

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales

“Funcionalización de electrodos de oro mediante la química EDC/NHS con aptámeros para biosensor impedimétrico con aplicación de detección de *Brucella Abortus*”

Proyecto Final de Graduación para optar por el título de Ingeniera en Materiales con el grado académico de Licenciatura

Realizado por: Kenia del Carmen Blandón Corrales

Profesor Guía: M. Sc. Adrián Quesada Martínez

Profesor Lector: M. Sc. Ricardo Esquivel Isern

Profesor Lector: Ph. D. Bruno Chiné Polito

Cartago, septiembre, 2024

TEC | Tecnológico
de Costa Rica



Resumen

La siguiente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotrónica en complemento con las instalaciones del Centro de Investigación y Extensión en Ingeniería en Materiales (CIEMTEC) y el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC). La *Brucella Abortus* es la bacteria causante de la brucelosis, la cual es una enfermedad que puede transmitirse entre animales y humanos y que, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), provoca hasta medio millón de casos anuales a nivel mundial. Este patógeno es responsable de abortos, disminución en la producción de leche y carne en los animales y genera pérdidas económicas en el sector ganadero de hasta \$600 millones en América Latina.

El objetivo principal del proyecto es desarrollar un método de funcionalización de electrodos de oro mediante la química EDC/NHS con aptámeros para el desarrollo de un dispositivo que permita la detección selectiva de *Brucella Abortus*. Inicialmente se realizan pruebas para la inmovilización de los aptámeros en distintos sustratos para demostrar la efectividad y la preparación adecuada de las superficies para realizar la funcionalización con el ácido mercaptopropiónico y la química de EDC/NHS que se complementan para permitir la fijación de los aptámeros. Por último, se realizó la caracterización de los chips de SiO₂ y del electrodo de oro funcionalizados con los aptámeros mediante las técnicas de caracterización de espectroscopía: RAMAN, Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y de Impedancia Electroquímica (EIS), así como la Voltamperometría Cíclica (CV) y la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Mediante AFM se notaron cambios importantes en la rugosidad de la superficie luego de la funcionalización con la química EDC/NHS, en la zona donde se notaron estos cambios se realizó un análisis de área mediante RAMAN el cual presentó señales de importancia que se asocian con los ácidos nucleicos. En complemento, el análisis FTIR respaldó la presencia de los grupos funcionales principales de los aptámeros, así como del MPA sobre la superficie de los chips ya funcionalizados. Con la CV y EIS se terminó de confirmar la inmovilización exitosa de los aptámeros sobre la superficie, se observó la disminución en los picos anódicos y catódicos que resaltan una menor reversibilidad de la reacción del electrolito con cada paso que se realizaba, mientras que los gráficos de Nyquist demostraron la adhesión efectiva de capas mediante el aumento de la impedancia en cada paso de la funcionalización.

Abstract

The following research was carried out in the Biotronics Laboratory in complement with the facilities of the Materials Engineering Research and Extension Center (CIEMTEC) and the National Nanotechnology Laboratory (LANOTEC). *Brucella Abortus* is the bacterium that causes brucellosis, which is a disease that can be transmitted between animals and humans and which, according to the World Health Organization (WHO), causes up to half a million cases per year worldwide. This pathogen is responsible for abortions, decreased milk and meat production in animals and generates economic losses in the livestock sector of up to \$600 million in Latin America.

The main objective of the project is to develop a method of functionalization of gold electrodes by EDC/NHS chemistry with aptamers for the development of a device that allows the selective detection of *Brucella Abortus*. Initially, tests for the immobilization of aptamers on different substrates are performed to demonstrate the effectiveness and proper preparation of surfaces to perform the functionalization with mercaptopropionic acid and EDC/NHS chemistry complementing each other to enable aptamer binding. Finally, characterization of the SiO₂ chips and gold electrode functionalized with the aptamers was performed using the spectroscopy characterization techniques: RAMAN, Fourier Transform Infrared (FTIR) and Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS), as well as Cyclic Voltammetry (CV) and Atomic Force Microscopy (AFM).

By AFM, important changes in the surface roughness were noticed after functionalization with EDC/NHS chemistry, in the area where these changes were noticed an area analysis was performed by RAMAN which presented important signals associated with nucleic acids. In addition, FTIR analysis supported the presence of the main functional groups of the aptamers as well as MPA on the surface of the functionalized chips. With CV and EIS, the successful immobilization of the aptamers on the surface was confirmed, the decrease in the anodic and cathodic peaks was observed highlighting a lower reversibility of the electrolyte reaction with each step performed, while the Nyquist plots demonstrated the effective adhesion of layers by increasing the impedance at each step of the functionalization.

Acta de Entrega del Informe Final del Proyecto Final de Graduación

Se informa que se ha recibido el Informe Final del Proyecto Final de Graduación, realizado por la estudiante Kenia del Carmen Blandón Corrales, carné 2019083825, el cual se titula: “Funcionalización de electrodos de oro mediante la química EDC/NHS con aptámeros para biosensor impedimétrico con aplicación de detección de *Brucella Abortus*” y que se realizó en conjunto con el Laboratorio de Biotrónica en el 1^{er} Semestre de 2024. El Proyecto Final de Graduación es un requisito académico del Programa de Licenciatura en Ingeniería en Materiales de la Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Este documento ha sido declarado:

Público

Confidencial



M. Sc. Adrián Quesada Martínez
Profesor Guía

Kenia Blandón Corrales
Estudiante

M. Sc. Ricardo Esquivel Isern
Profesor Lector

Ph. D. Bruno Chiné Polito
Profesor Lector

M. Sc. Ricardo Esquivel Isern
Director Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales

Cartago, septiembre, 2024

Constancia de Defensa Pública del Proyecto Final de Graduación

El presente Proyecto Final de Graduación titulado “Funcionalización de electrodos de oro mediante la química EDC/NHS con aptámeros para biosensor impedimétrico con aplicación de detección de *Brucella Abortus*” realizado en conjunto con el Laboratorio de Biotrónica de la Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales del Instituto Tecnológico de Costa Rica durante el 1er Semestre de 2024, ha sido defendido ante el Tribunal Examinador integrado por los profesores Adrián Quesada Martínez, Ricardo Esquivel Isern y Bruno Chiné Polito; como requisito para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Materiales de la Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales, del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Este documento y su defensa ante el Tribunal Examinador han sido declarados:

Públicos

Confidenciales



M. Sc. Adrián Quesada Martínez
Profesor Guía

Kenia Blandón Corrales
Estudiante

M. Sc. Ricardo Esquivel Isern
Profesor Lector

Ph. D. Bruno Chiné Polito
Profesor Lector

M. Sc. Ricardo Esquivel Isern
Director Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales

Cartago, septiembre, 2024

Carta de Entendimiento

Señores

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Biblioteca José Figueres Ferrer

Yo, Kenia del Carmen Blandón Corrales, carné 2019083825, autorizo (X) no autorizo () a la Biblioteca José Figueres Ferrer del Instituto Tecnológico de Costa Rica disponer del Trabajo Final realizado por mi persona titulado “Funcionalización de electrodos de oro mediante la química EDC/NHS con aptámeros para biosensor impedimétrico con aplicación de detección de *Brucella Abortus*” para ser ubicado en el Repositorio Institucional y el Catálogo SIBITEC para que se pueda tener acceso a través de internet.



Firma del estudiante

Cédula: 208180840

Agradecimientos

Primero agradecer a Dios y a mi mamá por brindarme la posibilidad de poder estudiar en una institución tan prestigiosa y por ser mi apoyo incondicional hasta el final. A Josué Mata y Shaslyn Araya, mis mejores amigos, por ser mi mayor motivación a lo largo de la carrera y por no dejar que me rindiera a pesar de las distintas situaciones que se presentaron en el camino.

A la profesora Ph. D. Claudia Chaves Villarreal por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por guiarme y enseñarme tantas cosas que me han hecho crecer mucho como ingeniera, científica y persona. A los integrantes del Laboratorio de Biotrónica que me ayudaron a poder realizar pruebas y que celebraron estos resultados conmigo.

Al Ph. D. Sergio Paniagua Barrantes y la Ph. D. Yendry Corrales Ureña, investigadores del LANOTEC, por su apoyo, motivación y conocimientos brindados que permitieron la obtención de los resultados esperados durante el proyecto. También, directamente al LANOTEC, por facilitarnos el uso del equipo de AFM, FTIR y RAMAN, así como el uso de las instalaciones para poder realizar las pruebas y técnicas necesarias.

A la Ph. D. Caterina Guzmán Verri, por brindarnos tanto los aptámeros normales como los específicos para terminar de comprobar el funcionamiento del método de funcionalización.

Y, por último, agradecer a los profesores Ricardo Esquivel Isern y Adrián Quesada Martínez, por la paciencia y entendimiento brindado hacia mi persona ante las situaciones que se presentaron en el desarrollo del proyecto.

Dedicatoria

A mi valiente mamá, Ana. Esta tesis es el resultado de tu amor, apoyo y sacrificio a lo largo de mis años de estudio. Tus palabras de aliento, perseverancia, paciencia y tu ejemplo constante han sido mi inspiración siempre. Cada día que trabajas incansablemente y cada vez que me brindas tu amor son tesoros que valoro profundamente. Esta tesis es un tributo para ti, mi fuente inagotable de fortaleza y amor en mi búsqueda de conocimiento, lo que soy hoy en día es un reflejo de tu inquebrantable dedicación. Te amo con todo mi corazón y esta tesis es mi modesta forma de agradecerte por todo lo que has hecho por mí.

Y a mi princesa Abril, mi pedazo de cielo que vino a cambiar mi vida, a darle un giro completo y a llenar de bendiciones mi camino. De ahora en adelante, todo será por y para ti, espero que mis esfuerzos y sacrificios sean el reflejo del increíble futuro que te espera, donde solamente seremos tu abuela, tú y yo, juntas las tres hasta el final, te amo.

IN MEMORIAM

A mi segunda mamá, Evelyn. Daría todo lo que tengo para que pudieras ver a la profesional a la que acompañaste y amaste incondicionalmente por 18 años, te amo y te extraño mucho, esto es para ti hasta el cielo.

Índice

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Acta de Entrega del Informe Final del Proyecto Final de Graduación	4
Constancia de Defensa Pública del Proyecto Final de Graduación	5
Carta de Entendimiento.....	6
Agradecimientos	7
Dedicatoria.....	8
1. Introducción	12
1.1. Identificación de la empresa	13
1.2. Justificación del estudio	14
1.3. Impacto Socioambiental	15
1.4. Objetivos del estudio	16
1.4.1. Objetivo general	16
1.4.2. Objetivos específicos	16
1.5. Alcances y limitaciones del estudio.....	17
1.5.1. Alcances	17
1.5.2. Limitaciones.....	17
2. Marco Teórico.....	18
2.1. Brucelosis	19
2.2. Biosensor	20
2.3. Tipos de biosensores.....	21
2.3.1. Biosensores electroquímicos	21
2.3.2. Biosensores impedimétricos.....	22
2.3.3. Biosensores basados en cadenas de ADN	22
2.4. Biofuncionalización de superficies.....	24
3. Metodología	26
3.1. Preparación de la superficie de oro.....	27
3.2. Funcionalización de aptámeros mediante química EDC/NHS	27
3.3. Caracterización de los electrodos funcionalizados con los aptámeros	29
3.3.1. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS) y Voltamperometría Cíclica (CV)	29
3.3.2. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	29
3.3.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	30
3.3.4. Espectroscopía RAMAN.....	30

4.	Resultados y discusión	31
4.1.	Elección de sustrato.....	32
4.1.1.	Mica	32
4.1.2.	SiO ₂	33
4.2.	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	35
4.3.	Espectroscopía RAMAN	37
4.4.	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	38
4.5.	Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS) y Voltamperometría Cíclica (CV)	
	40	
5.	Conclusiones	43
6.	Recomendaciones.....	45
7.	Bibliografía	47
8.	Anexos.....	51

Índice de figuras

Figura 1. Método de transmisión de la brucelosis hacia las personas (Ma et al., 2024).	19
Figura 2. Biosensor y sus componentes (Ogurtsov, 2014)	20
Figura 3. Diagrama de un biosensor electroquímico	22
Figura 4. Diagrama de un biosensor basado en aptámeros (Wu et al., 2019)	23
Figura 5. Comportamiento del aptámero durante el acoplamiento con el electrodo	24
Figura 6. Inmovilización de aptámeros en SAM de ácido mercaptopropiónico mediante química EDC/NHS (Oberhaus et al., 2020)	25
Figura 7. Procedimiento de limpieza de la superficie de oro.	27
Figura 8. Proceso de funcionalización mediante la química EDC/NHS	28
Figura 9. Esquema de reacción para la formación de enlaces amida mediante la química EDC/NHS.	29
Figura 10. Comparación de protocolo de funcionalización para a) chips y b) electrodo de oro.	32
Figura 11. Chips de SiO ₂ recubiertos con a) cromo-oro y b) oro sobre poliamida Kapton	33
Figura 12. Imágenes a) 2D y b) perfil de rugosidad de patrones de PDMS	35
Figura 13. Imágenes a) 2D y b) perfil de rugosidad de chip de SiO ₂ recubierto con oro estampado con MPA	36
Figura 14. Imágenes a) 2D y b) perfil de rugosidad de chip de SiO ₂ funcionalizado con la química EDC/NHS con aptámeros	36
Figura 15. Espectro RAMAN de chips de SiO ₂ funcionalizados con aptámeros específicos mediante química EDC/NHS	37
Figura 16. Espectro FTIR comparativo de chips de SiO ₂ puros y funcionalizados con aptámeros específicos mediante química EDC/NHS	38
Figura 17. Espectro FTIR de chips de SiO ₂ funcionalizados con aptámeros específicos mediante química EDC/NHS	39
Figura 18. Voltamograma cíclico en 10 mM de [Fe (CN) ⁶] ⁴⁻ en 0.1 M de KCl en PBS para electrodo de oro funcionalizado con MPA y aptámeros.	41
Figura 19. Gráfico Nyquist de la señal de EIS para electrodo de oro funcionalizado con MPA y aptámeros	42

1. Introducción

1.1. Identificación de la empresa

El proyecto por desarrollar se realiza en el Laboratorio de Biotrónica del Centro de Investigación y Extensión en Ingeniería de los Materiales (CIEMTEC) de la Escuela de Ciencias e Ingeniería de los Materiales del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), de la sede central de Cartago.

El Laboratorio de Biotrónica, es un grupo interdisciplinario de investigación en ingeniería de dispositivos sostenibles para generación, transformación, gestión y almacenamiento de energía e información a base de nanomateriales y biomoléculas. El grupo es liderado por la profesora Ph. D. Claudia Chaves Villarreal y, además, está conformado por estudiantes de pregrado de la carrera de Ingeniería en Materiales y otras áreas, los cuales han sido parte de la publicación de artículos científicos en revistas reconocidas, así como la participación en conferencias nacionales e internacionales.

El proyecto forma parte del proyecto del Fondo Especial para la Educación Superior (FEES) denominado: “Biosensor microfluídico para detección de *Brucella Abortus*: prueba de concepto para la detección de agentes infecciosos bajo estándares de la Organización Mundial de la Salud (OMS)”. Este proyecto consiste en el desarrollo de un dispositivo microfluídico que permita la detección específica de bacterias, la cual es posible mediante la adhesión selectiva de la bacteria, en este caso la *Brucella Abortus* a aptámeros que se relacionan con la membrana celular de la bacteria. El principal aporte del grupo es el desarrollo del biosensor para luego agregarlo al sistema de microfluídica.

1.2. Justificación del estudio

La *Brucella Abortus* es una bacteria gram negativa, que es el agente causal de la brucelosis, una enfermedad zoonótica que puede infectar tanto a humanos como a animales, esta se transmite a los humanos a través del contacto directo con animales o tejidos infectados, como el consumo de leche o carne crudas. También puede transmitirse a través del contacto con agua o suelo contaminados. La brucelosis puede causar una variedad de síntomas, que incluyen fiebre, escalofríos, dolor muscular, fatiga y pérdida de peso. En algunos casos, la enfermedad puede ser fatal (Rivas-Solano, 2015).

Entre los principales desafíos que se tienen para la detección de esta bacteria se tiene la baja concentración de la bacteria en las distintas muestras biológicas, al no ser una bacteria relativamente virulenta la vuelve exigente, por lo que cultivarla o medirla es difícil por lo que retrasa muchos de los procesos de detección, además de que las pruebas serológicas no son específicas por lo que podría indicar hasta un falso positivo (World Health Organization., 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido criterios básicos para métodos de diagnóstico de estos patógenos, los cuales deben ser económicamente accesibles, fáciles de usar, sensibles, específicos y no deben depender de una tecnología compleja o de energía no portátil, como es el caso de los biosensores impedimétricos, los cuales son dispositivos que utilizan la impedancia eléctrica para detectar la presencia de un analito. Para el diagnóstico de brucelosis lo ideal es utilizar técnicas de bacteriología, sin embargo, debido a escasos recursos, el diagnóstico de la brucelosis se basa en la serología la cual debe estandarizarse (World Health Organization., 2015).

A partir del alto costo de las pruebas bacteriológicas y las limitaciones de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la brucelosis, se presenta la necesidad de estudiar alternativas potenciales a los sistemas de diagnósticos actuales. Las pruebas serológicas detectan anticuerpos mediante inmunoensayos enzimáticos (ELISA), inmunotransferencia y aglutinación. La OMS establece los criterios básicos que hacen que una prueba diagnóstica sea adecuada para lugares con recursos limitados, algunos de estos aspectos son que sea accesible para la población en riesgo de infección.(Urdea et al., 2006)

Este proyecto se apega a las políticas institucionales, contribuyendo con el desarrollo científico, tecnológico y de innovación en los ejes de conocimiento estratégicos salud e industria. Además, se acopla los ejes transversales del Plan Estratégico de la institución, como lo son tecnología, sostenibilidad e innovación.

1.3. Impacto Socioambiental

El método de funcionalización de electrodos de oro con aptámeros para la aplicación en un biosensor con aplicación de detección de *Brucella Abortus*, tiene un impacto significativo ya que el desarrollo de métodos que permitan la detección de este tipo de patógeno en los animales va a permitir que se prevenga y que se disminuya la transmisión a los humanos, es decir que cause la brucelosis. La brucelosis es una enfermedad que se estima en hasta medio millón de casos por año en el mundo y en Latinoamérica, se estiman pérdidas de hasta 600 millones de dólares (Freer & Castro, 2001).

Si se comparan los métodos de detección ya existentes, es decir las pruebas bacteriológicas y las serológicas, con el método de un biosensor impedimétrico, se tiene que el biosensor es reutilizable, por lo que se generarían menos residuos, se consumiría menos energía y los resultados se obtendrían de manera más rápida y efectiva (Zeng et al., 2022).

1.4. Objetivos del estudio

1.4.1. Objetivo general

Desarrollar el proceso de funcionalización de electrodos de oro mediante la química EDC/NHS con aptámeros para el desarrollo de un dispositivo que permita la detección selectiva de Brucella Abortus.

1.4.2. Objetivos específicos

- Modificar y establecer un protocolo para funcionalización de aptámeros mediante la química EDC/NHS sobre electrodos de oro y distintos sustratos.
- Acoplar los aptámeros a los electrodos de oro mediante la química con 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida y N-Hidroxisuccinimida (EDC/NHS).
- Comprobar la funcionalización de los aptámeros sobre los electrodos mediante técnicas de caracterización: Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS), Voltamperometría Cíclica (CV), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), espectroscopia RAMAN y la espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).

1.5. Alcances y limitaciones del estudio

1.5.1. Alcances

Este proyecto va a desarrollar una plataforma que permita la detección selectiva de *Brucella Abortus*, mediante la funcionalización de los electrodos de oro, la cual será utilizada para aplicación de un sensor de impedancia eléctrica del proyecto.

El proyecto se va a enfocar en crear un protocolo de la funcionalización con la química EDC/NHS para electrodos de oro y otros sustratos que puedan ser recubiertos con oro para luego ser caracterizados con distintas técnicas para comprobar la funcionalización correcta de los aptámeros.

1.5.2. Limitaciones

La falta de equipo y conocimiento especializado va a provocar que se realicen muchas muestras distintas para validar la funcionalización, provocando así una extensión del proyecto.

Las condiciones de trabajo pueden afectar el estado y funcionamiento de los químicos (almacenamiento y transporte), e incluso al realizar las técnicas de caracterización las muestras pueden verse afectadas.

El factor humano es uno de los principales componentes que pueden afectar una medición de caracterización.

2. Marco Teórico

Se realiza una investigación de conceptos y avances de los biosensores impedimétricos que han sido basados en la funcionalización de electrodos de oro con aptámeros con la química EDC/NHS para la detección de *Brucella Abortus*. Se mencionarán los biosensores, su funcionamiento y los tipos existentes, así como las técnicas de caracterización a utilizar.

2.1. Brucelosis

La brucelosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Brucella*, las cuales pueden afectar a varios animales, incluyendo ganado bovino, ovejas, cabras, cerdos y otros mamíferos. La brucelosis puede transmitirse a los humanos ya sea a través del contacto con los animales infectados o el consumo de productos que ya se encuentren contaminados (Hernández-Mora et al., 2017).

La brucelosis perjudica económicamente a varios países del mundo y, en América Latina, se estima que las pérdidas anuales causadas por esta enfermedad son de hasta \$600 millones de dólares estadounidenses, las cuales son originadas por la disminución de la producción de leche, carne y de los propios valores de venta de los animales afectados (Gil & Samartino, 2001).

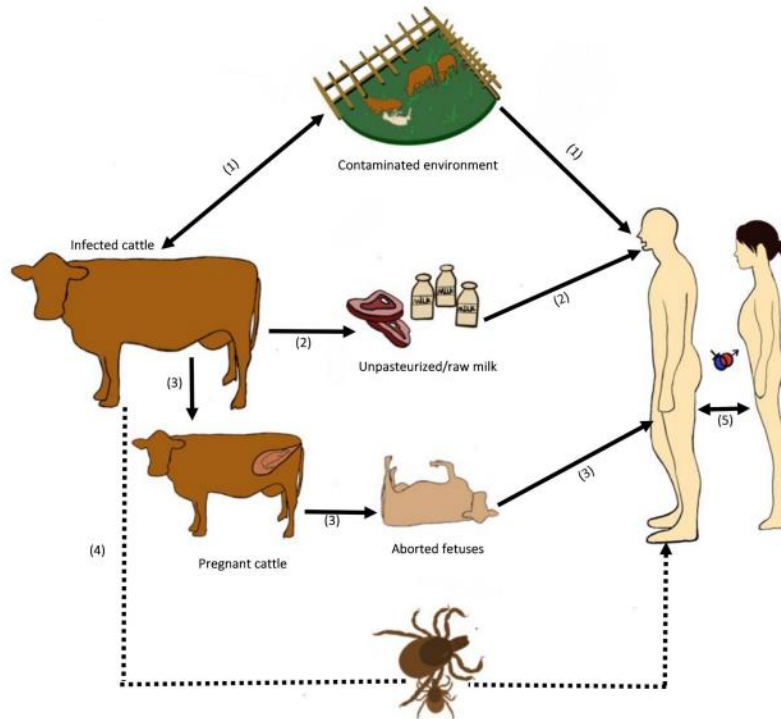


Figura 1. Método de transmisión de la brucelosis hacia las personas (Ma et al., 2024).

La detección de la brucelosis y de la *Brucella Abortus* radica en proteger la salud de las personas y animales, previniendo complicaciones graves y, además, permite reducir las pérdidas animales y económicas y también la exposición de animales enfermos y consumo de productos contaminados.

El diagnóstico se realiza mediante pruebas serológicas, cultivo bacteriano y técnicas de biología molecular. El tratamiento generalmente implica el uso de antibióticos, como doxiciclina y rifampicina. La prevención incluye prácticas de bioseguridad en la producción de alimentos, vacunación en animales y la promoción de la higiene en la manipulación de productos animales por parte de los humanos (Neha et al., 2017).

2.2. Biosensor

Un biosensor es un dispositivo analítico que utiliza componentes biológicos para detectar la presencia de una sustancia específica y transduce esa información en una señal medible. Estos dispositivos tienen una amplia gama de aplicaciones en medicina, industria, medio ambiente y seguridad alimentaria. Un biosensor típicamente consta de tres componentes principales: un bioreceptor, un transductor y un sistema de lectura y procesamiento (Bhalla et al., 2016).

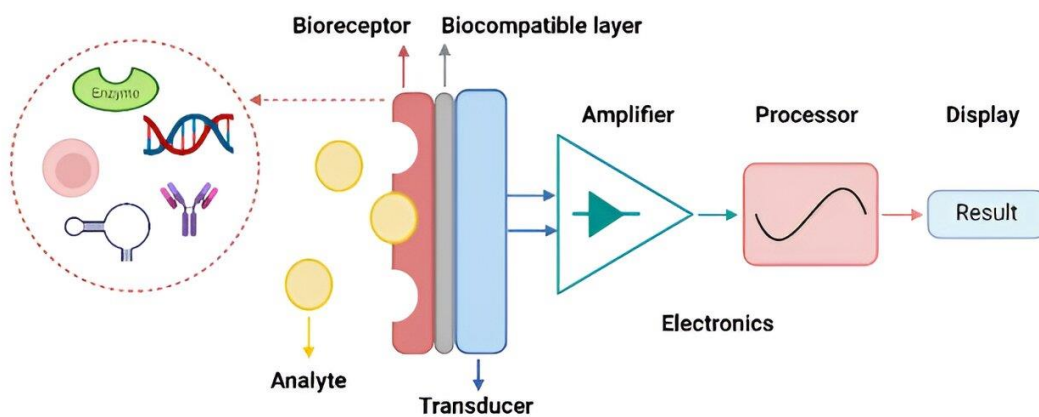


Figura 2. Biosensor y sus componentes (Ogurtsov, 2014)

En la **Figura 2**, se muestra los componentes de un biosensor típico, descritos a continuación (Bhalla et al., 2016):

Analito: es la sustancia de interés que debe ser detectada.

Biorreceptor: comprende una capa de biomoléculas con la capacidad de reconocer el analito. Cuando se da la interacción del biorreceptor con el analito, se da un proceso de generación de señales por medio de luz, calor, cambio de pH, masa o concentración, este proceso se denomina bioreconocimiento.

Transductor: es un elemento que convierte los eventos de bioreconocimiento en una señal física medible, que puede ser óptica, electroquímica, eléctrica, piezoeléctrica y calorimétrica, que suelen ser proporcionales a la cantidad de interacciones analito biorreceptor.

Unidad de procesamiento de señal: es el componente que procesa y prepara la señal transducida para su visualización en una pantalla, está compuesto de circuitos electrónicos.

Existen diferentes técnicas las cuales se utilizan para funcionalizar la superficie de transductores con biorreceptores. El estudio de la formación de grupos funcionales (carboxilos, aminos, amida, etc.) sobre las superficies de los transductores permiten la unión covalente de los biorreceptores mediante moléculas específicas que son compatibles al material del transductor, siendo esta una técnica destacable y aplicable en áreas como la microfluídica (Bahadir & Sezgintürk, 2016).

2.3. Tipos de biosensores

Los biosensores son dispositivos analíticos que combinan un elemento biológico con un transductor fisicoquímico para detectar la presencia de sustancias específicas. Dependiendo de la naturaleza del transductor y del reconocimiento biológico, los biosensores pueden clasificarse en diferentes tipos. Dos de los tipos más relevantes son los biosensores impedimétricos y los biosensores basados en cadenas de ADN.

2.3.1. Biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos son una clase de biosensores que combinan un componente biológico con un transductor electroquímico para detectar la presencia de un analito específico. Estos dispositivos son ampliamente utilizados debido a su alta sensibilidad, especificidad, y la posibilidad de miniaturización. Los biosensores electroquímicos se basan en la medición de cambios en las propiedades eléctricas, como la corriente, el potencial, la conductancia o la impedancia, que ocurren como resultado de una interacción biológica (Kulkarni et al., 2022).

El principio fundamental de los biosensores electroquímicos radica en la detección de eventos bioquímicos a través de un transductor electroquímico. El transductor convierte la señal biológica resultante de la interacción entre el analito y el elemento biológico de reconocimiento (como enzimas, anticuerpos, ADN, células o tejidos) en una señal eléctrica que puede ser medida y cuantificada (Kulkarni et al., 2022).

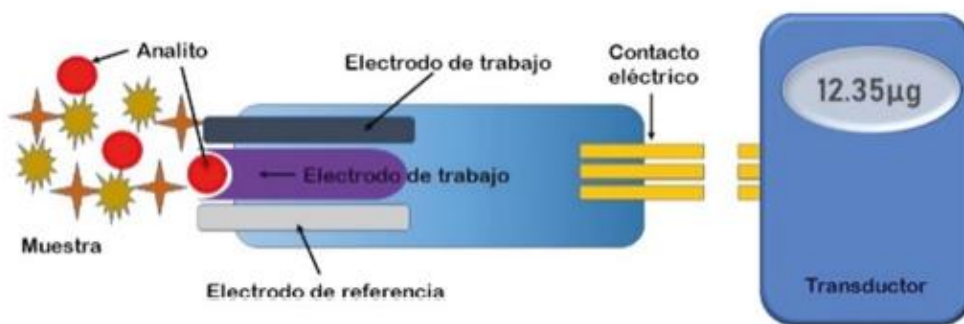


Figura 3. Diagrama de un biosensor electroquímico

2.3.2. Biosensores impedimétricos

Los biosensores impedimétricos son un tipo de biosensor electroquímico que mide la impedancia, es decir, la oposición al flujo de corriente alterna en un sistema. Estos dispositivos se basan en la detección de cambios en la resistencia o en la capacitancia del medio como respuesta a la interacción entre el analito y el elemento biológico de reconocimiento, generalmente una enzima, anticuerpo, o célula (Bahadir & Sezgintürk, 2016).

Su principio básico radica en la medición de la impedancia a través de un sistema que ha sido modificado por un evento biológico. Este evento, como la unión de un analito a un receptor, causa cambios en las propiedades eléctricas de la interfaz, los cuales son detectados como variaciones en la impedancia. La técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) es comúnmente utilizada para monitorear estos cambios y proporcionar datos cuantitativos sobre la concentración del analito (Kulkarni et al., 2022).

2.3.3. Biosensores basados en cadenas de ADN

Los biosensores basados en ADN permiten detectar proteínas y otras biomoléculas que interactúan de forma específica con determinados fragmentos de ADN, lo que resulta en una alta selectividad para el analito en una mezcla de elementos químicos o biológicos que generalmente

componen las muestras biológicas como sangre u orina. El fragmento de ADN a inmovilizar debe cumplir con una alta sensibilidad y selectividad para maximizar la eficiencia de hibridación y minimizar la unión no específica. Para fabricar este tipo de biosensores, la inmovilización de la secuencia de ADN es un proceso de mucha importancia (Strahl & Errington, 2024).

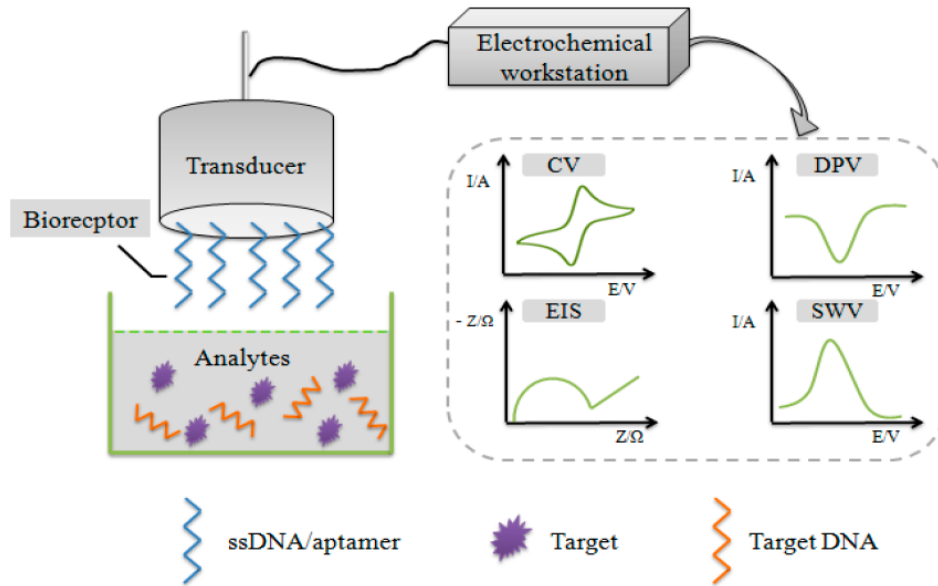


Figura 4. Diagrama de un biosensor basado en aptámeros (Wu et al., 2019)

La tecnología de síntesis de ADN es un proceso químico que se utiliza para crear moléculas de ADN artificiales y, además, funciona para crear aptámeros de forma específica. Esta técnica consiste en el diseño de la secuencia de ADN del aptámero basado en la estructura y función de la molécula objetivo, luego se sintetiza la secuencia de ADN mediante síntesis química, enzimática o in vitro y luego se purifica el aptámero sintetizado. Es importante que se realice una correcta purificación y caracterización para así determinar la afinidad, especificidad, objetivo y estabilidad ante distintos ambientes (Strahl & Errington, 2024).

El cambio en la construcción del aptámero de ADN podía leerse detectando el cambio electroquímico en la superficie del electrodo. En la **figura 5**, es posible observar el comportamiento que tiene el aptámero al entrar en contacto con el electrodo. Los aptámeros de ADN se han utilizado como biosensores en la vigilancia del medio ambiente, la detección de riesgos alimentarios, el diagnóstico médico y son especialmente eficaces en el seguimiento de diversos analitos en células de mamíferos (Strahl & Errington, 2024).

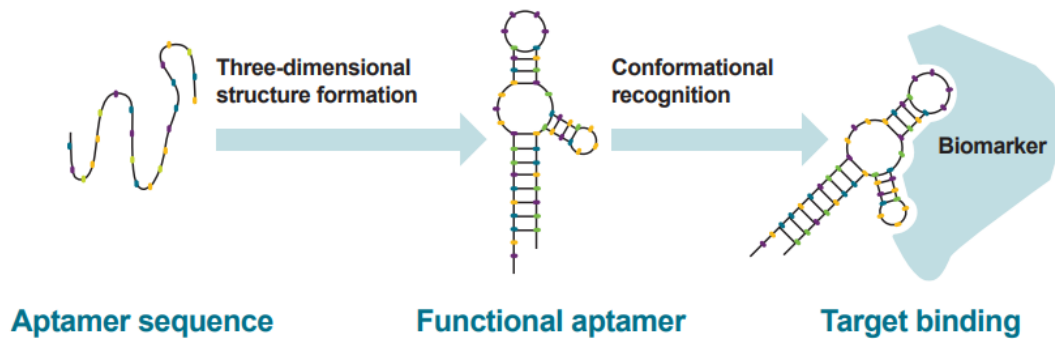


Figura 5. Comportamiento del aptámero durante el acoplamiento con el electrodo

2.4. Biofuncionalización de superficies

Para superficies de oro, un método común es la inmovilización de aptámeros mediante la unión covalente de los grupos tiol, los cuales permiten mejorar la señal biomolecular en la superficie. Entre estos procedimientos se tienen químicas de enlace como la cisteamina, el ácido 3-mercaptopropiónico (MPA), reactivo de Lomant e incluso los tioles aromáticos, que consisten en monocapas que son autoensambladas en la superficie (Oberhaus et al., 2020).

Entre las químicas más utilizadas se menciona la de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), conocida por sus siglas como EDC/NHS. Esta técnica utiliza la deposición de MPA como un enlazador intermedio, el EDC forma una carbodiimida cuando reacciona con los grupos funcionales carboxilo y amida. Mediante NHS, se mejora el rendimiento de la reacción, la cual ayuda a la formación de intermedios con mayor estabilidad y también logra conjugar las aminas primarias, este procedimiento se muestra en la **figura 6**. Debido a que los enlaces amida producen inmovilizaciones estables debido a la mínima reactividad que produce el enlace C-N, la reacción de ácidos carboxílicos y aminas primarias se utiliza con frecuencia para crear aptasensores (Oberhaus et al., 2020).

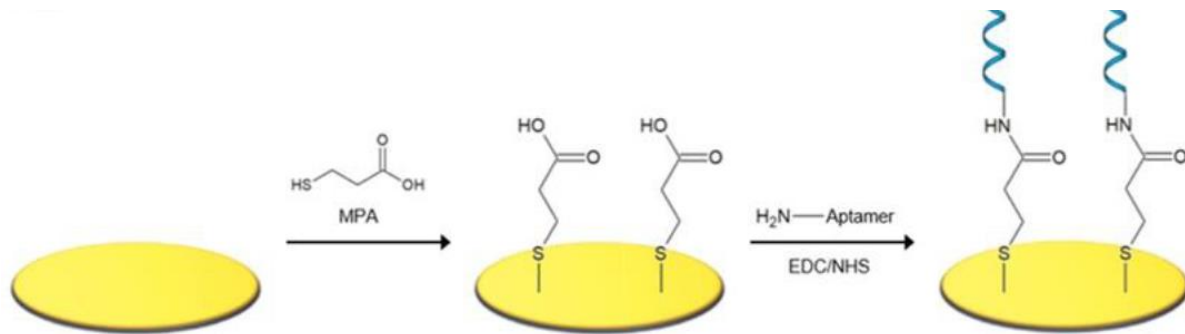


Figura 6. Inmovilización de aptámeros en SAM de ácido mercaptopropiónico mediante química EDC/NHS (Oberhaus et al., 2020)

En este proyecto se utiliza como referencia el procedimiento descrito por (Sedki et al., 2020) en el que se utiliza la química EDC/NHS para inmovilizar un bacteriófago para la fabricación de un biosensor para la detección de la bacteria E.coli.

3. Metodología

Siguiendo el protocolo establecido en el desarrollo del proyecto, se define la limpieza y funcionalización con EDC/NHS de la siguiente manera (Zúñiga-Rivera, 2023). Es importante destacar que al protocolo se le realizan modificaciones para conseguir resultados optimizados.

3.1. Preparación de la superficie de oro

Primero se realiza la limpieza del electrodo de oro, de forma mecánica mediante el pulido del electrodo con solución coloidal de alúmina $0.05 \mu\text{M}$, luego se coloca el electrodo en el sonicador con acetona y con agua por 5 minutos, para finalizar se realiza la limpieza electroquímica del electrodo de oro, se aplican 100 ciclos de potencial entre -0.3 y 1.3 V , con una velocidad de barrido de 100 mV/s , usando como electrolito una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.05 M , utilizando un potenciómetro Methrom Autolab PGSTAT128 N, SN AUT8418, este proceso se ejemplifica en la **figura 7**.

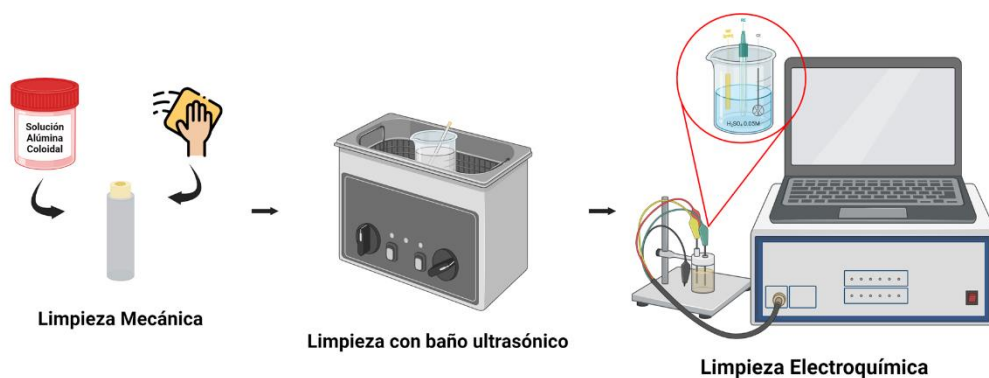


Figura 7. Procedimiento de limpieza de la superficie de oro.

3.2. Funcionalización de aptámeros mediante química EDC/NHS

Una vez se realizó la limpieza de los electrodos (el de oro y el de platino), se sumerge el electrodo en un beaker con 5 ml de solución de Ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) en etanol absoluto 0.1 M durante 1 hora para que se forme una monocapa uniforme. Una vez que se cumple el tiempo necesario, se realiza un lavado del electrodo con etanol para remover físicamente las moléculas de MPA no enlazadas covalentemente.

Para activar los grupos carboxílicos del MPA, se utiliza la química EDC/NHS, donde se debe sumergir el electrodo con MPA en 5 ml de buffer de Ácido 2- morfolinoetanosulfónico (MES) al 0.1 M con un pH de 5.5 que además contiene EDC 0.15 M y NHS 0.15 M , durante 30 minutos.

Se realiza un lavado del electrodo utilizando buffer MES para remover las moléculas de EDC/NHS que no reaccionaron. El electrodo modificado y activado se incuba durante 1 hora con una solución de 5 μl del aptámero específico de concentración 0.064 mM con terminación amina a utilizar, seguido de esto se realiza un lavado con una solución de tampón PBS.

Continuamente el electrodo se sumerge en una solución 0.1 M de etanolamina durante 30 minutos para pasivar los grupos -NHS que no reaccionaron y se lava nuevamente con una solución de PBS, como último paso se sumerge el electrodo en albúmina de suero bovino para prevenir reacciones no deseadas del material biológico con la superficie de oro. El esquema de reacción de este proceso y diagrama general del procedimiento se representa en la **figura 8 y 9**.

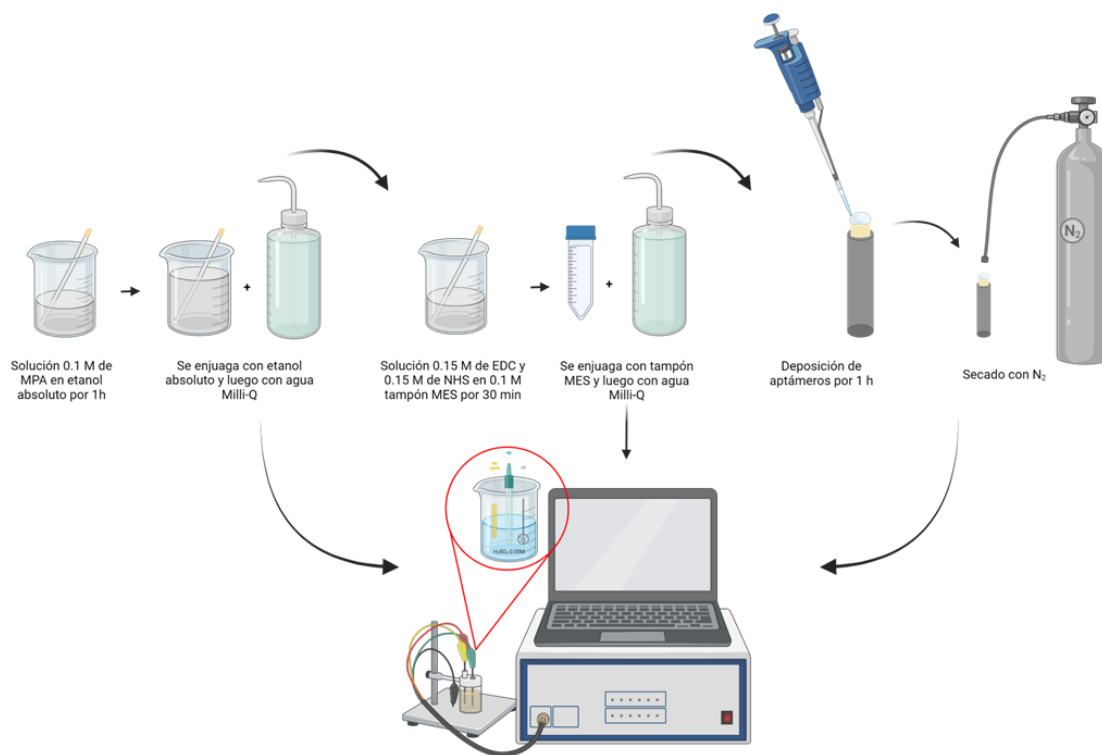


Figura 8. Proceso de funcionalización mediante la química EDC/NHS

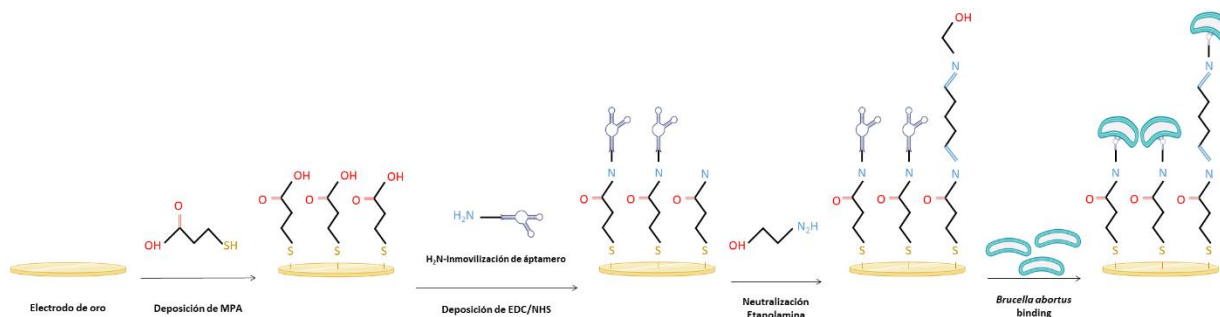


Figura 9. Esquema de reacción para la formación de enlaces amida mediante la química EDC/NHS.

El procedimiento completo de la limpieza y funcionalización de los electrodos y chips de oro se describe en los **anexos**, como parte del cumplimiento de los objetivos.

3.3. Caracterización de los electrodos funcionalizados con los aptámeros

3.3.1. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS) y Voltamperometría Cíclica (CV)

Entre cada paso de la funcionalización se utiliza una celda electroquímica estándar con tres electrodos, donde el electrodo de trabajo corresponde al electrodo de oro funcionalizado de disco de oro, marca DEK, modelo EWG113B, cuyo diámetro interno es de 0.039 in y el externo de 0.236 in, el contraelectrodo corresponde a una malla de platino y, por último, el de referencia que es el electrodo Ag/AgCl. Como electrolito en la celda se utiliza una solución 10 mM de ferrocianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ en 0.1 M de cloruro de potasio (KCl) con buffer fosfato salino de pH 7.4.

Para las mediciones de CV, se aplican 3 ciclos de potencial entre -0.2 V y 0.8 V, con una velocidad de barrido de 100 mV/s. Para las medidas de EIS, se aplica un potencial de 0.235 V y un rango de frecuencia de 10^5 a 0.1 Hz a 5 mV .

3.3.2. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Mediante este análisis se pueden obtener imágenes a nivel nanométrico, que muestran la superficie y que permite analizar la estructura de la capa de aptámeros, y obtener características como dimensiones de los aptámeros, rugosidad de la superficie, etc. Para esta técnica se utilizan chips de óxido de silicio (SiO_2) recubiertos con 11.4 nm de Cromo y 262 nm de Oro, y se utiliza el equipo MFP-3D Origin de Asylum Research para AFM.

Para lograr mediciones más precisas se sigue un protocolo de estampado por micro contacto de patrones de polidimetilsiloxano (PDMS), el cual se modifica para ajustarlo a las condiciones de los chips de SiO₂ (Cordero-Guerrero et al., 2023). Estas mediciones se toman cuando el patrón es estampado en el chip con el MPA y luego cuando los aptámeros son adheridos, con tamaño y escala de 5 nm con análisis de perfil de rugosidad. El procedimiento que se sigue para dicha aplicación de estampado se observa en los anexos.

El equipo y la toma de muestras de esta técnica se realizarán en el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC) del Centro Nacional de Alta Tecnología (CENAT).

3.3.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).

Para esto se utiliza el Espectrómetro FTIR Nicolet iS50. Los espectros se miden con una resolución de 4 cm⁻¹, a lo largo de 100 barridos en la región de frecuencias de 500-4000 cm⁻¹. Para realizar las mediciones, se utilizan 3 chips de SiO₂ recubiertos de oro, en el primero no se realiza ninguna modificación, ya que este se va a utilizar como “patrón”; para el segundo solamente el primer paso de la funcionalización, correspondiente a la aplicación del MPA en la superficie; y para el tercero, se continua el procedimiento hasta lograr acoplar el aptámero luego de la química EDC/NHS. Esta técnica permite observar las variaciones de los modos vibraciones que cambian el momento dipolar

Se mide la transmitancia que generan las muestras. El equipo y la toma de muestras de esta técnica se realizarán en el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC) del Centro Nacional de Alta Tecnología (CENAT).

3.3.4. Espectroscopía RAMAN

Se utiliza el Espectrómetro MicroRaman XploRA™ PLUS. Se coloca la muestra patrón y la muestra del chip de SiO₂ recubierto con oro con la funcionalización y deposición de los aptámeros, esto porque esta técnica de caracterización permite medir en la superficie con un láser de muy pequeña longitud de onda, como lo es en este caso que se utiliza un láser de 532 nm a 25 % para que la muestra no se quemé antes de encontrar la región que permita obtener los resultados y así distinguir las dispersiones inelásticas que alteran la polarizabilidad.

4. Resultados y discusión

4.1. Elección de sustrato

Se realizó la técnica de funcionalización sobre dos distintos sustratos para poder lograr la adhesión del MPA sobre la superficie y que fuera lo más semejante al sustrato final que se utilizará para la etapa microfluídica del proyecto del FEES. Es importante destacar que para la funcionalización en chips se realizó una modificación en el protocolo a partir del que se utiliza para el electrodo, el cual se puede observar en los anexos.

4.1.1. Mica

Se utilizó Vidrio de Mica para las primeras pruebas de adhesión del MPA a la superficie, para esto se realizó deposición de una capa de oro y luego se siguió el protocolo. Se observó que cuando se aplicaban las cantidades especificadas para la funcionalización del electrodo el oro de la superficie se desprendía por lo que no daban resultados adecuados en el FTIR.

A partir de esto se realizó una modificación en las concentraciones de los reactivos que participan en la funcionalización y se compararon directamente los dos protocolos, y se observó el desprendimiento casi total al seguir el protocolo de los electrodos de oro. En la **figura 10** se observan los chips luego de estar 1 hora en MPA.

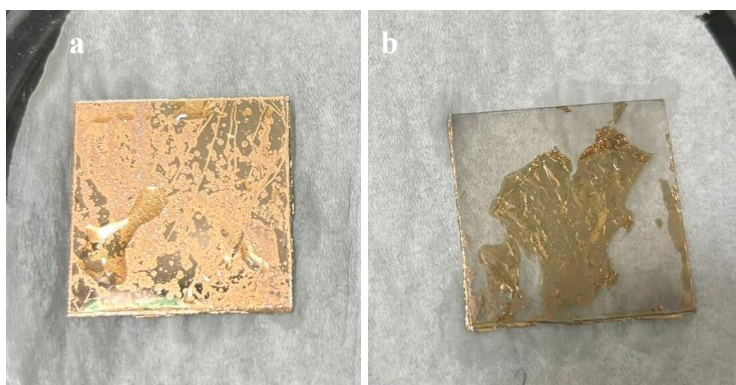


Figura 10. Comparación de protocolo de funcionalización para **a)** chips y **b)** electrodo de oro.

Se identificó como factor principal la falta de un compuesto como el titanio o cromo que actúe como acoplante entre la mica y el oro. Y también, se observó que la mica se desprendía entre capas lo que indicaba que la solución de MPA se estaba introduciendo entre las capas del vidrio.

4.1.2. SiO₂

Luego de varias pruebas, se decidió cambiar el sustrato de mica a óxido de silicio (SiO₂). Se tomaron 2 chips para comprobar con cuál recubrimiento reacciona mejor el reactivo de MPA, en la **figura 11.a** se observa el chip de SiO₂ recubierto de oro con una capa de Cromo y en la **figura 11.b** con una capa de poliamida Kapton. Siguiendo el protocolo previamente establecido para la funcionalización de los chips, se realizó la funcionalización con cada paso hasta la aplicación de los aptámeros.

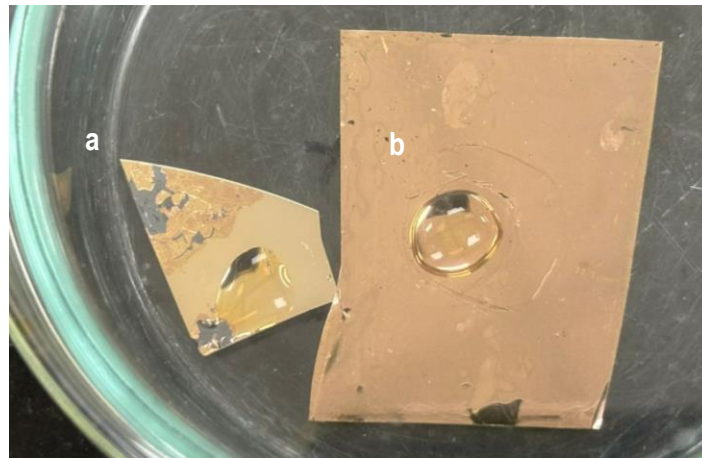


Figura 11. Chips de SiO₂ recubiertos con **a)** cromo-oro y **b)** oro sobre poliamida Kapton

Una vez se realizó el enjuague de los aptámeros de la superficie de ambos chips se realizó una prueba de ángulo de contacto mediante un goniómetro. A las muestras se les denominó SG por “*Silicon Gold*” y SGK por “*Silicon Gold Kapton*”, también se tiene “M”, “MEN” y “APT” los cuales corresponden a los pasos de funcionalización con MPA, EDC/NHS y Aptámero, respectivamente. En la **tabla 1** y **2**, se observan los resultados de las mediciones realizadas.

Es importante destacar que las muestras de EDC/NHS no mostraron ni hidrofobia ni hidrofília, esto debido a que lo único que generan sobre la capa de MPA son enlaces para la adhesión de los aptámeros, por lo que la disminución o aumento del ángulo de contacto en dicha etapa, se asocia a un pequeño cambio en las moléculas presentes sobre la superficie, en el caso del recubrimiento de cromo-oro se comporta de forma más hidrofílica y sobre el Kapton de forma hidrofóbica, por lo que se mantiene como sustrato principal de análisis el SiO₂ solamente recubierto de Cromo y Oro.

Tabla 1. Resultados de ángulo de contacto mediante goniómetro en chips funcionalizados de SiO₂, Cromo y Oro









Muestra		Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Promedio	Desv. Est.
Medición		α	β	α	β	α	β		
SG		50.796	48.527	63.305	65.129	49.001	47.816	54.09567	7.9225
SGM		75.698	76.551	76.926	78.75	77.277	79.109	77.38517	1.3114
SGMEN		77.146	64.833	78.732	74.286	72.894	73.009	73.48333	4.8375
SGAPT		71.602	76.452	59.167	57.219	64.04	64.699	65.52983	7.3298

Tabla 2. Resultados de ángulo de contacto mediante goniómetro en chips funcionalizados de SiO₂ recubiertos con Kapton y oro

Muestra		Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Promedio	Desv. Est.
Medición		α	β	α	β	α	β		
SGK		74.698	75.373	79.624	69.341	74.129	75.362	74.7545	3.2913
SGKM		49.295	52.595	53.049	51.972	60.101	56.31	53.887	3.7844
SGKMEN		63.783	67.563	55.89	58.197	62.119	64.535	62.0145	4.2979
SGKAPT		65.506	61.781	61.976	61.155	64.792	62.245	62.90917	1.7861

Como se observa en ambas muestras, el ángulo de contacto se comporta de manera hidrofílica ante la supuesta presencia del aptámero, por lo que demuestra que si se encuentra en la superficie.

4.2. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Para observar a nivel nano la superficie se realizaron tomas de imágenes AFM del patrón de PDMS utilizado, el MPA estampado en la superficie y la adhesión de los aptámeros en la superficie. En la **figura 12** se observa la superficie y el perfil de rugosidad que presenta el patrón de PDMS utilizado para aplicar la técnica por micro contacto.

Se puede observar en dicha figura que el patrón tiene una rugosidad promedio de 80 nm, y se observa además que está en perfecto estado. Mediante esto es más fácil identificar el lado correcto en el cual se debe depositar el MPA para que se adhiera el chip.

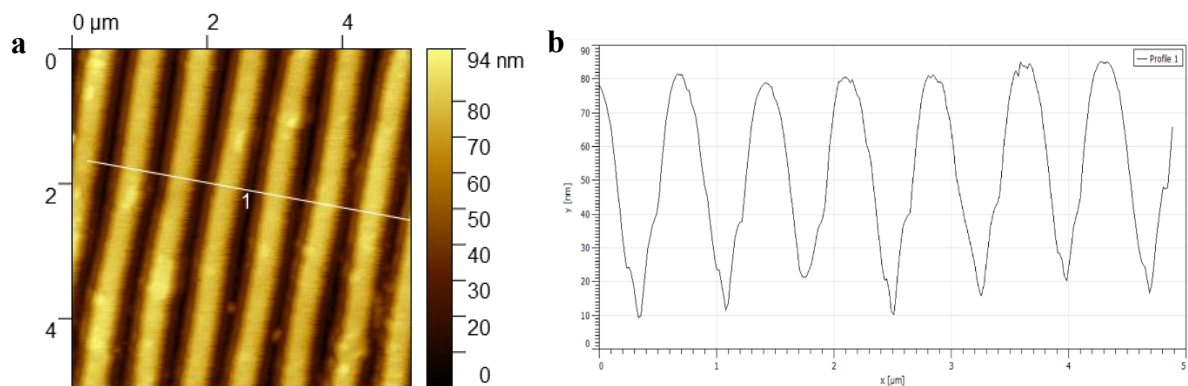


Figura 12. Imágenes **a)** 2D y **b)** perfil de rugosidad de patrones de PDMS

Ahora, en la **figura 13.a**, se puede observar el MPA estampado en la superficie, donde mediante este proceso de estampado por microcontacto se crean distintas monocapas del compuesto, en este caso el MPA, sobre la superficie deseada. Se puede observar que el estampado del patrón tiene zonas donde no se adhirió al 100 %, sin embargo, mediante el perfil de rugosidad se obtiene una rugosidad promedio de 40 nm, donde se tiene la monocapa de MPA, lo que indica que las monocapas tienen una altura de 40 nm.

Es importante destacar que se formó un pequeño exceso del patrón en una de las zonas de la superficie del chip, la cual sirvió de referencia para realizar la medición o toma de imagen en el mismo punto estratégico.

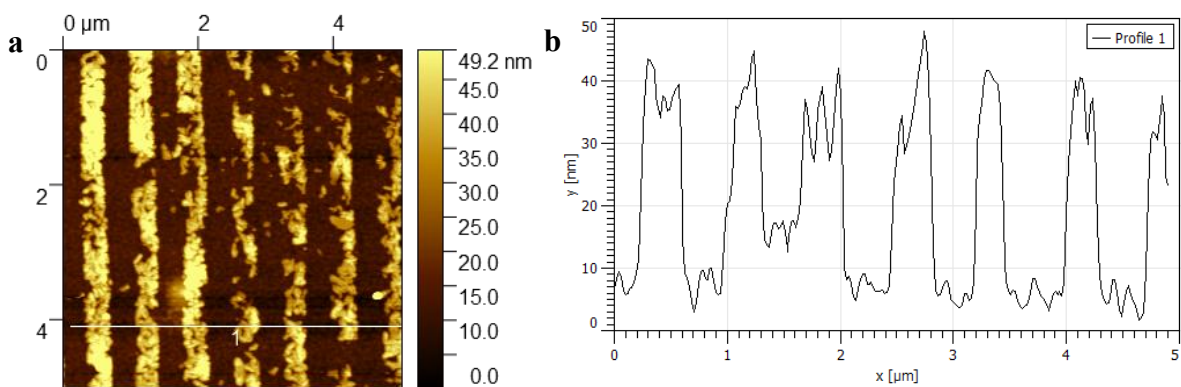


Figura 13. Imágenes a) 2D y b) perfil de rugosidad de chip de SiO₂ recubierto con oro estampado con MPA

Una vez observada la monocapa de MPA estampada sobre el chip, se continuó con la aplicación de la química EDC/NHS y la deposición de los aptámeros. En la **figura 14.a** se observa como en ciertas zonas se desprendió un poco el patrón de MPA, sin embargo, en donde se midió el perfil de rugosidad, se observó la presencia de los aptámeros, esto asociado al aumento de altura en las señales de hasta ~70 nm. Los aptámeros específicos tienen un tamaño de 75 pares de base, los cuales corresponden a 25.5 nm, se entiende que estos no tienen una forma establecida, por lo que pueden presentarse tanto acumulados como un nudo o estirados completamente.

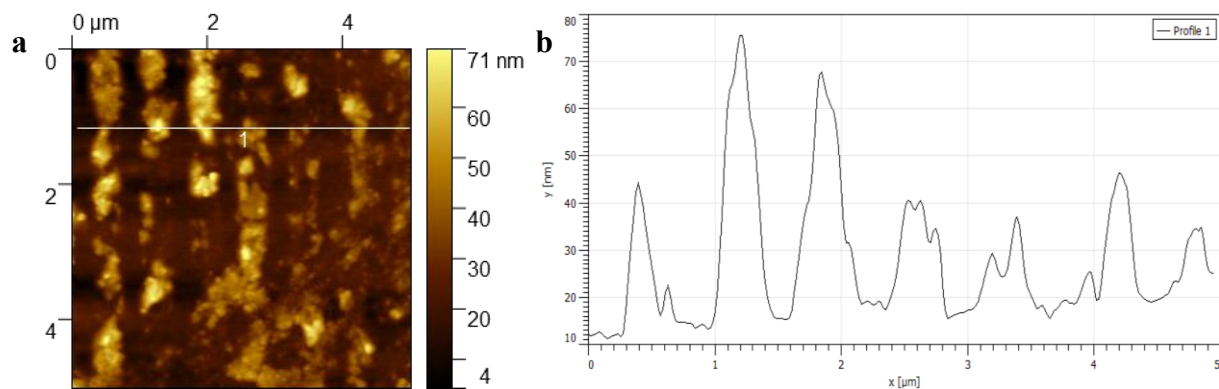


Figura 14. Imágenes a) 2D y b) perfil de rugosidad de chip de SiO₂ funcionalizado con la química EDC/NHS con aptámeros

4.3. Espectroscopía RAMAN

Mediante el análisis de la superficie del chip de SiO₂ recubierto con cromo-oro y funcionalizado con aptámeros, se identificaron 3 señales de importancia como se observa en la **figura 15**, las cuales a aproximadamente 1000 cm⁻¹ y 1500 cm⁻¹ se asocian con la vibración de los grupos C-O-H y C-O, y donde a ~3000 cm⁻¹ se puede considerar un estiramiento alifático de C-C (Arib et al., 2018), que indicaban una alteración en la polarizabilidad de los aptámeros.

Para confirmar estas señales se utilizó un láser de 532 nm en el área específica del chip donde se observó una “aglomeración” de MPA, la cual se observó fácil debido a que el patrón de PDMS generó en la superficie un efecto tornasol, y de manera complementaria se realizó la medición de FTIR para identificar de manera más directa los grupos funcionales.

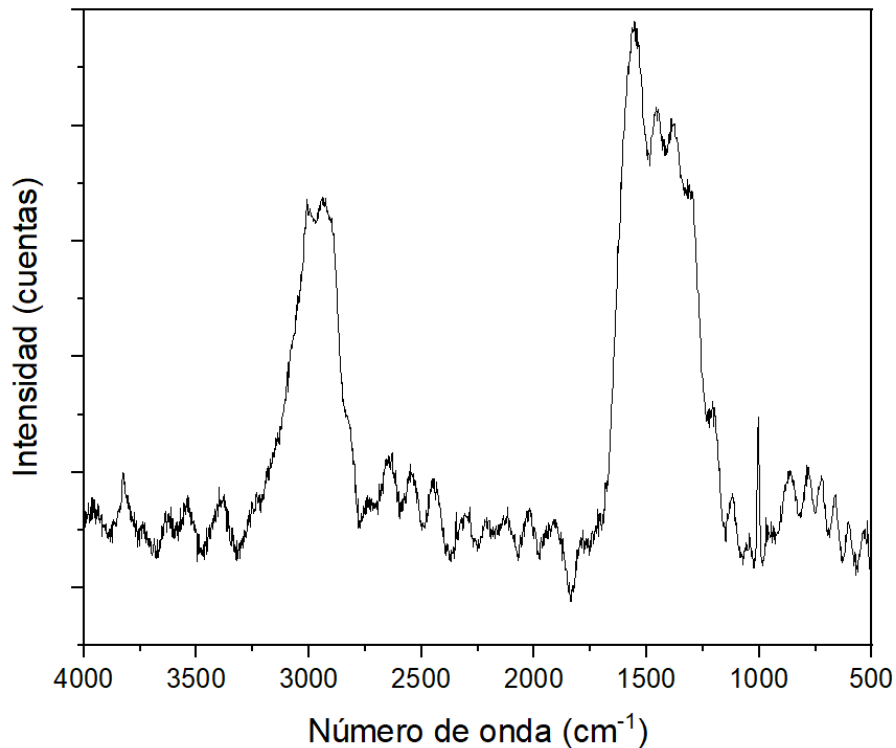


Figura 15. Espectro RAMAN de chips de SiO₂ funcionalizados con aptámeros específicos mediante química EDC/NHS

4.4. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Luego de verificar la presencia de aptámeros sobre la superficie mediante AFM y observar las señales de importancia en RAMAN, se realizó el análisis de FTIR, donde inicialmente se realiza la comparación de la muestra patrón del chip de SiO₂ recubierto con cromo-oro sin nada y del chip ya funcionalizado con los aptámeros mediante la química EDC/NHS, como lo muestra la **figura 16**.

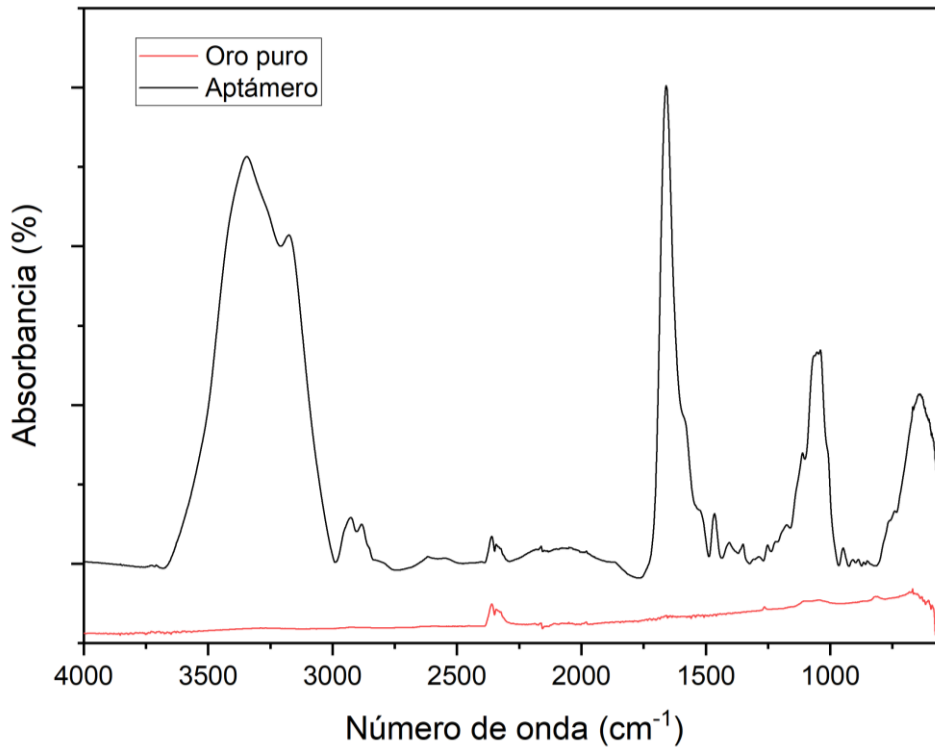


Figura 16. Espectro FTIR comparativo de chips de SiO₂ puros y funcionalizados con aptámeros específicos mediante química EDC/NHS

Mediante este espectro se pueden observar señales de distintas absorbancias, lo que demuestra la adhesión de moléculas al chip luego de seguir el protocolo completo de funcionalización de aptámeros específicos, las cuales pueden asociarse tanto al MPA o a los aptámeros. Es importante destacar que las señales de mayor absorbancia se encuentran en ~ 1000 , ~ 1500 y $\sim 3000-3500$ cm⁻¹, las cuales coinciden con las encontradas en el análisis RAMAN de la muestra. Aunque este tipo de espectroscopia reacciona a cambios en el momento dipolar, como complemento de la espectroscopía RAMAN nos brinda información de la estructura molecular muy importante.

En la **figura 17** se realiza el análisis de los grupos funcionales, donde se identifican las señales características de los aptámeros (color celeste). Las señales encontradas en 3176 y 3348 cm^{-1} , corresponden a un traslape de los estiramientos de los grupos O-H y N-H presentes en los grupos carboxilo y amida, la señal en 2926 cm^{-1} se asocia a las vibraciones de C-H que provienen de los grupos -CH de las bases nitrogenadas (Harahsheh et al., 2021). Por otro lado, la señal de 1659 cm^{-1} , se le atribuye a los estiramientos de los grupos C=O y la de 1465 cm^{-1} de N-O demuestran la correcta funcionalización gracias a la unión de las amidas. La señal de 1041 cm^{-1} demuestra la presencia de la banda fosfato (P-O-C) del esqueleto del ácido nucleico (Zhang & Zhang, 2022).

En el caso de las señales de las moléculas del MPA (color rojo), se interrelacionan con varias de los aptámeros como lo son las señales del O-H y C=O, sin embargo, se destaca la señal importante de 641 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones de estiramiento del grupo de C-S y en 2619 cm^{-1} la presencia esencial del grupo tiol S-H, lo que indica la preparación correcta de la superficie funcionalizada (Mayilmurugan et al., 2017).

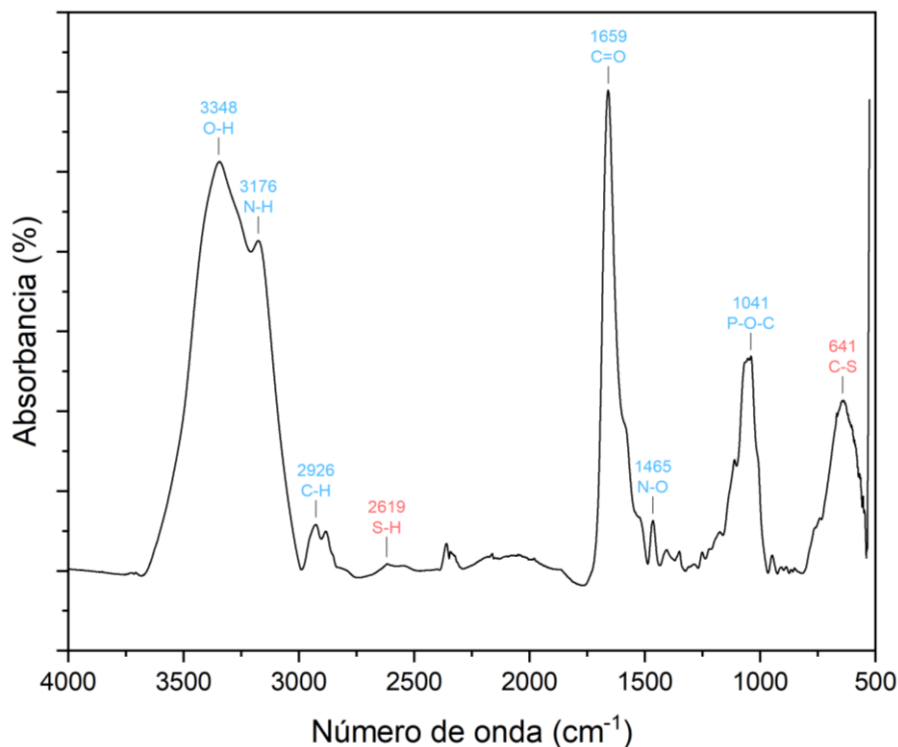


Figura 17. Espectro FTIR de chips de SiO_2 funcionalizados con aptámeros específicos mediante química EDC/NHS

4.5. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS) y Voltamperometría Cíclica (CV)

Para observar cambios en las características de la superficie del electrodo modificado y así observar los pasos de la inmovilización de los aptámeros, se realizaron mediciones de voltamperometría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica entre los pasos principales de la funcionalización: sin reactivo, con MPA y una vez se realizó la incubación de los aptámeros sobre el electrodo.

Se utilizó un electrolito de una solución 10 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, cuyos resultados se encuentran en la **figura 18 y 19**. En el caso de la voltamperometría cíclica de la figura 18, primero se le realizó al electrodo de oro sin funcionalizar, para que este funcionara como patrón de referencia para las mediciones siguientes. Es posible obtener los picos anódicos y catódicos que corresponden a la respuesta electroquímica del sistema por la oxidación y reducción del electrolito de la celda electroquímica, este comportamiento demuestra la presencia de una reacción reversible.

Una vez se funcionaliza con el MPA, se observa una disminución significativa en los picos anteriormente mencionados, lo que se explica el aumento en la resistencia de transferencia de carga en la interfaz que hay entre el electrodo y el electrolito, lo cual provoca una dificultad de penetración para los electrones para que puedan atravesar la monocapa para llegar al oro y que se presente la señal, además de que ocurre una disminución en la reversibilidad de la reacción. Al agregar el aptámero se obtuvo una disminución aún más notoria en los picos anódicos y catódicos, lo que demuestra la adhesión correcta de estos por el aumento en la resistencia.

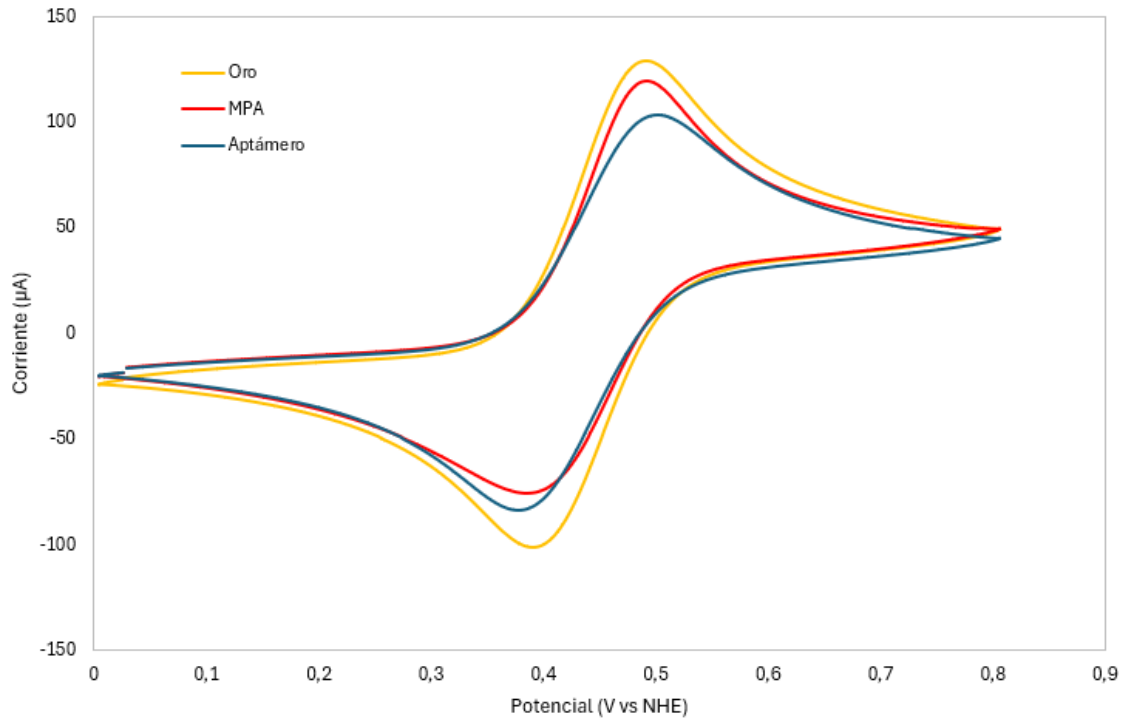


Figura 18. Voltamograma cíclico en 10 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ en 0.1 M de KCl en PBS para electrodo de oro funcionalizado con MPA y aptámeros.

A su vez, se realizaron las mediciones de la impedancia electroquímica, se obtuvo una medida patrón con electrodo de oro sin funcionalizar, donde se puede observar la ausencia del semicírculo, que es una respuesta común en los electrodos metálicos puros. Este semicírculo muestra la respuesta que hay entre el electrodo y el electrolito, donde se obtiene información acerca de la resistencia y capacitancia mediante la impedancia de la interfaz.

Se puede observar en la figura 19 que conforme se agregaba el MPA y los aptámeros, este semicírculo se hacía más pronunciado, lo que indica el aumento en la impedancia total del sistema, ya que la capa que recubre el electrodo es más gruesa lo que obstaculiza el flujo de electrones que van desde el electrolito hasta el electrodo, demostrando el principio de transferencia de carga electrodo-electrolito (Sedki et al., 2020). Lo que demuestra la adhesión correcta de los aptámeros al electrodo de oro mediante la química EDC/NHS.

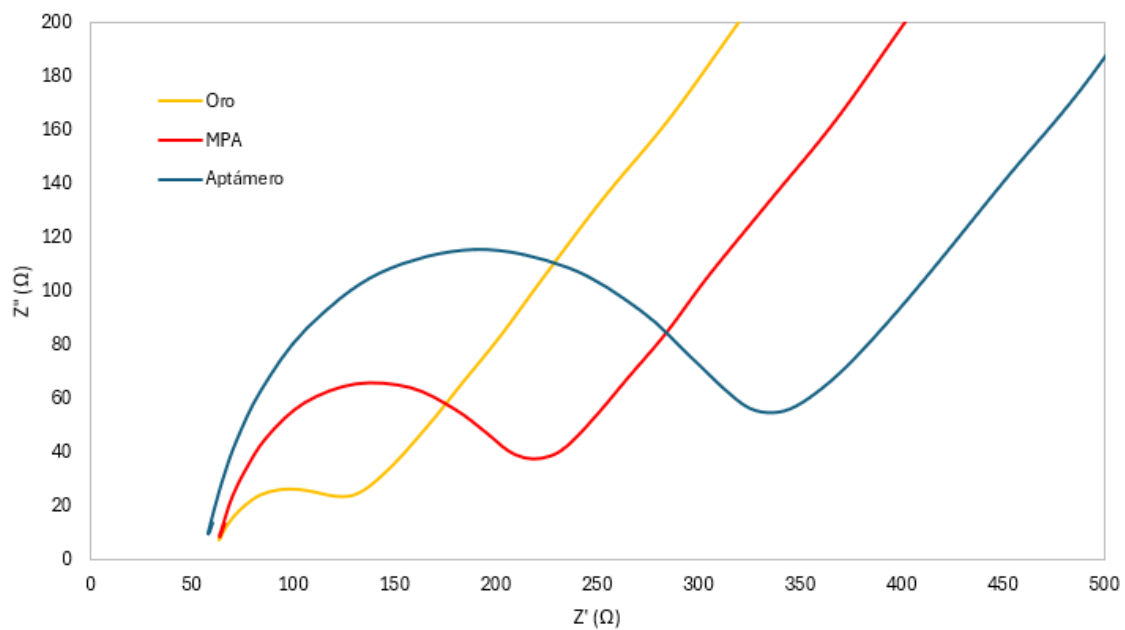


Figura 19. Gráfico Nyquist de la señal de EIS para electrodo de oro funcionalizado con MPA y aptámeros

5. Conclusiones

En este proyecto se modificó y estableció un protocolo de funcionalización mediante la química EDC/NHS para electrodos de oro y distintos sustratos recubiertos con oro para análisis de caracterización, este protocolo se puede observar en los anexos del documento.

Mediante la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) se logró observar la superficie de los sustratos de SiO₂ recubiertos con cromo-oro luego del estampado por microcontacto de patrones de polidimetilsiloxano (PDMS) y la química EDC/NHS, que demostró la existencia de partículas que modificaron la rugosidad las cuales se asocian a los aptámeros adheridos a la superficie.

El análisis RAMAN confirmó la presencia de grupos asociados a los aptámeros ubicados en un área en donde se obtuvo aglomeración de aptámeros, de manera complementaria se realizó la medición de FTIR que permitió definir y asociar fácilmente estas señales con la información respectiva del MPA y de los aptámeros. Se obtuvieron los grupos principales que se encuentran en las bases del ADN y ARN de los aptámeros, demostrando la adhesión correcta de estos.

La voltamperometría cíclica (CV) evidenció la correcta adhesión del MPA a la superficie del electrodo debido a la disminución en los picos anódicos y catódicos, lo que indica una mayor resistencia de transferencia de carga en la interfaz electrodo-electrolito. Mediante la química EDC/NHS se lograron adherir los aptámeros al electrodo, el cual se evidencia en la disminución mayor de los picos del voltamograma, lo que sugiere una barrera adicional que dificulta la transferencia de electrones y una disminución en la reversibilidad de la reacción del electrolito.

Con la Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS) y el gráfico de Nyquist se observó un aumento gradual de la impedancia con los pasos de la funcionalización, lo que indica un aumento en la resistencia y una correcta adhesión de los reactivos y moléculas de la funcionalización, demostrando la presencia y relación entre los aptámeros específicos inmovilizados en la superficie del electrodo y la resistencia total de sistema de la celda electroquímica.

6. Recomendaciones

Se recomienda realiza la toma de datos y mediciones inmediatamente después de aplicado cualquier paso o colocado un reactivo correspondiente a la funcionalización, esto para evitar la contaminación o exposición de la muestra a moléculas o ambientes no deseados.

De ser necesario el transporte o trabajo de las muestras en distintos laboratorios, se recomienda que los reactivos o muestras no se expongan por periodos prolongados a condiciones que no sean las indicadas en las fichas técnicas correspondientes, esto para evitar el daño u oxidación de los reactivos y por ende una incorrecta funcionalización.

Aunque se haya demostrado la adhesión correcta de los aptámeros tanto en el electrodo de oro como en los sustratos, se recomienda realizar variaciones experimentales, así como más ensayos que evalúen la reproducibilidad de los resultados y obtener así un proceso más optimizado y resultados más precisos.

Por último, se recomienda fomentar la colaboración con expertos en los diferentes temas que se involucran en el proyecto, como lo es en los procesos biológicos y manejo adecuado de los aptámeros y su inmovilización sobre el electrodo, uso de la técnica de funcionalización de EDC/NHS y otras técnicas que permitan un mejor rendimiento del experimento, tanto a nivel de preparación como en las técnicas de caracterización.

7. Bibliografía

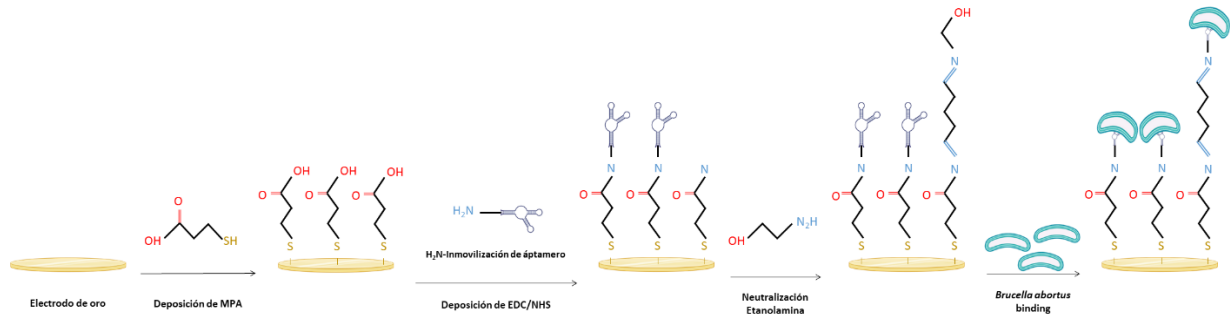
- Arib, C., Milano, S., Gerbino, A., & Spadavecchia, J. (2018). Aptamer Grafting onto (on) and into (in) Pegylated Gold Nanoparticles: Physicochemical Characterization and In vitro Cytotoxicity Investigation in Renal Cells. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 09(06). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000520>
- Bahadir, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2016). A review on impedimetric biosensors. En *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* (Vol. 44, Número 1, pp. 248–262). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.942456>
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Cordero-Guerrero, J., Jiménez-Thuel, G., & Paniagua, S. A. (2023). Sub-micron patterning of metal oxide surfaces via microcontact printing and microtransfer molding of amphiphilic molecules and antifouling application. *Journal of Materials Research*, 38(6), 1573–1582. <https://doi.org/10.1557/s43578-023-00909-x>
- Freer, Enrique., & Castro, R. (2001). *Immunochemical characterisation of Brucella LPS and its relation to virulence.* 22(1–2). https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29482001000100008
- Gil, A. D., & Samartino, L. (2001). *LAS ÁREAS URBANAS Y PERIURBANAS DE AMÉRICA LATINA.*
- Harahsheh, T., Makableh, Y. F., Rawashdeh, I., & Al-Fandi, M. (2021). Enhanced aptasensor performance for targeted HER2 breast cancer detection by using screen-printed electrodes modified with Au nanoparticles. *Biomedical Microdevices*, 23(4). <https://doi.org/10.1007/s10544-021-00586-9>
- Hernández-Mora, G., Ruiz-Villalobos, N., Bonilla-Montoya, R., Romero-Zúniga, J. J., Jiménez-Arias, J., González-Barrientos, R., Barquero-Calvo, E., Chacón-Díaz, C., Rojas, N., Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., & Moreno, E. (2017). Epidemiology of bovine brucellosis in Costa Rica: Lessons learned from failures in the control of the disease. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182380>

- Kulkarni, M. B., Ayachit, N. H., & Aminabhavi, T. M. (2022). Biosensors and Microfluidic Biosensors: From Fabrication to Application. En *Biosensors* (Vol. 12, Número 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/bios12070543>
- Ma, R., Li, C., Gao, A., Jiang, N., Feng, X., Li, J., & Hu, W. (2024). Evidence-practice gap analysis in the role of tick in brucellosis transmission: a scoping review. En *Infectious Diseases of Poverty* (Vol. 13, Número 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40249-023-01170-4>
- Mayilmurugan, M., Sindhu, G., Manikandan, M., Dhanuskodi, S., & Arasu, M. M. A. (2017). One-pot Synthesis of MPA Capped CdTe Quantum Dots for Non Enzymatic Hydrogen Peroxide Biosensor Application One-pot Synthesis of MPA Capped CdTe Quantum Dots for Non-Enzymatic Hydrogen Peroxide Biosensor Application. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*. <https://www.researchgate.net/publication/323308655>
- Neha, Verma, A. K., Kumar, A., & Ahmed, I. (2017). Comparative efficacy of serological diagnostic methods and evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of bovine brucellosis. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18(4), 279. [/pmc/articles/PMC5767636/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35767636/)
- Oberhaus, F. V., Frense, D., & Beckmann, D. (2020). Immobilization techniques for aptamers on gold electrodes for the electrochemical detection of proteins: A review. En *Biosensors* (Vol. 10, Número 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/BIOS10050045>
- Ogurtsov, V. I. (2014). *ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR BASED ON MICROFABRICATED ELECTRODE ARRAYS FOR LIFE SCIENCES APPLICATIONS*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.11066.49603>
- Rivas-Solano, O. (2015). Brucella abortus: patogénesis y regulación génica de la virulencia. *Tecnología en Marcha*, 28(2), 61–73.
- Sedki, M., Chen, X., Chen, C., Ge, X., & Mulchandani, A. (2020). Non-lytic M13 phage-based highly sensitive impedimetric cytosensor for detection of coliforms. *Biosensors and Bioelectronics*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111794>
- Strahl, H., & Errington, J. (2024). *On: Fri*. 54, 9. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215>

- Urdea, M., Penny, L. A., Olmsted, S. S., Giovanni, M. Y., Kaspar, P., Shepherd, A., Wilson, P., Dahl, C. A., Buchsbaum, S., Moeller, G., & Hay Burgess, D. C. (2006). Requirements for high impact diagnostics in the developing world. *Nature* 2006 , 444(1), 73–79. <https://doi.org/10.1038/nature05448>
- World Health Organization. (2015). *The control of neglected zoonotic diseases: from advocacy to action*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241508568>
- Wu, Q., Zhang, Y., Yang, Q., Yuan, N., & Zhang, W. (2019). Review of electrochemical DNA biosensors for detecting food borne pathogens. En *Sensors (Switzerland)* (Vol. 19, Número 22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s19224916>
- Zeng, J., Duarte, P. A., Ma, Y., Savchenko, O., Shoute, L., Khaniani, Y., Babiuk, S., Zhuo, R., Abdelrasoul, G. N., Charlton, C., Kanji, J. N., Babiuk, L., Edward, C., & Chen, J. (2022). *An impedimetric biosensor for COVID-19 serology test and modification of sensor performance via dielectrophoresis force*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114476>
- Zhang, Y., & Zhang, J. (2022). Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Aptasensor Made of Carbon-Based Nanomaterials for Detecting Lactoferrin at Low Concentrations. *ACS Omega*, 7(42), 37964–37970. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05129>
- Zúñiga-Rivera, D. (2023). *Funcionalización de electrodos de oro con aptámeros para biosensor impedimétrico con aplicación en detección de Brucella abortus*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

8. Anexos

Protocolo para Inmovilización de Aptámeros sobre Oro con EDC/NHS



Preparación de electrolitos

Materiales	Equipo
Acetona	Botellas de 500 ml y 1L
Agua Mili-Q	Pipeta de 2 ml
Agua destilada	Balanza analítica
Ácido nítrico (HNO ₃)	Espátulas
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	
Cloruro de potasio (KCl)	
Ferrocianuro de potasio ([Fe (CN) ₆] ⁴⁻)	
Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7.4)	

Procedimiento

1. Limpiar con agua y jabón toda la cristalería que se va a utilizar en el procedimiento, seguido de acetona y ácido nítrico, seguidamente se realizan lavados con agua destilada y por último lavados con agua Mili-Q. Limpiar las espátulas con agua y jabón, seguido de acetona y lavados con agua destilada.
2. **Solución 1:** Preparar 400 ml de solución 0.05 M de ácido sulfúrico (H₂SO₄), para esto se mide 1.11 ml de ácido sulfúrico con una pipeta de 2 ml, se coloca en un recipiente con tapa de 500 ml y se agrega 398.89 ml de agua Mili-Q.

- 3. Solución 2:** Preparar 1 L de disolución 10 mM de Ferrocianuro de potasio ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$), en 0.1 M de cloruro de potasio (KCl) y PBS (pH 7.4), para esto se mide en la balanza analítica 4225.45 mg de Ferrocianuro de potasio ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$), 7450.20 mg de KCl y un sobre de PBS, estas sustancias se agregan a un recipiente con tapa de 1 L y se afora con agua Mili-Q. Se prepara un litro para utilizarlo en varios procedimientos.

Limpieza electrodos de platino

Materiales	Equipo
Alúmina 1 μm	Kimwipes
Acetona	Beakers de 10 ml
Agua Mili-Q	Pinzas de teflón
Agua destilada	Espuma
Ácido nítrico (HNO_3)	Baño ultrasónico
Ácido sulfúrico (H_2SO_4)	Pipeta de 3 ml
Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)	Pipeta de 2 ml
	Probeta de 100 ml
	Celda de vidrio

Procedimiento

1. Limpiar con agua y jabón toda la cristalería que se va a utilizar en el procedimiento, seguido de acetona y ácido nítrico, seguidamente se realizan lavados con agua destilada y por último lavados con agua Mili-Q.
2. Se realiza la limpieza mecánica, para esto se coloca alúmina sobre un Kimwipe y se friccionan los electrodos de platino (Pt) (malla rectangular y electrodo de malla cuadrada) sobre la alúmina.



Figura 1. Pulido de electrodos de platino con alúmina

3. Seguidamente se realiza la limpieza orgánica, se sujeta los electrodos con pinzas de teflón para colocarlos en un beaker de 25 ml, se le agrega agua destilada hasta cubrir la superficie de los electrodos. Se sónica durante 5 min. El agua se descarta y se agrega acetona al beaker hasta cubrir la superficie de los electrodos, para volver a sonicar por 5 min.
4. Seguidamente se realiza la limpieza química, se prepara 8 ml de disolución piraña en un beaker de 10 ml, para esto se agrega primero 6 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado utilizando una pipeta de 3 ml, seguido se vierte 2 ml de Peróxido de hidrógeno concentrado utilizando una pipeta de 2 ml. Se introducen los electrodos de Pt en el beaker durante 30 min.

!\\ siempre verter peróxido sobre el ácido lenta y cuidadosamente gota a gota !

5. Luego se enjuagan los electrodos con agua destilada dentro de la capilla y se seca con aire.
6. Por último, se realiza la limpieza electroquímica utilizando el potenciostato. Se usa como electrolito una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.05 M (**solución 1**), se mide 55 ml de **solución 1**, utilizando una probeta de 100 ml y se agrega a la celda de vidrio.
7. Se usa el electrodo de platino de malla limpio como electrodo de trabajo, el contraelectrodo de espiral y el electrodo de referencia $Ag/AgCl_{3.5M} KCl$

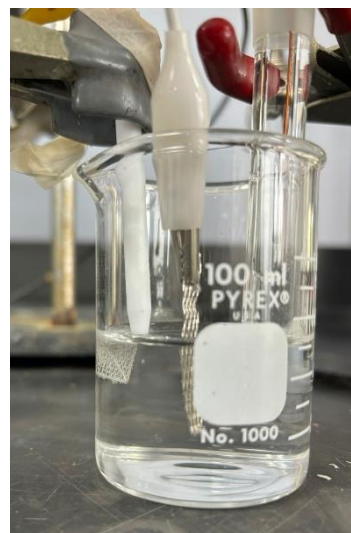
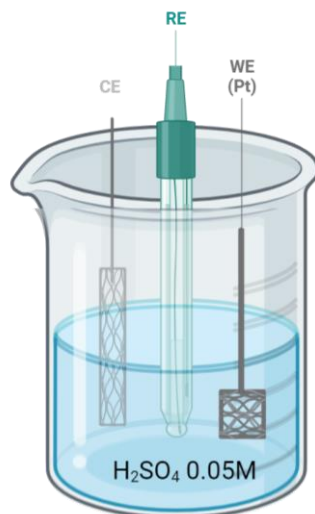


Figura 2. Conexiones para realizar la limpieza electroquímica del Pt.

- El experimento está guardado en la computadora. Se le aplica 2 V durante 600 s, con una posterior aplicación de voltamperometría cíclica entre -191 mV a 1139 mV vs AgAgClKCl_{3.5M} durante 40 ciclos.

Limpieza electrodo de oro

Materiales	Equipo
Alúmina 0.05 μm	Toalla de tela
Acetona	Beakers de 10 ml
Agua destilada	Espuma
Ácido nítrico (HNO_3)	Baño ultrasónico
Acido sulfurico (H_2SO_4)	2 Probetas de 100 ml
	Celda de vidrio

Procedimiento

- Limpiar con agua y jabón toda la cristalería que se va a utilizar en el procedimiento, seguido de acetona y ácido nítrico, seguidamente se realizan lavados con agua destilada y por último lavados con agua Mili-Q.
- Se realiza la limpieza mecánica del electrodo oro, para esto se utiliza una toalla de tela suave, primero se humedece la toalla con agua y se exprime para eliminar el exceso de

agua, seguido de esto se coloca la solución coloidal de alúmina $0.05 \mu\text{m}$ sobre la parte suave de la toalla de tela y se fricciona el electrodo sobre la alúmina suavemente sin presionar, continuar el proceso hasta obtener una superficie con efecto espejo. Lavar el electrodo con agua destilada y secar con aire.

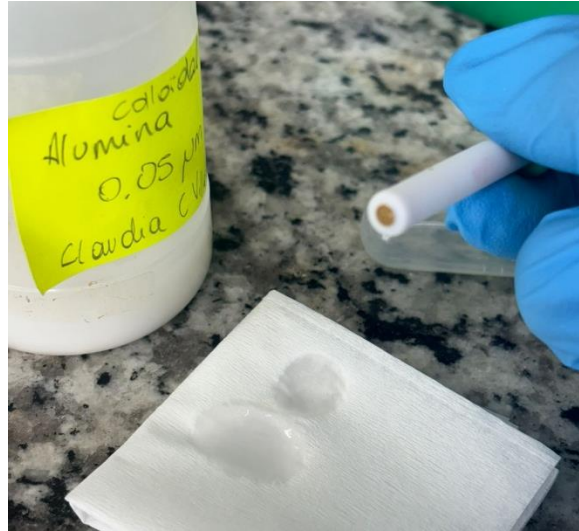


Figura 3. Pulido de electrodo de oro con alúmina coloidal

3. Se realiza la limpieza orgánica del electrodo, se coloca el electrodo en un beaker de 25 ml, se le agrega agua destilada para cubrir la superficie del electrodo y se sónica durante 5 min.
4. El agua se descarta y se agrega acetona al beaker hasta cubrir la superficie del electrodo, para volver a sonicar por 5 min.
5. Por último, se realiza la limpieza electroquímica utilizando el potenciostato. Se usa como electrolito una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.05 M purgado con N_2 (**solución 1**), se mide 55 ml de solución 1, utilizando una probeta de 100 ml y se agrega a la celda de vidrio.
6. Se usa el electrodo de platino de espiral limpio como contraelectrodo, el electrodo de trabajo es el de oro y el electrodo de referencia $\text{Ag}/\text{AgCl}_{3.5\text{M}} \text{KCl}$

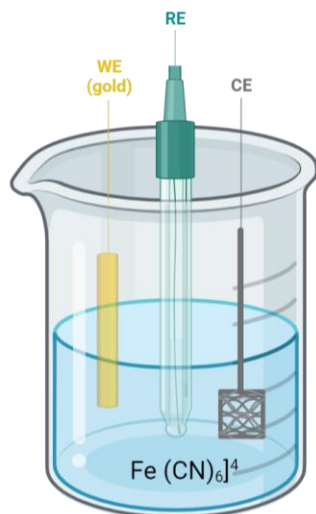


Figura 4. Conexiones para realizar la limpieza electroquímica del oro y medición de CV y EIS.

7. Se limpia el electrodo de oro aplicando 13 ciclos de potencial entre -0.3 y $+1.3$ V Vs. Ag/AgCl con una velocidad de barrido de 100 mV/s.
8. Para finalizar, se realiza la medición de CV y EIS para el oro desnudo. Para esto se mide 55 ml de solución 10 mM de Ferrocianuro de potasio ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) (solución 2), utilizando una probeta de 100 ml, se coloca la solución en la celda de vidrio, previamente lavada según el punto 1.
9. Se utilizan los siguientes parámetros para realizar las mediciones, potencial de -0.6 (-0.2) a 0.6 (0.8) V Vs. Ag/AgCl con una velocidad de barrido de 0.05 V/s y EIS, se aplicando un potencial de CA 0.15 (0.1) V Vs. Ag/AgCl en el rango de frecuencia de 1 a 10^4 (10^5) Hz a un potencial de CC de 0.00 mV.

Funcionalización de la superficie de oro mediante EDC/NHS

Materiales	Equipo
Ácido 3-mercaptopropiónico (MPA)	Micropipeta de 1-20 μ l
Etanol absoluto	Micropipeta de 10-100 μ l
Ácido morfolinoetanosulfónico (MES)	Cajas petri pequeñas
Agua Mili-Q	Probetas de 10 ml
N-hidroxisuccinimida (NHS)	Beakers 10-25 ml
Ácido Nítrico (HNO_3)	Probeta de 100 ml
Serum de albumina bovino (BSA)	Celda de vidrio
Etanolamina	
N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC)	
Ditiotreitol (DTT)	
Buffer PBS	

Funcionalización de los electrodos de oro

Procedimiento

Limpiar con agua y jabón toda la cristalería que se va a utilizar en el procedimiento, seguido de acetona y ácido nítrico, seguidamente se realizan lavados con agua destilada y por último lavados con agua Mili-Q.

1. Ácido Mercaptopropiónico (MPA)

- 1.1. Se prepara 5 ml de solución de ácido mercaptopropionico (MPA) 0.1 M, se mide 43,5 μ l de MPA con una micropipeta de 10 – 100 μ l, se coloca en un balón aforado de 5 ml y se completa con etanol absoluto.
- 1.2. Se sumerge el electrodo limpio en un beaker con la solución 0.1 M de MPA durante 1 hora para formar una monocapa autoensamblada en la superficie de oro.
- 1.3. Al retirar el electrodo de la solución de MPA, se enjuaga 3 veces con etanol absoluto, para este paso se colocan tres beakers con etanol absoluto y se sumerge el electrodo en cada uno

de ellos con mucho cuidado, esto con el fin de remover moléculas de MPA no enlazadas covalentemente.

- 1.4. Se realiza la medición de CV y EIS, para el MPA. Se mide 55ml de solución 2, utilizando una probeta de 100 ml y se coloca en la celda de vidrio

Se usa el electrodo de platino de espiral limpio como *contraelectrodo*, el electrodo de trabajo es el de oro y el electrodo de referencia Ag/AgCl_{3.5M KCl}. Una vez terminada la medición, se desecha la solución y se enjuaga la celda con agua Mili-Q.

2. Etil Carbodiimida (EDC) y N-Hidroxisuccinimida (NHS)

- 2.1. Se prepara 5 ml de solución de 0.15 M de EDC y 0.15 M de NHS en 0.1 M tampón MES, para esto se pesa en la balanza analítica, 143.78 mg de EDC, 86.32 mg de NHS, se agrega a un beaker de 10 ml y se completa con el tampón MES, se deja por 30 minutos.
- 2.2. El tampón MES, se preparó previamente con 50 ml de Agua Mili-Q, 1066.2 mg de MES y 3.8mg de DTT, este último para que se mantenga el valor de pH, que se debe medir con un pHmetro y que de un pH 5.5.
- 2.3. Se hace un lavado con tampón MES para eliminar las moléculas de EDC/NHS que no reaccionaron.

3. Aptámero

- 3.1. El electrodo modificado y activado se incuba con 10 µl de solución de aptámero, seguido de un lavado con solución tampón fosfato (PBS)
- 3.2. Luego de enjuagar el electrodo se seca con N₂ con poca presión y con cuidado y se realiza la medición de CV y EIS para la solución de aptámeros. Se mide **55ml de solución 2**, utilizando una probeta de 100 ml y se coloca en la celda de vidrio

Se usa el electrodo de platino de espiral limpio como *contraelectrodo*, el electrodo de trabajo es el de oro y el electrodo de referencia Ag/AgCl_{3.5M KCl}. Una vez terminada la medición, se desecha la solución y se enjuaga la celda con agua Mili-Q.

4. Bloqueo de aptámeros

- 4.1. Preparar 5 ml de solución de **etanolamina 0.1 M**, se mide **0.03 ml de etanolamina** con una micropipeta de 10 – 100 μ l, se coloca en un balón aforado de 5 ml y se completa con agua Mili-Q.
- 4.2. Posteriormente, el electrodo se sumerge en un beaker con una solución de etanolamina 0,1 M durante 30 minutos para pasivar los grupos **-NHS** que no reaccionaron.
- 4.3. El electrodo se lavó a fondo con solución de **PBS** y se sumerge el electrodo en **BSA** para evitar una reacción no deseada del material biológico y el oro, durante **30 minutos**.

Funcionalización en chips de oro ($\text{SiO}_2+\text{Cr}+\text{Au}$)

Se utilizan chips de SiO_2 con un recubrimiento de 11.4 nm de Cromo y 262 nm de Oro para las pruebas de análisis de FTIR, AFM, SEM, ángulo de contacto y RAMAN.

Procedimiento

1. Limpieza de los chips con oro

- 1.1. Se realiza una solución con 100 μ l de *Hellmanex* y 5 ml de agua Mili-Q.
- 1.2. Se introducen los chips en la solución y se colocan en una plantilla a 60 °C durante 30 minutos.
- 1.3. Pasado el tiempo se enjuagan los chips con agua Mili-Q, al menos 3 enjuagues.

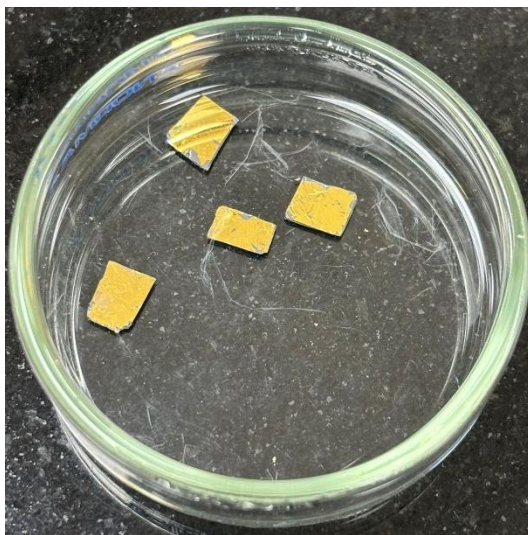


Figura 5. Limpieza de chips de oro con *Hellmanex*

2. Ácido Mercaptopropiónico (MPA)

2.1. Se preparan 2 ml de solución de ácido mercaptopropionico (MPA) 0.01 M, se mide 2.44 μ l de MPA con una micropipeta de 1-20 μ l y se coloca en una caja Petri y se agregan 2 ml de etanol absoluto.

3. Preparación de los patrones de PDMS para microcontacto

3.1. Se selecciona el patrón y se introduce en un recipiente con etanol absoluto, donde se debe sonicar por 30 segundos para retirar cualquier sustancia o partículas no deseadas.

3.2. Se retira y se seca con aire comprimido o N₂ y se coloca sobre un vidrio porta muestras, asegurándose que esté el patrón hacia arriba (revisar en AFM)

3.3. Se coloca con un aplicador la solución de MPA sobre el patrón y se espera a que se seque completamente

3.4. Se coloca el chip de oro sobre el patrón y se coloca en una plantilla a 120 °C durante 10 minutos

3.5. Pasado el tiempo se retira el chip con precaución de que no se deslice sobre el patrón y se enjuaga 3 veces con etanol absoluto para remover las moléculas de MPA que no se enlazaron covalentemente a la superficie

En caso de que se requiera hacer alguna medición para caracterización, se seca con N₂ con mucho cuidado, para no remover las partículas que estén en la superficie.

4. Etil Carbodiimida (EDC) y N-Hidroxisuccinimida (NHS)

4.1. Se preparan 5 ml de solución de EDC y NHS en tampón MES, en una balanza analítica se miden 6 mg de EDC y 5 mg de NHS y se coloca en una caja Petri (o beaker) y se agregan 5 ml de tampón MES.

4.2. El tampón MES, se preparó previamente con 50 ml de Agua Mili-Q, 1066.2 mg de MES y 3.8mg de DTT, este último para que se mantenga el valor de pH, que se debe medir con un pHmetro y que de un pH 5.5.

4.3. Una vez esté preparada la solución se introducen los chips durante 30 minutos, y una vez pasado el tiempo, se enjuaga con tampón MES.

En caso de que se requiera hacer alguna medición para caracterización, se seca con N₂ con mucho cuidado, para no remover las partículas que estén en la superficie.

5. Aptámero

- 5.1. Ahora se debe incubar el chip con 5 μ l de solución de aptámero y se deja reposar por 1 hora y luego se enjuaga con PBS.
- 5.2. Luego de esto, se debe hacer 5ml de solución de etanolamina con 5 μ l de etanolamina y el resto de agua Mili-Q, esto para pasivar los grupos NHS que no reaccionaron.



Figura 6. Deposición de aptámeros sobre chips de oro luego de aplicar el protocolo de funcionalización con la química EDC/NHS