempo de secado de 4h para cada electrodo, donde la medida de caracterización se denominó “SPE/CN”. Luego, se aplicó una voltamperometría cíclica en una solución 0.5 M de ácido sulfúrico (H_2SO_4) en un rango de potencial de +0.7 a -0.1 V durante tres ciclos como pretratamiento para la síntesis de AuNPs. Se agregó una alícuota de 100 μL a 1 mM de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 0.5 M de H_2SO_4 , para la síntesis de AuNPs y se aplicó un potencial de +0.05 V -100 s (se empleó un tiempo de electrodeposición de 100s, puesto que al agregar las nanoestructuras de carbono a la configuración se mejora notablemente la señal, lo que no requiere aumentar la señal con las AuNPs) por la técnica de CA, el cual también se caracterizó electroquímicamente y se nombró como “SPE/CN/AuNPs”.

Seguidamente se realizó la inmovilización de 500 nM de aptámero tiolado, el cual se incubó por 1h con DTT y posteriormente se agregó 10 μL de esta solución sobre el electrodo modificado con AuNPs en cámara húmeda durante 16 h, para luego lavar con agua y así remover el ADN no inmovilizado. En este caso la medida de caracterización fue asignada como “SPE/CN/AuNPs/Apt”. Finalmente se inmovilizó 5 μL de 5 μM de MCH y se dejó incubando sobre el electrodo por 5 min, para después lavar con agua, denominando la medida de caracterización como “SPE/CN/AuNPs/Apt/MCH”.

Una vez construido los biosensores se realizó la detección de la sonda complementaria a una concentración de 1nM. Se agregó 100 μL de esta solución sobre los biosensores durante 35 min, realizando tres repeticiones de esta prueba.

6.3 Resultados y discusión

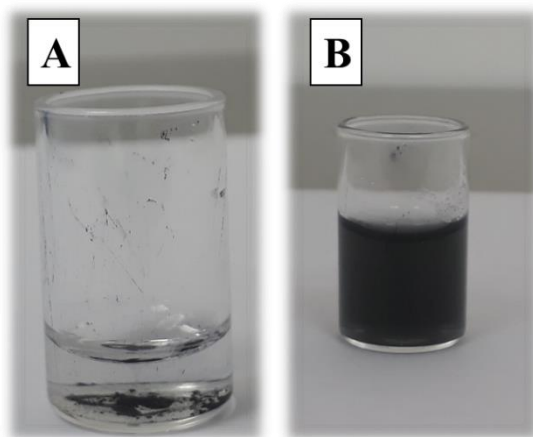
6.3.1 Caracterización de las nanoestructuras de carbono.

6.3.1.1 Estabilidad de las dispersiones.

En las fotografías de la Figura 35 se puede observar una suspensión de GO antes y después de ser dispersados, en donde se encontró que utilizando agua había una mejor dispersión del nanomaterial.

Figura 35.

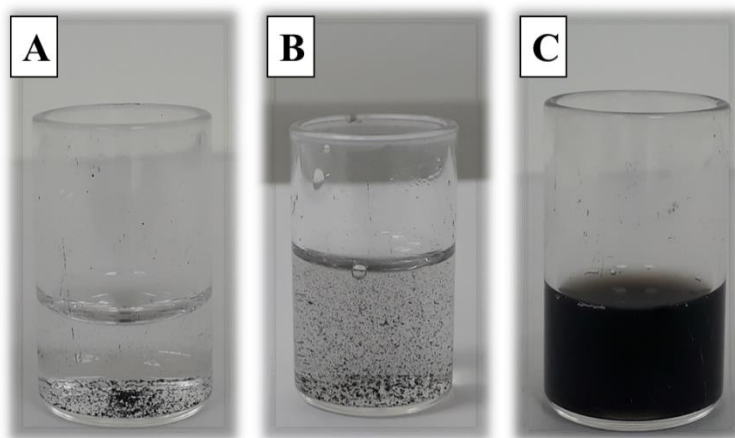
Fotografía de una suspensión 1 mg/mL de óxido de grafeno en agua A) Sin dispersar y B) Dispersados



De la misma forma se sometió a ultrasonido una suspensión de MWCNT en agua (Ver figura 36), lo cual no favoreció la dispersión. Por esta razón, se empleó SDS como agente dispersante, obteniendo de esta forma la dispersión de los MWCNT.

Figura 36.

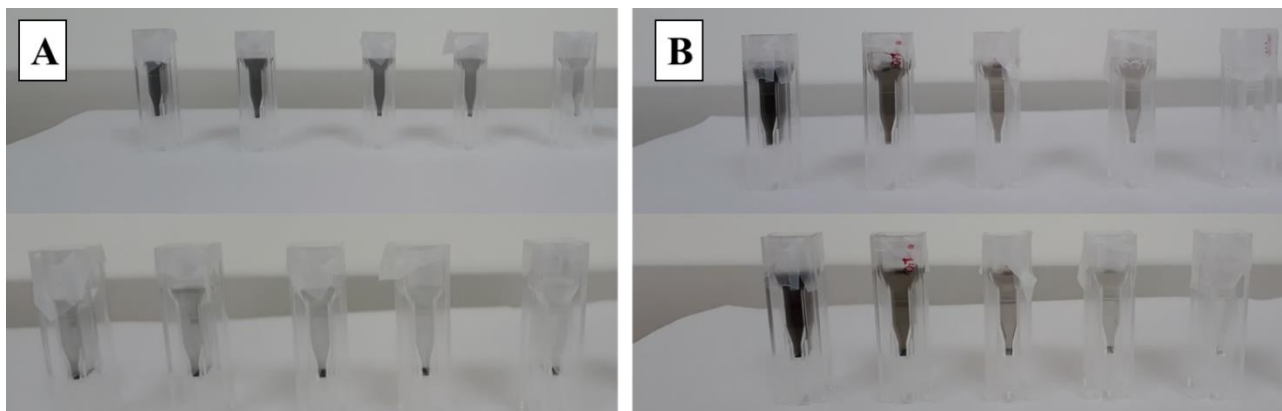
Fotografía de suspensiones 1 mg/mL de nanotubos de carbono multipared A) en agua sin dispersar, B) en agua dispersados y C) en solución 1% de SDS dispersados



En cuanto a la estabilidad de estas nanoestructuras, se encontró que después de una semana la dispersión comenzaba a precipitarse (Ver Figura 37), especialmente en las dispersiones que contenían óxido de grafeno. Con base en este resultado se decidió preparar las dispersiones y aplicarlas de inmediato.

Figura 37.

Estabilidad de las dispersiones de las nanoestructuras de carbono



Nota. Diluciones de A) óxido de grafeno B) nanotubos de carbono multipared; en la parte superior una fotografía recién realizada la dispersión y diluida a diferentes concentraciones y en la parte inferior el estado de las mismas muestras siete días después

6.3.1.2 Caracterización de las nanoestructuras de carbono por espectroscopia de absorción UV-Vis.

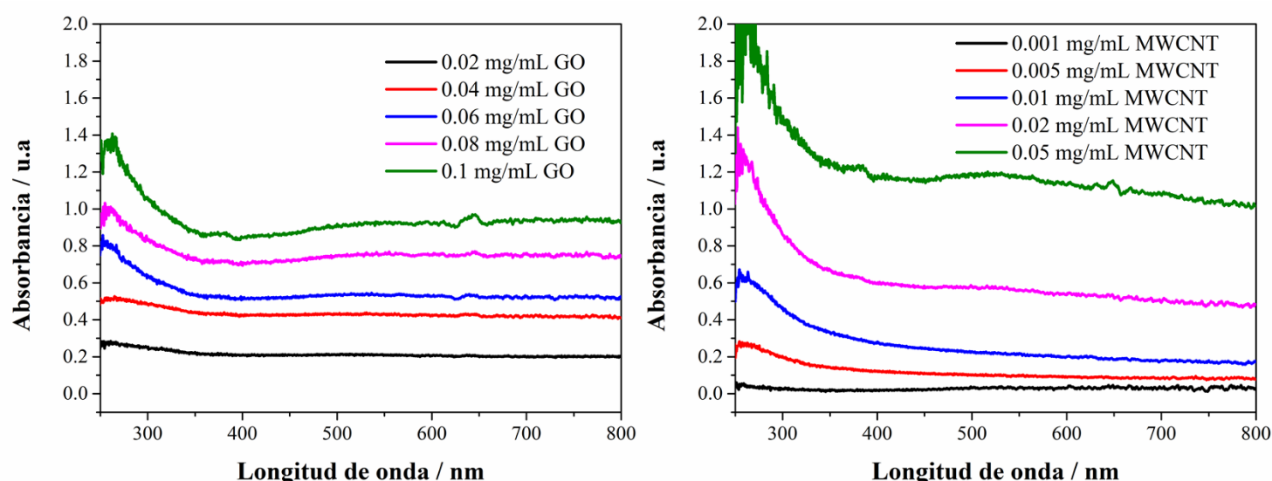
Mediante espectroscopia UV-Vis se comprobó que las nanoestructuras se dispersaron completamente, puesto que las bandas características entre 200- 1200 nm son activas en una región diferente del UV-Vis a cuando están aglomeradas (Jagadish et al., 2015).

La Figura 38 muestra los espectros de cada tipo de nanoestructura variando su concentración. Se observó que la banda de absorción en donde las dispersiones son activas es aproximadamente en 260 nm, lo cual concuerda con trabajos como el Jagadish y otros (Jagadish et al., 2015), que variaron el tipo de solvente para dispersar nanotubos de carbono, encontrando un pico de absorción en la región entre 200-300. En otro estudio realizado por Lai y otros (Lai, Zhu, Luo, Zou, & Huang, 2012), se observó un pico de absorción para el GO con agua, inicialmente en la región entre 230-300 nM y después al ir aumentando la concentración de KMnO_4 este pico se fue desplazando.

Además, se varió las concentraciones de cada tipo de dispersión, como otra forma de asegurar que el comportamiento de los espectros fuese causado por efecto de la dispersión, dado que la concentración de la dispersión está relacionada directamente con la intensidad de la absorbancia (Thuy et al., 2012). En el caso del GO, se encontró que después de 0.08 mg/mL los valores de absorbancia son superiores a 1 y para los MWCNT ocurrió lo mismo a una concentración de 0.02 mg/mL.

Figura 38.

Espectros de absorción UV-Vis de dispersiones de las nanoestructuras de carbono



Nota. Diluciones de óxido de grafeno (GO) a la izquierda y nanotubos de carbono (MWCNT) a la derecha

6.3.1.3 Caracterización de las nanoestructuras de carbono por espectroscopia Raman.

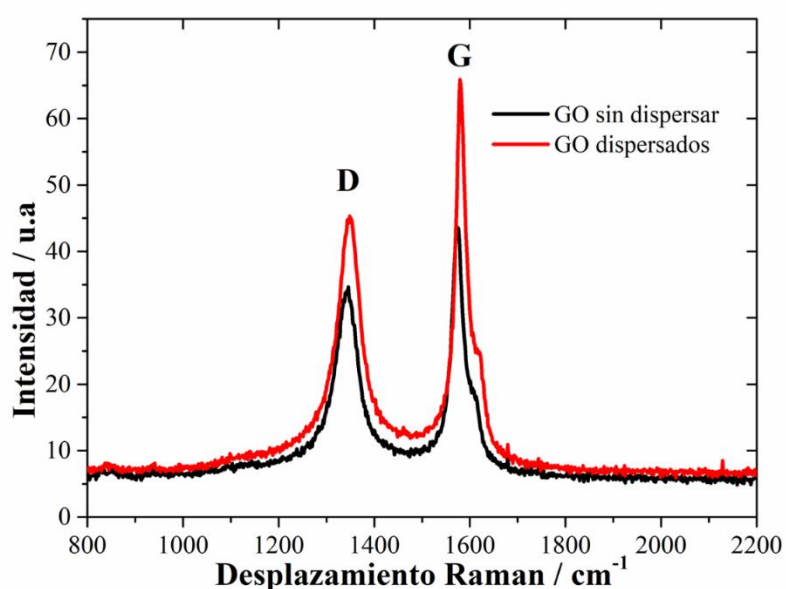
La técnica de espectroscopia Raman, puede ser utilizada para investigar el número de capas, el tipo y cantidad relativa de defectos, tensión mecánica, y funcionalización de las nanoestructuras de carbono (Bîru & Iovu, 2018).

En la Figura 39 se presentan dos espectros Raman del GO antes y después de ser dispersado, identificándose los picos característicos de las bandas D y G. Una vez el GO se dispersó, se puede observar mayor intensidad en los dos picos, lo que puede estar relacionado

a las vibraciones causadas por las oscilaciones de estiramiento de los enlaces de C-C sp^2 en la banda característica G ($\sim 1580\text{ cm}^{-1}$); y respecto a la banda D se asocia a la presencia de defectos en la red de carbono (Zheng et al., 2013) (Childres, Jauregui, Park, Caoa, & Chena, 2013).

Figura 39.

Espectroscopia Raman de la dispersión con óxido de grafeno



Nota. Muestra de GO antes (espectro color negro) y después (espectro rojo) de ser dispersados

En cuanto a la relación entre el desplazamiento de ambas bandas (D/G) se observó que en ambos casos fue de 0.86, confirmando de esta manera la conservación de la estructura del material y sus propiedades.

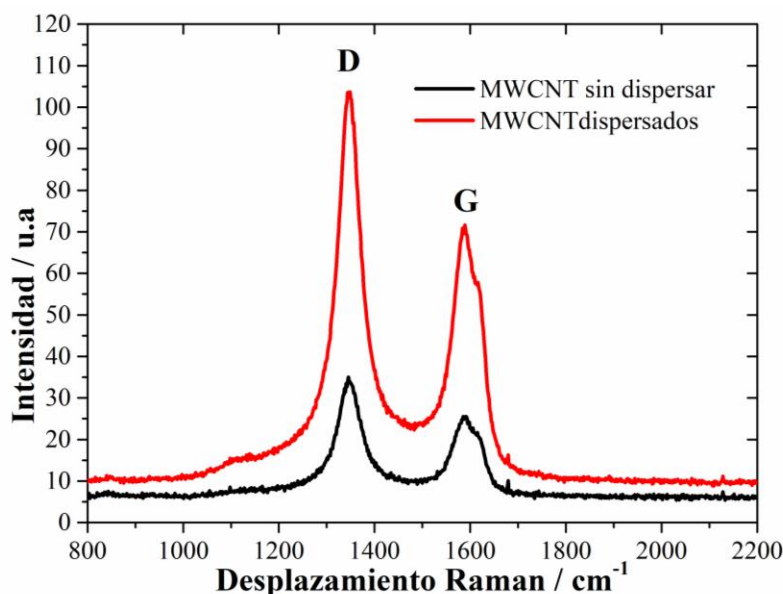
De igual modo, se aplicó el análisis de espectroscopia Raman para la dispersión de los MWCNT (Ver la Figura 40), en el cual se observó mayor intensidad de absorción en la banda D, indicando mayor número de grupos funcionales en los nanotubos de carbono, que

después de ser dispersados, se indujo un desorden en las paredes del nanomaterial (Bîru & Iovu, 2018).

En cuanto a la ubicación de las bandas, no se presentan desplazamientos, lo que significa que no hubo separación entre las capas de los nanotubos. Caso contrario se presentó en el estudio de Jagadish y otros (Jagadish et al., 2015), en el cual utilizaron diferentes tipos de solvente ocurriendo un desplazamiento de la bandas respecto a los nanotubos de carbono sin dispersar. Adicionalmente, se tiene una conservación de los nanotubos, debido a que la relación entre las bandas se mantiene ($D/G=0.85$).

Figura 40.

Espectroscopia Raman de nanotubos de carbono multipared



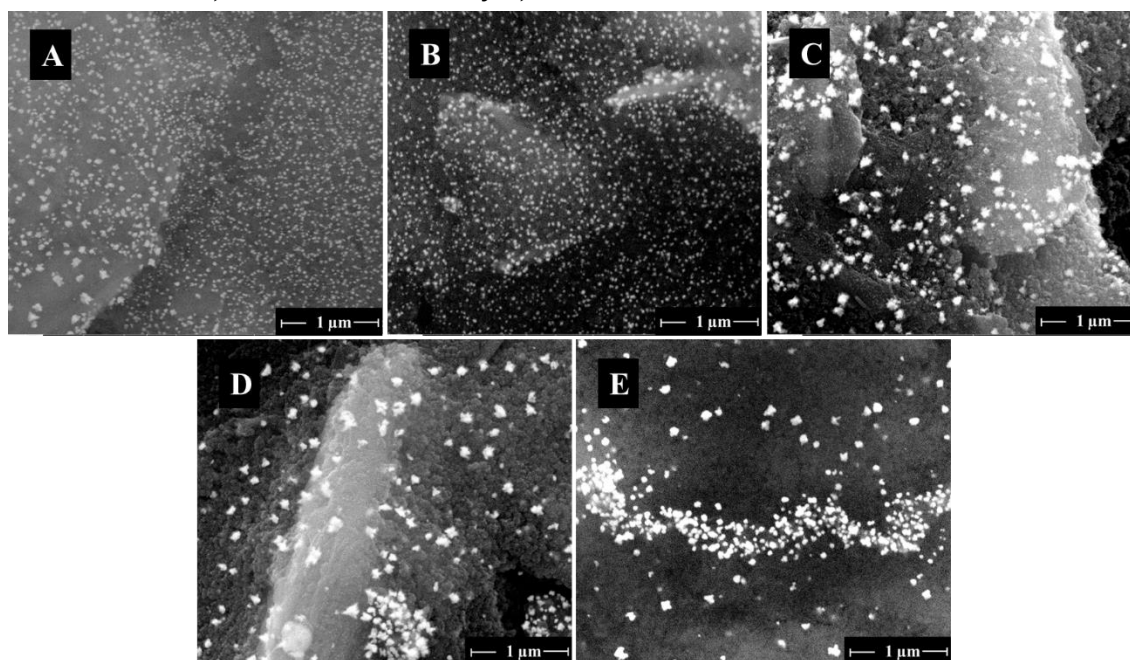
Nota. Muestra de MWCNT antes (espectro color negro) y después (espectro rojo) de ser dispersados

6.3.1.4 Caracterización SEM: Deposición de las nanoestructuras de carbono y síntesis de AuNPs por electrodeposición química.

De acuerdo con la Figura 41 se tuvo en cuenta un electrodo modificado con AuNps como referencia para comparar las diferencias que se observan al depositar las nanoestructuras de carbono. En este caso se analizó la micrografía mediante un barrido de electrones secundarios que permiten ver la composición de las muestras. Se observó formación de partículas de oro, evidenciando un cambio en la base de las micrografías SEM que contienen ya sea GO (morfología 2D), MWCN (morfología 1D) o ambos nanomateriales, confirmando de esta manera la deposición efectiva de los mismos.

Figura 41.

Micrografías SEM (a 50000x) de electrodos modificados con A) AuNPs, B) GO/AuNPs, C) MWCNT/AuNPs, D) GO/MWCNT/AuNPs y E) MWCNT/GO/AuNPs

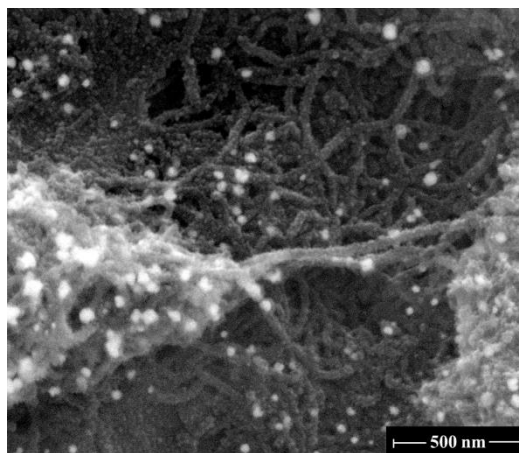


Nota. Condiciones de síntesis de AuNPs en todos los casos 0.05 V – 100 s. Micrografía de electrones secundarios

En cuanto al electrodo que fue modificado solo con MWCNT (Ver Figura 42), se logró evidenciar de forma amplificada que su estructura se mantuvo después del proceso de dispersión, recubriendo toda la superficie y sobre estos la formación por electrodeposición química de las nanopartículas. En estudios relacionados como el de Wang y otros (Jie Wang et al., 2010), en los resultados SEM se vio que las superficies contenían recubrimiento de nanotubos de carbono multipared, y además, depositaban nanocables de óxido de zinc.

Figura 42.

Micrografía SEM (a 100000x) de un electrodo modificado con MWCNT

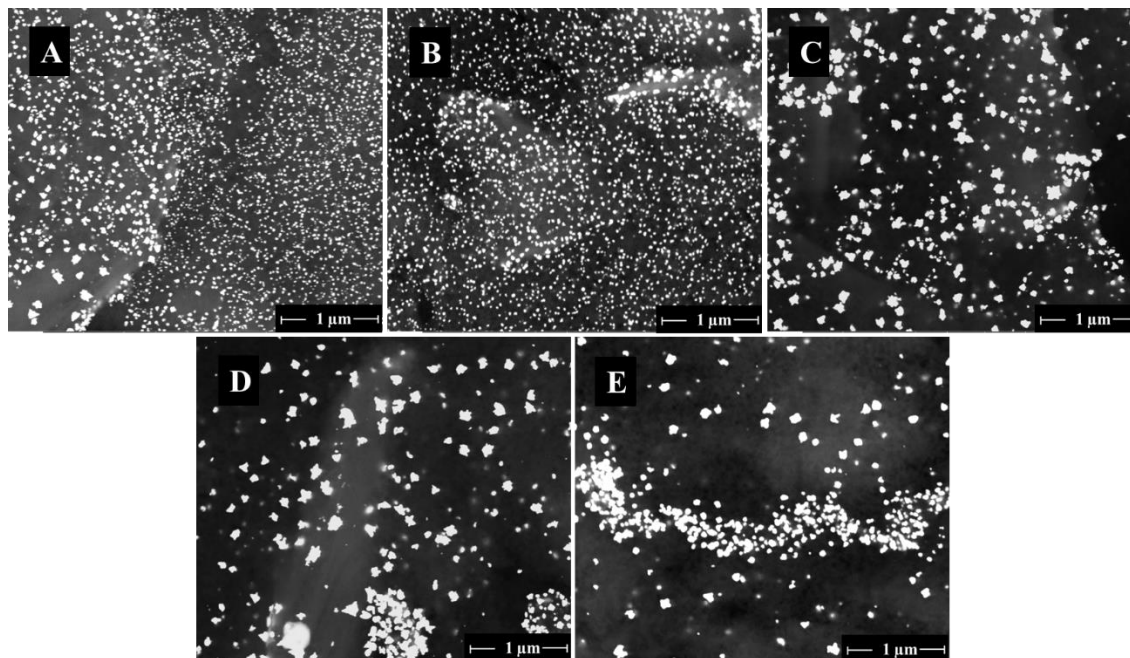


Además, se presentaron las mismas micrografías medidas a partir de electrones retrodispersados para mirar el efecto de las nanoestructuras de carbono depositadas previamente sobre la morfología de las AuNps (Ver Figura 43). En algunas zonas de la superficie, se resaltó mayor concentración de las nanopartículas, lo que puede ser causado por la presencia tanto del GO como de los MWCNT, facilitando su crecimiento.

Por otro lado, se observó que en las deposiciones donde hay presencia de MWCNT y ambas nanoestructuras (Figura 43 C-E) se dio un aumento de tamaño de las nanopartículas, posiblemente por ser la superficie más conductora, puesto que prima el crecimiento sobre la formación de más núcleos.

Figura 43.

Micrografías SEM (a 50000x) de electrodos modificados con A) AuNPs, B) GO/AuNPs, C) MWCNT/AuNPs, D) GO/MWCNT/AuNPs y E) MWCNT/GO/AuNPs



Nota. Condiciones de síntesis de AuNPs en todos los casos -0.05 V – 100 s. Micrografía de electrones retrodispersados

6.3.2 Caracterización electroquímica de los electrodos modificados con las nanoestructuras de carbono.

Seguidamente, se realizó la caracterización electroquímica de las configuraciones estudiadas a partir de las técnicas de voltamperometría cíclica y espectroscopia de impedancia electroquímica.

6.3.2.1 Voltamperometría cíclica.

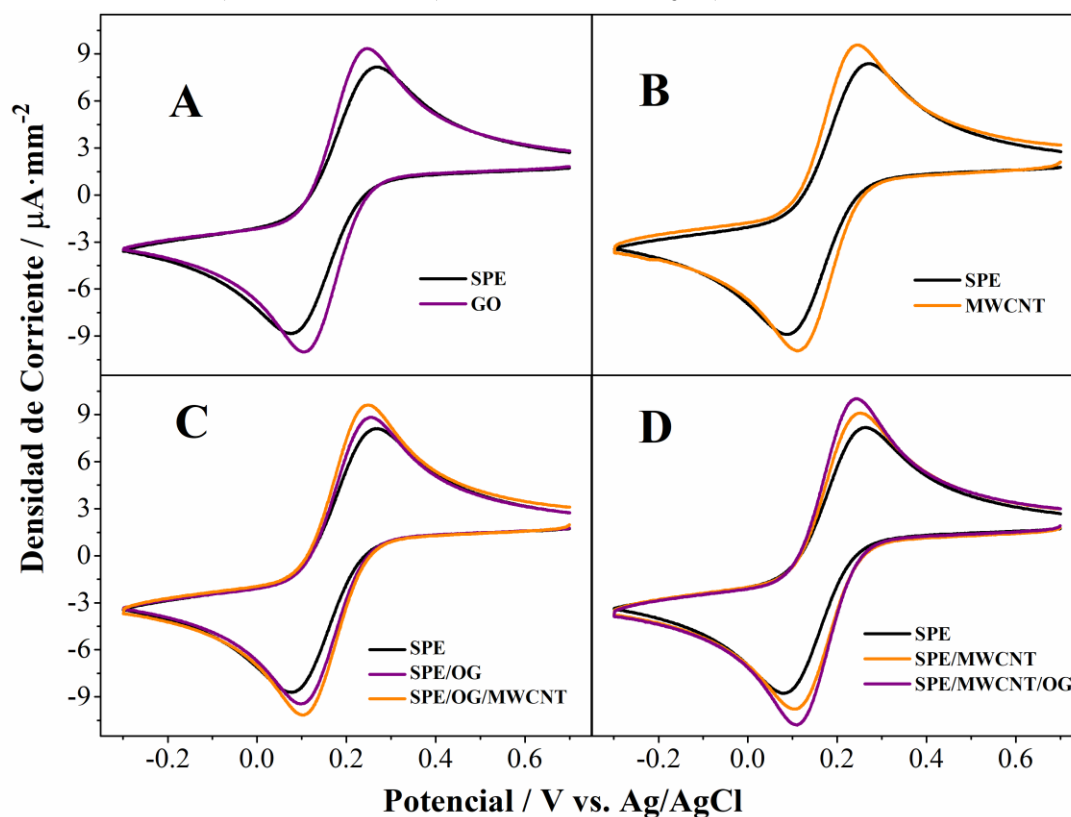
En la Figura 44, se presentan los voltamperogramas cíclicos medidos en 10 mM de la cupla redox del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, siendo la curva de color negro la señal del electrodo base, con el cual se comparó el aumento de los picos característicos al depositar GO, MWCNT o la sinergia entre ambas nanoestructuras de carbono según corresponda. Esto sucede debido

al aumento en la conductividad y mejora del transporte eléctrico en la cinética de la reacción proporcionado por el efecto de las nanoestructuras de carbono (Ahmad et al., 2018).

Para analizar de forma cuantitativa los voltamperogramas, se determinaron los valores de intensidad de corriente anódica máxima, el delta de potencial y el área electroactiva efectiva a partir de cada modificación aplicada sobre los electrodos (Ver Tabla 13). De esta manera, se puede afirmar que el incremento en la intensidad de los picos característicos es dado por el aumento en el área superficial del electrodo. En cuanto a la reducción del delta de potencial, resulta por el incremento de la transferencia de carga de los electrodos modificados.

Figura 44.

Voltamperogramas cíclicos de electrodos modificados con nanoestructuras de carbono A) Con GO, B) Con MWCNT, C) Con GO-MWCNT y D) MWCNT-GO



Nota. Medidas realizadas usando 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Velocidad de barrido de 50 mV/s

Con base en la literatura se conoce que en la reacción de la cupla redox del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ se transfiere un electrón, donde la relación de los picos característicos ($I_{\text{cp}}/I_{\text{ap}}$) es igual a 1 y la diferencia entre los potenciales de estos picos debe ser igual 59 mV, para que ocurra un proceso reversible (Bard & Faulkner, 2001; Biotechnology, 2013). En este caso, el delta de potencial que alcanzó mayor reducción fue la configuración MWCNT-GO pasando de un delta de 184.13 mV a 125.74 mV, correspondiendo todas las muestras a un proceso cuasi reversible.

Tabla 13

Comparación de los parámetros de medición y área electroactiva de los electrodos serigrafados sin modificar y modificado con nanoestructuras de carbono

Electrodo	Densidad de Corriente [$\mu\text{A}/\text{mm}^2$]	Delta de Potencial [mV]	Área [mm^2]
SPE-GO			
Sin modificar	8.1689 ± 0.9045	191.9967 ± 0.0058	3.4822 ± 0.0545
GO	9.3549 ± 1.3992	140.3700 ± 0.0054	3.9877 ± 0.0844
SPE-MWCNT			
Sin modificar	8.4061 ± 1.9047	182.3867 ± 0.0135	3.5833 ± 0.1149
MWCNT	9.5805 ± 1.9128	134.2333 ± 0.0051	4.0839 ± 0.1154
SPE-GO- MWCNT			
Sin modificar	8.1515 ± 1.6296	190.7667 ± 0.0050	3.4748 ± 0.0983
GO	8.8371 ± 0.5063	156.4200 ± 0.0062	3.7670 ± 0.0305
MWCNT	9.9739 ± 0.7648	135.2600 ± 0.0024	4.2516 ± 0.0461
SPE-MWCNT-GO			
Sin modificar	8.2036 ± 1.8322	184.1300 ± 0.0062	3.4970 ± 0.1105
MWCNT	9.1379 ± 0.8374	145.7900 ± 0.0109	3.8953 ± 0.0505
GO	10.4049 ± 1.7972	125.7467 ± 0.0023	4.4353 ± 0.1084

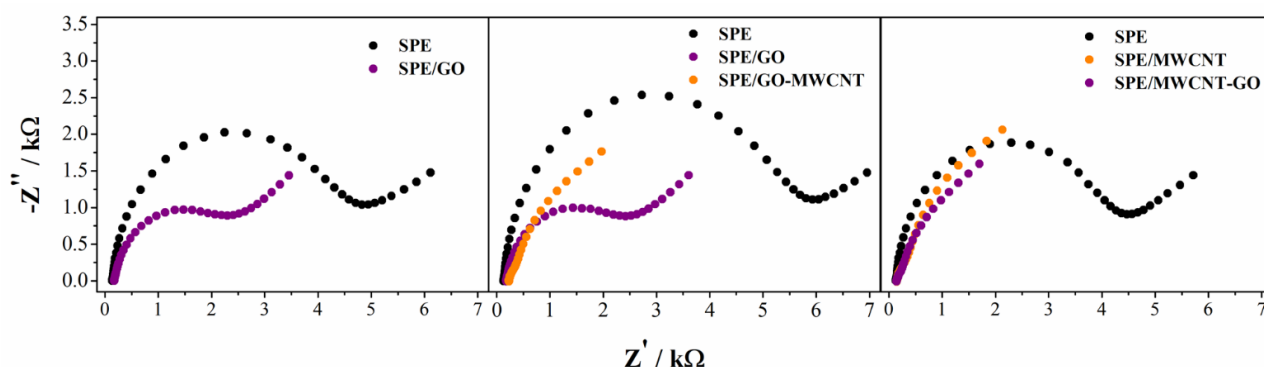
Además, se calculó el área electroactiva a partir de la ecuación de Randles-Sevcik, encontrándose igual incremento del área al depositar solo GO o MWCNT (0.5 mm^2).

Mientras que, al analizar las configuraciones donde se emplearon ambas nanoestructuras, se obtuvo mayor área electroactiva cuando se modificó inicialmente con MWCNT y después con GO (igual a 4.43 mm^2).

6.3.2.2 Espectroscopia de impedancia electroquímica.

En la Figura 45 se muestra la mayoría de las configuraciones estudiadas y en la Figura 46 lo correspondiente al electrodo modificado con nanotubos de carbono multipared para observar detalladamente el diagrama de Nyquist. En la primera figura, la modificación del electrodo tanto con GO como con MWCNT mejoraron la transferencia de carga, por las propiedades enunciadas anteriormente. Como consecuencia la resistencia a la transferencia de carga disminuye y analizando el efecto de cada nanoestructura este valor es más significativo al depositar MWCNT, lo que puede estar relacionado a una mayor conductividad por presentar mayor área superficial esta nanoestructura. Los valores de resistencia de carga fueron obtenidos a partir del circuito equivalente y son presentados en la Tabla 14.

Figura 45. Diagrama de Nyquist de electrodos modificados con nanoestructuras de carbono con A) GO, B) GO-MWCNT y C) MWCNT-GO



Nota. Medidas realizadas usando $2 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Condiciones de trabajo: amplitud de 10 mV y un rango de barrido de frecuencias desde $0.5\text{-}50000 \text{ Hz}$

En el caso de la modificación del electrodo con GO, consta de un semicírculo y una línea recta al final con pendiente de aproximadamente 45°. El semicírculo se forma en la región de frecuencias altas (1-2 kΩ), lo que está asociado con la resistencia a la transferencia de carga. Mientras que, la pendiente se denomina resistencia de Warbug, la cual ocurre a frecuencias bajas y está relacionado a los procesos de difusión de iones que se dan a través del electrolito a la interfaz del electrodo, muy utilizado en otros trabajos (Congur, Sayar, Erdem, & Piskin, 2013; C. Wang et al., 2013).

Tabla 14

Cambio de la resistencia a la transferencia de carga R_{et} de configuraciones de las nanoestructuras de carbono

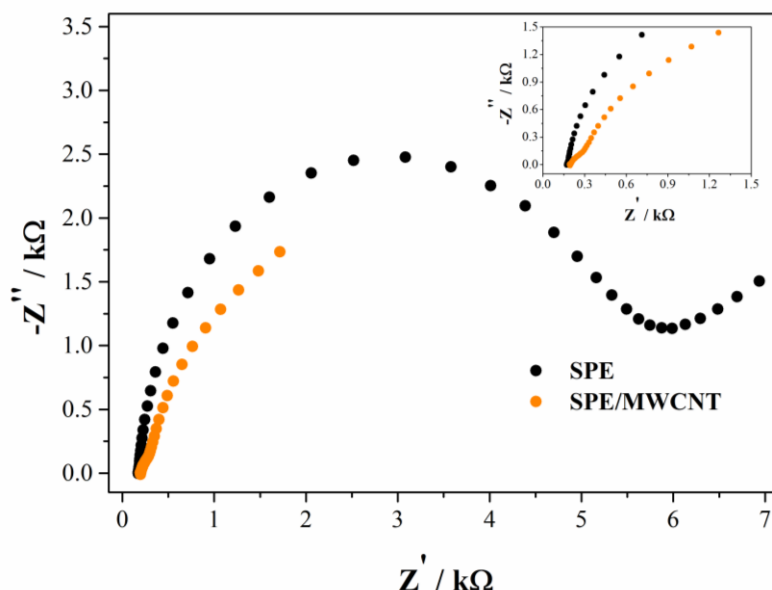
Muestra	R_{et} [kΩ]
GO	
Sin modificar	3.9770 ± 0.1538
GO	1.5513 ± 0.0461
MWCNT	
Sin modificar	4.0247 ± 0.2489
MWCNT	0.1165 ± 0.0068
GO- MWCNT	
Sin modificar	4.0503 ± 0.4615
GO	1.8763 ± 0.1107
GO- MWCNT	0.1526 ± 0.0588
MWCNT-GO	
Sin modificar	3.5523 ± 0.1547
MWCNT	0.2253 ± 0.0268
MWCNT-GO	0.1520 ± 0.0385

Para el caso del electrodo modificado con los MWCNT (Ver en la figura 46), aparentemente no se observa el semicírculo relacionado con la resistencia a la transferencia de carga. Sin embargo, al amplificar la región de altas frecuencias (eje Z' 0-0.4 kΩ) en la gráfica insertada (al lado derecho Figura 46), se puede observar que, sí ocurre la resistencia a la transferencia de carga, pero por las propiedades conductoras que le otorga el

nanomaterial a la superficie, este valor de resistencia es muy pequeño. Esta forma vertical también se puede explicar como un comportamiento capacitivo del espectro, ya que entre más vertical sea la curva, más capacitivo será (Y. Wang et al., 2009).

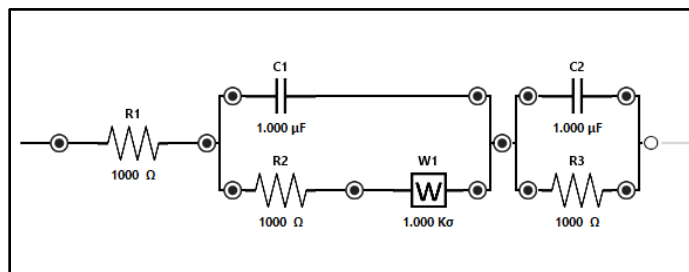
Figura 46.

Diagrama de Nyquist del electrodo serigrafiado sin modificar y modificado con nanotubos de carbono multipared



Nota. Medidas realizadas usando 2 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Inserto del mismo diagrama más amplificado. Condiciones de trabajo: amplitud de 10 mV y un rango de barrido de frecuencias desde 0.5-50000 Hz

Por esta razón, el circuito equivalente de Randles que se venía empleando para obtener información de la modificación del SPE, fue necesario ajustarlo para calcular la resistencia a la transferencia de carga para el caso de los electrodos con presencia de MWCNT (Ver Figura 47). Lo que se puede interpretar que al depositar MWCNT sobre la superficie del electrodo cambió las características del material; sin embargo, se mantiene un proceso difusivo (Vazquez Gutierrez, 2007).

Figura 47.*Modelo del circuito equivalente para las superficies modificadas con MWCNT*

Finalmente, se tienen los electrodos con la sinergia de ambos materiales, en donde la última medida de la resistencia a la transferencia resulta muy baja, pasando de valores de alrededor de 4 k Ω a valores de 0.15 k Ω para ambas configuraciones. De este último resultado, no se encontró en la literatura estudios relacionados, puesto que se encontraban solo con un tipo de nanomaterial o modificados con AuNPs (Benvidi, Firouzabadi, Moshtaghiun, Mazloun-Ardakani, & Tezerjani, 2015; Congur et al., 2013; Mohammad-Razdari et al., 2019). De esta forma, los resultados de EIS concuerdan con los obtenidos por voltamperometría cíclica.

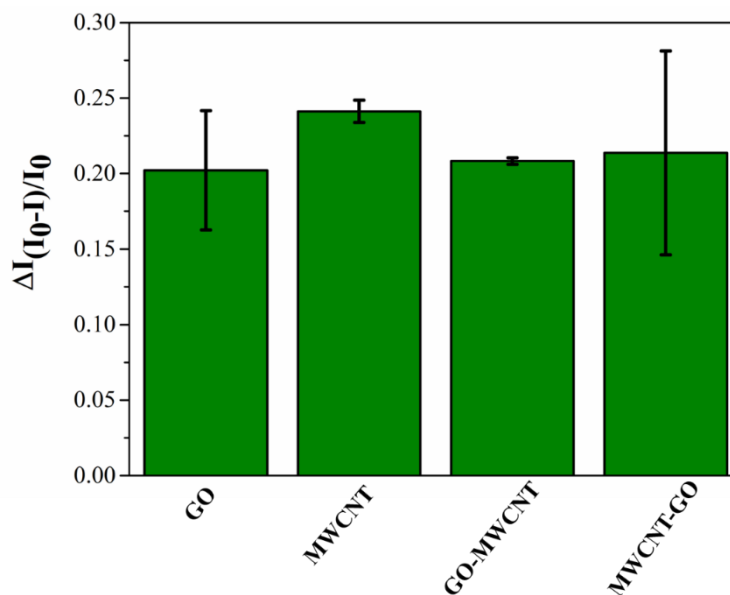
6.3.3 Evaluación de los biosensores para la detección del ADN complementario.

A partir de la detección de sonda complementaria con los cuatro biosensores propuestos, se encontró información sobre el efecto del uso de diferentes nanoestructuras de carbono, mostrando que la combinación de GO y MWCNT no es significativo comparado con la respuesta de cada nanoestructura por separado (Ver Figura 48). Lo anterior, puede explicarse debido a que las propiedades electroquímicas y área superficial, específicamente de los nanotubos se aprovecha en mayor medida de forma individual. En un trabajo realizado por Zheng y otros (Zheng et al., 2013) se obtuvo mejor respuesta electroquímica en la detección de glucosa empleando un electrodo con MWCNT, comparado con otro modificado

con GO. Por lo tanto, se seleccionó la configuración SPE/MWCNT para la evaluación de los parámetros del biosensor.

Figura 48.

Comparación de los biosensores modificados con nanoestructuras de carbono para la detección de 1 nM de ADN complementario



Nota. Medidas de SWV usando 10 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Condiciones de trabajo: amplitud de 50 mV, f 10 Hz y paso de potencial 5 mV

6.3.4 Caracterización electroquímica del Biosensor seleccionado.

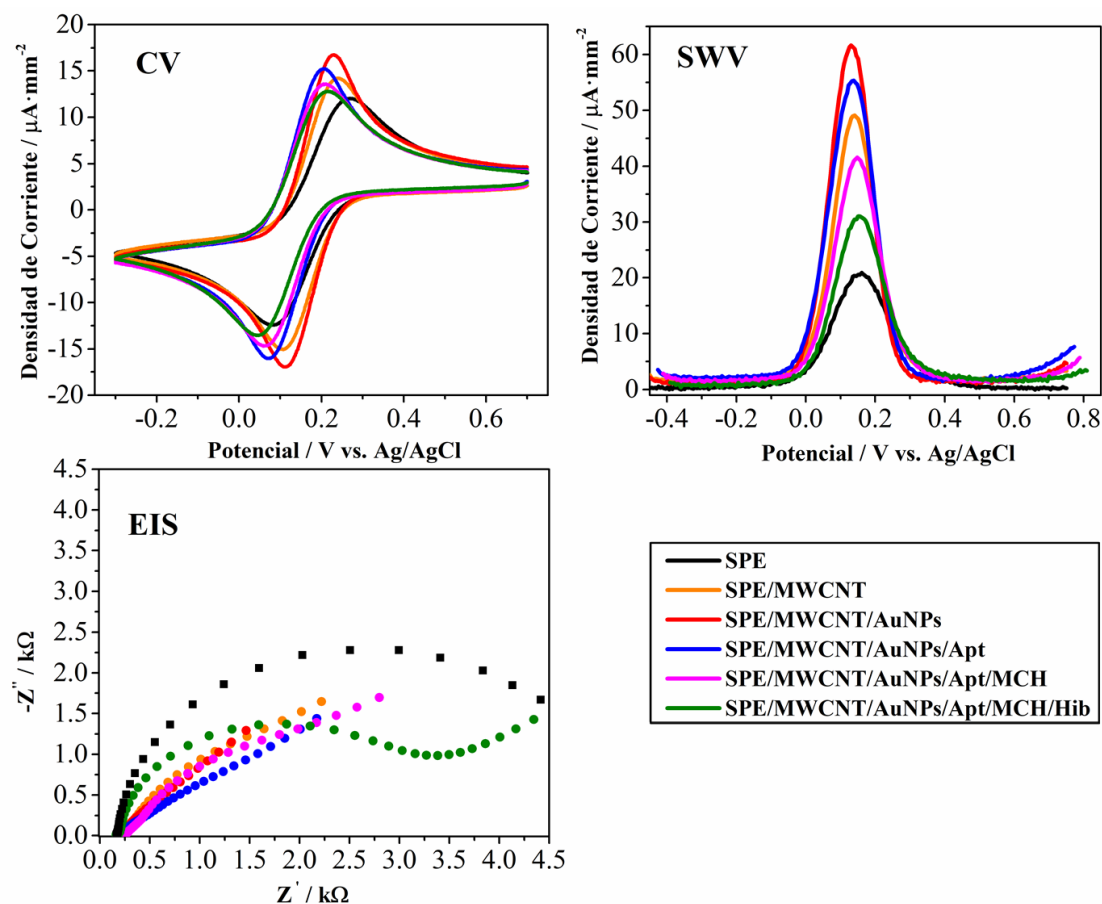
A continuación, se muestra en la Figura 49 la caracterización electroquímica del biosensor seleccionado por las técnicas CV, SWV y EIS. Para el caso de las técnicas voltamperométricas (CV y SWV) se observa un incremento en los picos de corriente del electrodo modificado con MWCNT, comparado con el electrodo sin modificar. Esto es atribuido por la alta cinética de transferencia de electrones, gran área superficial y excelente conductividad de los nanotubos de carbono multipared. Luego, la señal sigue incrementando una vez se han electrodepositado las AuNps, contribuyendo también al mejoramiento de la actividad electroquímica del electrodo por sus propiedades conductoras y nanoestructurales.

Cuando es inmovilizado el aptámero tiolado, la señal de densidad de corriente se reduce por la interacción del esqueleto de fosfato cargado negativamente del ADN de la sonda con la cupla redox. Posteriormente, la señal sigue disminuyendo por el ordenamiento de las sondas del aptámero tiolado por el efecto del MCH sobre la superficie. Cuando se ha realizado la detección de la sonda complementaria de ADN, se aumenta la presencia de ADN y por tanto también las cargas repulsivas con la cupla redox (Benvidi et al., 2015) (Eissa et al., 2019) (Benvidi et al., 2015; Eissa et al., 2019).

En contraste, para la caracterización realizada por EIS, por tratarse del estudio de las resistencias resultantes por cada modificación del electrodo, cambia el comportamiento. Es decir, en las modificaciones relacionadas con los nanomateriales la resistencia disminuye y comienza a aumentar a medida que se hacen las modificaciones con el ADN.

Figura 49.

Caracterización electroquímica de la plataforma biosensora con nanotubos de carbono multipared por las técnicas de CV, SWV y EIS



Nota. Detección de 1 nM de ADNcomplementario. Medidas de SWV usando 10 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Condiciones de trabajo: amplitud de 50 mV, f 10 Hz y paso de potencial 5 mV

6.4 Conclusiones parciales

Las condiciones de dispersión del óxido de grafeno y nanotubos de carbono, permitieron la deposición sobre los electrodos serigrafiados a concentraciones de 0.05 mg/mL y 0.001 mg/mL respectivamente, conservando cada una sus propiedades estructurales y conductoras.

Se diseñaron cuatro transductores obteniendose valores del área electroactiva de 3.98 mm² (SPE/GO), 4.08 mm² (SPE/MWCNT), 4.25 mm² (SPE/GO/MWCNT) y 4.43 mm² (SPE/MWCNT/GO).

La plataforma biosensora modificada con nanotubos de carbono multipared (SPE/MWCNT), resultó ser más eficiente electroquímicamente ($\frac{I_0-I}{I_0}=0.24 \pm 0.007 \mu\text{A}$) que las otras plataformas para la detección de sonda de ADN complementario.

7. Análisis de los parámetros de detección del biosensor electroquímico frente al reconocimiento de ADN en matrices acuosas

7.1 Introducción

En general los sensores basados en el reconocimiento molecular, es importante caracterizar su señal de respuesta; que facilite su optimización para una matriz dada. En la siguiente sección, se presentan brevemente los principales criterios de la respuesta de un biosensor y mediante los resultados obtenidos se discutirá su relación con las propiedades del receptor y las partes del transductor de los biosensores electroquímicos propuestos.

7.2 Criterios para tener en cuenta en la respuesta de un biosensor

7.2.1 Curva de calibración.

La curva de calibración de un método bioanalítico es una relación lineal entre la concentración (variable independiente) y la respuesta (variable dependiente) utilizando un método de mínimos cuadrados(Moosavi & Ghassabian, 2018). Esta relación se construye para ser aplicado en la predicción de concentraciones desconocidas del analito de una matriz dada. La calidad de un método bioanalítico depende en gran medida de la linealidad de la curva de calibración, brindando una indicación positiva de los resultados para un ensayo en un rango validado.

7.2.2 Rango de linealidad.

La linealidad de la curva de calibración es un requerimiento fundamental en el campo del análisis químico. En general, la linealidad no se cuantifica, pero se observa por simple inspección o mediante pruebas significativas de no linealidad. La no linealidad se elimina

mediante la selección de un intervalo de operación más restringido (Dosal & Villanueva, 2008). Cada intervalo lineal puede ser distinto por el efecto causado de la matriz procedente.

Para demostrar la linealidad de la curva de calibración resultante, se requieren cumplir ciertos criterios de aceptación en la que estadísticamente se puede justificar esa linealidad; para ello es necesario calcular: la pendiente, el intercepto en “Y” y el coeficiente de correlación. Este último debe cumplir un $r^2 > 0.98$ (Perdomo, 2017)

7.2.3 Sensibilidad.

La sensibilidad de un método mide la capacidad del biosensor para diferenciar pequeñas variaciones en la concentración del analito. Es la pendiente de la curva de calibración (Thevenot et al., 2013).

7.2.4 Límite de detección (LOD).

Corresponde a la menor concentración que se puede detectar por el método de análisis empleado. Una forma de determinar el LOD, x_L , es por el criterio definido por IUPAC que:

$$y_L = \bar{y}_B + k s_B \quad (\text{E.7.1})$$

Donde y_L es la probabilidad de la señal analítica más pequeña discernible, $\bar{y}_B$ es el promedio de las medidas del blanco y k es un valor que se elige de acuerdo con el nivel de confianza que se desee, generalmente 3 (Leary, 2010). El blanco se refiere a la señal emitida por el instrumento con una disolución que contiene las mismas especies de una muestra, exceptuando el analito.

Además, como x_L es función de y_L , se tiene:

$$x_L = \frac{y_L - \bar{y}_B}{m} \quad (\text{E.7.2})$$

Sustituyendo la ecuación (E.7.2) en (E.7.1), se obtiene:

$$X_L = \frac{k s_B}{m} \quad (\text{E. 7.3})$$

Donde m es la pendiente de la curva de calibración.

Como información adicional se puede obtener de la ecuación el límite de cuantificación variando k a 10 normalmente (Dosal & Villanueva, 2008).

7.2.5 Selectividad.

La selectividad es la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación que puedan estar presentes en la muestra. Se expresa como la relación de la señal de salida del analito cuando está de forma pura en una solución. Seguidamente se adicionan impurezas a la solución. Por lo tanto, la selectividad es expresada como el porcentaje en la variación de respuesta del biosensor (Thevenot et al., 2013). La selectividad se puede calcular comparando las medidas obtenidas de la detección de una muestra del blanco con y sin el analito (Moosavi & Ghassabian, 2018).

7.2.6 Repetibilidad.

Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto (Stoytcheva, Zlatev, Velkova, Valdez, & Ovalle, 2009).

7.2.7 Reproducibilidad y estabilidad.

La reproducibilidad es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas en días diferentes y se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad. El coeficiente de variación en el estudio de la reproducibilidad debe ser igual o mayor que el obtenido en el estudio de repetibilidad para la misma cantidad o concentración debido a la mayor fuente de error que existe en la reproducibilidad.

En el caso de determinar la estabilidad operacional del biosensor se debe considerar la concentración del analito, el continuo contacto del biosensor con la solución del analito, la temperatura, el pH, la composición del buffer. Su tiempo de vida es desconocido por lo que puede servir por días, semanas o incluso más tiempo de acuerdo con su uso y forma de almacenamiento (Stoytcheva et al., 2009; Thevenot et al., 2013).

La estrategia experimental que se llevó a cabo para determinar los parámetros analíticos consistió en realizar una curva de calibración para dos biosensores, uno modificado solo con nanopartículas de oro y otro con nanotubos de carbono y nanopartículas de oro, para posteriormente comparar la sensibilidad de cada dispositivo. Por otra parte, se estudió la selectividad y especificidad de cada biosensor. Finalmente, se hizo un estudio de la estabilidad en el tiempo de los biosensores preparados con el fin de mirar su reproducibilidad.

7.3 Desarrollo experimental.

Esta etapa estuvo orientada en analizar los parámetros de detección del biosensor electroquímico modificado con nanopartículas de oro y nanotubos de carbono multipared (AuNps-MWCNT).

7.3.1 Sensibilidad.

Se realizó una curva de calibración para detectar el rango de trabajo de los biosensores. Los biosensores fueron preparados a las condiciones definidas en los capítulos anteriores y se pusieron a incubar en soluciones con distintos valores de concentración (0.01, 0.1, 1, 10 y 100 nM) de la sonda de ADN complementaria durante 35 min. Una vez terminado el tiempo de detección, los electrodos fueron lavados con agua y luego se secaron con flujo de nitrógeno.

Posteriormente se realizó las medidas electroquímicas empleando la técnica de voltamperometría de onda cuadrada, obteniendo respuestas de intensidad de corriente, los cuales fueron utilizados para realizar la curva de calibración del delta de corriente vs. el logaritmo de la concentración de la secuencia de ADN complementario, realizando tres repeticiones del experimento. De esta forma, se obtuvo una ecuación del biosensor hacia la detección de ADN complementario de la forma:

$$\frac{I_0 - I}{I_0} (\mu A) = m \log C_{ADN} \left(\frac{nmol}{L} \right) + b (\mu A) \quad (E.7.4)$$

7.3.2 Selectividad.

Se empleó una sonda de ADN no complementaria, con el fin de identificar la capacidad de hibridación de ADN en solución acuosa del biosensor seleccionado. A

continuación, se presenta la secuencia de las sondas de ADN utilizadas previamente y la sonda no complementaria empleada para estudiar la selectividad:

Sonda de ADN receptor (B1Apt2):	5'-Tiol-TTA CAA CCC GAA GGC C-3'
Secuencia de ADN objetivo (B1Comp):	5'-GGC CTT CGG GTT GTA A-3'
Secuencia de ADN no complementaria (B1Trs):	5'-TTA AGG ATT TGG TGC C-3'

La concentración empleada en el estudio de este parámetro fue de 100 nM durante un tiempo de incubación de 35 min del ADN no complementario.

7.3.3 Pruebas de estabilidad.

La estabilidad de los biosensores de ADN consistió en realizar medidas de detección después de 7 días de almacenados en el refrigerador a 4°C en cámara húmeda.

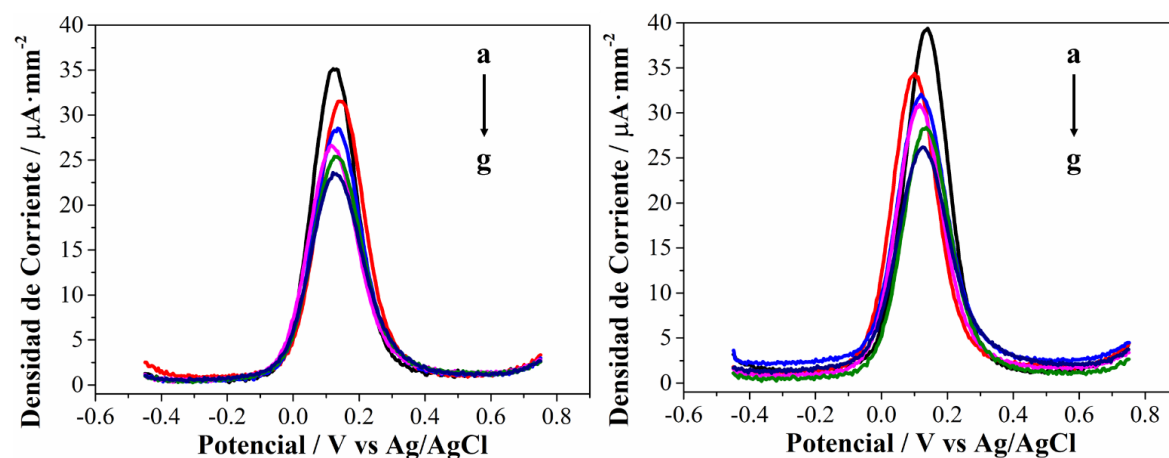
7.4 Resultados y discusión

7.4.1 Sensibilidad.

Los biosensores propuestos fueron usados para evaluar diferentes concentraciones de la sonda de ADN complementaria, empleando la técnica de SWV, como se puede observar en la Figura 50. Al aumentar la concentración de ADN, ocurre una reducción gradual de la señal de corriente.

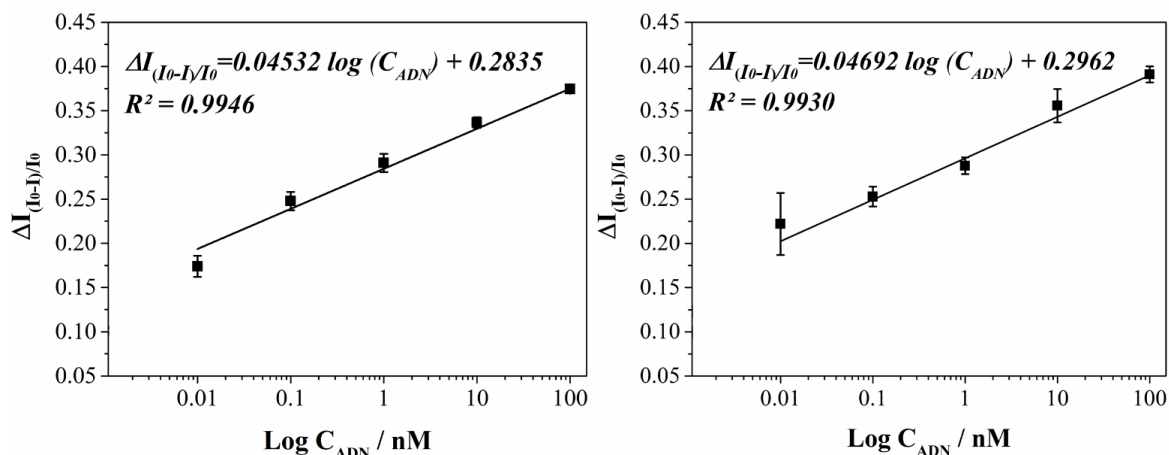
Figura 50.

Voltamperogramas de onda cuadrada variando la concentración de ADN complementario



Nota. Valores de concentración desde a – g (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 nM) aplicados sobre los biosensores propuestos: Biosensor 1 (AuNPS) a la izquierda y Biosensor 2 (AuNps_MWCNT) a la derecha; en 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Condiciones de trabajo: 50 mV de amplitud de 50, f 10 Hz y paso de potencial 5 mV. Velocidad de barrido de 50 mV/s

Como resultado de la señal electroquímica obtenida para cada concentración, se halló la curva de calibración para cada biosensor (ver Figura 51). De esto, se puede interpretar la pendiente de cada gráfica como la sensibilidad del método de detección empleado, resultando una mayor pendiente para el Biosensor 2 (AuNPs-MWCNT), lo que se puede atribuir al efecto de los nanotubos de carbono multipared.

Figura 51.*Curvas de calibración de los biosensores*

Nota. Biosensor 1 (AuNps) a la izquierda y Biosensor 2(AuNps-MWCNT) a la derecha.

Seguidamente, se calculó el límite de detección considerando tres repeticiones de la desviación estándar de la medida del blanco (solución sin ADN complementario) dividido por la pendiente, obteniendo los valores que se muestran en la Tabla 15 correspondientes a cada biosensor. El Biosensor 1, alcanzó un límite más bajo de detección de 0.05154 nmol/L, mientras en el Biosensor 2 fue de 0.2159 nmol/L.

A partir de la literatura al comparar con otros biosensores voltamperométricos, se encontró que algunos logran un LOD inferior al rango de detección(Jahandari, Taher, Karimi-Maleh, Khodadadi, & Faghih-Mirzaei, 2019), otros tienen un límite con un valor igual a la concentración inicial de detección(Zhu et al., 2015), y otros cerca a este primer valor de concentración como se evidenció también para este caso(Eissa et al., 2019).

Además, se calcularon los límites de cuantificación, de manera que estos lo que indican es un criterio aceptable de la menor concentración que puede detectar cada dispositivo, siendo el Biosensor 1 en el que se encontró un menor límite de cuantificación.

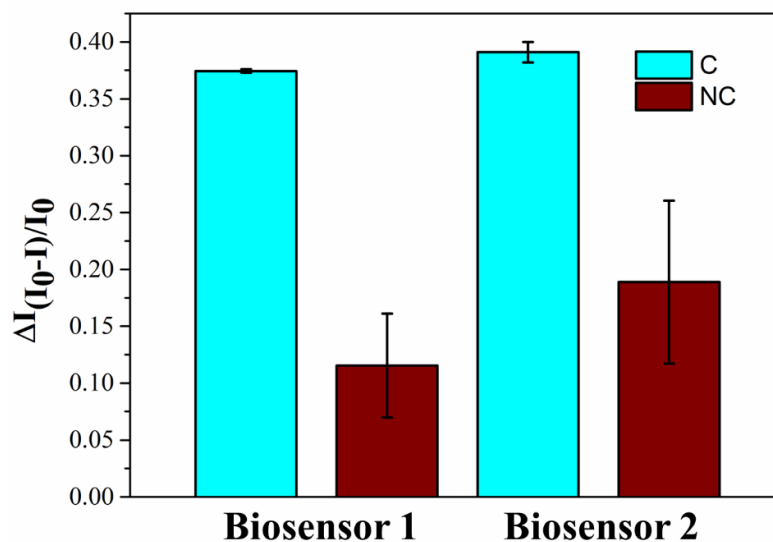
Tabla 15
Límites de detección

Muestra	Límite de detección [nmol/L]	Límite de cuantificación [nmol/L]
Biosensor 1 (AuNPs)	0.05154	0.1718
Biosensor 2 (MWCNT-AuNPs)	0.2159	0.7198

De los resultados obtenidos acerca de la curva de calibración de ambos dispositivos, se tiene que el Biosensor 2 logró detectar de forma significativa las pequeñas variaciones de concentración de ADN complementario para el rango de trabajo al cual funciona. Y respecto al límite de detección, se encontró que el Biosensor 1 tiene la capacidad de detectar una concentración mínima del ADN complementario. Si bien ambos parámetros son influyentes en el diseño de biosensores, el objetivo de este trabajo era estudiar el efecto proporcionado por las nanoestructuras de carbono en la sensibilidad de la señal, encontrándose que sí favorece en el mejoramiento de la respuesta electroquímica.

7.4.2 Selectividad.

Se utilizó 100 nM de la sonda no complementaria para el estudio de este parámetro, encontrándose una selectividad parcial para ambos biosensores, como se puede observar en la Figura 52. En el biosensor 1, la capacidad para detectar una sonda no complementaria es menor a 30.81% y en el biosensor 2 corresponde a 48.31% con respecto a la detección de la sonda complementaria. Encontrándose que el biosensor 2 tiene menor selectividad, debido a una posible interacción de los grupos funcionales adicionados en la estructura de los nanotubos de carbono, que pueden estar detectando la sonda no complementaria.

Figura 52.*Selectividad de los biosensores*

Nota. Detección de sonda complementaria (C) y no complementaria (NC) con concentración 100 nM empleando los biosensores propuestos: Biosensor 1 (AuNPS) y Biosensor 2 (AuNps_MWCNT)

7.4.3 Estabilidad.

En esta prueba se encontró que la inmovilización del ADN tiolado (receptor) fue estable en el séptimo día para los dos biosensores. Sin embargo, una vez agregado el ADN complementario no se alcanza alta capacidad de detección para el Biosensor 1.

Tabla 16*Valores de estabilidad*

Muestra	Porcentaje de estabilidad inmovilización	Porcentaje de estabilidad hibridación
Biosensor 1	82.96 %	25.45 %
Biosensor 2	97.56 %	82.19 %

7.5 Conclusiones parciales

Se obtuvo dos biosensores reproducibles con sus respectivas curvas de calibración para un rango de detección entre 0.01 a 100 nM de ADN complementario, resultando las ecuaciones: $\frac{I_0-I}{I_0}(\mu A) = 0.04532 \text{Log} C_{ADN} + 0.2835$ para el Biosensor 1 (SPE-AuNPs) y $\frac{I_0-I}{I_0}(\mu A) = 0.04692 \text{Log} C_{ADN} + 0.2962$ para el Biosensor 2 (SPE-MWCNT-AuNPs), presentando una mayor sensibilidad en el Biosensor 2.

El límite de detección para cada dispositivo fue de 0.05154 nmol/L (Biosensor1) y 0.2621 nmol/L (Biosensor2).

Los biosensores resultaron parcialmente selectivos al evaluar la detección hacía una sonda de ADN no complementaria., detectando una señal del 30.81% para el Biosensor 1 y 48.31% para el Biosensor 2.

Los biosensores presentaron una estabilidad en la inmovilización del receptor; sin embargo, al detectar la sonda complementaria no hubo una detección aceptable. Por lo tanto, se debe emplear el biosensor recién preparado.

8. Conclusiones Generales

Las condiciones determinadas para la construcción del transductor fueron electrodos serigrafiados modificados con AuNps sintetizadas y electrodepositadas por la técnica de cronoamperometría (+0.05 V tiempos de 100 y 500 s). Para la inmovilización del receptor se empleó una concentración de 500 nM de aptámero tiolado con un tiempo de inmovilización de 16h. Se complementó la conformación del receptor con la adición del MCH a una concentración de 5 μ M durante 5 min de incubación. Para la detección del ADN objetivo o sonda complementaria, se sumergió el biosensor bajo una solución tampón de PBS 0.1 M pH 7.4 con 5 mM de $MgCl_2$ a una concentración determinada de la sonda de ADN complementario durante 35 min a temperatura ambiente.

Se logró la dispersión del óxido de grafeno y los nanotubos de carbono multipared conservando cada una sus propiedades estructurales y conductora. Se depositó sobre los electrodos serigrafiados a concentraciones de 0.05 mg/mL (GO) y 0.001 mg/mL (MWCNT). Se diseñaron cuatro transductores obteniéndose valores del área electroactiva de 3.98 mm² (SPE/GO), 4.08 mm² (SPE/MWCNT), 4.25 mm² (SPE/GO/MWCNT) y 4.43 mm² (SPE/MWCNT/GO). La plataforma biosensora modificada con nanotubos de carbono multipared (SPE/MWCNT), resultó ser más eficientes electroquímicamente empleando medidas de voltamperometría de onda cuadrada ($\frac{I_0-I}{I_0}=0.24 \pm 0.007 \mu A$), que las otras plataformas para la detección de sonda de ADN complementario.

Se obtuvo dos biosensores reproducibles con sus respectivas curvas de calibración, resultando las ecuaciones de $\frac{I_0-I}{I_0}(\mu A) = 0.04532 \text{Log} C_{ADN} + 0.2835$ para el Biosensor 1 (SPE-AuNPs) y $\frac{I_0-I}{I_0}(\mu A) = 0.04692 \text{Log} C_{ADN} + 0.2962$ para el Biosensor 2 (SPE-MWCNT-AuNPs), presentando mayor sensibilidad en el Biosensor 2. Alcanzando un límite de detección para cada dispositivo de 0.05154 nmol/L (Biosensor 1) y 0.2621 (Biosensor 2). Los biosensores resultaron parcialmente selectivos, detectando una señal del 30.81% y 48.31% de los biosensores 1 y 2 de sonda no complementaria respectivamente. Respecto a la estabilidad, los biosensores presentaron una estabilidad en la inmovilización del receptor. Sin embargo, al detectar la sonda complementaria no hubo una detección aceptable. Por lo tanto, se debe emplear el biosensor recién preparado.

9. Recomendaciones

Cabe resaltar que este trabajo es uno de los primeros que se realiza en los grupos de investigación partícipes, con relación al tema de los biosensores electroquímicos, por lo que se proponen las siguientes recomendaciones para contribuir con su avance y desarrollo.

Estudiar el número de ciclos aplicados a la activación del electrodo de trabajo con lavado de 0.5 M de ácido sulfúrico con el fin de aumentar la actividad electroquímica de la superficie, especialmente luego de sintetizar nanopartículas de oro por electrodeposición. De la misma manera, aplicar un lavado antes de inmovilizar el receptor para evitar la oxidación de las nanopartículas.

Evaluar la temperatura de hibridación con el fin de optimizar la detección de la sonda complementaria, teniendo como punto de referencia 37°C.

Cambiar la solución de inmovilización del aptámero tiolado, para mirar el efecto de la fuerza iónica y el pH sobre la conformación de la estructura y optimización de la señal de la respuesta electroquímica.

Evaluar el tiempo de detección del analito a tiempos inferiores y superiores de 35 min, con el fin de encontrar la señal de saturación. Al mismo tiempo emplear otras matrices en la disolución del analito como agua y otras soluciones tampón (TE, EDTA ó Tris-HCl).

Emplear azul de metileno (u otras moléculas redox) como indicador electroquímico, con el fin aumentar más formas de detección y corroborar el buen funcionamiento del receptor estudiado.

Realizar pruebas de estabilidad de los biosensores a temperaturas inferiores de -20 °C con el fin de crear lotes de biosensores y no necesariamente de forma instantánea.

Realizar pruebas de validación a partir de la detección del mismo analito por técnicas como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o pruebas convencionales.

A partir de las plataformas obtenidas se puede ampliar el estudio de otros receptores, por ejemplo, la inmovilización de aptámeros con mayor número de nucleótidos, péptidos, moléculas inorgánicas, entre otros.

Se sugiere estudiar el parámetro de la selectividad aplicando más tipos de analitos diferentes al analito objetivo.

Referencias bibliográficas

- Abdalahi, M. H., Maximiano Fernandes, A., Bashari, M., Ji, J., He, Q., & Sun, X. (2014). Rapid and sensitive detection of foodborne pathogenic bacteria (staphylococcus aureus) using an electrochemical DNA genomic biosensor and its application in fresh beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(52), 12659–12667. <https://doi.org/10.1021/jf503914f>
- Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2008). Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry. A review. *Analytica Chimica Acta*, 622(1–2), 11–47. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.070>
- Ahmad, R., Wolfbeis, O. S., Hahn, Y. B., Alshareef, H. N., Torsi, L., & Salama, K. N. (2018). Deposition of nanomaterials: A crucial step in biosensor fabrication. *Materials Today Communications*, 17(July), 289–321. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2018.09.024>
- Alex, S., & Tiwari, A. (2015). Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, properties and applications-A review. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(3), 1869–1894. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9718>
- Alves Ferreira, M. A. (2016). Técnicas electroquímicas para la determinación y especiación de arsénico en aguas. In *Metodologías Analíticas Para La Determinación Y Especiación De As En Aguas Y Suelos* (pp. 185–210).
- Amiri, M., Bezaatpour, A., Jafari, H., Boukherroub, R., & Szunerits, S. (2018b). Electrochemical Methodologies for the Detection of Pathogens. *ACS Sensors*. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b00239>

- Amor, O. (2015). *Sensor enzimático de papel (Maestría)*. Universidad de Oviedo.
- Antuña-Jiménez, D., González-García, M. B., Hernández-Santos, D., & Fanjul-Bolado, P. (2020). Screen-printed electrodes modified with metal nanoparticles for small molecule sensing. *Biosensors*, 10(2), 1–22. <https://doi.org/10.3390/bios10020009>
- Arcidiacono, S., Bieri, N. R., Poulidakos, D., & Grigoropoulos, C. P. (2004). On the coalescence of gold nanoparticles. *International Journal of Multiphase Flow*, 30(7-8 SPEC. ISS.), 979–994. <https://doi.org/10.1016/j.ijmultiphaseflow.2004.03.006>
- ARIKSOYSAL, D. (2019). Electrochemical Investigation of Carbon Nanotube Modified Surfaces Based on Ferricyanide and Guanine Signals for DNA Biosensor Applications. *Cumhuriyet Science Journal*, 40. <https://doi.org/10.17776/csj.441382>
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). Electrochemical methods. Fundamentals and applications. In J. W. & Sons (Ed.), *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* (2nd ed., Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00056-9>
- Barker, D., & Walsh, F. C. (1991). Applications of Faraday's Laws of Electrolysis in metal finishing. *Transactions of the Institute of Metal Finishing*, 69(pt 4), 158–162. <https://doi.org/10.1080/00202967.1991.11870915>
- Barreiros dos Santos, M., Agusil, J. P., Prieto-Simón, B., Sporer, C., Teixeira, V., & Samitier, J. (2013). Highly sensitive detection of pathogen Escherichia coli O157: H7 by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 45(1), 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.01.009>
- Benvidi, A., Firouzabadi, A. D., Moshtaghiun, S. M., Mazloun-Ardakani, M., & Tezerjani, M. D. (2015). Ultrasensitive DNA sensor based on gold nanoparticles/reduced graphene

oxide/glassy carbon electrode. *Analytical Biochemistry*, 484, 24–30.

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.05.009>

Biotechnology, D. of C. E. and. (2013). Linear Sweep and Cyclic Voltametry: The Principles.

Retrieved from University of Cambridge website:

[https://www.ceb.cam.ac.uk/research/groups/rg-eme/Edu/linear-sweep-and-cyclic-](https://www.ceb.cam.ac.uk/research/groups/rg-eme/Edu/linear-sweep-and-cyclic-voltametry-the-principles)

[voltametry-the-principles](https://www.ceb.cam.ac.uk/research/groups/rg-eme/Edu/linear-sweep-and-cyclic-voltametry-the-principles)

Bîru, E. I., & Iovu, H. (2018). Graphene Nanocomposites Studied by Raman Spectroscopy.

In *Raman Spectroscopy* (pp. 180–190). <https://doi.org/10.5772/intechopen.73487>

Bock Gu, M., & Hak-Sung, K. (2014). *Biosensors Based on Aptamers and Enzymes*.

Bravo Segura, I. (2017). *Interacción de nanoestructuras de carbono o metálicas con*

(bio)moléculas y su aplicación al desarrollo de sensores (Tesis Doctoral) (Universidad

Autónoma de Madrid, Madrid.). Retrieved from

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=135986>

Brosel-Oliu, S., Ferreira, R., Uria, N., Abramova, N., Gargallo, R., Muñoz-Pascual, F. X., &

Bratov, A. (2018). Novel impedimetric aptasensor for label-free detection of

Escherichia coli O157:H7. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 255, 2988–2995.

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.121>

Cajigas, S., Alzate, D., & Orozco, J. (2020). Gold nanoparticle/DNA-based

nanobioconjugate for electrochemical detection of Zika virus. *Microchimica Acta*,

187(11), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04568-1>

Carrascosa, L. G., Sina, A. A. I., Palanisamy, R., Sepulveda, B., Otte, M. A., Rauf, S., ...

Trau, M. (2014). Molecular inversion probe-based SPR biosensing for specific, label-

free and real-time detection of regional DNA methylation. *Chemical Communications*, 50(27), 3585–3588. <https://doi.org/10.1039/c3cc49607d>

Castillo, J. (2009). CONSTRUCCIÓN DE UN ELECTRODO ENZIMÁTICO PARA LA OPTIMIZACIÓN Y DISEÑO DE BIOSENSORES Y CELDAS DE BIOCOMBUSTIBLE. *Memorias Del IV Simposio de Química Aplicada – SIQUIA 2009*.

Childres, I., Jauregui, L. A., Park, W., Caoa, H., & Chena, Y. P. (2013). Raman spectroscopy of graphene and related materials. *New Developments in Photon and Materials Research*, 403–418.

Congur, G., Sayar, F., Erdem, A., & Piskin, E. (2013). Voltammetric and impedimetric DNA detection at single-use graphite electrodes modified with gold nanorods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.040>

Diard, J.-P., Gorrec, B., & Le Montella, C. (2013). Handbook of Electrochemical Impedance Spectroscopy. Electrical circuits containing CPEs. *Handbook of Electrochemical Impedance Spectroscopy*, 33. Retrieved from <http://www.bio-logic.info/potentiostat-electrochemistry-ec-lab/apps-literature/eis-literature/hanbook-of-eis/>

Díaz del Castillo, F. (2012). Introducción a Los Nanomateriales. In *Lecturas de Ingeniería* 20 (pp. 10–46). Cuatitlán Izcalli.

Dominguez Fernandez, E., Pérez-Peréz, A., Turbon, D., & Arroyo-Pardo, E. (2008). ADN ANTIGUO: Química y Aplicaciones. *Annales de La Real Sociedad Española de Química*, 27–37.

Dosal, M. A., & Villanueva, M. (2008). Introducción a la metrología química: Curvas de

- calibración en lo métodos analíticos. In *Antología de Química Analítica Experimental* (pp. 18–26). Retrieved from http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION_23498.pdf
- Drahansky, M., Paridah, M. ., Moradbak, A., Mohamed, A. ., Owolabi, F. abdulwahab taiwo, Asniza, M., & Abdul Khalid, S. H. . (2016). We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. *Intech, i(tourism)*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Duan, W. H., Wang, Q., & Collinsa, F. (2011). *Chemical Science*. 2(7). <https://doi.org/10.1039/c0sc00616e>
- Dudin, P. V., Unwin, P. R., & Macpherson, J. V. (2010). Electrochemical nucleation and growth of gold nanoparticles on single-walled carbon nanotubes: New mechanistic insights. *Journal of Physical Chemistry C*, 114(31), 13241–13248. <https://doi.org/10.1021/jp1043706>
- Eissa, S., Almusharraf, A. Y., & Zourob, M. (2019). A comparison of the performance of voltammetric aptasensors for glycated haemoglobin on different carbon nanomaterials-modified screen printed electrodes. *Materials Science and Engineering C*, 101(November 2018), 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.001>
- El-deab, M. S., Sotomura, T., & Ohsaka, T. (2005). *Size and Crystallographic Orientation Controls of Gold Nanoparticles Electrodeposited on GC Electrodes*. 1–6. <https://doi.org/10.1149/1.1824041>
- Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical*

- Education*, 95(2), 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>
- Erdem, A. (2007). Nanomaterial-based electrochemical DNA sensing strategies. *Talanta*, 74(3), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.10.012>
- Espinosa, C., Ortiz-Trujillo, I. C., Carlos-Cornelio, J. A., Zapata-Hernández, R. D., & Hoyos-Palacio, L. M. (2017). Carbon nanotube dispersion for in-vitro applications. *Dyna*, 84(203), 24–30. <https://doi.org/10.15446/dyna.v84n203.64132>
- Etesami, M., Karoonian, F. S., & Mohamed, N. (2011). *Electrochemical Deposition of Gold Nanoparticles on Pencil Graphite by Fast Scan Cyclic Voltammetry*. (100), 688–693.
- Feng, D., Lu, X., Dong, X., Ling, Y., & Zhang, Y. (2013). Label-free electrochemical immunosensor for the carcinoembryonic antigen using a glassy carbon electrode modified with electrodeposited Prussian Blue, a graphene and carbon nanotube assembly and an antibody immobilized on gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, 180(9–10), 767–774. <https://doi.org/10.1007/s00604-013-0985-8>
- Gao, Q., Zhang, W., Guo, Y., Qi, H., & Zhang, C. (2011). Highly sensitive impedimetric sensing of DNA hybridization based on the target DNA-induced displacement of gold nanoparticles attached to ssDNA probe. *Electrochemistry Communications*, 13(4), 335–337. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2011.01.018>
- González-Carrato, V. (2015). *Biosensores electroquímicos basados en nanomateriales y en materiales magnéticos para la determinación de analitos de interés bioquímico (Tesis Doctoral)*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- González García, S. (2015). *Reconocimiento Molecular Mediante Aptámeros de Péptidos Inmunotóxicos de Gluten (Maestría)*. Universidad de Oviedo, Oviedo.

- Gramy Instruments Inc. (2014). Basics of Electrochemical Impedance Spectroscopy Impedance Values. *Application Note Rev. 2.0*, (215), 1–28.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors (Switzerland)*, (January), 1400–1458.
- Grujicic, D., & Pesic, B. (2002). Electrodeposition of copper: The nucleation mechanisms. *Electrochimica Acta*, 47(18), 2901–2912. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(02\)00161-5](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(02)00161-5)
- Hajihosseini, S., Nasirizadeh, N., Hejazi, M. S., & Yaghmaei, P. (2016). A sensitive DNA biosensor fabricated from gold nanoparticles and graphene oxide on a glassy carbon electrode. *Materials Science and Engineering C*, 61, 506–515. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.091>
- Hartati, Y. W., Suryani, A. A., Agustina, M., Gaffar, S., & Anggraeni, A. (2019). A Gold Nanoparticle–DNA Bioconjugate–Based Electrochemical Biosensor for Detection of *Sus scrofa* mtDNA in Raw and Processed Meat. *Food Analytical Methods*, 12(11), 2591–2600. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01593-6>
- Hernández, Frank J., Botero-Hincapié, J. A. (2012). Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos. *Iatreria*, 25(1–2), 159–168.
- Hernandez, F. J., & Ozalp, V. C. (2012). Graphene and other nanomaterial-based electrochemical aptasensors. *Biosensors*, 2(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/bios2010001>
- Hezard, T., Fajerweg, K., Evrard, D., Collière, V., Behra, P., & Gros, P. (2012). Influence

of the gold nanoparticles electrodeposition method on Hg(II) trace electrochemical detection. *Electrochimica Acta*, 73, 15–22.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.10.101>

Hezard, T., Fajerwerg, K., Evrard, D., Vincent, C., Philippe, B., & Gros, P. (2012). Gold nanoparticles electrodeposited on glassy carbon using cyclic voltammetry: Application to Hg(II) trace analysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 664(Ii), 46–52.

Housaindokht, M. R., Verdian, A., Sheikhzadeh, E., Pordeli, P., Rouhbakhsh Zaeri, Z., Janati-Fard, F., ... Solimani, S. (2018). A sensitive electrochemical aptasensor based on single wall carbon nanotube modified screen printed electrode for detection of Escherichia coli O157:H7. *Advanced Materials Letters*, 9(5), 369–374.
<https://doi.org/10.5185/amlett.2018.1701>

Jagadish, K., Srikantaswamy, S., Byrappa, K., Shruthi, L., & Abhilash, M. R. (2015). Dispersion of Multiwall Carbon Nanotubes in Organic Solvents through Hydrothermal Supercritical Condition. *Journal of Nanomaterials*, 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/381275>

Jahandari, S., Taher, M. A., Karimi-Maleh, H., Khodadadi, A., & Faghih-Mirzaei, E. (2019). A powerful DNA-based voltammetric biosensor modified with Au nanoparticles, for the determination of Temodal; an electrochemical and docking investigation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 840(January), 313–318.
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.03.049>

Jiménez, C. León, D. (2009). Biosensores : Aplicaciones y PERSPECTIVAS en el control y calidad de procesos y Productos Alimenticios. *Revista de La Facultad de Química*

Farmacéutica. Universidad de Antioquia, 16, 144–154.

Kajal, P., Ghosh, K., & Powar, S. (2018). *Manufacturing Techniques of Perovskite Solar Cells*. 341–364. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7206-2_16

Keighley, S. D., Li, P., Estrela, P., & Migliorato, P. (2008). Optimization of DNA immobilization on gold electrodes for label-free detection by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics, 23*(8), 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.11.012>

Lai, Q., Zhu, S., Luo, X., Zou, M., & Huang, S. (2012). Ultraviolet-visible spectroscopy of graphene oxides. *AIP Advances, 2*(3), 3–8. <https://doi.org/10.1063/1.4747817>

Leary, J. J. (2010). *ANALISIS INSTRUMENTAL Calibración y Límite de Detección en Técnicas Instrumentales*.

Lee, T. M. H. (2008). Over-the-counter biosensors: Past, present, and future. *Sensors, 8*(9), 5535–5559. <https://doi.org/10.3390/s8095535>

Li, Z., Cui, R., Tian, C., Chen, D., Han, Z., Zhai, C., ... Zhang, G. (2017). Design and tailoring of a three-dimensional reduced graphene oxide/helical carbon nanotube composite for electrochemical biosensing application. *Journal of Solid State Electrochemistry, 21*(12), 3675–3681. <https://doi.org/10.1007/s10008-017-3711-3>

Liang, P., Canoura, J., Yu, H., Alkhamis, O., & Xiao, Y. (2018). Dithiothreitol-Regulated Coverage of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles to Achieve Optimized Biosensor Performance. *ACS Applied Materials and Interfaces, 10*(4), 4233–4242. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b16914>

- Ligaj, M., Tichoniuk, M., Gwiazdowska, D., & Filipiak, M. (2014). Electrochemical DNA biosensor for the detection of pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*. *Electrochimica Acta*, 128, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.10.061>
- Loos, M. (2007). Carbon Nanotube Reinforced Composites. In *Journal of the Society of Mechanical Engineers* (Vol. 110). https://doi.org/10.1299/jsmemag.110.1060_192
- Lucarelli, F., Marrazza, G., Turner, A. P. F., & Mascini, M. (2004). Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(6), 515–530. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00256-2](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00256-2)
- Luo, C., Lei, Y., Yan, L., Yu, T., Li, Q., Zhang, D., ... Ju, H. (2012). A Rapid and Sensitive Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Direct Detection of Escherichia Coli O111. *Electroanalysis*, 24(5), 1186–1191. <https://doi.org/10.1002/elan.201100700>
- Luo, C., Tang, H., Cheng, W., Yan, L., Zhang, D., Ju, H., & Ding, S. (2013). A sensitive electrochemical DNA biosensor for specific detection of Enterobacteriaceae bacteria by Exonuclease III-assisted signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 48, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.03.084>
- Ma, X., Jiang, Y., Jia, F., Yu, Y., Chen, J., & Wang, Z. (2014a). An aptamer-based electrochemical biosensor for the detection of Salmonella. *Journal of Microbiological Methods*, 98(1), 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.01.003>
- Ma, X., Jiang, Y., Jia, F., Yu, Y., Chen, J., & Wang, Z. (2014b). An aptamer-based electrochemical biosensor for the detection of Salmonella. *Journal of Microbiological Methods*, 98(1), 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.01.003>
- Martínez, G. (2012). *Screen-Printed Electrodes for Electrochemical DNA Detection* (Vol.

9). Asturias, España.

Mirceski, V., Skrzypek, S., & Stojanov, L. (2018). Square-wave voltammetry. *ChemTexts*, 4(4), 0. <https://doi.org/10.1007/s40828-018-0073-0>

Mishra, G. K. (2018). *Electrochemical Aptasensors for Food and Environmental Safeguarding : A Review*. 1–13. <https://doi.org/10.3390/bios8020028>

Mohammad-Razdari, A., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Izadi, Z., Ensafi, A. A., Rostami, S., & Siadat, M. (2019). An impedimetric aptasensor for ultrasensitive detection of Penicillin G based on the use of reduced graphene oxide and gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, 186(6), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3510-x>

Mohan Mundotiya, B., & Wahdat, U. (2016). Morphology Controlled Synthesis of the Nanostructured Gold by Electrodeposition Techniques. In *Web science core collection* (p. 13). Retrieved from <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>

Mohanty, U. S. (2011). Electrodeposition: A versatile and inexpensive tool for the synthesis of nanoparticles, nanorods, nanowires, and nanoclusters of metals. *Journal of Applied Electrochemistry*, 41(3), 257–270. <https://doi.org/10.1007/s10800-010-0234-3>

Moosavi, S. M., & Ghassabian, S. (2018). Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72932>

Moran, K. L. M., Fitzgerald, J., Mcpartlin, D. A., & Loftus, J. H. (2016). Biosensor-Based Technologies for the Detection of Pathogens and Toxins. In *Comprehensive Analytical*

Chemistry (Vol. 74). <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2016.04.002>

Moreno, M., Rincon, E., Pérez, J. M., González, V. M., Domingo, A., & Dominguez, E. (2009). Selective immobilization of oligonucleotide-modified gold nanoparticles by electrodeposition on screen-printed electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4), 778–783. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.08.028>

Murugaiyan, S. B., Ramasamy, R., Gopal, N., & Kuzhandaivelu, V. (2014). Biosensors in clinical chemistry : An overview. *Advanced Biomedical Research*.

Ocaña Tejada, C. (2011). *Aptasensores impedimétricos para la detección de trombina (Maestría)*. Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra.

Ojeda, C. (2009). Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial Oficina Asesora Jurídica República de Colombia. *Ministerio De Vivienda*, (8), 1–2.

Olaya, S., & Ulises, A. (2018). *Diseño y desarrollo de sensores y biosensores para monitoreo de procesos biohidrometalúrgicos*. 217. Retrieved from https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n6381_SaavedraOlaya.pdf

OMS. (2015). Las enfermedades de transmisión alimentaria en la Región de las Américas. Retrieved from https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg_infographics/es/

OMS. (2020). Inocuidad de los alimentos. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

Ordúz, A. (2017). *Desarrollo de un biosensor basado en electrodos de nanotubos de carbono modificados con peroxidasa de pasto guine (Panicum maximum) para la determinación*

de triclosan (Tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

Ortega, A., Russo, B., Acero, A., Lorén, J., & Ruiz, O. (2015). *Tecnologías de Biosensores en la medida de la calidad de agua*.

Ozkan-Ariksoysal, D., Kayran, Y. U., Yilmaz, F. F., Ciucu, A. A., David, I. G., David, V., ... Ozsoz, M. (2017a). DNA-wrapped multi-walled carbon nanotube modified electrochemical biosensor for the detection of *Escherichia coli* from real samples. *Talanta*, 166(December 2016), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.005>

Ozkan-Ariksoysal, D., Kayran, Y. U., Yilmaz, F. F., Ciucu, A. A., David, I. G., David, V., ... Ozsoz, M. (2017b). DNA-wrapped multi-walled carbon nanotube modified electrochemical biosensor for the detection of *Escherichia coli* from real samples. *Talanta*, 166(October 2016), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.005>

Palchetti, I., & Mascini, M. (2012). *Electrochemical nanomaterial-based nucleic acid aptasensors*. 3103–3114. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5769-1>

Pardo, W. A. (2016). *Development of electrochemical platform for DNA sensing (Ph.D project)*. Universidad de Barcelona, Barcelona.

Pei, Q., Wang, Y., Liu, S., Qin, Y., Leng, X., Cui, X., & Huang, J. (2017). Exonuclease III-aided autonomous cascade signal amplification: A facile and universal DNA biosensing platform for ultrasensitive electrochemical detection of *S. typhimurium*. *New Journal of Chemistry*, 41(15), 7613–7620. <https://doi.org/10.1039/c7nj01626c>

Perdomo, M. (2017). Artículo técnico: Análisis químico, medir es comparar. *Área Salud y Seguridad*, 0(0), 1–6.

- Pingarrón, José M. Sánchez, P. (1999). *Química electroanalítica: Fundamentos y aplicaciones* (Síntesis, Ed.). Madrid.
- Piroozmand, F., Mohammadipanah, F., & Faridbod, F. (2020). Emerging biosensors in detection of natural products. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 5(4), 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.08.002>
- Rasheed, P. Abdul, & Sandhyarani, N. (2017). Carbon nanostructures as immobilization platform for DNA: A review on current progress in electrochemical DNA sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 97(March), 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.06.001>
- Rasheed, Pathath Abdul, & Sandhyarani, N. (2017). Electrochemical DNA sensors based on the use of gold nanoparticles: a review on recent developments. *Microchimica Acta*, 184(4), 981–1000. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2143-1>
- 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(August), 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2017.09.001>
- Renedo, O. D., Alonso-Lomillo, M. A., & Martínez, M. J. A. (2007). Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73(2), 202–219. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.03.050>
- Ríos-Tobón, S., Agudelo-Cadavid, R. M., & Gutiérrez-Builes, L. A. (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 35(2), 236–247.

<https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08>

Rodríguez, S., Tutor, B., Jarque, J. C., Supervisora, F., & Segarra Ferrando, C. (2015).

Máster en Ciencia y Tecnología de los Materiales Cerámicos Estudio de dispersión de nanopartículas de grafeno en agua Trabajo final de máster. Proyecto de investigación (SIT043). Retrieved from

http://repositori.uji.es/xmlui/bitstream/handle/10234/167067/TFM_2015_rodriguezS.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Rozenblum, G. T., Pollitzer, I. G., & Radrizzani, M. (2019). Challenges in electrochemical aptasensors and current sensing architectures using flat gold surfaces. *Chemosensors*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/chemosensors7040057>

Sadegh, H., & Shahryari-ghoshekandi, R. (2015). Functionalization of carbon nanotubes and its application in nanomedicine: a review. *Nanomed*, 2(July), 231–248. <https://doi.org/10.7508/nmj>

Shahrokhian, S., & Rastgar, S. (2012). Electrochemical deposition of gold nanoparticles on carbon nanotube coated glassy carbon electrode for the improved sensing of tinidazole. *Electrochimica Acta*, 78, 422–429. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.06.035>

Sigma-Aldrich. (2020). Carbon nanotube, multi-walled, carboxylic acid functionalized. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/755125?lang=en®ion=CO>

Sigmaaldrich. (2018). Protocol for Thiol-Modified Oligonucleotide DDT Reduction. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/oligo-reduction.html>

- Špringer, T., Šípová, H., Vaisocherová, H., Štěpánek, J., & Homola, J. (2010). Shielding effect of monovalent and divalent cations on solid-phase DNA hybridization: Surface plasmon resonance biosensor study. *Nucleic Acids Research*, 38(20), 7343–7351. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq577>
- Stoytcheva, M., Zlatev, R., Velkova, Z., Valdez, B., & Ovalle, M. (2009). *Analytical Characteristics of Electrochemical Biosensors*. 27(3), 353–362. <https://doi.org/10.4152/pea.200903353>
- Sun, G., Liu, Z., & Chen, G. (2010). Dispersion of pristine multi-walled carbon nanotubes in common organic solvents. *Nano*, 5(2), 103–109. <https://doi.org/10.1142/S1793292010001986>
- Taranejoo, S., & Moghri, M. (2014). Development of a novel electrochemical biosensor based on catalytic properties of adenosine deaminase immobilized on graphene oxide/carboxymethyl chitosan/multi-wall carbon nanotube platform. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 87(1), 69–75. <https://doi.org/10.1134/S1070427214010108>
- Taylor, P., Hilding, J., Grulke, E. A., Zhang, Z. G., & Lockwood, F. (2011). Journal of Dispersion Science and Technology Dispersion of Carbon Nanotubes in Liquids. *Journal of Dispersion Science and Technology*, (July), 37–41.
- Thangamuthu, M., Hsieh, K. Y., Kumar, P. V., & Chen, G. Y. (2019). Graphene- and Graphene Oxide-Based Nanocomposite Platforms for Electrochemical Biosensing Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20122975>
- Thevenot, D., Toth, K., Durst, R., Wilson, G., Thevenot, D., Toth, K., ... Wilson, G. (2013).

Electrochemical biosensors : recommended definitions and classification To cite this version : HAL Id : hal-00862855 ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS : RECOMMENDED.

- Thuy, N. T., Tam, P. D., Tuan, M. A., Le, A. T., Tam, L. T., Van Thu, V., ... Chien, N. D. (2012). Detection of pathogenic microorganisms using biosensor based on multi-walled carbon nanotubes dispersed in DNA solution. *Current Applied Physics*, 12(6), 1553–1560. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2012.04.035>
- Tiwari, I., Singh, M., Pandey, C. M., & Sumana, G. (2015). Electrochemical detection of a pathogenic Escherichia coli specific DNA sequence based on a graphene oxide-chitosan composite decorated with nickel ferrite nanoparticles. *RSC Advances*, 5(82), 67115–67124. <https://doi.org/10.1039/c5ra07298k>
- Tonelli, D., Scavetta, E., & Gualandi, I. (2019). *Electrochemical Deposition of Nanomaterials for Electrochemical Sensing*. <https://doi.org/10.3390/s19051186>
- Varela, Z. S., Lavalle, L. P., & Alvarado, D. E. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: Una mirada en Colombia. *Salud Uninorte*, 32(1), 105–122.
- Vazquez Gutierrez, J. L. (2007). EMPLEO DE LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIAS ELECTROQUÍMICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE BIOMATERIALES. APLICACIÓN A UNA ALEACIÓN BIOMÉDICA DE Co-Cr-Mo (Maestría). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Viet, N. X., & Takamura, Y. (2016). *Electrodeposited Gold Nanoparticles Modified Screen Printed Carbon Electrode for Enzyme-Free Glucose Sensor Application*. 32(4), 83–89.
- Wang, C., Yuan, X., Liu, X., Gao, Q., Qi, H., & Zhang, C. (2013). Signal-on impedimetric

electrochemical DNA sensor using dithiothreitol modified gold nanoparticle tag for highly sensitive DNA detection. *Analytica Chimica Acta*, 799, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.09.024>

Wang, Jie, Li, S., & Zhang, Y. (2010). A sensitive DNA biosensor fabricated from gold nanoparticles, carbon nanotubes, and zinc oxide nanowires on a glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta*, 55(15), 4436–4440. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.02.078>

Wang, Jinping, Leong, M. C., Leong, E. Z. W., Kuan, W. Sen, & Leong, D. T. (2017). Clinically Relevant Detection of *Streptococcus pneumoniae* with DNA-Antibody Nanostructures. *Analytical Chemistry*, 89(12), 6900–6906. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01508>

Wang, Joseph. (2003). Nanoparticle-based electrochemical DNA detection. *Analytica Chimica Acta*, 500(1–2), 247–257. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00725-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00725-6)

Wang, L., Chen, X., Wang, X., Han, X., Liu, S., & Zhao, C. (2011). Electrochemical synthesis of gold nanostructure modified electrode and its development in electrochemical DNA biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 30(1), 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.09.003>

Wang, X., Lai, W., Man, T., Qu, X., Li, L., Chandrasekaran, A. R., & Pei, H. (2018). Bio-surface engineering with DNA scaffolds for theranostic applications. *Nanofabrication*, 4(1), 1–16. <https://doi.org/10.1515/nanofab-2018-0001>

Wang, Y., Shi, Z., Huang, Y., Ma, Y., Wang, C., Chen, M., & Chen, Y. (2009). The Journal of Physical Chemistry C Volume 113 issue 30 2009 [doi 10.1021%2Fjp902214f] Wang,

- Yan; Shi, Zhiqiang; Huang, Yi; Ma, Yanfeng; Wang, Chengyan -- Supercapacitor Devices Based on Graphene Materials.pdf. *Journal of Physical Chemistry C*, 113(30 2009), 13103–13107.
- Wu, N. ying, Gao, W., He, X. lun, Chang, Z., & Xu, M. tian. (2013). Direct electrochemical sensor for label-free DNA detection based on zero current potentiometry. *Biosensors and Bioelectronics*, 39(1), 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.038>
- Ximena, A., Velasco, V., Ximena, A., & Velasco, V. (2017). *Desarrollo y caracterización de un sensor basado en nanoestructuras de carbono contenido en polímeros conductores para aplicaciones óseas* Desarrollo y caracterización de un sensor basado en nanoestructuras de carbono contenido en polímeros conductores par.
- Yamanaka, K., Vestergaard, M. C., & Tamiya, E. (2016). Printable electrochemical biosensors: A focus on screen-printed electrodes and their application. *Sensors (Switzerland)*, 16(10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/s16101761>
- Yang, W., Ratinac, K. R., Ringer, S. R., Thordarson, P., Gooding, J. J., & Braet, F. (2010). Carbon nanomaterials in biosensors: Should you use nanotubes or graphene. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49(12), 2114–2138. <https://doi.org/10.1002/anie.200903463>
- Zhang, J., & Gao, L. (2007). *Dispersion of multiwall carbon nanotubes by sodium dodecyl sulfate for preparation of modified electrodes toward detecting hydrogen peroxide*. 61, 3571–3574. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.11.138>
- Zhao, G., & Liu, G. (2019). Electrochemical deposition of gold nanoparticles on reduced graphene oxide by fast scan cyclic voltammetry for the sensitive determination of

As(III). *Nanomaterials*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/nano9010041>

Zhao, Y., Wang, H., Jia, G., & Li, Z. (2018). *Application of Aptamer-Based Biosensor for Rapid Detection of Pathogenic Escherichia coli*. 1–16. <https://doi.org/10.3390/s18082518>

Zheng, D., Vashist, S. K., Dykas, M. M., Saha, S., Al-Rubeaan, K., Lam, E., ... Sheu, F. S. (2013). Graphene versus multi-walled carbon nanotubes for electrochemical glucose biosensing. *Materials*, 6(3), 1011–1027. <https://doi.org/10.3390/ma6031011>

Zhu, L., Liu, Y., Yang, P., & Liu, B. (2015). Label-free Aptasensor based on Electrodeposition of Gold Nanoparticles on Graphene and Its Application in the Quantification of Adenosine Triphosphate. *Electrochimica Acta*, 172, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.04.100>

Apéndices

A. Definición de los parámetros de las condiciones de trabajo de la técnica SWV

Para establecer las condiciones de trabajo de la técnica de SWV, se estudiaron sus parámetros principales: El pulso de altura (PH), el paso de altura (SH) y la frecuencia (f)). Para esto, se estudió cada parámetro variando uno y fijando los dos parámetros restantes. Por ejemplo, al variar el valor de frecuencias se dejaba fijo el pulso de altura y el paso de altura. Se estudiaron tres pulsos de altura como se muestra en la Tabla A1.

Tabla A.A1.

Condiciones estudiadas

SWV variación de f [Hz]	SWV variación de SH [mV]	SWV variación de f	SWV variación de SH [mV]	SWV variación de f	SWV variación de SH [mV]
2	1	2	1	2	1
5	2.5	5	2.5	5	2.5
10	5	10	5	10	5
15	7.5	15	7.5	15	7.5
20	10	20	10	20	10
Condiciones fijas					
SH= 5 mV f= 10 Hz		SH= 5 mV f= 10 Hz		SH= 5 mV f= 10 Hz	
PH= 25 mV		PH= 50 mV		PH= 75 mV	

Los resultados se analizaron de forma cualitativa a partir de los voltamperogramas de onda cuadrada obtenidos para cada caso.

Figura A1. SWV variando la f (a la izquierda) y SH (a la derecha) a un pulso de altura de 25 mV usando 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución acuosa con 0.1 M de KCl

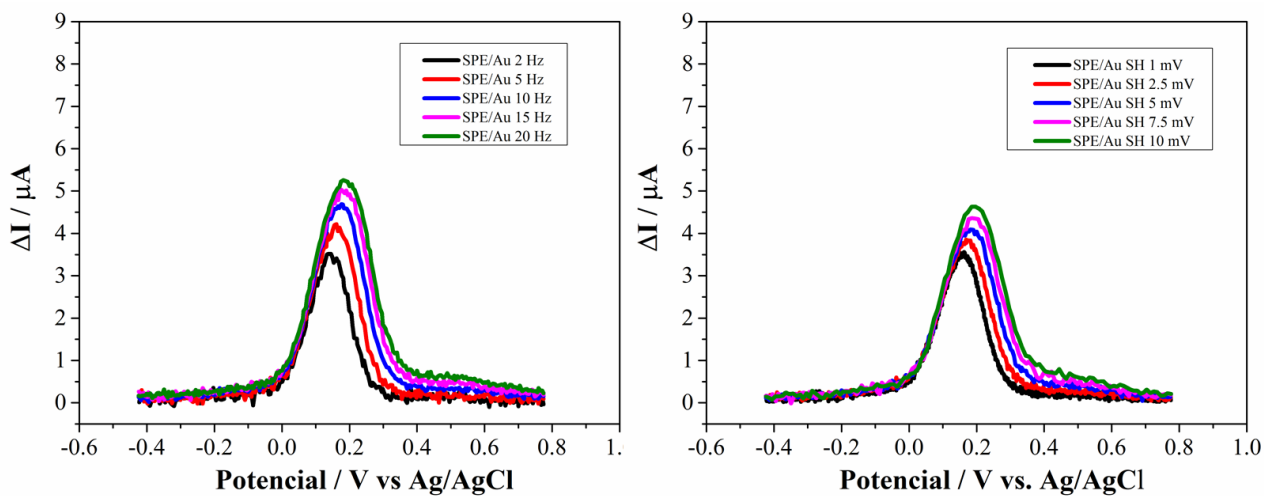


Figura A2. SWV variando la f (a la izquierda) y SH (a la derecha) a un pulso de altura de 50 mV usando 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución acuosa con 0.1 M de KCl

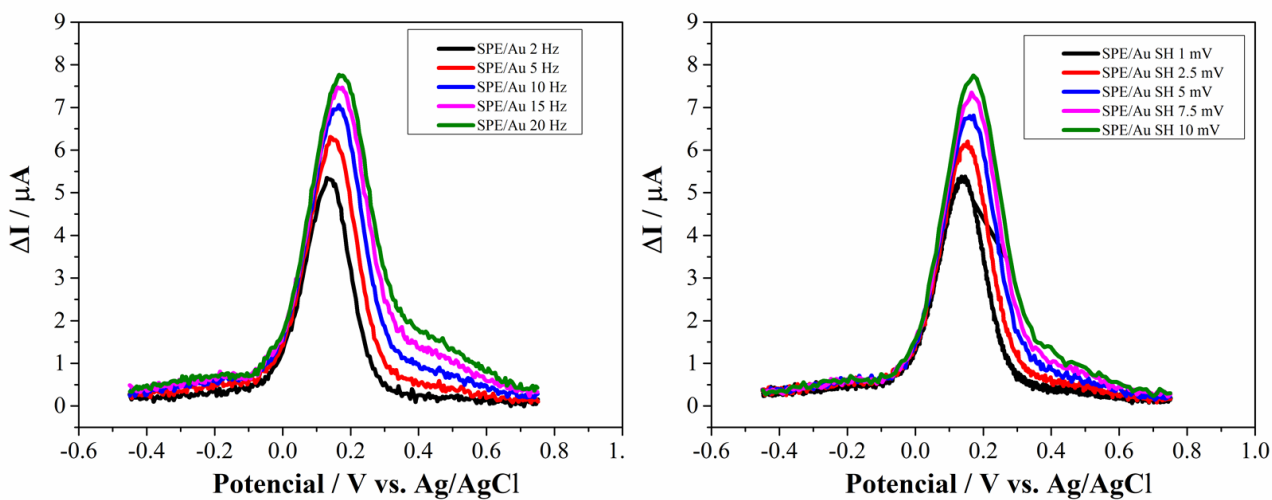
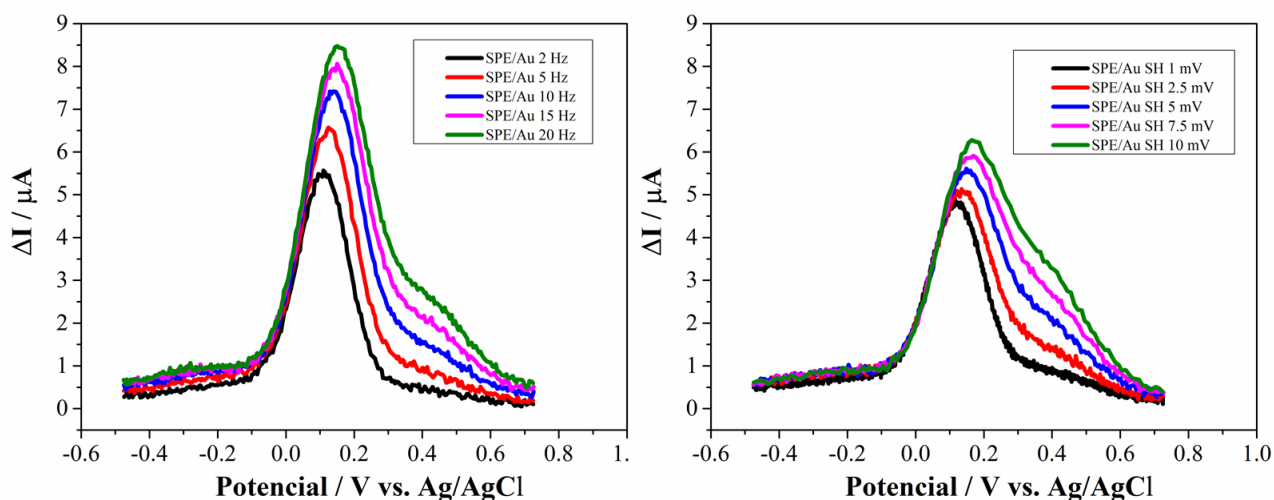


Figura A3. SWV variando la f (a la izquierda) y SH (a la derecha) a un pulso de paso de 75 mV usando 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución acuosa con 0.1 M de KCl



Al observar los resultados SWV se observa, que al cambiar de un potencial de pulso de 50 a 75 mV la intensidad del pico de corriente no cambia tanto, como sí ocurre a 25 mV.

Se sabe que la multiplicación de la f con SH da como resultado la velocidad de barrido del sistema. Sin embargo, cada una tiene una función diferente. Por un lado, la f esta relacionada con el tiempo en que tarda en completarse un ciclo de SWV, en donde a f mayores ($f > 10$) se observa que el pico va perdiendo definición (especialmente al decrecer el pico). Además de los tres parámetros según la literatura el más crítico es la f .

En el caso del SH, se define como la altura del paso, es decir la forma en que está segmentado el pulso o amplitud dada. Por lo que se observa como los resultados obtenidos al modificar este parámetro muestra más cambio en cuanto al ruido de la curva, debido a que, si se toman valores bajos, el número de puntos por correr el mayor y hace que tarde más en realizarse el pulso, por lo que lo más conveniente sería emplear un paso intermedio que no tarde tanto, pero tampoco que sea tan alto porque no tendría en cuenta la cinética o fenómenos que ocurren durante la reacción.

Basado en los dos voltamperogramas de onda cuadrada obtenidos (variando f y SH) a un pulso de 50 mV, se va a definir las condiciones de trabajo para posteriores pruebas. Se puede observar como en la variación de f , al aumentar el tiempo luego de que ocurre el pulso la curva no llega al mismo valor de corriente como al inicio del pulso, esto pasa a que esta ocurriendo una interferencia debido a la capa difusa que se forma, mientras que a un SH de 5 mV (comparar las tres variaciones de pulso de altura), si logra cerrar con el mismo comportamiento al que inicia, indicando mayor reversibilidad de la reacción.

Por lo tanto, se concluye que las condiciones favorables para emplear en SWV son:

$PH = 50 \text{ mV}$; $SH = 5 \text{ mV}$; $F = 10 \text{ Hz}$.

Respecto a las condiciones que se empleó en CV, el scan rate es de 50 mV/s y se pudo observar que es una condición intermedia, la cual no toma tanto tiempo, pero tampoco es tan rápida como para despreciar el tipo de reacción que esté ocurriendo. Por lo anterior, la velocidad de barrido en ambas técnicas fue 50 mV/s.

B. Determinación de la concentración de MCH

B.1. Concentración de MCH

La concentración se estudió con base en la teoría que establece guardar una relación de 1:1000 de ADN:MCH. Se preparó una solución con concentración de 0.5 μM de aptámero tiolado y 500 μM de MCH, variando el tiempo de inmovilización a 60, 30 y 5 min. Los resultados mostraron que la señal se mantuvo similar para los tres casos (Ver Figura B4, B5 Y B6). Por esta razón se decidió disminuir la concentración, además que la superficie del electrodo no es completamente de oro, por lo que también eso pudo influir en que el MCH este bloqueando toda la superficie (Keighley et al., 2008).

Figura B1. Voltamperogramas cíclicos variando el tiempo de inmovilización de una solución de 1mM de MCH usando 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución buffer PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Las medidas fueron realizadas a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1} .

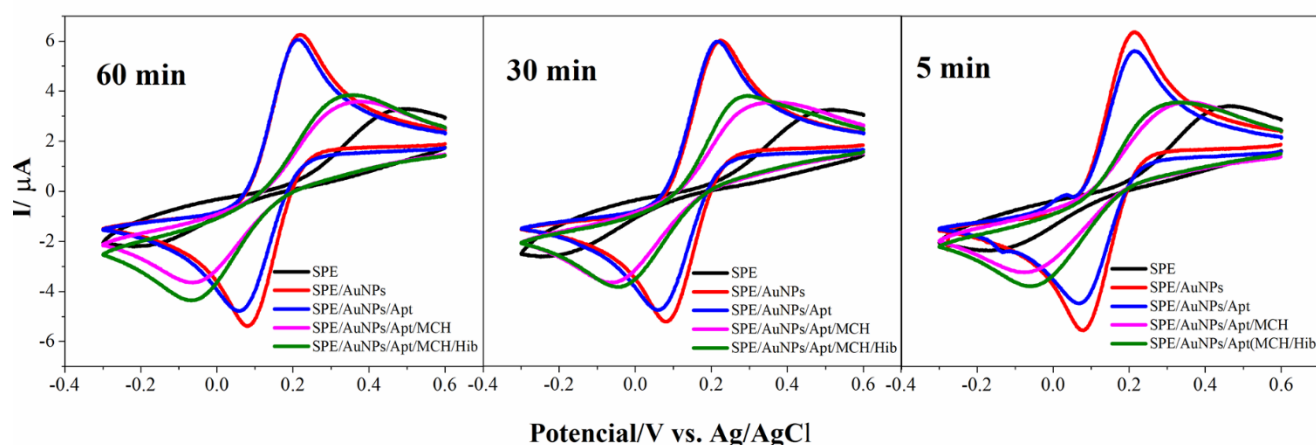


Figura B2. Voltamperogramas de onda cuadrada variando el tiempo de inmovilización de una solución de 0.5 mM de MCH usando 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución buffer PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Las medidas fueron realizadas a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1}

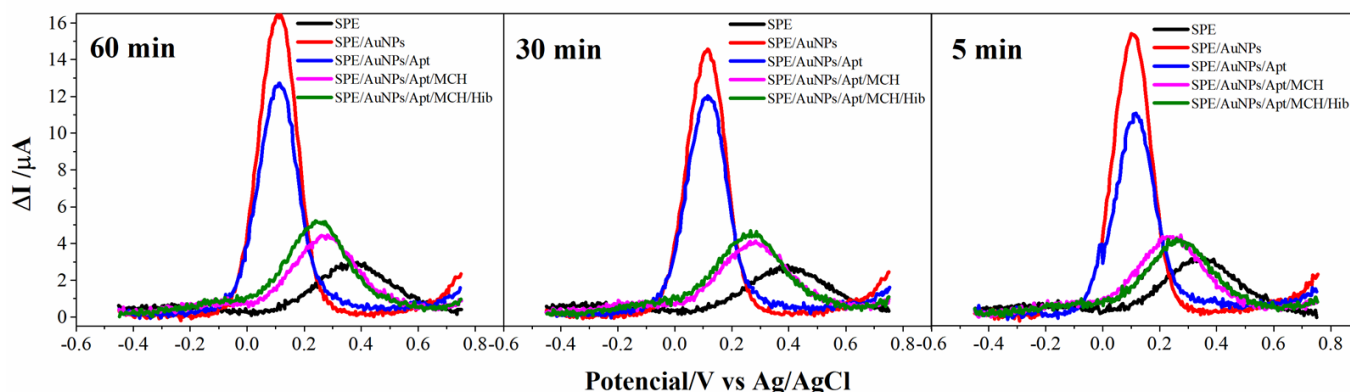
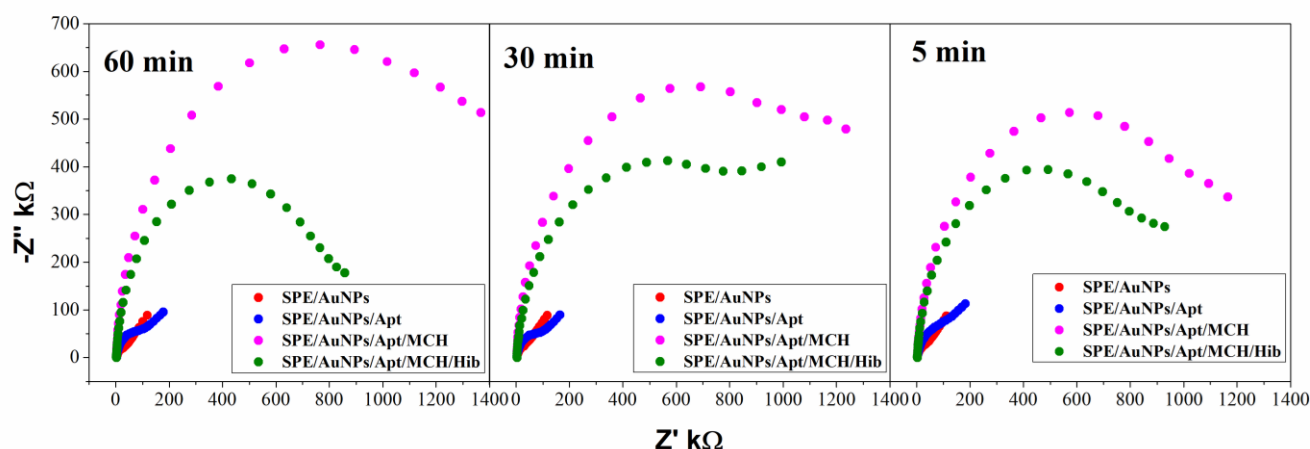


Figura B3. Diagramas de Nyquist de EIS, variando el tiempo de inmovilización de una solución de 0.5 mM de MCH usando 2 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución buffer PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Las medidas fueron realizadas a una amplitud de 10 mV y un rango de barrido de frecuencias desde 0.5-50000 Hz.



B.2. Gráficas complementarias del análisis de la concentración seleccionada de MCH.

A continuación, se complementa el análisis del resultado analizado en la sección 5.3.5.2 del libro con las otras dos técnicas empleada (CV y SWV). presenta las concentraciones que se estudiaron, bajando la relación de ADN:MCH de 1:1000 a 1:100, 1:10, y 1:1, fijando un tiempo de inmovilización de 5 min. Se puede observar en SWV (Ver Figura B8), especialmente que a una concentración de 0.5 la señal de MCH ya no es fija sobre la superficie o suficiente, puesto que la señal obtenida supera la señal anterior del aptámero

tiolado. Para la concentración de 50 μM aun la señal se desplaza en el eje que representa el potencial similar a la señal base (electrodo sin modificar), lo que la cantidad de MCH bloquea la superficie completamente. Mientras que a un concentración de 5 μM , aunque aparentemente no se ve un cambio entre la señal del MCH y la de Hibridación, el pulso se mantuvo en la misma posición respecto al valor de potencial anterior y con el resultados presentado de EIS se confirma que si hubo cambios en la detección del analito. Por esta razón esta condición fue la seleccionada

Figura B4. Voltamperogramas cíclicos variando la concentración de MCH inmovilizado durante cinco minutos usando 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución buffer PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Las medidas fueron realizadas a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1}

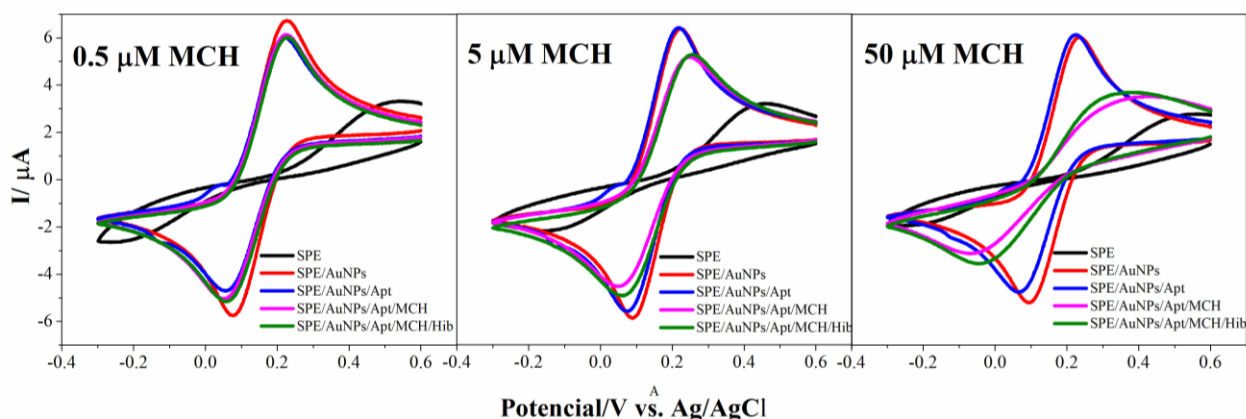
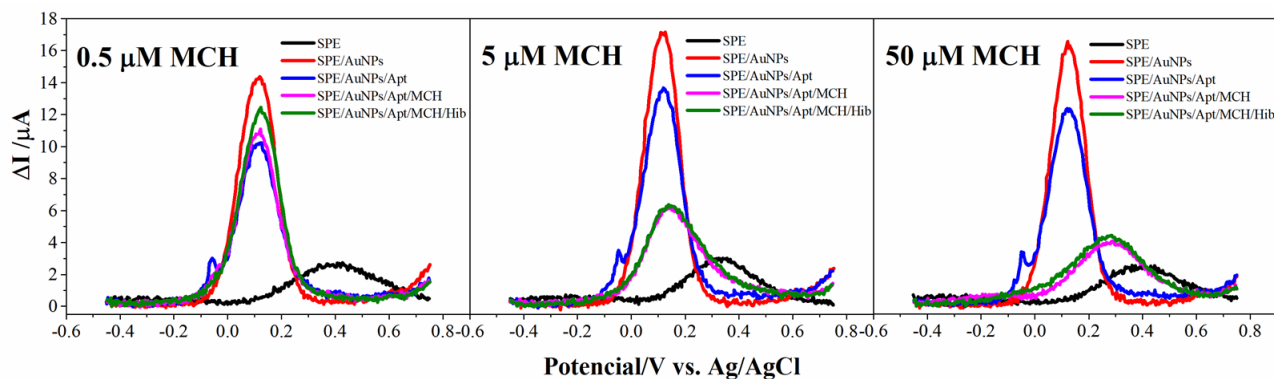


Figura B5. Voltamperogramas de onda cuadrada variando la concentración de MCH inmovilizado durante 5 minutos usando 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución buffer PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Las medidas fueron realizadas a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1} .



C. Determinación de las concentraciones de las nanoestructuras de carbono

Para la determinación de la concentración se tuvo en cuenta las disoluciones seriadas analizadas por Espectroscopia UV-vis en la sección 6.3.1.2 del libro y lo encontrado en la literatura, acerca de las concentraciones de estas nanoestructuras depositadas sobre electrodos comprenden valores inferiores a 1 mg/mL (Jie Wang et al., 2010). Se estudiaron dos valores de concentración (0.1 y 0.05 mg/mL) para cada una de las nanoestructuras (Ver Figuras C1, C2 y C3). Los resultados obtenidos, muestra todas las modificaciones de la superficie hasta la señal del analito. Se encontró respecto a la señal de los electrodos modificados con MWCNT tiene una alta intensidad de los picos característicos de los voltamperogramas cíclicos lo que indica que hay mayor conductividad. Sin embargo, en los resultados en la técnica por SWV esta señal se trasladaba verticalmente, lo que implicaba un error en la señal a la hora de emplear un rango de detección del analito.

Además, tanto los electrodos modificados con GO como los MWCNT al detectar el ADN complementario, la señal disminuía mucho, lo que puede estar pasando por una adsorción en la superficie de que no permite detectar lo que se quiere, que es a partir del receptor inmovilizado con las nanopartículas de oro mediante el grupo tiol. Por esta razón, se seleccionó la concentración de 0.05 mg/mL de GO, mientras que, para los MWCNT, se disminuyó la concentración y se encontró que seguía siendo muy conductivo, por lo que la concentración seleccionada para tales nanoestructuras fue de 0.001 mg/mL (Ver Figura C4)

Figura C1. Voltamperogramas cíclicos de electrodos modificados con nanoestructuras de carbono variando la concentración depositada a 0.1 y 0.05 mg/mL; usando 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Las medidas fueron realizadas a una velocidad de barrido de 50 mV/s

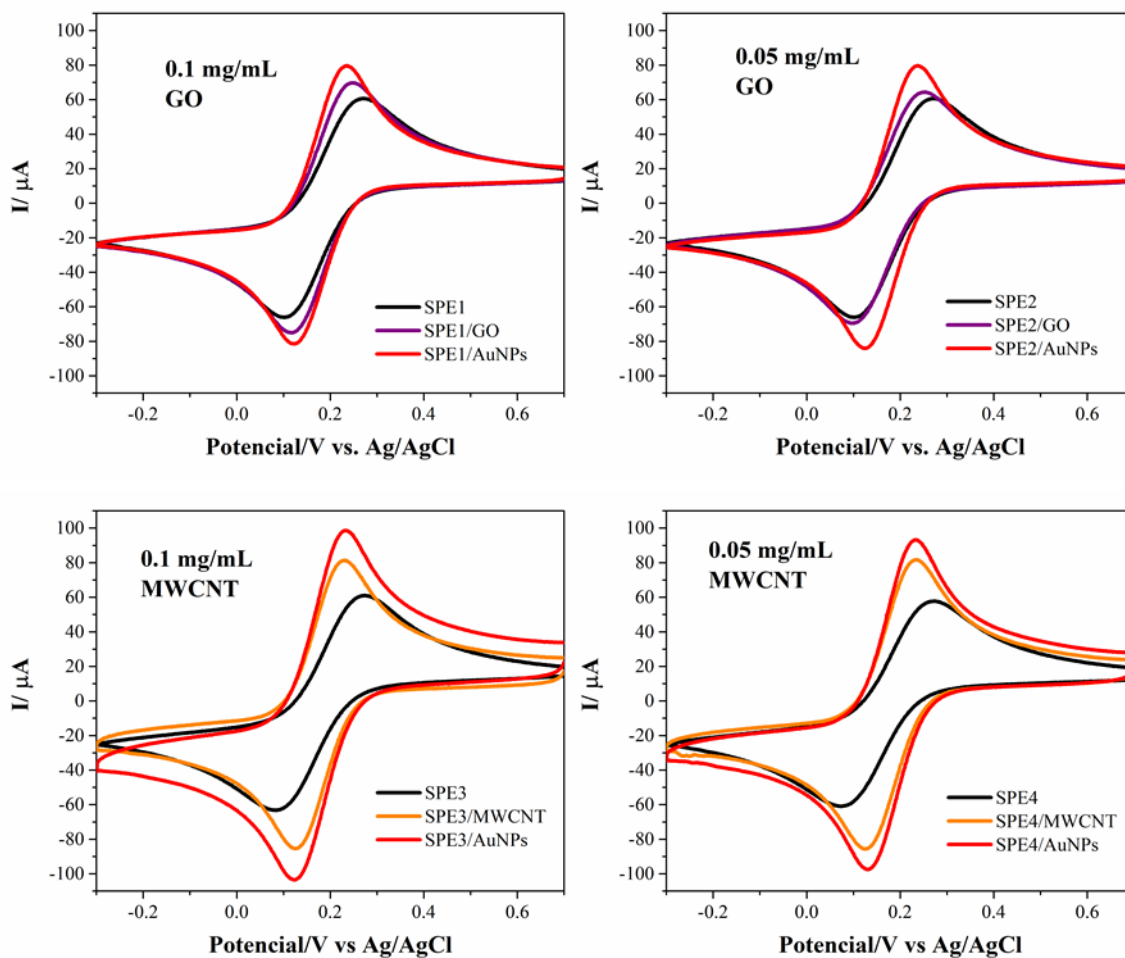


Figura C2. Diagramas de Nyquist de EIS de electrodos modificados con nanoestructuras de carbono variando la concentración depositada a 0.1 y 0.05 mg/mL; usando 2 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en solución buffer PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Las medidas fueron realizadas a una amplitud de 10 mV y un rango de barrido de frecuencias desde 0.5-50000 Hz

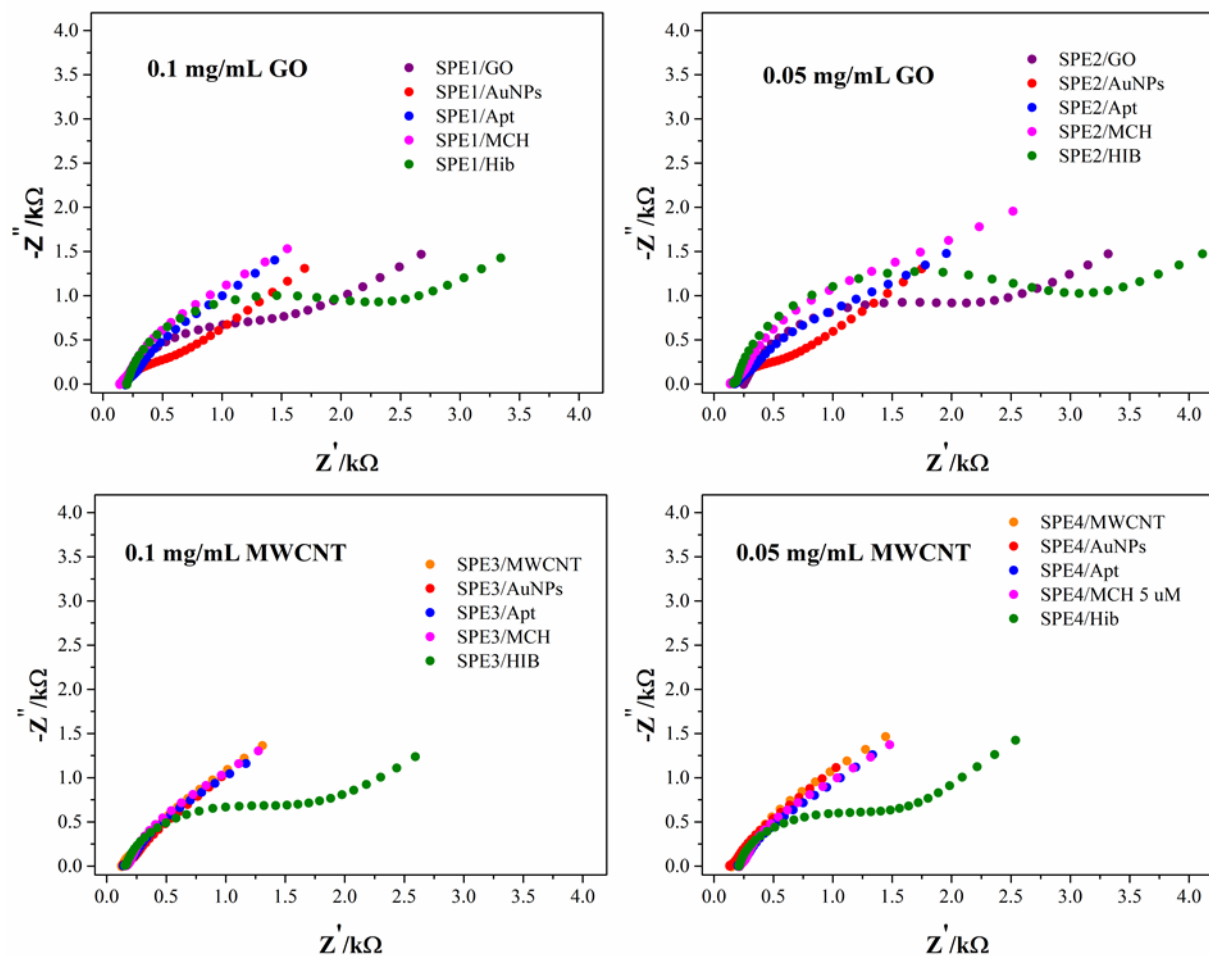


Figura C3. Voltamperogramas de onda cuadrada de electrodos modificados con nanoestructuras de carbono variando la concentración depositada a 0.1 y 0.05 mg/mL; usando 10 mM $[Fe(CN)_6]^{4-/-}$ en solución tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl. Las medidas fueron realizadas a una velocidad de barrido de 50 mV/s

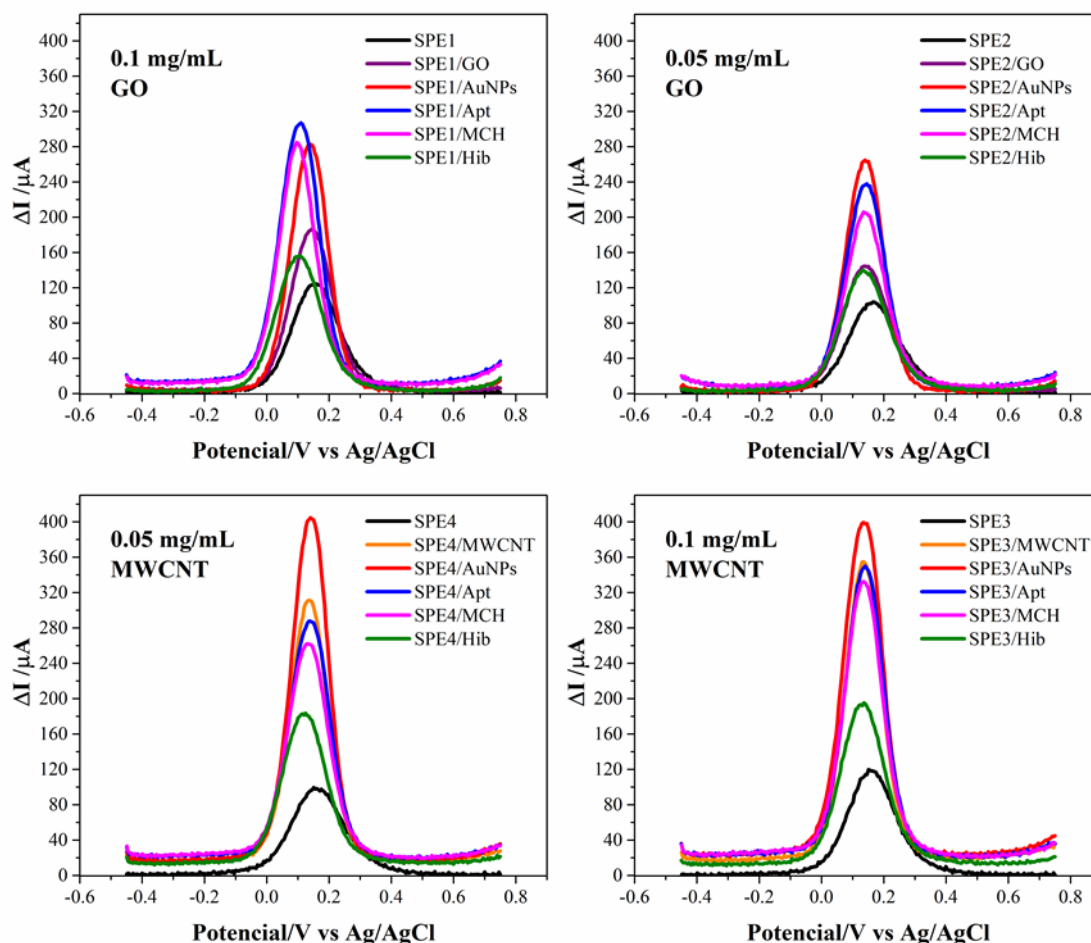


Figura C4. Voltamperogramas de onda cuadrada de electrodos modificados con nanotubos de carbono multipared variando la concentración depositada a 0.001 y 0.002 mg/mL; usando 10 mM $[Fe(CN)_6]^{4-/-}$ en solución tampón PBS de 0.1 M pH 7.4 con 0.1 M de KCl

