



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA
AVANZADA**

**DESARROLLO DE UN SOPORTE BASADO EN
POLÍMEROS CONDUCTORES PARA CAPTURA DE
ANTICUERPOS ASOCIADOS CON TUBERCULOSIS
PARA SU USO EN BIOSENSORES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN TECNOLOGÍA

P R E S E N T A :

MIGUEL ÁNGEL ARROYO ORNELAS

DIRECTORES DE TESIS:

**DRA. MA. CONCEPCIÓN ARENAS ARROCENA
ENES UNIDAD LEÓN, UNAM
DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN
CFATA, UNAM**



JURIQUILLA, QUERÉTARO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE
MÉXICO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA LICENCIATURA EN TECNOLOGÍA

Votos Aprobatorios

COMITÉ ACADÉMICO
Licenciatura en Tecnología
PRESENTE

En cumplimiento del Artículo 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis con título **Desarrollo de un soporte basado en polímeros conductores para captura de anticuerpos asociados con tuberculosis para su uso en biosensores**, que realizó el pasante **Arroyo Ornelas Miguel Ángel**, con número de cuenta: **40901488-0**, bajo la opción de titulación por Tesis y Examen profesional en la carrera de Licenciatura en Tecnología.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Campus UNAM-Juriquilla, Qro a 26 de Mayo de 2014

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Pedro Salas Castillo	
SECRETARIO	Dra. Ma. Concepción Arenas Arrocena	
VOCAL	Dr. Mathieu Hautefeuille	
1er. SUPLENTE	Dra. Luz María López Marín	
2º SUPLENTE	Dra. Blanca Edith Millán Chiu	

A mi mamá Alicia Ornelas Valadez por su apoyo incondicional.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Dra. Ma. Concepción Arenas Arrocena, la Dra. Luz María López Marín y el Dr. Víctor Castaño Meneses por aceptarme en el proyecto que inspiro el presente trabajo, por su valiosa contribución en mi formación académica y por su constante ayuda.

Agradezco a Teresa Gómez Quintero, por la confianza y apoyo que me ha otorgado, y por su colaboración durante la realización del presente trabajo.

Quiero agradecer especialmente a mi mamá Alicia Ornelas Valadez quien me alentó a continuar estudiando, ha sido un ejemplo de trabajo constante y me ha brindado su apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, RR181512-IB101512 “Desarrollo de polímeros semiconductores y nanocristales inorgánicos para obtener compuestos híbridos fotovoltaicos”. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Agradecimiento al Conacyt por el financiamiento otorgado para el desarrollo de este trabajo de tesis, a través del proyecto SEP-CONACyT CB176450

Agradecimiento por su apoyo técnico a:

El Dr. Domingo Rangel Miranda, el Dr. Fernando Ramírez, el Tec. Daniel Mondragón y a la Mtra. María Guadalupe Delgado.

Índice general

Agradecimientos	vi
Resumen	5
Abstract	7
1. Introducción	9
1.1. Sobre la tuberculosis	9
1.2. Métodos actuales para el diagnóstico de tuberculosis	13
1.3. Biosensores	17
1.3.1. Principales biosensores desarrollados para el diagnóstico de TB	23
1.4. Técnicas electroquímicas	26
1.4.1. Cronoamperometría	28
1.4.2. Voltametría cíclica	29
1.4.3. Espectroscopia de impedancia electroquímica	32
1.5. Polímeros conductores como soporte para biosensores	39
1.5.1. Polianilina	42
1.5.2. Polipirrol	45
2. Justificación	48
3. Hipótesis	49

4. Objetivos	50
4.1. Objetivo general	50
4.2. Objetivos específicos	50
5. Estrategia experimental	51
5.1. Sistema a desarrollar	51
5.2. Diagrama experimental	52
6. Materiales y métodos	55
6.1. Síntesis de polímeros conductores	55
6.1.1. Síntesis química de polianilina	55
6.1.2. Síntesis electroquímica de polianilina	56
6.1.3. Síntesis electroquímica de polipirrol	57
6.2. Obtención de DAT y suero hiperinmune de conejo	58
6.2.1. Purificación del antígeno DAT	58
6.2.2. Inmunoensayo de bioactividad del suero hiperinmune-DAT . .	61
6.3. Inmunoensayos sobre películas de polímeros conductores	62
6.3.1. Determinación de la cantidad óptima de DAT	62
6.3.2. Inmunoensayo con sueros de conejos	63
6.3.3. Inmunoensayos con sueros humanos	64
6.4. Inmunoensayo con espectroscopia de impedancia electroquímica . . .	65
6.5. Inmunoensayo electroquímico con anticuerpos secundarios conjugados a HRP	66
7. Resultados y discusión	69
7.1. Obtención del antígeno DAT y suero hiperinmune	69
7.1.1. Cromatografía en capa fina (CCF)	69
7.1.2. Control de calidad de los inmunoreactivos	72
7.2. Resultados del soporte basado en PANi	73
7.2.1. Voltametría cíclica para síntesis de películas de polianilina . .	73
7.2.2. Determinación de la cantidad óptima de DAT para los inmu- noensayos sobre polímeros conductores	74

7.2.3.	Inmunoensayo con suero de conejo sobre PANi	76
7.2.4.	Inmunoensayo con sueros humanos sobre PANi	78
7.2.5.	Ensayo EIS sobre PANi	80
7.2.6.	Modelo de circuito eléctrico del soporte basado en PANi	82
7.2.7.	Análisis de impedancias obtenidas de la EIS para PANi	85
7.3.	Resultados del soporte basado en PPy	86
7.3.1.	Voltametría cíclica para síntesis de películas de polipirrol	86
7.3.2.	Inmunoensayo con suero de conejo sobre PPy	87
7.3.3.	Inmunoensayo con suero de humano sobre PPy	88
7.3.4.	Ensayo EIS sobre PPy 30 KHz a 0.3 Hz	89
7.3.5.	Ensayo EIS sobre PPy 100 KHz a 0.1 Hz	91
7.3.6.	Modelo de circuito eléctrico del soporte basado en PPy	93
7.3.7.	Análisis de impedancias obtenidas de la EIS para PPy	98
7.4.	Ensayo electroquímico de cronoamperometría con anticuerpos conjugados a HRP	99
8.	Conclusiones	103
	Apéndices	105
	Preparación de soluciones	105
	Solución de relleno de electrodo Ag/AgCl	105
	Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)	105
	Solución de albúmina de suero bovino (BSA)	106
	Solución amortiguadora dietanolamina (DEA)	106

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad altamente infecciosa y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) está entre las primeras diez causas de muerte; aproximadamente una de cada tres personas en el mundo la presentan en su forma latente. Uno de los principales problemas para controlar la propagación de esta enfermedad es la falta de un sistema de diagnóstico oportuno.

Los biosensores son sistemas desarrollados para detectar la presencia de sustancias orgánicas a través de un sistema de transducción. Una de las mejores opciones para transducir señales es por medio métodos electroquímicos, debido a su bajo costo y buena sensibilidad. Pueden ser usados para capturar y medir biomoléculas características de determinadas enfermedades para realizar un diagnóstico.

Los polímeros conductores son compuestos orgánicos que presentan alta conductividad eléctrica, son fáciles de sintetizar, son asequibles y tienen afinidad por diferentes biomoléculas, por estas características son materiales ideales para la construcción de biosensores.

En el presente trabajo se presenta el desarrollo de una plataforma para inmovilización de antígenos. El sistema construido fue un biosensor del tipo electroquímico para la detección de anticuerpos contra 2,3-Di-*O*-acil-trealosa (2,3-DAT). La plataforma para la inmovilización del 2,3-DAT, un antígeno altamente asociado a infecciones por *M. tuberculosis* fue utilizada para capturar satisfactoriamente los anticuerpos en suero y las mediciones se realizaron electroquímicamente. El sistema se construyó usando los polímeros conductores polianilina y polipirrol como sustratos; las técnicas de espectroscopia de impedancia electroquímica y voltametría cíclica se utilizaron para la caracterización del soporte y la detección de anticuerpos.

Abstract

Tuberculosis is a highly infectious disease. According to the World Health Organization (WHO), it is one of the top ten causes of death in the world; approximately one third of the world population has been infected with the causative agent of the disease, *Mycobacterium tuberculosis*. One of the main problems to control the propagation of this disease is the absence of an appropriate diagnostic system.

Biosensors are systems developed to detect organic substances by means of a transduction system. One of the most practical system for transducing signals in biosensors is through electrochemical measurement due to low cost and good sensibility. This can be used for capture and measurement of biomolecules that are characteristic of certain disease for a diagnostic.

Conducting polymers are organic compounds that present high electric conductivity, are easy to synthesize, are affordable and have high affinity for biomolecules, for all of this characteristics these are ideal materials for the construction of biosensors.

In this work, the develop of a platform for antigen immobilization is presented. The system was constructed for its use as an electrochemical biosensor for the detection of antibodies against 2,3-Di-*O*-acyl-trehalose (2,3-DAT).The platform for the immobilization of 2,3-DAT, a highly specific antigen associated to *M. tuberculosis* infections, was successfully used to capture antibodies in serum and it was measured by means of electrochemical measurements. The system was constructed using the conducting polymers polyaniline and polypyrrole as substrates; the techniques of electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltametry were used for the characterization of the support and the detection of antibodies.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Sobre la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad altamente infecciosa provocada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Este bacilo se aloja principalmente en los pulmones aunque también puede afectar otros órganos. En pacientes con un sistema inmune normal la bacteria puede ser controlada y en algunos casos permanece en estado latente; en el caso de pacientes con una deficiencia en su sistema inmune, por ejemplo personas que padecen diabetes o infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el bacilo puede proliferar y causar enfermedad, lo cual se le conoce como estado activo de la infección. Algunos síntomas característicos de la enfermedad son fiebre, cansancio excesivo, tos persistente y pérdida de peso. Dos terceras partes de las personas infectadas con tuberculosis que no se diagnostican a tiempo y que no son atendidas fallecen por las complicaciones de la enfermedad.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) [1], *M. tuberculosis* es el agente bacteriano que más personas mata en el mundo. La mayoría de los casos de TB ocurren en países en vías de desarrollo. Aproximadamente un tercio de la población total del mundo está infectada con la forma latente de esta enfermedad, es decir que poseen la bacteria pero no presentan síntomas ni pueden transmitirla.

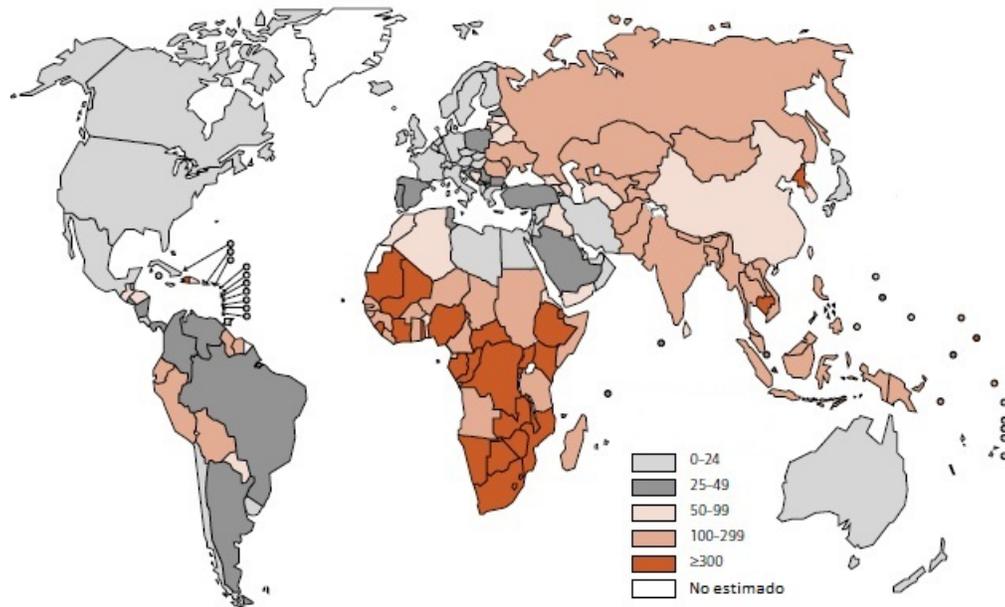


Figura 1.1: Mapa de casos estimados de TB en el mundo por cada 100,000 habitantes. (Organización mundial de la salud (OMS), 2012 [1])

Existe una relación importante entre personas infectadas con VIH en fase de SIDA y el desarrollo de TB activa, ya que esta última es favorecida ante el debilitamiento del sistema inmune; el tabaquismo en adultos y la desnutrición en niños son otros factores importantes que afectan el sistema inmune y permiten que la enfermedad se desarrolle. En México, de acuerdo con los registros sanitarios, en el 2010 se reportaron 15,384 nuevos casos de TB pulmonar y 1,827 defunciones, lo cual corresponde a un promedio de 42 nuevos casos y 5 muertes cada día. En la figura 1.1 se pueden observar los casos estimados de TB por cada 100,000 habitantes en distintos países.

En la figura 1.2, se puede observar el ciclo de infección de la bacteria que causa la tuberculosis. La transmisión de la enfermedad se da principalmente por vía aérea. Cuando una persona infectada con TB activa expulsa pequeñas partículas cuando habla, estornuda o tose, estas pueden permanecer mucho tiempo en el aire, donde otra persona puede absorberlas al respirar y la bacteria llegará de esta forma a sus

pulmones; este método de contagio es lo que hace a la tuberculosis tan infecciosa. Cuando el bacilo se encuentra dentro del huésped, existe una primer respuesta inmune del organismo que detecta el patógeno; los macrófagos acuden al sitio de infección para combatir a la bacteria y encapsularla en su interior para destruirla; la mayoría de las veces el bacilo puede sobrevivir al interior del macrófago y permanecer ahí de forma latente hasta que el sistema inmune se debilite y pase al estado de TB activa. El estado de latencia es uno de los principales problemas para controlar esta enfermedad, ya que el paciente durante esta fase no presenta síntomas. Cuando pasa a la fase activa se puede confundir con otra enfermedad, como una simple tos o resfriado. En este caso la persona generalmente no toma los cuidados adecuados, lo que la convierte en importante foco de infección. Se calcula que mientras no es tratada, una persona con TB activa puede infectar entre 10 y 15 personas al año.

Actualmente uno de los métodos más usados para el control de la epidemia de tuberculosis es la aplicación de la vacuna *Bacillus de Calmette y Guérin (BCG)*, la cual corresponde a una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*. La vacuna es eficiente en variedades graves de tuberculosis en niños, como la meningitis tuberculosa y miliar. Sin embargo, para tuberculosis pulmonar en niños y adultos tiene un rango de eficacia muy variable que va del 0 al 80% [2]; aunque esta vacuna ha permitido controlar el contagio a niveles masivos, no garantiza la protección contra la enfermedad y año con año hay nuevos brotes de TB.

En la mayoría de los casos la tuberculosis tratada oportunamente es curable; sin embargo se han descubierto algunas cepas que tienen resistencia a los medicamentos más usados en el mundo, como son la isoniacida y la rifampicina, que actualmente representan el tratamiento más efectivo contra la TB; a la variante resistente de *M. tuberculosis* se le clasifica como *TB con multiresistencia a drogas (MDR-TB)*. Existe otra variante llamada *tuberculosis con resistencia extendida a drogas (XDR-TB)*, la cual además de ser resistente a los medicamentos mencionados anteriormente, tiene resistencia a quinolonas y a antibióticos inyectados como amikacina, capreomicina y kanamicina; utilizados para tratar la MDR-TB. En el 2006 se reportaron 4 casos en

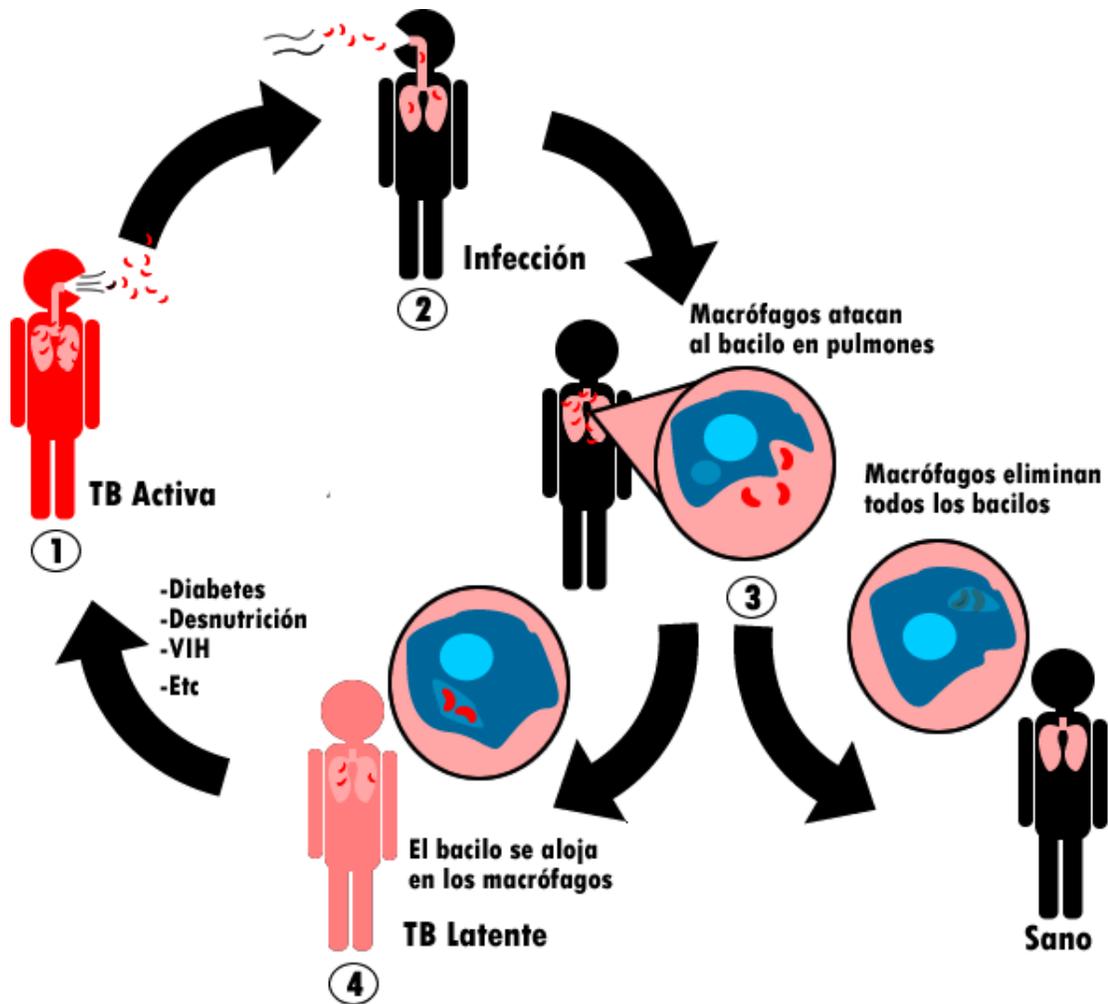


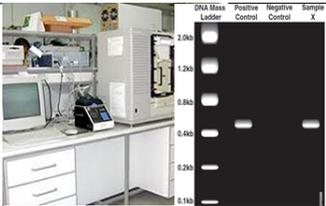
Figura 1.2: Ciclo de infección de *M. tuberculosis*. 1. Un individuo con tuberculosis activa estornuda o tose y expulsa partículas que contienen al bacilo. 2. Una persona sana, al respirar puede absorber la bacteria la cual se aloja en los pulmones. 3. El sistema inmune identifica al agente patógeno y acuden macrófagos para eliminar el bacilo, si logran eliminarlo correctamente el paciente estará sano; sin embargo el bacilo en ocasiones puede permanecer inactivo dentro del macrófago. 4. El individuo tiene tuberculosis latente; puede volverse activa la función del sistema inmune se torna deficiente.

Irán de una nueva variante de TB denominada *tuberculosis totalmente resistente a drogas (TDR-TB)*. Como su nombre lo indica esta cepa no responde ante ninguno de los medicamentos mencionados anteriormente para el tratamiento; en enero de 2012, en India se reportaron 12 casos de personas que presentaban esta cepa [3], la presencia de esta variante en India es alarmante ya que es el país con mayor número de casos *MDR-TB* sin controlar, aproximadamente 100,000 infectados; las autoridades sanitarias de ese país admiten no tener la infraestructura necesaria para diagnosticar y tratar a estos pacientes. Cabe destacar que estas variantes aumentan exponencialmente la mortalidad y el costo de los tratamientos. En el caso de una epidemia, no solo en India sino en el resto de países en desarrollo, donde se reporta el mayor número de casos de TB, los sistemas de salud podrían colapsar por el potencial crecimiento de la enfermedad. Ante este panorama, un punto crítico para lograr controlar esta epidemia es el diagnóstico oportuno de personas con TB activa.

1.2. Métodos actuales para el diagnóstico de tuberculosis

En el cuadro 1.1, se pueden observar las diferencias en tiempo, precio y precisión de los principales métodos de detección usados en la actualidad. La variación del precio es debido a las regiones donde se realiza el análisis, por el costo de personal y reactivos; la variación en el caso del cultivo es por el tiempo que puede durar el ensayo, si aparecen bacilos en el cultivo, la muestra se considera sospechosa y se continúa el cultivo hasta por 4 semanas para confirmar la presencia de *M. tuberculosis*. Es notable que casi todos los métodos requieren varias visitas del paciente al consultorio, lo cual es una gran limitante, sobre todo en zonas rurales o con pocas vías de comunicación.

Cuadro 1.1: Principales métodos utilizados en la actualidad para el diagnóstico de TB, 2010 [1].

Método	Imagen	Costo(Dls)	Precisión	Tiempo /Visitas
Microscopía de esputo		0.2 - 5	Media	1 Día 2-5
Cultivo		18-2700	Muy Alta	1-4 Semanas 2-3
Secuenciación de ADN		40-67	Alta	1-2 Días 2
Radiografía		20-100 Dls	Baja	1 Días 1-2

Uno de los principales métodos para el diagnóstico rápido de la TB es por medio de la microscopía del esputo del paciente [4]. Esta se realiza tomando una muestra del fluido que es expulsado cuando el paciente tiene una tos profunda, la muestra es tratada para teñir a la bacteria y es examinada al microscopio para buscar a la bacteria que aparece como un bastón alargado de aproximadamente $5 \times 0.5 \mu\text{m}$; cabe destacar que es necesario un estricto control de calidad del procedimiento para prevenir la contaminación cruzada y resultados falsos; aunque es un método relativamente rápido y con una buena precisión, hay factores que influyen en la reproducibilidad de los resultados como son: la experiencia de la persona que examina la muestra, el agente que se usa para teñir a la bacteria, el tipo de microscopio, el tipo de cepa examinada y la edad del paciente; aproximadamente el 30 % de los pacientes, principalmente en niños no pueden producir el esputo requerido para este análisis.

El cultivo de *Mycobacterium* es el procedimiento estándar a nivel mundial para obtener mayor precisión en la detección de la TB. Este suele usarse una vez que se sospecha de la infección después de una toma de esputo. El proceso consiste en tomar una muestra del fluido del paciente (de origen respiratorio: esputo, lavado bronquial o broncoalveolar; de origen no respiratorio: sangre, orina, médula osea, etc.) que posteriormente se cultiva en una placa con medio (Lowenstein Jensen). La sensibilidad de este método es tan alta que puede detectar hasta 10 bacilos/mL (límite de detección). El problema es que se requiere entre 1 y 4 semanas para verificar la presencia del microorganismo en el cultivo; además se requiere un laboratorio de bioseguridad tipo 3. Adicionalmente, el personal debe estar entrenado en el manejo de agentes infecciosos por el peligro que representa trabajar con *M.tuberculosis*. Este tipo de laboratorio requiere de equipamiento especializado de alto costo, lo que limita su acceso en países en vías de desarrollo, que son los que tienen mayores índices de morbilidad.

El proceso estándar para la identificación de diferentes cepas de *M.tuberculosis* es por medio de la secuenciación de ácidos nucleicos [5], principalmente con la secuenciación de la región 16S rDNA. Se han creado kits para automatizar y estandarizar

el proceso de análisis por este medio, lo que ha permitido identificar múltiples cepas. Uno de los principales problemas del método de diagnóstico es que algunas especies de micobacteria no son identificables con la secuencia 16S, además tiene un costo relativamente elevado para ser un sistema generalizado de análisis.

Otro método de diagnóstico es la prueba con derivado proteico purificado (PPD) tuberculina. El examen consiste en inyectar en la piel del paciente un derivado de antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*; durante la prueba se genera una pápula por la reacción inmune del cuerpo que se mide durante las primeras 24, 48 y 72 horas (dependiendo del contacto que el paciente haya tenido con la bacteria será el tamaño de la pápula). La prueba es muy inespecífica, ya que tiende a dar falsos positivos en personas que han recibido la vacuna BCG incluso muchos años después de la vacunación [6], además los resultados solo indican que el paciente ha tenido contacto con la bacteria y no que esté enfermo.

El uso de rayos X, para obtener una radiografía de los pulmones, es otro de los métodos más usados en el diagnóstico; algunas personas infectadas presentan lesiones pulmonares en forma de cavidades, estas se pueden observar como manchas oscuras en la radiografía [7]. El examen también es inespecífico, ya que solo permite detectar TB pulmonar y puede confundirse con otras enfermedades pulmonares, otra desventaja es que requiere el uso de una máquina de rayos X, la cual es poco asequible.

La OMS estipula que para obtener un control exitoso de enfermedades infecciosas en países pobres y en vías de desarrollo, se deben desarrollar sistemas y dispositivos 'ASSURED', el acrónimo que por sus siglas en inglés es: asequibles, sensible, específicos, amigables al usuario, rápidos/robustos, libres de la necesidad de equipamiento y con fácil disponibilidad. Se estima que de obtenerse un sistema con una sensibilidad del 85 %, se podrían salvar aproximadamente 400,000 vidas cada año. Idealmente el sistema de diagnóstico no debe requerir instalaciones eléctricas, refrigeración, acceso a agua limpia, ni personal entrenado y se deben obtener los resultados en alrededor de una hora [8].

1.3. Biosensores

Los biosensores son dispositivos analíticos que permiten principalmente la detección y cuantificación de elementos de origen biológico como enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos, lípidos, proteínas, etc. La figura 1.3 muestra el funcionamiento general de un biosensor, la muestra de interés se hace pasar sobre un bioreceptor, este puede ser, por ejemplo, un sustrato que contenga un ligando o un elemento que reaccione con la sustancia de interés. Usando uno o varios elementos de transducción se obtiene una señal eléctrica que es amplificada y acondicionada a través de componentes electrónicos. Finalmente la cuantificación del analito se muestra al usuario a través de un elemento de interfase como puede ser una pantalla. Quizás el ejemplo más popular de un biosensor son los sistemas caseros para la cuantificación de glucosa en sangre y las pruebas de embarazo caseras.

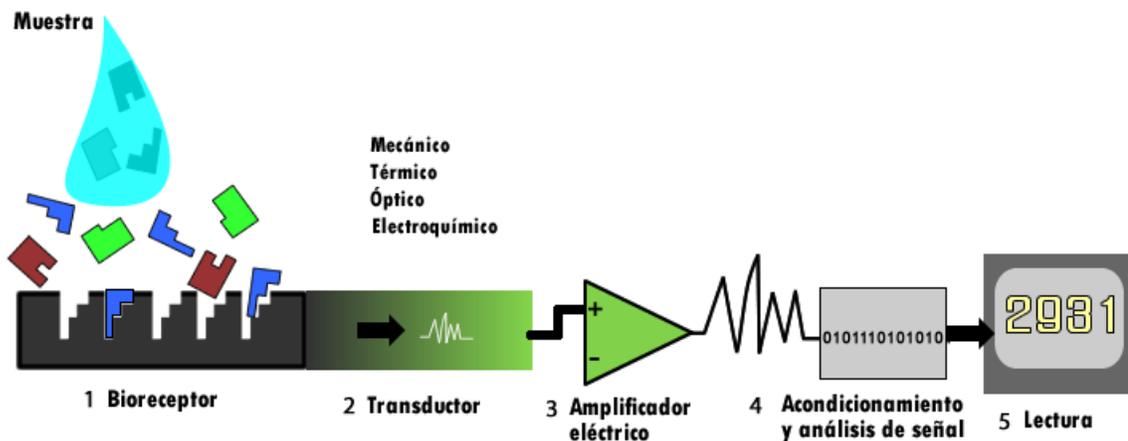


Figura 1.3: Esquema de funcionamiento de un biosensor. La muestra con el analito de interés se pasa por un bioreceptor, el cual lo captura y por medio de un transductor lo convierte en señal eléctrica que es amplificada y acondicionada para poder ser leída por el usuario.

Las ventajas de los biosensores sobre otros sistemas de análisis se basan en su facilidad de uso (no requerir equipamiento especializado ni personal capacitado); generalmente son económicos; tienen una alta sensibilidad y son miniaturizables, por lo que es más fácil transportarlos. Todas estas características hacen que estos dispositivos sean los candidatos ideales para suplir la necesidad de sistemas de diagnóstico, especialmente para enfermedades infecciosas en países pobres y en vías de desarrollo.

Dependiendo del método de transducción que se use para detectar el analito de interés, los biosensores se pueden clasificar en ópticos, mecánicos, piezoeléctricos, magnéticos y electroquímicos (figura 1.4). Se han construido una gran variedad de biosensores para diferentes sustancias usando distintos métodos de transducción; por ejemplo se han diseñado biosensores ópticos usando puntos cuánticos como marcadores para detectar la presencia de virus [9]. Los transductores mecánicos son principalmente basados en sistemas microelectromecánicos (MEMS, por sus siglas en inglés); un ejemplo de estos transductores es el microcantilever (microbarra anclada a una superficie en un solo extremo) sobre el cual se pueden fijar sustancias específicas para detectar otros elementos de una muestra a través de un cambio mecánico generado por la unión de ambas sustancias; por ejemplo, sobre microcantilever inmovilizaron concavalina A y fibronectina para detectar esporas del hongo *Aspergillus niger* [10]. Los sensores piezoeléctricos usan la propiedad de ciertos materiales de generar un potencial eléctrico cuando se les aplica una fuerza mecánica; por ejemplo, un polímero a base de nanotubos de carbono con grupos funcionales carboxilo se ha desarrollado para la detección de residuos de pesticidas [11]. Tal vez los menos comunes son los biosensores magnéticos, un ejemplo de estos es el desarrollo de sensores para detectar la presencia de bacterias como *Legionella pneumophila* y *Salmonella* [12], estos sensores funcionan conjugando un anticuerpo a nanopartículas magnéticas, éstas ante la presencia de las bacterias se aglutinan generando un campo magnético, la intensidad del campo es proporcional a la concentración.

El sistema de transducción más utilizado en biosensores es el electroquímico, que consiste en una serie de electrodos que detectan cambios en las propiedades eléctricas o reacciones químicas (a través de dispositivos electrónicos); un ejemplo representa-

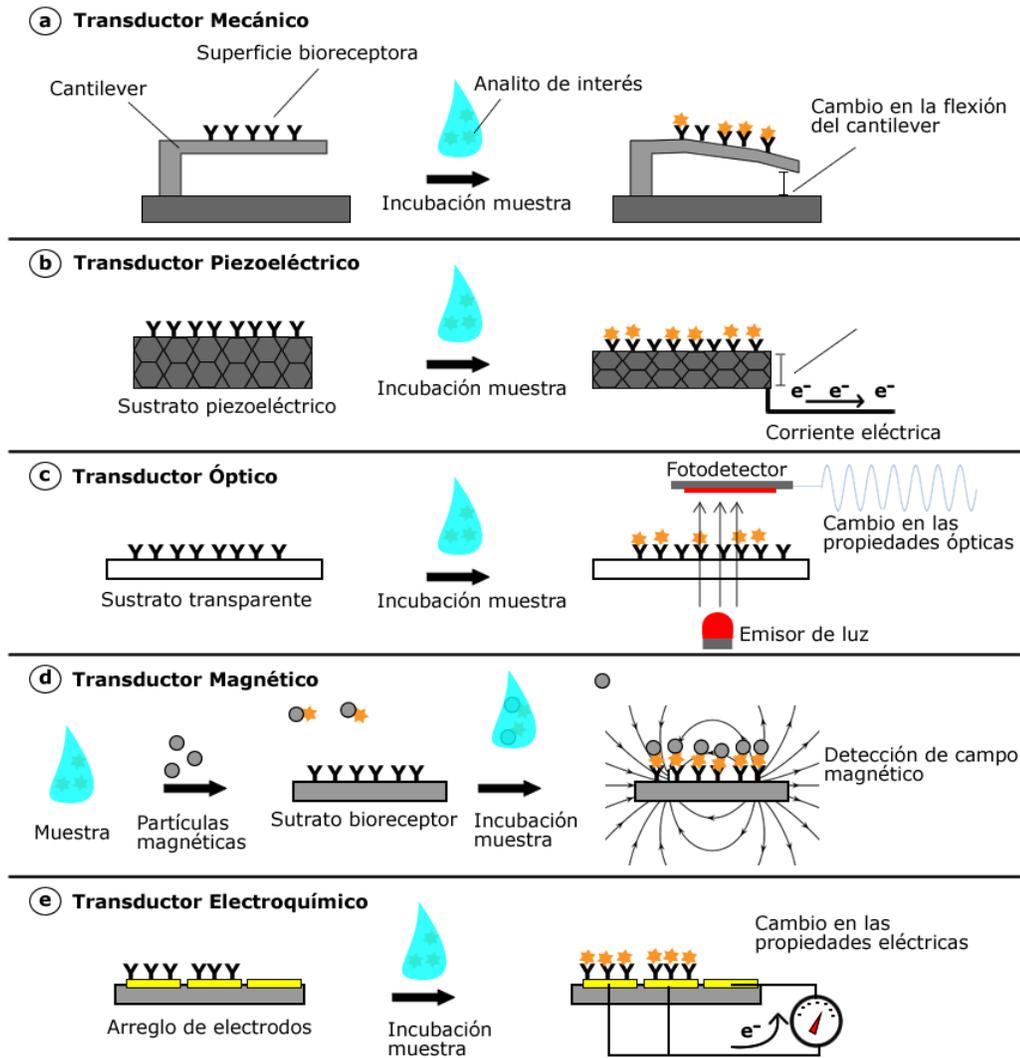


Figura 1.4: Diagramas de algunos ejemplos de los diferentes métodos de transducción en biosensores. a) Se puede observar la flexión de un cantilever la cual puede ser registrada por resistividad o capacitancia. b) El material piezoeléctrico, al deformarse, genera una corriente eléctrica la cual puede medirse electrónicamente. c) Algunas sustancias pueden tener propiedades específicas de absorbanza, difracción, refracción o fluorescencia, los cambios pueden ser medidos con un fotodetector. d) Los sistemas magnéticos se basan en conjugar partículas magnéticas a sondas biológicas para poder detectar el cambio en el campo magnético. e) El sensor electroquímico registra los cambios en resistividad, capacitancia o las corrientes generadas por reacciones de oxidación y reducción.

tivo de transducción electroquímica se encuentra en los sensores para medir glucosa. Sin embargo, existen otros sistemas de transducción ampliamente utilizados, como la cromoamperometría, ruido electroquímico y espectroscopia de impedancia electroquímica. Las ventajas de los biosensores electroquímicos sobre los anteriores son las siguientes: pueden construirse en sistemas miniaturizados, de fácil transporte; el equipo y materiales para su elaboración son asequibles en comparación con otros sistemas de transducción.

Debido a las ventajas que presentan, se han creado una gran variedad de biosensores con este sistema de transducción; algunos ejemplos son: un biosensor para detectar problemas hepáticos basado en la detección de niveles de colesterol, bilirrubina y aminotransferasa [13], el sensor funciona inmovilizando enzimas sobre un arreglo de electrodos y mide la corriente generada por la reducción química de la enzima; otro biosensor electroquímico que se ha desarrollado es para detectar *Listeria monocytogenes*, en éste se mide la reducción de grafeno con partículas de plata que se usan como marcador [14]. El desarrollo de sensores basados en espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS, por sus siglas en inglés) ha crecido en los últimos años. Esta técnica, a diferencia de los métodos antes mencionados, no requiere de marcadores secundarios, por ejemplo se ha desarrollado un biosensor para monitorear el crecimiento de neuroblastocitos en gel por medio del cambio de impedancia [15].

En algunos casos el biosensor como tal no es suficiente para obtener un sistema de diagnóstico que sea portátil y fácil de usar, ya que el manejo y preparación de la muestra se debe hacer por personas calificadas y usando un estricto protocolo de calidad, lo cual es necesario para obtener resultados reproducibles. Para solucionar estas dificultades, se han desarrollado dispositivos que integran los sistemas de manejo y preparación de la muestra, y los automatizan junto con el biosensor, a este concepto se le conoce como “Lab-on-a-chip”. En estos sistemas se pueden integrar microcanales, microbombas, sensores y todo lo necesario para realizar la prueba sin necesidad de algún otro equipamiento o personal capacitado. Algunos MEMS fabricados en sustratos de silicio, han sido usados como plataforma para fabricar estos

dispositivos, por ejemplo se han creado sistemas en MEMS con microcanales que son capaces de medir y separar líquidos con una precisión de nanolitros [16], también se han fabricado sistemas para la preparación y administración controlada de medicamento con microbombas [17].

Además de los MEMS, también se han utilizado sistemas de microfluidos basados en polímeros, entre los cuales destacan los de polidimetilsiloxano (PDMS) y polimetilmetacrilato (PMMA), si bien estos no tienen las propiedades mecánicas ni eléctricas del silicio, su fabricación es mucho más sencilla, lo cual permite realizar prototipos más rápido, a un menor costo e incluso desarrollar dispositivos desechables. Por ejemplo, se han desarrollado sistemas compuestos por microbombas peristálticas, en los que se logra separar el plasma de la muestra de sangre [18], también se han desarrollado sistemas pasivos que son capaces de separar el plasma sin necesidad de una bomba [19]. La combinación de estos dispositivos y los biosensores permitirán, en un futuro cercano, desarrollar sistemas de análisis que cubran todas las necesidades para el manejo de muestras en clínica. En la figura 1.5 se puede observar un ejemplo de un sistema microfluídico para el estudio de crecimiento de bacterias [20].

Un recurso bien explotado en el campo de los biosensores es la inmovilización de sustancias activas afines a algún patógeno o series de estos. El proceso de inmovilización tiene su propia área de desarrollo y pruebas. La inmovilización de enzimas se basa en la confinación de este tipo de biomoléculas sobre una matriz o soporte distinto al que normalmente se encuentran ligadas; polímeros inertes y otros materiales inorgánicos son usados como soporte para la inmovilización de enzimas y otras sustancias de origen biológico. La matriz o soporte ideal para la inmovilización debe ser físicamente resistente, inerte (que no reaccione químicamente con la biomolécula), estabilidad, capacidad para aumentar la especificidad o actividad de la enzima, reducir la adhesión de moléculas no deseadas y la contaminación microbiana. Diferentes métodos son utilizados para la inmovilización y el rendimiento de esta se ve afectado por muchos factores; el primero es por adsorción, donde la inmovilización se da por agregación, proteólisis e interacciones hidrófobas entre el soporte y las enzimas,

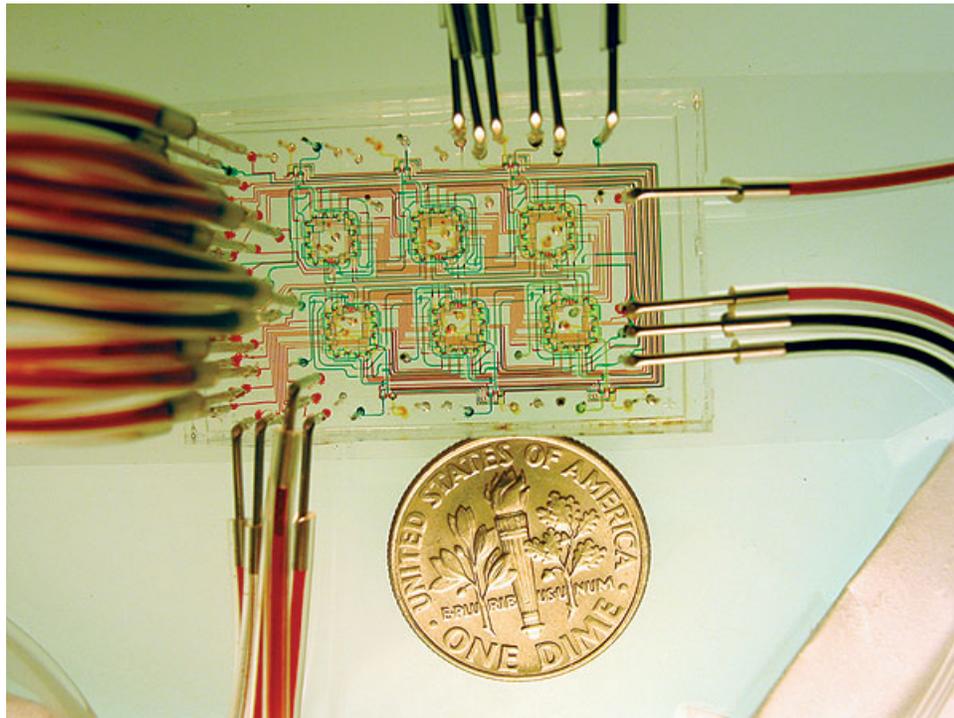


Figura 1.5: Ejemplo en el que se muestra el tamaño y complejidad de los dispositivos microfluídicos (George M. Whitesides, 2006[20])

generalmente es absorción física y el soporte o matriz se introduce en un baño con solución que contenga las biomoléculas y al secarse estas quedan sobre la superficie de los electrodos; el segundo método es por unión de enlaces covalentes, donde los aminoácidos de la cadena lateral de la enzima forman enlaces covalentes con los elementos de los que está hecha la matriz o soporte, aminoácidos como arginina, ácido aspártico, histidina, etc., también influyen los grupos funcionales imidazol, indolilo, hidróxido fenólico, etc.; y el tercer método general se basa en la inmovilización por afinidad donde se utilizan materiales soporte o matriz que sean específicos para la enzima y cambian sus condiciones fisiológicas para la adhesión de un grupo específico de estas. Existe otro método utilizado para la inmovilización, el método de captura, donde las enzimas se capturan por fuerzas covalentes y no covalentes, utilizando geles o fibras para fijar las enzimas a la matriz o soporte; este tipo de encapsulación es

bastante usado [21].

1.3.1. Principales biosensores desarrollados para el diagnóstico de TB

Los biosensores pueden ser comparados de acuerdo a una infinidad de parámetros, inicialmente, podríamos hablar de su linealidad, sensibilidad, selectividad y tiempo de respuesta. La linealidad ideal de un biosensor se determina en función de la relación existente entre la señal medida y la concentración del analito de interés; esta debe ser constante independientemente de la concentración. La sensibilidad se mide en función del valor de la respuesta del electrodo por la concentración del sustrato. Su selectividad debe ser favorecida disminuyendo interferencias químicas que dificulten la medición. El tiempo de respuesta que tarde en obtener el 95 % de la medición determinará si es un biosensor adecuado o no (dependiendo de lo que se quiera medir).

Hay técnicas utilizadas con una baja y mediana efectividad de detección: pruebas que requieren 24 h o más para producir resultados y requieren instrumentación especial con personal calificado. Con respecto al uso de biosensores para el diagnóstico de TB existen biosensores basados en la detección de antígenos, anticuerpos o la bacteria completa a través de sistemas piezoeléctricos; los cristales de cuarzo utilizados tienen una alta sensibilidad a los cambios en masa y superficie, por lo que alcanzan un límite de detección 10 CFU/mL. A pesar de que se considera un excelente límite de detección, factores como la densidad, viscosidad, constante dieléctrica y conductividad de la muestra pueden afectar la medición. La linealidad para este tipo de biosensores se ha observado en concentraciones que van de 10^2 a 10^7 CFU/mL con un punto de corte de 100 Hz. Los biosensores ópticos basados en espectroscopia raman poseen una sensibilidad del 95.2% comparado con los métodos de secuenciación de rRNA de diferentes especies de *Micobacterium*. Requiere que se tengan previamente identificadas la especie de *Micobacterium* TB para realizar la detección e identificación; un laboratorio de bioseguridad 3 y los antígenos fluorescentes, que incrementan el costo [22].

Es difícil realizar una versión portátil para la detección de muchas enfermedades; otros sensores para el diagnóstico de TB se basan en espectroscopia de interferometría [23], éste es capaz de detectar si hay anticuerpos para tuberculosis en el paciente; el sistema tiene una sensibilidad del 75 % comparado con un inmunoensayo estandar, y puede trabajar con la muestra de sangre directamente sin diluir, la desventaja es que requiere de equipamiento óptico especializado, por lo que no es fácil hacer una versión asequible ni portátil. Otro tipo de sensores son los que detectan ADN de la bacteria de tuberculosis [24], los cuales contienen nanopartículas de oro unidas a una sonda de ADN con una afinidad a la secuencia de un gen específico de la micobacteria y la respuesta de la señal se amplifica separando las sondas unidas al ADN por medios magnéticos; posteriormente se realiza la cuantificación de forma electroquímica. Para este sensor se reporta una muy buena sensibilidad de hasta $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$, pero requiere reactivos poco estables a temperatura ambiente y el uso de la sonda y nanopartículas de oro elevan el precio del biosensor.

A continuación se muestra una tabla 1.2 con los principales sensores para diagnóstico de TB desarrollados.

Tecnología	Biomarcador	Límite de detección	Costo	Sensibilidad	Tipo de muestra	Tiempo de respuesta
Microbalanza de cristal de cuarzo	Todos los bacilos de <i>M. tuberculosis</i>	10^5 CFU/mL	NR	Dependiente	Cualquier fluido	NR
Cristal de cuarzo piezoeléctrico con multicanales	NH_3 y absorción de CO_2	10 CFU/mL	4.2 dólares por ensayo	NR	Cualquier fluido	2-4 días
Sistemas rápidos fluorometría por alcoholímetro	Antígeno Ag85B	$50-70$ CFU/mL	NR	74%	Espito	10 minutos
Interferométrico	Antígenos 38-kDa	NR	No portable	75%	Sanguínea	3 horas
Resonancia de plasmón superficial	Antígeno CFP-10	100 ng/mL	No portable	NR	NR	NR
Resonancia magnética	NR	20 CFU/mL	1.0 dólar	NR	Espito	30 minutos
Electrodo de carbono serigrafado	Antígenos Ag360 y Ag231	40 ng/mL	NR	NR	Sanguínea	10 minutos
Inmunosensor enzimático	Anticuerpos para ácido micólico	NR	NR	86.7%	Espito	NR
Electrólisis mediada por micropunta	Todos los bacilos de <i>M. tuberculosis</i>	8×10^3 CFU/mL	NR	NR	Stock	NR
Sensor acústico	Todos los bacilos de <i>M. tuberculosis</i>	2×10^3 CFU/mL	NR	NR	Cultivo de esputo	4-10 días

Cuadro 1.2: Principales biosensores desarrollados para la detección de TB.
NR: No reportado.

1.4. Técnicas electroquímicas

La electroquímica brinda herramientas útiles para determinar sus propiedades como potenciales de oxidación, reducción, comportamiento eléctrico, fenómenos de difusión, etc., de diferentes materiales y superficies. Esta técnica permite estudiar la transferencia de cargas (electrones o huecos) entre una fase sólida (material, electrodo o superficie de estudio) y una fase líquida (electrolito). El electrodo al entrar en contacto con el electrolito libera cargas hacia la solución hasta llegar al equilibrio energético, esto provoca un desbalance de cargas en la superficie del electrodo generando, a su vez, potencial eléctrico. Este desbalance de cargas es conocido como efecto de doble capa, que consiste en un arreglo de dos capas monomoleculares de carga positiva y negativa producidas por la transferencia de cargas entre el electrodo y electrolito. El espesor de estas capas es del orden de Angstroms por lo que el campo eléctrico producido llega a ser del orden de KeV [25].

En la figura 1.6 se presenta un esquema básico de una celda electroquímica de dos electrodos (ánodo y cátodo) que están unidos entre si mediante un voltímetro; en el ánodo ocurre un proceso de oxidación (pérdida de electrones) liberando iones con carga positiva hacia la solución, mientras que en el cátodo ocurre un proceso de reducción (ganancia de electrones) liberando iones negativos. Estos iones se difunden a través de una membrana porosa la cual evita la saturación de cargas en la superficie de los electrodos. Esta diferencia de carga entre los dos electrodos genera un potencial que es registrado en el voltímetro.

En la mayoría de los experimentos electroquímicos, sólo es de interés conocer las reacciones que suceden en uno de los dos electrodos, por lo que se usa un tercer electrodo como referencia (celda independiente contiene una solución saturada de sales). El electrodo comúnmente utilizado para el estudio de sistemas biológicos es el de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) y recubierto de una solución electrolítica de KCl saturada.

En los sensores electroquímicos generalmente se usa una configuración de 3 electrodos, el electrodo de trabajo es el que se desea analizar, el electrodo de referencia

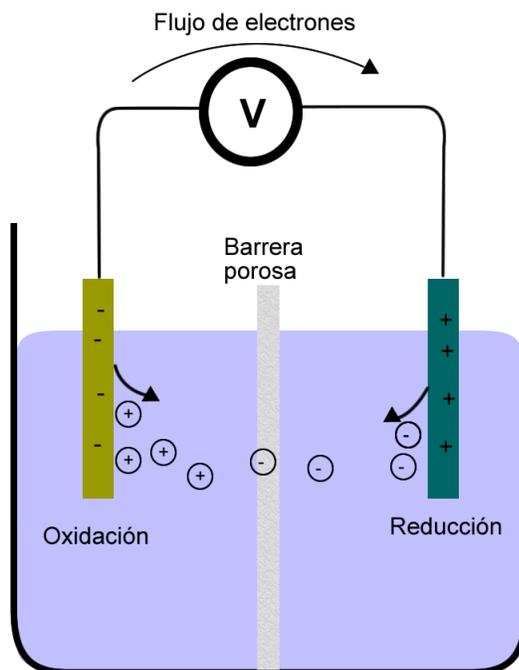


Figura 1.6: Diagrama de una celda electroquímica de dos electrodos.

y un electrodo auxiliar o contraelectrodo; este último, genera la carga necesaria para regular el potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia mediante un potenciostato con el que se mide el voltaje generado en el electrodo de trabajo. En la figura 1.7 se observa el diagrama eléctrico básico de un potenciostato conectado a una celda electroquímica de tres electrodos; el electrodo de referencia se conecta a un amplificador operacional, en el cual se coloca un potencial de referencia que es el que se quiere mantener entre el electrodo de referencia (RE) y el de trabajo (WE), la diferencia del voltaje deseado pasa por el contraelectrodo (CE) para proveer la corriente suficiente.

El uso de celdas y potenciostatos permite realizar algunas técnicas usadas para biosensores como son: cronoamperometría [26], voltametría cíclica o voltamperometría [27] y espectroscopia de impedancia electroquímica [28]. A continuación se explican los fundamentos de cada una de estas técnicas.

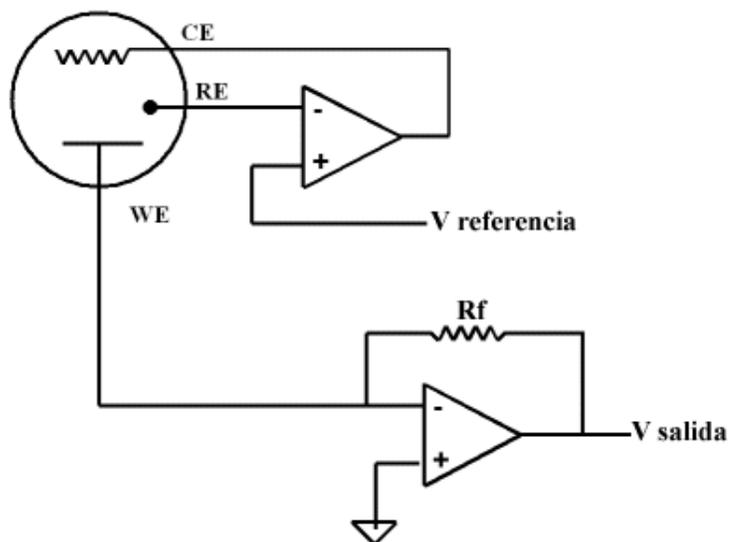


Figura 1.7: Diagrama eléctrico de un potenciostato con una celda electroquímica de tres electrodos.

1.4.1. Cronoamperometría

En la técnica de cronoamperometría, la celda se mantiene a un potencial constante o con un pulso cuadrado, y se registra el cambio en la corriente a través del tiempo [29]. Las alteraciones de corriente en el tiempo se deben principalmente a la expansión o disminución de las capas de difusión del electrodo de trabajo. La ventaja de la cronoamperometría, es que usualmente no requiere de marcadores o reactivos secundarios, además que es extremadamente sensible. Sin embargo, la técnica requiere que haya especies de concentración variable durante el ensayo, que se reduzcan u oxiden, o que produzcan corriente eléctrica. La técnica se ha utilizado para diversos tipos de sensores desde los clásicos sistemas para medir glucosa o colesterol [30], y para el estudio de la respuesta electroquímica de neurotransmisores en tiempo real [31].

La figura 1.8 muestra un diagrama de la respuesta cronoamperométrica obtenida

a partir de un sensor electroquímico para la detección de ADN [32]. El sensor usa la enzima peroxidasa de *Armoracia rusticana* (HRP), que se conjuga a una sonda de ADN uniéndose a la muestra de interés; al agregar peróxido de hidrógeno se genera una corriente eléctrica debido a la reducción de éste último; la corriente es registrada a través del tiempo y se puede observar como el pico que aparece en la gráfica.

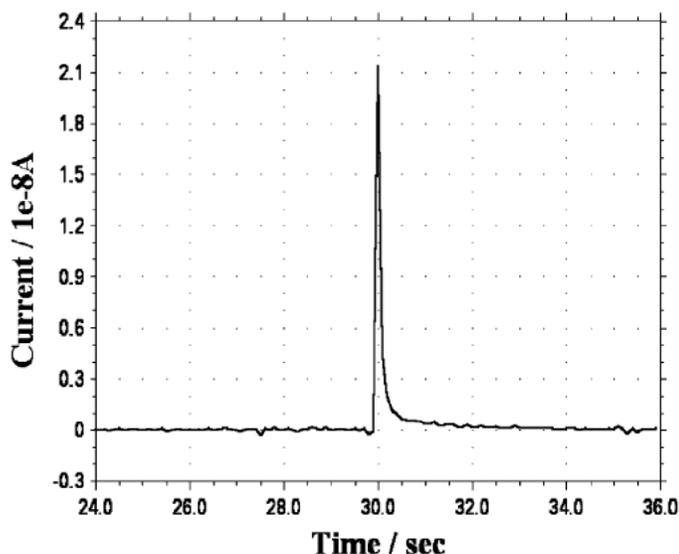


Figura 1.8: Ejemplo de cronoamperometría para un biosensor de ADN basado en HRP [32].

1.4.2. Voltametría cíclica

Una de las técnicas más usadas en electroquímica es la voltametría cíclica (CV, por sus siglas en inglés), a diferencia de la cronoamperometría en la CV se hace un barrido de voltaje con una señal rampa a través del tiempo, cuando se alcanza el potencial máximo la rampa se invierte, generando así una señal triangular, durante el experimento se genera una señal de corriente que es graficada contra el potencial para obtener el voltamograma cíclico.

La CV es útil para realizar la caracterización de especies químicas que tienen la capacidad de oxidarse y reducirse usando determinados potenciales eléctricos, otro

uso es para electrodepositar sustancias sobre electrodos, como metales o polímeros conductores. Dos parámetros importantes a tomar en cuenta durante el experimento son la tasa de barrido y el potencial máximo y mínimo. La tasa de barrido determina la frecuencia de la señal rampa, usualmente se expresa en mV/s; para electrodepósitos, la tasa tiene una fuerte influencia en la estructuración de la película, ya que determina la velocidad a la cual se depositan las capas. El potencial máximo y mínimo son los que determinan la amplitud de la señal y los potenciales de oxidación contribuyendo en el grosor de la película, debido a que el potencial será proporcional a la cantidad de masa que se deposita en cada ciclo.

La figura 1.9 muestra en (a) la señal triangular que se introduce al sistema. En (b) la respuesta obtenida en corriente contra potencial. En el voltamograma, los puntos i_{pc} e i_{pa} representa los picos de corriente catódica y anódica, respectivamente, y los potenciales máximos son representados por E_{pc} e E_{pa} . En los electrodepósitos, estos potenciales representan el voltaje al cual se realiza la máxima transferencia de masa, los picos de corriente también pueden indicar el proceso de oxidación o reducción de una especie química, si aparecen ambos picos significa que la reacción con la especie química es reversible. Uno de los problemas de esta técnica es que durante cada ciclo cierta cantidad de material se puede depositar en los electrodos de referencia o contraelectrodo, provocando un cambio en la resistividad y por lo tanto en la intensidad de corriente y el potencial de salida.

Algunos biosensores que han usado CV son, por ejemplo, un biosensor para la determinación de nitratos [33], que se basa en la inmovilización de la enzima nitrato reductasa que se reduce al haber mayor cantidad de nitratos, por lo que los picos catódicos presentan mayor intensidad de corriente. Otro sensor amperométrico que se ha desarrollado, es para determinación de cromatos en el agua[34], el cual usa una enzima que al entrar en contacto con cromatos se reduce liberando electrones, lo que genera una intensidad de corriente proporcional a la cantidad de cromato. Un novedoso biosensor para detectar células tumorales [35] se basa en la inmovilización sobre un electrodo de oro de Anti-EpCAM, un anticuerpo que va dirigido contra una

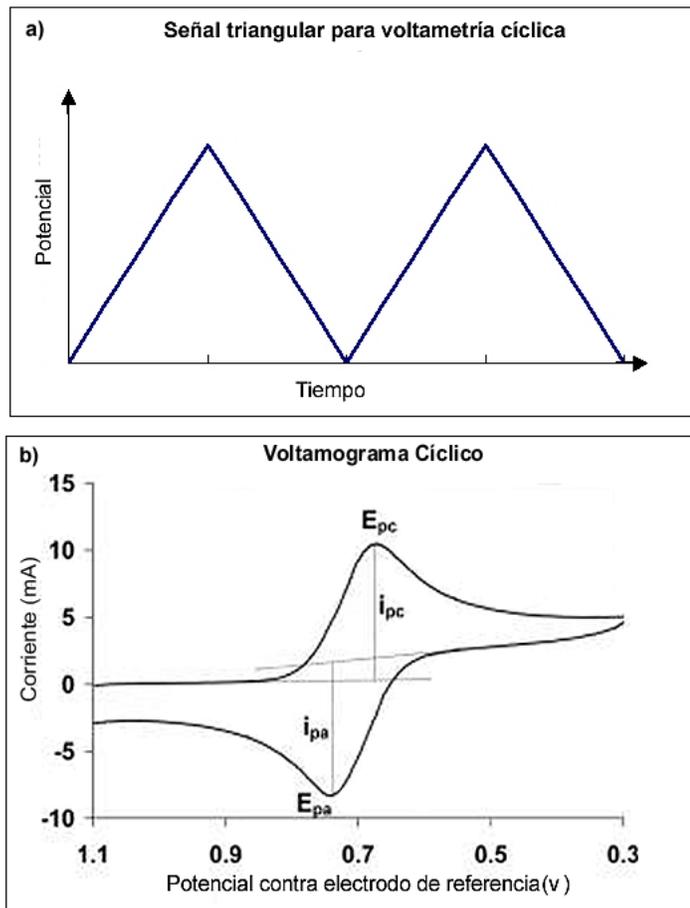


Figura 1.9: a) Señal triangular a un potencial determinado con respecto al electrodo de referencia. b) Voltamograma Cíclico donde se muestra el voltaje contra la corriente durante los ciclos.

proteína de adhesión epitelial (EpCAM) expresada por algunos tumores. A la muestra se le agrega una sonda de anticuerpos anti-EpCAM marcados con nanopartículas magnéticas; los anticuerpos al unirse a las células y éstas al sustrato, generan un cambio en la conductividad eléctrica del sistema.

Una desventaja de los biosensores que usan CV, es que para medir cambios de corriente o conductividad, se requiere que haya especies que tengan una actividad electroquímica, usualmente estas no están presentes en los inmunoensayos; por lo que

se requiere agregar una enzima u otro marcador que genere la señal, este proceso implica más tiempo y material en la preparación del sistema lo que eleva el costo del biosensor.

1.4.3. Espectroscopia de impedancia electroquímica

La espectroscopia de impedancia electroquímica, por sus siglas en inglés 'EIS', es una de las técnicas de mayor interés en el campo de los biosensores debido a que no requiere marcadores secundarios y puede dar una gran cantidad de información del sistema que se analiza. La EIS, a diferencia de la CV, genera una señal senoidal con una amplitud de voltaje determinada a diferentes frecuencias para establecer el comportamiento de los diferentes elementos del sistema.

La EIS se basa en la modelación de cualquier sistema electroquímico como un circuito eléctrico, por ejemplo, una célula, un metal con corrosión o una celda electroquímica; éstos sistemas se pueden considerar como un arreglo de los tres elementos pasivos básicos que existen en los circuitos eléctricos: resistores, capacitores e inductores. En la figura 1.10 se muestran los tres elementos pasivos, el primero es el resistor que es un material que se interpone al flujo de la corriente eléctrica que se disipa en forma de calor. El segundo elemento es el capacitor; está compuesto por dos placas paralelas de un material conductor, al generar un potencial entre ambos extremos de las placas éste se almacena en el capacitor en forma de un campo eléctrico. El último elemento es un inductor, generalmente compuesto por un conductor enrollado en forma de espiral (bobina), al generar una diferencia de potencial y pasar la corriente, este elemento almacena la carga en forma de campo magnético.

En general con las técnicas electroquímicas mencionadas anteriormente (CV y cronoamperometría), solo se toma en cuenta la resistividad o su inverso la conductividad, las cuales se rigen por la ley de Ohm (ecuación 1.1), donde la resistencia (R) del sistema es directamente proporcional al voltaje (V) e inversamente proporcional a la corriente (I); sin embargo esta ley solo aplica para elementos resistivos lineales.

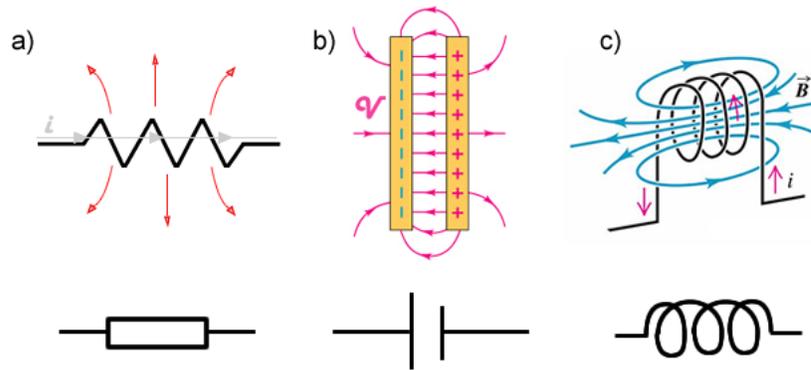


Figura 1.10: Elementos básicos pasivos eléctricos. a) Resistor, disipa la carga en forma de calor. b) Capacitor, almacena la carga en forma de campo eléctrico c) Inductor, almacena la carga en forma de un campo magnético.

$$R = \frac{V}{I} \quad (1.1)$$

La impedancia (Z) se puede definir como la oposición que presenta un circuito al flujo de corriente, tomando en cuenta la contribución de los elementos capacitivos e inductivos del sistema, a diferencia de la ley de Ohm. La intensidad de la impedancia se puede calcular sumando sus elementos y tratándolos como resistores, pero sustituyendo el valor por las ecuaciones indicadas en el cuadro 1.3, es notable que éstas ecuaciones son dependientes del voltaje a través del tiempo; es decir, que la frecuencia (ω) en los inductores y capacitores afecta la señal de salida, es por esta razón que en la EIS se realiza un barrido de frecuencias, así se pueden obtener los valores de los diferentes elementos que pueden representar el circuito eléctrico del sistema. El modelado del sistema usualmente se puede reducir a un conjunto de resistores y capacitores, ya que se puede suponer que en los electrodos usados en biosensores no existen elementos inductivos o tienen valores muy bajos que pueden ser despreciados.

De acuerdo a las ecuaciones de impedancia (ver cuadro 1.3), se puede observar la respuesta ante una señal senoidal producida por una fuente de voltaje, cuando se agrega un resistor al circuito se obtendrá la misma señal senoidal de voltaje pero

Cuadro 1.3: Ecuaciones de impedancia de los elementos eléctricos pasivos.

Elemento	Ecuación Impedancia	Ecuación Voltaje-Corriente
Resistor (R)	$Z = R$	$V = IR$
Capacitor (C)	$Z = 1/i\omega C$	$I = C \frac{dV}{dt}$
Inductor (L)	$Z = i\omega L$	$V = L \frac{dI}{dt}$

Donde $\omega = 2\pi f$ es la frecuencia radial del voltaje de entrada.

con una amplitud reducida, ya que el valor del resistor es generalmente mayor a uno. En el caso del capacitor se puede obtener una señal en la que también cambia la amplitud; pero como la carga y descarga del elemento capacitivo está en función del tiempo, se puede observar un corrimiento de la señal llamado desplazamiento de fase (ϕ), Figura 1.11.

El barrido de frecuencias usualmente va de 10,000 Hz a 0.1 Hz; se usa este rango de frecuencias ya que no se conocen los valores aproximados de las capacitancias del sistema, el límite superior de 10 KHz se usa ya que a mayores frecuencias es poco probable encontrar efectos capacitivos del sistema electroquímico, además se pueden detectar inductancias y capacitancia provenientes de los puntos de conexión ajenas al sistema de estudio. Los parámetros ϕ y Z son dependientes de esta frecuencia angular y la representación de estos valores (Z y ϕ) vs ω es llamada gráfico de Bode, el cual consta de dos gráficas una donde se muestran la magnitud de la señal y la fase, este diagrama es útil ya que permite registrar un amplio rango de frecuencias y observar la respuesta del sistema ante diferentes frecuencias. Otra forma de representar los datos obtenidos es usando la ecuación de Euler (ecuación 1.2), al ser la entrada de voltaje una señal senoidal, se puede representar con la ecuación 1.3, con este planteamiento se puede generar una ecuación de la impedancia dependiente de la frecuencia angular (ecuación 1.4). Se puede observar que esta ecuación incluye una componente real y una compleja, que al graficar la impedancia real ($\text{Re}Z$) en función de la par-

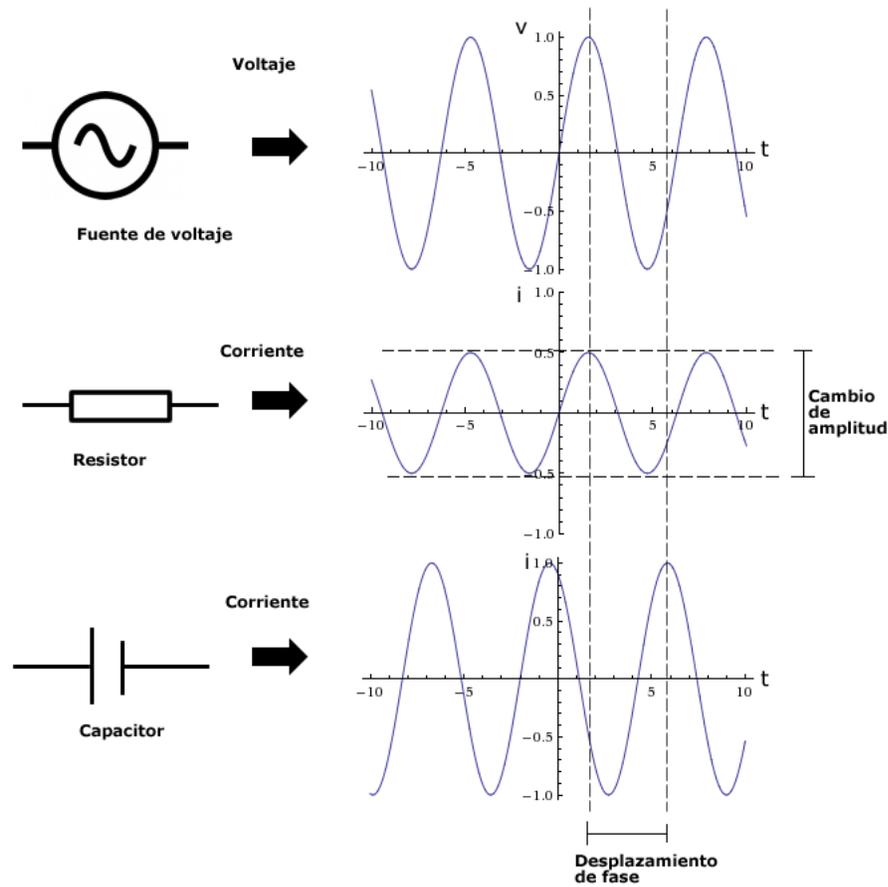


Figura 1.11: Respuesta de un Resistor y un Capacitor al procesar una señal senoidal producida por una Fuente de voltaje.

te compleja de la impedancia ($\text{Im}Z$) se obtiene la gráfica de Nyquist. Con los dos tipos de gráficos (Bode y Nyquist) se puede obtener diferente información del sistema.

$$e(i\phi) = \cos\phi + i\sin\phi \quad (1.2)$$

$$V_t = V_0 e^{i\omega t} \quad (1.3)$$

$$Z(\omega) = V/I = Z_0 e^{i\phi} = Z_0(\cos\phi + i\sin\phi) \quad (1.4)$$

En la figura 1.12, se observan las gráficas de impedancia de Nyquist y Bode para un circuito compuesto por un capacitor y un resistor en un arreglo en paralelo.

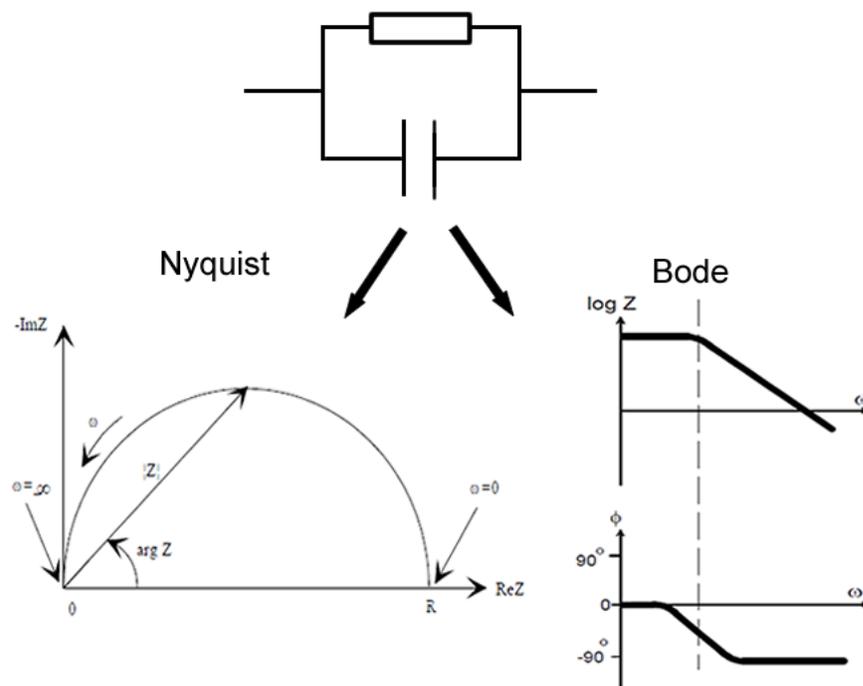


Figura 1.12: a) Gráficas de Nyquist y Bode para la impedancia de un circuito compuesto por un capacitor y un resistor conectados en paralelo.

La ecuación 1.5, muestra como se calcula la impedancia en un circuito en paralelo, siendo Z_r y Z_c las impedancias del resistor y capacitor, respectivamente. Al sustituir los valores de la impedancia de cada uno de los elementos presentados en el cuadro 1.3 se obtiene una ecuación compleja que es dependiente de la frecuencia angular (1.6) y al separar las partes real e imaginaria, se obtienen las ecuaciones 1.7 y 1.8; en

la parte real mientras que el valor de $\text{Re}Z$ aumenta conforme la frecuencia disminuye hasta llegar a un límite en R . Por otro lado, en la parte imaginaria el valor de $\text{Im}Z$ tiende a cero a frecuencias muy altas o muy bajas; el valor máximo alcanzado es cuando la frecuencia toma un valor igual a la raíz cuadrada del inverso del capacitor. Al graficar ambos valores de impedancia se obtiene el gráfico de Nyquist (figura 1.12) el cual muestra un semicírculo, cada punto de éste puede ser representado también por el módulo (distancia del origen al punto) y el argumento (ángulo formado entre el eje y el módulo) de la impedancia, el cual es el desplazamiento de fase y se puede obtener con la ecuación 1.9.

$$Z = \frac{1}{1/Z_c + 1/Z_r} \quad (1.5)$$

$$Z(\omega) = \frac{R}{1 + i\omega CR} \quad (1.6)$$

$$\text{Im}Z(\omega) = \frac{\omega CR^2}{1 + \omega^2 C^2 R^2} \quad (1.7)$$

$$\text{Re}Z(\omega) = \frac{R}{1 + \omega^2 C^2 R^2} \quad (1.8)$$

$$\text{arg}Z = \phi = \arctan\left(\frac{1}{\omega RC}\right) \quad (1.9)$$

Para el mismo circuito 1.12, el gráfico de Bode primero muestra como cambia la impedancia en relación con la frecuencia angular. La ecuación 1.6, muestra que conforme la frecuencia aumenta la impedancia tiende a R , debido a que el capacitor a altas frecuencias no alcanza a recargarse, por lo que se comporta como una apertura en el circuito; la otra parte de la gráfica de Bode muestra la dependencia del ángulo de fase con la frecuencia angular, como se observa en la ecuación 1.9, el desplazamiento depende de la frecuencia angular y es una función del \arctan , es decir, conforme la frecuencia aumenta el desplazamiento se incrementa.

Con la información obtenida de la EIS se puede realizar un modelado del circuito eléctrico, el cual representa el sistema de estudio a partir de elementos pasivos, los cuales pueden formar una gran variedad de circuitos. En la figura 1.13, se puede observar como una celda electroquímica se puede modelar como un circuito eléctrico; en general los cables y conexión se comportan como resistencias de alta conductividad, el electrolito de la celda también se comporta como una resistencia de más baja conductividad, pero algunos otros elementos como las bicapas formadas por las uniones de los electrodos, o la capa delgada formada por la interfase entre la solución y el electrodo (doble capa), se comportan como capacitores. Las capas que se forman durante la incubación de biomoléculas, como antígenos y anticuerpos que se adhieren al soporte, pueden afectar los valores de resistencia y capacitancia del sistema; tomando en cuenta estos cambios, sería posible determinar la presencia de estas moléculas en una muestra usando la técnica EIS.

La técnica de EIS se ha usado en varios tipos de biosensores, sobre todo en aquellos en los que se quiere eliminar la necesidad de un marcador secundario para realizar la cuantificación del analito de interés; también donde se tienen estructuras que generan grandes cambios en la impedancia. Por ejemplo, un biosensor que detecta glicoproteínas midiendo el cambio en la resistencia de carga [36]. Otro ejemplo es un biosensor para la detección de endotoxinas en vacunas [37], en este sensor se usa un aptámero para atrapar los lipopolisacaridos de origen bacteriano, se inmoviliza sobre un microelectrodo de oro y se miden las propiedades eléctricas tras incubarlo. La EIS se ha incorporado incluso en sistemas más complejos de biochips, por ejemplo en uno para la cuantificación de células a través de la medición de la capacitancia [38], la cual es directamente proporcional el número de células sobre el área del electrodo de trabajo.

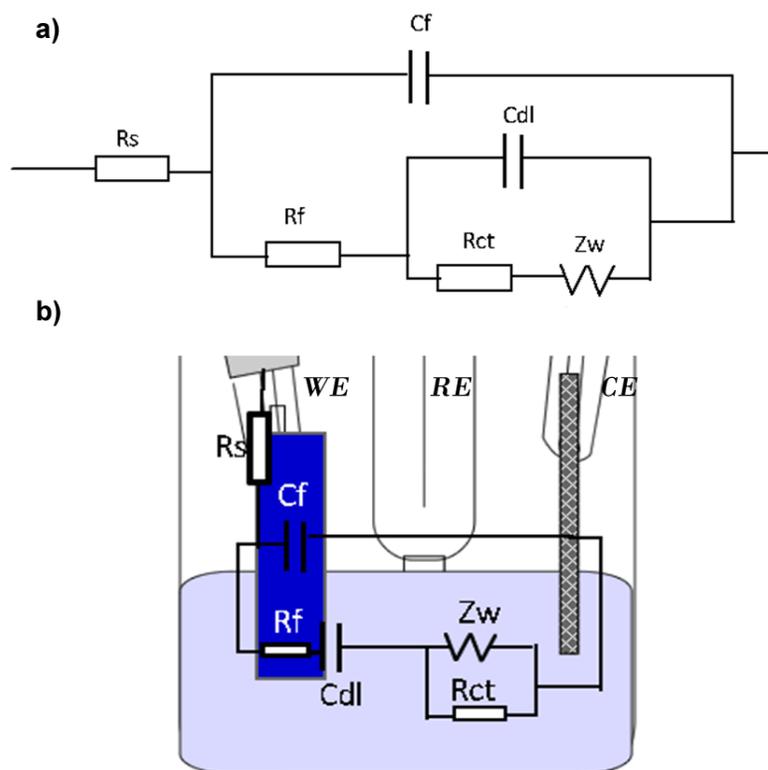


Figura 1.13: a) Circuito eléctrico que se puede modelar a partir de la celda electroquímica b) Representación del circuito dentro de la celda

1.5. Polímeros conductores como soporte para biosensores

Uno de los obstáculos en el desarrollo de biosensores, es la obtención de un sustrato adecuado para la inmovilización del ligando (antígeno u otro elemento) que servirá para capturar el analito de interés, además el sustrato debe ser compatible con el método de transducción de la señal. Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los sustratos usados en sensores electrónicos son a partir de semiconductores como el silicio, y en algunos casos polímeros sintéticos; sin embargo, el problema al utilizar estos materiales, es que la mayoría de las veces las biomoléculas usadas

en los ensayos no tienen afinidad por estos, incluso algunos no son biocompatibles y afectan el comportamiento de los reactivos. Una alternativa para lograr un sustrato adecuado es el uso de los polímeros conductores, que son compuestos orgánicos con la capacidad de conducir corriente eléctrica; su estructura les brinda afinidad hacia ciertas biomoléculas y gracias a su buena conductividad se pueden realizar pruebas electroquímicas sobre éstos.

Desde mediados del siglo XIX, se comenzaron a realizar modelos teóricos de compuestos orgánicos que podían presentar un estado de conductividad, al principio se hicieron algunos experimentos con polianilina que además de ser conductora en su estado oxidado, presentaba propiedades electrocrómicas; pero fue hasta la década de 1970 cuando se descubrieron y desarrollaron por primera vez polímeros con una alta conductividad eléctrica, esto se presentaba principalmente en su estado oxidado aunque en pocos casos se presenta en su estado reducido. En el año 2000 Alan J. Heeger, Alan G MacDiarmid y Hidki Shirakawa recibieron el premio nobel por el descubrimiento y desarrollo de estos polímeros [39].

Los polímeros conductores pueden ser clasificados de acuerdo a la forma en que las cargas se propagan a través de ellos; este fenómeno está relacionado con su estructura molecular, los polímeros redox contienen centros por los cuales los electrones van brincando, estos centros redox son principalmente orgánicos u organometálicos y pueden estar directamente sobre la cadena del polímero o en la cadena lateral. En algunos polímeros las moléculas redox pueden retenerse en la cadena temporalmente por medios electrostáticos cuando se encuentran en forma de electrolito. El otro tipo de polímeros conductores son los conductores intrínsecos (ICP), donde la conducción de electrones se da principalmente por el mecanismo de salto, cada enlace de la cadena recibe y libera electrones.

A la fecha se han descubierto muchos polímeros que pueden actuar como ICP, entre los que más se utilizan están poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT), que presente una buena conductividad y estabilidad; el polipirrol (PPy), que está formado por cadenas de anillos de pirrol, tiene una alta conductividad y es muy estable al medio ambiente. Otro de los polímeros más usados es la polianilina (PAni), esta se forma a

partir del monómero anilina, también tiene una alta conductividad y es un material electrocrómico, es decir que al ser oxidada o reducida por una corriente eléctrica esta puede cambiar de color y cambiar sus propiedades eléctricas. En la figura 1.14 se pueden observar las estructuras de los polímeros mencionados así como los diferentes estados de oxidación de la PANi.

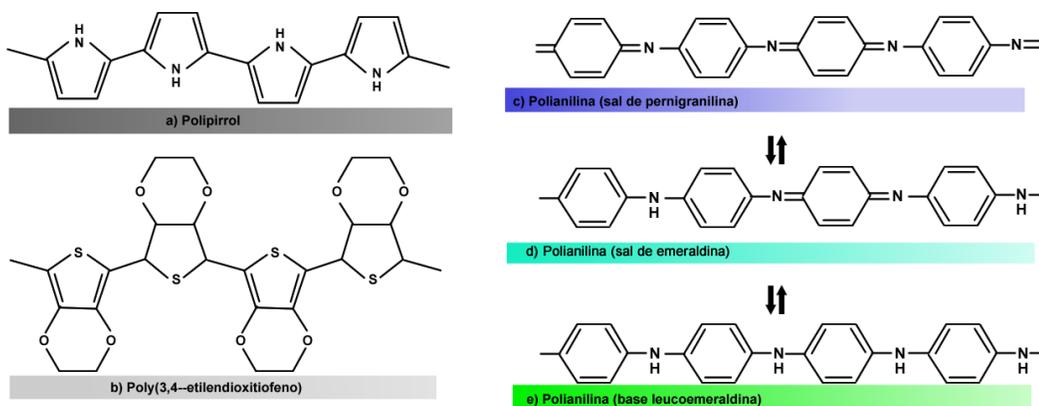


Figura 1.14: Estructura química de Polipirrol (PPy), poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) y estados de oxidación de la polianilina (PANi)

El descubrimiento de los polímeros conductores ha tenido una gran repercusión en la industria electrónica, ya que es posible remplazar algunos componentes electrónicos hechos de elementos como silicio y germanio cuyo costo es más elevado y los procesos de fabricación son complejos. Por ejemplo, se ha usado polipirrol y poli(acetileno) para la fabricación de pantallas electrónicas, en la construcción de capacitores, en el desarrollo de recubrimientos anticorrosivos, en dispositivos electrocrómicos, en sistemas de baterías, en la construcción de celdas solares orgánicas, así como en sensores y actuadores. Las principales ventajas que tienen los electrónicos orgánicos, es que su costo de fabricación es muy inferior a los fabricados de silicio cristalino, además que el dispositivo final adopta las propiedades plásticas del polímero haciendo posible crear pantallas y celdas solares que se adapten a superficies variadas. Un ejemplo de la versatilidad de los ICP, es la creación de un micro brazo robótico de solo $670 \mu\text{m}$ de PPy capaz de levantar una cuenta de vidrio de $100 \mu\text{m}$, utilizado para la manipulación de cultivos celulares [40]. En un futuro estos sistemas podrían

ser usados para crear un laboratorio en un chip que sea fabricado en un solo paso con polímeros conductores.

Otra de las ventajas que presentan estos polímeros, es que pueden ser depositados por medios químicos y electroquímicos [41], [42]. Al realizar el depósito a través de campos eléctricos, se pueden producir películas de área y espesor controlado; en el caso de la PANi se puede controlar su estado de oxidación simplemente cambiando el potencial de la celda electroquímica sin necesidad de agregar agentes dopantes y se pueden depositar en áreas selectivas para formar patrones. Una ventaja particularmente en biosensores, es que pueden transferir eficientemente los electrones producidos por reacciones bioquímicas, por lo que pueden ser usados como sitios de inmovilización para las biomoléculas y como sistema de transducción. Además son insolubles en medios acuosos y también en algunos casos en medios orgánicos, y presentan una buena estabilidad térmica de aproximadamente 150 °C. Por estas características son ideales para la construcción de biosensores a nivel industrial.

1.5.1. Polianilina

La polianilina (PANi) es un polímero conductor que bajo ciertas condiciones de oxidación o reducción puede conducir corriente eléctrica, es decir su resistencia o capacidad de conducir puede ser cambiada por medios químicos y electroquímicos. Dependiendo de su estructura, la PANi puede presentarse en diferentes estados; como pernigranilina en el cual obtiene un color azul/violeta y conduce muy poca corriente eléctrica; en leucoemeraldina donde tiene un color verde claro casi transparente e igualmente tiene baja conductividad; y el estado medio oxidado emeraldina, que es el estado más útil. En su estado desdopado se le conoce como emeraldina base, tiene un color azul intenso y baja conductividad, en su estado dopado se le conoce como sal de emeraldina, es color verde intenso y presenta una alta conductividad en el orden de decenas de ohms.

Los mecanismos de polimerización química y electroquímica de la PANi son si-

milares durante los primeros pasos. El paso inicial es la oxidación de la anilina para formar un radical catiónico, el cual puede presentarse en tres formas como se observa en la figura 1.15. En el segundo paso, los radicales se unen formando un dímero dicatiónico, este pasa por un proceso de re-aromatización para alcanzar un estado estable y durante este proceso se pierden dos protones. El tercer paso es la propagación de la cadena de PANi, durante el proceso electroquímico (figura 1.16a), los dímeros se oxidan en la superficie del electrodo, estos radicales se unen a otros cationes de anilina para formar la cadena, la película obtenida mediante este proceso continua oxidándose, lo que la deja en el estado base emeraldina que actúa como aislante, por lo tanto solo puede alcanzar un determinado tamaño (dependiente de la estructura) antes de que se sature el electrodo; si se quiere continuar creciendo la película se debe reducir colocando un voltaje negativo para pasarla a sal de emeraldina; la necesidad de realizar este cambio ocasiona que la síntesis electroquímica de la PANi se tarde tiempos más largos que para otros polímeros como el PPy.

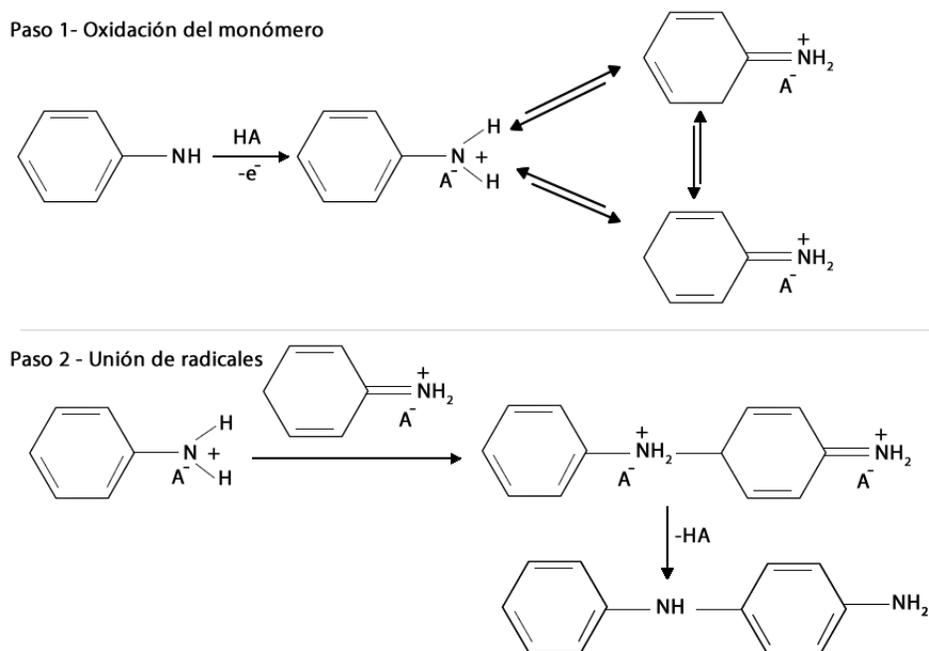
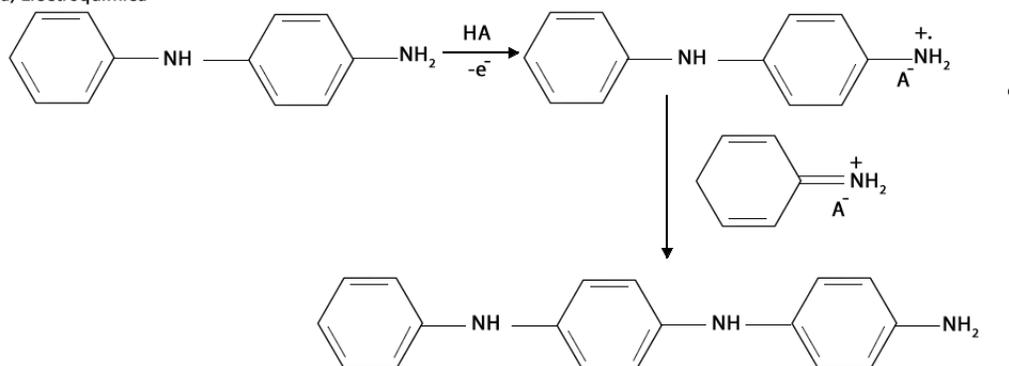


Figura 1.15: Mecanismo inicial de polimerización de la polianilina.

En el proceso químico (figura 1.16 b), se forma directamente la cadena oxidada de emeraldina que puede contener algunas partes de leucoemeraldina y pernigranilina, cuando el agente oxidante se termina durante la reacción, el polímero se reduce para formar la base emeraldina, después de sintetizada se puede dopar utilizando un ácido para formar la sal emeraldina.

Paso 3 - Crecimiento de la cadena

a) Electroquímica



b) Química

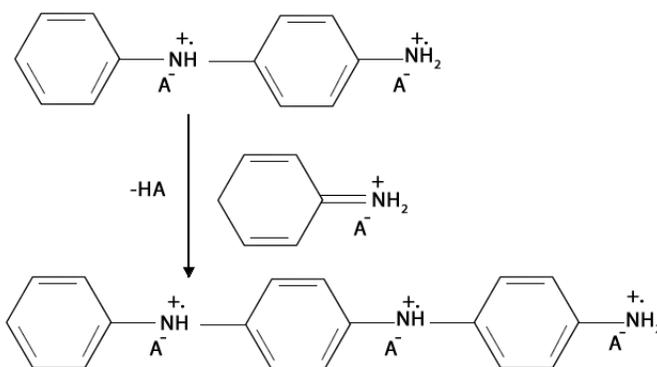


Figura 1.16: Crecimiento de la cadena de PANi durante la polimerización a) electroquímica y b) química.

La PANi ha sido usada en algunos biosensores, por ejemplo en uno capaz de detectar fenoles[43], sobre la PANi se inmovilizó por adsorción la enzima polifenol oxidasa, la detección se hizo por amperometría. Otro sensor similar puede detectar

colesterol[44], en este se usa la enzima colesterol oxidasa. Un ejemplo más novedoso es un biosensor libre de marcadores para la detección de *Escherichia coli*[45], sobre la película de PANi se inmovilizaron anticuerpos anti- *E. coli*, el electrodo se incubo en una solución con diferentes concentraciones de la bacteria, la detección se hizo por medio de EIS.

1.5.2. Polipirrol

El polipirrol se forma por la oxidación del monómero pirrol, esta puede ser generada por electropolimerización o por polimerización química con un oxidante. La síntesis por baño químico se utiliza usualmente para obtener grandes cantidades de polímero, mientras que la electroquímica se usa para obtener películas de un tamaño y geometría controlada. Usualmente el proceso químico produce polvos y partículas de PPy, mientras que la electroquímica genera películas depositadas en los electrodos. Debido a que el PPy tiene una conductividad muy buena en el orden de decenas de ohms, el crecimiento electroquímico es virtualmente ilimitado, en contraste con la PANi cuyo crecimiento es autolimitante; sin embargo el obtener una superficie uniforme depende en gran medida del electrodo de trabajo que se utilice, se ha observado que se obtiene una mejor nucleación en electrodos de platino y carbón vítreo, pero tienen la desventaja de ser muy costosos, por el contrario se ha observado que es difícil de sintetizar en electrodos de grafito y de acero inoxidable los cuales son más accesibles. Tal vez la mejor opción son los electrodos de ITO (óxido de índio-estaño), este compuesto se puede depositar sobre diferentes sustratos como vidrio y polímeros, las películas de PPy crecidas en ITO tienen una nucleación aceptable y es asequible.

El mecanismo de electropolimerización del PPy se muestra en la figura 1.17; las unidades de monómero son absorbidas en el electrodo oxidándolas y generando cationes radicales de pirrol. Los cationes se pueden unir con otro catión radical igual o con unidades de monómero neutral en la solución. Esto forma un dímero el cual tiene una doble desprotonación para formar una molécula neutra, estos dímeros radicales tienen un potencial de oxidación menor a los monómeros libres en la solución,

por lo cual comienza a crecer la cadena de polímero uniéndose con otros dímeros o monómeros. Usualmente el potencial de crecimiento se encuentra arriba de los +600 mV (vs Ag/AgCl) y la morfología de las películas obtenidas depende en gran medida del potencial al cual se deposita, del electrodo de trabajo y del electrolito usado.

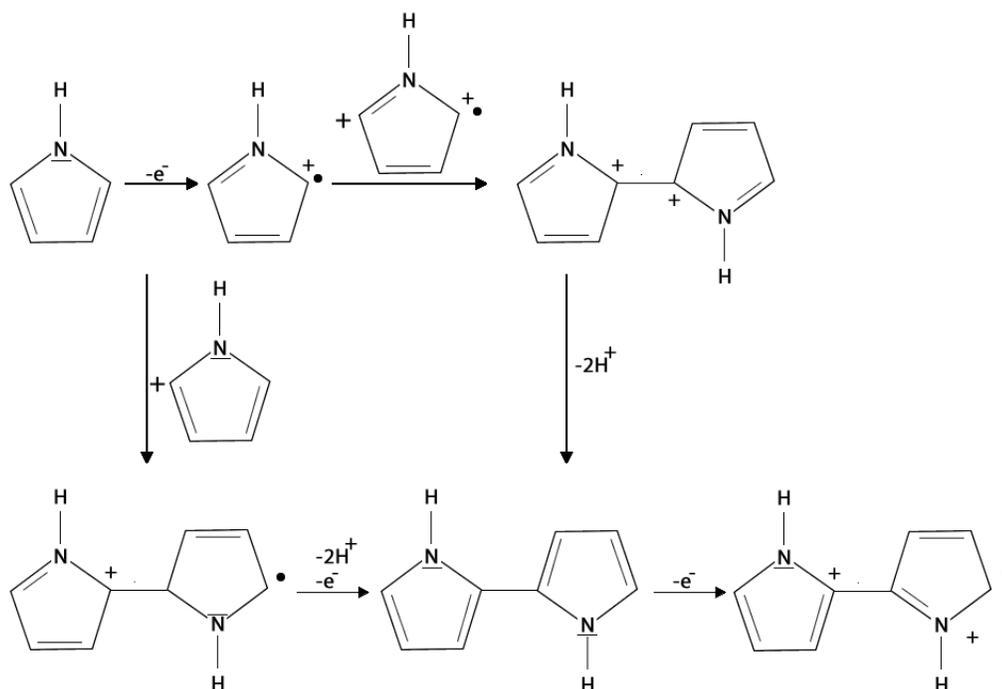


Figura 1.17: Mecanismo de electropolimerización del polipirrol.

El PPy ha sido tal vez el más estudiado entre los ICP para aplicaciones electrónicas, debido a su buena conductividad y estabilidad química, además de que es fácil de sintetizar. En el área biomédica ya se han realizado varios biosensores usando este polímero conductor, por ejemplo se ha desarrollado un inmunosensor electroquímico para detectar el virus de la leucemia bovina, utilizando como ligando la proteína gp51 que puede capturar anticuerpos producidos durante la enfermedad [43]; la cuantificación se realiza por EIS y se logró diferenciar claramente un sistema con el virus incubado con respecto a uno sin el virus. Otro ejemplo es un sensor de glucosa que utiliza nanopartículas de PPy recubiertas con la enzima glucosa oxidasa [46], la de-

tección se llevó a cabo por amperometría y se observó que el sensor genera hasta 10 veces más corriente que las tiras convencionales, ya que al estar la enzima alrededor de las nanopartículas se obtiene un electrodo con mayor área superficial.

Capítulo 2

Justificación

Como se mencionó en el capítulo 1, el bacilo *M.tuberculosis* es el agente bacteriano que causa mayor mortalidad en el mundo. Además que un tercio de la población mundial está infectada con la forma latente de la enfermedad, por lo que una de las estrategias más efectivas para detener la propagación de esta enfermedad es el diagnóstico oportuno.

Por estas razones, es necesario desarrollar nuevos métodos de diagnóstico que permitan una detección oportuna del patógeno, que sea fácil de utilizar, sencillo de transportar, con una alta sensibilidad y un precio asequible. Los biosensores, son sistemas que cumplen con estas características, en particular los basados en sistemas electroquímicos. Por lo cual en el presente trabajo se propone la construcción de un soporte de detección de anticuerpos asociados a TB por medios electroquímicos, que pueda servir en un futuro como plataforma de diagnóstico.

Capítulo 3

Hipótesis

Es posible desarrollar un soporte basado en polímeros conductores, que sea capaz de detectar anticuerpos asociados a tuberculosis activa, en suero sanguíneo de humanos, a través de técnicas electroquímicas.

Capítulo 4

Objetivos

4.1. Objetivo general

- Desarrollar un soporte basado en polímeros conductores, que sea capaz de captar y medir la presencia de anticuerpos asociados a tuberculosis activa en suero sanguíneo.

4.2. Objetivos específicos

- Purificar el antígeno di-*o*-aciltrealosa (DAT), el cual es un antígeno con alta especificidad para la detección de tuberculosis.
- Sintetizar películas de polímeros conductores por medios químicos y electroquímicos.
- Inmovilizar el antígeno DAT sobre las películas de polímeros conductores.
- Medir la capacidad del soporte para captar anticuerpos anti-DAT a través de inmunoensayos convencionales.
- Caracterizar el soporte por técnicas electroquímicas, para detectar la presencia de anticuerpos anti-DAT en suero sanguíneo.

Capítulo 5

Estrategia experimental

5.1. Sistema a desarrollar

El sistema que se desea desarrollar en este trabajo se ilustra en la figura 5.1, este es una plataforma de inmovilización que puede ser usada como un biosensor electroquímico para la detección de anticuerpos asociados a tuberculosis; consiste en un sustrato (1) sobre el cual se sintetiza una película delgada de polímero conductor (2), sobre ella se inmoviliza un antígeno 2,3-Di-O-acil-trealosa (DAT) (3) que se expresa en las paredes de la bacteria que produce tuberculosis, por lo que personas que padecen esta enfermedad producen anticuerpos contra DAT. Sobre la plataforma se puede incubar suero sanguíneo que contenga anticuerpos anti-DAT (4), estos se adherirán al DAT y se puede medir su presencia por métodos electroquímicos (5).

Una segunda opción para evaluar la capacidad del sistema como biosensor se muestra en la imagen 5.2; en esta variación, después de inmovilizar los anticuerpos anti-DAT sobre el sustrato, se añade un anticuerpo secundario anti-IgG, el cual está conjugado a la enzima peroxidasa de *Azadirachta indica* en inglés HRP (horseradish peroxidase), una especie de rábano, posteriormente al agregar peróxido de hidrógeno, la enzima lo reduce generando un agente oxidante, esta variación del agente oxidante puede medirse a través de un mediador, el cual capta los electrones de la reacción y los conduce al electrodo, con lo que se puede registrar una corriente

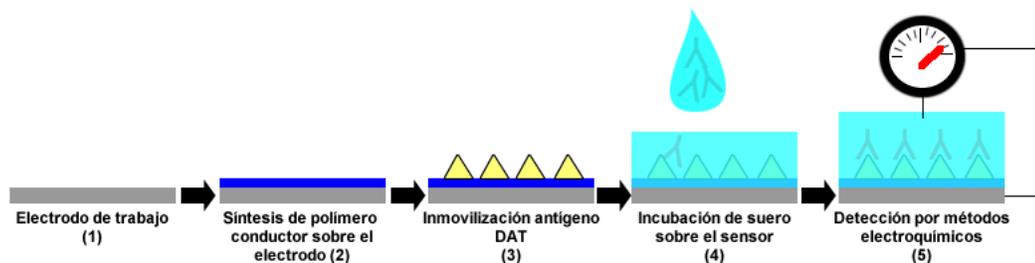


Figura 5.1: Esquema del sistema polímero conductor con DAT para desarrollar una plataforma para un biosensor.

eléctrica.

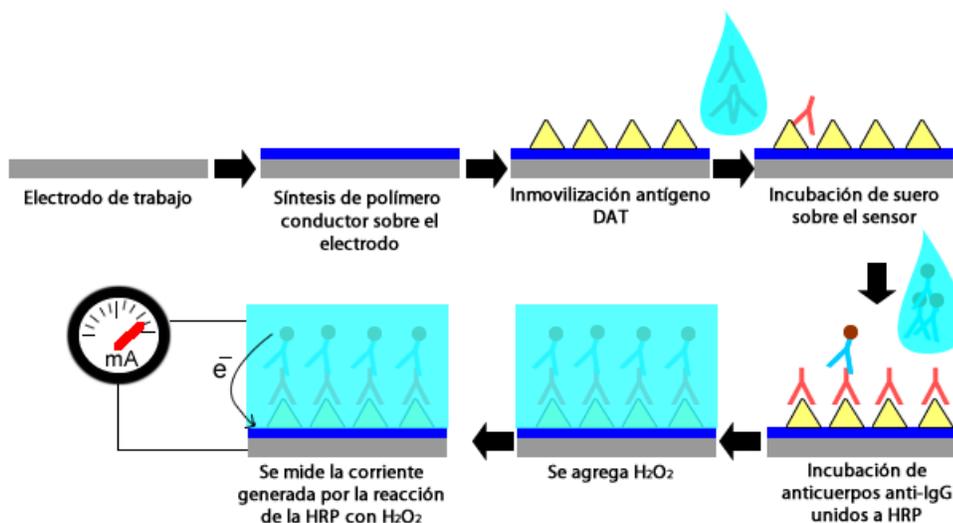


Figura 5.2: Esquema de medición electroquímica usando anticuerpos conjugados a HRP

5.2. Diagrama experimental

La figura 5.3 es el diagrama experimental que se desarrolló. La primera etapa fue sintetizar las películas de polímeros conductores; polipirrol y polianilina. La PANi se sintetizó electroquímicamente debido a que el proceso de crecimiento requiere mucho

tiempo, además se probó también con películas sintetizadas químicamente; el PPy sólo se sintetizó electroquímicamente.

El antígeno DAT se purificó a partir de un cultivo de la cepa de *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841. Los lípidos se obtuvieron por extracción orgánica, el glicolípidos se purificó por cromatografía en una columna de sílice [47]. Para obtener un suero sanguíneo control e hiperinmune (suero con antígeno) se inmunizaron dos conejos Nueva Zelanda y su bioactividad se comprobó con una prueba colorimétrica ELISA sobre placas de microtitulación comerciales.

Una vez verificada la bioactividad, se determinó la cantidad óptima a colocar en el polímero semiconductor mediante inmunoensayos usando diferentes concentraciones de DAT. También se realizaron inmunoensayos con el suero hiperinmune de conejo sobre PANi y PPy para confirmar su funcionalidad como soportes. Para la primera serie de experimentos se decidió usar PANi, ya que se pensaba que se podía observar una diferencia directa en su conductividad debido a los efectos de la reacción antígeno-anticuerpo, por otro lado se eligió PPy, ya que presenta una mayor estabilidad electroquímica, lo que haría más fácil medir una corriente al usar un mediador. Después se realizaron inmunoensayos usando sueros humanos infectados con TB, sobre películas de PANi y PPy. Como primer acercamiento para registrar los cambios en las propiedades electroquímicas del sistema, se hicieron ensayos de EIS sobre las películas usando suero hiperinmune de conejo, esto con el fin de observar si es posible detectar directamente anticuerpos en los soportes. Finalmente se hizo un ensayo electroquímico por cronoamperometría, usando el anticuerpo secundario conjugado a HRP sobre PPy con suero de conejo hiperinmune y con suero de humanos infectados.

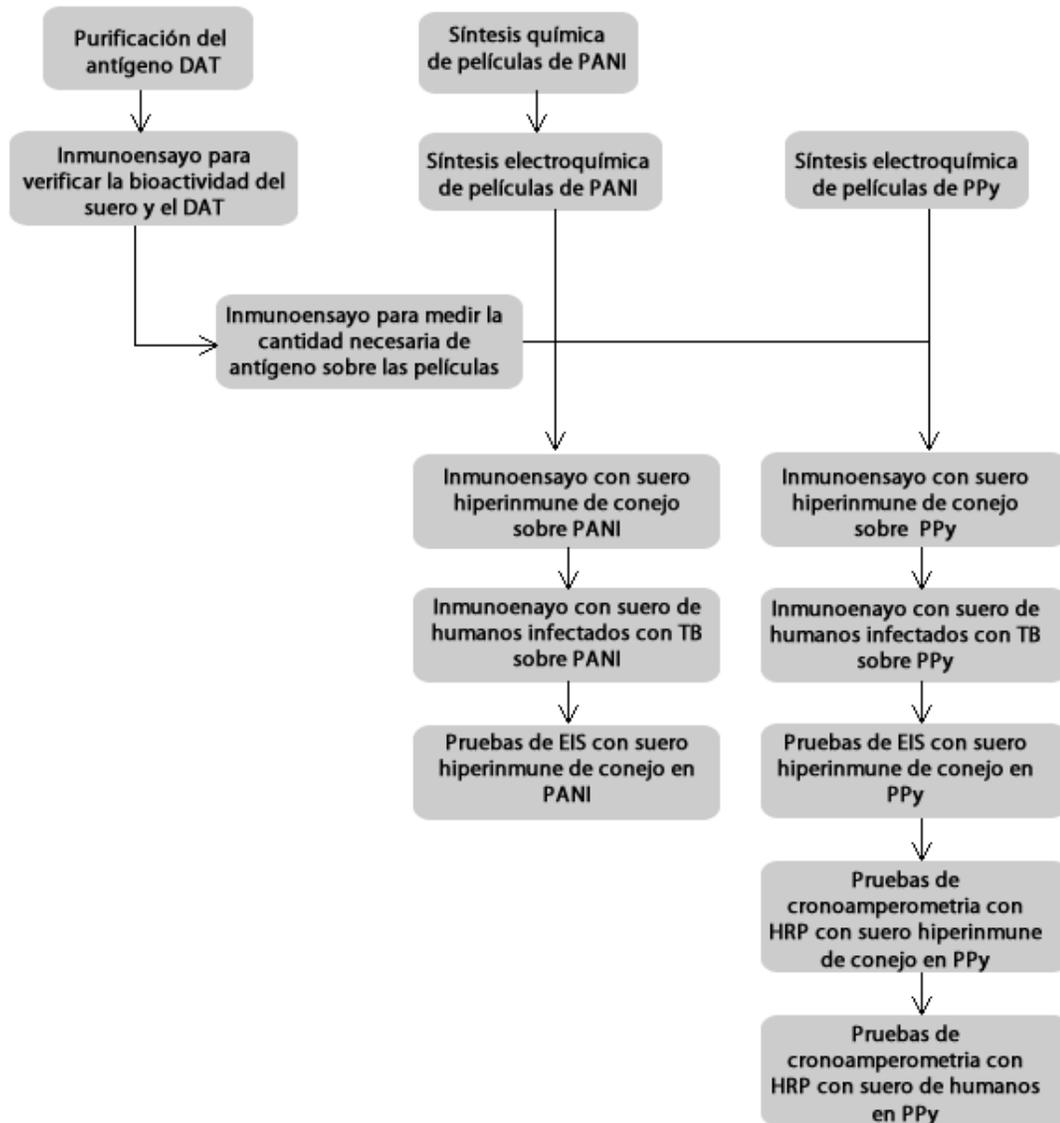


Figura 5.3: Diagrama experimental

Capítulo 6

Materiales y métodos

6.1. Síntesis de polímeros conductores

Para los diferentes ensayos se sintetizaron películas de PANi por medio químico; y películas de PANi y PPy por medio electroquímico.

6.1.1. Síntesis química de polianilina

Debido a que el método de baño químico permite sintetizar un gran número de películas de PANi en poco tiempo, fue el primer método que se usó para sintetizar las películas para los ensayos preliminares, principalmente debido a que se necesitaron muchas películas durante las primeras fases de prueba de inmunoensayos sobre polímeros conductores.

Para sintetizar las películas de PANi, se cortaron rectángulos de hojas de PET (Aldrich Prod. No. 639303) de 25 mm x 75 mm, se lavaron (agua desionizada) y colocaron en sonicación por 10 minutos en una solución de isopropanol. Los rectángulos se soportaron sobre portaobjetos. Se vertieron 1.1 L de HCl 0.1 M (J.T. Baker Prod. No. 5367, 36.5-38.0 %) y 5.46 mL de anilina (Aldrich Prod. No. 242284; previamente destilada, 99 %) en un cristizador y se enfrió el sistema hasta alcanzar una temperatura de 2 °C. Posteriormente se preparó una solución de 10.67 g de APS (Aldrich Prod. No. 248614, ≥ 98 %) en 91 mL de agua destilada y se agregó lentamente por

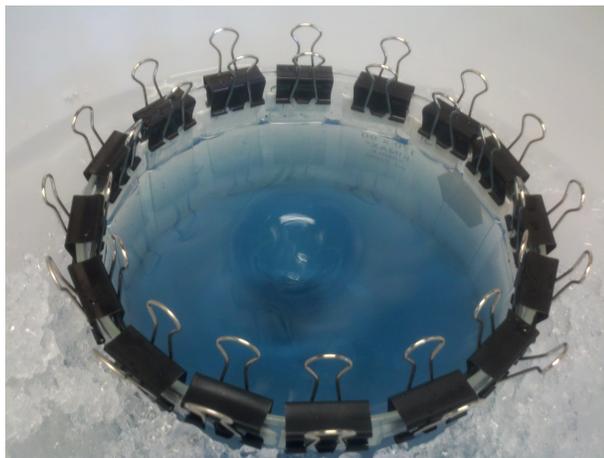


Figura 6.1: Cristalizador en el baño de hielo durante el proceso de polimerización de PANi por baño químico. Se puede observar como la solución adquiere un color azul.

bureta. Cuando la solución comenzó a cambiar a un color azul claro, se colocaron los portaobjetos verticalmente en la solución y se dejaron sumergidos por una hora. En la figura 6.1 se observa como los soportes de vidrio con el PET se sujetan por medio de sujetadocumentos en la orilla del cristalizador. Al terminar el proceso las películas se enjuagan con abundante agua destilada y se colocan en sonicación por 5 minutos para retirar el exceso de polímero en la superficie de la película.

6.1.2. Síntesis electroquímica de polianilina

Como se mencionó en el capítulo 1, el crecimiento electroquímico de la PANi es auto limitante, por lo tanto el tiempo de síntesis se incrementa. Sin embargo es más controlado, reproducible y se obtiene una superficie más homogénea. Es notable que en este método no se usa un oxidante ya que el proceso de oxidación se produce electroquímicamente. En este caso se usó la técnica de CV para crecer las películas.

Para realizar la síntesis se utilizaron sustratos de vidrio y PET recubiertos con ITO de 2.5 cm x 1 cm. Se preparó una solución de anilina (0.1 mL) en 20 mL de H_2SO_4 0.1M (J.T. Baker Prod. No.9681, 95.0 - 98.0%), se dejó en agitación por 10 minutos. La celda utilizada se observa en la figura 6.2, el PET recubierto de ITO

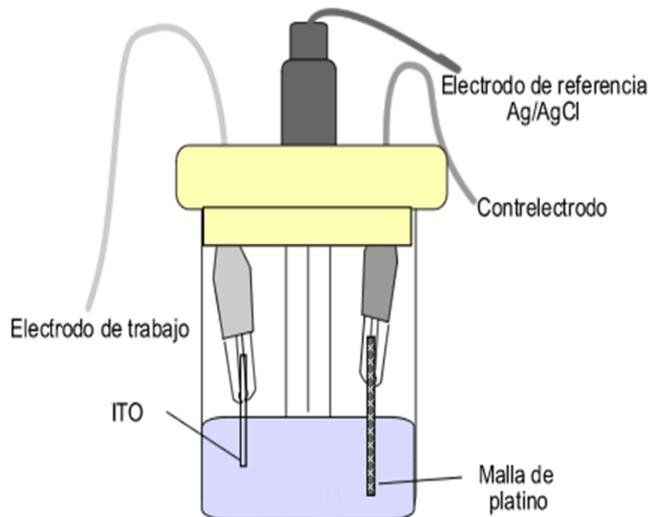


Figura 6.2: Esquema de la celda electroquímica usada para el depósito electroquímico de PANi y PPy. El sustrato se coloca como electrodo de trabajo, el electrodo de referencia es una malla de platino y se usó un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

actuó como electrodo de trabajo, como contraelectrodo se usó una malla de platino y se utilizó un electrodo de referencia de Ag/AgCl con solución KCl 4M saturada de AgCl (Aldrich Prod. No. Z113085). El potenciostato (A Gill AC) se ajustó para la CV en 'cyclic sweep' con parámetro de barrido de: -200 mV a +1600 mV, 50 mV/s, 7 Ciclos. Al terminar el depósito se enjuagaron las películas con abundante agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

6.1.3. Síntesis electroquímica de polipirrol

La síntesis electroquímica de polipirrol tiene la ventaja de que no se pierde conductividad durante el electrodeposición, es por eso que el crecimiento de películas es virtualmente ilimitado. Además el crecimiento es mucho más rápido comparado con el de PANi. En general el PPy presenta problemas de adherencia sobre vidrio, es decir que las películas tienden a desprenderse muy fácilmente del sustrato de vidrio, por lo cual se eligió trabajar sólo con películas sintetizadas sobre PET recubierto de ITO para los inmunoensayos. El electrodeposición se realizó en una solución electrolítica de

acetonitrilo con perclorato de litio, ya que permite una mejor difusión del monómero lo que genera películas más uniformes, con mejor conductividad y mayor adherencia.

También se utilizaron sustratos de PET recubierto de ITO de 2.5 cm x 1 cm. La solución electrolítica se preparó agregando 0.45 g de LiClO₄ (Aldrich Prod. No. 431567, ≥ 99.99%) en 100 mL de acetonitrilo (Aldrich Prod. No. 271004, ≥ 99.8%) y se agitó por 5 minutos. Se colocaron 17 mL de la solución en la celda electroquímica, se agregó el monómero pirrol 0.1mL (Aldrich Prod. No. 131709, 98%) y se dejó en agitación por 5 minutos más. El potenciostato se ajustó para CV con valores de barrido de: 0 mV a +1600 mV, 100 mV/s, 3 Ciclos. Al finalizar la síntesis las películas se dejaron secar boca arriba a temperatura ambiente por 24 hrs.

6.2. Obtención de DAT y suero hiperinmune de conejo

6.2.1. Purificación del antígeno DAT

La figura 6.3, muestra la estructura del DAT, este es una molécula anfipática que contiene dos cadenas de ácidos grasos y dos unidades de glucosa. La molécula está presente en la pared exterior del bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, por lo que muchos pacientes afectados por tuberculosis pueden presentar anticuerpos contra DAT.

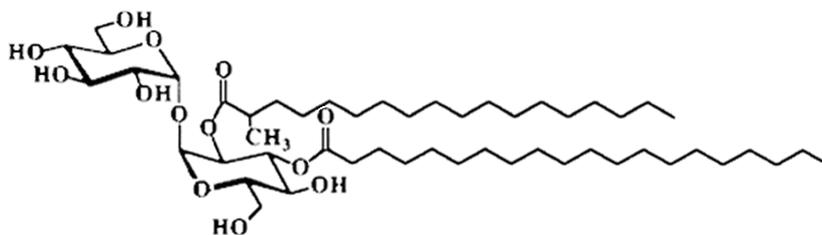


Figura 6.3: Estructura química del antígeno 2,3-Di-O-acyl-trealosa (DAT).

La purificación del DAT se hizo a partir de extractos de lípidos de la bacteria *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841. Se usó esta bacteria ya que su manipulación es de

menor riesgo comparada con *Mycobacterium tuberculosis*. Existe una clara respuesta antigénica cruzada entre *Mycobacterium fortuitum* y otras especies de *Mycobacterium* debido a la presencia del glicolípido DAT, ensayos ELISA realizados sobre diferentes especies la corroboran, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium tuberculosis* pueden detectarse usando un anticuerpo contra la molécula de di-*o*-aciltrealosa [48]. La extracción se realizó por cromatografía en columna de sílice a la cual se fueron agregando sucesivamente soluciones más polares de solvente para eluir el lípido de interés. Durante la purificación se hicieron pruebas de cromatografía en capa fina para monitorear la salida y pureza del DAT de las fracciones obtenidas. De la purificación en columna se obtuvieron dos fracciones ricas en DAT aproximadamente un total de 0.4 g, sin embargo estas contenían algunas impurezas. Para obtener fracciones más limpias se realizó una purificación por cromatografía en capa fina (CCF) en placas de recuperación y purificación en micro columnas pre-empacadas con gel de sílice.

- Purificación por columna de cromatografía

El primer paso es montar la columna de sílice (figura 6.4), se colocó un algodón en la punta para controlar el flujo. Luego se pesaron 160 g de Florisil® (Supelco Prod. No.20281) y se suspendieron usando cloroformo (J.T. Baker Prod. No.9138, ≥ 99.8

Las fracciones se coletaron con la siguiente proporción de solventes (CHCl_3 : CH_3OH , vol:vol): 100:0, 95:5, 92.5:7.5, 90:10, 87.5:12.5, 85:15 y 80:20. Cada fracción obtenida se evaporó mediante un rotavapor, el lípido que quedó en el matraz se solubilizó con una mezcla del solvente (CHCl_3 : CH_3OH , 80:20) aproximadamente con 5 mL, y se vertió en un tubo de ensayo, se evaporó el solvente restante bajo corriente de nitrógeno y calentando a 50 °C. El tubo se conservó en congelación en atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación de los lípidos.

Una vez coleccionadas las fracciones completas se realizó una cromatografía en capa fina (CCF) para observar el contenido de DAT de cada una. Se usaron placas de sílica gel 60 F₂₅₄, 10 x 20 cm (EMD Prod. No.5729-6), la fase móvil consistió en una mezcla de CHCl_3 60 mL, CH_3OH 12 mL, H_2O 1 mL. El revelado se llevó a cabo con

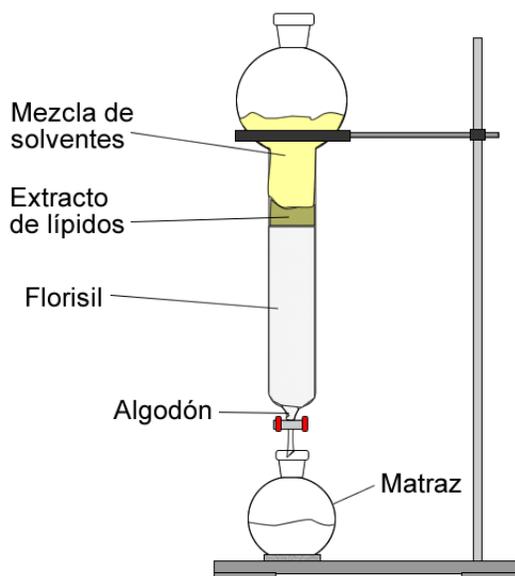


Figura 6.4: Esquema del montaje de la columna de cromatografía.

antrona al 2% en H_2SO_4 calentando la placa a 110°C .

De las fracciones que se obtuvieron la de 92.5:7.5 fue en la que se obtuvo mayor cantidad de DAT, con esta fracción se hizo una segunda columna más pequeña con 15 g de Florisil®. Se hizo con la mezcla de ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$, V:V): 100:0, 95:5, 93:7, 91:9, 89: 11, 87:13 y 85:15.

- Purificación de DAT en placas de recuperación (CCF)

La purificación por CCF se hizo usando placas de gel silica 60 F, 20 x 20 cm (MERCK Prod. No.113894), como fase móvil se utilizó la mezcla CHCl_3 60 mL, CH_3OH 12 mL, H_2O 1 mL. Se agregaron 60 μg para cada placa. Las placas se revelaron usando antrona al 2% en H_2SO_4 y calentando a 110°C . El DAT se extrajo del sílice usando la mezcla $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$, 80:20.

6.2.2. Inmunoensayo de bioactividad del suero hiperinmune-DAT

Se realizó un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), para cuantificar la cantidad de anticuerpos presentes en el suero inmune y confirmar que el DAT obtenido de las purificaciones mantiene su actividad como antígeno.

Se utilizaron los sueros de dos conejos Nueva Zelanda (JC y MA) inmunizados con el antígeno DAT [49]. En el cuadro 6.1 se muestra el esquema de inmunización de ambos conejos.

Días	DAT	Solución	Sangrado
0	-	-	T0
10	5 mg	SSI y CFA	T1
40	3 mg	SSI y IFA	T2
60	3 mg	SSI y IFA	T3
80	-	-	T4

Cuadro 6.1: Esquema de inmunización de conejos Nueva Zelanda.

El ensayo se llevó a cabo depositando 2 μg de DAT en cada pozo, el DAT fue disuelto en 100 μl de una mezcla de hexano-etanol (1:1, vol/vol) (J.T. Baker Prod. No. 9310, > 99 % / J.T. Baker Prod. No. 8006, > 99 %), se usaron placas de microtitulación de 96 pozos (Polysorp, NUNC 47509). Posteriormente los sitios activos se bloquearon colocando 200 μl de una solución de BSA (Fisher BioReagents 102 M-9501) en PBS al 3 % (w/v) y se dejó incubar la placa 2 hrs a 37°C. Al terminar la incubación se realizaron 3 lavados con PBS. Se colocaron 50 μl en cada pozos del suero de conejo en BSA 0.3 %, se usaron los suero de los tiempos T0, T2 y T4 de los dos conejos inmunizados, cada muestrade suero se hizo por triplicado. De cada suero se hicieron las diluciones en proporciones 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200. Los sueros se dejaron incubar durante 2 hrs a 37°C. Al terminar la incubación se lavaron los pozos 5 veces con PBS.

Se añadieron 100 μl de anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Aldrich Prod. No. A3687), éste en una dilución de 1:10000 en BSA 0.3 %. Se dejó incubar

durante 2 hrs a 37°C. Al finalizar se lavó 5 veces con BSA 0.3%. Se agregaron a cada pozo 100 μl PNPP (Aldrich Prod. No. F71768) al 0.1% en un tampón de DEA. Se incubó por 15 min a 37°C. Al terminar se midió la absorbancia a 450 nm, en el lector de microplacas (iMark Microplate Reader, Biorad).

La figura 6.5, muestra el esquema de los diferentes pasos del ensayo ELISA. La cantidad de producto de color que se obtiene al final, es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-DAT en el suero sanguíneo.

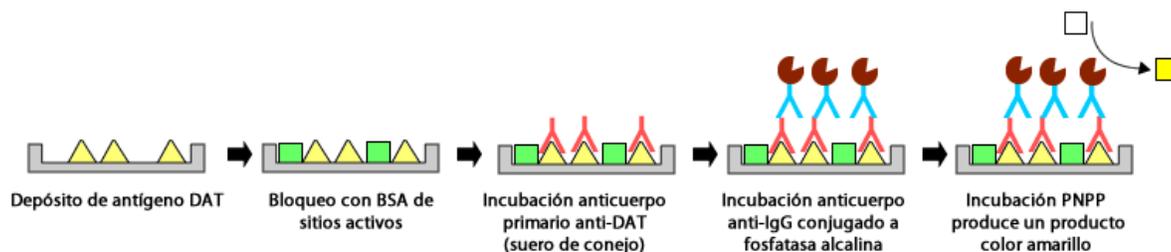


Figura 6.5: Esquema de los pasos para el ensayo ELISA.

6.3. Inmunoensayos sobre películas de polímeros conductores

6.3.1. Determinación de la cantidad óptima de DAT

Para determinar la cantidad óptima de DAT a depositar sobre los soportes de polímeros conductores, se realizó un ELISA cambiando la cantidad de DAT que se colocó en cada sustrato de polímero conductor. Para este ensayo se utilizó PANi y el suero del conejo JC en tiempos T0 y T4.

Para el ensayo los sustratos de PANi se cortaron en cuadros con una medida de 1 cm^2 y se usaron placas de microtitulación de 24 pozos (NUNC 42475). Sobre cada cuadro de sustrato se depositó DAT, para el ensayo se usaron las siguientes cantidades: 0.25 μg , 0.5 μg , 1 μg , 2 μg , 4 μg , 8 μg , 16 μg , 32 μg , 64 μg y 128 μg . Los sitios activos en los pozos se bloquearon colocando 600 μl de una solución de BSA

en PBS al 3 % (w/v). Se dejó incubar la placa 2 hrs a 37°C. Transcurrido el tiempo se sumergieron los cuadritos de PANi en los pozos y se dejó incubar dos horas más a la misma temperatura. Al terminar se realizaron 3 lavados con PBS.

Se colocaron 200 μl en cada pozo de los sueros de conejo disuelto en BSA 0.3 %, se usaron los sueros de los tiempos T0 y T4 del conejo JC. Cada muestra se evaluó por duplicado y se usó una dilución 1:100. Los sueros se dejaron incubar durante 2 hrs a 37°C. Al terminar la incubación se lavaron los pozos 5 veces con PBS.

Posteriormente se añadieron 400 μl de anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (dilución de 1:15000 en BSA 0.3 %). Se dejó incubar durante 2 hrs a 37°C. Al finalizar se lavó 5 veces con BSA 0.3 %. Se agregaron a cada pozo 400 μl de PNPP al 0.1 % en un tampón de DEA. Se incubó por 15 min a 37°C. Las muestras fueron transferidas a una placa de 96 pozos para poder leer la absorbancia. Las lecturas fueron realizadas a 450 nm en un lector de microplacas.

6.3.2. Inmunoensayo con sueros de conejos

Se realizó un ELISA con el suero de conejo para confirmar que el DAT conserva su actividad sobre las películas de polímeros conductores y saber si esta actividad es dosis-dependiente. Se hizo un ensayo sobre películas de PANi y otro sobre PPy, ambas sintetizadas electroquímicamente, los dos ensayos se hicieron de forma idéntica. Se utilizó el suero del conejo JC en tiempos T0 como control y T4 hiperinmune. El primer paso fue el depósito de DAT sobre los sustratos, usando 20 μl de una mezcla de hexano-etanol (1:1, vol/vol), se colocaron 2 μg de antígeno en cada cuadro de sustrato. Posteriormente cada cuadro se pegó a la placa de microtitulación usando pegamento instantáneo. Los sitios activos en los pozos se bloquearon colocando 700 μl de una solución de BSA en PBS al 3 % (w/v). Se dejó incubar la placa 2 hrs a 37 °C, al terminar se lavaron 3 veces con con PBS.

El siguiente paso fue colocar 500 μl en cada pozo de los suero de conejo disuelto en BSA 0.3 %, se usaron los suero de los tiempos T0, y T4 del conejo JC. De cada suero se usaron diluciones 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600, las muestras se hicieron por triplicado. Los sueros se dejaron incubar durante la noche en refrigeración a 5

°C. Al terminar la incubación se lavaron los pozos 5 veces con PBS.

Se añadieron 500 μl de anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina, éste en una dilución de 1:15000 en BSA 0.3%. Se dejó incubar durante 2 hrs a 37°C. Al transcurrir el tiempo se lavó 5 veces con BSA 0.3%. Luego se agregaron 500 μl PNPP al 0.1% en un tampón de DEA a cada pozo. Se incubó por 15 min a 37°C. Las muestras se transfirieron a placas de 96 pozos para leer la absorbanica a 450 nm en el lector de microplacas.

La imagen 6.6, se muestra el ensayo ELISA modificado sobre las películas de polímeros conductores, la principal diferencia con el ensayo convencional es que el antígeno se deposita sobre la película y posteriormente esta se pega sobre el pozo de titulación.

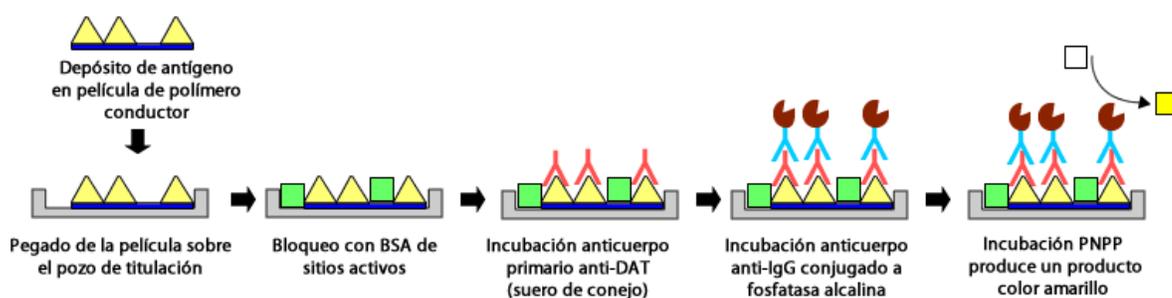


Figura 6.6: Esquemade los pasos para el ensayo ELISA modificado sobre polímeros conductores.

6.3.3. Inmunoensayos con sueros humanos

Se realizó un ELISA con los sueros de humanos infectados con TB para confirmar que el DAT sobre los polímeros conductores es capaz de detectar una diferencia entre los sueros sanos e infectados. Se hizo un ensayo sobre películas de PANi y otro sobre PPy, ambas sintetizadas electroquímicamente, los dos ensayos se hicieron de forma idéntica. Se utilizó el suero del conejo JC en tiempos T0 como control y T4 hiperinmune.

De forma similar que en los ensayos anteriores, se colocaron 2 μg de DAT sobre cada cuadro de sustrato y cada cuadro se adhirió a los pozos usando pegamento. Se bloquearon los sitios activos con 700 μl de una solución de BSA al 3% (w/v). Se incubó 2 hrs a 37°C, al terminar la incubación se realizaron 3 lavados con PBS.

Se colocaron 500 μl en cada pozo de los sueros de humanos en solución de BSA 0.3% a una dilución de 1:100, se usaron 5 sueros de humanos infectados con TB y 5 sueros de humanos sanos como control, cada muestra se hizo por triplicado. Los sueros se dejaron incubar durante la noche en refrigeración a 5°C, después de la incubación se lavaron los pozos 5 veces con PBS.

Posteriormente se añadieron 500 μl de anti-IgG de humano conjugado a fosfatasa alcalina (Aldrich Prod. No. A542) en dilución de 1:20000 en BSA 0.3%. Se dejó incubar durante 2 hrs a 37°C. Al finalizar se lavó 5 veces con BSA 0.3%. Para revelar la placa se agregaron a cada pozo 500 μl PNPP (*para* nitrofenil fosfato) al 0.1% en tampón de DEA (dietanolamina). Se incubó por 15 min a 37°C. Las muestras se pasaron a placas de 96 pozos para su lectura a 450 nm.

6.4. Inmunoensayo con espectroscopia de impedancia electroquímica

Los ensayos por espectroscopia de impedancia electroquímica se realizaron sobre los soportes de PPy y PANi. Se usaron los sueros del conejo JC en los tiempos T0 como control y T4 como hiperinmune. Se realizaron mediciones de EIS entre cada paso de incubación de los soportes.

Se prepararon los soportes de PANi y PPy, cortando los sustratos en rectángulos con un tamaño de 1 cm x 2.5 cm. En cada soporte se depositaron 4 μg de DAT. Los sitios activos de los soportes se bloquearon colocando 1.5 mL de la solución de BSA en PBS al 3% (w/v) para cada pozo en una placa de 24 pozos. Se dejó incubar la placa 2 hrs a 37°C. Al terminar la incubación se realizaron 3 lavados con PBS. Se colocaron 1.3 mL en cada pozo de los suero de conejo en dilución 1:100 en solución de BSA 0.3%, para cada muestra se usaron 6 películas. Los sueros se dejaron incubar

durante la noche en refrigeración a 5°C. Al terminar la incubación se lavaron los pozos 5 veces con PBS.

Para las lecturas de EIS la celda se uso como se observa en la figura , como electrolito se uso PBS 1X. Las lecturas se hicieron a una frecuencia de 30 000 Hz a 0.3 Hz (potenciostato A Gill AC) para la PANi y el PP. para el PPy además de ésta se hizo una lectura más en el rango de 100 000 Hz a 0.1 Hz (potenciostato Gamry Reference 3000), la amplitud de rango en ambos casos es la máxima que ofrecia cada potenciostato, y se decidió medirlas de esta forma ya que no se conocia el rango específico de frecuencias para las impedancias de interés. Para todas las lecturas, se uso un valor de 32 mV RMS y se le dio 30 segundos de reposo a la celda entre cada lectura . Con los datos obtenidos se hizo un modelo de circuito basado en los modelos reportados en algunas publicaciones [43], [50], [51], [52], [53]. Con los modelos que se obtuvieron para cada soporte, se hizo un programa en MATLAB para extraer los datos de las gráficas de cada electrodo antes de la incubación con el suero y después de la incubación, se compararon la impedancia, resistencia de carga, capacitancia de superficie y la impedancia compleja.

6.5. Inmunoensayo electroquímico con anticuerpos secundarios conjugados a HRP

Para concluir con el proceso experimental, se realizaron inmunoensayos electroquímicos usando como marcadores anticuerpos conjugados a HRP. En la figura 6.7, se observa el funcionamiento de esta plataforma; sobre el electrodo de ITO se electrodepositó el polímero PPy junto con el mediador azul de metileno (MB), después de depositar el antígeno y captar los anticuerpos de interés, se agrega el marcador que es un anticuerpo anti-IgG unido a la enzima HRP, posteriormente se agrega H₂O₂, la HRP reduce el peróxido y genera un agente oxidante el cual oxida al MB y este último libera electrones que son transportados hacia el electrodo directamente o mediante la película de PPy.

Este ensayo se llevó a cabo usando suero hiperinmune y control del conejo JC,

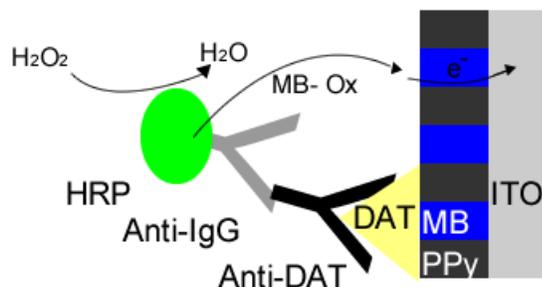


Figura 6.7: Esquema de la reacción de HRP; en presencia del peróxido de hidrógeno la enzima actúa como oxidante con el mediador MB, el cual libera electrones que son captados por el electrodo.

también se hizo el mismo ensayo para sueros de humanos infectados y se usaron sueros de humanos sanos como control.

Los soportes se prepararon usando rectángulos de PET recubierto de ITO con un tamaño de 1 cm x 1.8 cm. Se preparó una solución con 0.1 M de pirrol y 0.1 M de azul de metileno en acetonitrilo. El depósito se realizó por voltametría cíclica usando 3 ciclos, con un rango de 200 a 1500 mV, a una tasa de 100 mV/s. Los soportes se sometieron a tratamiento térmico a 50°C por 3 horas antes de realizar el depósito de antígeno.

A cada soporte se le agregó 4 µg de DAT, usando 60 µl de una mezcla de hexano-etanol (1:1, vol/vol). Los ensayos se realizaron en placas de 12 pozos (NUNC 42475). A cada pozo de la placa de titulación se le agregó 1.5 mL de solución de BSA en PBS al 3% (w/v) para el bloqueo de sitios activos. Las películas de PPy se sumergieron en los pozos y se incubaron durante 2 hrs a 37°C. Al terminar la incubación se realizaron 3 lavados con PBS. Posteriormente se colocaron 1.2 mL en cada pozo de los suero en solución de BSA 0.3%. En el caso de sueros humanos se usaron diluciones 1:100, para el suero de conejo se hicieron diluciones 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800. La placa se dejó en incubación durante la noche a 4°C, al terminar se hicieron 5 lavados con PBS 1X. Se colocaron 1.2 mL del anticuerpo conjugado a HRP (humano ab97225 y conejo ab6721) en solución de BSA 0.3% en una dilución 1:10000. Se incubó la placa

por 2 hrs a 37°C, al terminar se hicieron 5 lavados con BSA 0.3%, se dejaron en esa solución hasta el momento de realizar la lectura electroquímica.

Capítulo 7

Resultados y discusión

7.1. Obtención del antígeno DAT y suero hiperinmune

7.1.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

Para obtener el DAT se realizó una serie de procesos de purificación en columnas de sílice. Después de la extracción de lípidos, se realizaron placas de CCF para verificar la pureza de las fracciones obtenidas.

La figura 7.1, muestra la placa CCF con las fracciones obtenidas de la primera columna con los lípidos totales de *M. fortuitum*. Los lípidos de la columna desílice se eluyeron con solventes de polaridad creciente (metanol-cloroformo, de 0 a 20 %) en pasos de 2.5 %, las fracciones se compararon con un estándar previamente identificado como DAT, el antígeno fue monitoreado a través de los derivados de furfural para identificación de azúcares. F1 corresponde a las diluciones de proporción $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (87.5:12.5), estas fueron pasadas por otra columna de purificación con mayor resolución.

La figura 7.2 presenta el análisis por CCF de la segunda columna, en la cual se purificaron en eluciones de los solventes metanol-cloroformo, de 0 a 15 %, en pasos de 1.5 %, se observan que las fracciones 5 y 6 contienen una mayor cantidad de antígeno

DAT, estas corresponden a diluciones de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (87.5:12.5 y 89:11).

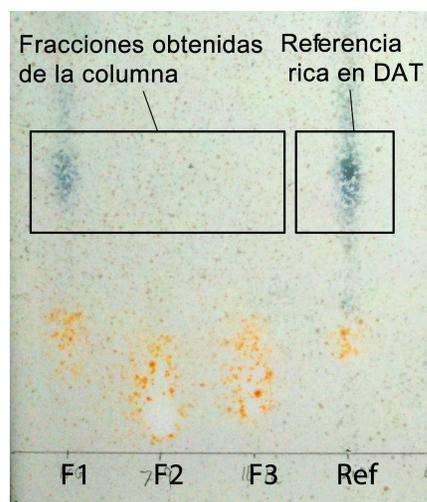


Figura 7.1: Análisis por CCF con las fracciones de extractos lipídicos totales que contenían glicolípidos medianamente polares. El revelado fue realizado con antrona al 2% en $\text{H}_2:\text{SO}_4$

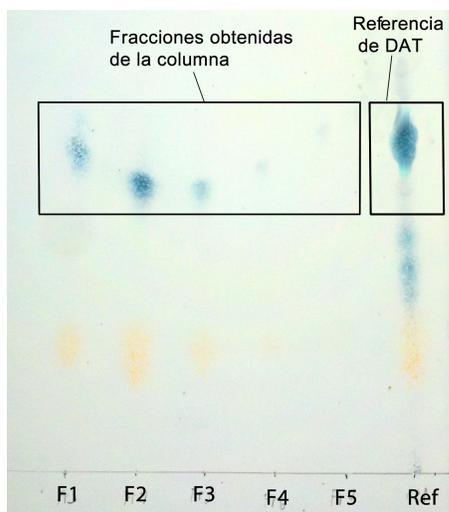


Figura 7.2: Análisis por CCF de las fracciones enriquecidas con lípidos. El revelado fue realizado con antrona al 2% en $\text{H}_2:\text{SO}_4$

La eluciones obtenidas de las columnas anteriores, fueron separadas por mini columnas Sep-Pak y por PLC (Preparative Liquid Chromatography). La figura 7.3, muestra las fracciones obtenidas de la mini columna en la cual se puede observar que la fracción correspondiente a una dilución $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (94:6), contiene DAT puro; de forma similar se observa como el lípido obtenido de la PLC es DAT puro. Se obtuvo un mejor rendimiento de DAT de las columnas Sep-Pak, aproximadamente 2 mg de DAT por cada 10 mg de lípido, para la extracción por PLC se obtuvieron aproximadamente 0.5 mg de DAT por cada 10 mg de lípido. El DAT obtenido por este procedimiento, fue usado para la inmunización de conejos e inmunoensayos posteriores.

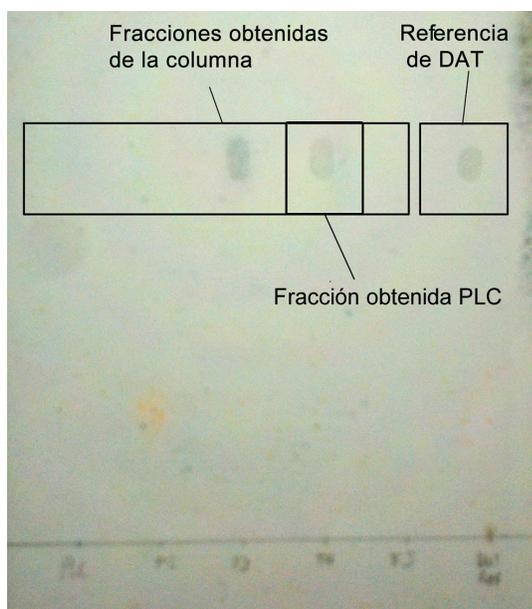


Figura 7.3: Análisis por CCF de las fracciones obtenidas de las microcolumnas Sep-Pak y de la PLC, se obtuvo DAT purificado. El revelado fue realizado con antrona al 2% en H_2SO_4

7.1.2. Control de calidad de los inmunoreactivos

Se llevo a cabo un inmunoensayo con DAT purificado y los sueros hiperinmunes de conejo (que contiene anticuerpos anti-DAT), para comprobar que ambos mantuvieron su bioactividad y para determinar las muestras de sueros a usar, así como para establecer los tiempos de incubación sobre el soporte para ensayos posteriores. De los dos conejos inmunizados, se obtuvieron sueros sanguíneos a 3 tiempos, $t=0$ (antes de inmunizar el conejo), $t=2$ (después de 40 días de inmunización) y $t=4$ (después de 80 días de inmunización). En la figura 7.4 se muestran los resultados del ensayo, se observa como la actividad es dependiente de la concentración del suero sanguíneo, y se muestra el suero del $t = 4$ tiene una mayor concentración de anticuerpos anti-DAT.

De los resultados obtenidos, se determinó que el suero a usar durante los ensayos sería el $t=4$, era de esperarse que este tiempo tuviera más anticuerpos; durante la producción de anticuerpos se tiene una fase inicial de retardo, en el que un clon específico de célula B productora de anticuerpos comienza a reproducirse, posteriormente se tiene una fase donde el número de células B es mayor y la producción de anticuerpos crece exponencialmente.

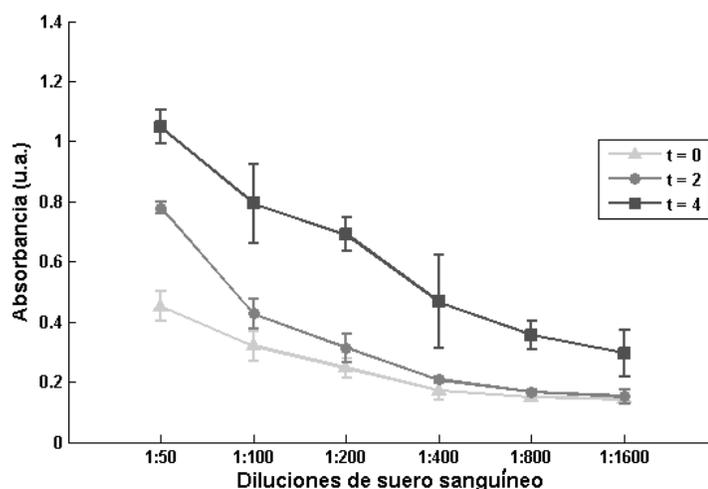


Figura 7.4: Resultados de ELISA de la bioactividad del suero de conejo y el antígeno DAT.

7.2. Resultados del soporte basado en PANi

7.2.1. Voltametría cíclica para síntesis de películas de polianilina

La figura 7.5, muestra un voltamograma de la síntesis de las películas de PANi, el cuál coincide con los reportados con condiciones similares [54][55]. Los picos b y c, son picos de oxidación del monómero sobre el electrodo de trabajo que indican la transición del estado emeraldina a leucoemeraldina, aunque en general se considera que ambos estados se encuentran en cierta medida en la película. Los picos e y d son de reducción del monómero, indican el paso de emeraldina a pernigranilina; conforme la película crece se puede observar la aparición de los picos a y d, que son característicos de la oxidación y reducción, respectivamente, de la película de PANi. Debido a que el proceso de polimerización termina durante la parte de oxidación como se mencionó en el capítulo 1, las películas finales se obtuvieron en estado emeraldina medio oxidada.

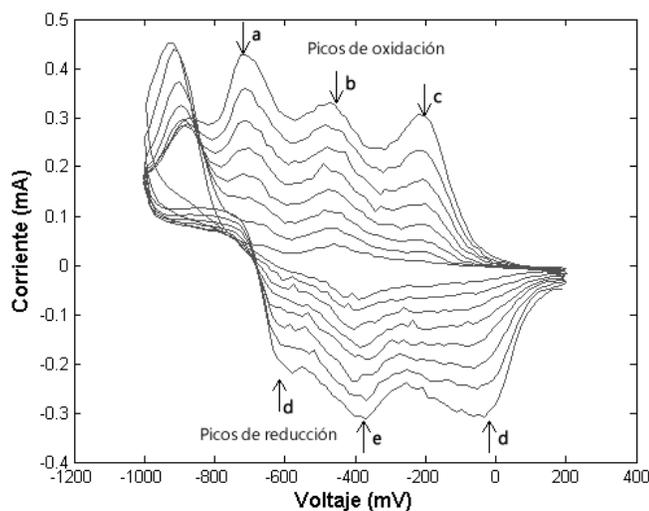


Figura 7.5: Voltametría cíclica del crecimiento de películas de PANi. Rango de voltaje de -200 mV a +1600 mV a una tasa 50 mV/s, 7 Ciclos.

Las películas se sintetizaron con un rango de -200 mV a +1600 mV a una tasa de 50 mV/s. La figura 7.6, muestra algunas de las películas obtenidas con diferentes ciclos. Se observó que con 7 ciclos se obtenían películas con espesor, adherencia y reproducibilidad adecuados. Durante el depósito se obtuvieron películas dopadas de un color verde esmeralda, como era de esperarse al realizar el lavado con agua éstas se desdoparon cambiando de color verde a un azul claro. En general se observó que las películas sintetizadas por el método electroquímico fueron más uniformes y reproducibles que las obtenidas por el método químico, ya que los voltamogramas del crecimiento de las películas no mostraron variaciones significativas en los gráficos de corriente-voltaje.

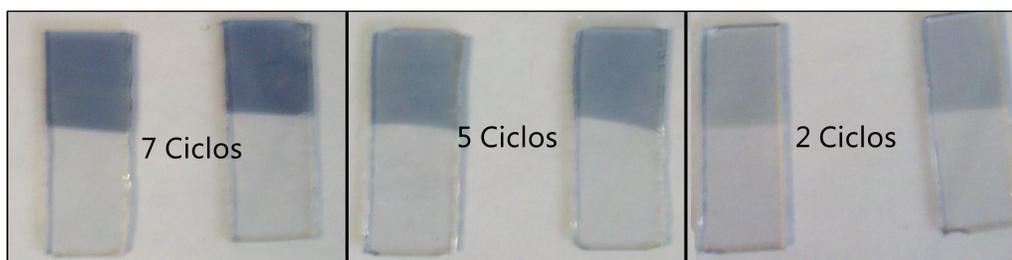


Figura 7.6: Películas de PANi obtenidas electroquímicamente, con diferente número de ciclos de CV (-200 mV a +1600 mV a una tasa de 50 mV/s). Se observó un crecimiento más uniforme y reproducible en las películas con 7 ciclos.

7.2.2. Determinación de la cantidad óptima de DAT para los inmunoensayos sobre polímeros conductores

La cantidad óptima de DAT a depositar sobre las películas de polímeros conductores, fue determinada mediante un ELISA sobre PANi, utilizando un suero de conejo en dilución 1:100 y variando la cantidad de DAT depositada. En la figura 7.7 se muestra el ensayo con cantidades crecientes de DAT (0, 8, 16, 32, 64 y 128 μg por película de 1 cm^2).

Se observó que no hay un cambio significativo en la densidad óptica al aumentar la cantidad de DAT depositado, de hecho con 4 y 8 μg se observó una menor desviación

estándar en los resultados. Probablemente este efecto es debido a la saturación de la película con $4 \mu\text{g}$ de antígeno, a mayores dosis puede adherirse más antígeno de forma heterogénea (por ejemplo a través de enlaces de Van der Waals entre lípidos), lo cual provoca un cambio en el área superficial de sitios donde pueden captarse anticuerpos y posiblemente la pérdida del antígeno durante los lavados del inmunoensayo.

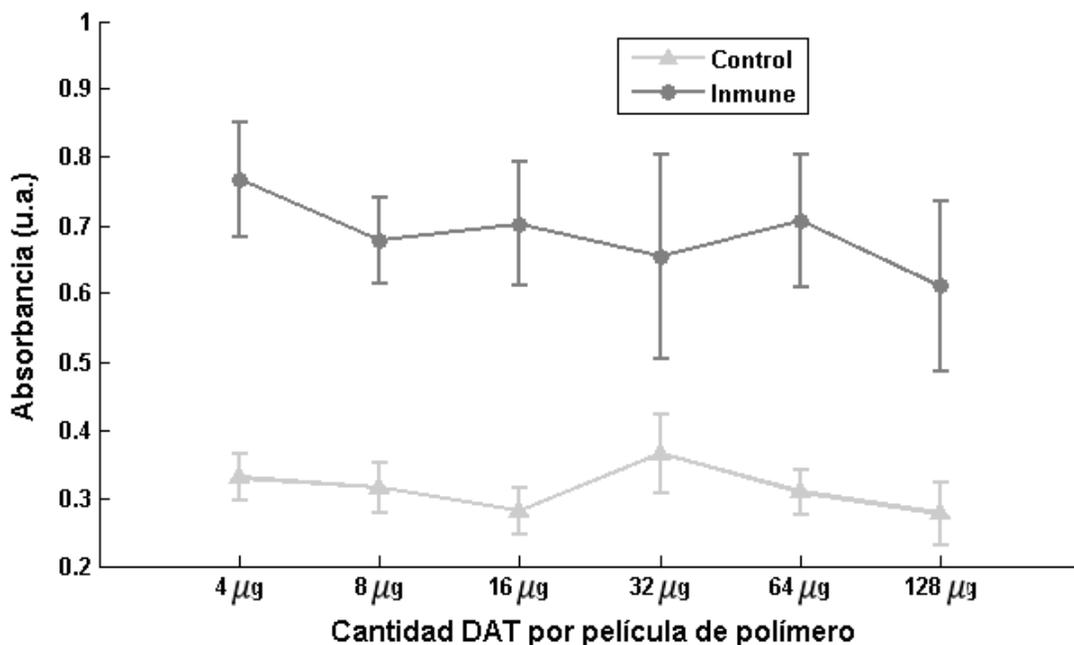


Figura 7.7: ELISA para determinar la cantidad óptima de DAT a colocar sobre películas de PANi, utilizando de $4 \mu\text{g}$ a $128 \mu\text{g}$ de DAT.

Ya que el primer ensayo indicó que la cantidad óptima de DAT para depositar en 1 cm^2 es menor o igual a $1 \mu\text{g}$, se realizó otro ensayo usando cantidades de DAT de 0.5 a $16 \mu\text{g}$. Como se observa en la figura 7.8, un aumento en la cantidad de DAT superior a $8 \mu\text{g}$ por película, resulta en una menor variabilidad en los resultados del ensayo. Con dosis de 2 a $8 \mu\text{g}$ de DAT se observan resultados reproducibles, por lo que se decidió utilizar una cantidad de $2 \mu\text{g}$ por película en los ensayos subsecuentes.

Los ensayos posteriores, fueron planeados para comparar la diferencia entre las películas sintetizadas por el método químico y electroquímico utilizando suero hiper-

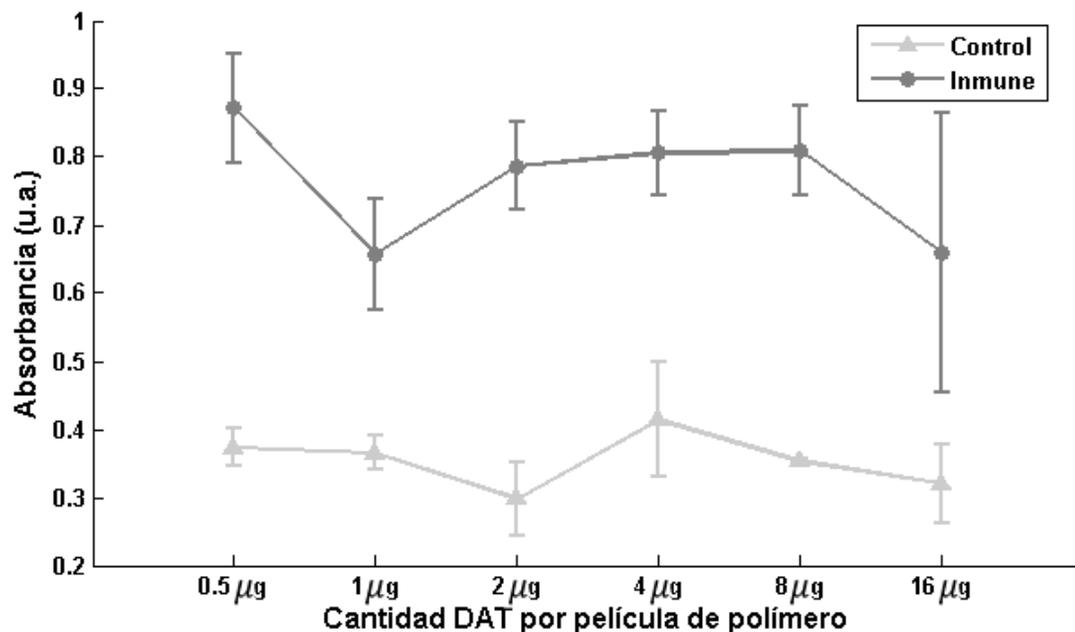


Figura 7.8: ELISA para determinar la cantidad óptima de DAT a colocar sobre películas de PANi, utilizando de 0.5 µg a 16 µg de DAT.

inmune de conejo. Así mismo, se realizó un inmunoensayo con una pequeña muestra de sueros humanos en donde se incluyeron 5 sueros de individuos sanos y 5 de individuos con TB pulmonar que responden al antígeno DAT, para comprobar la utilidad de la plataforma de PANi como soporte de detección.

7.2.3. Inmunoensayo con suero de conejo sobre PANi

Para los ensayos, los sueros de conejo fueron diluidos de manera seriada desde una dilución 1:50 hasta 1:1600. La respuesta obtenida en ambos ensayos fue mayor en las muestras con suero hiperinmune que en las de suero control, y es dependiente de la dilución. En la figura 7.9, se puede observar una absorbancia máxima con la dilución 1:200, probablemente debido a la saturación de antígeno biodisponible sobre la superficie de la película. Por otro lado la respuesta inespecífica aumento

considerablemente al utilizar diluciones $\leq 1:100$.

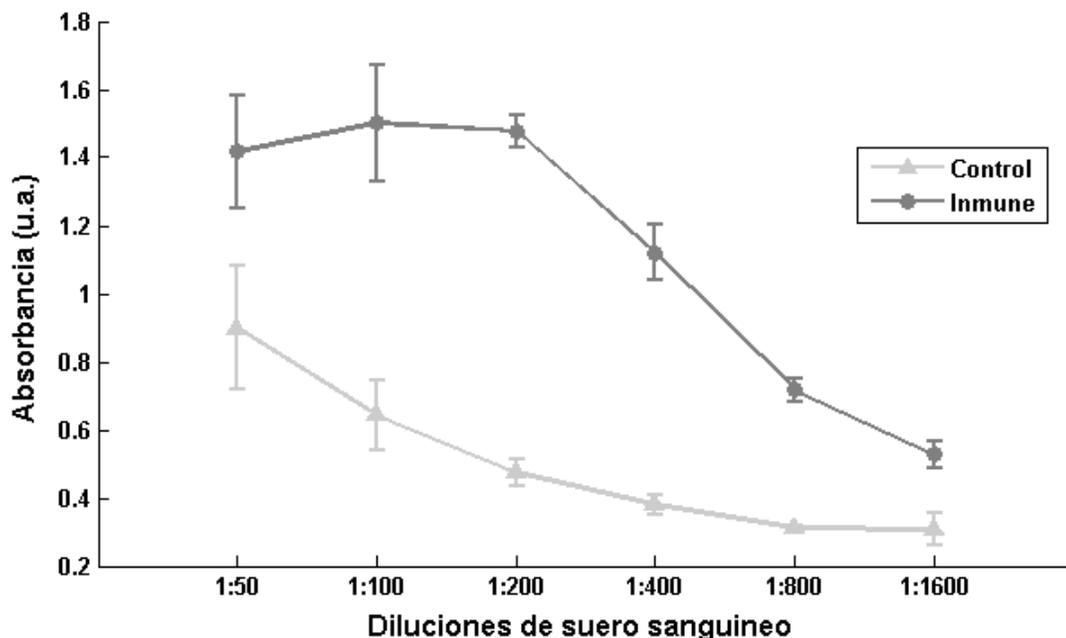


Figura 7.9: Inmunoensayo con suero de conejo, utilizando $2 \mu\text{g}$ de DAT sobre películas de PANi sintetizadas químicamente.

Para el inmunoensayo sobre PANi sintetizada electroquímicamente, se observa (figura 7.10) que la curva resultante es dependiente de la dilución y lineal, además que muestra una menor tendencia a encontrar respuesta inespecífica conforme aumenta la concentración del suero preinmune, comparada con el ensayo sobre PANi sintetizada químicamente. Estas diferencias sugieren que el depósito de antígeno en las películas sintetizadas electroquímicamente, es más heterogéneo, lo cual es de esperarse, ya que como se mencionó en el capítulo 1, la PANi sintetizada químicamente tiene mayor rugosidad debido a que tienden a formarse cadenas de oligómeros que se adhieren a la superficie de la películas, si bien esto otorga una mayor superficie y podría aumentar la sensibilidad del sistema, al no tener control sobre la rugosidad se obtienen resultados variables. Por otro lado en la PANi sintetizada electroquímica

el crecimiento es uniforme, queda por determinar si esta diferencia en el depósito del polímero es la causa de la discrepancia en la respuesta.

En base a estos resultados, se decidió utilizar la PANi obtenida electroquímicamente, para realizar un ensayo con sueros humanos.

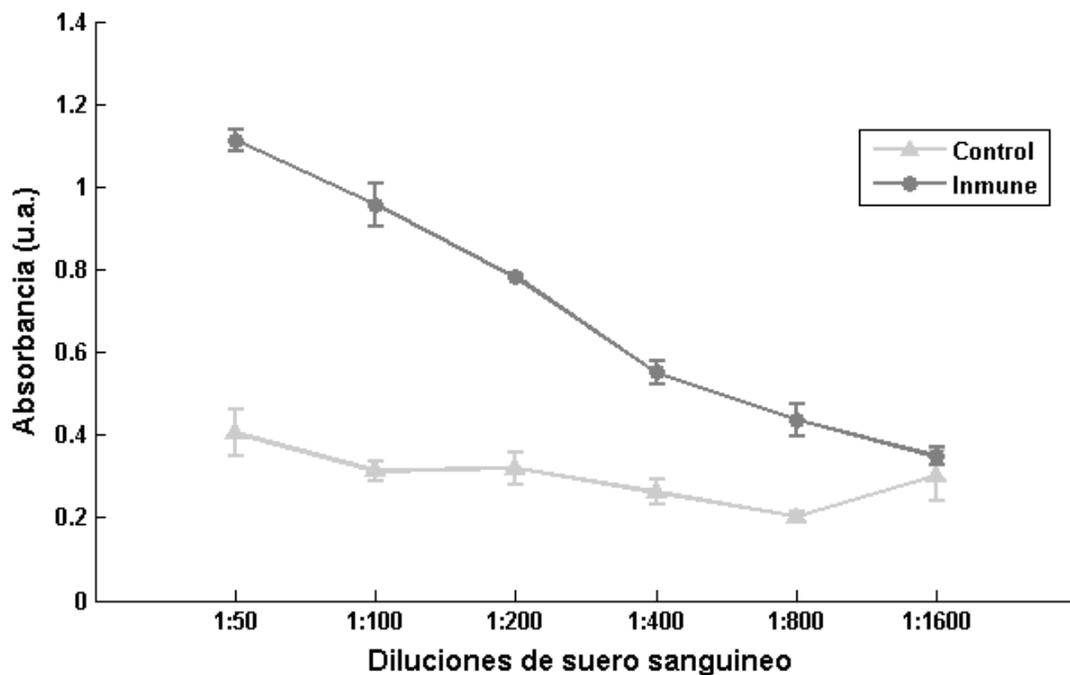


Figura 7.10: Inmunoensayo con suero de conejo, utilizando $2 \mu\text{g}$ de DAT sobre películas de PANi sintetizadas electroquímicamente.

7.2.4. Inmunoensayo con sueros humanos sobre PANi

Para comprobar la funcionalidad del soporte para la detección de anticuerpos asociados a TB, se realizó un inmunoensayo sobre PANi usando 5 sueros de humanos sanos y 5 sueros de humanos afectados por TB. La figura 7.11, muestra como para los sueros control se obtuvo una respuesta de baja densidad óptica y pero dispersa, esta dispersión es de esperarse en muestras humanas ya que las condiciones de

cada paciente son diferentes, contrario a los sueros hiperinmunes que se obtuvieron en condiciones controladas. En contraste los sueros de individuos con TB presentan una alta reactividad con el DAT depositado sobre la PANi. Algunas de estas muestras presentan una respuesta claramente superior a la encontrada con los sueros de individuos sanos, con un efecto de tamaño (ES, por sus siglas en inglés) igual 3.08 y un porcentaje de diferencia (S) $> 99\%$ [56]. Estos resultados indican que existe una diferencia significativa entre el uso de ambas muestras, por lo que el soporte es adecuado para la captura de anticuerpos asociado a TB activa.

El siguiente paso fue realizar un inmunoensayo sobre PANi utilizando EIS para realizar la cuantificación de anticuerpos.

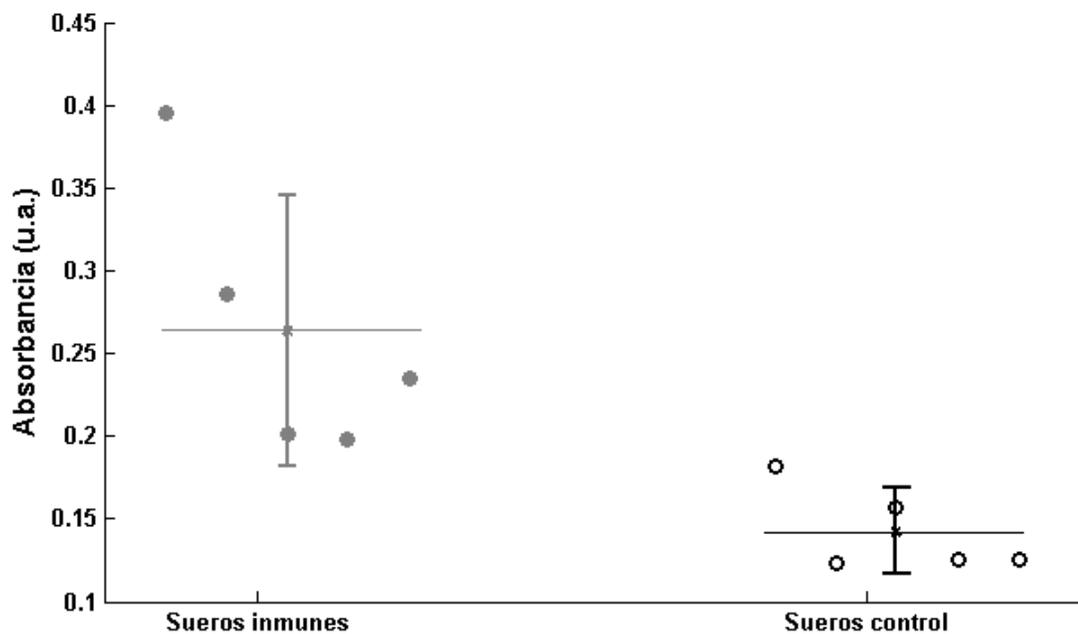


Figura 7.11: Inmunoensayos sobre películas de PANi con sueros de humanos en dilución 1:100 con $2 \mu\text{g}$ DAT por soporte.

7.2.5. Ensayo EIS sobre PANi

Los experimentos anteriores demostraron que es posible medir la diferencia entre sueros inmunes y controles usando métodos de cuantificación ópticos, estos métodos requieren un marcador secundario y pasos adicionales durante el ensayo. Para tratar de eliminar la necesidad de estos reactivos, se hizo un ensayo de EIS para observar si era posible detectar una diferencia entre los sueros de forma electroquímica.

La figura 7.12, muestra uno de los diagramas de Nyquist que se obtuvieron en los ensayos de EIS sobre PANi. En el gráfico se observa un desplazamiento de las dos lecturas, debido a la resistencia de carga, la cual es causada por la resistencia del electrolito donde se realizan las mediciones, por lo cual es irrelevante para nuestras lecturas. En base a lo mencionado en el capítulo 1 sección 1.4.3 y los modelos obtenidos en publicaciones similares [43] [50], podemos deducir que cada gráfica contiene dos zonas importantes, un semicírculo que es provocado por los cambios de resistencia y capacitancia en el soporte, y una zona lineal que es un incremento de capacitancia causada por fenómenos difusivos adicionales a los de la doble capa. Estas lecturas muestran que existe un cambio de las propiedades eléctricas antes y después de la incubación con sueros. En el diagrama de Bode (figura 7.13), se puede apreciar como con altas y bajas frecuencias no hay una diferencia significativa entre ambas lecturas, sin embargo se puede observar un desplazamiento de fase entre el suero inmune y el control en el rango de frecuencias de 100 a 1000 Hz. Los resultados de las lecturas sugieren que es posible detectar diferencias entre sueros inmunes y control, el siguiente paso es encontrar un modelo de circuito eléctrico para poder determinar cuáles elementos contribuyen con los cambios de las propiedades eléctricas.

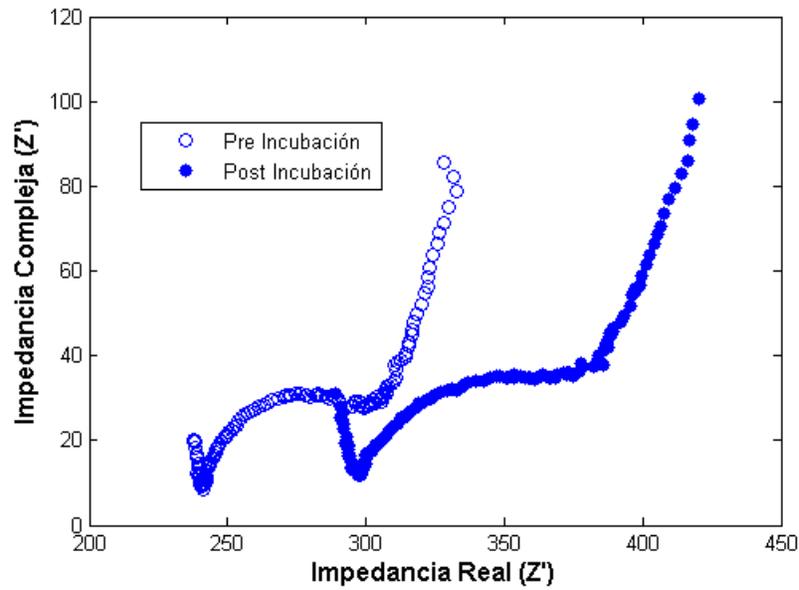


Figura 7.12: Espectro de Nyquist de las películas de PANi antes y después de la incubación con suero de conejo.

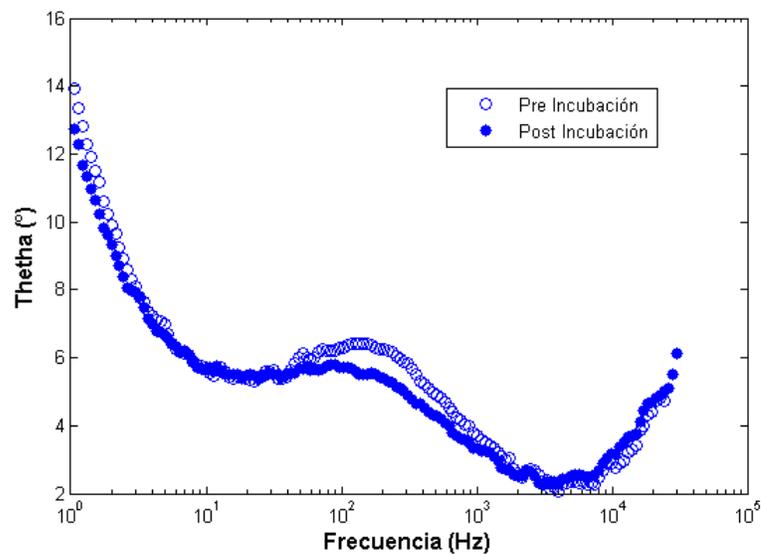


Figura 7.13: Espectro de Bode de las películas de PANi antes y después de la incubación con suero de conejo.

7.2.6. Modelo de circuito eléctrico del soporte basado en PANi

Con los datos obtenidos de los diferentes ensayos de EIS, apartir de modelos similares en sistemas similares[43] [50] [51] [52] [53], se fueron interclando de forma numérica los diferentes modelos en MATLAB hasta obtener un modelo cercano que se ajustaba a las diferentes mediciones. Finalmente, se obtuvo el modelo de circuito para el soporte de PANi constituido de 3 partes (figura 7.14); (1) R_s es la resistencia de carga de la celda electroquímica; los circuitos paralelos de capacitor y resistencia $C_1 - R_1$ y $C_2 - R_2$, son elementos provocados por los puntos de conexión de la película de PANi y el cableado dentro de la celda electroquímica; el (2) corresponde a la parte del sistema en la solución de electrolito; (3) R_p y C_p , son la resistencia y capacitancia de la película de PANi. CPE es un elemento de cambio de fase constante debido a los fenómenos de difusión de la celda, algunos provocados por la doble capa y otros indeterminados; C_f es la capacitancia de la doble capa y R_f la resistencia de difusión.

Para confirmar la validez del modelo, este se comparó con los datos obtenidos, mediante una simulación en MATLAB. Además se utilizó la función de regresión no lineal de MATLAB. Las gráficas que se presentan, se muestra el ajuste para un suero pre-inmune, sin embargo ajusta bien para todas las mediciones. Se observa que la gráfica de Nyquist (figura 7.15), ajusta casi perfectamente excepto en la parte de inicio donde se obtienen algunos efectos provocados por las conexiones eléctricas de la celda con una $R=0.87212$. Para $Re(Z) < 275 \Omega$, el modelo no ajusta bien, debido a que no se tomaron en cuenta algunos elementos inductivos y de difusión posiblemente causados por las conexiones y el contacto de las orillas del ITO con la solución. Para el diagrama de Bode (figura 7.16), también se ajusta muy bien ($R=0.7512$), excepto en la parte de altas frecuencias, sin embargo la parte de interés (en el intervalo de 1 a 1000 Hz) se encontraron cambios significativos entre las películas incubadas con suero inmune y suero control.

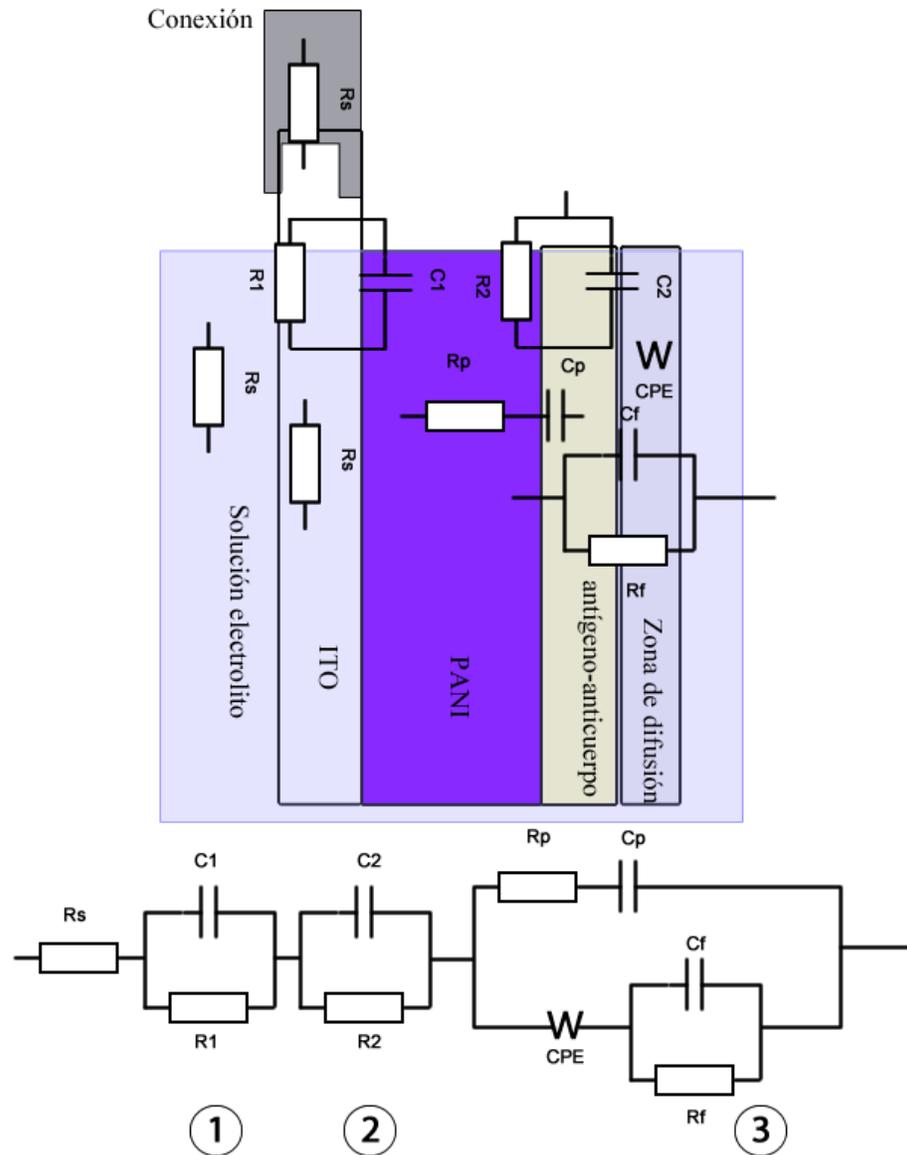


Figura 7.14: Modelo de circuito eléctrico obtenido a partir de la EIS en películas de PANi.

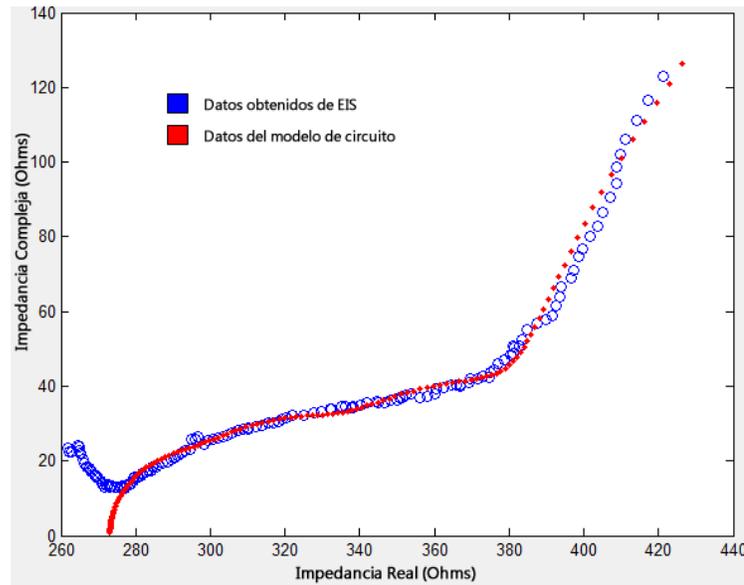


Figura 7.15: Ajuste del modelo obtenido con los datos de la EIS en PANi para la gráfica de Nyquist

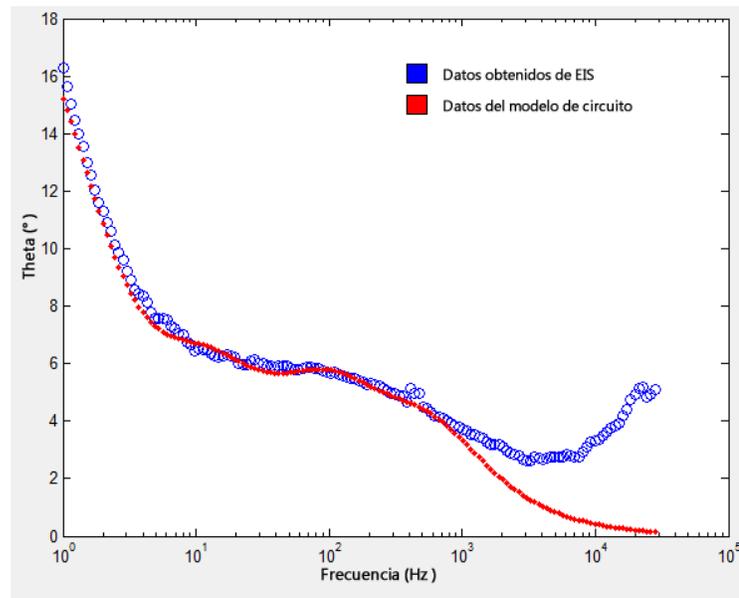


Figura 7.16: Ajuste del modelo obtenido con los datos de la EIS en PANi para la gráfica de Bode

7.2.7. Análisis de impedancias obtenidas de la EIS para PANi

La figura 7.17 presenta una comparación de los valores de impedancia obtenidos en los sueros inmunes y controles. Los gráficos muestran el promedio de la impedancia real y compleja para las muestras antes y después de la incubación del suero sanguíneo, en el grupo de películas control y en el grupo de películas inmunes; no se observa un cambio significativo en la impedancia real ($ES = 0.95$, $S < 82\%$) ni en la imaginaria ($ES = 0.58$, $S < 73\%$).

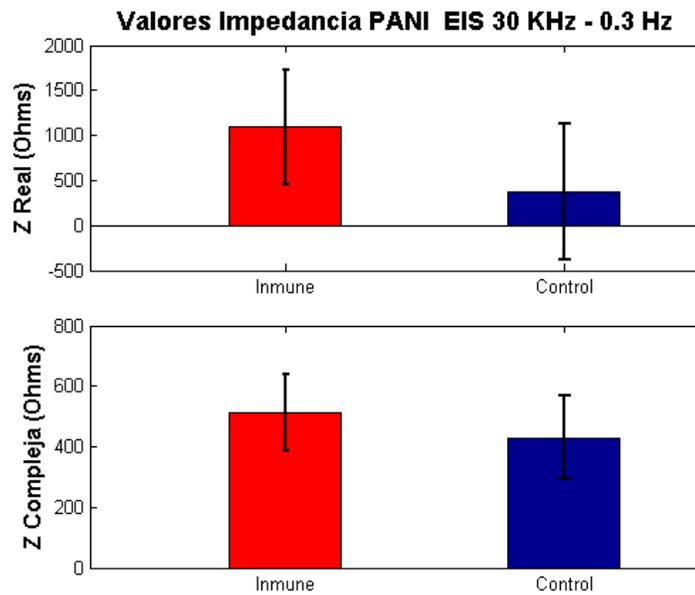


Figura 7.17: Comparación de los valores de impedancia entre los sueros inmunes y control, obtenidos del ensayo de EIS sobre PANi.

7.3. Resultados del soporte basado en PPy

7.3.1. Voltametría cíclica para síntesis de películas de polipirrol

La serie de experimentos se realizó para PPy de forma similar a los de PANi, ya que se esperaba que la mayor estabilidad electroquímica del PPy facilitara hiciera más reproducibles las mediciones, además que tiene una mejor conductividad, por lo que es un mejor mediador para pruebas que involucran un marcador como la HRP. Las películas de PPy fueron sintetizadas por medio de CV; la síntesis se realizó con diferente número de ciclos para obtener el espesor y adherencia adecuados. La figura 7.18, presenta voltamograma característico crecimiento de PPy; los picos observados en la gráfica coinciden con los reportados en la literatura [57] [58], los picos a y b corresponden a la parte anódica, donde el monómero pirrol se oxida sobre el electrodo de trabajo, mientras que los picos c y d corresponden a la parte catódica donde se reduce el monómero. El voltamograma muestra que el crecimiento sigue siendo uniforme independientemente del número de ciclos.

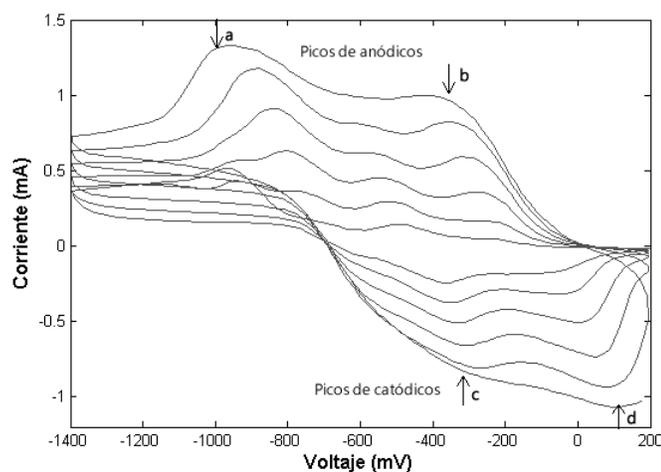


Figura 7.18: Voltametría cíclica para el crecimiento de películas de polipirrol. 7 ciclos, con un rango de voltaje 0 mV a +1600 mV, a una tasa de 100 mV/s.

La siguiente figura, 7.19, muestra algunas de las películas obtenidas a diferentes ciclos, para todas se usó un rango de 0 mV a +1600 mV a una tasa de 100 mV/s. Las películas que mostraron mejor adherencia y reproducibilidad fueron las obtenidas con 3 ciclos, por lo que éstas se eligieron para realizar los inmunoensayos posteriores.

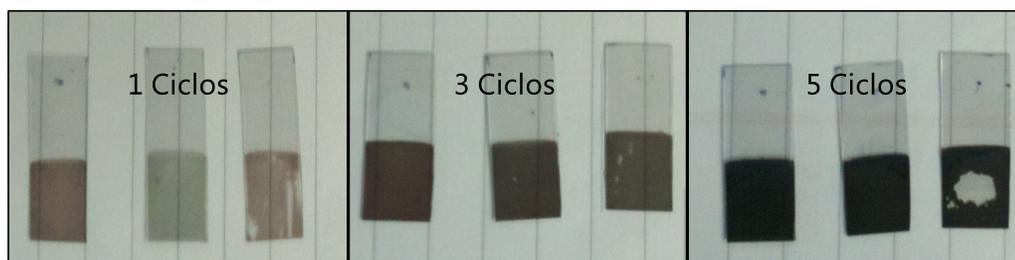


Figura 7.19: Películas de PPy obtenidas por CV a diferentes ciclos de crecimiento.

7.3.2. Inmunoensayo con suero de conejo sobre PPy

Se realizó un inmunoensayo sobre soportes de PPy usando suero de conejo diluido de forma seriada desde 1:50 hasta 1:1600, depositando $2 \mu\text{g}$ de DAT para el soporte. En la figura 7.20 se presenta la respuesta óptica en función de las diluciones de suero de conejo. La tendencia de los resultados es similar a la obtenida con PANi y se observa como la respuesta del suero hiperinmune es mayor que la del suero control. Además que es dependiente de la dilución del suero sanguíneo, la máxima absorbancia se alcanza a una dilución de 1:100. La respuesta ligeramente exponencial en función de la concentración de suero.

Los resultados de inmunoensayos con sueros de conejo, nos indican que el soporte obtenido en este proyecto de tesis se comporta de forma similar a las placas comerciales de microtitulación, por lo que puede ser utilizado para realizar inmunoensayos con la ventaja de que el soporte puede ser usado también para realizar las mediciones electroquímicas y realizar una cuantificación de anticuerpos captados de forma electroquímica. El siguiente experimento fue un ensayo sobre el soporte con PPy con sueros humanos.

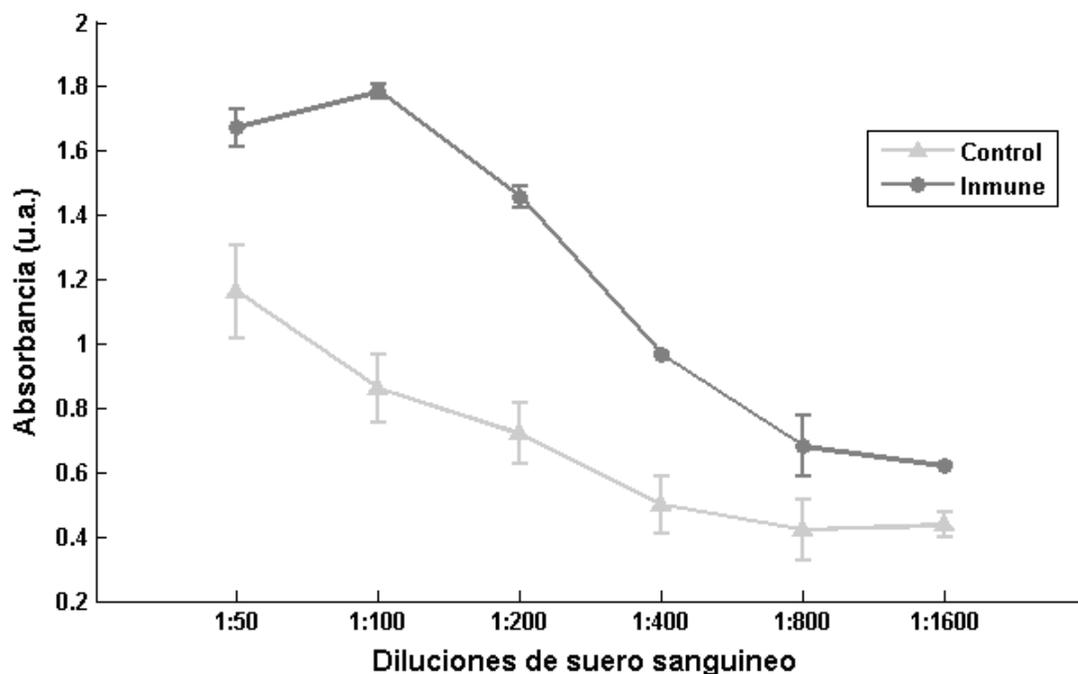


Figura 7.20: Inmunoensayo con suero de conejo, utilizando $2 \mu\text{g}$ de DAT sobre películas de PPy sintetizadas electroquímicamente.

7.3.3. Inmunoensayo con suero de humano sobre PPy

Se realizó un inmunoensayo sobre PPy usando sueros de humanos, para comprobar que es posible detectar anticuerpos característicos de TB con el soporte desarrollado; se usaron 5 sueros de individuos sanos como control y 5 sueros de humanos con TB. La figura 7.21, muestra que los sueros control mantienen una baja densidad óptica, por otro lado se observa que los sueros inmunes tienen una mayor densidad óptica y mayor dispersión, lo cual es de esperarse en sueros humanos de diferentes individuos. En contraste al ensayo realizado sobre PANi, en este se observa una diferencia mucho más clara con los 5 sueros inmunes con respecto a los control ($ES = 4.63$, $S > 99.9\%$).

Los resultados muestran que es posible usar el soporte para la captación y cuanti-

ficación de anticuerpos en individuos afectados por TB. En el siguiente experimento, fue utilizar la técnica de EIS para realizar la cuantificación de anticuerpos.

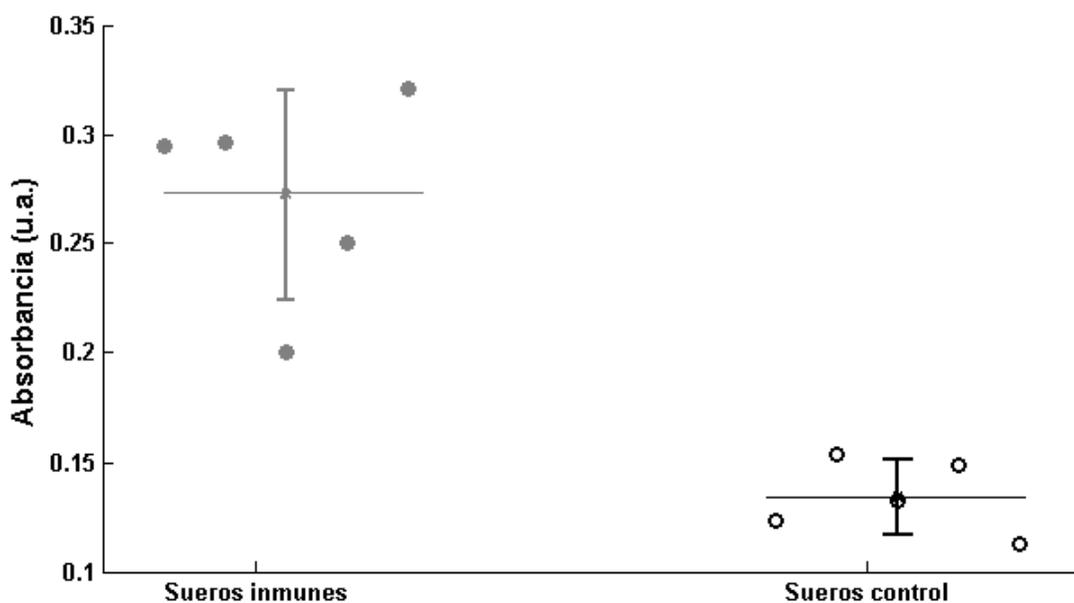


Figura 7.21: Inmunoensayos sobre películas de PANi con sueros de humanos en dilución 1:100 con $2 \mu\text{g}$ DAT por soporte.

7.3.4. Ensayo EIS sobre PPy 30 KHz a 0.3 Hz

Se realizaron dos inmunoensayos utilizando EIS, el primero se realizó en un rango de frecuencias de 30 KHz a 0.3 Hz. El diagrama de Nyquist del primer ensayo (figura 7.22), al igual que en el ensayo de PANi se observa un desplazamiento provocado por la resistencia de carga, además de un semicírculo el cual indica un cambio en la impedancia capacitiva y resistiva, también se observa una zona lineal, a diferencia de la PANi, esta es una línea de casi 90° lo que indica que no hubo fenómenos difusivos adicionales a los de la doble capa.

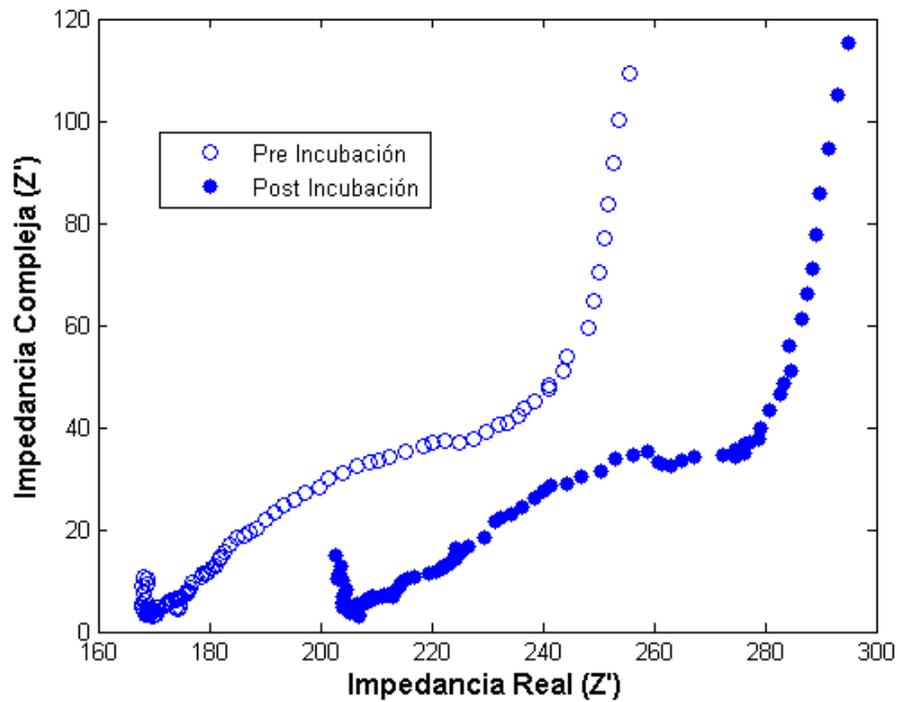


Figura 7.22: Espectro de Nyquist (30 KHz - 0.3 Hz) de las películas de PPy antes y después de la incubación con suero de conejo.

El diagrama de Bode (figura 7.23), se observan desplazamientos entre la curva del suero inmune y la del control, en el rango de frecuencias de 1 Hz y hasta 700 Hz aproximadamente; mientras que a altas y bajas frecuencias no se observan cambios significativos. En los ensayos de EIS de PANi y PPy se observan desplazamientos en rangos de frecuencias similares, lo cual puede ser un indicador de que estos son debidos a la adherencia de anticuerpos. Se hizo un experimento adicional aumentando el rango de frecuencias para PPy.

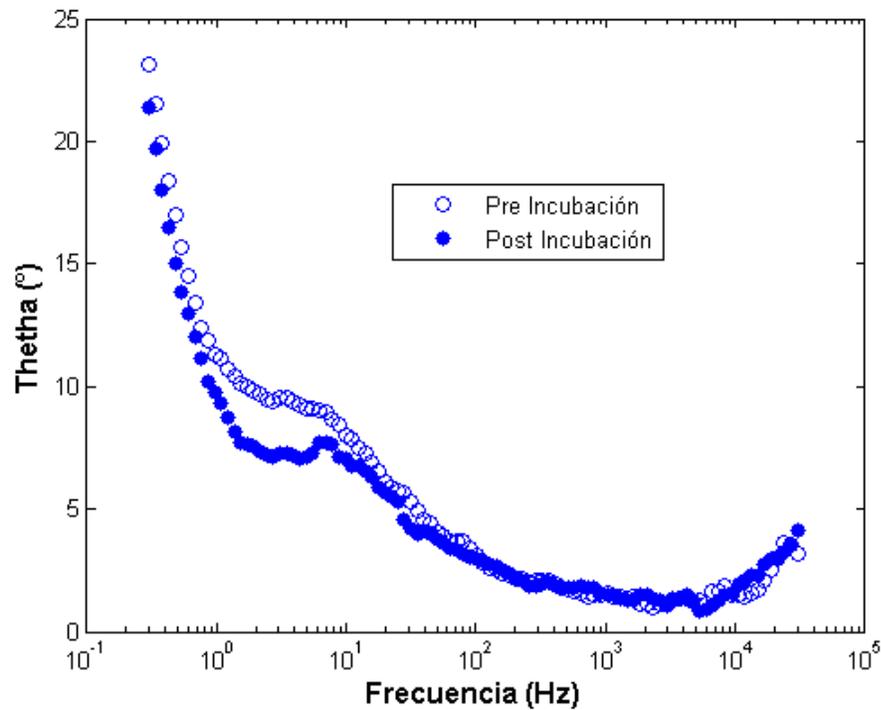


Figura 7.23: Espectro de Bode (30 KHz - 0.3 Hz) de las películas de PPy antes y después de la incubación con suero de conejo.

7.3.5. Ensayo EIS sobre PPy 100 KHz a 0.1 Hz

El diagrama de Nyquist (figura 7.24), muestra un semicírculo el cual indica un cambio de la resistencia y capacitancia antes y después de la incubación. A diferencia de las lecturas anteriores, no se muestra un desplazamiento ni fenómenos difusivos, esto se debe a que el equipo usado elimina estos elementos automáticamente al no ser relevantes para la lectura.

El diagrama de Bode (figura 7.25), muestra desplazamiento de fase similar a los obtenidos en los ensayos anteriores de PANi y PPy, sin embargo se observa un desplazamiento mucho menor del ángulo de fase, probablemente debido a que el sistema compensó elementos de cambio de fase constante (CPE), es decir capacitancias

ajenas al sistema de interés y producidas por los puntos de contacto. Se observan desplazamientos en frecuencias de 1 a 700 Hz, lo cual es consistente con la lectura de PPy de 30 KHz - 0.3 Hz. Este desplazamiento, se debe posiblemente al cambio de la superficie de la películas debido a la adherencia de anticuerpos. El siguiente paso fue determinar el modelo de circuito del soporte basado en PPy, determinando el valor de los diferentes elementos, sería posible determinar con precisión el cambio de impedancia producido por los anticuerpos que se adhieren.

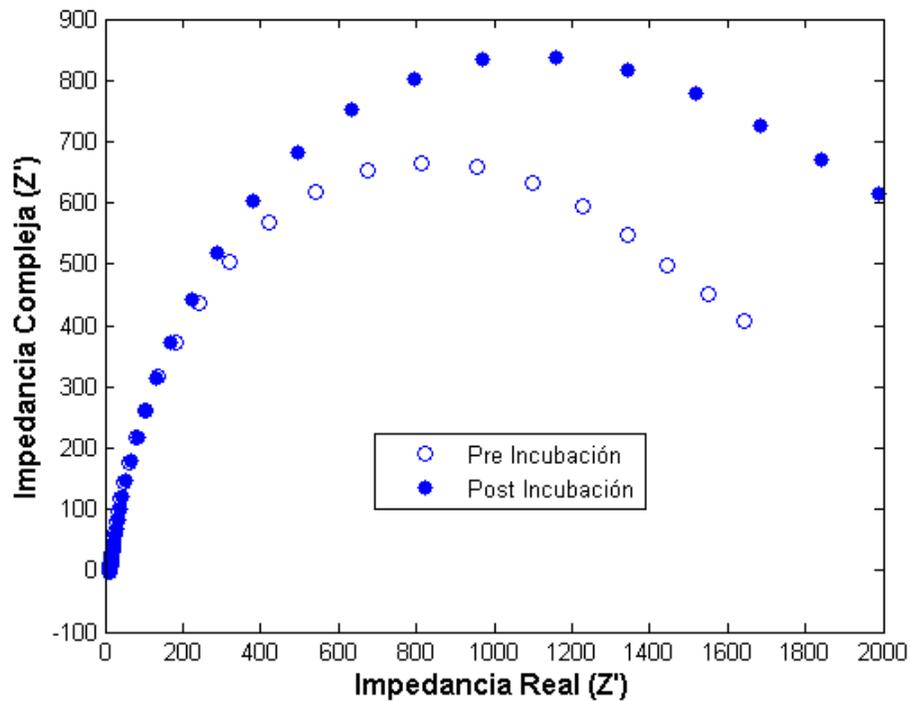


Figura 7.24: Espectro de Nyquist (100 KHz - 0.1 Hz) de las películas de PPy antes y después de la incubación con suero de conejo.

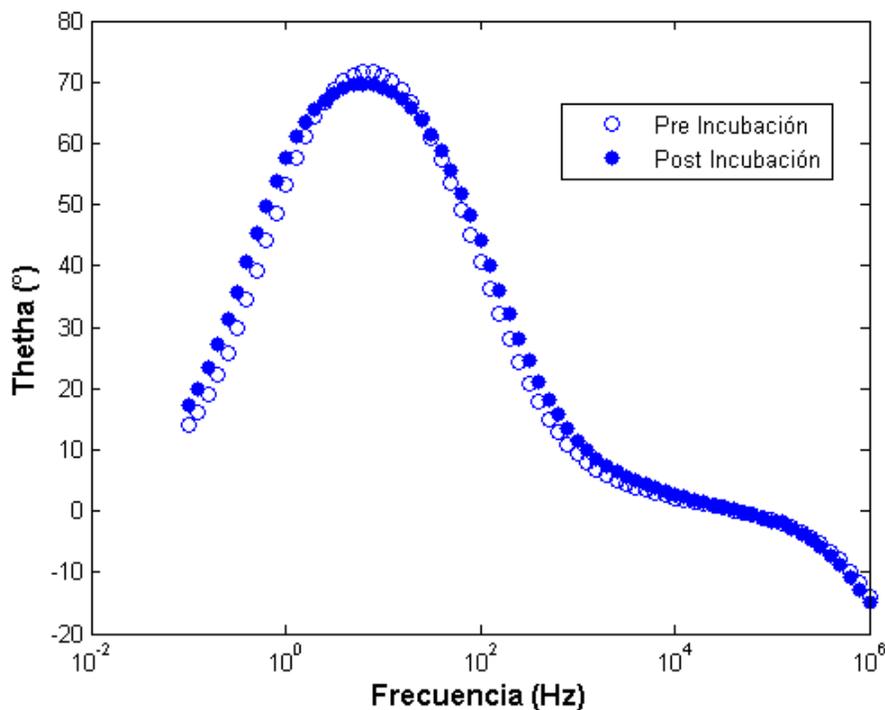


Figura 7.25: Espectro de Bode (100 KHz - 0.1 Hz) de las películas de PPy antes y después de la incubación con suero de conejo.

7.3.6. Modelo de circuito eléctrico del soporte basado en PPy

Para los ensayos con PPy (figura 7.26), se siguió el mismo método para obtener un modelo de circuito, para este caso se obtuvo un modelo más complejo comparado con el de PANi. I_1 es un elemento inductivo que se presentó debido al cableado y a las altas frecuencias. La parte 1 del circuito, probablemente fue causada por parte del lípido que paso a la zona del electrodo donde no había PPy, generando una interfase de doble capa; R_{f1} y C_{f1} son elementos de la interface que entra en contacto con la solución de electrolito; CPE es un elemento capacitivo de difusión por doble capa y R_{p1} es la resistencia del material en esa zona. En la parte 2 del circuito, C_1 y R_1 , es un circuito formado por el contacto de la película donde traspaso lípido sin

PPy. La tercera parte es el circuito que corresponde al sistema de la película de PPy; R_{p2} y R_c son elementos resistivos de la película y el electrodo; CPE2 es un elemento capacitivo de la película de PPy; R_{f2} y C_{f2} son la resistencia de difusión y capacitancia de la doble capa respectivamente.

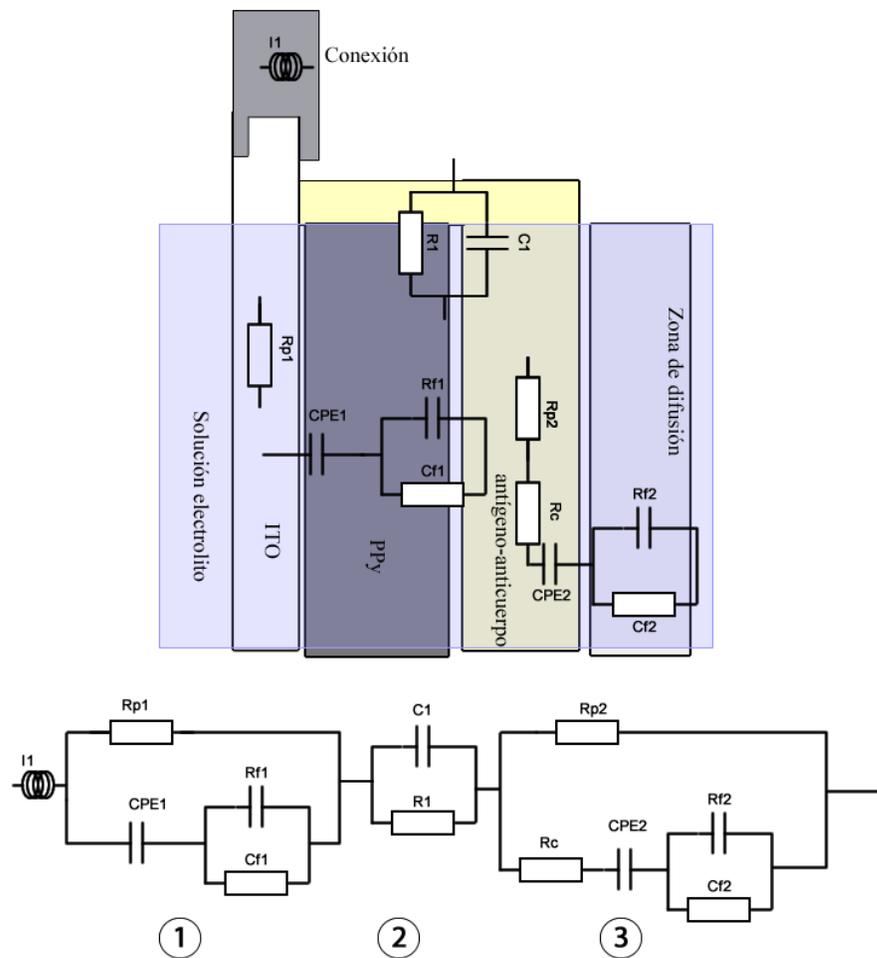


Figura 7.26: Modelo de circuito eléctrico obtenido a partir de la EIS en películas de PPy.

La simulación del modelo en el caso de la EIS (30 KHz - 0.3 Hz) de PPy, se ajustó mucho mejor comparado con el de PANi. En el gráfico de Nyquist (figura 7.27), la curva ajusta casi perfectamente ($R=0.9712$) excepto por la zona inicial de 300 a 320 ohms de impedancia real, lo cual es debido a impedancias generadas por el cableado de la celda. La gráfica de Bode (figura 7.28), muestra que el modelo ajusta bien excepto para frecuencias altas, pero en general a frecuencias de 1000 a 0.1 Hz se obtuvo un buen ajuste ($R=0.8599$).

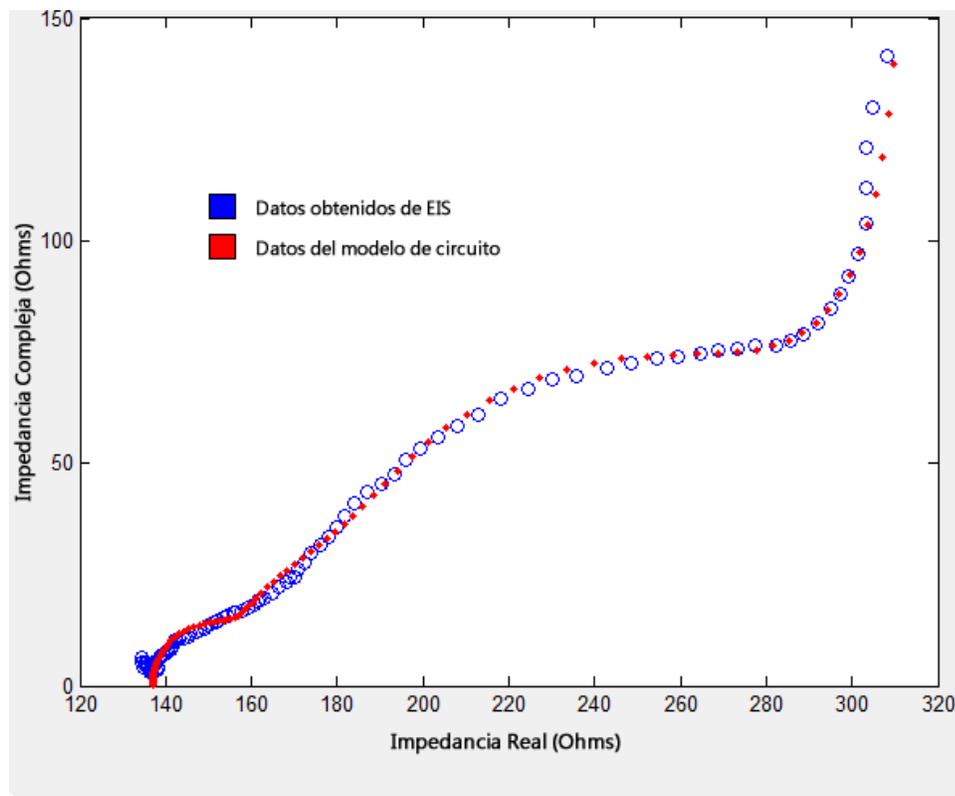


Figura 7.27: Ajuste del modelo obtenido con los datos de la EIS (30 KHz - 0.3 Hz) en PPy para la gráfica de Nyquist

El modelo ajustó mucho mejor para las mediciones de EIS hechas de 100,000 a 0.1 Hz, probablemente debido a que el equipo en el que se realizó, elimina automáticamente algunas impedancias generadas por las conexiones y la solución de electrolito.

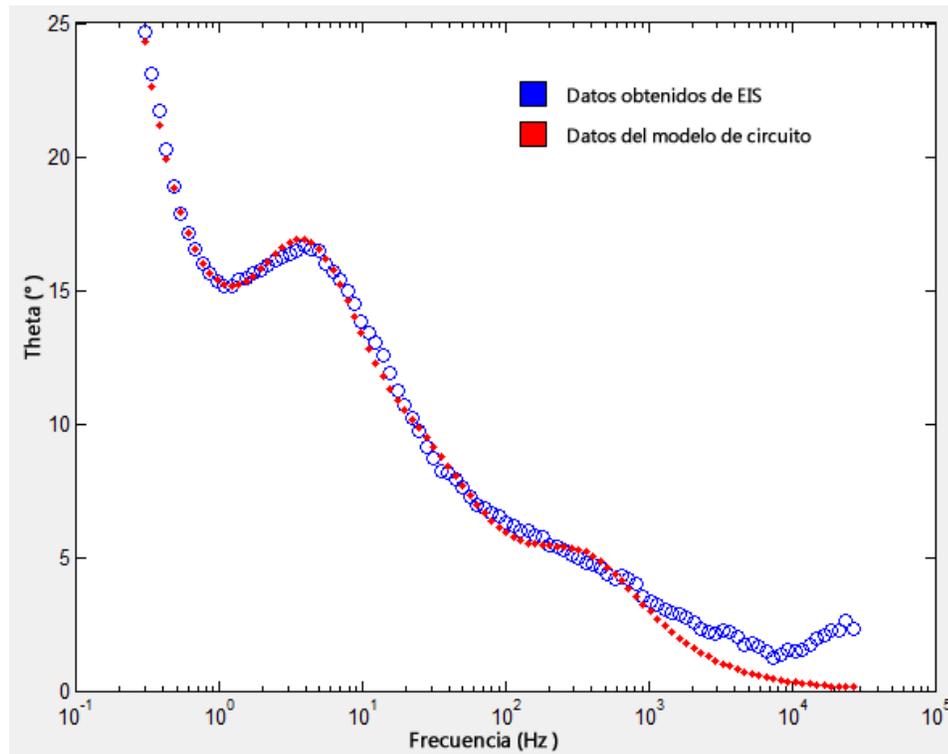


Figura 7.28: Ajuste del modelo obtenido con los datos de la EIS (30 KHz - 0.3 Hz) en PANi para la gráfica de Bode

Cabe destacar que a pesar de que las gráficas de ambas mediciones de PPy son diferentes, el modelo se ajusta bien para los dos casos. En el caso de la gráfica de Nyquist para este modelo (figura 7.29), la gráfica se ajusta muy bien ($R=0.9851$), excepto entre 1200 - 1800 ohms, en donde contribuyen algunos elementos capacitivos debidos a los fenómenos de difusión. Lo mismo ocurre para la gráfica de Bode (figura 7.30), también existe un buen ajuste ($R=0.9789$) en casi todo el espectro de frecuencias, dondelas pequeñas diferencias son debido a los efectos de difusión.

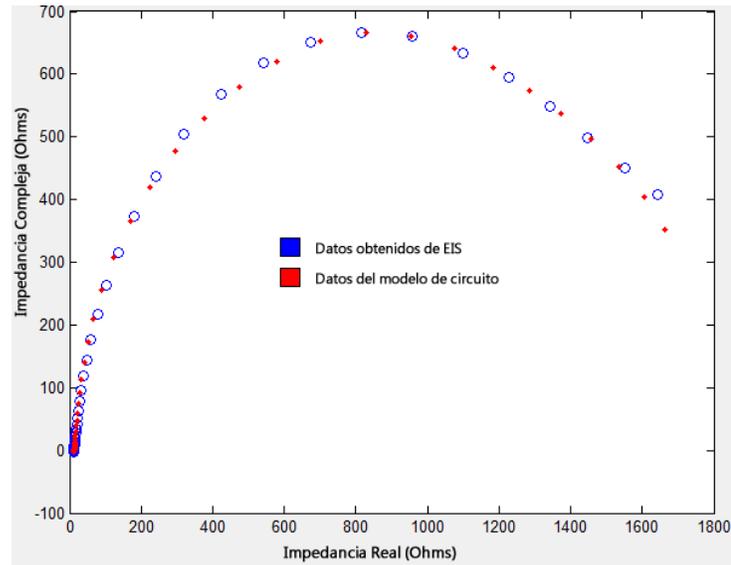


Figura 7.29: Ajuste del modelo obtenido con los datos de la EIS (100 KHz - 0.1 Hz) en PPy para la gráfica de Nyquist

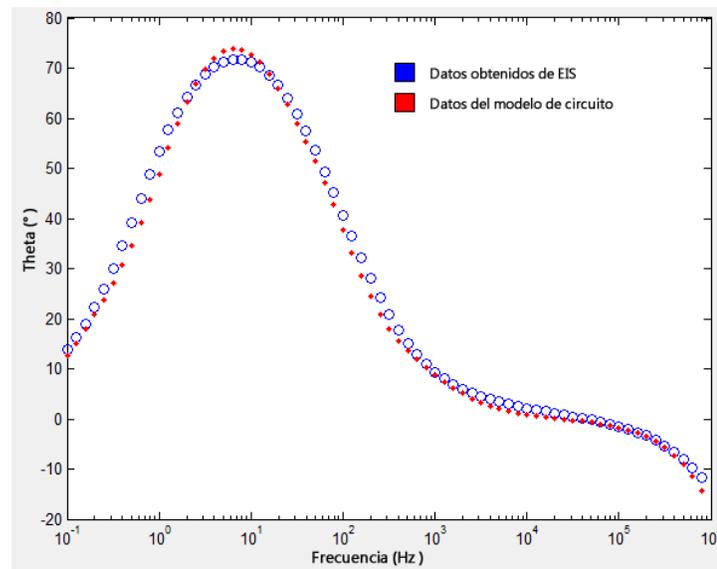


Figura 7.30: Ajuste del modelo obtenido con los datos de la EIS (100 KHz - 0.1 Hz) en PANi para la gráfica de Bode

7.3.7. Análisis de impedancias obtenidas de la EIS para PPy

Se analizaron los valores de impedancia real e imaginaria para los datos obtenidos de EIS con PPy, la figura 7.31 muestra el promedio de los valores obtenidos para la EIS de 30 KHz a 0.3 Hz, en este caso no se observa diferencia significativa entre los datos de impedancia real ($ES = 0.35$, $S < 66\%$) o impedancia imaginaria ($ES = 0.34$, $S < 66\%$)

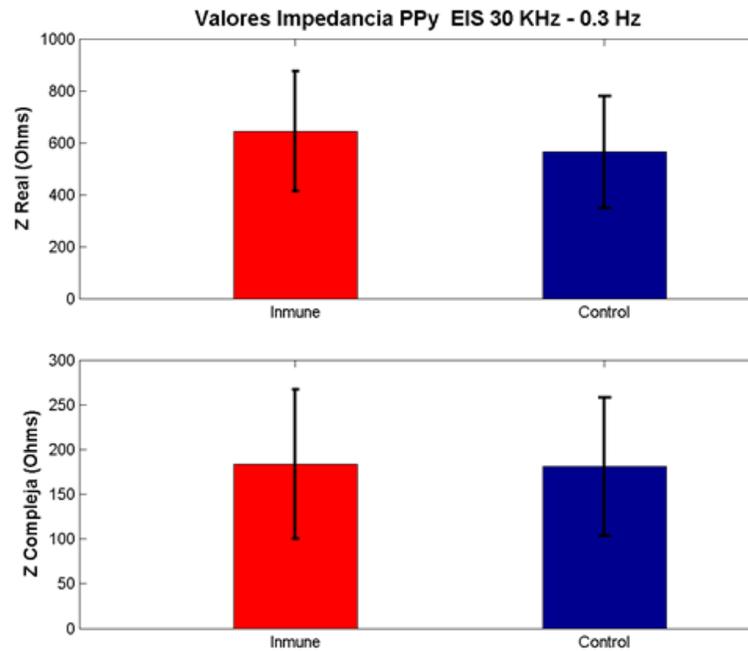


Figura 7.31: Comparación de los valores de impedancia entre los sueros inmune y control, obtenidos del ensayo de EIS sobre PPy de 30 KHz a 0.3 Hz.

Para los datos de la EIS de 100 KHz a 0.1 Hz (figura 7.32), tampoco se observó diferencia significativa entre los datos de impedancia real ($ES = 0.37$, $S < 66\%$) o imaginaria ($ES = 0.03$, $S < 50\%$).

Aunque los gráficos de impedancia de Bode y Nyquist, sugieren que existe una diferencia significativa entre las muestras tratadas con suero inmune y preinmune, los análisis de los promedios de impedancia real e imaginaria muestran que no la hay; sin embargo, esto no descarta que pueda existir una diferencia medible entre

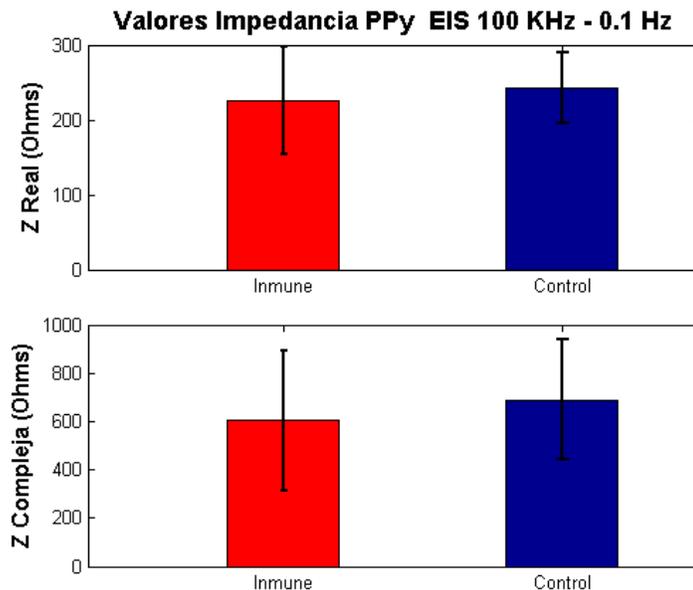


Figura 7.32: Comparación de los valores de impedancia entre los sueros inmune y control, obtenidos del ensayo de EIS sobre PPy de 100 KHz a 0.1 Hz.

los elementos individuales del circuito, no obstante los circuitos modelos obtenidos son muy complicados, ya que contienen elementos debidos a las conexiones de las películas, al DAT que se depositaba sobre la superficie del sustrato sin polímero, al cableado y a algunos fenómenos de difusión de la celda. Todos estos elementos hacen virtualmente imposible calcular manualmente los valores de impedancia de cada uno de estos. Es posible desarrollar un método numérico para el cálculo de estos elementos, sin embargo está fuera de los objetivos del presente trabajo. El siguiente paso fue explorar un método electroquímico alternativo para la cuantificación.

7.4. Ensayo electroquímico de cronoamperometría con anticuerpos conjugados a HRP

Como alternativa a la EIS, se llevó a cabo un inmunoensayo basado en el uso de HRP como marcador y una cuantificación por cronoamperometría. Los ensayos se

realizaron usando la plataforma basada en PPy, debido a que se obtuvieron mejores respuesta en los inmunoensayos sobre esta plataforma, además que los tiempos de síntesis son mucho más cortos que los de PANi. Para los inmunoensayos se usaron sueros de conejo y sueros humanos.

La figura 7.33, muestra los picos de corriente obtenidos de una cronoamperometría realizada con sueros de conejo, para este ensayo se usaron diluciones 1:100 y 1:400; se puede observar como los picos de corriente correspondientes a los sueros inmunes, son significativamente más elevados comparados con los obtenidos para los controles, en éstos últimos incluso se observa una disminución de la corriente antes de alcanzar su estado estacionario.

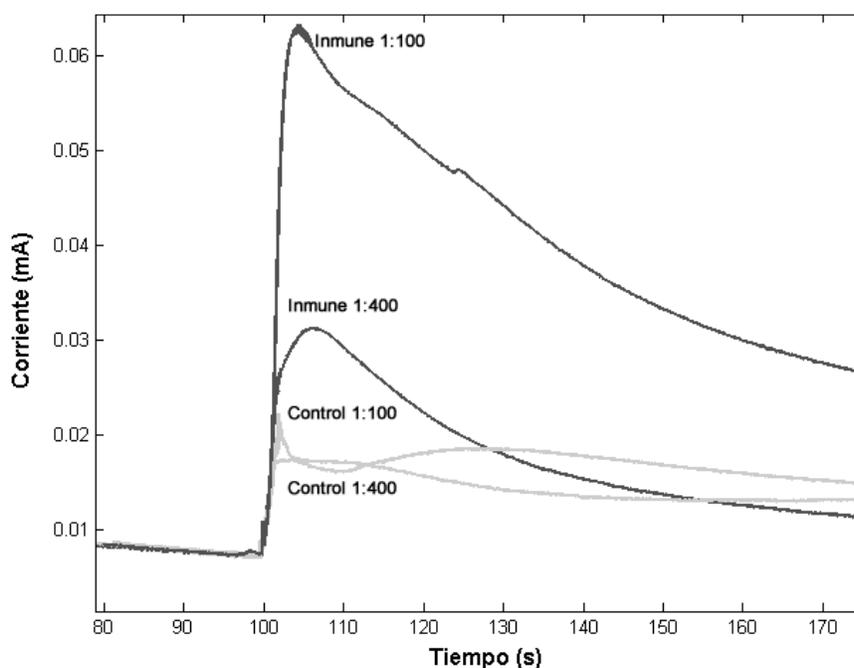


Figura 7.33: Picos de corriente al agregar el peróxido de hidrógeno durante la cronoamperometría para sueros inmune y control de conejo.

En base a lo datos de la cronoamperometría para suero de conejo (figura 7.33), se obtuvo la corriente promedio para las intensidades máximas de cada una de las lecturas. En la figura 7.34, se observa que la corriente promedio es dependiente de

la dilución del suero, además se obtiene una corriente máxima a la dilución 1:200, lo cual es consistente con los resultados convencionales. Estos resultados implican que es posible realizar ensayos de forma electroquímica, los cuales brindan algunas ventajas importantes como la posibilidad de miniaturizar y automatizar los sistemas para crear plataformas de diagnóstico más eficaces.

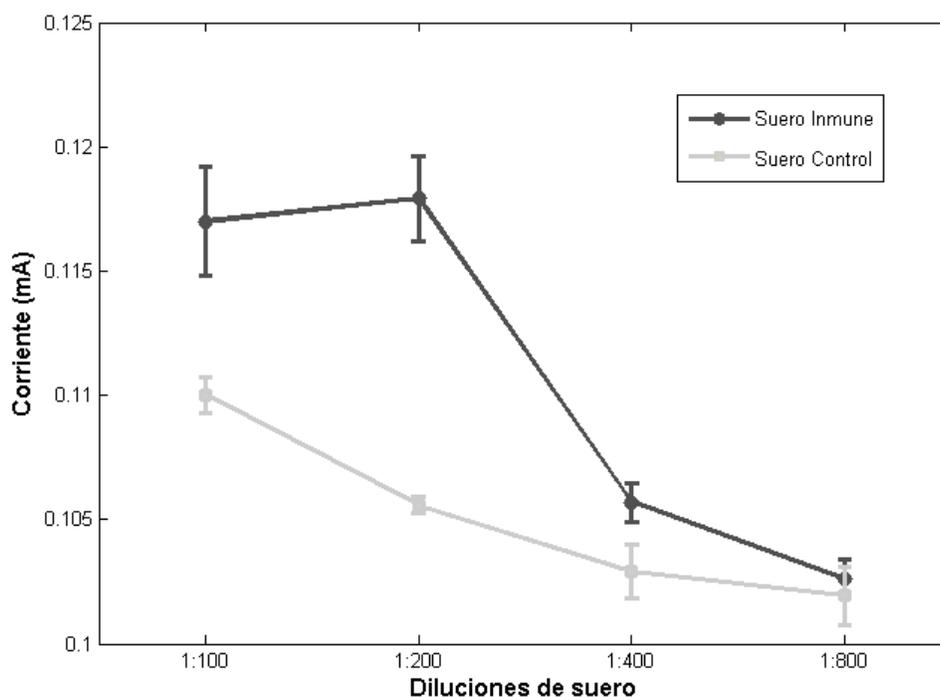


Figura 7.34: Corriente promedio obtenida para el suero inmune y control de conejo a diferentes diluciones.

Finalmente, se realizó un ensayo con un grupo de sueros humanos infectados con TB y se usaron sueros de personas sanas como control. En la imagen 7.35, se observa cómo se obtuvo una corriente promedio mayor para el grupo control comparado con el inmune ($ES = 1.6$, $S < 95\%$), los resultados son similares a los obtenidos en los inmunoensayos convencionales con PPy y PANi.

Estos resultados sugieren que existe una diferencia significativa, por lo cual es posible utilizar este soporte para realizar un sistema de captación de anticuerpos característicos de TB y realizar la cuantificación de forma electroquímica, aun se requiere probar el método con un número mayor de muestras para determinar su potencial como un sistema de diagnóstico. De ser posible, el sistema presentado podría ser usado para desarrollar sistemas automatizados de diagnóstico de menor costo, que no requieran equipo especial ni personal capacitado.

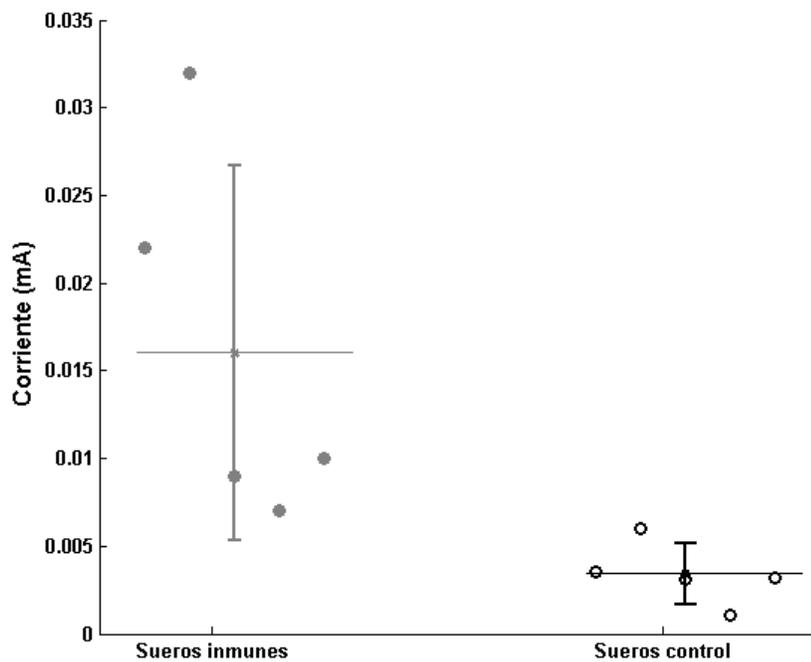


Figura 7.35: Corriente promedio obtenida para el grupo de sueros inmunes y control de humanos.

Capítulo 8

Conclusiones

- Se sintetizaron exitosamente películas de PANi química y electroquímicamente y de PPy electroquímicamente y se logró funcionalizarlas con el antígeno DAT.
- Se demostró mediante inmunoensayos que es posible realizar la cuantificación de los anticuerpos anti-DAT en suero de conejo sobre los soportes de PANi y PPy.
- También se logró registrar una diferencia significativa sobre el soporte, de anticuerpos anti-DAT en sueros de pacientes infectados con respecto a sueros de pacientes sanos.
- Con la técnica de EIS, se obtuvo un modelo de circuito y se logró observar algunos cambios en las propiedades eléctricas; sin embargo aún es necesario refinar el sistema para lograr hacer una cuantificación de anticuerpos por este método.
- Por medio de cronoamperometría, se demostró que es posible registrar la presencia de anticuerpos asociados a TB en suero sanguíneo por el método usando un marcador secundario.
- En conclusión, se logró obtener un soporte basado en PPy funcionalizado con el antígeno DAT, el cual es capaz de detectar y cuantificar de forma electroquímica anticuerpos que se asocian con la TB activa y se probó exitosamente su funcionalidad como biosensor.

- Los resultados de este trabajo, dan pie a múltiples posibilidades para el desarrollo de un biosensor para TB. En futuros trabajos se puede continuar caracterizando la respuesta del soporte en base a PPy-PB-HRP en ensayos doble ciego para validar su funcionamiento, además se pueden realizar mediciones controladas para obtener los valores del instrumento como límite de detección y sensibilidad. Por otra parte, una alternativa atractiva es miniaturizar y controlar mejor el sistema, para obtener modelos de EIS más simples y reproducibles que permitan determinar con precisión la contribución de los anticuerpos a los cambios de impedancia, con lo cual se podría comenzar el desarrollo de un biosensor libre de marcadores, que involucre menos pasos experimentales y en consecuencia sea mucho más asequible.

Apéndices

Preparación de soluciones

Solución de relleno de electrodo Ag/AgCl

El electrodo se rellena con una solución de KCl 4 M saturada con AgCl. Para preparar 50 ml:

1. A 35 ml de agua desionizada se le agregan 14.91 gr de KCl.
2. Se deja en agitación por 15 minutos. Posteriormente la solución se afora a 50 ml.
3. Se agrega un poco de AgCl, y se coloca en agitación por media hora hasta que los residuos de AgCl se vuelvan grises.
4. Se filtra la solución y debe almacenarse al resguardo de la luz.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Para preparar una 1 litro de solución de PBS 10X (1 M):

1. A 800 ml de agua, se le agregan:
 - NaCl - 80 g
 - KCl - 2 g
 - Na₂HPO₄ - 14.4 g
 - KH₂PO₄ - 2.4 g

o bien:

- NaCl - 80 g
 - KCl - 2 g
 - Na₂HPO₄·7H₂O - 14.4 g
 - KH₂PO₄ - 2.4 g
2. Se ajusta el pH a 7.4 con HCl 1 M y se afora a 1 litro.
 3. Se esteriliza la solución en autoclave o por filtración, se preparan alicuotas y pueden conservarse a temperatura ambiente.

Solución de albúmina de suero bovino (BSA)

Para preparar 100 ml de solución de BSA al 3%:

1. A 80 ml de PBS 1X, se le agregan 3 g de BSA.
2. Se deja en reposo hasta que se disuelva la proteína (No debe agitarse ya que tiende a formar burbujas).
3. Se afora a 100 ml con PBS 1X.
4. Puede conservarse 24 hrs en refrigeración a 5 °C.

Solución amortiguadora dietanolamina (DEA)

Para preparar 1 litro se solución de dietanolamina al 10% (v/v):

1. A 700 ml de agua desionizada se le agregan:
 - dietanolamina - 100 ml
 - MgCl₂·6H₂O - 102 mg
 - NaN₄ - 0.4 g
2. Se agrega HCl concentrado hasta obtener un pH de 9.8
3. Se afora con 1000 ml de agua desionizada y se conserva a resguardo de la luz a temperatura ambiente.

Bibliografía

- [1] WHO. *Global Tuberculosis Control Epidemiology, Strategy, Financing*. World Health Organization, 2009.
- [2] MJ Banon. Bcg and tuberculosis. *Arch Dis Child.*, 80:80–83, 1999.
- [3] Samuel Loewenberg. India reports cases of totally drug-resistant tuberculosis. *The Lancet*, 379:205, 2012.
- [4] Pere Joan Cardona. *Understanding Tuberculosis - Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis*. InTech, 2012.
- [5] Peters Cdeper Gabriellme. E. Van Der Vliet, R Iannea . F. Sschikkibnko and Paulr . Klaster. Nucleic acid sequence-based amplification (nasba) for the identification of mycobacteria. *Journal of General Microbiology*, 139:2423–2429., 1993.
- [6] Starke J. Tuberculosis skin testing: New schools of thought. *Journal of the American Academy of Pediatrics*, 98:123–125, 1996.
- [7] Cockcroft A Chaturvedi N. Tuberculosis screening among health service employees: who needs chest x-rays? *J Soc Occup Med*, 42:179–182, 1992.
- [8] Peter Small Christy Hanson Steven Reed Jane Cunningham Julia E. Aledort Lee Hillborne Maria E. Rafael Federico Giroso & Christopher Dye Emmett Keeler, Mark D. Perkins. Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics, 2006.

- [9] Daniel Hoehn Sheila A. Grant R. Cody Stringer, Susan Schommer. Development of an optical biosensor using gold nanoparticles and quantum dots for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134:427–431, 2008.
- [10] Natalija Backmann Hans Peter Lang Marcel Düggelin Martin Hegner Natalia Nugaeva, Karin Y. Gfeller. Micromechanical cantilever array sensors for selective fungal immobilization and fast growth detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 21:849–856, 2005.
- [11] Yun-xu-zi Gu Zhan-jiang Shanga, Yan-li Xu. A rapid detection of pesticide residue based on piezoelectric biosensor. *Procedia Engineering*, 15:4480–4485, 2011.
- [12] Tatiana I. Ksenevich Petr I. Nikitina, Petr M. Vetoshko. New type of biosensor based on magnetic nanoparticle detection. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311:445–449, 2007.
- [13] Nam-Ki Min Suk-In Hong Min-Jung Song, Dong-Hwa Yun. Electrochemical biosensor array for liver diagnosis using silanization technique on nanoporous silicon electrode. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103:32–37, 2007.
- [14] Yuanyuan Zhang Hairong Yang Hongwei Gao-Ying Chen Zhenfan Sun Wei Suna, Xiaowei Qi. Electrochemical dna biosensor for the detection of listeria monocytogenes with dendritic nanogold and electrochemical reduced graphene modified carbon ionic liquid electrode. *Electrochimica Acta*, 85:145–151, 2012.
- [15] M. Naumann S. Kintzios P. Hauptmann T. Jacobs, T. Valero. Electrical impedance spectroscopy of gel embedded neuronal cells based on a novel impedimetric biosensor. *Procedia Chemistry*, 1:261–264, 2009.
- [16] Jan A. Dziuban Piotr Prokaryn-Michał Chudy Artur Dybko Zbigniew Brzózka Sylwester Bargiel, Anna Górecka-Drzazg. Nanoliter detectors for flow systems. *Sensors and Actuators A*, 115:245–251, 2004.

-
- [17] Banchong Mahaisavariya Adisorn Tuantranont A. Nisar, Nitin Afzulpurkar. Mems-based micropumps in drug delivery and biomedical applications. *Sensors and Actuators B*, 130:917–942, 2008.
- [18] Patrick Pouteau Yves Fouillet a Jean-Luc Achard Elodie Sollier, Hervé Rostaing. Passive microfluidic devices for plasma extraction from whole human blood. *Sensors and Actuators B*, 141:617–624, 2009.
- [19] Duckjong Kim Sang-Jin Park Je-Kyun Park Yu Chang Kim, Seung-Hoon Kim. Plasma extraction in a capillary-driven microfluidic device using surfactant-added poly(dimethylsiloxane). *Sensors and Actuators B*, 145:861–868, 2010.
- [20] George M. Whitesides. Overview the origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442:367–373, 2006.
- [21] Sumitra Datta, L. Rene Christena, and Yamuna Rani Sriramulu Rajaram. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1):1–9, 2013.
- [22] ShuQi Wang, Fathi Inci, Gennaro De Libero, Amit Singhal, and Utkan Demirci. Point-of-care assays for tuberculosis: Role of nanotechnology/microfluidics. *Biotechnology Advances*, 31:438–449, 2013.
- [23] Mahavir Singh Katrin Schmitt-Albrecht Brandenburg Alexander Berka Frank F. Bier Thomas Nagel, Eva Ehrentreich-Forster. Direct detection of tuberculosis infection in blood serum using three optical label-free approaches. *Sensors and Actuators B*, 129:934–940, 2008.
- [24] Evangelyn C. Alocilja Edith Torres-Chavolla. Nanoparticle based dna biosensor for tuberculosis detection using thermophilic helicase-dependent isothermal amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 26:4614–4618, 2011.
- [25] Stephen Lower. All about electrochemistry, 2005.

- [26] Iolanda Cruz Vieira Orlando Fatibello-Filho, Karina Omuro Lupettia. Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (persea americana) biosensor. *Talanta*, 55:685–692, 2001.
- [27] Calum J. McNei César Fernández-Sánchez. Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24:37–48, 2005.
- [28] S.F. D'Souza Jitendra Kumar. Microbial biosensor for detection of methyl parathion using screen printed carbon electrode and cyclic voltammetry.
- [29] Janos Voros Dorothee Grieshaber, Robert MacKenzie and Erik Reimhult. Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures. *Sensors*, 8:1400–1458, 2008.
- [30] T. Z.; Peng Y. Q. Li, J. P.; Peng. A cholesterol biosensor based on entrapment of cholesterol oxidase in a silicic sol-gel matrix at a prussian blue modified electrode. *Electroanalysis*, 15:1031–1037, 2003.
- [31] R. M. Michael, D. J.;Wightman. Electrochemical monitoring of biogenic amine neurotransmission in real time. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19:33–46, 1999.
- [32] Anastasia Bogomolova Elena Komarova, Matt Aldissi. Direct electrochemical sensor for fast reagent-free dna detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 21:182–189, 2005.
- [33] S. Cosnier S. Da Silva, D. Shan. Improvement of biosensor performances for nitrate determination using a new hydrophilic poly(pyrrole-viologen) fim. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 103:397–402, 2003.
- [34] Canh Tran Minh Mireille Bruschi Ioannis Ignatiadis Caroline Michel, Fabienne Battaglia-Brunet. Amperometric cytochrome c3-based biosensor for chromate determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 19:345–352, 2003.

- [35] Chee Chung Wong Abdur Rub Abdur Rahman Sunil K. Arya, Karen Yan-ping Wang. Anti-epcam modified lc-spdp monolayer on gold microelectrode based electrochemical biosensor for mcf-7 cells detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 41:446–451, 2013.
- [36] Jaroslav Katrlík Pavol Gemeiner Milan Mikula Martin Nosko Jan Tka To-mas Bertok, Alena Sediva. Label-free detection of glycoproteins by the lectin biosensor down to attomolar level using gold nanoparticles. *Talanta*, 108:11–18, 2013.
- [37] Hyuck Lee MiSuk Cho Woo-Seok Choe Youngkwan Lee Wenqiong Su, Meng Lin. Determination of endotoxin through an aptamer-based impedance biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 32:32–36, 2012.
- [38] V. Auger A. Poghossian M. Koudelka-Hep M.J. Schöninga, N. Näthera. Mi-niaturised flow-through cell with integrated capacitive eis sensor fabricated at wafer level using si and su-8 technologies. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 108:986–992, 2005.
- [39] György Inzelt. *Conducting Polymers A New Era in Electrochemistry*. Springer, 2008.
- [40] Olle Ingana Edwin W. H. Jager, Elisabeth Smela. Microfabrication: conjugated polymer actuators. *Issues in Nanotechnology*, 290:1540–1546, 2000.
- [41] Patrick C. Howlett Jim Efthimiadis-Douglas R. MacFarlane Adrian B. Cha-pline Simon B. Hall David L. Officer Gordon G. Wallace Maria Forsyth Jen-nifer M. Pringle, John Efthimiadis. Electrochemical synthesis of polypyrrole in ionic liquids. *Polymer*, 45:1447–1453, 2004.
- [42] Justin Hanks David W. Hatchett John M. Kinyanjui, Neloni R. Wijeratne. Che-mical and electrochemical synthesis of polyaniline/platinum composites. *Elec-trochimica Acta*, 51:2825–2835, 2006.

- [43] H. Cesiulis A. Ramanaviciene A. Ramanavicius, A. Finkelsteinas. Electrochemical impedance spectroscopy of polypyrrole based electrochemical immunosensor. *Bioelectrochemistry*, 79:11–16, 2010.
- [44] M.K. Pandey B.D. Malhotra Suman Singh, Pratima R. Solanki. Cholesterol biosensor based on cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase immobilized onto conducting polyaniline films. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 115:534–541, 2006.
- [45] Chirosree Roy Chaudhuri Krishnan Bandyopadhyay Pintu Send Ankan Dutta Chowdhurya, Amitabha Dea. Label free polyaniline based impedimetric biosensor for detection of e. coli o157:h7 bacteria. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171:916–923, 2012.
- [46] Almira Ramanaviciene Arunas Ramanavicius, Asta Kausaite. Polypyrrole-coated glucose oxidase nanoparticles for biosensor design. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 111:532–539, 2005.
- [47] Rosario Leyva Luis A. Esparza Luz M. López-Marín Rafael Saavedra, Erika Segura. Mycobacterial di-o-acyl-trehalose inhibits mitogen- and antigen-induced proliferation of murine t cells in vitro. *Clinical and Diagnostic Immunology*, 8:1081–1088, 2001.
- [48] Hamid M.E., Ridell M., Minnikin D.E., and Goodfellow M. Serotaxonomic analysis of glycolipids from mycobacterium chelonae-m. fortuitum complex and bovine farcy strains. *Zentralblatt fur Bakteriologie: International Journal of medical microbiology.*, 288:23–34, 1998.
- [49] Yissel Diana Contreras Valeriano. Desarrollo de una plataforma de detección amperométrica de biomarcadores en tuberculosis activa. Master’s thesis, Licenciatura en Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.
- [50] A.I. del Río J.C. Galván F. Cases J. Bonastre, J. Molina. Study of the electrical properties of novel hybrid organic–inorganic conducting textiles of

- polypyrrole-phosphotungstate-polyester using electrochemical impedance spectroscopy. *Synthetic Metals*, 161:1957–1965, 2011.
- [51] R. Faez M.A.S. Oliveira, J.J. Moraesa. Impedance studies of poly(methylmethacrylate-co-acrylic acid) doped polyaniline films on aluminum alloy. *Progress in Organic Coatings*, 65:347–356, 2009.
- [52] Chien-How Chu Chi-Chang Hu. Electrochemical impedance characterization of polyaniline-coated graphite electrodes for electrochemical capacitors — effects of film coverage/thickness and anions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 503:105–116, 2001.
- [53] Chi-Chang Hu A Gopalan Wei-Chih Chena, Ten-Chin Wen. Identification of inductive behavior for polyaniline via electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*, 47:1305–1315, 2002.
- [54] J.V. Jahkmi Shilpa Tawde, D. Mukesh. Redox behavior of polyaniline as influenced by aromatic sulphonates anions: cyclic voltametry and molecular modeling. *Synthetic Metals*, 125:401–413, 2002.
- [55] Murat Ates A. Sezai Sarac and Bilge Kilic. Electrochemical impedance spectroscopic study of polyaniline on platinum, glassy carbon and carbon fiber microelectrodes. *International Journal of Electrochemical Science*, 3:777–786, 2008.
- [56] <http://www.leeds.ac.uk/educol/documents/00002182.htm>. What effect size is and why it is important, Robert Coe, 2002.
- [57] Reza Ansari. In-situ cyclic voltammetry and cyclic resistometry analyses of conducting electroactive polymer membranes. *ChemTech*, 1:1398–1402, 2009.
- [58] E.M. Girott M.J.L. Santosa, A.G. Broloa. Study of polaron and bipolaron states in polypyrrole by in situ raman spectroelectrochemistry. *Electrochimica Acta*, 52:6141–6145, 2007.