



**INAOE**

# **Funcionalización de nanopelículas de oro con oligonucleótidos de SARS-CoV-2 para uso en un biosensor óptico**

Por:

**Cristina Isabel Díaz Failach**

Presentado como requisito parcial para la obtención del grado de:

**Maestría en Ciencias y Tecnologías Biomédicas**

en el:

**Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica Y Electrónica**

Supervisada Por:

**Teresita Spezzia Mazzocco, INAOE**

Agosto de 2021  
Tonantzintla, Puebla



*Dedicada a Fidel José Failach Y a  
Laureano Alberto Rosero quienes tuvieron  
que padecer las terribles consecuencias  
de esta enfermedad.*

---

## AGRADECIMIENTOS

---

Agradecer es un acto hermoso pero difícil, y no porque no se desee hacerlo, sino porque en el proceso de hacer un trabajo investigativo, muchas personas aportan y ayudan de alguna forma a culminar ese proceso y no siempre se les recuerda en estos escritos.

Me gustaría iniciar agradeciendo a Dios, por permitirme venir a este mundo y abrir los caminos para llegar a este punto. A mi mamá por creer más en mí de lo que yo misma creo, por su amor incondicional y por hacerme reír incluso en los momentos más difíciles, a mi papá por darme aliento y no dejarme caer, por nuestras extensas pláticas sobre química, sobre biología, por sus ideas maravillosas sobre el mundo y la ciencia, por ser mi faro de luz en la oscuridad y por hacerme sentir que, sin importar la edad, siempre podré hacer lo que me proponga. A Pao por creer desde un principio en mí, por su apoyo en todos estos años, por su cariño a pesar de todas las situaciones, por impulsarme cada día y no permitirme dar ni un paso atrás, a mi hermano por su alegría, por no rendirse y por darme a mi sobrinita, a todos mis tíos que me han apoyado de diferentes formas, gracias.

A Aleja por ser mi persona, mi psicóloga de cabecera y estar ahí escuchándome en los momentos más críticos, a Moni, por su amistad y compañía en este último año, por enseñarme a amar con locura la bici y mostrarme otra cara de la vida. A mis amigos, a Adri y Leidy por darme fuerza y por seguir ahí para mí a pesar de la distancia, a Dianita y Sandris, por animarme y sus consejos en química y biología, a la Hna Dolly por sus oraciones, a Vane por sus palabras de aliento, y por ayudarme a tener los pies sobre la tierra, a Andrés y Loretica, porque más que mis roomies se convirtieron en mi familia, a Bets, Marty, Joaco y Juanito, porque a lo largo de mi maestría cada uno estuvo en su momento brindándome su amistad incondicional y por eso a todos ellos los llevo

en mi corazón para siempre.

También quiero agradecer la Dra. Teresita Spezzia, mi asesora, por su apoyo incondicional, por su incansable trabajo, por sus consejos, por sus enseñanzas, por su alegría y su motivación y sobre todo por impulsarme a seguir aun cuando yo creía no poder más. Agradezco también a todos los doctores que conocí en este maravilloso centro de investigación, y a todos mis maestros, porque cada uno aportó en algún momento de mi formación, así mismo agradezco al INAOE, por darme la oportunidad de estudiar en el programa y el apoyo económico que me brindo a lo largo de mi maestría.

A todos aquellos que olvido mencionar y que de alguna forma hicieron mi vida más amable en este camino, infinitas gracias, porque este trabajo no hubiera sido posible sin la motivación, la ayuda y el apoyo de todos ustedes.

---

## RESUMEN

---

**Introducción:** En el mes de diciembre del año 2019, en Wuhan, China se produjeron una serie de síntomas respiratorios agudos atípicos, que se empezaron a transmitir de persona a persona y lograron trascender fronteras internacionales a más de 200 países en todo el mundo, por lo que fue declarado como una pandemia. Después de varios análisis y pruebas, se encontró que el responsable de la enfermedad COVID-19 era un nuevo coronavirus, que recibió el nombre de síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus 2, o por sus siglas en inglés SARS-CoV-2. Actualmente, el diagnóstico de SARS-CoV-2, se realiza con la prueba de reacción en cadena de polimerasa de transcripción reversa. Sin embargo, ante las limitaciones de la misma, se están investigando y desarrollando dispositivos y pruebas diagnósticas alternativas a la RT-PCR, para identificar la presencia del virus en un paciente. Los biosensores ópticos de resonancia plasmónica en superficie (SPR), son buenos candidatos para la detección de diferentes biomoléculas en diversos agentes biológicos, como por ejemplo los virus, Es importante enfatizar que para su correcto funcionamiento, se requiere la funcionalización de los nanomateriales, que implica modificar sus propiedades mediante la adsorción de diversos átomos, iones, o moléculas de alguna sustancia que puede estar en estado sólido, líquido o gaseoso y que logran adherirse a sus paredes modificando algunas propiedades físicas tales como la solubilidad y dispersión, ya que de esto depende la eficiencia y la especificidad del dispositivo a la hora de analizar células diana.

**Métodos:** En este estudio se determinó si oligonucleótidos tiolados, específicos a SARS-CoV-2 se adherían a nanopelículas de oro a través de dos métodos de funcionalización; envejecimiento con sal y funcionalización *in situ*. Inicialmente se elaboró una curva de calibración a partir de los reactivos 3-AMP y DTNB para determinar la concentración de oligonucleótidos presentes en un

sobrenadante al finalizar el proceso de funcionalización, posteriormente se realizó la primera prueba de funcionalización, encontrando que los procesos debían ser optimizados y ajustados. Para la segunda prueba de funcionalización por ambos métodos, se determinó por métodos espectrofotométricos, el porcentaje de oligonucleótidos adheridos a una nanopelícula de oro y finalmente se realizó el proceso de funcionalización en un biosensor óptico de resonancia plasmónica.

**Resultados:** Se encontró que los dos métodos de funcionalización usados en este estudio permiten la adhesión de oligonucleótidos a las nanopelículas de oro, sin embargo, el método más efectivo es la funcionalización *in situ* con agua libre de nucleasas. Así mismo, se encontró que el área del sustrato donde está depositada la NF y la cantidad de oligonucleótidos a usar son factores clave en el proceso de funcionalización. Por otro lado, es necesario el depósito de titanio en la nanopelícula de oro, puesto que este elemento brinda estabilidad mecánica y eficiencia al proceso de adhesión de los oligonucleótidos. Finalmente, el uso de un chip y una bomba de infusión brinda estabilidad en la adhesión de los oligonucleótidos a la nanopelícula y reduce la medición de errores en el biosensor.

---

## REVIEW

---

**Introduction:** In December 2019, in Wuhan, China, a series of atypical acute respiratory symptoms occurred, which began to be transmitted from person to person and managed to transcend international borders to more than 200 countries around the world. For this reason it was declared a pandemic. After several analyzes and tests, it was found that COVID-19, was responsible of disease; a new coronavirus, which received the name of severe acute respiratory syndrome by coronavirus 2, or SARS-CoV-2 for its acronym in English. Currently, the diagnosis of SARS-CoV-2 is carried out with the reverse transcription polymerase chain reaction test (RT-PCR). However, given its several limitations, new devices and alternative diagnostic tests to RT-PCR are being investigated and developed , to identify the presence of the virus in a patient. Surface plasmon resonance (SPR) optical biosensors are good candidates for the detection of different biomolecules in various biological agents, such as viruses. In order to detect successfully and with accuracy the biological target, the functionalization of nanomaterials used for SPR optical biosensor is required., which implies modifying their properties through the adsorption of various atoms, ions, or molecules.

**Methods:** In this study it was determined whether SARS-CoV-2 specific thiolated oligonucleotides adhered to gold nano-films through two functionalization methods: aging with salt and functionalization *in situ*. Initially, a calibration curve was elaborated from the 3-AMP and DTNB reagents to determine the concentration of oligonucleotides present in a supernatant at the end of the functionalization process, later the first functionalization test was carried out, finding that the processes had to be optimized. For the second

functionalization test by both methods, the percentage of oligonucleotides adhered to a gold nano-film was determined by spectrophotometric methods and finally the functionalization process was carried out in a plasmonic resonance optical biosensor.

**Results:** It was found that the two functionalization methods used in this study allow the adhesion of oligonucleotides to gold nano-films, however, the most effective method is *in situ* functionalization with nuclease-free water. Likewise, it was found that the area of the substrate where the NF is deposited and the number of oligonucleotides to be used are key factors in the functionalization process. On the other hand, the deposit of titanium in the gold nano-film is necessary since this element provides gold film mechanical stability and efficiency to the oligonucleotide adhesion process. Finally, the use of a chip and an infusion pump provides stability in the adhesion of the oligonucleotides to the nano-film and reduces the measurement of errors in the biosensor.



---

## TABLA DE CONTENIDO

---

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	17
<b>Introducción</b> .....	17
<b>1.1. Antecedentes</b> .....	18
<b>1.2. Planteamiento del problema</b> .....	29
<b>1.3. Justificación</b> .....	29
<b>1.4. Objetivo general</b> .....	30
<b>1.5. Objetivos específicos</b> .....	31
<b>1.6. Hipótesis</b> .....	31
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	32
<b>Marco Teórico</b> .....	32
<b>2.1. Virus: SARS-CoV-2</b> .....	33
<b>2.2. Ácidos nucleicos</b> .....	39
<b>2.2.1. Estructura y función del ADN y del ARN</b> .....	41
<b>2.2.2. Oligonucleótidos</b> .....	44
<b>2.3. Nanomateriales</b> .....	45
<b>2.3.1. Nanopelículas</b> .....	46
<b>2.4. Grupo Tiol</b> .....	47
<b>2.5. Biosensores</b> .....	48
<b>2.5.1. Biosensores ópticos</b> .....	50
<b>2.5.2. Biosensores ópticos de resonancia de plasmón superficial</b> .....	51
<b>2.6. Elementos de espectrofotometría</b> .....	54
<b>2.6.1. Transmitancia</b> .....	55
<b>2.6.2. Absorbancia</b> .....	56
<b>2.6.3. Ley de Lambert-Beer</b> .....	56
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	58
<b>Metodología</b> .....	58
<b>3.1. Oligonucleótidos</b> .....	59
<b>3.1.1. Identificación de los oligonucleótidos con ensayo colorimétrico</b> .....	60
<b>3.1.2. Procedimiento para la preparación de los oligonucleótidos</b> .....	61

3.2. Preparación de Soluciones y Reactivos.....	62
3.3. Curva de calibración .....	68
3.3.1. Pruebas de optimización para la curva de calibración .....	71
3.4. Optimización de la disponibilidad de oligonucleótidos por ensayo colorimétrico en DTNB .....	72
3.5. Funcionalización y Optimización del proceso en NFs de oro con oligonucleótidos específicos a SARS-CoV-2.....	74
3.5.1. Procedimiento envejecimiento con sal.....	74
3.5.2. Proceso de funcionalización <i>in situ</i> .....	75
3.5.3. Procesos de optimización para funcionalización de NF de oro relacionado con concentración, volumen y conformación de la NF.....	76
3.6. Confirmación indirecta de la funcionalización .....	80
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>82</b>
<b>Resultados Experimentales.....</b>	<b>82</b>
4.1. Colorimetría con 3AMP y DTNB.....	83
4.2. Elaboración de una curva de calibración.....	84
4.3. Disponibilidad de oligonucleótidos en buffers distintos.....	89
4.4. Funcionalización de una NF de oro sin titanio.....	90
4.5. Funcionalización de una NF de oro con 1 nm de titanio.....	93
4.6. Funcionalización <i>in situ</i> a intervalos de tiempo distintos con métodos espectrofotométricos.....	95
4.7. Funcionalización de NFs con oligonucleótidos específicos a SARS-CoV-2 y detección en biosensor .....	98
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>107</b>
<b>Conclusiones y Trabajo a Futuro .....</b>	<b>107</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>110</b>

---

## TABLA DE ILUSTRACIONES

---

<i>Ilustración 1 Casos de COVID -19 notificados semanalmente por WHO region y Global deaths al 28 de febrero de 2021. Adaptado de (World Health Organization , 2021).....</i>	<i>19</i>
<i>Ilustración 2 Representación del virus de la influenza H1N1. Tomado de (Ocronos, 2020).....</i>	<i>33</i>
<i>Ilustración 3 Representación de distintos virus que afectan a seres vivos. Tomado de: (Vecteezy , 2021).....</i>	<i>34</i>
<i>Ilustración 4 Micrografía electrónica de dos coronavirus. Tomado de (Beards, 2017).....</i>	<i>35</i>
<i>Ilustración 5 Géneros del orden Nidovirales, de la familia Coronaviridae. En rojo se encuentra ubicada la enfermedad COVID 19, correspondiente al virus del SARS-CoV-2 Tomado de (Chen, Liu, &amp; Guo, 2020).....</i>	<i>36</i>
<i>Ilustración 6 Pacientes con enfermedad de SARS-CoV-2, estratificados por edad y sexo (panel superior) de una observación de 20133 pacientes. El color morado representa el número de pacientes que fallecieron a causa de la enfermedad, el color amarillo representa los pacientes que debieron seguir hospitalizados con cuidados continuos, y el color rosa los pacientes que fueron dados de alta. Tomado de (Docherty, y otros, 2020).....</i>	<i>37</i>
<i>Ilustración 7 Representación gráfica de como el SARS-CoV-2 ingresa a la célula mediante el reconocimiento del receptor ACE II. Tomado de: (Mousavizadeh &amp; Ghasemi, 2021).....</i>	<i>39</i>
<i>Ilustración 8 Representación gráfica de la conformación del ADN, a partir de la repetición de los nucleótidos y grupos fosfato. Tomada de (Brody, 2020).....</i>	<i>41</i>
<i>Ilustración 9 Representación gráfica de la unión de los nucleótidos para ADN y ARN mediante el enlace fosfodiéster. Tomado de: (Canazas, 2015).....</i>	<i>43</i>
<i>Ilustración 10 Representación de algunos tipos de oligonucleótidos. Tomado de: (Toledo, 2020)</i>	

.....	44
<i>Ilustración 11 Representación esquemática de las partes de un biosensor .....</i>	<i>49</i>
<i>Ilustración 12 Representación esquemática de la configuración experimental de un biosensor óptico SPR.....</i>	<i>52</i>
<i>Ilustración 13 Comparación entre el campo de ondas evanescentes de NFs y NPs.....</i>	<i>53</i>
<i>Ilustración 14 Diagrama de niveles de energía para una molécula.....</i>	<i>54</i>
<i>Ilustración 15 Representación esquemática de la transmitancia.....</i>	<i>55</i>
<i>Ilustración 16 Representación de estructura de DTNB y su oxidación con un tiol. Tomado de: (Jeffery, 2016).....</i>	<i>60</i>
<i>Ilustración 17 Representación esquemática del 3AMP. Tomado de: (Cymit, 2021).....</i>	<i>66</i>
<i>Ilustración 18 Configuración de la primera prueba realizada con 3AMP. Donde B, corresponde al blanco, CN, control negativo y todas las medidas que se muestran en cada pozo están en unidades de <math>\mu\text{M}</math> .....</i>	<i>70</i>
<i>Ilustración 19 En la ilustración izquierda se ve el 3AMP en los pozos de la microplaca. En la ilustración de la derecha se observa la reacción colorimétrica que se genera una vez se agrega el DTNB. Se evidencia entonces que entre mayor sea la concentración de 3AMP, la reacción con DTNB, se torna en un amarillo más intenso.....</i>	<i>71</i>
<i>Ilustración 20 Prueba de disponibilidad de oligonucleótidos, por ensayo colorimétrico.....</i>	<i>73</i>
<i>Ilustración 21 Funcionalización de una NF de oro con oligonucleótidos .....</i>	<i>75</i>
<i>Ilustración 22 primera prueba de optimización para volumen de soluciones y levantamiento de la NF por ausencia de titanio.....</i>	<i>77</i>
<i>Ilustración 23 Primera prueba de optimización después de 20 horas de incubación. Los círculos en rojo evidencian los granos de sales que quedaron después de la evaporación de las soluciones. ....</i>	<i>78</i>

*Ilustración 24 Segunda prueba de optimización para evitar la evaporación..... 79*

*Ilustración 25 Primera prueba de funcionalización de NFs con oligonucleótidos específicos a SARS-CoV-2 ..... 91*

*Ilustración 26 Apariencia de la NF de oro después de 17 horas de incubación por el método de envejecimiento con sal..... 92*

*Ilustración 27 NF de oro sin titanio después de ser lavada con PBS al finalizar el proceso de funcionalización ..... 93*

*Ilustración 28 Proceso de funcionalización a intervalos de tiempo cortos; A y B son diluciones en agua a 5 y 30 minutos respectivamente, mientras que C y D son diluciones con buffers a 5 y 30 minutos..... 96*

*Ilustración 29 Representación del arreglo experimental del biosensor SPR..... 99*

*Ilustración 30 Chip usado para disminuir errores de medición en el biosensor. .... 103*

---

## TABLA DE GRÁFICAS

---

<i>Gráfica 1 Curva de calibración a partir de ensayo colorimétrico entre 3AMP y DTNB .....</i>	<i>87</i>
<i>Gráfica 2 Desviación estándar de los datos obtenidos experimentalmente para la absorbancia en la curva de calibración. ....</i>	<i>89</i>
<i>Gráfica 3 Sensograma primera prueba de funcionalización con oligonucleótidos en biosensor. El espesor de la NF "e" es de 56 nm, tiene un depósito de 1 nm de titanio. Las etiquetas L1 y L2 corresponden a dos lavados posteriores a la funcionalización con agua libre de nucleasas ...</i>	<i>102</i>
<i>Gráfica 4 Sensograma de la segunda prueba de funcionalización en NF de oro. El espesor de la NF fue de 56 nm y se hizo un depósito de 1 nm de titanio. ....</i>	<i>104</i>
<i>Gráfica 5 Sensograma de prueba de funcionalización corrigiendo fallos de pruebas anteriores. ....</i>	<i>105</i>

---

## LISTA DE TABLAS

---

<i>Tabla 1 Antecedentes de investigaciones para funcionalización de NPs y NFs en diferentes biosensores.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabla 2 Oligonucleótidos usados para la funcionalización de las NPs de oro.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabla 3 Información sobre la refrigeración de los oligonucleótidos, de acuerdo con su estado .....</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 5 Resultados de absorbancia obtenidos para la primera prueba con AMP por triplicado, donde B corresponde al pozo que contiene el blanco y CN, corresponde al pozo que contiene el control negativo. Así mismo los números que se encuentran en las franjas de color verde representan las concentraciones en unidades de nM y los valores que se observan bajo cada concentración, representan el valor de la absorbancia obtenido en el lector de microplacas. ...</i>	<i>83</i>
<i>Tabla 6 Absorbancia obtenida para la prueba colorimétrica con 3AMP y DTNB para la elaboración de la curva de calibración, obtenidas con lector de microplacas.....</i>	<i>85</i>
<i>Tabla 7 Prueba de ensayo colorimétrico para determinar la disponibilidad de tioles en tres buffers distintos; PBS, TE y agua libre de nucleasas.....</i>	<i>90</i>
<i>Tabla 8 Resultados de la segunda prueba de funcionalización. A.s, es la absorbancia del sobrenadante, C.s es el rango de concentración del sobrenadante, %P.adh es el porcentaje de adhesión de oligonucleótidos a la NF, A L1, AL2 y A L3 corresponden a las absorbancias de tres lavados posteriores al proceso de funcionalización .....</i>	<i>94</i>
<i>Tabla 9 Resultados para funcionalización a intervalos de tiempo cortos con agua y buffer fosfato de sodio, donde Abs, significa absorbancia, Sob. Corresponde al sobrenadante y L1, L2 y L3, hace referencia a los lavados realizados posterior al proceso de funcionalización. ....</i>	<i>97</i>

## **Lista de Abreviaturas.**

**SARS-CoV-2:** Síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus 2

**NMs:** Nanomateriales

**NPs:** Nanopartículas

**NFs:** Nanopelículas

**RT-PCR:** Reacción en cadena de polimerasa de transcripción reversa

**3-AMP:** Ácido 3-Mercaptopropiónico

**SPR:** Resonancia plasmónica de superficie

**A:** Adenina

**T:** Timina

**G:** Guanina

**C:** Citosina

**U:** Uracilo

**SPR:** Resonancia de plasmón superficial

**A:** Absorbancia

**T:** Transmitancia

**C:** Concentración

**3-AMP:** Acido 3-Mercaptopropiónico

**DTNB:** ácido 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoicol)

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DTT:** Ditiotreitól

**PBS:** Tampón de fosfato salino

**TE:** Tris-EDTA



# CAPÍTULO 1

---

## Introducción

---

En este capítulo se estructura una breve introducción a la enfermedad COVID-19, los métodos de diagnóstico y las investigaciones actuales para su detección, así mismo se presentan varios antecedentes que evidencian el trabajo de funcionalización con nanopelículas y nanopartículas en biosensores y finalmente se presenta el planteamiento, justificación, objetivos e hipótesis del trabajo.

### **1.1. Antecedentes.**

En el mes de diciembre del año 2019, en Wuhan, China se produjeron una serie de síntomas respiratorios agudos atípicos, que se empezaron a transmitir de persona a persona y lograron trascender fronteras internacionales a más de 200 países en todo el mundo, por lo que fue declarado como una pandemia. Después de varios análisis y pruebas, se encontró que el responsable de la enfermedad era un nuevo coronavirus, que recibió el nombre de *síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus 2*, o por sus siglas en inglés *SARS-CoV-2* (Yuki, Fujiogi, & Koutsogiannaki, 2020).

A la fecha actual, esta enfermedad ha infectado a más de doscientos millones de personas y causado la muerte de más de cuatro millones (ilustración 1 <https://www.worldometers.info/coronavirus>). Las personas de edad avanzada o con comorbilidades subyacentes como problemas cerebrovasculares, cardiovasculares, cardiorrespiratorios, diabetes mellitus, hipertensión, obesidad, entre otros (Guan, y otros, 2020) , son más propensos a infectarse con el virus. Sin embargo, cualquier persona en cualquier rango de edad y condición de salud, puede llegar a infectarse al estar cerca de un portador del virus y desarrollar sintomatologías severas.

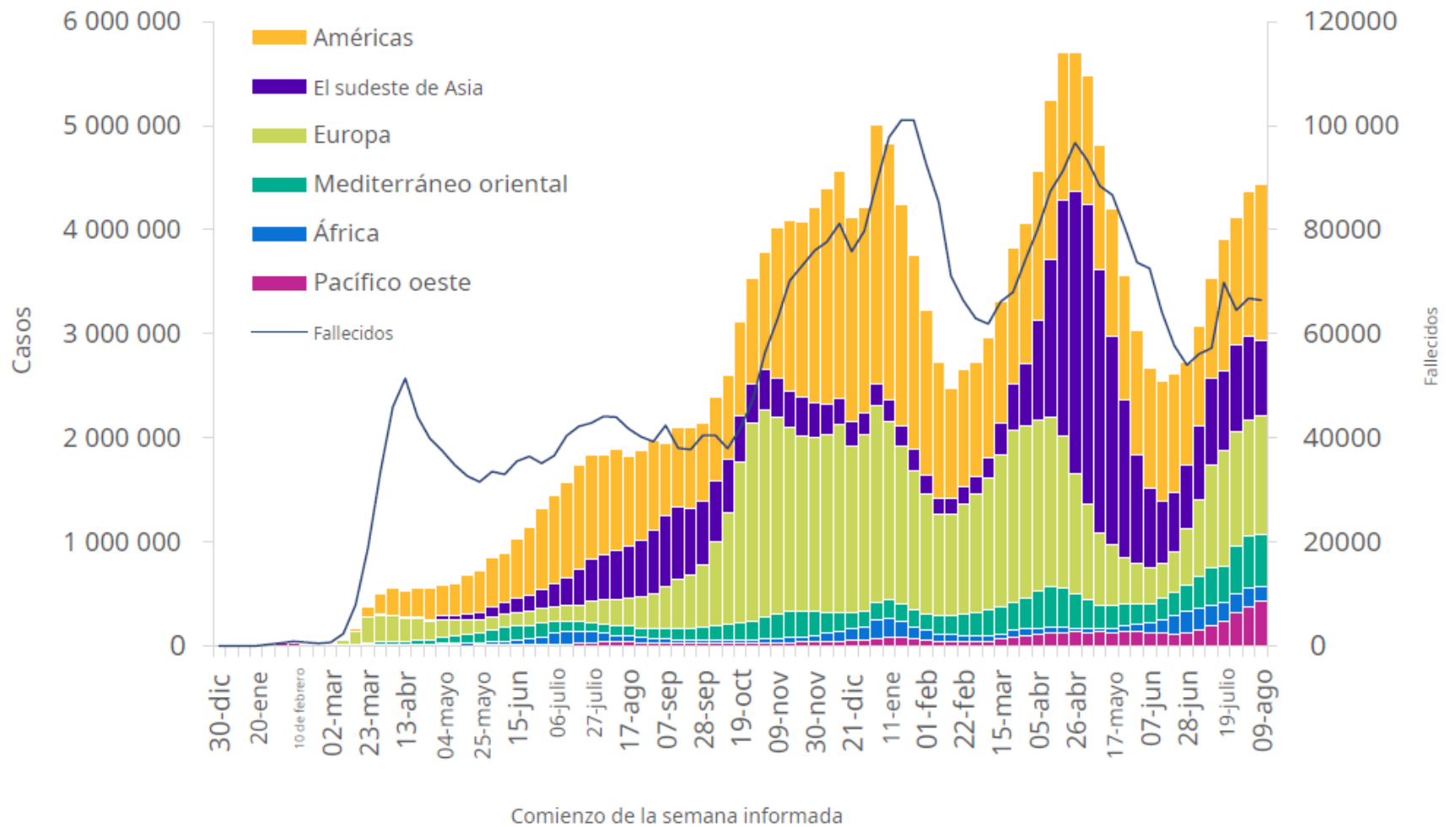


Ilustración 1 Casos de COVID -19 notificados semanalmente por WHO region y Global deaths al 10 de agosto de 2021. Adaptado de (World Health Organization , 2021)

Uno de los grandes problemas que ha surgido en el transcurso de la pandemia, es que las manifestaciones clínicas que produce el virus SARS-CoV-2 en el organismo son muy variables, siendo los síntomas más comunes; fiebre, tos seca y cansancio, sin embargo, otros pacientes pueden llegar a experimentar dolor de garganta, diarrea, dolor de cabeza, pérdida del sentido del olfato, del gusto, entre otros. Por otro lado, también se encuentran aquellos portadores del virus que son asintomáticos, es decir que no presentan ninguna sintomatología, e incluso ninguna anomalía en radiografías de tórax, por lo que solo pueden ser identificados mediante pruebas positivas de ácido nucleico viral, lo que implica que las curvas de contagio pueden seguir creciendo indiscriminadamente (Al-Qahtani, 2020).

Hasta el momento no se cuenta con un tratamiento definitivo, pues según la variabilidad de los síntomas los pacientes se deben tratar de diferentes formas; algunos por la baja complejidad de sus síntomas van a requerir reposo y medicamentos que mejoren su sintomatología, mientras que otros necesitarán de ventilación mecánica y permanencia en la unidad de cuidados intensivos (UCI). En este sentido, bajar los niveles de contagio de la pandemia no solo implica contar con tratamientos adecuados, sino también con pruebas diagnósticas eficientes, confiables y rápidas que permitan detectar a tiempo a los portadores del virus.

Actualmente el diagnóstico de SARS-CoV-2, se realiza con la prueba de reacción en cadena de polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR). Sin embargo, ante varias limitaciones de la misma, se están investigando y desarrollando dispositivos y pruebas diagnósticas alternativas a la RT-PCR, para identificar la presencia del virus en un paciente. Un ejemplo de ello son los biosensores ópticos de resonancia plasmónica en superficie (SPR), ya que son buenos candidatos para la detección de diferentes biomoléculas en diversos agentes biológicos, como por ejemplo los virus (Tiwari, Vig, Dennis, & Singh, 2011).

Los biosensores SPR detectan cambios mínimos en el índice de refracción de la superficie de detección y funcionan a partir de oscilaciones colectivas de electrones de conducción en la superficie de diversos nanomateriales (NMs) metálicos, ya sean nanopartículas (NPs), nanopelículas (NFs), nanoalambres, nanoislas, etc. La energía del fotón asociada con la resonancia está en función de algunas características de los NMs, como son su constitución, tamaño, forma y el entorno dieléctrico circundante, pero además los NMs exhiben resonancias plasmónicas en frecuencias ópticas, lo que implica que tienen un espectro característico con uno o más picos en el rango de luz visible que corresponden a resonancias de oscilación electrónica específicas (Nusz J. , Curry, Marinakos, Wax, & Chilkoti, 2009). Sin embargo, si se generan cambios en la capa superficial de los NMs, como las uniones de moléculas de analitos, o la adsorción de moléculas biológicas, esto produce una alteración en el índice de refracción en el NM, lo que resulta en un cambio del espectro SPR que se puede medir como un cambio en la intensidad máxima de la luz dispersada o como un cambio en la longitud de onda máxima del SPR (Englebienne, 1998) , por lo que estos biosensores son ideales para la detección de moléculas y diferentes analitos.

Existen diferentes tipos de biosensores; los biosensores amperométricos, que detectan los cambios en la corriente, los biosensores potenciométricos que detectan los cambios en el potencial, los biosensores piezoeléctricos que detectan los cambios en la masa, los biosensores ópticos que logran establecer una correlación entre los cambios en la concentración, en la masa, o en el número de moléculas y los cambios en las características de la luz, uno de ellos es el biosensor óptico basado en la técnica de resonancia del plasmón superficial (SPR), que tiene una gran ventaja frente a los otros biosensores, gracias a su velocidad de detección, alta especificidad, alta sensibilidad y posibilidad de análisis en tiempo real, aunque su elaboración

puede tener una menor relación costo/beneficio respecto a otros biosensores (Ramírez, 2005).

Los NMs en general se caracterizan por tener propiedades únicas; morfologías más pequeñas que un micrómetro en al menos una dimensión. La mayoría de ellos tienen buena relación superficie/volumen, algunos como las NPs presentan alta reactividad a las células vivas y en general los que están compuestos de metales como el oro son biocompatibles y tienen estabilidad química, lo cual los convierte en elementos indispensables para un biosensor (Tiwari, Vig, Dennis, & Singh, 2011).

En la investigación biomédica, los NMs más usados son las NFs y las NPs de oro, debido a que este metal en particular, es inerte y menos citotóxico que otros materiales. El uso de uno u otro depende del propósito de la investigación. Por ejemplo, en el caso de NPs, estas pueden ser usadas para entregar fármacos, para la investigación de genes, el reconocimiento de analitos, entre otros. En el caso de las NFs, estas se usan principalmente en dispositivos como los biosensores, pues son altamente estables y tienen un buen nivel de sensibilidad a la hora de generar plasmones de resonancia.

Si bien el uso de NMs es indispensable para el funcionamiento de un biosensor, todos necesitan ser funcionalizados, puesto que esto es lo único que permite que el dispositivo sea específico para cierto tipo de organismo, mediante el cambio de los índices de refracción en el NM. La funcionalización implica modificar las propiedades de un NM, mediante la adsorción de diversos átomos, iones, o moléculas de alguna sustancia que puede estar en estado sólido, líquido o gaseoso y que logran adherirse a las paredes modificando algunas propiedades físicas tales como la solubilidad, dispersión, índice de refracción, entre otros (Guel, López, & Galindo, 2012). Además de esto, la modificación de propiedades de los NMs es fundamental en investigaciones biomédicas, ya que gracias a este cambio se puede tener una mejor

interacción con las moléculas biológicas.

En este proyecto de investigación se va a trabajar con NFs específicamente, ya que como se mencionó antes, tienen buena estabilidad y sensibilidad en el biosensor, y a pesar de que tienen el mismo principio de funcionamiento que las NPs, tienen un campo de ondas evanescentes en un intervalo de 200 nm a 500 nm, por lo que su rango de detección es más amplio, lo que puede llegar a ser una desventaja frente a las NPs, que tiene un campo de ondas evanescentes de 20 a 50 nm, lo que hace que sean mucho más específicas que las NFs. Sin embargo y a pesar de esta desventaja, siguen siendo una buena herramienta de trabajo en un biosensor.

La diferencia más pronunciada entre las NFs y las NPs se evidencia en el biosensor, ya que en el caso de las NPs se formarán campos de onda evanescente más pequeños, respecto a los que se forman en las NFs, sin embargo en cuanto a la funcionalización, los procesos son relativamente similares para ambos NMs, siempre y cuando las NPs estén depositadas en un sustrato, tal como en el caso de una NF, puesto que las NPs también pueden encontrarse en presentaciones coloides, lo que implica un proceso de funcionalización diferente. Frente a esto Chen y otros investigadores, en 2008 funcionalizaron NPs de oro con oligonucleótidos para detectar patógenos en tiempo real transmitidos por alimentos, usando un biosensor piezoeléctrico. Para ello inmovilizaron una sonda tiolada específica para el gen *eaeA* de *E. coli* O157:H7 sobre la superficie del biosensor y una segunda sonda complementaria a la secuencia diana se conjugó con las NFs de oro, obteniendo una mejora en la sensibilidad de detección del ADN de los patógenos. Así mismo, en otro estudio se funcionalizaron NFs de oro con oligonucleótidos como sondas en un biosensor de tira de reactivo para el análisis de ADN, encontrando que este tipo de funcionalización ayudó a que la detección del ADN objetivo fuera

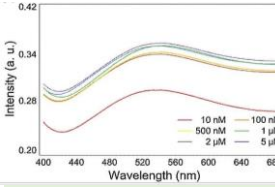
más rápida en comparación con técnicas como la detección por electroforesis en gel de agarosa, además de ser ocho veces más rápida que la técnica electroforética (Glynou, Ioannou, Christopoulos, & Syriopoulou, 2003).

En el 2020 Maha y otros investigadores funcionalizaron NPs de grafeno y oro con oligonucleótidos antisentido para la detección rápida y ultrasensible de SARS-CoV-2, usando un chip biosensor electroquímico y reportaron que la máxima eficiencia del sensor se obtuvo con la funcionalización de los oligonucleótidos, logrando que las ventajas del biosensor desarrollado sobre otras pruebas como la RT-PCR, tuvieran un límite de detección mejorado, una respuesta más rápida para lograr datos estables, además de una excelente vida útil y producción económica plausible. De igual forma en otro estudio (Parikshit, Maha, Ketan, Matthew, & Dipanjan, 2020 ), se reporta el uso de NFs de oro, funcionalizadas con oligonucleótidos antisentido modificados con tiol, y diseñados específicamente para el gen N (fosfoproteína de la nucleocápside) del SARS-CoV-2, demostrando que esta funcionalización permitió que las NFs se aglomerasen selectivamente en presencia de su secuencia de ARN diana de SARS-CoV-2 y presentaran un cambio en su resonancia de plasmón de superficie. En la tabla 1 se presentan varios antecedentes relacionados con métodos de funcionalización de NPs y NFs en biosensores.



Tabla 1 Antecedentes de investigaciones para funcionalización de NPs y NFs en diferentes biosensores

Referencia	Título	oligonucleótido o Gen utilizado	Técnica utilizada	Nanomaterial	Observaciones	Resultados
Alafeef et al (2020)	Rapid, Ultrasensitive, and Quantitative Detection of SARS-CoV-2 Using Antisense Oligonucleotides Directed Electrochemical Biosensor Chip	Oligonucleótidos Antisentido SARS-CoV-2 (gen N)	biosensor electroquímico compuesto por nanopartículas de grafeno y oro funcionalizadas junto con una configuración de lectura eléctrica para detectar selectivamente la presencia de material genético SARS-CoV-2	NPs de oro de 10 nm para óptima respuesta	El sensor distingue con éxito las muestras positivas de COVID-19 de las negativas con casi el 100% de precisión, sensibilidad y especificidad y exhibe un cambio insignificante en la señal de salida para las muestras que carecen de un segmento objetivo viral SARS-CoV-2 (p. Ej., SARS-CoV, MERS-CoV o muestras negativas de COVID-19 recolectadas de sujetos sanos)	Se obtuvo éxito en un amplio rango de detección lineal de 585,4 copias / $\mu\text{L}$ a $5,854 \times 10^7$ copias / $\mu\text{L}$ .

Langmuir et al 2002	Functionalized Surfaces of Mixed Alkanethiols on Gold as a Platform for Oligonucleotide Microarrays	oligonucleótidos 24-mer y ADN 89-mer	Usan NFs de oro para la funcionalización con monocapas autoensambladas de alcanetioles. Primero inmovilizan la streptavidina, que luego usan para inmovilizar oligonucleótidos, microarreglos de ADN, proteínas etc.  para detección usan un sistema de microarrays de ADN basado en fluorescencia.	NFs de oro	Las SAM mixtas preparadas a partir de soluciones de carga que contienen 75-95% del alcanotiol biotinilado dieron como resultado altos niveles de inmovilización de streptavidina funcional.	Tiene mayor selectividad la detección por microarreglos de ADN que por unión de oligos complementarios
Lee et al (2019)	Label-free localized surface plasmon resonance biosensor composed of multi-functional DNA 3-way junction on hollow Au spike-like nanoparticles (HAuSN) for avian influenza virus detection	Oligonucleótidos de ADN 3WJ (3 vías de unión)  *Influenza A H5N1 * Influenza A H1N1 *proteína de pico (S)	biosensor LSPR compuesto de ADN 3 W J (3 vías de ADN multifuncional) en un electrodo ITO modificado con HAuSN	nanopartícula hueca en forma de espiga	 <p>Para efectos prácticos, una óptima intensidad en el biosensor se obtendría con 1 uM</p>	El biosensor puede detectar la proteína HA en un tiempo aproximado de 10 minutos logrando alta sensibilidad y alta especificidad.

Lee et al (2006)	Mixed DNA/oligo (ethylene glycol) functionalized gold surfaces improve DNA hybridization in complex media	ssDNA	Usan monocapas mixtas de ADN monocatenario tiolado (ssDNA) autoensambladas que contienen un diluyente de superficie oligo (etilenglicol) (OEG) tiolado corto en NFs de oro para mejorar la captura específica de dianas de ADN de medios complejos y lo comparan con monocapas puras, es decir sin OEG	NFs de oro	las estructuras de anillo de base de nucleótidos de ssDNA tioladas adsorbidas en las monocapas de ssDNA mixtas están orientadas más paralelas a la superficie del oro en comparación con las bases de ADN en las monocapas de ssDNA puras	Los resultados de la SPR demuestran que la incorporación de OEG en la capa de ssDNA mejora la resistencia de la superficie tanto al ADN no específico como a la adsorción de proteínas facilitando la detección de pequeñas secuencias diana de ADN
Steinmetz et al 2019	A sensitive label-free impedimetric DNA biosensor based on silsesquioxane-functionalized gold nanoparticles for Zika Virus detection.	sonda de ssDNA de ZIKV	biosensor de ADN para detectar ZIKV en muestras de suero humano real utilizando un electrodo de carbono vítreo oxidado (ox-GCE)	nanopartículas de oro funcionalizadas con silsesquioxano	El dispositivo reportado mostró una estabilidad adecuada y una sensibilidad y selectividad satisfactorias para cuantificar el ZIKV en muestras de suero humano	El biosensor propuesto presentó un LOD de 0.82 pmol L <sup>-1</sup> , con un rango lineal de 1.0 x10 <sup>-12</sup> - 1.0 x10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup> .

Valdez et al 2016	Facile and rapid detection of respiratory syncytial virus using metallic nanoparticles	anticuerpo policlonal anti-RSV	usaron el desplazamiento de LSPR como método de detección de RSV mediante el uso de un anticuerpo policlonal anti-RSV conjugado con nanopartículas metálicas (Cu, Ag y Au).	para nanopartículas de cobre fue de $254 \pm 11,11$ nm. Para nanopartículas de plata y oro un pico de intensidad en 10-20 nm y otro en $151 \pm 0,57$ y $185 \pm 4,37$ nm	El proceso de funcionalización se optimizó en 5 $\mu$ L (20 $\mu$ g) de anticuerpo para nanopartículas de cobre y oro y 10 $\mu$ L (40 $\mu$ g) para nanopartículas de plata	Las nanopartículas de cobre y plata funcionalizadas pudieron detectar específicamente el RSV adenovirus, sin embargo, las nanopartículas de oro mostraron cambios inespecíficos
-------------------	--	--------------------------------	---	---	--	---

## **1.2. Planteamiento del problema.**

Las NFs metálicas poseen propiedades ópticas únicas que han llevado al desarrollo de una nueva clase de sensores biomoleculares sin etiquetas. Estos biosensores pueden estar orientados al fenómeno SPR, que confiere propiedades únicas de dispersión y absorción de luz a dichas NFs plasmónicas (Nusz G. , Curry, Marinakos, Wax, & Chilkoti, 2009). Sin embargo, la especificidad del biosensor no solo depende del uso de un NM, sino que se necesita de la funcionalización de estas para lograr detectar el organismo en estudio. Este proceso requiere la evaluación y optimización de un protocolo que se ajuste a las necesidades del biosensor, es por esta razón que se hace necesario investigar sobre la funcionalización de NFs metálicas con oligonucleótidos específicos al virus SARS-CoV-2 para la eficacia y buena sensibilidad de un biosensor óptico SPR.

## **1.3. Justificación.**

La pandemia por la enfermedad del COVID-19, sigue siendo un gran motivo de preocupación a nivel mundial, puesto que las tasas de contagio en más de 200 países aún siguen siendo elevadas, además de que no se ha evaluado en definitiva la proporción de personas infectadas por el SARS-CoV-2, que han permanecido asintomáticas durante el curso de la infección (Velavan & Meyer, 2020).

Para realizar la detección del virus SARS-CoV-2, se ha venido usando la prueba de la RT-PCR, sin embargo, estas pruebas son costosas, requieren de muchas horas para la obtención de resultados y pueden llegar a arrojar resultados erróneos, debido a que

se requiere que los pacientes se encuentren en una fase aguda de la enfermedad, para tener una concentración suficiente del material genético del virus para que pueda ser detectado (Xiao, Tong, & Zhang, 2020)

En consecuencia, la necesidad de métodos de diagnóstico viral rápidos y rentables ha llevado a centrarse en el desarrollo de plataformas de biosensores en tiempo real. Particularmente las aplicaciones en biosensores plasmónicos han ganado una atención significativa, debido a su versatilidad, monitoreo sin etiquetas y bajo tiempo de respuesta (Mauriz, 2020), sin embargo el uso de estos dispositivos requiere de otros elementos indispensables como las NFs, que obligatoriamente deben ser funcionalizadas para que los dispositivos tengan resultados altamente confiables, específicos y estén bien dirigidos en los objetivos diana a analizar.

Es por lo anterior que este proyecto de investigación se sustenta en dos aspectos principales; la investigación de funcionalización de NFs de oro con oligonucleótidos específicos a SARS-CoV-2 para la especificidad de un biosensor óptico de resonancia plasmónica, y por otro lado la aprobación de un proyecto CONACYT para el INAOE, en el que se pretende la creación de un biosensor óptico plasmónico para la detección de la enfermedad.

#### **1.4. Objetivo general.**

Evaluar el proceso de funcionalización de NFs de oro con oligonucleótidos específicos a las secuencias de ARN específicas del SARS-CoV-2, para uso en un biosensor óptico SPR.

### **1.5. Objetivos específicos.**

- Determinar la mayor disponibilidad de los tioles de los oligonucleótidos, a partir del ensayo colorimétrico DTNB usando tres buffers diferentes.
- Optimizar el proceso de funcionalización de las NFs de oro en relación con la concentración y el volumen de oligonucleótidos específicos a SARS-CoV-2.
- Evaluar el proceso de funcionalización de las NFs de oro con oligonucleótidos específicos a SARS-CoV-2 a diferentes intervalos de tiempo.
- Evaluar el proceso de funcionalización *in situ* en un biosensor óptico SPR.

### **1.6. Hipótesis.**

La evaluación y optimización del proceso de funcionalización de NFs de oro con oligonucleótidos específicos para SARS-CoV-2, permitirá determinar los factores más relevantes para este proceso.

# **CAPÍTULO 2**

---

## **Marco Teórico**

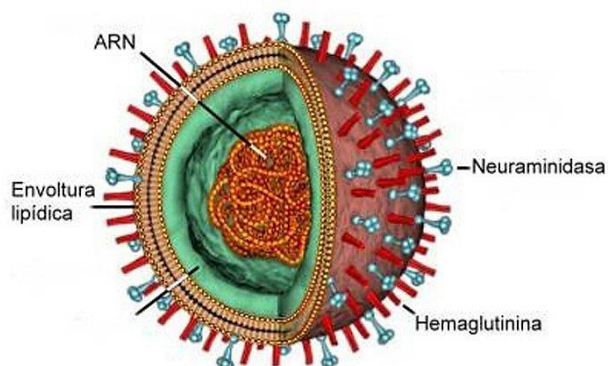
---



En este capítulo se abordan los aspectos más generales del virus SARS-CoV-2, tales como su clasificación de la especie y familia dentro los virus, así como también mecanismo de acción a nivel celular. Por otra parte, se hace una introducción a los ácidos nucleicos y se explica el concepto de oligonucleótido. De igual forma se abordan conceptos clave sobre los nanomateriales, el grupo tiol y algunas generalidades de los biosensores y finalmente se comentan algunos elementos de espectrofotometría.

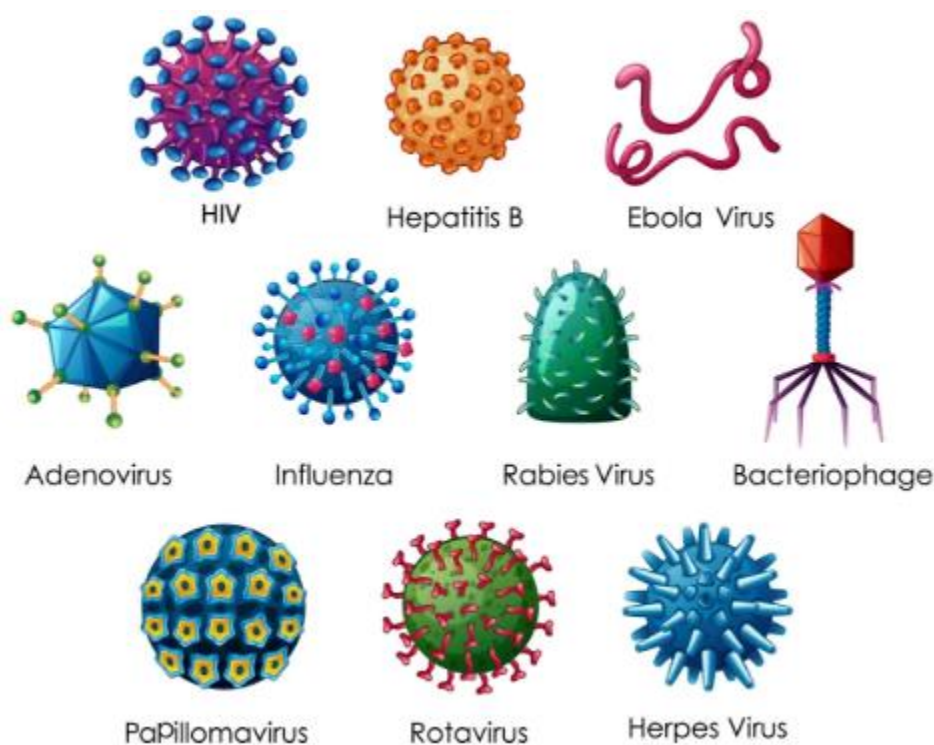
## 2.1. Virus: SARS-CoV-2.

La palabra virus se acuñó a finales del siglo XIV y significa veneno o toxina, estos agentes de tamaños inferiores a los 100 nm, se caracterizan por tener una estructura organizada compuesta por proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y azúcares. Así mismo se puede encontrar en el centro del virus su material genético, compuesto por ácidos nucleicos que suelen estar rodeados por una cubierta de proteína, llamada cápside, y en la parte más externa se encuentra la envoltura del virus compuesta por lípidos y proteínas, tal como se observa en la ilustración 2.



*Ilustración 2 Representación del virus de la influenza H1N1.  
Tomado de (Ocronos, 2020)*

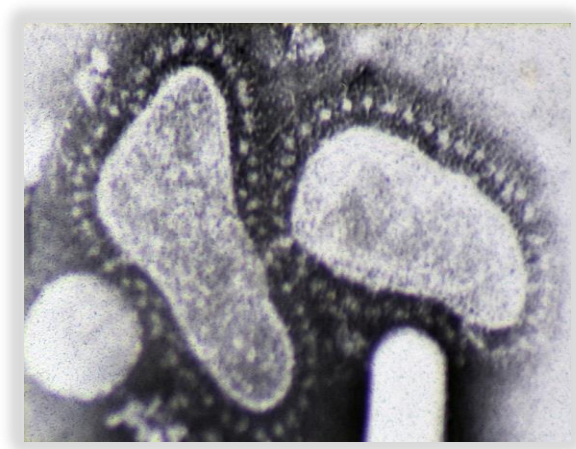
A pesar de tener una estructura biológica, los virus no son autónomos, por lo cual necesitan de toda la maquinaria que posee una célula para poder subsistir y reproducirse. Existen distintas clases de virus que se pueden asociar a diversas enfermedades en los seres vivos, como el SIDA, la hepatitis, la influenza, los herpes virus, entre otros (ilustración 3).



*Ilustración 3 Representación de distintos virus que afectan a seres vivos. Tomado de: (Vecteezy, 2021)*

El SARS-CoV-2 (coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave), llamado inicialmente COVID-19, es un coronavirus altamente contagioso que surgió en Wuhan, China a finales de 2019 y es el causante de la actual pandemia en el año 2021. A pesar de que SARS-Cov-2 se cree es una cepa de reciente aparición de coronavirus en los humanos, todas las cepas existentes de este virus se pueden ubicar taxonómicamente en la familia Coronaviridae, en la

subfamilia Coronavirinae. Su nombre se debe a una corona de peplómeros (puntas) que se ve alrededor de la superficie del virus, que es una envoltura proteínica que determina el tropismo (reacción a estímulos exteriores) de acuerdo al huésped (ilustración 4). Dichos virus se caracterizan por su genoma, una cadena monocatenaria de ARN con polaridad positiva, que estructuralmente tiene similitud con el ARN mensajero del hospedador (Consejo general de colegios farmacéuticos, 2020).



*Ilustración 4* Micrografía electrónica de dos coronavirus. Tomado de (Beards, 2017)

Existen cuatro subfamilias de coronavirus conocidos; alfa, beta, gamma y delta (ilustración 5), mientras que los primeros dos se originan en mamíferos, particularmente en murciélagos, los gamma y delta se originaron en cerdos y aves, pero la mayoría de ellos fueron capaces de mutar y contagiar a los seres humanos (Velavan & Meyer, 2020). El tamaño genómico de los coronavirus, puede variar entre 26 Kb y 32 Kb y de acuerdo al subtipo pueden causar infecciones leves como los alfa-coronavirus, o enfermedades graves y muertes como los beta-coronavirus.

El SARS-CoV-2, pertenece a la familia de los beta-coronavirus y está estructurado mediante cuatro genes principales que conforman la nucleocápside, la proteína de membrana

pequeña, la glicoproteína de membrana y otra glicoproteína adicional a esta (Thirumalaisamy & Meyer, 2020).

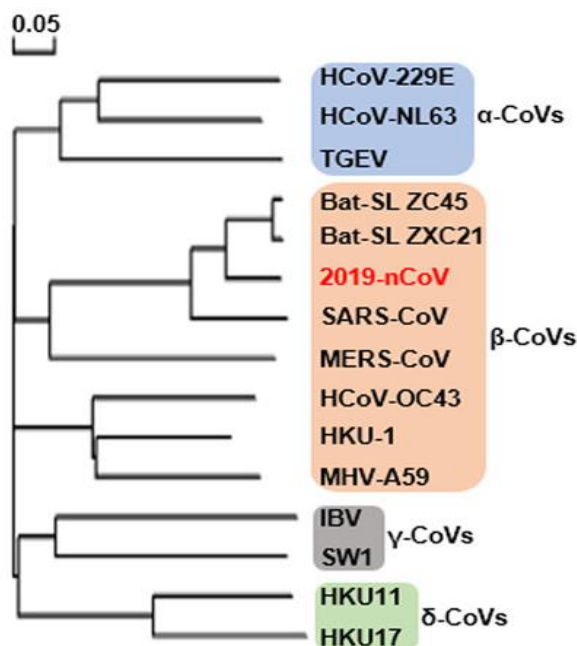


Ilustración 5 Géneros del orden Nidovirales, de la familia Coronaviridae. En rojo se encuentra ubicada la enfermedad COVID 19, correspondiente al virus del SARS-CoV-2 Tomado de (Chen, Liu, & Guo, 2020)

Por otro lado, se ha encontrado un 96% de similitud con los coronavirus provenientes de los murciélagos, un 91% con los pangolines, y en un menor porcentaje (80%) con el SARS-CoV-1. De igual forma se ha reportado que el tiempo que se demora el SARS-CoV-2 en ingresar a la célula es de 10 minutos y hasta que genera replications de nuevos virus aproximadamente 10 horas (Lavandero, 2020). A pesar de la desastrosa situación que ha generado el SARS-CoV-2 en el planeta, el grado de mortalidad que presenta es bajo, aunque su nivel de contagio se encuentra en un rango intermedio.

La prevalencia de contagio de este virus se encuentra en un mayor porcentaje en la población de los adultos mayores, en un rango de edades de 60 a 89 años (Docherty, y otros, 2020), en el que no solo se observan el mayor número de contagios, sino también el mayor

número de muertes (ilustración 6). Sin embargo, todas las personas independientemente de su edad y género pueden infectarse con el virus y retransmitirlo, así mismo las complicaciones clínicas que se puedan presentar dependerán de las comorbilidades que presente un paciente, teniendo mayor riesgo de muerte aquellos pacientes con mayores comorbilidades.

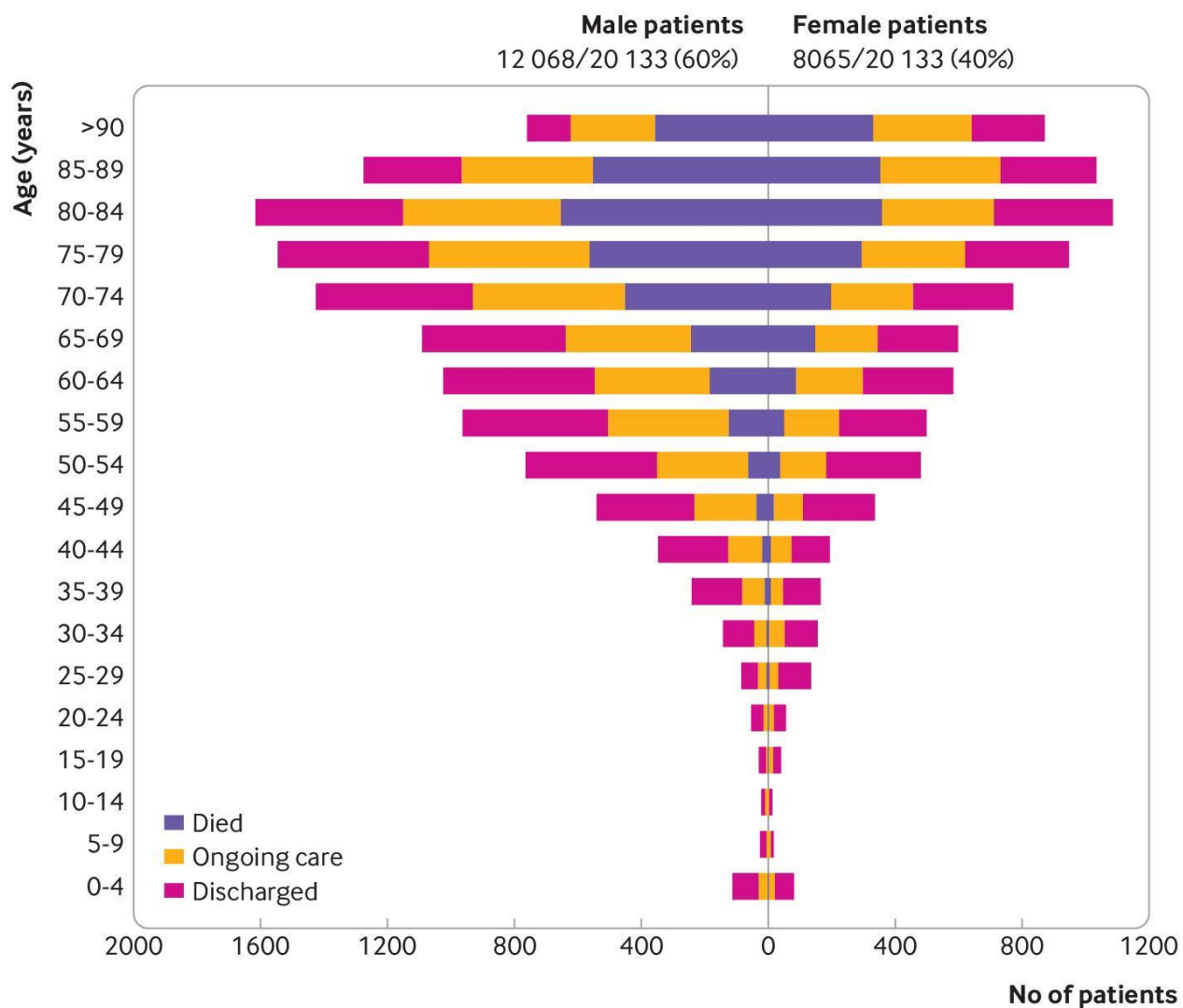


Ilustración 6 Pacientes con enfermedad de SARS-CoV-2, estratificados por edad y sexo (panel superior) de una observación de 20133 pacientes. El color morado representa el número de pacientes que fallecieron a causa de la enfermedad, el color amarillo representa los pacientes que debieron seguir hospitalizados con cuidados continuos, y el color rosa los pacientes que fueron dados de alta. Tomado de (Docherty, y otros, 2020)

El contagio de SARS-CoV-2, se produce cuando el virus ingresa a la célula hospedera a través de su proteína estructural principal spike (proteína S), que se encuentra ubicada en la corona de puntas que caracteriza este virus (ilustración 7). Esta proteína contiene dos subunidades; S1 y S2, en la primera se localiza el dominio receptor obligatorio (RBD), que es el que reconoce y se une específicamente a la enzima de angiotensina II (ACE II, cumple con funciones reguladoras en el sistema cardiovascular, permitiendo mantener la homeostasis del mismo, a partir de la generación de los péptidos angiotensina 1-7 y angiotensina 1-9), que se encuentra presente en mucosas nasales, en pulmones, en neumocitos tipo II, en intestinos, y funciona como un receptor para el ingreso del virus a la célula.

Una vez que la proteína S se une con el receptor ACE II, se procesa esta proteína por una serina proteasa de transmembrana tipo 2 (TMPRSS 2), la cual produce una escisión en dos posiciones diferentes de la subunidad SE, lo que permite la activación de la proteína S, y por tanto la fusión de la membrana del virus y la de la célula (Soto, 2020 ), posteriormente el virus ingresa a la célula y libera su material genético en el citoplasma de la célula hospedera, secuestrando la maquinaria celular y usándola para la fabricación de nuevos virus a través de la información genética de su cadena de ARN.

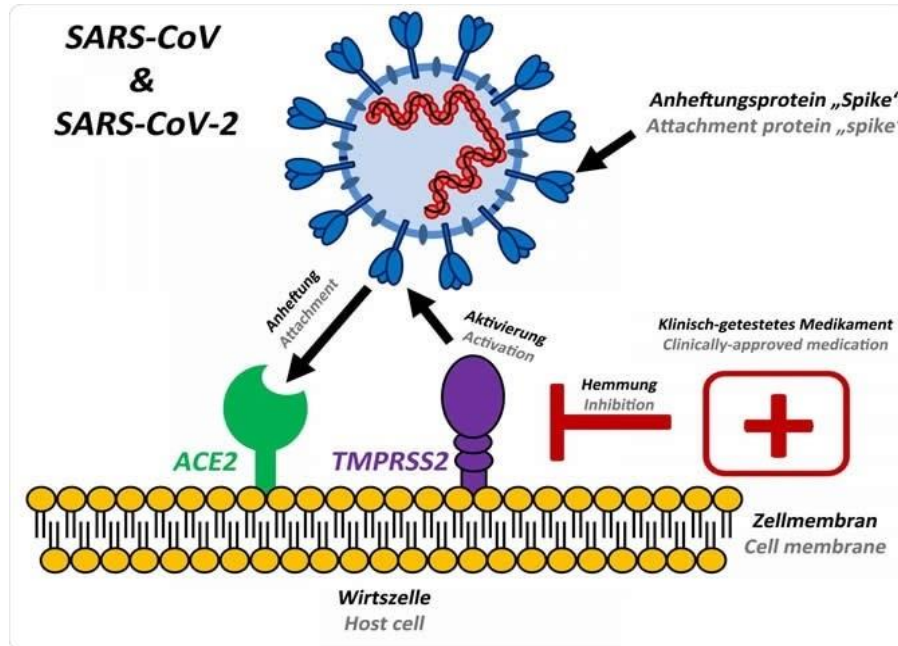


Ilustración 7 Representación gráfica de como el SARS-CoV-2 ingresa a la célula mediante el reconocimiento del receptor ACE II. Tomado de: (Mousavizadeh & Ghasemi, 2021)

## 2.2. Ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos son polímeros formados de unidades repetitivas conocidas como nucleótidos (ilustración 8), que son moléculas formadas por tres componentes: una pentosa, es decir un azúcar con 5 carbonos, uno o más grupos fosfato y un compuesto nitrogenado, al que se conoce como base (Horton & otros, 2008 ). La pentosa de los ácidos nucleicos puede ser D-ribosa, que está contenida en las cadenas de ácido ribonucleico (ARN), o puede ser 2-desoxi-D-ribosa que está contenido en los nucleótidos del ácido desoxirribonucleico (ADN). Así mismo, en los nucleótidos se pueden distinguir dos grandes grupos; las purinas que contienen las bases nitrogenadas adenina (A) y guanina (G), y las pirimidinas que contienen a las bases uracilo (U), que solo está presente en el ARN, citosina (C) y timina (T) que solo está presente en ADN.

Los nucleótidos se unen entre sí para formar largas cadenas de polinucleótidos a través de

enlaces fosfodiéster entre los carbonos de las posiciones 3' de un nucleótido con la 5' del otro, y la unión de las bases nitrogenadas tiene como función principal el almacenamiento y transmisión de información genética.



## Acido Desoxirribonucleico (ADN)

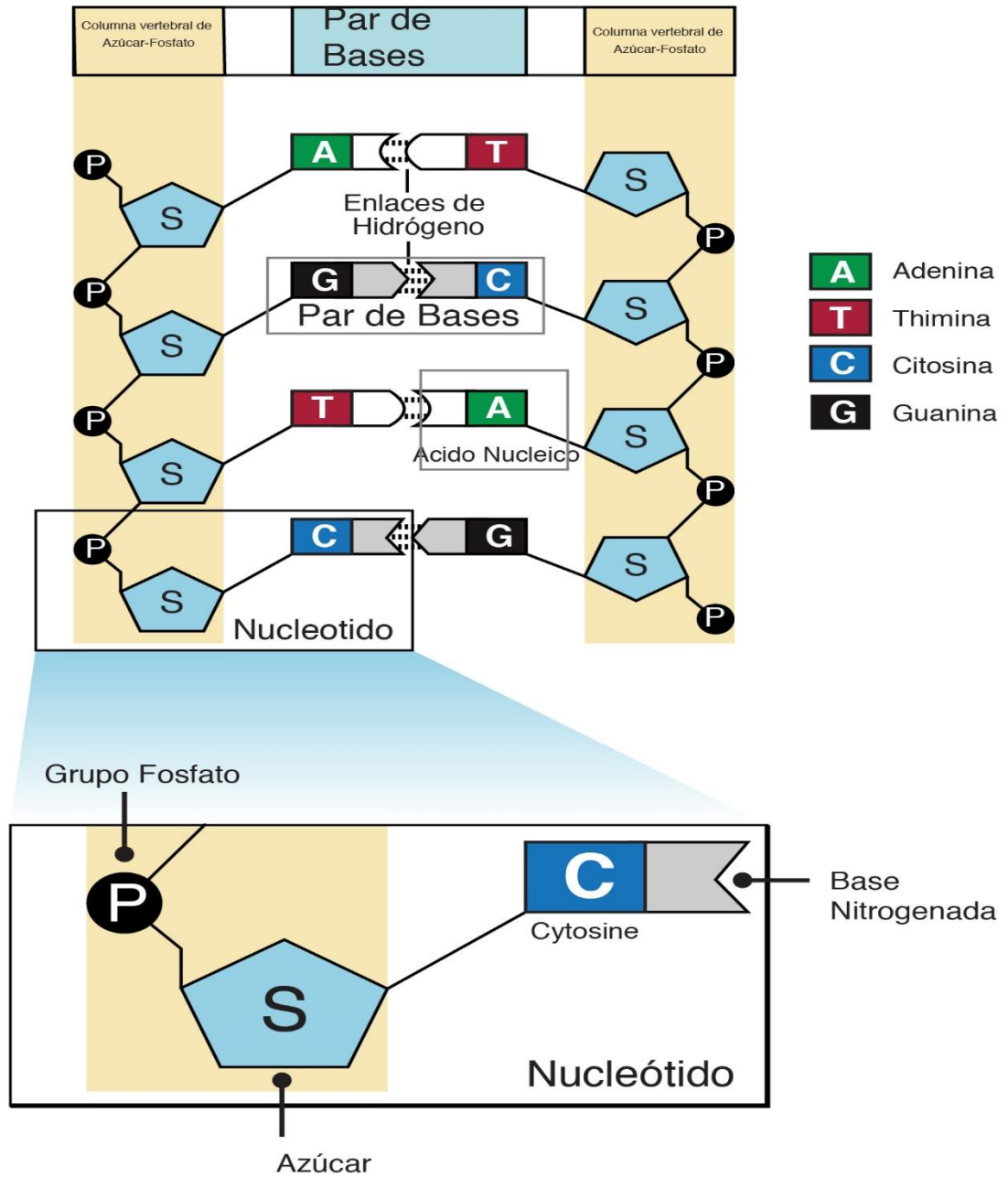


Ilustración 8 Representación gráfica de la conformación del ADN, a partir de la repetición de los nucleótidos y grupos fosfato. Tomada de (Brody, 2020)

### 2.2.1. Estructura y función del ADN y del ARN.

El ADN tiene dos funciones principales; almacenar la información genética, es decir, que guardan las instrucciones que determinaran el fenotipo y el genotipo de un

determinado organismo, pero además a través del ADN se transmite esa información a los organismos descendientes a través de la reproducción sexual o asexual (ChileBio, 2018). Por otro lado, en el ARN suelen existir diversos tipos de acuerdo a la función que realice; el ARN mensajero, lleva información de una secuencia de aminoácidos para una determinada proteína desde el ADN, hasta los ribosomas, donde se sintetizan diferentes tipos de proteínas. El ARN de transferencia, tal y como lo indica su nombre, puede transferir aminoácidos específicos a un polipéptido, lo que permite realizar síntesis de proteínas, y finalmente el ARN ribosomal forma parte de los ribosomas y también cumple una función indispensable en la síntesis proteica. Además de cumplir diversas funciones en las células, el ARN, también suele ser el único material genético de ciertos virus.

En cuanto a su estructura, el ADN es bicatenario, es decir, está compuesto por dos cadenas lineales de nucleótidos antiparalelas unidos por enlaces fosfodiéster entre el grupo fosfato de un nucleótido y el grupo hidroxilo del carbono 3' de la pentosa del nucleótido siguiente (ilustración 9). Mientras que el ARN es una molécula monocatenaria, que se encuentra en proporción 10:1, respecto al ADN, y que, a diferencia de este, tiene un grupo hidroxilo en el carbono 2', que es lo que caracteriza a las ribosas

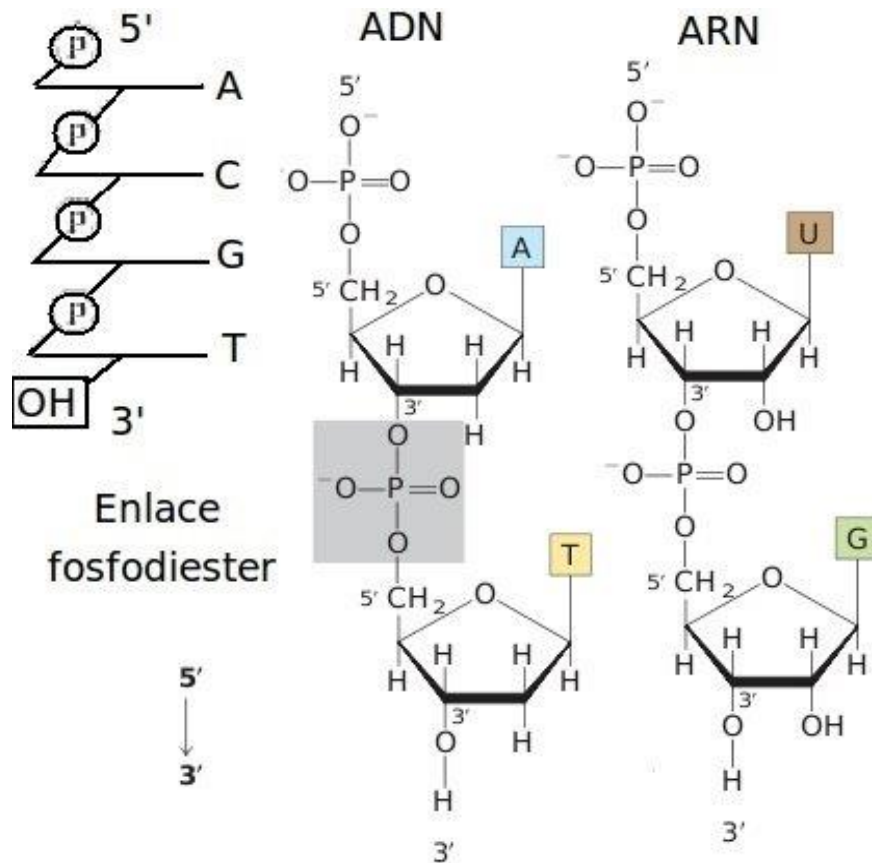


Ilustración 9 Representación gráfica de la unión de los nucleótidos para ADN y ARN mediante el enlace fosfodiéster. Tomado de: (Canazas, 2015)

La evidencia experimental hasta el momento, muestra que la conformación y unión de los nucleótidos para formar la cadena lineal, es una estructura inamovible para cualquier hebra de ADN o ARN, sin embargo lo que va a determinar la variación en las cadenas de ADN y la forma en cómo se guarda la información genética en esa estructura, es la unión de las diferentes combinaciones de las bases nitrogenadas a través de puentes de hidrogeno, que se complementan entre purinas y pirimidinas de acuerdo a como se enuncia la ley de Chargaff para el ADN; existe un número similar de moléculas de Adenina y Timina, así como de Guanina con Citosina, lo que significa que las bases A-T y C-G son complementarias (ilustración 9). Algo similar ocurre para el ARN, en donde las bases complementarias se dan entre la A y el U, y

la C y la G (Chargaff, Zamenhof, & Green, 1950).

### 2.2.2. Oligonucleótidos.

La palabra “*oligo*” significa poco o corto, por tanto, los oligonucleótidos son cadenas cortas (50 pares de bases o menos) de ADN o ARN sintéticas, usadas en investigaciones de biología molecular como puntos de partida para pruebas genéticas, investigación forense, secuenciación, cebadores en reacciones de amplificación, sondas de hibridación, entre otros (TermoFisher scientific , 2019). Estas cadenas se fabrican mediante el proceso de síntesis química en fase sólida, en el que las cuatro bases (A, C, T, G) se agregan uno por uno, para formar secuencias específicas de nucleótidos en crecimiento, en la dirección 3’ a 5’.

Hay diferentes tipos de oligonucleótidos que incluyen moléculas de ARN natural como miRNA (micro ARN), siRNA (ARN pequeño de interferencia) o Primers, también conocidos como cebadores (ilustración 10). Además también existen moléculas de oligonucleótidos sintéticos como los oligonucleótidos antisentido (ASO) o bases no naturales compuestas por secuencias como ácidos nucleicos de enlace (LNA).

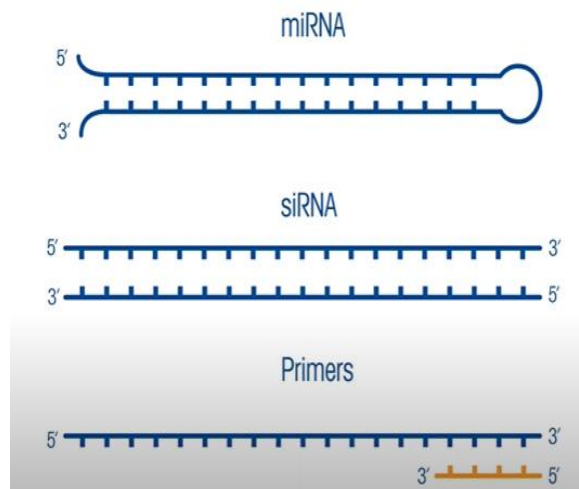


Ilustración 10 Representación de algunos tipos de oligonucleótidos. Tomado de: (Toledo, 2020)

Una vez realizada la síntesis del oligonucleótido, se desala para eliminar las sales utilizadas durante el proceso. En algunos casos durante la síntesis del oligonucleótido se pueden formar cadenas más cortas o secuencias de falla, por lo que cada vez que se agrega una base al oligonucleótido, puede no adherirse y puede ayudar a formar una cadena lateral más pequeña, la cual puede llegar a competir con la secuencia completa en algunas aplicaciones en el laboratorio y pueden afectar significativamente los resultados. Es por esto que, si la aplicación de los oligonucleótidos en una investigación requiere solo la secuencia de longitud completa, se deben usar métodos de purificación que crean un oligonucleótido más puro al eliminar estas secuencias de falla, estos pueden ser HPLC, Cartridge o PAGE.

### **2.3. Nanomateriales.**

En general, muchas de las propiedades de un material dependen de la organización de los átomos o del comportamiento de los electrones en el mismo. Cuando se hace una reducción a escala nanométrica en al menos una de las dimensiones del material, el movimiento de los electrones queda muy limitado debido a esa reducción dimensional, esto provoca un cambio en las propiedades, tal que se pueden llegar a diseñar diversos tipos de materiales con características muy específicas (Tantra, 2016). Estos materiales a escala nanométrica están constituidos por unidades estructurales, que tienen al menos una dimensión que oscila en un tamaño de 1 a 100 nm, por lo que son considerados como nanomateriales (NMs).

Existen varios tipos de NMS; los que están basados en carbono, como los fullerenos o los nanotubos, los cuales tienen varias aplicaciones principalmente en el campo de la electrónica.

Por otro lado, se encuentran los dendrímeros, que son polímeros contruidos a partir de unidades ramificadas y que, al tener cavidades interiores, son ideales para la administración de fármacos. Así mismo, se encuentran los que están basados en metales, como los puntos cuánticos, las NPs y NFs de oro, plata, óxidos metálicos, etc. En este tipo de NMs debido al confinamiento de los electrones, en un número finito de estados energéticos cuánticos disponibles, se encuentran propiedades ópticas y electrónicas excepcionales para el uso en investigación biomédica; como biomarcadores en técnicas de imagen de alta sensibilidad para la identificación de tumores cancerígenos, para diagnóstico a nivel molecular e incluso en biosensores para generar plasmones de resonancia superficial. Y finalmente se encuentran otro tipo de NMs, como lo son los compuestos, que combinan NPs, con otro tipo de materiales de mayor tamaño y que tienen gran utilidad en la zona industrial.

### **2.3.1. Nanopelículas.**

Las NFs suelen ser super estructuras continuas de algún NM que por lo general suelen tener las mismas características del NM que están conformados, aunque en rangos distintos, pudiendo ser más o menos efectivas en algunas pruebas respecto al NM que las conforma (Scanlon, Smirnov, Stockman, & Peljo, 2018).

En el caso de las NFs de oro, estas son super estructuras de NPs de oro, que poseen propiedades ópticas, conductoras y catalíticas. Estas NPs, se pueden ensamblar en soportes sólidos como los sustratos para la conformación de las NFs, y sus propiedades van a depender de la separación de las NPs y del grosor del depósito en el sustrato.

De otra parte, es importante resaltar que existen algunas condiciones ambientales que pueden afectar el funcionamiento de una NF, como puede ser el agua, la

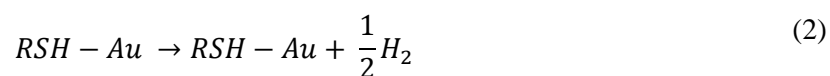
temperatura, los cambios de pH. Principalmente las NFs de metales como el oro se ven afectadas por los cambios de temperatura, puesto que el índice de refracción y el espesor varían como función de la temperatura, en tanto que los índices de refracción disminuyen cuando la temperatura incrementa (Espinoza, 2013). Otro factor importante que puede afectar el funcionamiento de una NF metálica es la corrosión, que se suele dar por contacto con sustancias químicas agresivas o incluso agentes ambientales que pueden producir algún tipo de oxidación y por tanto un cambio en las propiedades del metal del NM.

#### **2.4. Grupo Tiol.**

Los tioles, también llamados mercaptanos o sulfhidrilos, se caracterizan porque tienen un grupo funcional formado por un átomo de azufre y uno de hidrógeno (-SH), que debido a su configuración electrónica tiene diversas propiedades químicas que pueden ser de mucha utilidad en ciertos arreglos experimentales; la nucleofilia (son aniones o moléculas que tienen pares de electrones no compartidos y pueden cederlos a átomos deficientes de electrones) es una propiedad de este grupo funcional, que se presenta gracias a los electrones libres del azufre y que es esencial para la reactividad de los tioles, pues generalmente estas reacciones involucran un ataque nucleofílico sobre un electrófilo (son iones positivos, es decir moléculas con átomos que no tienen octeto y por lo tanto son muy afines a aniones o moléculas abundantes en electrones) (Turell, y otros, 2017). Entre otras propiedades de los tioles también se encuentra la acidez, que tiene un  $pK_a$  (constante de disociación ácida) 5 o 6 unidades más bajo que el alcohol (es decir, son más ácidos que los alcoholes) debido a que el azufre tiene mayor tamaño y menor electronegatividad.

Por otra parte, los tioles también se caracterizan por tener una gran estabilidad al unirse a

los metales, particularmente al oro, esto es debido a la alta energía del enlace que se forma entre el azufre del grupo tiol y el metal. El proceso de unión entre el grupo funcional y el oro se da porque las moléculas del tiol se adsorben sobre la superficie del metal y debido a las interacciones intermoleculares se terminan formando estructuras muy organizadas sobre la superficie de oro (Corthey, 2012). Esta reacción química puede describirse como sigue:



En la primera fase, las moléculas de los tioles sufren una **fisisorción** (adhesión de un elemento a una superficie con una fuerza relativamente débil como la de Vander Waals) sobre la superficie de oro, posteriormente pierden el átomo de hidrógeno y se genera un radical tiil (RS) para formar una unión tiolato (S-Au), considerado un enlace covalente.

## 2.5. Biosensores.

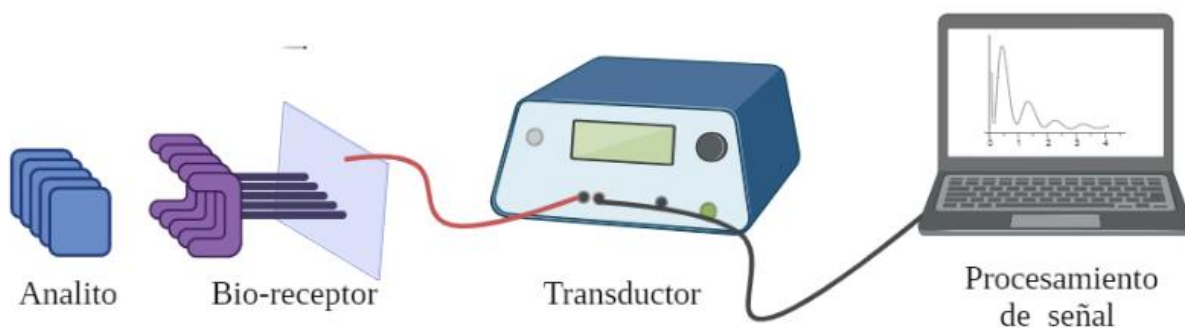
Los biosensores son dispositivos que usan reacciones bioquímicas específicas, y que están mediadas por organismos, tejidos, orgánulos, células, anticuerpos, enzimas, entre otros para detectar algún tipo de interacción biomolecular a través de señales eléctricas, ópticas o térmicas, proporcionando información analítica y cuantitativa con alta precisión en un intervalo de tiempo corto, con volúmenes bajos del analito, así como pretratamientos mínimos de la misma (López, 2018).

Lo anterior implica que los biosensores convierten un evento que puede ser de tipo físico o biológico, en una señal medible a través de un transductor. Estos dispositivos constan de tres partes principales (ilustración 11); un elemento de reconocimiento biológico, que permite



especificidad para la detección del analito, un transductor, que permite transformar una interacción biomolecular en una señal medible, y un procesamiento de la señal que permite ver, analizar e interpretar los resultados (Dahlin, Tegenfeldt, & Hook, Improving the instrumental resolution of sensors based on localized surface plasmon resonance , 2006).

Dependiendo del tipo de transductor utilizado para la detección de la señal, los biosensores se pueden clasificar en electroquímicos, mecánicos y ópticos; los primeros se basan en la medición de cambios electroquímicos que provocan las interacciones biomoleculares y se miden a través de las corrientes que generan los elementos biológicos que recubren los electrodos.



*Ilustración 11 Representación esquemática de las partes de un biosensor*

Por otro lado, se encuentran los biosensores mecánicos, que básicamente miden cambios de masa en la superficie del transductor, como por ejemplo la micro balanza de cristal de cuarzo, que trabaja basándose en la disminución de la frecuencia de resonancia del cristal después de la unión de los analitos con los bioreceptores, ya que, al unirse la biomolécula objetivo, se genera un cambio en la frecuencia de resonancia (López, 2018). Finalmente se tienen los biosensores ópticos, que, por ser de gran interés para este trabajo, se describirán con más detalle en la siguiente subsección de este apartado.

### 2.5.1. Biosensores ópticos.

Los biosensores ópticos, son dispositivos que detectan interacciones biológicas de “*binding*” (unión) a través de la medición de variaciones de algunas propiedades ópticas de la luz, como absorción, reflectancia, interferencia, índice de refracción, intensidad o incluso polarización (Peltomaa, Martínez, Peña, & Moreno-Bondi, 2018). El funcionamiento de estos biosensores se basan en el mecanismo de ondas evanescentes, que se producen cuando las ondas propagadas en un determinado medio se someten a una reflexión interna total, donde el límite se produce cuando la onda incide en un ángulo superior al ángulo crítico, allí se produce un confinamiento de la onda electromagnética en interfaces que tienen distinto índice de refracción y se forma un campo de ondas evanescentes, dicho campo funciona como una especie de sonda, que puede detectar cambios en el índice de refracción y así proporcionar una señal que al ser procesada arroja una medida cuantitativa del analito que se estudia a través del biosensor.

Una de las ventajas de este campo evanescente es que tiende a la desintegración hacia el medio externo de forma exponencial, esto implica que los biosensores ópticos pueden aprovechar esa desintegración para la detección de los cambios del índice de refracción que se producen cerca de la superficie del material sobre el cual se está propagando la luz, y esto minimiza la interferencia con otras sustancias o partículas presentes en la solución. Por otro lado, este tipo de dispositivos logran una alta sensibilidad de detección con tiempos de respuesta cortos, no sufren interferencias electromagnéticas o mecánicas y pueden ser construidos en miniatura (López, 2018).

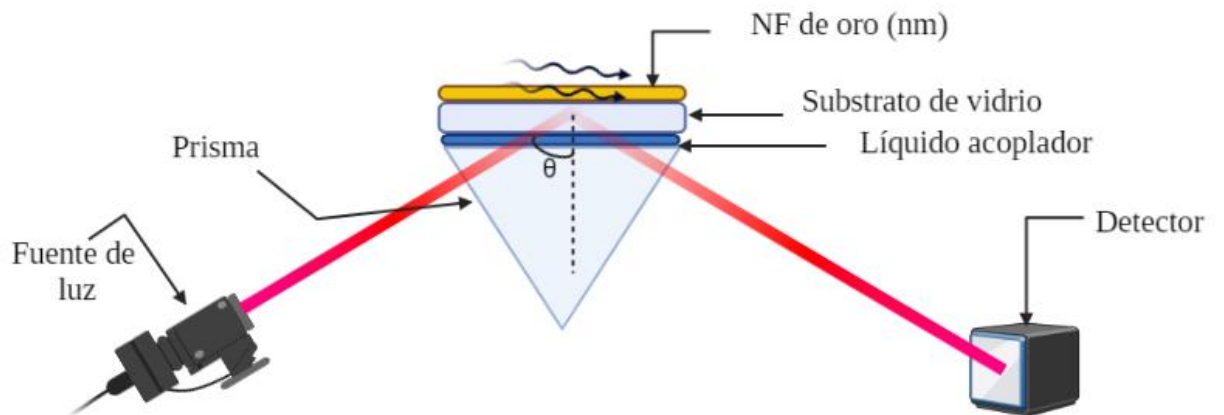
Se pueden diferenciar dos tipos de biosensores ópticos con mecanismos de campo

evanescente, los que usan guías de ondas dieléctricas convencionales, y los que están basados en modos plasmónicos en una interfaz metal-dieléctrico. Por el interés particular de este trabajo de investigación, solamente se va a profundizar en el segundo tipo de biosensor óptico de campo evanescente.

### **2.5.2. Biosensores ópticos de resonancia de plasmón superficial.**

El biosensor óptico de resonancia de plasmón superficial (SPR), es uno de los tipos de biosensor más avanzado y utilizado, debido a la versatilidad, a su alta sensibilidad, a la posibilidad de hacer lecturas en tiempo real y a la medición directa de la cinética de binding (Peltomaa, Martínez, Peña, & Moreno-Bondi, 2018).

Cuando un fotón golpea en la interfaz de dos medios con constantes dieléctricas de signos opuestos, tal como un metal (generalmente oro o plata) y un dieléctrico, una parte de la energía del fotón se acopla a través del revestimiento metálico con los electrones de la capa de la superficie del metal y las cargas libres presentes en la interfaz de los dos medios empiezan a oscilar debido a la excitación, dicho movimiento de los electrones es lo que se denomina plasmón de superficie (ilustración 12) y normalmente se propaga en paralelo a la superficie del metal (Espinoza, 2013). La oscilación del plasmón a su vez genera un campo electromagnético, el cual tiene sus máximos ubicados en la interfaz metal-dieléctrico y presenta campos evanescentes que decaen exponencialmente en ambos medios (López, 2018).

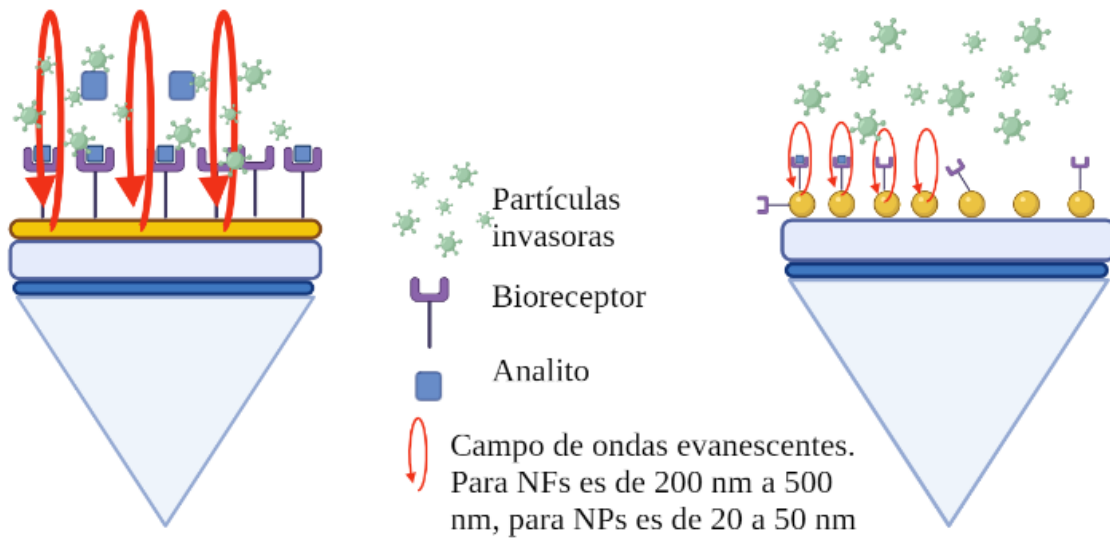


*Ilustración 12 Representación esquemática de la configuración experimental de un biosensor óptico SPR*

El metal más utilizado para los biosensores SPR es el oro, debido a sus propiedades ópticas en el espectro de la luz visible a infrarrojo cercano, además posee muy buena resistencia química y tiene diversas posibilidades de funcionalización, la más conocida, tiol-oro. Es importante resaltar que, si bien el oro tiene las propiedades necesarias para la generación de plasmones de superficie, también necesita condiciones específicas para que la sensibilidad de reconocimiento sea eficiente, una de las condiciones más importantes si se están usando NFs, es el grosor de la misma puesto que, a espesores mayores a 150 nm, las NFs suelen comportarse como espejos (López, 2018).

Por otro lado, es necesario destacar que dependiendo del NM usado en el biosensor se tendrán algunas ventajas sobre otros NMs por ejemplo, los NFs han demostrado ser más eficaces en la monitorización de interacciones biomoleculares con una sensibilidad entre  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$  unidades de índice de refracción, frente a las NPs, que cuentan con un rango de sensibilidad en un intervalo menor,  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  unidades de índice de refracción (Dahlin, Wittenberg, & Hook, Promises and Challenge of nanoplasmonic

devices for refractometric biosensing, 2013). Sin embargo, en el caso de las NFs, la desintegración de onda evanescente expande de 200 a 500 nm aproximadamente el campo en el medio, lo que da como resultado una alta sensibilidad a los cambios generales del índice de refracción, es decir que cualquier cambio en el índice de refracción que se genere en ese campo será detectado por el biosensor, mientras que en las NPs el campo electromagnético está muy confinado cerca de la superficie, con un área sensible promedio entre 10 y 20 nm que se expande a unos pocos nanómetros de la superficie, lo que hace que este tipo de NM sea mucho más específico a los cambios en el índice de refracción (ilustración 13), pues su campo de onda evanescente es mucho menor que el de las NFs.



*Ilustración 13 Comparación entre el campo de ondas evanescentes de NFs y NPs.*

## 2.6. Elementos de espectrofotometría.

La espectrofotometría es una técnica que se usa cuando se requieren hacer mediciones cuantitativas y análisis de espectros, pero además permite determinar la concentración de un compuesto en una solución (Díaz, Bárcena, E, Galván, & Novo, 2010). El fundamento de esta técnica está basado en la capacidad que tienen las moléculas de absorber las radiaciones del espectro UV (195-400 nm) y el visible (400-780 nm), y esto dependerá principalmente de la estructura atómica de las moléculas y las condiciones del medio en que se generen.

Cuando una molécula absorbe luz, se produce un salto energético, desde un estado basal  $E_0$ , hasta un estado más excitado  $E_1$ , sin embargo, en ese estado su tiempo de vida es corto, por lo que la molécula puede regresar a su estado base mediante la emisión de fluorescencia, que es el proceso de emisión de luz desde un estado excitado, conversión de energía interna, o puede suceder que la molécula pase a un estado excitado de energía intermedio (ilustración 14). Cada molécula, tiene una serie de bandas energéticas que la distingue de otras moléculas, esto implica que para cada una se tendrá un único espectro de absorción.

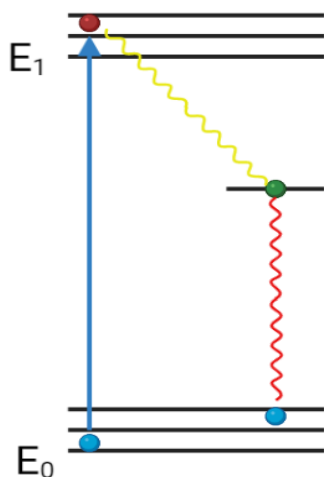


Ilustración 14 Diagrama de niveles de energía para una molécula

En cuanto a las regiones del espectro electromagnético que se usan en espectrofotometría, se encuentra la región UV, una región de energía muy alta, en la que compuestos con dobles y triples enlaces, sistemas aromáticos y grupos carbonilos presentan su máxima absorbancia, por lo que la UV es usada para la determinación de los compuestos ya mencionados. Así mismo, en la región visible del espectro se debe tener en cuenta que para realizar mediciones y determinar de forma cuantitativa y cualitativa un compuesto, se debe usar la longitud de onda en la que absorbe la luz las moléculas de la solución, ya que no es la misma que transmite.

### 2.6.1. Transmitancia.

Cuando un haz de luz atraviesa una sustancia con una intensidad inicial  $I_0$ , a una determinada longitud de onda, dicha sustancia absorberá una parte de la radiación ( $I_a$ ), que incide sobre ella y el resto ( $I_t$ ), atravesará hasta llegar a un detector, tal como se observa en la ilustración 15.

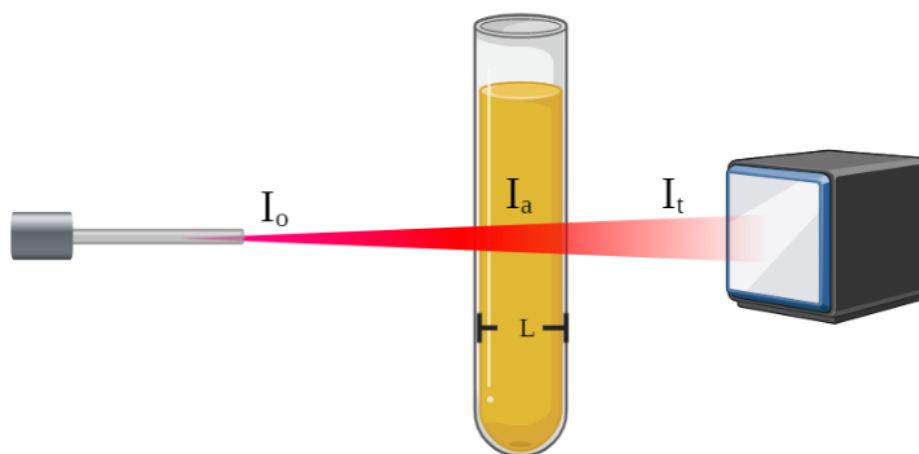


Ilustración 15 Representación esquemática de la transmitancia

Luego entonces se cumple:

$$I_o = I_a + I_t \quad (3)$$

La transmitancia  $T$  de una sustancia es una magnitud que indica la relación entre la cantidad de luz transmitida y la cantidad de luz que incidió en la solución, y se puede expresar en forma de porcentaje como sigue:

$$T = \frac{I_t}{I_o} \cdot 100 \quad (4)$$

### 2.6.2. Absorbancia.

La absorbancia  $A$ , es la cantidad de intensidad de luz que absorbe la muestra y se define como se observa a continuación:

$$A = -\log \frac{I_t}{I_o} \quad (5)$$

La absorbancia y la transmitancia son conceptos relacionados, pero opuestos, ya que si se obtiene un valor grande de  $T$  significa que la solución absorbió muy poco, y viceversa cuando se obtiene un valor pequeño en  $T$  significa que la sustancia absorbió un gran porcentaje de la  $I_o$ . En el caso en que  $I_o$  sea igual a  $I_t$ , esto significa que la solución no absorbe nada, y entonces  $A=0$ .

### 2.6.3. Ley de Lambert-Beer.

Esta ley es una medida cuantitativa de la radiación e indica la relación de proporcionalidad que existe entre la  $A$  de la luz monocromática que incide en una solución y la concentración  $C$  de los cromóforos presentes en dicha solución. Esta ley



se puede expresar matemáticamente como sigue:

$$A = \log \frac{I_t}{I_o} = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (6)$$

Como se puede observar en la ecuación 6, la ley de Lambert-Beer expresa una relación lineal, donde  $\varepsilon$ , es el coeficiente de extinción molar, una constante de proporcionalidad única para cada cromóforo de una solución, y  $l$  indica la longitud de la cubeta o recipiente que atraviesa el haz de luz incidente. Es importante resaltar que esta ley solamente se cumple para soluciones diluidas y cuando la luz usada para determinar la concentración de la sustancia es monocromática.

# CAPÍTULO 3

---

## Metodología

---

En este capítulo se aborda los fundamentos y la metodología usada para el desarrollo del proyecto de investigación; preparación de los oligonucleótidos y de los buffers, pero además se abordan varios apartados en los que se profundiza sobre la optimización del volumen y concentración adecuados para los procesos de funcionalización de las NFs de oro, así como los procedimientos realizados para la obtención de la curva de calibración.

### **3.1. Oligonucleótidos.**

Para la funcionalización de las NFs, se usaron oligonucleótidos que fueron sintetizados como una cadena simple de ADN que codifica para SARS-CoV-2 (tabla 1), la cual fue adquirida en la empresa Mycosynth y fue escogida de acuerdo con las secuencias usadas en diversos países para el diagnóstico de COVID-19 según la bibliografía revisada (Corman, y otros, 2020). En la tabla 1, se puede observar que la cadena tiene en su nombre un dominio RdRp, que significa ARN polimerasa dependiente de ARN, debido a que todos los virus que poseen un genoma de ARN positivo codifican para RdRp, que finalmente es el encargado de la replicación, síntesis y transcripción de sus genomas (Alquist, 2002), sin embargo, en INAOE, no se tienen las condiciones para la manipulación de organismos que representen un nivel de bioseguridad IV, como en el caso de los virus, por lo cual, la síntesis realizada para la cadena de oligonucleótidos no es como tal un ARN, sino un ADN, la cual representa la secuencia de nucleótidos original del virus, pero no tiene el dominio que le permite replicarse al interior del cuerpo humano.

Tabla 2 Oligonucleótidos usados para la funcionalización de las NPs de oro.

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia de ADN	Peso molecular (g/mol)	Longitud (bases)	Escala ( $\mu\text{M}$ )	Temperatura de fusión ( $^{\circ}\text{C}$ )
RdRp-COVID	[Tiol]5'GCA TCT CCT GAT GAG GTT CCA CCT G-3'	7716	25	1	59.5

### 3.1.1. Identificación de los oligonucleótidos con ensayo colorimétrico.

Los oligonucleótidos utilizados para la funcionalización de las NFs, son ADN monocatenarios, es decir de cadena sencilla y presentan una modificación en uno de sus extremos (5'), en los que se ha añadido un grupo tiol, esta modificación en la cadena permite la reactividad del tiol con el reactivo DTNB (reactivo de Ellman para ensayo de sulfhidrilo) (ilustración 16, parte izquierda) y de esta forma es posible identificar la presencia de oligonucleótidos en una determinada disolución.

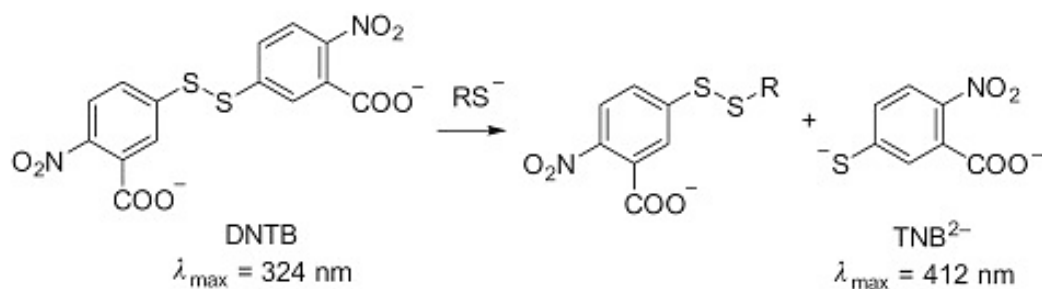


Ilustración 16 Representación de estructura de DTNB y su oxidación con un tiol. Tomado de: (Jeffery, 2016)

La oxidación entre el DTNB y el grupo tiol de los oligos, se produce cuando el sulfhidrilo reacciona con el enlace disulfuro del DTNB, escindiéndolo y dando lugar

al producto 2-nitro-5-tiobenzato, también conocido como ion  $TNB^-$ , y posteriormente se ioniza al dianión  $TNB^{2-}$  (ilustración 16, parte derecha), este último ion se caracteriza por presentarse en soluciones con pH neutro y tener un color amarillo. Su cuantificación se puede realizar por medios espectrofotométricos a través de la medición de la absorbancia de la luz visible a 412 nm.

### **3.1.2. Procedimiento para la preparación de los oligonucleótidos.**

- Se resuspendieron los oligonucleótidos liofilizados en 1 ml de buffer de agua libre de nucleasas para biología molecular, adquirida en Sigma Aldrich, con el fin de tener una concentración de 1  $\mu$ M.
- Se uso una microcentrífuga de labnet, modelo spectrafuge 24D con spin 13000, durante 30 segundos para que todo el volumen se concentrara en la parte baja del tubo.
- Se calentaron los oligonucleótidos a una temperatura de 65°C en baño maría CIVEQ HH-2, por 5 minutos para que los oligonucleótidos estuvieran separados y disponibles para trabajar.
- Se agitaron brevemente en un vortex científico, modelo VTX-5
- Se hicieron alícuotas a 50  $\mu$ L
- Se almacenaron a -20°C para largo plazo tal como se observa en la tabla 2 para refrigeración en uso rápido.

Tabla 3 Información sobre la refrigeración de los oligonucleótidos, de acuerdo con su estado

Estado	Temperatura (°C)	Duración
Seco	-25 a -15	Varios años
Seco	15 a 25	5 meses a 2 años
Líquido	-25 a -15	6 meses a 2 años
Líquido	2 a 8	2 meses a 1 año
Líquido	15 a 25	1 semana a 3 meses

**Nota:** Es recomendable diluir el liofilizado en 1 ml de diluyente y posteriormente utilizar el buffer que se requiera probar. De tal forma que los oligonucleótidos con 1.0  $\mu$ moles tengan una concentración final de 1  $\mu$ M.

### 3.2. Preparación de Soluciones y Reactivos.

#### Buffer TE

El TE (Tris- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)), adquirido en Sigma Aldrich, es una solución tampón que se usa de forma común en biología molecular para diversos procedimientos que involucran cadenas de ADN, ADNc o ARN, con el propósito de estabilizar las cadenas y evitar su degradación.

#### Buffer PBS

El buffer de PBS (buffer fosfato salino), es una solución isotónica, que presenta una composición muy semejante al líquido extracelular de los mamíferos, que permite mantener el pH estable y no es tóxico.

#### Preparación

- Se agregaron a 800 ml de agua destilada
- 8 g NaCl marca Omnicem
- 0.2 g de KCl marca Omnicem

- 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> marca Omnicem
- 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> marca Omnicem
- Se ajusto a pH 8.0
- Se esterilizó en autoclave NOM de 3 calores modelo CV250

### **Agua libre de nucleasas**

Es agua pura, adecuada para uso en todo tipo de procesos experimentales, sobre todo en biología molecular. Las nucleasas son pequeñas enzimas que se encuentran en todo tipo de células y catalizan la ruptura de enlaces fosfodiéster, además que según su tipo pueden modificar proteínas o incluso escindir el material genético, es por ello que el agua no debe tener nucleasas cuando se necesita tener copias de ADN o ARN.

### **DTNB**

También llamado reactivo de Ellman, el ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico), es un compuesto muy útil como reactivo de ensayo de sulfhidrilo debido a su especificidad por los grupos tioles a pH neutro, debido a que, al reaccionar con estos, se origina un producto de color amarillo que proporciona un método fiable para medir cisteínas reducidas y otros tioles libres en solución. Estos grupos -SH, pueden estimarse en una muestra comparándolo con una curva patrón obtenida en un espectrofotómetro, basándose en su fuerte absorbancia a 412 nm a partir de concentraciones conocidas de un compuesto que contiene tioles, como la cisteína o el ácido 3-mercaptopropiónico. Alternativamente, estos grupos funcionales pueden cuantificarse en referencia al coeficiente de extinción de DTNB.

### **Materiales.**

- Frasco volumétrico de 200 ml con tapa de rosca
- DTNB en polvo marca Sigma Aldrich

- Espátula de laboratorio
- Balanza analítica calibrada OHAUS serie Pioneer
- Varios tubos eppendorf
- 100 ml del buffer de PBS a pH 8
- 500 µl de DMSO para biología molecular marca SIGMA
- Micropipeta de 20 a 200 µl
- Matraz aforado de 100 ml

### **Preparación**

**Volumen (V):** 100 ml

**Peso molecular (P.M):** 396.36 g/mol

**Nota:** Todo el procedimiento debe ser realizado en una campana de flujo laminar con mínima iluminación.

- A partir de la ecuación de la concentración molar [1], se puede encontrar la masa de DTNB que se debe utilizar para su preparación a un volumen inicial de 5 ml:

$$M = \frac{g \text{ de soluto}}{(P.M) V} \quad (7)$$

Donde  $M$ , corresponde a la concentración molar de la solución,  $P.M$  corresponde al peso molecular,  $V$ , es el volumen total de la solución expresado en litros, y  $g \text{ de soluto}$ , es la masa de soluto que se va a utilizar. Según lo anterior, se puede entonces despejar de [7], los  $g \text{ de soluto}$  a utilizar, tal que:



$$g \text{ de soluto} = M(P.M)V \quad (8)$$

La preparación de este reactivo se realizó a una concentración de 0.1 mM, por lo que reemplazando en la ecuación [8], se encuentra que la masa a utilizar es:

$$g \text{ de soluto} = 100 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \left( 396.36 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) 0.1 \text{ L}$$

$$g \text{ de soluto} = 3.96 \text{ mg}$$

Una vez obtenida la masa a usar del reactivo, en una balanza analítica calibrada se pesan los 3.96 mg de DTNB en el interior de un tubo eppendorf y se disuelven con 500  $\mu\text{l}$  de DMSO, resuspendiendo con la micropipeta, hasta que el DTNB quede completamente diluido, posteriormente se miden 100 ml de PBS a pH. 8.0 en un matraz aforado, se depositan en un frasco volumétrico y se mezcla con la solución obtenida en el eppendorf. Finalmente se debe cubrir el frasco que contiene la solución con papel aluminio.

### **Ácido 3-Mercaptopropiónico**

El ácido 3-mercaptopropiónico (3AMP) (ilustración 17), adquirido en *Termo Fisher scientific*, es una solución usada como una monocapa auto ensamblada hidrófila, para tiolar NFs de oro, o incluso para la protección de nanopartículas con el objetivo de funcionalizar estos NM con enzimas, o grupos terminales más complejos para aplicaciones de biosensores (Sigma-Aldrich, 2021)

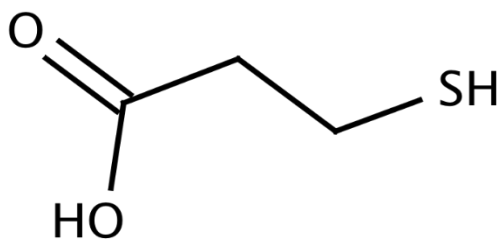


Ilustración 17 Representación esquemática del 3AMP. Tomado de: (Cymit, 2021)

## Materiales

- 3AMP líquido Termofisher
- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Tubos falcon de 15 ml
- Agua destilada estéril
- Papel aluminio

## Preparación

**Volumen:** 5 ml

**Peso molecular:**  $106.19 \text{ g/mol}$

**Densidad:**  $1.218 \text{ g/ml}$

**Nota:** Todo el procedimiento debe ser realizado en una campana de flujo laminar con mínima iluminación.

- Para una concentración inicial de 2 mM con un volumen inicial de 5 ml, se tiene que:

$$g \text{ soluto} = (2 \times 10^{-3} M)(0.005 L)(106.19 \text{ g/mol})$$

$$g \text{ soluto} = 1.06 \text{ mg}$$

Ya se tiene la masa del soluto que se requiere, sin embargo, en el laboratorio solo se cuenta con el 3AMP en versión líquida, por lo que se hace uso de la densidad de la sustancia para calcular el volumen correspondiente a usar de la solución, tal que:

$$V = \frac{m}{\rho}$$

$$V = \frac{1.06 \times 10^{-3} \text{ g}}{1.218 \text{ g/ml}}$$

$$V = 870.3 \mu\text{L}$$

Luego entonces en 5 ml de agua destilada se agregan 870.3  $\mu\text{L}$  de 3AMP y se tiene una solución a 2 mM, Sin embargo, como se va a requerir trabajar en concentraciones de nM, entonces se hace una nueva dilución de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (9)$$

Se hace una dilución a 5 ml para tener la solución en concentración de 2  $\mu\text{M}$ , tal que

$$V_1 = \frac{2 \times 10^{-6} \text{ M} (5 \times 10^{-3} \text{ L})}{2 \times 10^{-3} \text{ M}}$$

$$V_1 = 5 \times 10^{-6} \text{ L}$$

$$\text{Aforo} = 4995 \times 10^{-6} \text{ L agua destilada}$$

Para finalizar el proceso se deben cubrir los tubos Falcon con papel aluminio,

se deben marcar con el nombre de la sustancia, la concentración y la fecha de preparación, y después de ser usados deben ser refrigerados a 4°C.

### **3.3. Curva de calibración.**

Los métodos de funcionalización de NFs, necesitan estimar la diferencia de concentración de oligonucleótidos antes y después de la funcionalización, pues de esta forma se puede determinar la tasa de adhesión de los oligonucleótidos a las NFs. En este sentido, es claro que antes de la funcionalización, la concentración de oligonucleótidos será conocida, pero después se deben usar otros métodos para asegurarse que el proceso fue exitoso. Uno de esos métodos es la elaboración de la curva de calibración que permite la comparación de las propiedades del analito en estudio, como por ejemplo la absorbancia, contra la de estándares de concentración conocida del mismo analito o de algún otro con propiedades muy similares a éste.

Idealmente, esta curva debe realizarse con el analito que se pretende usar durante la funcionalización, en este caso particular los oligonucleótidos de SARS-CoV-2, sin embargo, de acuerdo con las especificaciones de la empresa Mycrosinth, los oligonucleótidos adquiridos vienen en un pellet seco que al ser resuspendidos en 1 ml de agua libre de nucleasas o en buffer Tris-HCL, se obtiene una concentración de 1  $\mu$ M. Es evidente entonces, que se tiene una cantidad mínima de oligos para realizar las pruebas necesarias para la funcionalización. Es por lo que se decidió usar un estándar que tuviera alguna característica similar con los oligonucleótidos y que permitiera generar la curva de calibración.

Tal como se mencionó en la sección 3.1.1., los oligonucleótidos usados para realizar la funcionalización están tiolados con la finalidad de que se adhieran a la superficie de las nanopelículas, debido a que los tioles tienen gran afinidad para adherirse al oro, pero además al estar tiolados, los oligonucleótidos pueden reconocerse fácilmente en pruebas de ensayo

colorimétrico, al respecto existen algunas otras sustancias conocidas, como el ácido 3-mecaptopropiónico (3AMP) (ilustración 17) que en su estructura también cuentan con un grupo tiol, y que al ser más económicas y accesibles que los oligonucleótidos permitió realizar diversas pruebas para la elaboración de la curva de calibración.

La primera prueba realizada con el 3AMP tenía como objetivo evidenciar la reacción con el DTNB en un ensayo colorimétrico. Para el desarrollo de la prueba se hicieron una serie de diluciones del 3AMP en agua destilada, así como se explicó en la sección 3.2., en un rango de concentraciones de 0  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ , y se hicieron lecturas de absorbancia en el lector de microplacas *iMark Absorbance Microplate* de Biorad. Los resultados se presentan en la tabla 4.

*Tabla 4 Concentraciones de 3-AMP usadas para la primera prueba de sensibilidad de absorbancia en el lector de microplacas. El stock inicial tenía una concentración de 2 mM, La primera columna se refiere a la concentración final de la dilución que se realizó, la segunda se refiere al volumen que se debe tomar del stock inicial para lograr la concentración final, y la tercera indica la cantidad de agua destilada que se toma para hacer la dilución*

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Vol. Stock ( $\mu\text{l}$ )	Aforar con Agua destilada
0	0	1000
1	100	950
3	150	850
5	250	750
7	350	650
9	450	550
11	550	450
13	650	350
15	750	250
20	1000	0

Una vez realizadas las diluciones del 3 AMP, se revisó en el protocolo los volúmenes que se iban a manejar con los oligonucleótidos en los ensayos colorimétricos, a saber, 20  $\mu\text{l}$  de una dilución de oligos y 180  $\mu\text{l}$  de DTNB y se tuvieron en cuenta para todas las pruebas que se

realizaron con el 3 AMP para la curva de calibración, con el fin de mantener las mismas condiciones de trabajo y que se pudiera usar la curva de calibración con los oligonucleótidos, a pesar de no haber sido elaborada con ellos. En ese sentido se depositaron 20  $\mu\text{l}$  de cada dilución de 3AMP en un pozo de una microplaca de 96 pozos por triplicado, tal como se observa en la ilustración 18 y posteriormente se agregaron 180  $\mu\text{l}$  de DTNB.



*Ilustración 18 Configuración de la primera prueba realizada con 3AMP. Donde B, corresponde al blanco, CN, control negativo y todas las medidas que se muestran en cada pozo están en unidades de  $\mu\text{M}$*

En la ilustración 19, se puede observar en la parte izquierda, la microplaca con las diluciones de 3 AMP, y en la parte de la derecha se observa la reacción colorimétrica que se genera una vez se agrega el DTNB. Es importante resaltar que lo que se quiere medir en el lector de microplacas es la absorbancia de la concentración que hay en cada pozo, por lo cual se hace necesario añadir el blanco, para que posteriormente se pueda restar la medida de la absorbancia del mismo con la que se genere para cada pozo que contenga el 3AMP y el DTNB,

en el caso de esta primera prueba todas las diluciones se realizaron en agua destilada (blanco), por lo que en los pozos A1, B1 y C1, se depositaron 200  $\mu$ l de agua destilada, que sería el volumen final que tendría cada pozo con las dos soluciones agregadas (3AMP y DTNB).



*Ilustración 19 En la ilustración izquierda se ve el 3AMP en los pozos de la microplaca. En la ilustración de la derecha se observa la reacción colorimétrica que se genera una vez se agrega el DTNB. Se evidencia entonces que entre mayor sea la concentración de 3AMP, la reacción con DTNB, se torna en un amarillo más intenso*

### **3.3.1. Pruebas de optimización para la curva de calibración.**

Como se mencionó en la sección anterior la curva de calibración se realizó con el 3AMP debido a que en su estructura cuenta con un grupo tiol, que es el que finalmente reacciona con el DTNB y permite la reacción para el ensayo colorimétrico. Sin embargo, se deben tener en cuenta dos aspectos para la elaboración de la curva final:

- La concentración mínima que se va a trabajar posteriormente con los oligonucleótidos.
- El tiempo de oxidación del 3AMP en presencia del DTNB para la medición de absorbancia en el lector de microplacas.

Teniendo en cuenta los dos aspectos mencionados anteriormente se realizan varias pruebas, siguiendo el mismo procedimiento y la misma configuración descritas con anterioridad:

**Prueba 1:** Se deja incubar la microplaca de 96 pozos a temperatura ambiente por 5 minutos y se practica una lectura rápida en el lector de microplacas a 415 nm.

**Prueba 2:** No se deja incubar la microplaca y se practica una lectura rápida a 415 nm en el lector de microplacas.

**Prueba 3:** Se deja incubar la microplaca de 96 pozos a temperatura ambiente por 5 minutos y se practica una lectura cinética a 10 segundos, 1 minuto y 3 minutos con 10 mediciones para cada intervalo en el lector de microplacas a 415 nm.

**Prueba 4:** No se deja incubar la microplaca y se practica se practica una lectura cinética a 10 segundos, 1 minuto y 3 minutos con 10 mediciones para cada intervalo en el lector de microplacas a 415 nm.

Después de realizar las pruebas, se logró evidenciar que la mejor opción para tener una curva lo más ajustada posible, fueron las lecturas cinéticas a diferentes intervalos de tiempo, sin embargo uno de los problemas que presenta hacer este tipo de lecturas es que el equipo va sumando las absorbancias que se producen en los diferentes intervalos de tiempo, por lo que no se obtiene una medida real de la absorbancia de la sustancia, por lo que de las lecturas rápida en el lector de microplacas, la mejor curva obtenida fue la de la prueba 1, en la que se dejó incubar la solución por 5 minutos y posteriormente se hizo la medición de absorbancia.

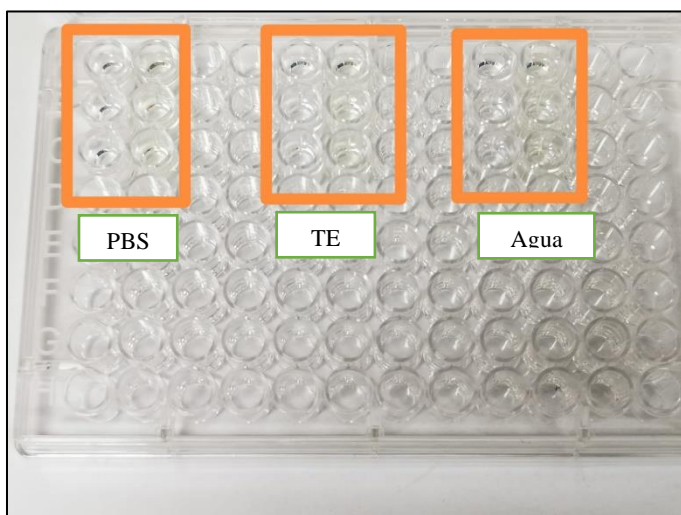
#### **3.4. Optimización de la disponibilidad de oligonucleótidos por ensayo colorimétrico en DTNB.**

Para garantizar la mayor disponibilidad posible de oligonucleótidos en solución se evaluaron 3 diferentes buffers (TE, PBS, agua) empleando el ensayo colorimétrico de DTNB. El sistema de reacción para la cuantificación de tioles se llevó a cabo a una concentración final



de 0.1 mM de DTNB, siguiendo los siguientes pasos:

- Se depositaron 200  $\mu$ L de cada buffer por triplicado, como referencia de cada fila.
- Se prepararon tres diluciones de oligonucleótidos a una concentración de 130 nM a un volumen de 60 $\mu$ L; una dilución en agua libre de nucleasas, una dilución en PBS y una dilución en TE.
- Se depositaron por triplicado 20  $\mu$ L de cada dilución de oligos en 3 filas diferentes de una microplaca de 96 pozos (ilustración 20)
- Se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Se adicionaron 180  $\mu$ L de DTNB a 0.1 mM a los pozos que contenían la solución con oligonucleótidos.
- Se leyó la absorbancia a 412 nm.
- Se calcularon concentraciones interpolando los valores obtenidos de absorbancia en la curva de calibración.



*Ilustración 20 Prueba de disponibilidad de oligonucleótidos, por*

### **3.5. Funcionalización y Optimización del proceso en NFs de oro con oligonucleótidos específicos a SARS-CoV-2.**

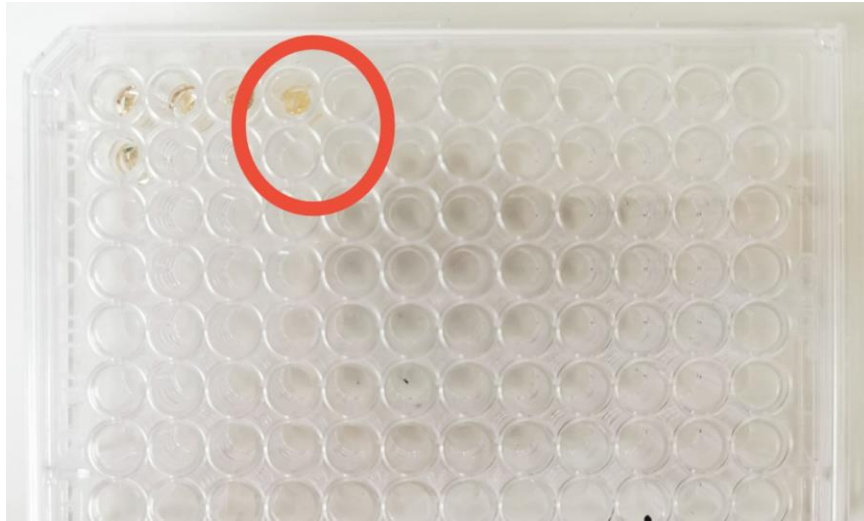
La funcionalización de una NF para un biosensor SPR implica necesariamente un cambio en el índice de refracción a la hora de la detección. Esto se logra principalmente con la adhesión de los oligonucleótidos a la NF de oro, que para el caso de este proyecto particular ya vienen tiolados, lo que permite que el proceso de funcionalización sea más rápido y sencillo. A continuación, se va a describir inicialmente cuales son los procedimientos de funcionalización y posteriormente se describen las pruebas de optimización realizadas para llegar a establecer los protocolos.

#### **3.5.1. Procedimiento de envejecimiento con sal.**

Teniendo en cuenta las condiciones mencionadas, y los procesos descritos para NPs por (Gill, Göeken, & Subramanian, 2013) se desarrollaron los siguientes pasos para el proceso de funcionalización de envejecimiento con sal en un sustrato cuadrado de 0,5 cm de lado con un depósito de oro de 56 nm:

- Para un volumen de 250  $\mu\text{L}$  a una concentración de 130 nM, se tomaron 32.5  $\mu\text{L}$  de oligonucleótidos a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  y se les añadió 92.9  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.
- Se puso la NF en una microplaca de 96 pozos teniendo cuidado que el oro quedara hacia arriba (ilustración 21) y se dejó incubando por 4 horas.
- Al retiro de la incubadora se adicionaron 114,3  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas y 42,8  $\mu\text{l}$  del tampón de NaCl 1 M / fosfato de sodio 100 mM ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4).
- Se dejó durante la noche (aproximadamente 17 horas) a 37°C.
- Se extrajo el exceso de oligonucleótidos mediante la eliminación del sobrenadante.

- Se reservó el sobrenadante para prueba colorimétrica con DTNB.
- Se realizaron múltiples lavados con PBS.
- Se resuspendió la película en tampón de NaCl 0,1 M / fosfato 10 mM (pH 7,4).



*Ilustración 21 Funcionalización de una NF de oro con oligonucleótidos*

### **3.5.2. Proceso de funcionalización *in situ*.**

- **Con buffer fosfato:** Para un volumen de 40  $\mu\text{L}$  a una concentración de 130 nM, se tomaron 5.2  $\mu\text{L}$  de oligonucleótidos a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  y se les añadió 28  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y 6.8  $\mu\text{L}$  del buffer NaCl 1 M / fosfato de sodio 100 mM ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4).
- **Sin buffer fosfato:** Para un volumen de 40  $\mu\text{L}$  a una concentración de 130 nM, se tomaron 5.2  $\mu\text{L}$  de oligonucleótidos a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  y se les añadió 34.8  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.
- Se puso la NF en una microplaca de 12 pozos tamaño, teniendo cuidado que el oro quede hacia arriba y se dejó incubando a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) por 30 minutos.

- Se extrajo el exceso de oligonucleótidos mediante la eliminación del sobrenadante.
- Se reservó el sobrenadante para prueba colorimétrica con DTNB.
- Se realizaron múltiples lavados con PBS.

### **3.5.3. Procesos de optimización para funcionalización de NF de oro relacionado con concentración, volumen y conformación de la NF.**

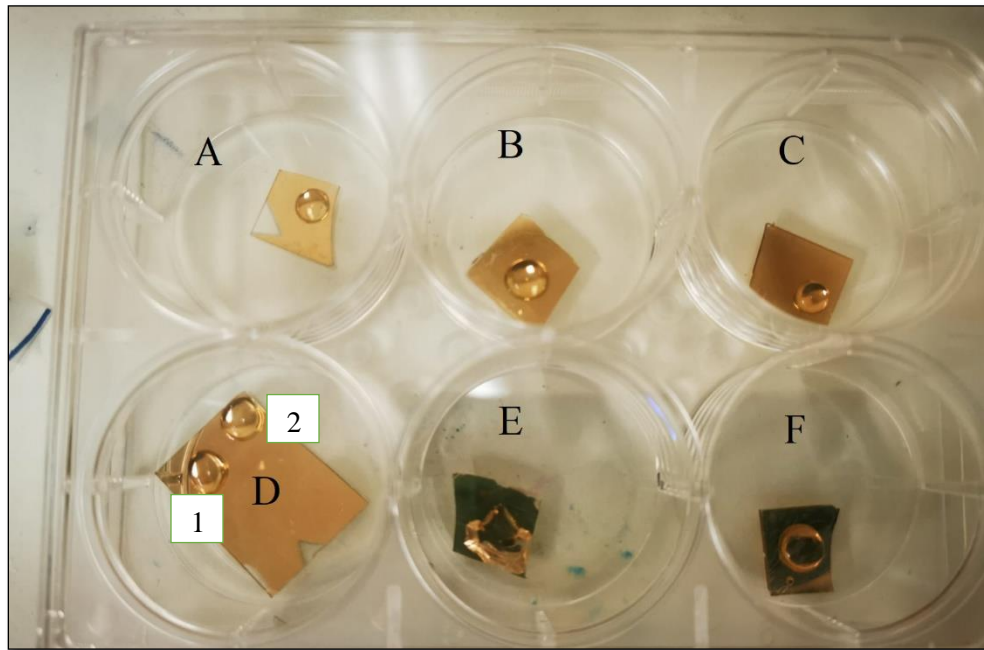
Inicialmente el protocolo de funcionalización de NF de oro se diseñó con base en los procesos encontrados en la revisión bibliográfica, sin embargo, cada proceso es diferente y depende de tres factores principalmente:

- Cantidad de oligonucleótidos disponibles
- Dimensiones del sustrato donde se deposita la NF de oro
- Método de funcionalización; envejecimiento con sal e incubación o depósito de las diluciones *in situ*.

Como se mencionó en una sección anterior, la cantidad de oligonucleótidos tiolados disponibles es 1 ml a 1  $\mu\text{M}$ , por lo que la cantidad de pruebas y repeticiones que se pueden hacer es reducida, y aun así se debe tener en cuenta que el lector de microplacas que se tiene en el laboratorio presenta una buena resolución para hacer mediciones con concentraciones superiores a 100 nM, ya que, por debajo de este punto, los resultados obtenidos no son concluyentes. En cuanto al segundo factor, es importante recordar que uno de los objetivos de la funcionalización en este proyecto era poder medir el porcentaje de adhesión de oligonucleótidos en el lector de microplacas mediante pruebas de ensayo colorimétrico, por lo que se necesita que después de finalizar la funcionalización se obtenga un sobrenadante que permita medir la absorbancia de este. Para ello se hicieron dos pruebas, una en la que la

superficie de los sustratos era irregular y tenían áreas entre  $1 \text{ cm}^2$  y  $4 \text{ cm}^2$ , y otra en la que las NFs eran cuadriláteros de lados aproximadamente iguales y de áreas que no superan los  $0.25 \text{ cm}^2$ .

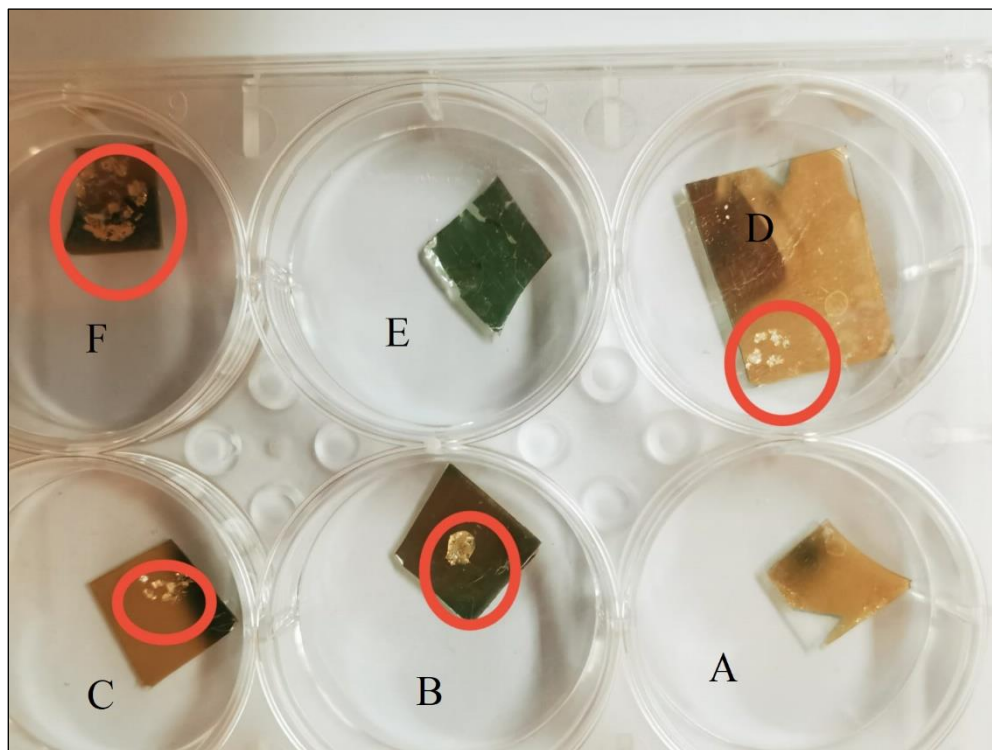
**Prueba 1:** En esta prueba se pusieron fragmentos irregulares de NFs de oro con distintos volúmenes de soluciones, tal como se observa en la ilustración 22:



*Ilustración 22 primera prueba de optimización para volumen de soluciones y levantamiento de la NF por ausencia de titanio*

- **Pozo A:** 30  $\mu\text{L}$  Agua libre de nucleasas
- **Pozo B:** 50  $\mu\text{L}$  de PBS
- **Pozo C:** 30  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato
- **Pozo D gota 1:** 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas
- **Pozo D gota 2:** 50  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato
- **Pozo E:** 50  $\mu\text{L}$  Agua libre de nucleasas
- **Pozo F:** 30  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato

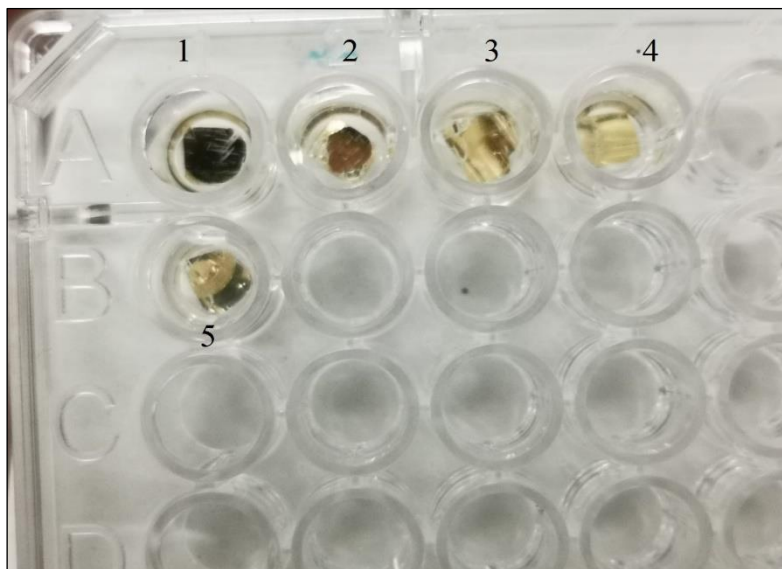
Es necesario resaltar que en este paso ya se había hecho una primera prueba de funcionalización (sección 4.4), y que uno de los resultados encontrados es que las NFs de oro sin titanio tenían la tendencia a desprenderse del sustrato, por lo que en esta primera prueba de optimización se quería determinar si con los volúmenes de 30  $\mu\text{L}$  y 50  $\mu\text{L}$  se tenía sobrenadante después de varias horas de incubación y que tanto afectaban los diferentes buffers a las NFs de oro con y sin titanio, razón por la cual solo el pozo D tenía la NF de oro con 1 nm de titanio además de la NF de oro. Después de 20 horas de incubación se observó que todos los pozos presentaban evaporación total de las soluciones (ilustración 23), siendo esto más crítico en los pozos en los que se había depositado PBS o solución fosfato al 0,1 M por el alto contenido de sales que contienen estas dos soluciones, lo que implicó un residuo de dichas sales en las NFs.



*Ilustración 23 Primera prueba de optimización después de 20 horas de incubación. Los círculos en rojo evidencian los granos de sales que quedaron después de la evaporación de las soluciones.*

Posteriormente, se hizo un lavado con PBS a todas las NFs y a excepción del pozo D, todas presentaron levantamiento parcial o total de la NF de oro, llevando a la conclusión que es necesario el depósito de titanio para la estabilidad de la NF de oro. De otra parte, al haberse evaporado todas las soluciones, es claro que se necesita una menor área de contacto con el ambiente y que la NF debe estar sumergida en solución para evitar la evaporación de las soluciones.

**Prueba 2:** Esta prueba se elaboró teniendo en cuenta los resultados de la prueba 1, razón por la que se disminuyeron todas las áreas de las NFs a aproximadamente  $0.25 \text{ cm}^2$ , todas se sumergieron en diferentes volúmenes de soluciones y todas tenían un depósito de 1 nm de titanio. En la ilustración 24 se muestra la configuración para esta prueba.



*Ilustración 24 Segunda prueba de optimización para evitar la evaporación*

- **Pozo 1:** 100  $\mu\text{L}$  agua libre de nucleasas
- **Pozo 2:** 100  $\mu\text{L}$  de PBS
- **Pozo 3:** 100  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato

- **Pozo 4:** 200  $\mu\text{L}$  de PBS
- **Pozo 5:** 300  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato

Después de 20 horas de incubación se encontró que ninguno de los pozos presentaba evaporación de la solución, aunque se debe tener presente que el propósito de evitar la desecación de los pozos es necesario para poder obtener un sobrenadante y posteriormente medir la absorbancia mediante prueba de ensayo colorimétrico, por lo que no solo basta con que el pozo no se evapore, sino que además debe quedar solución suficiente para la medición. A continuación, se presenta los volúmenes encontrados después del tiempo de incubación en cada pozo:

- **Pozo 1:** 20  $\mu\text{L}$  agua libre de nucleasas
- **Pozo 2:** 19  $\mu\text{L}$  de PBS
- **Pozo 3:** 17  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato
- **Pozo 4:** 100  $\mu\text{L}$  de PBS
- **Pozo 5:** 150  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede observar que un volumen adecuado para funcionalizar y obtener suficiente sobrenadante estaría en un rango de 200 a 300  $\mu\text{L}$ , el promedio de ambos sería entonces 250  $\mu\text{L}$

### **3.6. Confirmación indirecta de la funcionalización.**

El sobrenadante reservado de la funcionalización con cada uno de los oligonucleótidos se empleó para la medición indirecta de la eficiencia de la funcionalización, detectando los oligonucleótidos no adheridos a través del método colorimétrico con DTNB, tal como se



describió en el inciso 3.3.

### **Procedimiento**

- Se pusieron 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante retirado de la microplaca de funcionalización en un pozo nuevo.
- Se añadieron 180  $\mu\text{L}$  de DTNB.
- Se leyó la absorbancia en el lector de microplaca a 415 nm.
- Se calcularon las concentraciones interpolando los valores obtenidos de absorbancia en la curva de calibración.

# **CAPÍTULO 4**

---

## **Resultados Experimentales y Discusión**

---

En este capítulo se exponen los resultados de dos métodos de funcionalización; *in situ* a dos intervalos de tiempo, en la cual se hace la comparación entre el depósito de los oligonucleótidos en la NF sin ningún aditamento especial versus con buffer, y el otro método es la funcionalización a través del proceso de envejecimiento con sales para determinar si este proceso mejora la adhesión y disponibilidad de los oligonucleótidos, de igual forma se presentan los resultados obtenidos en la prueba de disponibilidad de oligonucleótidos en diferentes buffers y algunos sensogramas a partir de los datos obtenidos de la funcionalización realizada en el biosensor.

#### 4.1. Colorimetría con 3AMP y DTNB.

Generar una curva de calibración para trabajar con oligonucleótidos, implicó realizar una serie de pruebas de optimización que permitieran la fiabilidad de la curva final. A continuación, se muestran los resultados de absorbancia obtenidos en la primera prueba con 3AMP Y DTNB:

*Tabla 4 Resultados de absorbancia obtenidos para la primera prueba con AMP por triplicado, donde B corresponde al pozo que contiene el blanco y CN, corresponde al pozo que contiene el control negativo. Así mismo los números que se encuentran en las franjas de color verde representan las concentraciones en unidades de nM y los valores que se observan bajo cada concentración, representan el valor de la absorbancia obtenido en el lector de microplacas.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
	B	CN	1 nM	3 nM	5 nM	7 nM	9 nM	11 nM	13 nM	15 nM	20 nM	
A	0,035	0,042	0,350	0,757	0,830	0,955	1,137	1,227	1,128	1,272	1,404	
	B	CN	1 nM	3 nM	5 nM	7 nM	9 nM	11 nM	13 nM	15 nM	20 nM	
B	0,036	0,043	0,352	0,835	0,896	1,038	1,114	1,211	1,148	1,322	1,384	
	B	CN	1 nM	3 nM	5 nM	7 nM	9 nM	11 nM	13 nM	15 nM	20 nM	
C	0,036	0,043	0,369	0,783	0,84	0,887	1,004	1,207	1,198	1,301	1,375	

En la tabla 5 se evidencia el resultado final de las absorbancias, es decir que los valores que se observan en los pozos 3-11 son la diferencia entre los datos crudos obtenidos de la absorbancia y el valor obtenido para el blanco. De acuerdo con los resultados en esta primera prueba, se logró evidenciar que existe una relación directamente proporcional entre la absorbancia y la concentración de 3AMP, a excepción de la 9ª columna, donde posiblemente se tuvo un error en la preparación de la concentración de la dilución.

#### **4.2. Elaboración de una curva de calibración.**

Teniendo en cuenta que la concentración de las cadenas de oligonucleótidos es de 1  $\mu\text{M}$ , se repitió la prueba colorimétrica en un rango de concentraciones desde 0 nM hasta 1700 nM, obteniendo los resultados que se presentan en la tabla 6.

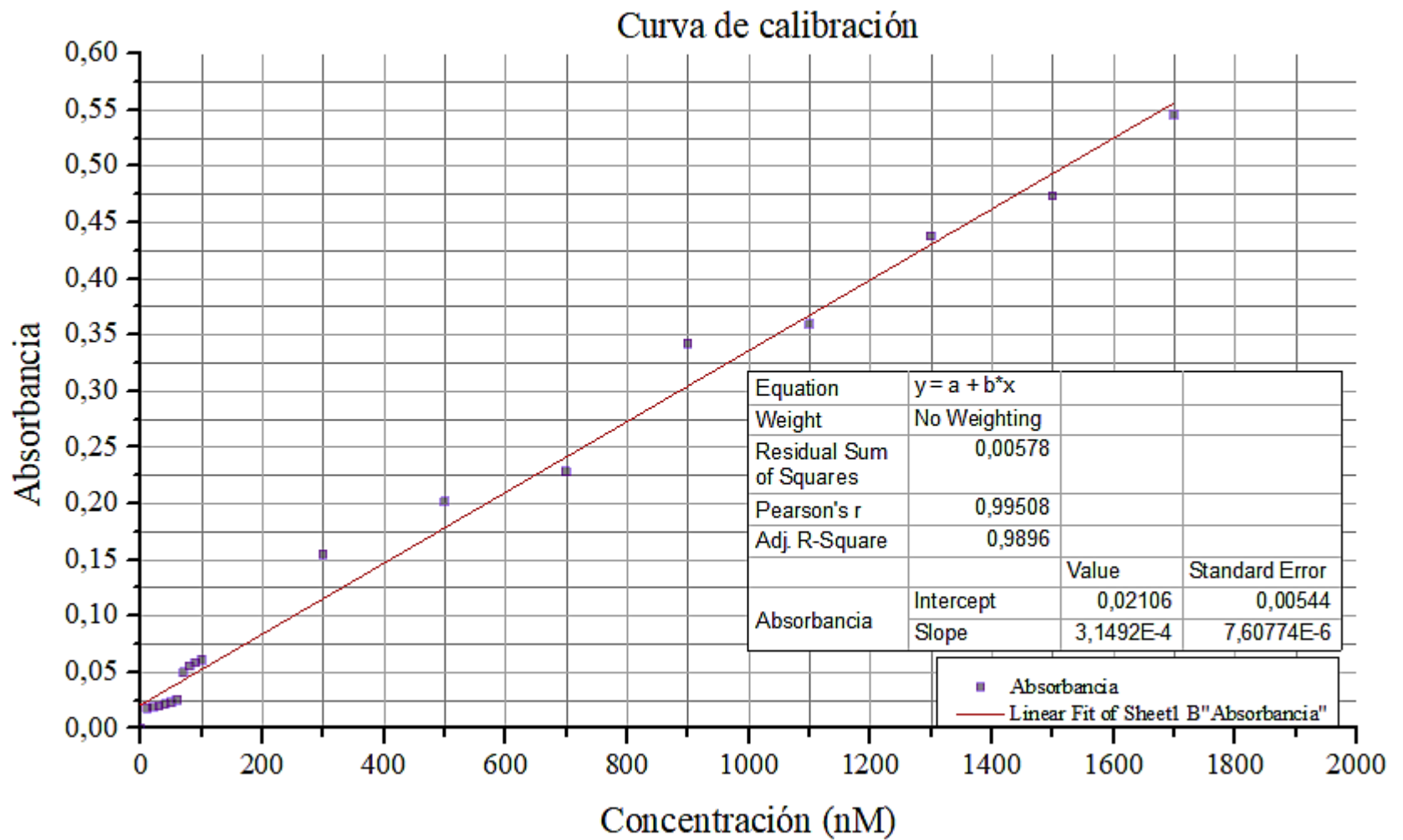
Tabla 5 Absorbancia obtenida para la prueba colorimétrica con 3AMP y DTNB para la elaboración de la curva de calibración, obtenidas con lector de microplacas.

Concentración de 3AMP (nM)	Absorbancia
0	0,0004
10	0,0177
20	0,0187
30	0,0197
40	0,0213
50	0,0230
60	0,0253
70	0,0497
80	0,0553
90	0,0583
100	0,0607
300	0,1547
500	0,2017
700	0,2283
900	0,3420
1100	0,3593
1300	0,4377
1500	0,4733
1700	0,5457

Tal como se observa en la tabla 6, a medida que aumenta la concentración de 3AMP, también aumenta la magnitud de la absorbancia, lo cual establece una relación de proporcionalidad directa entre la concentración de los tioles, que son los grupos que reaccionan con el DTNB, y la absorbancia obtenida mediante el lector de microplacas.

Vale la pena resaltar que esta prueba se tuvo que repetir reiteradas veces hasta obtener los resultados presentados en la tabla 5, ya que cuando las concentraciones de 3AMP son muy bajas, la resolución del equipo del lector de microplacas se acerca a su límite de detección (0,001 OD), lo cual impide mediciones correctas en la absorbancia. Lo anterior implica que para trabajar en el lector de microplacas las concentraciones que se deben usar tanto de 3AMP como de oligonucleótidos deben ser superiores a 100 nM, ya que solo este tipo de magnitud

ofrece confiabilidad en la medición. En la gráfica 1, se puede observar la curva de calibración obtenida para los datos presentados en la tabla 6.



*Gráfica 1 Curva de calibración a partir de ensayo colorimétrico entre 3AMP y DTNB*

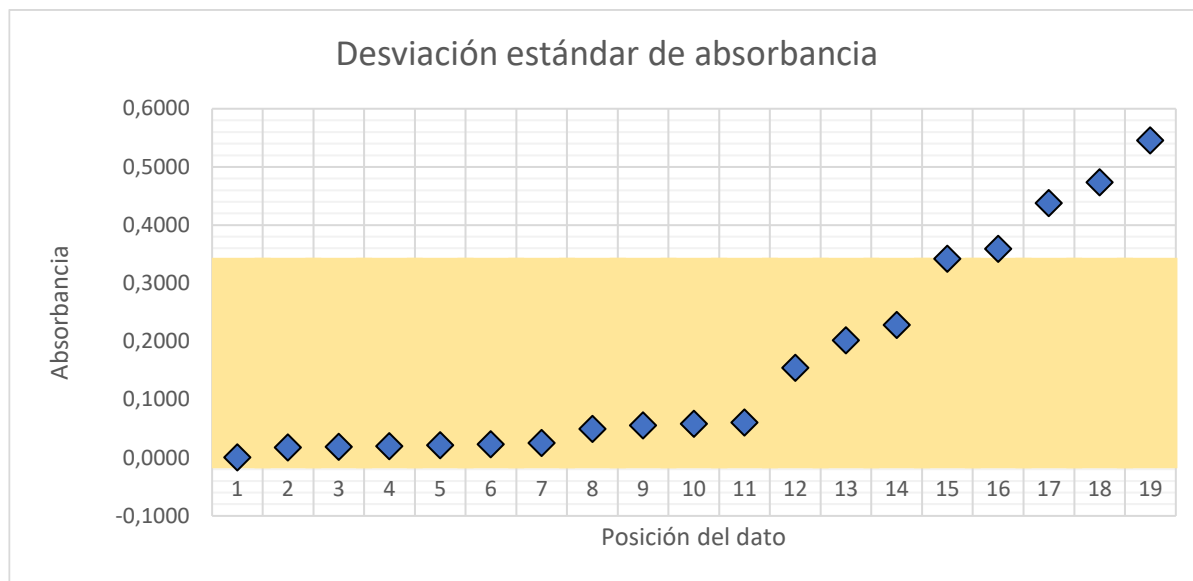
Tal como se observa en la gráfica 1, se realizó un ajuste de tendencia lineal (línea roja) mediante el método de mínimos cuadrados, obteniendo la siguiente ecuación para la recta:

$$A = (3.15 \times 10^{-4}C \pm 8.91 \times 10^{-6}) + (0.021 \pm 6.4 \times 10^{-3}) \quad (10)$$

La ecuación 7, se determinó a partir del método de mínimos cuadrados y permitió encontrar la concentración de los oligonucleótidos después de los procesos de funcionalización. El uso de la ecuación es sencillo, ya que A, representa la absorbancia que se obtiene a través de un medio espectrofotométrico y C, representa la concentración de la muestra. En el caso de este proyecto de investigación, lo que se quería era conocer la concentración de la dilución de oligonucleótidos en el sobrenadante, por lo que solo fue necesario despejar la concentración y encontrar el punto máximo y mínimo para obtener el rango de concentración de la dilución.

Por otro lado, era necesario conocer que tanto se alejaban los datos encontrados de absorbancia de la medida de desviación, estándar, por lo que se elaboró una gráfica, en la que se presenta este resultado (gráfica 2).





Gráfica 2 Desviación estándar de los datos obtenidos experimentalmente para la absorbancia en la curva de calibración.

En la gráfica 2 se muestra una franja en color naranja claro, que representa la desviación estándar de los datos de absorbancia obtenidos a través del lector de microplacas. Se puede observar como los primeros datos están muy cerca del límite inferior de la franja, lo que quiere decir que a pesar que los datos se encuentran dentro de las desviación estándar, estos deberían tomarse con precaución a la hora de analizar resultados en cuanto a los oligonucleótidos de SARS-CoV-2. Por otro lado se observa como a partir del dato 17, estos datos están fuera de la desviación estándar, sin embargo, no es una preocupación en este proyecto, ya que estos datos representan concentraciones mayores a 1000 nm, que es el máximo de concentración de los oligonucleótidos que se tenía.

#### 4.3. Disponibilidad de oligonucleótidos en buffers distintos.

La compañía Microsynth recomienda disolver los oligonucleótidos en agua estéril o buffer Tris-HCl (10 mM pH 7.5), por otro lado, Qui y otros en 2020, realizaron las diluciones de oligonucleótidos para la funcionalización de NPs de oro en un buffer de agua libre de nucleasas. En este trabajo de investigación se quiso hacer una comparación entre el buffer TE, el agua libre de nucleasas y PBS, a través de una prueba ensayo colorimétrico por triplicado

con DTNB, con el fin de determinar en cuál de ellos los tioles de los oligonucleótidos tenían mayor disponibilidad. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 7.

Tabla 6 Prueba de ensayo colorimétrico para determinar la disponibilidad de tioles en tres buffers distintos; PBS, TE y agua libre de nucleasas.

<b>DISPONIBILIDAD DE LOS TIOLES SEGÚN BUFFER</b>												
	Buffer PBS				Buffer TE				Buffer Agua libre de nucleasas			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,001	0,048			0,000	0,045			0,001	0,057		
B	0,000	0,045			0,001	0,051			0,001	0,052		
C	0,001	0,048			0,000	0,048			0,000	0,054		
D												
E												
F												
G												
H												
PROM		0,047				0,048				0,054		

En la tabla 6, se puede observar que la mayor disponibilidad de tioles se encuentra para agua libre de nucleasas, con una absorbancia de 0,054, esto indica que en dicha solución los oligonucleótidos están disponibles en un rango de concentración de 84,4 nM a 125,1 nM, y que por tanto un 80% en promedio de la concentración inicial, estarán libres para pegarse a la superficie de la NF de oro. En este sentido, tal como lo propone Qui y otros, se optó por realizar todas las diluciones de oligonucleótidos con agua libre de nucleasas.

#### 4.4. Funcionalización de una NF de oro sin titanio.

Ceretti, en su investigación de modificación de superficies de oro con oligonucleótidos para la detección de moléculas pequeñas, menciona que para la elaboración del sensor químico, se deben depositar varias capas de titanio en un sustrato y posteriormente el oro (Ceretti, 2016), así mismo Banks et al, explican los parámetros para unir moléculas de isopropóxido de titanio (IV) a monocapas de Ditiotreitól sobre superficies de oro funcionalizadas para formar

superficies coordinadas con titanio, sin embargo en los estudios en donde se emplea el titanio junto con el oro para depósito en superficies, no se explica porque es necesario emplear titanio en superficies de oro para ser funcionalizadas. En este trabajo de investigación se realizó una prueba de funcionalización en una NF de oro sin titanio, de 2 cm x 2 cm aproximadamente, tal como se observa en la ilustración 25.

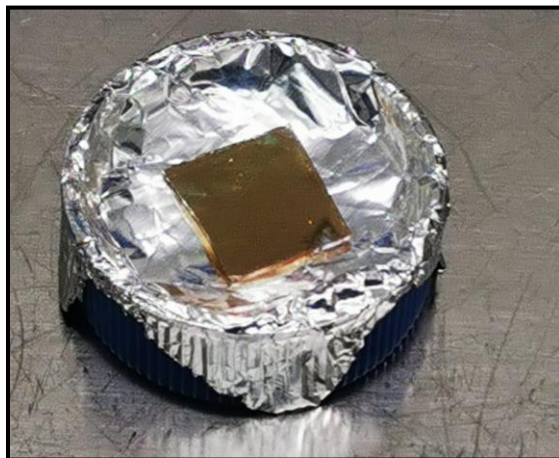


*Ilustración 25 Primera prueba de funcionalización de NFs con oligonucleótidos específicos a SARS-CoV-2*

De acuerdo con los resultados obtenidos en la curva de calibración (sección 4.2), la dilución de oligonucleótidos se hizo a una concentración de 130 nM, para evitar errores en la medición de la absorbancia del sobrenadante al finalizar el proceso de funcionalización. Inicialmente en el protocolo de funcionalización, se tenía que la cantidad necesaria para funcionalizar la superficie de la NF era de 35  $\mu$ L de una dilución, sin embargo, tal como se puede observar en la ilustración 25, la solución depositada es hidrofóbica a la superficie de oro de la NF, por lo que, si el propósito era funcionalizar toda la superficie, este volumen no fue suficiente para tal fin.

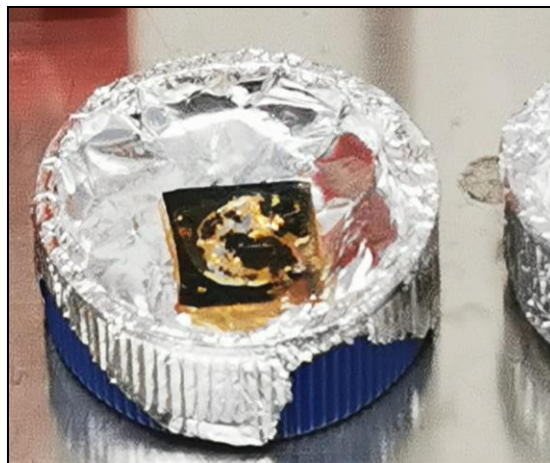
De acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 3.5 (Funcionalización y Optimización del proceso en NFs de oro con oligonucleótidos específicos a SARS-CoV-2) se

dejó la NF en incubación por un periodo de 17 horas aproximadamente. Una vez retirada la NF de la incubadora, se observó una evaporación total de la solución depositada (ilustración 26)



*Ilustración 26 Apariencia de la NF de oro después de 17 horas de incubación por el método de envejecimiento con sal.*

Debido a que se evaporó toda la solución depositada en la NF, no se obtuvo un sobrenadante para determinar la cantidad de oligonucleótidos adheridos a la superficie de la NF. Esta es otra razón por la que el volumen de 35  $\mu$ L de una dilución no es un volumen suficiente para realizar el proceso de funcionalización en una superficie de aproximadamente 4  $\text{cm}^2$  de área. Sin embargo, a pesar de no haber obtenido un sobrenadante para realizar la medición de absorbancia, se decidió realizar varios lavados a la NF con PBS, y hacer una prueba de detección colorimétrica con DTNB, para determinar cuántos oligonucleótidos se despegaban después de los lavados, pero al realizar el primer lavado con el buffer, la NF de oro se desprendió del sustrato de vidrio, tal como se observa en la ilustración 27:



*Ilustración 27 NF de oro sin titanio después de ser lavada con PBS al finalizar el proceso de funcionalización*

A pesar del desprendimiento de la NF de oro, se recogió el sobrenadante del lavado y se midió la absorbancia en el lector de microplacas, encontrando un rango de concentración de 135.2 nM a 175,9 nM de oligonucleótidos, lo que indica que en promedio más del 77,8% de los oligonucleótidos se desprendieron con la NF de oro. Por otro lado, fue determinante este primer experimento, al reconocer que el solo depósito de la NF de oro sobre el sustrato de vidrio es inestable y no permitió ningún proceso de funcionalización.

#### **4.5. Funcionalización de una NF de oro con 1 nm de titanio.**

Toubanaki y su equipo de investigación, en su estudio para conjugar NPs de oro con oligonucleótidos para aplicaciones en biosensores, explica que el ADN tiene una carga negativa muy alta, que es repelida por el oro, y por tanto impide la correcta funcionalización, por lo que usan el método de envejecimiento con sal para la funcionalización. Para ello añaden NaCl gradualmente a la mezcla de ADN y NPs de oro, afirmando que este proceso aumenta la carga del ADN y mejora la estabilidad de funcionalización. En este trabajo de investigación, basados en la evidencia presentada, se realizó una prueba de funcionalización, por el método de envejecimiento con sal.

Así mismo Li y su equipo de investigación, en su proyecto para el genotipado del polimorfismo de un solo nucleótido por plasmón de superficie, funcionalizan nanopartículas de oro con oligonucleótidos de ADN genómico, preparando el conjugado de oligonucleótidos con las NPs de oro, y dejando el tubo en un bloque de calor a 37°C por 4 horas, posteriormente agregando buffer fosfato y dejando envejecer a 37°C durante toda la noche. (Li, Wark, Lee, & Corn, 2006 )

En este proyecto de investigación se tuvieron presentes los procesos realizados por Toubanaki y Li para la funcionalización con el método de envejecimiento con sal, pero además se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en la prueba de funcionalización de NF de oro sin titanio, y así posteriormente se emplearon NFs con un depósito de titanio de 1 nm y se optimizó el proceso de funcionalización, tal como se indica en la sección (3.5.3.), con el fin de obtener un sobrenadante para medir la absorbancia al finalizar el proceso, posteriormente se repitió el proceso de funcionalización en una NF de oro con un 1 nm de titanio y se obtuvieron los resultados presentados en la tabla 8.

*Tabla 7 Resultados de la segunda prueba de funcionalización. A.s, es la absorbancia del sobrenadante, C.s es el rango de concentración del sobrenadante, %P.adh es el porcentaje de adhesión de oligonucleótidos a la NF, A L1, AL2 y A L3 corresponden a las absorbancias de tres lavados posteriores al proceso de funcionalización*

<b>A. s</b>	0,032
<b>C.s (nM)</b>	(14,5 - 55,3)
<b>% P.adh</b>	72,70%
<b>A L 1</b>	0,009
<b>A L 2</b>	0,007
<b>A L 3</b>	0,009

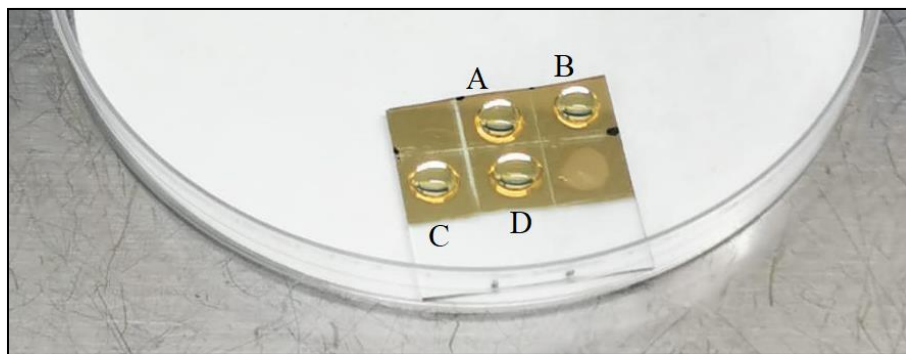
De acuerdo con lo que se observa en la tabla 8, la absorbancia obtenida para el sobrenadante (A.s), implica que hubo un rango de concentración (C.s) de 14,5 a 55,3 nM de oligonucleótidos disponibles. Lo anterior puede sugerir que el porcentaje de adhesión (%P.adh) de los

oligonucleótidos a la NF de oro fue en promedio del 72,7%, que respecto a la funcionalización de la NF de oro sin titanio, es un 71,3% más eficiente en el proceso de adhesión, lo que se confirma con los valores obtenidos en la absorbancia de los 3 lavados posteriores al proceso de funcionalización, que al tener valores tan cercanos al límite de detección del lector de microplacas, no se pudo determinar con precisión la concentración a la que corresponden los oligonucleótidos que se desprenden tras estos lavados, sin embargo esta misma situación indica que el porcentaje de oligonucleótidos que se despegaron fue muy bajo. Por otro lado, la mayor eficiencia de funcionalización obtenida en esta prueba indica que el titanio es un elemento indispensable para la estabilidad de las NFs de oro.

#### **4.6. Funcionalización *in situ* a intervalos de tiempo distintos con métodos espectrofotométricos.**

Una de las preguntas que surgió al iniciar el proceso de funcionalización fue, si era posible funcionalizar NFs de oro a intervalos de tiempo cortos y sin necesidad de incubar las NF, pues tal como lo mencionan Qui et al, en su proyecto de un biosensor fototérmico plasmónico para la detección de SARS-CoV-2, funcionalizaron NPs de oro con oligonucleótidos específicos para el virus mencionado, en un lapso de 48 minutos (Qiu, y otros, 2020). De igual forma Kummer y su equipo de investigación, en su proyecto de espectroscopía de fotoelectrones de alta resolución auto ensamblados en NFs de oro, funcionalizan oligonucleótidos antisentido modificados con un tiol en el extremo 5' en NFs de oro en un tiempo de 1 a 3 horas a través de soluciones con mercaptohexanol (Kummer, Vyalikh, Gavrila, Kade, & Jech, 2008). La discusión que se propone anteriormente de los dos autores evidencia la posibilidad de funcionalizar a intervalos de tiempo corto, por lo que en este proyecto de investigación se realizó una prueba de funcionalización *in situ* para verificar si a un tiempo menor a 48 minutos,

tal como lo propone Qui, era posible funcionalizar NFs de oro, por lo que el experimento se realizó comparando este proceso en dos intervalos de tiempo; 5 minutos y 30 minutos. Para ello se dividió una NF de oro de 2.5 cm de largo por 1 cm de ancho en secciones iguales y se realizaron 4 depósitos a 130 nM; en los cuadrantes A y B se depositaron diluciones con agua libre de nucleasas a un volumen de 40  $\mu$ L a 5 y 30 minutos respectivamente y en los cuadrantes C Y D, se añadieron los mismos 40  $\mu$ L, pero con buffer de fosfato de sodio, tal como se observa en la ilustración 28



*Ilustración 28 Proceso de funcionalización a intervalos de tiempo cortos; A y B son diluciones en agua a 5 y 30 minutos respectivamente, mientras que C y D son diluciones con buffers a 5 y 30 minutos*

Una vez finalizados los tiempos del proceso de funcionalización se recogió el sobrenadante, y se midió mediante ensayo colorimétrico DTNB, obteniendo los resultados que se presentan en la tabla 9.



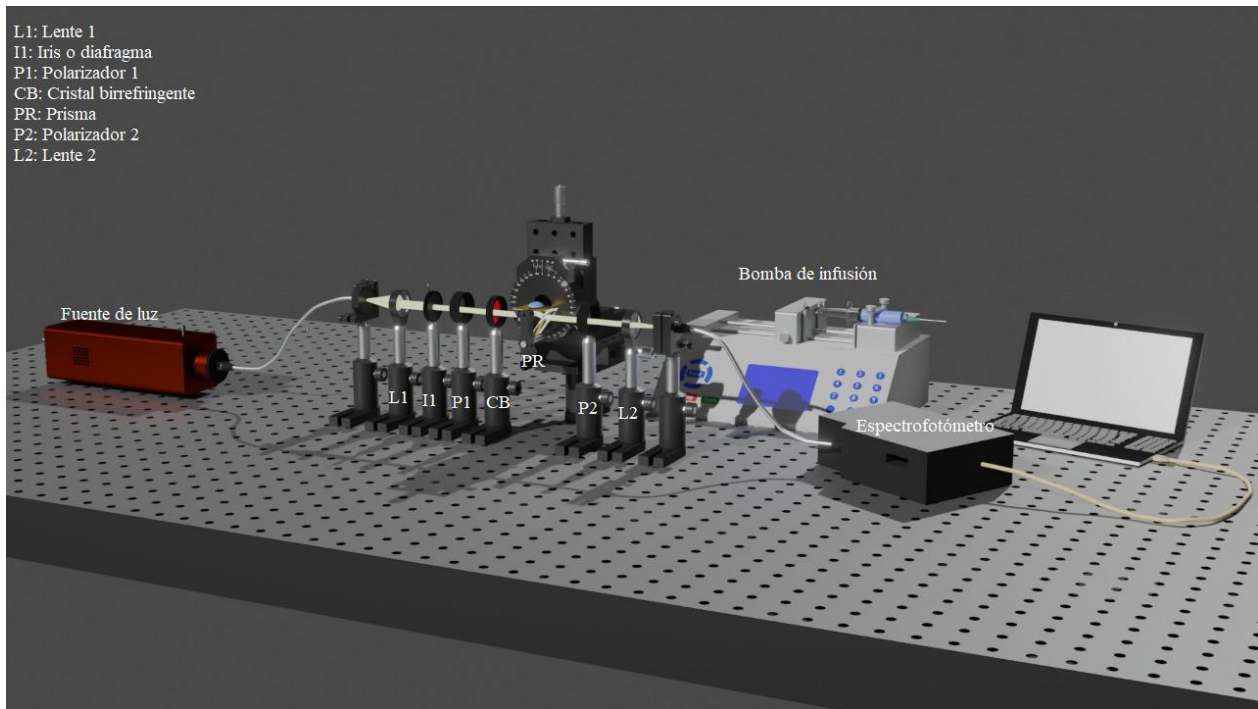
Tabla 8 Resultados para funcionalización a intervalos de tiempo cortos con agua y buffer fosfato de sodio, donde Abs, significa absorbancia, Sob. Corresponde al sobrenadante y L1, L2 y L3, hace referencia a los lavados realizados posterior al proceso de funcionalización.

Funcionalización para t= 5 min						Funcionalización para t= 30 min					
Abs referenci a Agua	Abs sob. agua	Concentración Sob. agua (nM)	Abs referencia buffer	Abs sob. buffer	Concentración Sob. buffer (nM)	Abs Referencia agua	Abs sob. Agua	Concentración Sob. agua (nM)	Abs Referencia buffer	Abs Sob. buffer	Concentración Sob. buffer (nM)
0,003	0,035	24,1 - 64,7	0,001	0,038	33,6-74,3	0,003	0,022	0 - 23,5	0,001	0,032	14,6 -55,3
Abs L1	L1		Abs L1	L1		Abs L1	L1		Abs L1	L1	
0,003	0,006	N/A	0,006	0,007	N/A	0,003	0,007	N/A	0,009	0,008	N/A
Abs L2	L2		Abs L2	L2		Abs L2	L2		Abs L2	L2	
0,003	0,006	N/A	0,002	0,006	N/A	0,003	0,005	N/A	0,005	0,006	N/A
Abs L3	L3		Abs L3	L3		Abs L3	L3		Abs L3	L3	
0,003	0,006	N/A	0,000	0,007	N/A	0,002	0,005	N/A	0,000	0,006	N/A

En la tabla 9, sombreado en color verde se muestran los resultados del proceso de funcionalización para un tiempo de 5 minutos y en azul el tiempo de 30 minutos. Se puede observar que los resultados obtenidos evidencian que la mayor adhesión de oligonucleótidos a la NF de oro se produjo en la dilución de agua libre de nucleasas en un lapso de 30 minutos, ya que, como se observa en la tabla 9, el rango de concentración del sobrenadante es de 0 nM hasta 23,5 nM, es decir que, de los 130 nM depositados inicialmente, se estarían adhiriendo en promedio el 90% de los oligonucleótidos depositados. En contraposición la menor adhesión se produjo en el buffer de fosfato de sodio a los 5 minutos con un promedio del 58.5% de adhesión. Estos resultados, finalmente indican que a pesar de que la funcionalización se hace en NFs de oro y no en NPs, como en el caso del proyecto de Qui et al, un lapso de solo 30 minutos es aceptable para la adhesión de los oligonucleótidos a la NF.

#### **4.7. Funcionalización de NFs con oligonucleótidos específicos a SARS-CoV-2 y detección en biosensor.**

Una vez que se logró determinar que la funcionalización *in situ* es posible y que incluso es un proceso en el que se obtienen mejores resultados de adhesión que el proceso de envejecimiento con sal durante toda la noche, se procedió a la funcionalización *in situ* en el biosensor (ilustración 29), con el objetivo de buscar el límite mínimo de detección de oligonucleótidos.



*Ilustración 29 Representación del arreglo experimental del biosensor SPR*

En la ilustración 29 se puede observar la representación del arreglo experimental del biosensor SPR. Inicialmente se muestra una fuente de luz que emite una onda de luz blanca que atraviesa un primer lente con el objetivo de colimar el haz de luz, posteriormente la onda atraviesa un iris o diafragma, que tiene por función limpiar impurezas del haz, lo que implica que el spot del haz se va a definir muy bien, luego el haz de luz va a pasar por un primer polarizador, con el cual se van a obtener las componentes de la onda paralela y perpendicular al plano de incidencia, que van a ser las que interfieran y den lugar a un interferograma que se verá reflejado en una interfaz gráfica, luego estas dos componentes van a atravesar un cristal birrefringente, que tiene por función introducir una diferencia de camino óptico entre las dos componentes, posteriormente estas componentes pasan a través del prisma, chocan contra la interfaz de dos medios con índice de refracción distinto, donde se genera el plasmón de

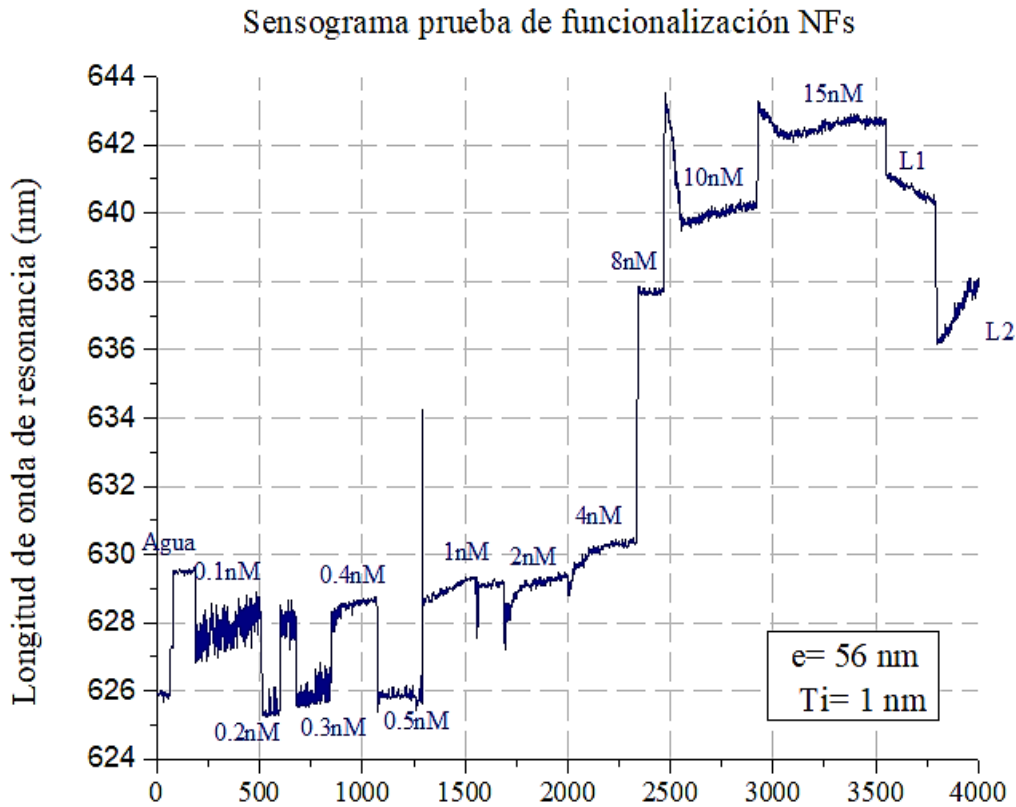
superficie, estas componentes se reflejan y pasan a través del segundo polarizador que acopla las dos componentes ondulatorias, y finalmente pasan a través del segundo lente donde llegan a una fibra óptica que esta acoplado al espectrofotómetro, en donde lo que se mide es la reflectancia obtenida en el proceso, y esta señal óptica se convierte en una señal eléctrica.

Seo y su equipo de investigación desarrollan un biosensor con láminas de grafeno y funcionalizan un anticuerpo específico contra la proteína de pico para SARS-CoV-2, evaluando la presencia del anticuerpo a través de la medición de voltajes. (Seo, y otros, 2020), por otro lado, Park y su equipo de investigación desarrollan un biosensor SPR para el diagnóstico del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), utilizando una proteína creada mediante la fusión genética de polipéptidos de unión a oro con un antígeno de superficie coronaviral del SARS, logrando una auto inmovilización en la superficie de oro sin modificación química de la superficie, pero además logrando la detección del virus en menos de 10 minutos (Park, Hyun, Lee, Lee, & Ko, 2009), así mismo Djaileb y su equipo elaboran un biosensor SPR, que detecta anticuerpos de la nucleocápside específicos contra el SARS-CoV-2, en suero humano sin diluir, la funcionalización del mismo lo realizan con un recubrimiento de una proteína recombinante de la nucleocápside del SARS-CoV-2 para detectar anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en el rango nano molar, logrando la detección del virus en un rango aproximado de 15 minutos. (Djaileb, y otros, 2020).

A pesar de que se encuentra en la literatura muchos desarrollos de biosensores SPR, solamente Qiu y su equipo de investigación, realizan un biosensor SPR fototérmico, y presentan en su informe el proceso de funcionalización en NPs de oro, mencionando que el límite de detección en el biosensor LSPR, es de 0,1 nM, y mostrando sensogramas de la funcionalización, en los cuales se evidencia que el punto de saturación es de 1.4 nM. En este proyecto de investigación, también se quiso evidenciar el proceso de adhesión de los

oligonucleótidos en tiempo real en un biosensor SPR y se encontró que para las NFs el límite de detección es mucho mayor, 2 nM, debido a que las NFs a diferencia de las NPs, tienen menor sensibilidad en el biosensor.

En la gráfica 3 se evidencia el sensograma de longitud de onda de resonancia para la primera prueba de funcionalización *in situ* en el biosensor. Dicha gráfica representa un sensograma de longitud de onda de resonancia. En el eje horizontal se encuentra graficado el tiempo transcurrido a lo largo del experimento y medido en segundos, y en el eje vertical se graficó el pico plasmónico, o lo que se conoce como longitud de onda de resonancia, que básicamente es un punto que se va desplazando hacia las longitudes de onda que tienden hacia el rojo, o hacia el azul.



Gráfica 3 Sensograma primera prueba de funcionalización con oligonucleótidos en biosensor. El espesor de la NF "e" es de 56 nm, tiene un depósito de 1 nm de titanio. Las etiquetas L1 y L2 corresponden a dos lavados posteriores a la funcionalización con agua libre de nucleasas

En la gráfica 3 se puede observar que para concentraciones por debajo de 1 nM, las detecciones realizadas en el biosensor son aparentemente ruido, ya que presentan intervalos donde se observa un desplazamiento del plasmón hacia las longitudes de onda que corresponden al rojo como en el caso de 0,1 nM y 0,4 nM, pero en otros casos como 0,2 nM y 0,5 nM se observan desplazamientos en sentido contrario, es decir un desplazamiento del plasmón en la dirección de las longitudes de onda que corresponde al azul. Sin embargo, a partir de las concentraciones 1 nM y 2 nM las mediciones son coherentes con el aumento de la concentración, esto quiere decir que a medida que aumenta la concentración, también lo hace la longitud de onda de resonancia. Por otro lado, es importante resaltar como se va moviendo el pico plasmónico de forma paulatina, lo que podría implicar que los

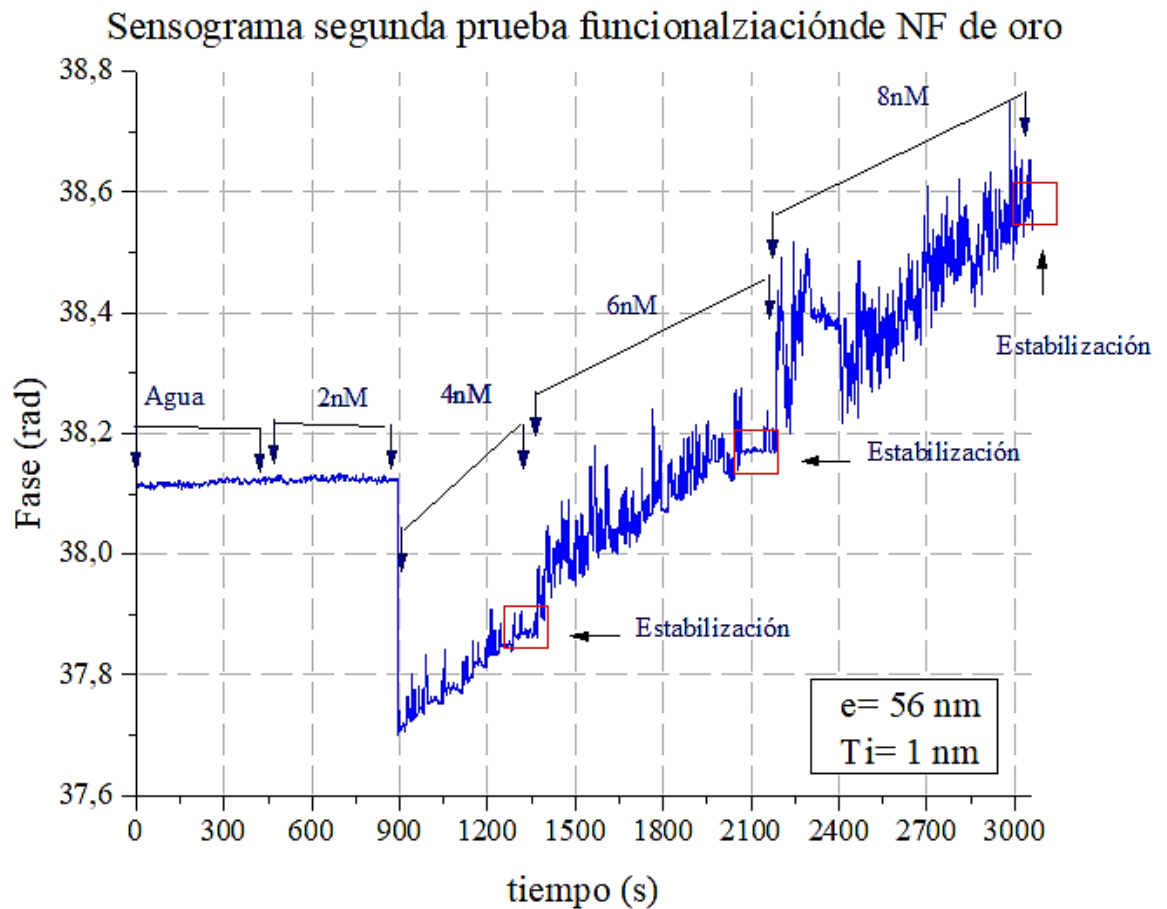
oligonucleótidos se van adhiriendo a las NFs poco a poco y esto cambia el índice de refracción, generando ese corrimiento en longitud de onda de resonancia. Sin embargo, es necesario resaltar que a los 2400 segundos cuando se realizó el depósito de la concentración con 6 nM, por error se movió la NF de oro que se ubicaba sobre el prisma, por lo que se tuvo que eliminar esta medición y no se puede afirmar con absoluta certeza que el salto que se produjo de 4 nM a 8 nM sea un efecto del cambio en la concentración o del movimiento de la NF. A pesar del error del movimiento de la película se pudo determinar que el rango de funcionalización para las NFs de oro era con concentraciones de 2 nM a 10 nM.

Por otro lado, se corrigieron algunos factores que afectaban la medición, como por ejemplo en lugar de usar micropipeta para depositar y recoger las soluciones, se usó un chip conformado por un microfluídico, la NF de oro y las mangueras para depositar y retirar la dilución (ilustración 30) y una bomba de infusión a velocidad regulada de 0,4 ml/ min y se volvió a realizar una prueba el rango de concentraciones obtenido.



*Ilustración 30 Chip usado para disminuir errores de medición en el biosensor.*

En la gráfica 3 se muestra el sensograma obtenido para la segunda medición.



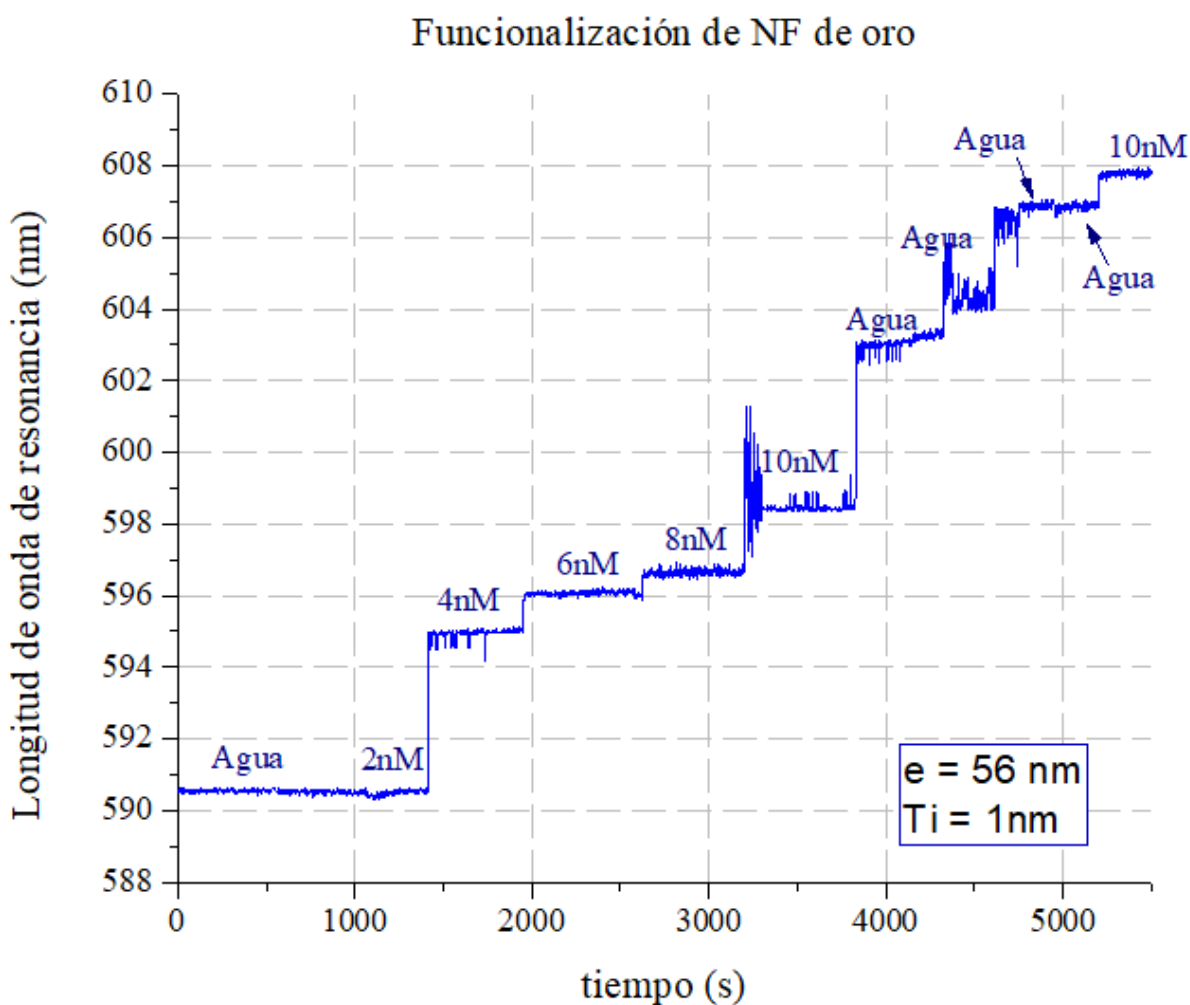
Gráfica 4 Sensograma de la segunda prueba de funcionalización en NF de oro. El espesor de la NF fue de 56 nm y se hizo un depósito de 1 nm de titanio.

En la primera prueba (gráfica 2) se presentó un sensograma de cambio de longitud de onda de resonancia del plasmón, para esta segunda prueba (gráfica 3) las diferencias que se presentaron fueron mínimas, por lo que se recurrió al sensograma de corrimiento de fase para tratar de evidenciar que cambios se estaban presentando ante las diferentes concentraciones depositadas en el chip.

Al igual que en la gráfica 2, en el sensograma de esta segunda prueba se observa que después de depositar agua y la primera solución de oligonucleótidos con una concentración de 2 nM, hay una caída para la concentración de 4 nM, y posteriormente para todas las



concentraciones depositadas el diagrama evidencia como se va funcionalizando la NF de forma gradual, lo que podría indicar que efectivamente se están adhiriendo los oligonucleótidos a la NF. Vale la pena mencionar que, en el cambio de jeringa para el depósito de la concentración de 10 nM, el chip se movió por lo que esta medida no se tuvo en cuenta en el sensograma. De igual forma se repitió tres veces la prueba, obteniendo resultados similares para la fase.



Gráfica 5 Sensograma de prueba de funcionalización corrigiendo fallos de pruebas anteriores.

Finalmente se corrigieron algunas falencias de pruebas anteriores y se obtuvo el resultado que se observa en la gráfica 5, en la que se observa como a partir del depósito de la concentración de 4 nM, en el instante de tiempo que corresponde a los 1500 segundos

aproximadamente, se empieza a desplazar el pico plasmónico hacia las longitudes de onda rojas. Vale la pena enfatizar como en cada concentración el aumento va siendo menor, lo que podría significar que los oligonucleótidos se van adhiriendo a la NF y esto va generando que cada vez el espacio para los oligonucleótidos de SARS-CoV-2 que se depositan sea menor. Sin embargo, también puede ocurrir que los oligonucleótidos se estén enlazando unos con otros, porque las concentraciones son mayores, y esto podría explicar el hecho que, al depositar agua, el pico plasmónico se siga desplazando en longitud de onda de resonancia, puesto que el agua puede “desenredar” los oligonucleótidos y estos pueden precipitarse a la NF y adherirse. El resultado anterior es uno de los más importantes, porque se puede interpretar que finalmente los oligonucleótidos de SARS-CoV-2 se están funcionalizando, adhiriéndose a la NF, que son los que finalmente a futuro, van a permitir reconocer las cadenas complementarios, dando lugar así a una prueba diagnóstica para detección del virus SARS-CoV-2.

# CAPÍTULO

# 6

---

## Conclusiones y Trabajo a Futuro

---

## 6.1. Conclusiones

- Las pruebas espectrofotométricas con DTNB permitieron establecer las bases de la funcionalización, porque se logró determinar que era posible la funcionalización de los oligonucleótidos específicos a SARS-CoV-2 y las NFs de oro *in situ*, y también a través del método de envejecimiento con sal.
- Fue posible detectar la conjugación *in situ* entre los oligonucleótidos específicos a SARS-CoV-2 y las NFs de oro en tiempo real a través de un biosensor SPR.
- A pesar de que ambos métodos de funcionalización permiten la adhesión de oligonucleótidos a las NFs de oro, el método de funcionalización *in situ* y con agua libre de nucleasas, garantiza el mayor porcentaje de adhesión.
- Se encontró que el límite de detección de oligonucleótidos específicos a SARS-CoV-2 óptimo para el biosensor en NFs de oro es de 2 nM.
- A diferencia del TE y del PBS, el agua libre de nucleasas fue el buffer más adecuado para el proceso de funcionalización de las NFs de oro.
- El límite de detección de oligonucleótidos tiolados presentes en una solución, en el lector de microplacas está por arriba del valor de 100 nM
- El depósito de titanio en las NFs de oro es necesario para la estabilidad mecánica de la NF y por tanto para el proceso de funcionalización.
- El proceso de funcionalización depende de factores como el área de la NF que se quiere funcionalizar y la cantidad de oligonucleótidos disponibles.
- Los lavados posteriores al proceso de funcionalización no indican un desprendimiento significativo de oligonucleótidos de las NFs, por tanto, buena adhesión a las NFs.
- El uso de un chip y una bomba de infusión con velocidad de flujo de 0,4 ml/ min

para el depósito de oligonucleótidos en el biosensor le da mayor estabilidad al proceso de funcionalización y reduce los errores en el proceso de medición.

## **6.2. Trabajo a futuro**

- Determinar de qué forma se están adhiriendo los oligonucleótidos a las NFs de oro, a través de la detección de la sonda complementaria en el biosensor.
- Realizar pruebas de diluciones con oligonucleótidos con DTT, para los buffers de agua libre de nucleasas y TE, para mejorar la estabilidad del tiol.
- Probar la eficiencia de la funcionalización en el biosensor, con sondas complementarias diferentes a las secuencias del SARS-CoV-2.
- Comprobar si la temperatura es un factor decisivo para el proceso de funcionalización en el biosensor SPR
- Probar si sustancias como el 6-mercapto-1-hexanol son sustancias que favorecen la mejor orientación de los oligonucleótidos sobre las NFs de oro.
- Comprobar si a mayor concentración de oligonucleótidos en una dilución las cadenas de ADN o los grupos funcionales tioles se enlazan.

## Bibliografía

- Al-Qahtani, A. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Emergency, history, basic and clinical aspects. *Saudi J Biol Sci*, 2531-2538.
- Alquist, P. (2002). RNA-dependent RNA polymerases, viruses and RNA silencing . *Science*, 1270-1273.
- ATCC. (2019). (4TI ATCC CRL-2539). Retrieved from <https://www.atcc.org/products/all/CRL-2539.aspx#documentation>
- Banks, J., Yu, T., & Yu, Z. (2002). Direct Visualization of the Hydrolysis Kinetics of Titanium(IV) Alkoxides on Functionalized Gold Surfaces. *The journal of physycal chemistry*.
- Beards, G. (2017). Micrografía electrónica de dos coronavirus.
- Brody, L. (2020, 10). *National Human Genome Research Institute* . Retrieved from Nucleótido : <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Nucleotido>
- Canazas, A. (2015). simulation of point mutation in the DNA replication.
- Ceretti, H. (2016, febrero 26). Modificación de superficies de oro con oligonucleótidos para la detección de moléculas pequeñas .
- Chargaff, E., Zamenhof, S., & Green, C. (1950). Composition of human desxypentose nucleic acid. *Nature*, 756-757.
- Chen, s., Wu, V., Chuang, Y., & Lin, C. (2008). Using oligonucleotide-functionalized Au nanoparticles to rapidly detect foodborne pathogenes on a piezoelectric biosensor. *Journal of microbiological methods* , 7-17.
- Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication and pathogenesis . *Natural Sciences* .
- ChileBio . (2018 ). *La estructura del ADN, los genes y el código genético*. Retrieved from <https://www.chilebio.cl/el-adn-los-genes-y-el-codigo-genetico/>
- Consejo general de colegios farmacéuticos. (2020). *Coronavirus: Covid-19 informe técnico*. Farmacéuticos .
- Corman, M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D., & Bleicker, T. (2020). Detection

- of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 25-3.
- Corthey, G. (2012). Estudio de interfases, metal-tiol en superficies planas y nanopartículas. *Tesis de doctorado*. La plata, Argentina.
- Cymit. (2021). *cymit química*. Retrieved from 3 mercaptopropionic acid:  
<https://cymitquimica.com/products/7W-GM5666/107-96-0/3-mercaptopropionic-acid/>
- Dahlin, A., Tegenfeldt, J., & Hook, f. (2006). Improving the instrumental resolution of sensors based on localized surface plasmon resonance . *Analytical Chemistry* , 4416-4423.
- Dahlin, A., Wittenberg, N., & Hook, F. (2013). Promises and Challenge of nanoplasmonic devices for refractometric biosensing. *Nanophotonics*, 83-101.
- Díaz, N., Bárcena, A., E, F., Galván, A., & Novo, J. (2010). Espectrofotometría; Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas.
- Djaileb, A., Charron, B., Hojjat, M., Thibault, V., Coutu, J., Stevenson, K., . . . Masson, J. (2020). A rapid and quantitative serum test for SARS-CoV-2. *Analytical Chemistry* .
- Docherty, A., Harrison, E., Green, C., Hardwick, H., Pius, R., Norman, L., . . . Carson, G. (2020). features of 20133 UK patients in hospital with COVID-19 using the ISARIC WHO, clinical characterisation protocol: prospective observational cohort study. *The BMJ: Leading Medical Research, News, Education, Opinion*.
- Englebienne, P. (1998). Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes. *Royal society of chemistry*, 1599-1603.
- Espinoza, Y. (2013, Abril). Automatización de un sistema de resonancia de plasmones de superficie para una medición de índice de refracción.
- Gill, R., Göeken, K., & Subramanian, V. (2013). Fast, single-step and surfactant-free oligonucleotide modification of gold nanoparticles using DNA with a positively charged tail. *C royal of chemistry* , 11400-11402.
- Glynou, K., Ioannou, P., Christopoulos, T., & Syriopoulou, V. (2003). Oligonucleotide-functionalized

- gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for DNA analysis by hybridization. *Anal. Chem.*, 4155-60.
- Gregory, R. (2018). *Ellman's assay for in-solution quantification*. Retrieved from BMG-LAB TECH: <https://www.bmglabtech.com/ellmans-assay-for-in-solution-quantification-of-sulfhydryl-groups/>
- Guan, W., Ni, Z., Hu, Y. L., Ou, C., He, J., & Liu, L. (2020). Clinical characteristics of 2019 novel coronavirus infection in china . *medRxiv*.
- Guel, M., López, L., & Galindo, A. (2012). Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas* , 9-18.
- Hoffman, M., & otros, y. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically- proven protease inhibitor . *Journal pre-proof*.
- Horton, H., & otros, y. (2008 ). *Principios de bioquímica* . Pearson Prentice Hall.
- Jeffery, D. (2016). Spotlight on varietal thiols and precursors in grapes and wines. *Australian Journal of Chemistry* .
- Kummer, K., Vyalikh, V., Gavril, G., Kade, A., & Jech, M. (2008). High Resolution photoelectron spectroscopy of self-assembled mercaptohexanol monolayers on gold surface. *Journal of Electron Spectroscopy and*, 59-64.
- Lavandero, S. (2020, mayo 29). ¿Cómo ingresa y actúa el SARS-CoV-2 en nuestro cuerpo? Chile.
- Li, Y., Wark, A., Lee, H., & Corn, R. (2006 ). Single nucleotide polymorphism genotyping by nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance imaging measurements of surface ligation reactions . *Anal. chem*, 3158-3164.
- López, G. (2018, octubre). Simple and low cost nanostructured plasmonic biosensors for sensitive and multiplexed biodetection. Barcelona .
- Maha, A., D, K., M, P., & Dipanjan. (2020). Rapid, Ultrasensitive, and Quantitative Detection of SARS-CoV-2 Using Antisense Oligonucleotides Directed Electrochemical Biosensor Chip. *ACS nano*.
- Mauriz, E. (2020). Recent Progress in Plasmonic Biosensing Schemes for. *Sensors* .
- Mousavizadeh, L., & Ghasemi, S. (2021). Genotype and fenotype of COVID 19: Their role in



- Pathogenesis. *Journal of microbiology, immunology and infection* , 159-163.
- Nusz, G., Curry, A., Marinakos, S., Wax, A., & Chilkoti, A. (2009). Rational Selection of Gold Nanorod Geometry for Label-free Plasmonic Biosensor. *Acs Nano*, 795-806.
- Nusz, J., Curry, A., Marinakos, S., Wax, A., & Chilkoti, A. (2009). Rational selection of gold nanorod geometry for label-free plasmonic biosensor. *ACS nano*, 795-806.
- Ocronos. (2020, 09 15). *Ocronos - Editorial Científico-Técnica*. Retrieved from virus-influenza-H1N1-servicios-urgencias: <https://revistamedica.com/manejo-virus-influenza-h1n1-servicios-urgencias/virus-influenza-h1n1-servicios-urgencias/>
- Parikshit, M., Maha, A., Ketan, D., Matthew, B. F., & Dipanjan, P. (2020 ). Selective Naked-Eye Detection of SARS-CoV-2 Mediated by N Gene Targeted Antisense Oligonucleotide Capped Plasmonic Nanoparticles. *ACS nano*, 7617-7627.
- Park, T., Hyun, M., Lee, H., Lee, S., & Ko, S. (2009). A self-assembled fusion protein-based surface plasmon resonance biosensor for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *talanta*.
- Peltomaa, R., Martínez, B., Peña, E., & Moreno-Bondi, M. (2018). Optical biosensors for labels-free detection of small molecules . *Sensors* .
- Qiu, G., Gai, Z., Tao, Y., Schmitt, J., Ublick, G., & J, W. (2020). Dual-Functional Plasmonic Photothermal Biosensors for Highly Accurate Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Detection. *ACS nano*, 5268-77.
- Ramírez, N. (2005). Biosensores: un acercamiento a la resonancia de plasmón superficial . *Revista CENIC, ciencias biológicas* .
- Regatos, D. (2012, febrero ). Biosensores ópticos de alta sensibilidad basados en técnicas de modulación plasmónica. Barcelona .
- Rivera, J., Aldama, W., & Mejía, E. (2016). Amplitud fotoacústica en función de la concentración de coloides con nanopartículas de oro obtenidos por ablación laser. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 77-89.
- Scanlon, M., Smirnov, E., Stockman, J., & Peljo, P. (2018). Gold nanofilms at liquid-liquid interfaces: An

emerging platform for redox electrocatalysis, nanoplasmonic sensors, and electrovariable optics. *Chemical Reviews*, 3722-3751.

Seo, G., Lee, G., Kim, M., Baek, S., Choi, M., Bon Ku, K., . . . Jun, S. (2020). Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. *American Chemical Society* , 5135-5142.

Sigma-Aldrich. (2021). *Merck*. Retrieved from 3-Mercaptopropionic acid:

[https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/aldrich/m5801?gclid=Cj0KCQjwIMaGBhD3ARIsAPvWd6iaJbLMW2OeTAtYHx7BYinqJfrbxx2a9peGCMANVikYEX6jNVVXBw0aAgGsEALw\\_wcB#](https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/aldrich/m5801?gclid=Cj0KCQjwIMaGBhD3ARIsAPvWd6iaJbLMW2OeTAtYHx7BYinqJfrbxx2a9peGCMANVikYEX6jNVVXBw0aAgGsEALw_wcB#)

Soto, G. (2020 ). Presencia y expresión del receptor ACE 2 (Target de SARS-Cov-2) en tejidos humanos y cavidad oral. Posibles rutas de infección en órganos orales. *International journal of odontostomatology* .

Tantra, R. (2016). *Nanomaterial Characterization An Introduction* . Chennai : WILEY.

ThermoFisher scientific . (2019, 09 19). *What is an Oligo?* Retrieved from

<https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/what-is-an-oligo/>

Thirumalaisamy, P., & Meyer, C. (2020). The covid 19 epidemic. *Tropical Medicine International Health*, 278-280.

Tiwari, P., Vig, K., Dennis, V., & Singh, S. (2011). Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomaterials* , 31-63.

Toledo, M. (2020). *What is Oligonucleotide Synthesis?* Retrieved from

<https://www.youtube.com/watch?v=kjSojZWnPQ4>

Toubanaki, D., & Karagouni, E. (2016). Oligonucleotide-conjugated gold nanoparticles for application on lateral flow biosensors: evaluation and optimization of low pH and salt-angng conjugation methods. *Analytical letters* , 1-32.

Turell, L., Vitturi, D., Cotiño, E., Lebrato, L., Moller, M., & Sagasti, C. (2017 ). The chemical basis of thiol addition to nitro-conjugated linoleic acid, a protective cell-signaling lipid. *Journal of*

*biological chemistry*, 1145-1159.

Vecteezy . (2021). *Vecteezy*. Retrieved from <https://es.vecteezy.com/arte-vectorial/1025344-primer-plano-de-diferentes-tipos-de-virus>

Velavan, T., & Meyer, C. (2020). The COVID-19 epidemic. . *Tropical medicine & international health* , 278-280.

World Health Organization . (2021). *Covid-19 weekly epidemiological update* .

Xiao, A., Tong, Y., & Zhang, S. (2020). profile of RT-PCR for SARS-CoV-2: A preliminary study from 56 covid-19 patients . *Clinical Infections Diseases* , 2249-51.

Yuki, K., Fujiogi, M., & Koutsogiannaki, S. (2020). COVID-19 pathophysiology: A review. *Clinical Immunology*, 2-7.

Zhou, P., Yang, X., & Shi, Z. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *nature*, 270-273.