

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluable y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Estudio de la DNazima peroxidasa PW17 y su potencial aplicación en biosensores.

Trabajo de tesis para optar por el título de Doctor en Ciencia y Tecnología de la Universidad
Nacional de General Sarmiento

Autor: Ana María Janeiro Tudanca

Director: Javier Marcelo Montserrat
Co-Directora: Silvana Andrea Ramírez

Fecha: (formato xx de mes de 2023)

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

FORMULARIO “E”
TESIS DE POSGRADO

Niveles de acceso al documento autorizados por el autor

El autor de la tesis puede elegir entre las siguientes posibilidades para autorizar a la UNGS a difundir el contenido de la tesis: *a)*

- Liberar el contenido de la tesis para acceso público.*
- Liberar el contenido de la tesis solamente a la comunidad universitaria de la UNGS:*
- Retener el contenido de la tesis por motivos de patentes, publicación y/o derechos de autor por un lapso de cinco años.*

- a. Título completo del trabajo de Tesis: Estudio de la DNAzima peroxidasa PW17 y su potencial aplicación en biosensores.
- b. Presentado por: Janeiro Tudanca, Ana María
- c. E-mail del autor: ajaneiro@campus.ungs.edu.ar
- d. Estudiante del Posgrado: Doctorado en ciencia y Tecnología, UNGS.
- e. Institución o Instituciones que dictaron el Posgrado: Instituto de Ciencias, Universidad Nacional de General Sarmiento.
- f. Para recibir el título de:
 - a) Grado académico que se obtiene: Doctora
 - b) Nombre del grado académico: Doctora en Ciencia y Tecnología
- g. Fecha de la defensa: 13 / 03 / 2024
 día mes año
- h. Director de la Tesis: Montserrat, Javier Marcelo
Co- Directora: Ramírez, Silvana Andrea
- i. Tutor de la Tesis: Ceretti, Helena Margarita
- j. Colaboradores con el trabajo de Tesis: -
- k. Descripción física del trabajo de Tesis (cantidad total de páginas, imágenes, planos, videos, archivos digitales, etc.): 171 páginas, 85 figuras, 5 tablas.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

- l. Alcance geográfico y/o temporal de la Tesis: no aplica
- m. Temas tratados en la Tesis (palabras claves): DNAzima peroxidasa, secuencia *PW17*, genosensor, colorimétrico, electroquímico.

- n. Resumen en español (hasta 1000 caracteres):

Este trabajo aporta un estudio de las condiciones de funcionamiento de la DNAzima peroxidasa de secuencia *PW17* para ser utilizada como generadora de señal en genosensores. Estas secuencias de ácido desoxirribonucleico simple cadena (sc-ADN) adquieren estructuras secundarias específicas, cuartetos de G, que al coordinarse con hemina son capaces de catalizar reacciones de peroxidación. Una de las aplicaciones más recientes de las DNAzimas peroxidadas es su utilización en biosensores, en particular en genosensores, como elemento de señalización de modo similar a las enzimas peroxidadas. Por ser secuencias sc-ADN tienen la ventaja de que pueden ser incorporadas fácilmente a las secuencias sonda sin necesidad de introducir modificaciones químicas y sin perder actividad catalítica al ser reutilizadas.

En esta tesis se estudió, de manera progresiva, la incorporación de *PW17* a una secuencia sc-ADN sonda para el armado de una capa de biorreconocimiento aplicable a genosensores. Se utilizó, como prueba de concepto, una sonda de estructura horquilla capaz de activar la función DNAzima, como generadora de señal, tras el reconocimiento específico de la secuencia complementaria sc-ADN analito.

- o. Resumen en portugués (hasta 1000 caracteres):

Este trabalho fornece um estudo das condições de operação da sequência de DNAzima peroxidase *PW17* para ser utilizada como geradora de sinais em genossensores. Essas sequências de ácido desoxirribonucléico de cadeia simples (cs-DNA) adquirem estruturas secundárias específicas, quartetos G, que, quando coordenados com a hemina, são capazes de catalisar reações de peroxidação. Uma das aplicações mais recentes das DNAzimas de peroxidase é seu uso em biossensores, particularmente genossensores, como um elemento de sinalização

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

semelhante às enzimas peroxidase. Por serem sequências de cs-DNA, têm a vantagem de poderem ser facilmente incorporadas a sequências de sondas sem a necessidade de introduzir modificações químicas e sem perder a atividade catalítica quando reutilizadas.

Nesta tese, a incorporação de *PW17* em uma sequência de sonda cs-DNA para a montagem de uma camada de biorreconhecimento aplicável a sensores de genes foi estudada progressivamente. Como prova de conceito, uma sonda de estrutura *hairpin* capaz de ativar a função DNAzima foi utilizada, como geradora de sinal, após o reconhecimento específico da sequência *target* complementar cs-DNA.

p. Resumen en inglés (hasta 1000 caracteres):

This work provides a study of the operating conditions of the DNAzyme peroxidase sequence *PW17* to be used as a signal generator in genosensors. These single-stranded deoxyribonucleic acid (ss-DNA) sequences acquire specific secondary structures, denominated G quartets. These structures coordinated with hemin are capable of catalyzing peroxidation reactions. One of the most recent applications of peroxidase DNAzymes is their use in biosensors, particularly genosensors, as a signaling element similar to peroxidase enzymes. The ss-DNA sequences have the advantage that they can be easily incorporated into probe sequences without the need to introduce chemical modifications and without losing catalytic activity when reused.

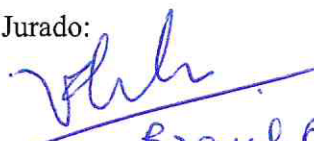
In this thesis it was presented, in a progressive way, the incorporation of *PW17* into a ss-DNA probe sequence for the assembly of a biorecognition layer applicable to genosensors. As a proof of concept, a hairpin structure probe capable of activating the DNAzyme function was used, as a signal generator, after the specific recognition of the target ss-DNA complementary sequence.

q. Aprobado por (Apellidos y Nombres del Jurado):

GRACIELA ALICIA GONZALEZ, RAQUEL OFELIA BIELSA, ELIZABETH SANDRA LEWKOWICZ

Firma y aclaración de la firma del Presidente del Jurado:

Firma del autor de la tesis:


Raquel Ofelia Bielsa

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).

Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Presentaciones a congresos:

“DNAzima peroxidasa ligada a superficies: estudio para su uso en genosensores”

A. M. Janeiro, S. A. Ramirez, J. M. Montserrat

XI Congreso Argentino de Química analítica.

Corrientes, Corrientes, 30 de noviembre al 3 de diciembre de 2021.

Presentación en formato póster.

“Avances en la aplicación de DNAzima peroxidasa para la detección de secuencias de ADN simple cadena”.

A. M. Janeiro, S. A. Ramirez, J. M. Montserrat

X Congreso Argentino de Química analítica.

Santa Rosa, La Pampa, 17 al 20 de septiembre de 2019.

Presentación en formato póster.

“Inmovilización de una DNAzima peroxidasa en beads magnéticos para el desarrollo de biosensores”.

A. M. Janeiro, S. A. Ramirez, J. M. Montserrat

XVIII Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados.

Y-TEC, Berisso, Bs. As., 30 de mayo al 1 de junio de 2018.

“Optimización del funcionamiento de una DNAzima peroxidasa para su uso en biosensores”.

A. M. Janeiro, S. A. Ramirez, J. M. Montserrat

XX Congreso Argentino de fisicoquímica y química inorgánica.

Villa Carlos Paz, Córdoba, 16 al 19 de mayo de 2017.

Presentación en formato póster.

“Biosensores aptaméricos para la detección de moléculas de bajo peso molecular”

A. Janeiro, S. A. Ramirez, J. M. Montserrat

XXX Congreso Argentino de Química

CABA, Bs. As., 22 al 24 de octubre de 2014.

Presentación en formato póster.

Aportes Originales:

(Especificar cuales son los aportes originales o innovadores conseguidos en la realización de esta tesis. Indicar donde se encuentran. Máximo una carilla)

La mayoría de los biosensores que se comercializan en la actualidad son inmunosensores, lo que significa que el biorreconocimiento se da por afinidad entre antígenos y anticuerpos. Una desventaja de estos sensores es la necesidad de señalizar el evento de reconocimiento, en muchos casos mediante la introducción de modificaciones químicas (“etiquetas”). Esto limita las posibles construcciones de la

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

capa de biorreconocimiento y encarece el costo de los dispositivos. Una de las “etiquetas” mas utilizadas, sobre todo en ensayos tipo ELISA, es la enzima *horseradish* peroxidasa (HRP) que cataliza la reducción de peróxido de hidrogeno a expensas de la oxidación de otro sustrato. Esta reacción genera una señal que suele ser detectada por técnicas colorimétricas, aunque también puede ser quimioluminiscentes o electroquímicas, siendo su intensidad proporcional a la concentración de analito.

En la década de 1990, con la optimización de la tecnología para la síntesis de secuencias sc-ADN, se desarrolló un nuevo grupo de biosensores de afinidad: los genosensores. En 1996 Sen *et al.* reportaron el hallazgo de secuencias sc-ADN capaces de formar estructuras secundarias específicas, cuartetos de G. Estas estructuras, al coordinarse con hemina, adquieren funcionalidad DNAzima y son capaces de catalizar reacciones de peroxidación de forma similar a sus análogos enzimáticos. Sin embargo, por ser secuencias sc-ADN, cuentan con la ventaja de que pueden ser incorporadas sin necesidad de modificaciones químicas como parte de la secuencia sonda, que cumple la función de elemento de biorreconocimiento.

El presente trabajo tiene por objetivo realizar aportes para la implementación de la DNAzima peroxidasa de secuencia *PW17* como generadora de señal en genosensores. Para ello se presenta un análisis progresivo del funcionamiento de la secuencia, incrementando de a poco las variables que lo afectan, de modo de reducir la complejidad de los ensayos. En primer lugar, se estudió la reacción de peroxidación con la DNAzima libre en solución analizando la señal obtenida por dos metodologías de detección: método óptico y electroquímico (capítulo 3). Luego se estudió el funcionamiento de la secuencia *PW17* como peroxidasa en fase heterogénea, inmovilizada sobre superficies de oro y sobre partículas magnéticas (capítulo 4). Finalmente, a partir de los resultados previos, se propuso como elemento de biorreconocimiento una secuencia sc-ADN (sonda) en estructura horquilla capaz de activar la función DNAzima mediante cambios conformacionales, tras el reconocimiento específico de la secuencia sc-ADN (analito). Se estudiaron las condiciones en las que, en presencia de secuencia analito, ocurre la activación de la función DNAzima generándose una señal detectable (capítulo 5).

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).
Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Los resultados de esta tesis aportan conocimiento que podrá ser utilizado como punto de partida para el diseño de futuros genosensores, particularmente colorimétricos, tema potencialmente relevante en la detección de secuencias específicas de ARN o ADN de interés para, por ejemplo, el diagnóstico de enfermedades virales, bacterianas o para detección de mutaciones genéticas.

Índice

Capítulo 1: Introducción

1.1 Biosensores: características, definiciones y aplicaciones	1
1.1.1 El sistema de biorreconocimiento	3
1.1.2 La fase de transducción	8
1.1.3 La detección	11
1.2 ADN como elemento de biorreconocimiento	15
1.2.1 Aplicaciones de los biosensores	21
1.3 Peroxidasas y generación de señal	23
1.4 DNAzima como parte del elemento de reconocimiento	27
1.5 Técnicas electroquímicas como método de detección del sustrato oxidado por catálisis con DNAzima	30
1.6 Estudio de la secuencia <i>PW17</i> para su aplicación en genosensores	34
1.7 Bibliografía	36

Capítulo 2: Materiales y métodos

2.1 Introducción	41
2.2 Reactivos, materiales e instrumental utilizados para el desarrollo experimental	41
2.2.1 Reactivos	41
2.2.2 Secuencias oligonucleotídicas	42
2.2.3 Materiales utilizados en el desarrollo del trabajo experimental	43
2.2.4 Instrumental	45
2.3 Detalle experimental de los ensayos realizados	46
2.3.1 Soluciones preparadas	46
2.3.2 Detalle experimental de los ensayos realizados	47
2.4 Técnicas y metodologías aplicadas para la detección	55

2.4.1 Detección espectrofotométrica.....	55
2.4.2 Detección electroquímica.....	56
2.5 Bibliografía.....	63

Capítulo 3: DNAzima peroxidasa en solución

3.1 Introducción.....	65
3.2 Evaluación de los sustratos para la reacción de peroxidación.....	66
3.2.1 Consideraciones relevantes para el análisis de la reacción de peroxidación, breve introducción teórica.....	66
3.2.2 Características de los sustratos de la reacción de peroxidación: ABTS y TMB.....	67
3.2.3 Resultados de la evaluación de la respuesta espectrofotométrica de los sustratos.....	70
3.2.4 Resultados de la evaluación de la respuesta electroquímica de los sustratos	74
3.3 Evaluación de las condiciones para la detección electroquímica de TMB oxidado por la reacción de peroxidación.....	80
3.4 Relación entre la concentración de Dz y la señal obtenida por las dos técnicas de medición.....	98
3.5 Bibliografía.....	107

Capítulo 4: DNAzima peroxidasa inmovilizada

4.1 Introducción.....	111
4.2 Secuencia <i>PW17</i> inmovilizada sobre partículas magnéticas.....	112
4.2.1 Ensayos exploratorios.....	114
4.2.2 Relación entre la cantidad de secuencia <i>B-Dz</i> inmovilizada y la intensidad de señal.....	118
4.2.3 Re uso del sistema.....	121
4.3 Secuencia <i>PW17</i> inmovilizada sobre oro.....	123
4.3.1 Ensayos exploratorios.....	127

Índice

4.3.2 Relación entre la cantidad de secuencia <i>T-Dz</i> inmovilizada y la intensidad de señal.....	131
4.3.3 Re uso del sistema.....	133
4.4 Comparación entre ambos soportes.....	134
4.5 Bibliografía.....	137

Capítulo 5: Sistema de biorreconocimiento

5.1 Introducción.....	139
5.2 Biorreconocimiento en fase homogénea.....	142
5.2.1 Tiempo de reacción.....	144
5.2.2 Tiempo de incubación.....	145
5.2.3 Concentración de ion magnesio (Mg^{+2}).....	147
5.2.4 Temperatura de incubación.....	148
5.3 Biorreconocimiento en fase heterogénea.....	151
5.4 Bibliografía.....	155

Capítulo 6: Conclusiones y proyecciones a futuro

6.1 Conclusiones.....	157
6.2 Proyecciones a futuro.....	159

Abreviaturas

dc-ADN	Ácido desoxirribonucleico doble cadena
sc-ADN	Ácido desoxirribonucleico simple cadena
ARN	Ácido ribonucleico
B-Dz	DNAzima peroxidasa modificada con biotina en el extremo 5'
I _p	Corriente de pico
C.A.	Cronoamperometría
Dz	DNAzima peroxidasa
T-Dz	DNAzima peroxidasa modificada con tiol en el extremo 5'
FcMeOH	Ferroceno metanol
Hm	Hemina
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rábano picante
MCH	6-Mercapto-1-hexanol
E _p	Potencial de pico
ABTS	Sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
TMB	3,3',5,5' tetrametil bencidina
TCEP	Tris (2-carboxietil) fosfina clorhidrato
V.C.	Voltametría cíclica
V.O.C.	Voltametría de onda cuadrada
V.P.D.	Voltametría de pulso diferencial

Capítulo 1

Introducción

1.1 Biosensores: características, definiciones y aplicaciones

La detección selectiva de sustancias de interés ha sido y seguirá siendo un tema de gran importancia tecnológica y social que involucra áreas tan variadas como diagnóstico clínico, toxicología, alimentos, monitoreo ambiental o procesos industriales. La obtención de resultados analíticos precisos y confiables es imprescindible para la toma de decisiones que permiten desde la disminución de los costos de análisis hasta el diagnóstico precoz de enfermedades. Las técnicas analíticas se han ido perfeccionando con los avances tecnológicos, las primeras que se han desarrollado requieren grandes cantidades de muestra, del orden de miligramos, y en muchos casos la obtención de resultados confiables depende fuertemente de la habilidad del analista. La búsqueda de mejoras en los resultados analíticos ha originado el desarrollo de nuevos y sofisticados métodos de análisis con ventajas tales como requerir menor cantidad de muestra, ser muy selectivos, sensibles y tener bajos límites de detección. Pero también algunas desventajas, como, grandes costos de instrumentación, instalación y mantenimiento además de requerir personal técnico especialmente entrenado. En muchos casos, y en particular cuando se requieren estudios microbiológicos, los ensayos pueden tomar horas o hasta incluso días, lo que impide obtener resultados en tiempo real. En este contexto adquiere importancia el desarrollo de los biosensores, como alternativa a las técnicas instrumentales, por ser dispositivos pequeños, sencillos, versátiles, de fácil operación e interpretación y respuesta rápida que permiten simplificar la adquisición de información analítica sin renunciar a la selectividad y sensibilidad¹.

Es interesante señalar que el desarrollo de los biosensores es relativamente reciente y remite a los últimos 70 años. Algunos hitos importantes para este campo fueron la puesta en funcionamiento del sensor de oxígeno en sangre de *Leland C. Clark Jr* en 1956 ^{2,3}, considerado como el primer biosensor en lograr el funcionamiento como tal, la comercialización del primer biosensor para la detección hogareña de glucosa en sangre en 1975 por la empresa *Yellow*

*Spring Instruments*⁴ y el desarrollo del primer biosensor portátil para detección de glucosa en 1992 por la empresa *I-STAT*⁵. Los avances tecnológicos necesarios para poner en funcionamiento los primeros biosensores portátiles dieron lugar a progresos notables en el diseño y desarrollo de dispositivos cada vez más pequeños, robustos, fáciles de usar e interpretar que continúan perfeccionándose constantemente. Las ventajas que poseen frente a las técnicas analíticas tradicionales de identificación y cuantificación, principalmente el hecho de que no se requiere especialización del operador, la posibilidad de diseño portátil y de miniaturización, hace a los biosensores ideales para determinaciones *in situ* tanto en campo como para uso hogareño. Las áreas de aplicación son amplias y variadas siendo utilizados principalmente para diagnóstico clínico, detección de drogas, toxinas, monitoreo ambiental y de calidad alimenticia^{5,6}.

El principio de funcionamiento de los biosensores se basa en la detección de una o más sustancias de manera específica y selectiva transformando interacciones biológicas en señales analíticas. Para que esta transformación pueda ocurrir se requieren tres partes que deben funcionar conjuntamente: el sistema de bioreconocimiento, compuesto de una sustancia de origen biológico, y que cumple la función de reconocer específicamente el analito a sensar; la fase de transducción, donde se genera la señal, y la fase de detección, donde la señal es procesada y transformada en información cuantitativa o semicuantitativa de fácil interpretación^{7,8}. En la **figura 1.1** se esquematizan las tres partes que conforman un biosensor. Al colocar la muestra en el dispositivo, el sistema de biorreconocimiento reconoce específicamente al/los analitos de interés, provocando una variación en la fase de transducción que es observada como una señal en la fase de detección.



Figura 1.1: Esquema de funcionamiento de un biosensor.

Cada una de las partes del biosensor puede estar constituida por diferentes elementos. El biorreconocimiento puede ser enzimático, inmunológico o por ácidos nucleicos, la transducción puede ser por cambios en la masa, en las propiedades eléctricas u ópticas y la detección puede ser másica, electroquímica u óptica. La posibilidad de combinación de diferentes componentes abre un abanico muy amplio para el diseño de biosensores para una infinidad de analitos.

A continuación, se describen por separado cada una de las partes que componen a los biosensores detallando las distintas posibilidades de construcción para cada uno de ellos.

1.1.1 El sistema de biorreconocimiento

El sistema de biorreconocimiento es el componente del biosensor que tiene contacto directo con la muestra. Su funcionamiento se basa en la especificidad natural de reconocimiento que presentan algunas moléculas de origen biológico como por ejemplo enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo o pares complementarios de ácidos nucleicos. En las últimas décadas también se han utilizado moléculas de origen sintético con funcionalidad similar a las biológicas^{9,10}. Los sistemas de biorreconocimiento pueden clasificarse según la interacción que da lugar al evento de reconocimiento, es decir según el origen del elemento de reconocimiento en: enzimáticos, de afinidad o químicos⁶.

El biorreconocimiento enzimático fue el primer sistema en ser utilizado para el desarrollo de biosensores por ser bien conocida la habilidad natural de las enzimas para formar complejos con un sustrato de modo específico y selectivo¹¹. En este caso el sistema de biorreconocimiento funciona también como transductor, es decir, al ocurrir el reconocimiento los complejos enzima-sustrato formados son capaces de catalizar reacciones químicas generando cambios detectables (señales directas). La actividad enzimática depende fuertemente de las condiciones ambientales como: temperatura, fuerza iónica o pH, y de las concentraciones de cofactor e inhibidor. Lo que implica que para el buen funcionamiento de este tipo de biosensores resulta fundamental analizar y ajustar la composición del medio de reacción. El empleo de enzimas para el

armado de la capa de biorreconocimiento presenta algunas desventajas como su poca estabilidad, vida media corta y alto costo de producción^{7,12}.

Un ejemplo de este tipo de dispositivo es el biosensor de glucosa de primera generación que se esquematiza en la **figura 1.2**. En este caso el analito es la molécula de glucosa y el elemento de biorreconocimiento la enzima glucosa oxidasa. El principio de funcionamiento está basado en la interacción específica enzima-sustrato siendo la detección de origen electroquímico. La glucosa se oxida en presencia de la enzima, luego ocurre un intercambio electrónico entre la enzima y un mediador, en este caso oxígeno, que se reduce generando una señal electroquímica directa⁸.

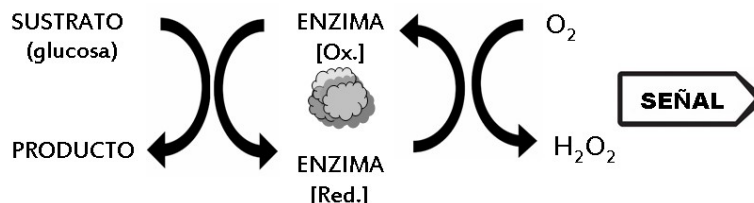


Figura 1.2: Esquema de un biosensor enzimático: biosensor de glucosa de primera generación.

En el biorreconocimiento por afinidad el receptor y el analito presentan interacciones fuertes y selectivas entre sí. Dentro de esta clasificación se encuentran los **inmunosensores**, cuyo funcionamiento se basa en las interacciones entre anticuerpo y antígeno, y los **sensores de ADN**, basados en la interacción entre hebras de ácido desoxirribonucleico (ADN) complementarias o entre un aptámero¹³ y su analito específico. En estos casos no se produce una señal directa al ocurrir el evento de reconocimiento, sino que es necesario desarrollar la etapa de transducción para señalizarlo. Se han aplicado una gran variedad de estrategias de transducción que dependen de las características de cada sistema de biorreconocimiento. Una de las estrategias más utilizadas, sobretodo en inmunosensores, consiste en incorporar un marcador o etiqueta química que, al ocurrir el evento de reconocimiento, reacciona para dar señal. Otra estrategia, que no requiere etiqueta, consiste en detectar el evento de reconocimientos a partir de las diferencias superficiales en ausencia y presencia de analito.

Una ventaja de los biosensores de afinidad consiste en que los procesos para obtener, aislar y purificar tanto anticuerpos como secuencias de ADN simple cadena (sc-ADN) están automatizados resultando más estables y menos costosos que en el caso de las enzimas^{8,14,15,16}.

Inmunosensores: los métodos inmunoquímicos suelen presentar una gran capacidad analítica debido a la alta afinidad y especificidad antígeno-anticuerpo pero que depende en gran medida del tipo de anticuerpo. La producción de anticuerpos requiere procedimientos de inmunización tradicionales que implican el uso de animales. Un inconveniente del método radica en el hecho de que no es posible producir especificidad de anticuerpos idéntica incluso en dos individuos de la misma especie¹⁷. Varios estudios han demostrado que la inmovilización orientada de los anticuerpos a la superficie del sensor favorece la unión del antígeno, lo que aumenta su estabilidad respecto a la que presentan en solución¹⁸.

Un ejemplo del reconocimiento antígeno-anticuerpo es el del inmunosensor para la detección visual de la infección por enterovirus 71 esquematizado en la **figura 1.3**. El biosensor es capaz de detectar el antígeno de enterovirus 71 (EV71). El elemento de biorreconocimiento es un inmunocomplejo formado por el anticuerpo que reconoce EV71 (anti-EV71 IgM) y otro anticuerpo marcado (G Anti-H IgM/HRP) modificado químicamente con una enzima peroxidasa, que actúa como etiqueta química. La muestra se coloca en un pocillo al que se agrega el inmunocomplejo, peróxido de hidrógeno y TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina). Al producirse el biorreconocimiento, la enzima cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a expensas de la oxidación de TMB, que vira de incoloro a azul, lo que permite identificar un cambio de color a simple vista¹⁹.

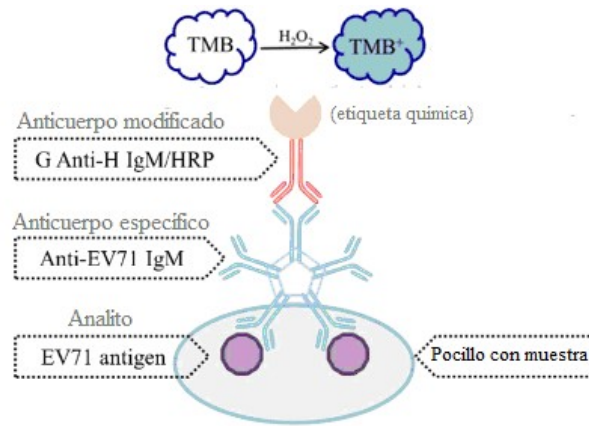


Figura 1.3: Ejemplo de biorreconocimiento antígeno-anticuerpo. Figura inspirada en el trabajo de Zhaozhao¹⁹.

Genosensores: el reconocimiento entre hebras sc-ADN ocurre por interacciones entre purinas y pirimidinas, obteniéndose como resultado estructuras doble cadena (dc-ADN)²⁰. Las secuencias sonda suelen inmovilizarse sobre la superficie del genosensor y reconocen específica y selectivamente a la secuencia analito. En la **figura 1.4** se esquematiza un ejemplo de este tipo de reconocimiento: el principio de funcionamiento del genosensor impedimétrico para la detección de cáncer en células de cabeza y cuello. Su funcionamiento se basa en la detección de un gen marcador (*MGMT* metilado). La secuencia sonda hibridiza por complementariedad con la secuencia analito pudiendo distinguirla de otra con tan solo una base cambiada (*mismatch*). Al formarse la doble cadena, la composición de la superficie del biosensor cambia y por lo tanto se modifica el espectro de impedancia²¹. La señal está dada por la diferencia entre los espectros de impedancia antes y después del agregado de la muestra.

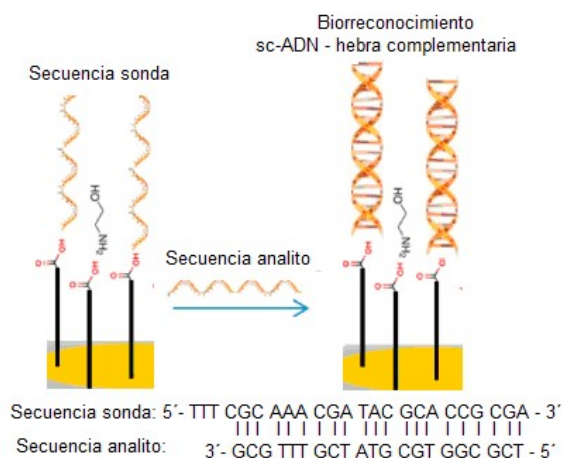


Figura 1.4: Ejemplo de biorreconocimiento entre hebras sc-ADN. Figura inspirada en el trabajo de Carr²¹.

Aptasensores: los aptámeros son secuencias cortas sc-ADN o ARN (ácido ribonucleico), oligonucleótidos de menos de 100 nucleótidos, seleccionadas y sintetizadas artificialmente (ver **sección 1.1.4**) para reconocer específica y selectivamente al analito con el que forma un complejo. Existe una gran variedad de aptámeros que pueden reconocer desde moléculas orgánicas de bajo peso molecular, iones metálicos, péptidos o proteínas hasta virus o células²². En la **figura 1.5** se esquematiza un ejemplo de reconocimiento aptámero-analito utilizado en aptasensores: la interacción entre la adenosina trifosfato (ATP, $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$) y el aptámero que la reconoce específicamente, de secuencia: 5'-ACC TGG GGG AGT ATT GCG G AG GAA GGT GTC ACA (A)₁₀ -3' ^{23,24}. El evento de reconocimiento da lugar a un cambio conformacional de la secuencia aptamérica y a la formación de un complejo “aptámero ATP-ATP”. Para los aptasensores de ATP se han reportado múltiples estrategias de generación de señal, las más comunes están basadas en métodos fluorescentes, electroquímicos, quimioluminiscentes y colorimétricos²⁵.

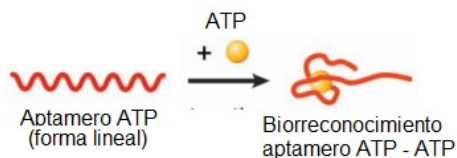


Figura 1.5: Ejemplo de biorreconocimiento aptámero-analito. Figura inspirada en el trabajo de Ying²³.

Biorreconocimiento químico, en este caso los receptores no son moléculas biológicas sino sustancias sintéticas diseñadas de modo que su estructura

secundaria y los grupos funcionales involucrados permitan una interacción específica y selectiva con el bioanalito. Típicamente son polímeros de impresión molecular²⁶, calixarenos²⁷ o nanomateriales^{28,29}. Al igual que para los biosensores de afinidad también es necesario desarrollar la etapa de transducción. Los receptores sintéticos son más estables que los biológicos, tienen un peso molecular relativamente pequeño, y se unen más firmemente al analito. Su principal desventaja es su biocompatibilidad relativamente baja^{6,30,31}.

En la **figura 1.6** se muestra la construcción de un polímero de impresión molecular para la detección de un analito por reconocimiento químico de algunos fragmentos específicos. En este ejemplo se utilizó como plantilla parte de la molécula analito creando los sitios de reconocimiento mediante su eliminación. Al estar en contacto el polímero de impresión molecular resultante con la molécula analito los sitios de reconocimiento se unen a fragmentos específicos funcionando como un sistema de reconocimiento químico.

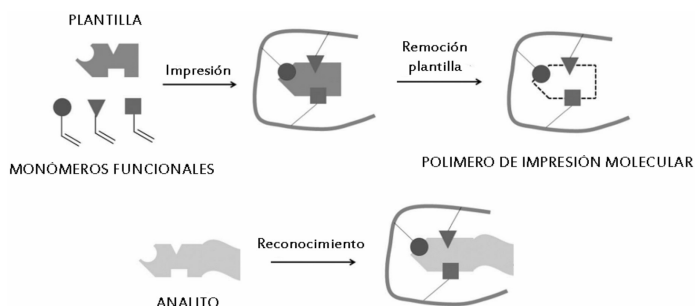


Figura 1.6: Esquema de construcción de un biosensor químico cuyo elemento de reconocimiento es un polímero de impresión molecular. Figura inspirada en el trabajo de Chen²⁶.

1.1.2 La fase de transducción

Como ya se ha mencionado, la mayoría de los sensores requieren una fase de transducción que permita señalar el evento de reconocimiento. Es necesario idear la forma de transformar el reconocimiento en un cambio detectable, para eso en muchos casos se recurre al uso de etiquetas químicas que reaccionan como consecuencia del evento de biorreconocimiento.

Las técnicas de transducción más utilizadas son las desarrolladas para los ensayos tipo ELISA *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*³². Estos ensayos se

basan en el concepto de la reacción antígeno-anticuerpo y son adaptables a otras construcciones, en particular a los biosensores de afinidad. Pueden ser aplicados en análisis altamente sensibles y selectivos para un amplio espectro de analitos como por ejemplo antígenos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hormonas, moléculas orgánicas pequeñas o iones metálicos. Las “etiquetas” más comúnmente utilizadas para inmunoensayos son las enzimas fosfatasa alcalina (ALP, alkaline phosphatase), peroxidasa del rábano picante (*HRP*, *horseradish peroxidase*) y β -galactosidasa que catalizan la conversión de sustratos cromogénicos, quimioluminiscentes o fluorogénicos. Estas etiquetas generalmente son acopladas a anticuerpos y tienen como función la señalización del evento de reconocimiento. A partir de la señal generada se identifica y/o cuantifica al analito^{33–35}.

Los ensayos pueden clasificarse en tres tipos: directos, indirectos o competitivos. En el **ensayo directo**, esquematizado en la **figura 1.7**, la muestra se pone en contacto con una superficie donde el analito queda inmovilizado. Luego se agrega una solución conteniendo al elemento de biorreconocimiento, modificado químicamente para acoplar una etiqueta a su estructura. Al producirse el evento de reconocimiento la etiqueta queda inmovilizada y su reacción genera una señal detectable.

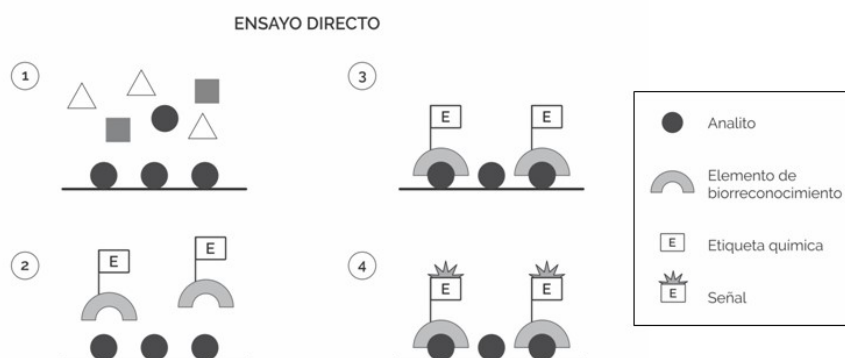
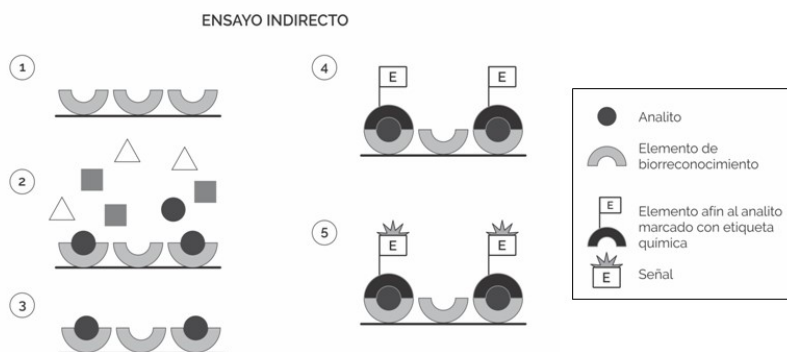


Figura 1.7: Esquema ensayo directo.

El **ensayo indirecto** se esquematiza en la **figura 1.8**. En este ensayo el elemento de biorreconocimiento inmovilizado es puesto en contacto con la muestra que contiene el analito. Al ocurrir el reconocimiento el analito queda inmovilizado selectivamente por interacción con el elemento de

biorreconocimiento. Luego se agrega otro elemento, afín al analito, marcado con una etiqueta. Al producirse este último evento de reconocimiento la etiqueta queda inmovilizada pudiendo ser detectada. A este ensayo se lo denomina tipo sándwich debido a que cada etapa puede considerarse como una capa. Si bien al aumentar el número de eventos de reconocimiento aumenta la sensibilidad también disminuye la especificidad del ensayo pudiendo dar falsos positivos o negativos.



. **Figura 1.8:** Esquema ensayo indirecto.

El **ensayo competitivo** se esquematiza en la **figura 1.9**. En primer lugar, la muestra que contiene al analito es puesta en contacto, en solución, con exceso del elemento de biorreconocimiento (mezcla M). De esta forma se produce el biorreconocimiento selectivo del analito, pero aún no hay generación de señal. Todo el analito disponible se une por afinidad al elemento de biorreconocimiento mientras que el exceso del mismo queda libre en solución. Por otro lado, sobre una superficie se inmoviliza una sustancia afín al elemento de biorreconocimiento, puede ser el analito que se quiere identificar u otra sustancia químicamente similar (para simplificar el esquema se lo denominó analito*). Se pone en contacto la mezcla M con el analito* inmovilizado, de esta manera el elemento de biorreconocimiento en exceso queda inmovilizado por su afinidad con el analito*. Se realizan lavados y se agrega nuevamente una solución conteniendo elemento de biorreconocimiento, pero en este caso marcado con una etiqueta. El elemento marcado reconoce al analito*, de este modo la cantidad de etiquetas inmovilizadas dependerá de la cantidad de analito* libre que haya quedado en el paso anterior. Cuando mayor sea la

concentración de analito en la muestra inicial menor será el exceso de elemento de biorreconocimiento sin marcar y menor la cantidad de analito* bloqueado, es decir que podrá inmovilizarse mayor cantidad de elemento de biorreconocimiento marcado y por lo tanto mayor resultará la intensidad de señal³³.

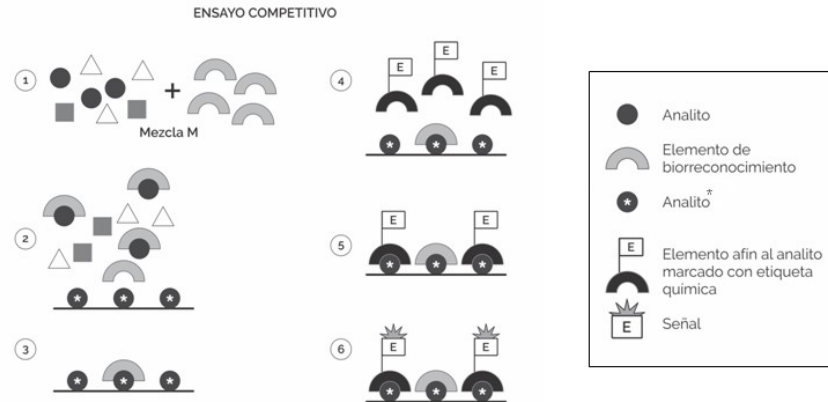


Figura 1.9: Esquema ensayo competitivo.

1.1.3 La detección

El evento de reconocimiento genera un cambio en el sistema que, en la fase de detección, es transformado en una señal fácilmente interpretable. En los casos en los que el cambio no es directo, que son la mayoría, la señal se genera debido a cambios superficiales o a construcciones que incluyen etiquetas como marcadores químicos. Existen numerosas técnicas de detección con diferentes características. Los detectores más comunes en biosensores suelen ser: másicos³⁶, electroquímicos u ópticos siendo los dos últimos los más ampliamente utilizados⁶. La **figura 1.10** resume la clasificación de los biosensores según los métodos de detección que utilizan y las principales técnicas de medición.

CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSENSORES SEGÚN EL TIPO DE DETECTOR

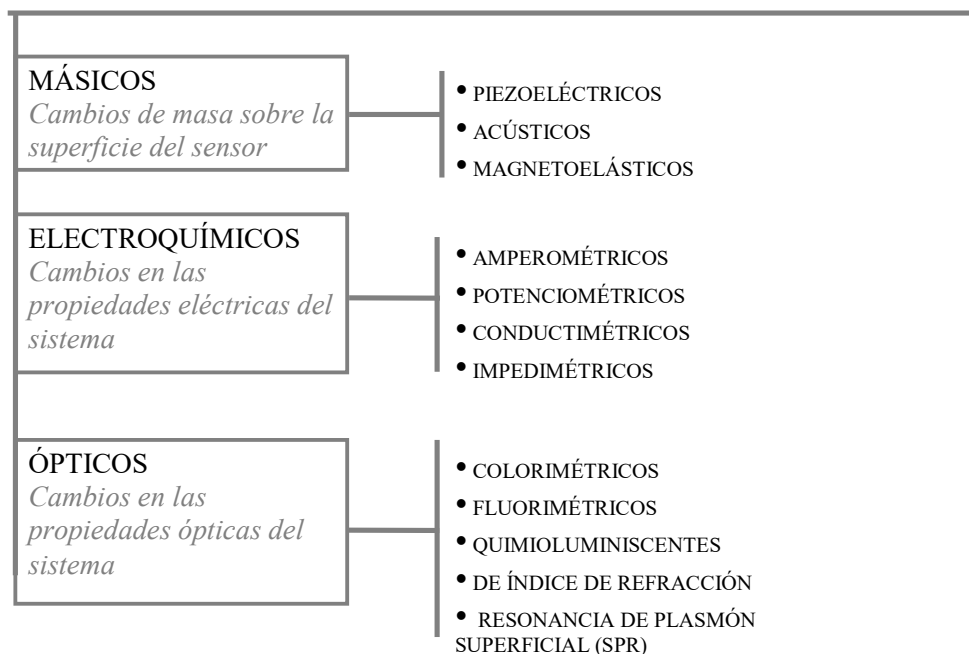


Figura 1.10: Clasificación de los biosensores según la técnica de detección.

Sensores másicos: se basan en la detección de cambios de la masa sobre la superficie del biosensor. Este tipo de detección se emplea principalmente en sensores de afinidad. Cuando el analito interactúa con el elemento de biorreconocimiento inmovilizado sobre la superficie se produce un cambio apreciable de la masa; señalizando el evento de reconocimiento sin necesidad de modificar la estructura con etiquetas químicas.

Se clasifican en piezoeléctricos, acústicos y magnetoelásticos. Los sensores piezoeléctricos utilizan pequeños cristales que pueden vibrar a cierta frecuencia dependiendo de la señal eléctrica aplicada y de la masa de sustancia generando y transmitiendo ondas acústicas que oscilan a una frecuencia de resonancia natural. Una variación en la masa sobre la superficie de sensado se traduce como una variación en la frecuencia resonante, es decir que permiten detectar cambios en la masa a partir del monitoreo de la variación de frecuencia. Los sensores de ondas acústicas transforman una señal eléctrica de entrada en una onda mecánica o acústica. Dicha onda sufre cambios en su velocidad de propagación y/o amplitud debido a algún fenómeno físico, como por ejemplo cambios en la masa, elasticidad, conductividad o propiedades

dieléctricas. Luego de que ocurre el cambio la onda vuelve a transformarse en una señal eléctrica de salida. La diferencia entre las señales de entrada y salida se relaciona directamente con el cambio físico³⁷. El dispositivo de ondas acústicas más común es la balanza de cristal de cuarzo (QCM) que utiliza el principio piezoeléctrico como fenómeno físico, aprovechando las características del cristal de cuarzo.

Los sensores magnetoelásticos están compuestos de cintas ferromagnéticas amorfas con alta resistencia mecánica a la tracción. Su funcionamiento es similar al de los sensores piezoeléctricos, al aplicar un campo magnético se genera una frecuencia resonante sobre la cinta ferromagnética, al producirse el biorreconocimiento esta frecuencia se ve alterada generándose una diferencia de señal³⁸⁻⁴⁰.

Sensores electroquímicos resultan extremadamente atractivos debido a la amplia variedad de reacciones redox que pueden emplearse para la generación de señal. Este tipo de dispositivos son de rápida respuesta, sencillos de operar y proporcionan una notable sensibilidad y selectividad. El instrumental requerido es simple, y permite diseñar sistemas analíticos portátiles y automatizados⁶. Este tipo de biosensores requieren muy poca energía y pueden ser producidos a bajo costo⁴¹. Además, operan con pequeños volúmenes de muestra y permiten el análisis de sustancias coloreadas. Se han desarrollado biosensores electroquímicos basados en las diferentes técnicas: amperométricos, potenciométricos, conductimétricos e impedimétricos^{42,43}.

- Los sensores amperométricos son los más ampliamente utilizados por ser robustos, sensibles y selectivos^{8,12}. La corriente medida tras aplicar un potencial constante resulta proporcional a la concentración de las especies presentes en la muestra que sean electroactivas a dicho potencial. La detección amperométrica es utilizada comúnmente en sensores biocatalíticos y de afinidad debido a su simplicidad y bajo límite de detección. Si en vez de aplicar un potencial constante el mismo es barrido en un rango establecido las técnicas se denominan voltametrías siendo las más aplicadas las voltametrías cíclica, de pulso diferencial y de onda cuadrada. Como respuesta se obtienen picos de corriente cuya altura máxima resulta proporcional a la concentración de analito, además el rango de potencial donde se observa señal aporta

información significativa ya que es una característica cualitativa del sistema^{1,10,39,42}.

-Los sensores potenciométricos se basan en la medición del potencial de una celda electroquímica. Ejemplos comunes son el electrodo de vidrio para pH y los electrodos selectivos de iones. Estos sensores utilizan una celda electroquímica con dos electrodos de referencia para medir el potencial a través de una membrana que reacciona selectivamente con el ion de interés. Pueden ser convertidos en biosensores inmovilizando sobre la membrana un elemento biológico como enzimas, antígenos o anticuerpos siempre y cuando al ocurrir el evento de reconocimiento se genere un ion detectable por el electrodo utilizado⁴².

-Los sensores conductimétricos se basan en el monitoreo de los cambios en la conductividad eléctrica del medio de reacción como consecuencia del evento de biorreconocimiento. Esta detección se utiliza principalmente para biosensores enzimáticos o sistemas biológicos vivos como microorganismos y organelas debido a que la conductividad del medio se ve incrementada durante los procesos metabólicos⁴⁴. Estos sensores suelen no ser específicos y tienen una mala relación señal / ruido, por lo que son poco utilizados⁴⁵.

-Sensores impedimétricos. La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) es una técnica de caracterización que proporciona información eléctrica en el dominio de frecuencia. Esta técnica permite modelar un proceso que ocurre en una celda electroquímica usando combinación de resistencias (R) y capacitancias (C), es decir, la respuesta de corriente producida por el sistema electroquímico puede interpretarse como un circuito RC equivalente.

La impedancia electroquímica se determina generalmente aplicando un potencial de corriente alterna a una celda electroquímica y midiendo la corriente que atraviesa la celda. Para obtener un espectro de impedancia, se aplica una pequeña señal de excitación de corriente alterna (típicamente 5-10 mV) al sistema dentro de un cierto rango de frecuencia, obteniendo así una respuesta de corriente alterna para cada valor de frecuencia analizado.

Debido a su capacidad de sondear directamente las propiedades interfaciales de un electrodo modificado, la técnica es utilizada como una herramienta para estudiar los eventos de biorreconocimiento en la superficie del electrodo, en particular es utilizada en el campo de los sensores de afinidad

(inmunosensores, aptasensores y genosensores). El elemento de biorreconocimiento se encuentra inmovilizado sobre la superficie del electrodo, la diferencia entre los espectros de impedancia antes y después de la interacción con el analito puede relacionarse con la concentración del mismo. Es una técnica simple, rápida, de bajo costo y que no requiere etiquetas químicas^{6,42,46}.

Sensores ópticos se basan en la determinación de cambios en las propiedades ópticas del sistema como consecuencia del evento de biorreconocimiento. Principalmente existen dos tipos de biosensores ópticos: los colorimétricos y los que se basan en cambios que ocurren en la propiedad óptica intrínseca de la biomolécula como resultado de su interacción con el analito. Tales cambios pueden ocurrir en la absorción, emisión, polarización, luminiscencia, en la resonancia de plasmón superficial (SPR) o dispersión combinatoria de luz (efecto Raman); en general se requieren detectores complejos y costosos.

La mayoría de los sensores ópticos reportados son colorimétricos y requieren etiquetas (sustancias colorimétricas o luminiscentes) unidas covalentemente a la biomolécula para generar la señal^{9,47,48}. Los sensores colorimétricos, resultan fáciles de usar y permiten realizar determinaciones a simple vista, sin necesidad de equipamiento, aportando una respuesta cualitativa o semicuantitativa. También es posible obtener una respuesta cuantitativa utilizando instrumental relativamente sencillo y robusto como colorímetros, espectrofotómetros o fluorímetros^{6,49}. Este tipo de detección es especialmente adecuada para determinaciones *in situ*⁵⁰.

1.2 ADN como elemento de biorreconocimiento

Para este trabajo de tesis fueron de particular interés los biosensores cuyo sistema de biorreconocimiento está basado en interacciones por afinidad, específicamente el objeto de estudio fueron los sensores de ADN.

Los sensores de ADN, comenzaron a desarrollarse en la década de 1990 a partir de que se perfeccionaron los procesos de síntesis en fase sólida de cadenas cortas sc-ADN (oligonucleótidos)^{39,51,52}. Actualmente este

procedimiento es bien conocido y existen varias empresas dedicadas a la comercialización de oligonucleótidos sintetizando las secuencias a pedido.

La síntesis en fase sólida consiste en alargar la cadena por agregado de fosforamiditas de nucleósidos repitiendo en ciclos los pasos sintéticos específicos. En la **figura 1.11** se esquematiza un ciclo completo. El primer monómero de la cadena se encuentra unido a un soporte sólido del cual será separado una vez finalizada la síntesis. Los grupos funcionales reactivos de cada nucleósido se encuentran derivatizados de modo de protegerlos químicamente para poder controlar la formación de las uniones fosfodiéster en los posteriores pasos de síntesis. Los grupos aminos exocíclicos son protegidos con grupos lábiles en medio básico (B-Gp). Mientras que los hidroxilos del carbono 5' son protegidos por dimetoxitritilo (DMTr), lábil en medio ácido.

En el primer paso (detrilitación), se elimina el grupo protector DMTr. A continuación (activación), se activa un monómero de fosforamidita que se acopla a través del grupo hidroxilo libre del nucleósido ligado a la fase sólida mediante una unión triésterfosfito. En el tercer paso (oxidación) el triésterfosfito se oxida para dar un átomo de fósforo pentavalente característico del enlace fosfato de los ácidos nucleicos mientras que los nucleósidos compatibles que no hayan reaccionado son enmascarados mediante acetilación para evitar que se formen productos secundarios no deseados en el siguiente ciclo (enmascaramiento). Finalmente, un nuevo paso de eliminación del grupo protector DMTr permite el comienzo del siguiente ciclo. Una vez que se completa el ensamblado de la cadena de oligonucleótidos, todos los grupos protectores son removidos para dar lugar a la secuencia oligonucleotídica deseada, el oligonucleótido es liberado de la fase sólida, y la secuencia es habitualmente purificada por cromatografía^{53,54}.

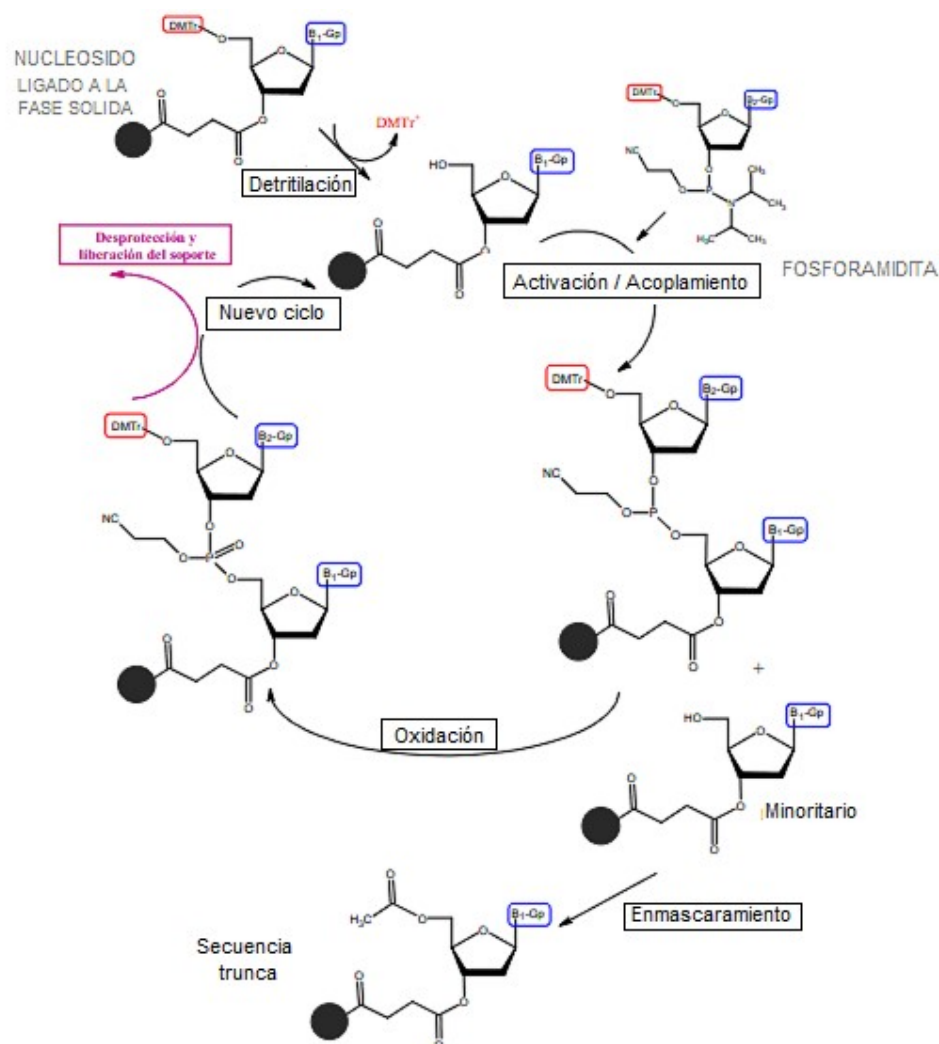


Figura 1.11: Ciclo de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. Figura cortesía de Belén Ponce⁵⁵.

La síntesis de secuencias oligonucleotídicas en fase sólida también permite la incorporación de diferentes grupos funcionales tanto en el extremo 5' de la secuencia a partir del empleo de fosforamiditas modificadas, como en el extremo 3' a partir de modificaciones químicas en el soporte sólido. Esos grupos funcionales son de interés para el armado de capas de biorreconocimiento de biosensores ya que otorgan funcionalidades que no están presentes en los oligonucleótidos naturales. Entre las modificaciones más comunes se encuentran la incorporación de *linkers*, por ejemplo: grupos amino, biotina o tiol, que permiten la interacción oligonucleótido-superficie y por

lo tanto su inmovilización o la de fluoróforos y *quenchers* que cumplen la función de etiquetas químicas^{39,56}.

Entre las funcionalidades que puede presentar una secuencia oligonucleotídica sintética, una de las más interesantes es la de actuar como aptámero. Los aptámeros son secuencias cortas sc-ADN o ARN que se unen a ligandos específica y selectivamente. La secuencia específica que reconoce cada ligando se obtiene a partir del método de SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), esquematizado en la **figura 1.12**. Este método consiste en exponer al ligando inmovilizado (analito para el que se desea hallar la secuencia aptamérica) a una biblioteca combinatoria de oligonucleótidos de entre 10^{12} y 10^{15} secuencias al azar (obtenidas por síntesis en fase sólida), y realizar múltiples rondas de selección (generalmente entre 6 y 18) eluyendo entre cada una, eliminando las secuencias que no quedan unidas específicamente y amplificando la secuencia que reconoce específicamente al analito. De esta forma se enriquece la biblioteca con la secuencia que presenta mayor afinidad por el analito en cuestión¹³.

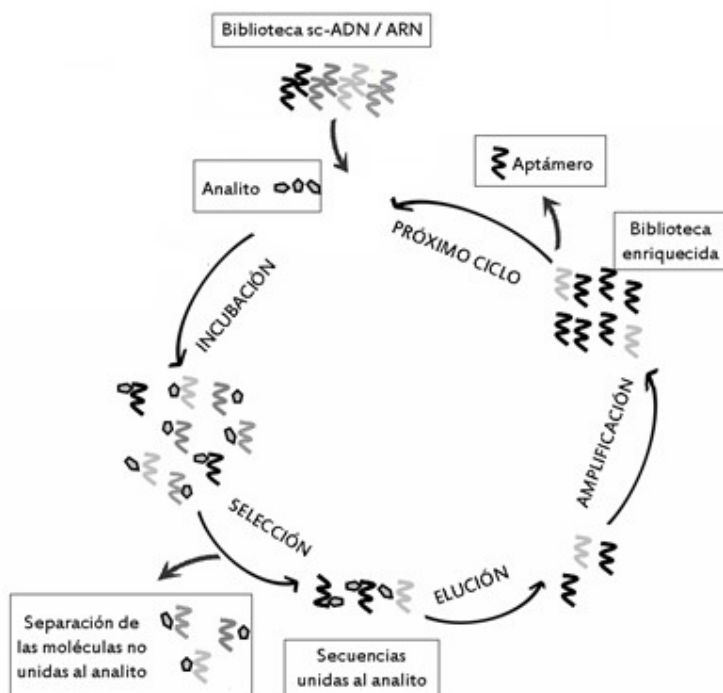


Figura 1.12: Esquema del método SELEX. Figura inspirada en el trabajo de Chen⁵⁷.

Como ya se ha mencionado, los avances tecnológicos para la síntesis de secuencias oligonucleotídicas en fase sólida y la optimización del método de SELEX fueron los que permitieron el desarrollo de los sensores de ADN entre los que se encuentran los genosensores y los aptasensores.

Los **genosensores** utilizan como elemento de biorreconocimiento sondas sc-ADN inmovilizadas. El reconocimiento se basa en los procesos de unión específicos que dan lugar a la formación de híbridos de ADN-ARN o ADN-ADN. La formación de dobles cadenas de ácidos nucleicos es el resultado de dos tipos de interacción: el apareamiento de bases complementarias por puentes de hidrógeno y el *stacking* entre pares de bases paralelas en el interior de las cadenas. En relación con las interacciones puente de hidrógeno, si bien la interacción canónica es la de *Watson-Crick* (**figura 1.13**), también existen otro tipo de apareamientos que han sido reportados tanto en la naturaleza como en construcciones sintéticas. De hecho, es posible encontrar 31 modos de aparear bases neutras con alta eficiencia. Entre ellos se encuentra el apareamiento *Hoogsteen* (encontrado en triples hélices de ADN y varios ARN) o el apareamiento *Wobble* (común en el ARN), entre otros.

La eficiencia y estabilidad de las interacciones entre secuencias complementarias hacen posible el diseño de genosensores donde la secuencia analito es reconocida por la secuencia sonda entre una mezcla de hebras sc-ADN no complementarias con alta sensibilidad, de modo que son capaces de discriminar mutaciones de una sola base³⁹.

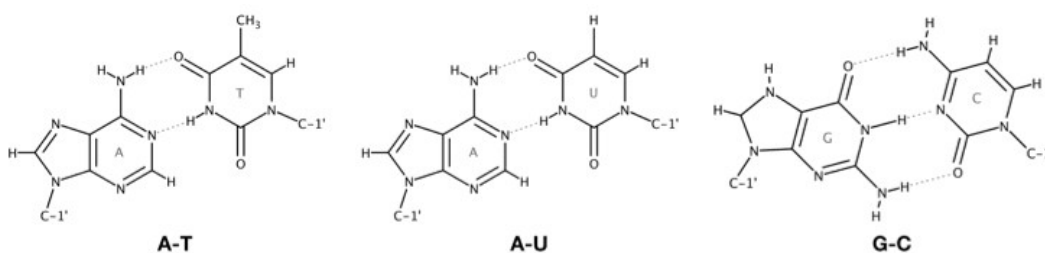


Figura 1.13: Interacciones puente de hidrogeno Watson-Crick. A: adenina y G: guanina (purinas) T: timina, C: citosina y U: uracilo (pirimidinas).

Los **aptasensores** utilizan aptámeros como elemento de biorreconocimiento, estos presentan una gran especificidad y selectividad por el ligando. Al ser aislados *in vitro* pueden seleccionarse para unirse específicamente a cualquier

ligando, incluso moléculas pequeñas con baja inmunogenicidad o alta toxicidad. Estos ligandos pueden ir desde moléculas orgánicas de bajo peso molecular, iones metálicos, péptidos o proteínas hasta virus o células^{50,58-60}.

El mecanismo de funcionamiento y los diseños para el armado de la fase de biorreconocimiento y las estrategias de transducción y detección reportados para sensores de ADN poseen muchos puntos en común con los reportados previamente para inmunosensores, debido a que estos han sido los primeros en haberse desarrollado y comercializado. Sin embargo, las secuencias oligonucleotídicas presentan algunas ventajas sobre los anticuerpos que permiten plantear sistemas más robustos. Los oligonucleótidos son químicamente más estables y mucho más pequeños que los anticuerpos, permiten su incorporación en dispositivos con mayor densidad superficial que las biomoléculas de mayor tamaño. Pueden resistir numerosos ciclos de desnaturalización y renaturalización térmica sin perder la capacidad de unión, mientras que los anticuerpos desnaturalizados generalmente no pueden ser renaturalizados. Tanto la hibridación doble cadena como la interacción aptámero-analito son reversibles, lo que permite el diseño de biosensores reutilizables⁶¹.

La posibilidad de incorporar, durante la síntesis en fase sólida, una gran variedad de modificaciones químicas facilita tanto la inmovilización de las secuencias sonda como el acoplamiento de etiquetas químicas que permitan la generación de señales colorimétricas, fluorescentes, quimioluminiscentes o electroquímicas pudiendo acoplar el biorreconocimiento a un amplio abanico de métodos de transducción. Ejemplos de esto son los sistemas de detección utilizados en ensayos tipo ELISA desarrollados para inmunosensores que pueden ser aplicados en genosensores y aptasensores ya sea utilizando enzimas para la generación de señal o reemplazándolas por etiquetas químicas o por cambios estructurales^{62,63}. En este sentido, las estructuras secundarias de las cadenas pueden diseñarse en forma racional para sufrir cambios conformacionales que, en presencia del analito, posibiliten numerosos esquemas de transducción de señales⁶⁴.

1.2.1 Aplicaciones de los biosensores

La gran variedad de combinaciones disponibles de fases de biorreconocimiento, transducción y detección da lugar a infinidad de posibles diseños en el campo de los biosensores. Es tal su versatilidad que son empleados para una enorme diversidad de aplicaciones como la detección de organismos causantes de enfermedades y contaminantes de alimentos, investigación forense, monitoreo medioambiental⁵¹, diagnóstico de enfermedades infecciosas, identificación de mutaciones genéticas, detección de fármacos⁴³, estudios biológicos y microbiológicos, entre otras^{50,60,61}. En particular en el campo de la medicina existe una necesidad urgente de dispositivos exactos, rápidos y económicos que puedan utilizarse para aportar información confiable sobre los parámetros bioquímicos ya sea, para mediciones de rutina en el hogar, como por ejemplo glucosa en sangre, o en centros de salud tanto para diagnóstico (por ejemplo detección de virus o bacterias en fluidos corporales) como para emergencias (por ejemplo detección de biomarcadores cardíacos que permitan advertir de forma inmediata alteraciones en la función cardíaca)¹⁸. Esto quedó demostrado particularmente durante la pandemia por la enfermedad de coronavirus (covid-19) causada por el virus SARS-CoV-2. Ante una enfermedad altamente contagiosa y desconocida fue de suma importancia tener herramientas de diagnóstico para recabar datos epidemiológicos y tomar decisiones político-sanitarias de modo de evitar el colapso de los sistemas sanitarios. Los biosensores para detección y diagnóstico de coronavirus jugaron un rol esencial en este caso. En Argentina el sistema científico-tecnológico y los organismos de control tuvieron la capacidad de responder muy rápidamente con el desarrollo de diferentes test de respuesta rápida, interpretación sencilla y que pudieran ser aplicados e instalaciones de relativa baja complejidad, sin necesidad de equipamiento complejo de laboratorio⁶⁵. Se desarrollaron y comercializaron al menos cuatro test de los cuales dos entran en la clasificación de inmunosensores y los otros dos son “test PCR”⁶⁶.

En la **Tabla 1.1** se describe sintéticamente el funcionamiento de los cuatro test desarrollados en Argentina.

Tipo de biosensor	Nombre del test Principio de funcionamiento
INMUNOSENSOR Detección de inmunoglobulinas IgG y/o IgM en sangre	COVID-AR⁶⁷ ELISA indirecto que utiliza la enzima <i>HRP</i> como etiqueta química. La detección es colorimétrica (por espectrofotometría) y permite cuantificar anticuerpos en sangre.
	FarmaCovTest⁶⁸ Ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral con detección colorimétrica a ojo desnudo.
PCR <i>(Polymerase Chain Reaction)</i> La retrotranscripción y amplificación del ARN viral se lleva a cabo por la técnica de LAMP en muestras de hisopado nasofaríngeo u orofaríngeo	NEOKIT COVID-19⁶⁹ La detección ocurre junto con la amplificación, en un único paso operativo, por un método colorimétrico cualitativo, observándose un cambio de color a simple vista.
	ELA-CHEMSTRIP⁷⁰ Utiliza una técnica de amplificación mejorada totalmente desarrollada en Argentina ELA® (<i>Easy Loop Amplification</i>). La detección colorimétrica se lleva a cabo en una segunda etapa mediante un ensayo inmunocromatográfico.

Tabla 1.1: Principio de funcionamiento de los test para covid-19 desarrollados en Argentina.

Algunos de estos test fueron puestos a disposición de los centros de salud en menos de 60 días. La velocidad con que se lograron los desarrollos es una muestra de la relevancia del campo de investigación.

Los principios de funcionamiento de los test mencionados, así como los de otros biosensores, pueden ser ajustados para la detección de distintos anticuerpos o ARN virales. Esto no es solamente una ventaja, sino que evidencia la necesidad y la importancia del desarrollo de estrategias tanto de biorreconocimiento como de transducción y detección, que puedan acoplarse al armado de diferentes dispositivos de forma urgente para la detección de nuevos analitos. Tal como sucedió durante la pandemia por SARS-CoV-2. El hecho de que la mayoría de los test se basaron en inmunoensayos evidencia

un mayor desarrollo de las investigaciones en esta área, lo que es de esperar porque lleva varias décadas de implementación. Para la detección de enfermedades por virus, los sensores de ADN podrían ser una buena alternativa sobre todo para diagnóstico. El ADN que se obtiene a partir del tratamiento de la muestra, la retrotranscripción del ARN viral y amplificación podría ser identificado, por ejemplo, a partir de la interacción con su hebra complementaria, utilizando el principio de funcionamiento de genosensores. Todavía hay mucho por explorar y desarrollar, siendo un campo de investigación con grandes perspectivas.

Más allá de los ejemplos puntuales para el diagnóstico de covid-19, los biosensores en general presentan varias ventajas frente a otras técnicas de detección y cuantificación. Son altamente específicos, lo que minimiza posibles interferencias, son precisos y sensibles; permitiendo la cuantificación de analitos en muy baja concentración, debajo de micromolar incluso llegando a picomolar. Permiten interpretar los resultados de manera directa y sencilla. Además, es posible miniaturizar tanto los dispositivos como la muestra a analizar aumentando su aplicabilidad. Normalmente no es necesaria la preparación de las muestras ya que pueden ser diseñados de forma de evitar interferencia eliminando el efecto de matriz⁶¹, por lo que pueden emplearse en entornos muy sucios⁶⁰. La gran mayoría de los desarrollos de biosensores funcionan muy bien para la detección *in vitro*. La detección *in vivo* o dentro de tejidos aún se encuentra en una etapa muy inicial y requiere más investigación de métodos y materiales novedosos para la transducción de señales⁶¹. Un punto a tener en cuenta para mejorar el rendimiento de los biosensores es el efecto de la inmovilización en el funcionamiento de la biomolécula. En este contexto adquieren relevancia las características de los materiales que se utilizan como superficie de inmovilización y su combinación con nanomateriales¹⁰.

1.3 Peroxidasas y generación de señal

Clásicamente el método ELISA emplea proteínas como etiquetas para la generación de señal. En particular la más utilizada en biosensores es la peroxidasa del rábano picante (*HRP*),^{34,71,72} por su estabilidad, facilidad para

ser conjugada con inmunoglobulinas y para la detección de los productos de reacción por métodos colorimétricos.

Al ser una hemoproteína, utiliza hemina como cofactor y es capaz de catalizar reacciones redox bisustrato con peróxido de hidrógeno H_2O_2 como oxidante, junto con un segundo sustrato susceptible de ser oxidado. Su funcionamiento se esquematiza en la **figura 1.14**. Entre los sustratos más comúnmente utilizados en aplicaciones analíticas se encuentran los colorimétricos como TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) que vira de incoloro a azul al oxidarse, y ABTS (Sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) que vira de verde claro a verde-azulado oscuro al oxidarse, y los quimioluminiscentes como luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona)⁷³.

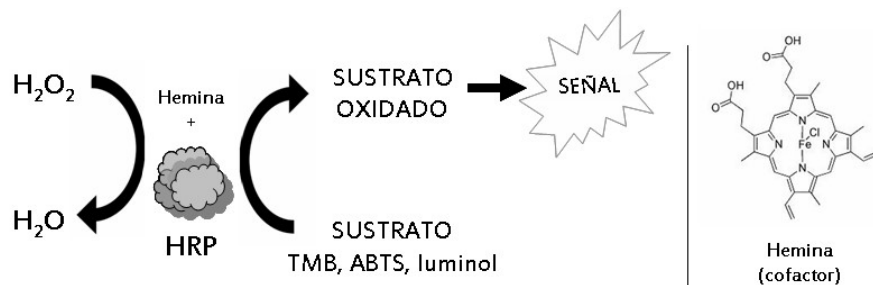


Figura 1.14: Esquema del funcionamiento de la enzima *HRP* como generadora de señal.

El uso de enzimas como etiquetas generadoras de señal presenta algunas desventajas. Tanto su preparación como purificación resultan laboriosas y costosas, además los cambios de temperatura afectan a la actividad catalítica acotando su efectividad⁷⁴. Con el objetivo de hallar etiquetas más estables, económicas y de fácil conjugación a los transductores, se han desarrollado una gran variedad de compuestos no proteicos con actividad similar a la de las enzimas peroxidasas. Estos compuestos van desde sales férricas a diferentes metaloporfirinas⁷⁵. De hecho, la hemina es capaz de catalizar reacciones de peroxidación por sí misma, aunque en niveles mucho más bajos que los de las enzimas que la utilizan como cofactor⁷⁶. Entre los compuestos con actividad similar a las de las peroxidasas se han identificado algunas secuencias sc-ADN. Estas secuencias fueron aisladas por el método SELEX como aptámeros específicos para porfirinas⁶³. Lo que motivó la búsqueda del aptámero capaz de reconocer hemina fue la relevancia de la “teoría del mundo ARN” que, entre

sus hipótesis, postula que una secuencia simple cadena podría funcionar como catalizador de reacciones químicas⁷⁷. Los complejos aptámero-hemina resultaron ser muy estables y presentaron una actividad peroxidasa mayor a la de hemina libre⁷⁵. Se encontró más de una secuencia capaz de unirse específicamente a hemina, todas tenían en común un alto porcentaje de guanina (G)^{78,79} lo que les permite formar estructuras terciarias específicas, denominadas cuartetos de G, en las cuales las guaninas se encuentran conectadas mediante interacciones puente de hidrógeno del tipo Hoogsteen. Estas estructuras se esquematizan en la **figura 1.15**.

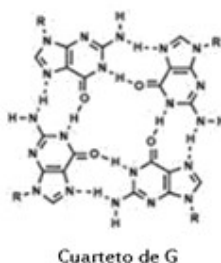


Figura 1.15: Estructura cuarteto de G.

La estabilidad de estas estructuras está muy ligada a la concentración de algunos cationes, en particular es indispensable la presencia de ion potasio (K^+) en el medio para estabilizar la estructura cuarteto de G^{75,78,80}. El K^+ se intercala entre dos estructuras cuarteto de G interactuando con los oxígenos de las guaninas para formar un quelato, tal como se esquematiza en la **figura 1.16**.

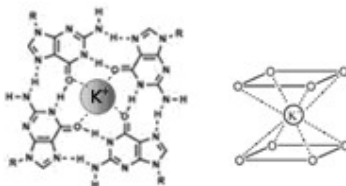


Figura 1.16: Estabilización de los cuartetos de G por ion potasio (K^+).

En 1996 Sen *et al.*⁷⁹ reportaron que entre las secuencias aisladas por SELEX la que presentó mayor actividad catalítica fue la denominada *PS2.M* que consta de 18 nucleótidos: 5'- *GTG GGT AGG GCG GGT TGG* - 3'. Casi una década más tarde, en 2004, Pavlov *et al.*⁴⁷ diseñaron una nueva secuencia ajustando y

acortando *PS2.M*. Esta secuencia, denominada *PW17*, consta de 17 nucleótidos: 5'- GGG TAG GGC GGG TTG GG-3'⁸¹. En la **figura 1.17** se esquematizan las estructuras de las secuencias *PS2.M* y *PW17* indicando las estructuras cuarteto de G formadas.

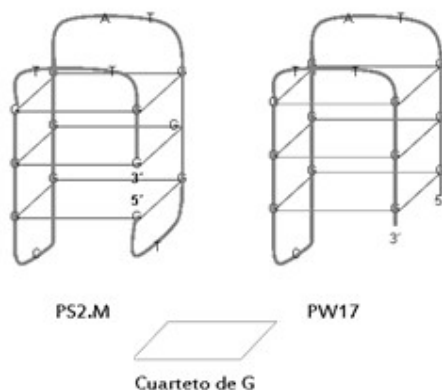


Figura 1.17: Estructuras de las secuencias *PS2.M* y *PW17* indicando los cuartetos de G formados.

Ambas secuencias tienen la capacidad de coordinarse con hemina formando “DNAzima peroxidasa”, es decir que pueden catalizar reacciones de peroxidación bisustrato con H_2O_2 como oxidante y un sustrato que resulta oxidado de forma similar a las peroxidadasas enzimáticas. Li *et al.* 2009⁸¹ demostraron que la velocidad catalítica de *PW17* es mayor a la de *PS2.M*. En la **figura 1.18** se esquematiza la reacción catalizada por la DNAzima peroxidasa de secuencia *PW17* en un medio acuoso con K^+ y hemina.

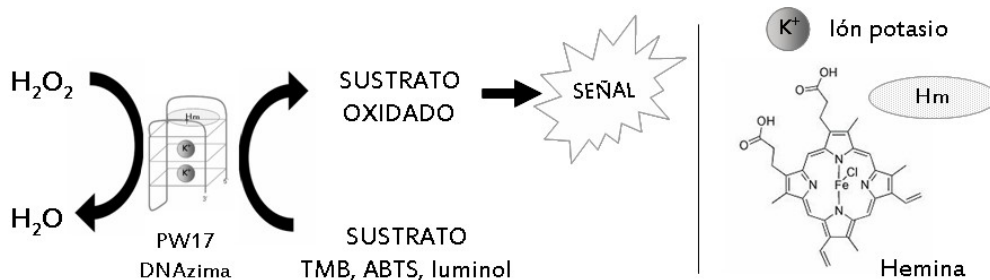


Figura 1.18: Esquema de la reacción de peroxidación catalizada por la DNAzima peroxidasa de secuencia *PW17* en medio acuoso con K^+ y hemina.

Las DNAzimas peroxidasas comenzaron a ser utilizadas para aplicaciones bioanalíticas hace dos décadas, aunque todavía continúan estudiándose nuevas aplicaciones debido a su gran versatilidad. El uso de secuencias sc-ADN en biosensores en lugar de proteínas aporta muchas ventajas como ser mayor termoestabilidad, facilidad de síntesis y menor costo de producción⁷⁴. La incorporación de DNAzimas peroxidasas a la secuencia de reconocimiento del analito favorece la generación directa de la señal, cumpliendo la misma función que *HRP* en ELISA pero sin necesidad de modificar la estructura del elemento de biorreconocimiento para introducir etiquetas químicas⁵⁰. Al igual que *HRP*, la DNAzima peroxidasa es capaz de catalizar la peroxidación de diversos sustratos, pudiendo generar señales de diferente naturaleza: fluorescentes^{80,82}, quimiluminiscentes⁴⁷, electroquímicas^{83,84} o colorimétricas^{73,85}. La mayoría de los sensores reportados son colorimétricos ya sea de respuesta cualitativa observable a simple vista o cuantitativa midiendo absorción⁷⁴. Es interesante señalar que en los últimos años se incrementaron los desarrollos de biosensores electroquímicos que utilizan DNAzima peroxidasa para la generación de señal aprovechando la actividad redox de los sustratos. En estos casos suelen utilizarse electrodos serigrafiados (ver **Capítulo 2**), en lugar de las celdas de tres electrodos, ya que permiten disminuir el volumen de muestra (menos de 100 μL) a la vez que contribuyen con una respuesta de fácil interpretación y reducción de costos siendo la producción de estos sensores rápida, simple y económica⁸⁶.

1.4 DNAzima peroxidasa como parte del elemento de biorreconocimiento

La actividad catalítica de las DNAzimas requiere la formación de estructuras secundarias o terciarias bien definidas y la alteración de tales estructuras puede desactivarla. Esta propiedad fue aprovechada para construir sensores que funcionan activando la función DNAzima en presencia de analito y desactivándola en ausencia del mismo⁸⁷. Una manera de lograr ese efecto es diseñar la fase de biorreconocimiento de modo que la secuencia que forma DNAzima se encuentre inicialmente dividida en dos partes inactivas capaces de reensamblarse en presencia del analito. Un ejemplo de esta estrategia es el aptasensor colorimétrico para detección de cocaína desarrollado por Luo *et al.* 2019⁵⁰ que se esquematiza en la **figura 1.19**. La fase de biorreconocimiento

consta de una sonda de ADN multimódulo (el aptámero se encuentra dividido en dos segmentos). La secuencia DNAzima también se encuentra dividida en dos segmentos, en presencia de la molécula de cocaína (analito) la construcción se ensambla para dar lugar al aptámero de cocaína y a la estructura cuartetos de G con funcionalidad DNAzima peroxidasa. Se produce la oxidación de ABTS a expensas de la reducción de H_2O_2 dando lugar a la señal colorimétrica⁵⁰.

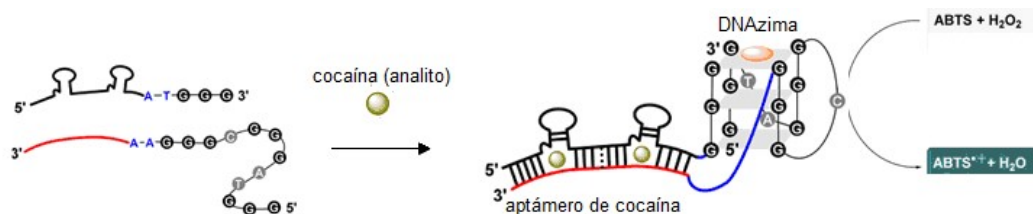


Figura 1.19: Esquema del aptasensor colorimétrico, Luo *et al.* 2019⁵⁰.

Otras estrategias que se basan en la activación de la función DNAzima mediante la manipulación de la estructura secundaria, pero sin necesidad de dividir la secuencia, utilizan el concepto de ensayo de tipo indirecto. En este caso la secuencia sonda, inmovilizada sobre una superficie, se diseña de forma tal que un segmento de su secuencia sea complementario al analito. Adicionalmente se requiere otra secuencia sc-ADN que contenga dos segmentos con diferente funcionalidad: uno complementario al analito y otro capaz de formar DNAzima peroxidasa. Un ejemplo de esta estrategia es el genosensor quimioluminiscente desarrollado por Pavlov *et al.* 2004, que se esquematiza en la **figura 1.20**. El elemento de biorreconocimiento consiste en una secuencia sc-ADN, en parte complementaria a la secuencia analito, inmovilizada sobre una superficie de oro. Una vez producido el evento de reconocimiento se une a la construcción otra hebra sc-ADN también parcialmente complementaria al analito. Esta última es capaz de formar DNAzima peroxidasa y generar una señal quimioluminiscente en presencia de H_2O_2 y luminol⁴⁷.

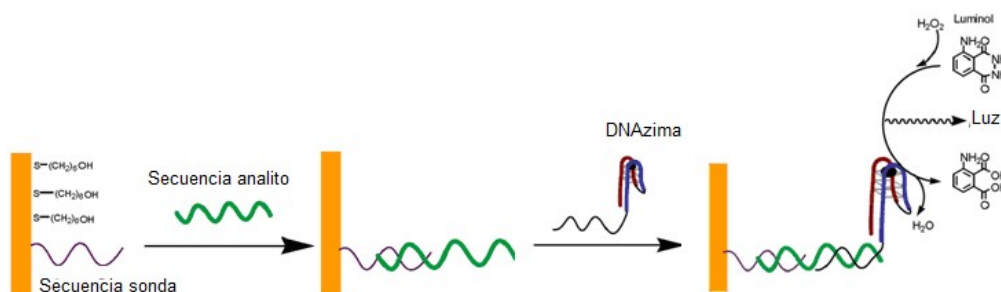


Figura 1.20: Esquema del genosensor quimioluminiscente, Pavlov *et al.* 2004⁴⁷.

Otra manera de controlar el encendido de la señal en presencia de analito consiste utilizar secuencias sonda que adquieran estructuras secundarias de tipo tallo-horquilla (*stem-loop*). En ausencia de analito el sistema permanece apagado. Tras la unión del analito la estructura horquilla-tallo se abre, permitiendo la activación de la función DNAzima y la generación de señal⁷³.

Un ejemplo de esta estrategia es el genosensor electroquímico desarrollado por Shi *et al.* 2015⁸⁸ que se esquematiza en la **figura 1.21**. El elemento de biorreconocimiento consta de una secuencia sonda inmovilizada sobre una superficie de oro. Esta secuencia tiene un segmento autocomplementario y se encuentra inicialmente en estructura de horquilla. En presencia del analito se produce el biorreconocimiento dando lugar a la formación de estructura doble cadena y la horquilla se desarma quedando libre el extremo capaz de formar estructuras cuartetos de G y coordinar hemina, activando la función DNAzima peroxidasa. Luego, en presencia de H_2O_2 y TMB se produce la reacción de oxidación y la señal electroquímica se determina por voltametría de pulso diferencial (VPD)⁸⁸.

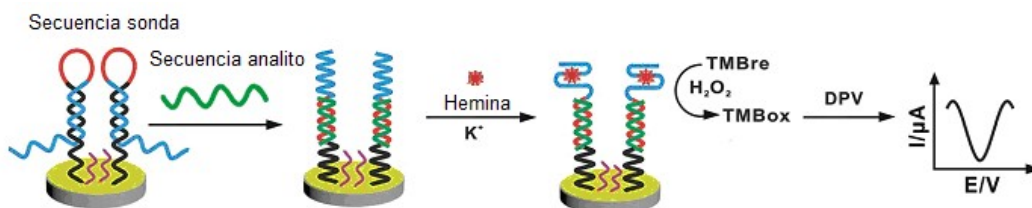


Figura 1.21: Esquema del genosensor electroquímico, Shi *et al.* 2015⁸⁸.

Estas construcciones son algunos ejemplos de las estrategias que pueden emplearse para el diseño de fases de reconocimiento utilizando secuencias sc-

ADN acopladas a DNAzima peroxidasa como generadora de señal a partir de la reacción de peroxidación con diferentes sustratos. En los ejemplos puede observarse claramente la principal ventaja de la DNAzima peroxidasa frente a las peroxidases enzimáticas, no es necesario acoplar etiquetas químicas, sino que la misma secuencia sonda es diseñada de forma tal que sea capaz de generar señal. Además, en cuanto a la posibilidad de inmovilización, las secuencias sc-ADN son muy versátiles. La síntesis en fase sólida permite introducir grupos funcionales típicamente tioles, carboxilos, aminos o biotina capaces interaccionar fuertemente con diferentes superficies⁶.

La principal desventaja del uso de DNAzimas para la generación de señal en biosensores radica en que su actividad catalítica es menor que la de *HRP*, lo que implica menor sensibilidad y mayor límite de detección. Para compensar esa diferencia se han desarrollado diferentes técnicas que buscan conseguir un aumento de la señal, por ejemplo la amplificación isotérmica de la secuencia analito⁸⁹, la amplificación de la señal a partir del diseño racional de la secuencia sonda de modo que las estructuras secundarias o terciarias admitan la formación de DNAzimas múltiples, o la inmovilización sobre diferentes soportes con el objetivo de obtener mayores densidades superficiales de secuencia capaz de activar la funcionalidad DNAzima peroxidasa⁷³. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por optimizar el funcionamiento de las fases de biorreconocimiento y las condiciones de reacción, aun no se ha logrado alcanzar las intensidades de señal obtenidas a partir de la actividad enzimática de la *HRP*. Todavía es necesario seguir investigando el funcionamiento de estos biosensores para optimizar su funcionamiento, robustez y la eficiencia de la actividad peroxidasa de la DNAzima como generadora de señal⁸⁰.

1.5 Técnicas electroquímicas como método de detección de sustrato oxidado por catálisis con DNAzima

En la última década hubo un gran avance en el diseño y armado de biosensores electroquímicos que aprovechan las reacciones de peroxidación para generar señal, entre ellos los sensores que utilizan TMB o ABTS como sustrato de la DNAzima peroxidasa. El funcionamiento suele ser muy similar para todos los sensores de este tipo, en presencia del analito ocurre la oxidación el sustrato. Mediante alguna técnica electroquímica se obtiene una

señal proporcional a la cantidad de sustrato oxidado y por lo tanto a la concentración de analito. En general, las técnicas de detección aplicadas en biosensores electroquímicos de afinidad son las de potencial controlado: cronoamperometría y voltametrías⁹⁰. La elección de la técnica electroquímica para la medición de sustrato oxidado a partir de la catálisis por DNAzima peroxidasa no resulta trivial ya que depende de las características del sistema y su interacción con la superficie del electrodo utilizado. El primer paso para la elección de la técnica de medición consiste en realizar un estudio exploratorio por voltametría cíclica (V.C) para obtener información sobre el comportamiento electroquímico del sistema, varios trabajos han reportado este tipo de análisis exploratorio. Dos ejemplos de esto son los trabajos publicados por Crew *et al.* 2007⁹¹ y Chen *et al.* 2011⁹². En el primero, Crew *et al.* 2007, **figura 1.22 (A)**, se comparan las señales obtenidas por V.C. para TMB oxidado por la reacción de peroxidación en medio levemente ácido (**curva a**) y luego de la acidificación del medio (**curva b**). En medio levemente ácido se observan dos picos en sentido reductivo y dos en sentido oxidativo mientras que en medio fuertemente ácido se observa un pico en sentido reductivo y uno en sentido oxidativo con una diferencia de potenciales adjudicable a una reacción reversible con intercambio de dos electrones. A partir de ese estudio exploratorio por V.C., se optó por realizar las mediciones en medio fuertemente ácido, ya que en estas condiciones la señal presenta picos más definidos lo que resulta más favorable para propósitos analíticos. Los autores eligieron como técnica de medición la cronoamperometría (C.A.), ya que permite controlar el potencial de modo de medir únicamente el TMB oxidado en la catálisis evitando la oxidación electroquímica y tiene como ventaja que requiere instrumental sencillo y de bajo costo⁹¹. En el trabajo publicado por Chen *et al.* 2011, **figura 1.22 (B)**, se reportó la señal de TMB oxidado medida por V.C. únicamente en medio levemente ácido. Se analizó la señal para cada etapa de construcción del sensor. Las señales (**a** y **e**) corresponden a la respuesta obtenida en el medio de reacción para la reacción de peroxidación, en la foto del inserto se muestra la coloración que adquiere el medio de reacción, un color azul más intenso implica mayor cantidad de TMB oxidado. Según los autores al barrer el potencial en sentido reductivo el pico de 0,25 V aumentó al aumentar la

actividad catalítica (**a** y **e**), también decidieron utilizar C.A. como técnica de medición, a potencial fijo sin acidificar el medio⁹².

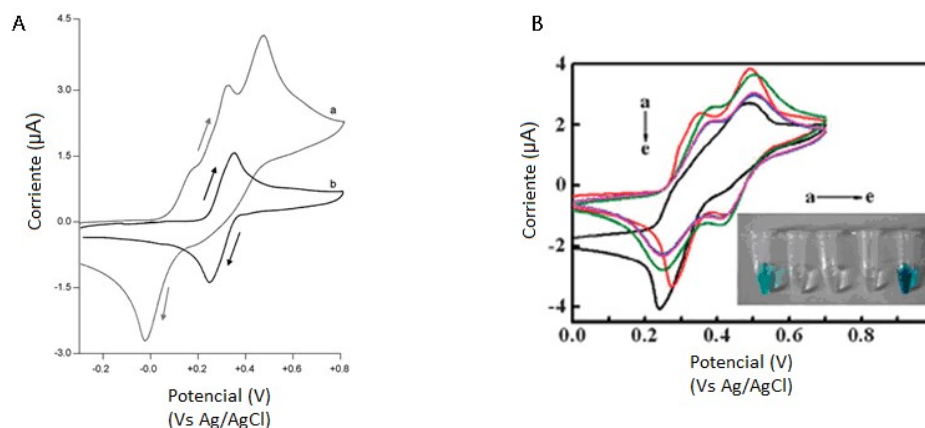


Figura 1.22: **A)** señal por V.C. de TMB luego de la reacción de peroxidación. **a)** en medio levemente ácido **b)** luego de acidificar el medio. Figura inspirada en la reportada por Crew *et al.* 2007⁹¹ **B)** señal por V.C. de TMB para diferentes etapas del armado del biosensor **a)** Capa de biorreconocimiento del biosensor con agregado de analito (activación de la DNAzima inmovilizada) **b)** electrodo de oro desnudo **c)** y **d)** construcción del biosensor en ausencia de analito (sin activación de la DNAzima peroxidasa) **e)** DNAzima en solución (inserto: imagen que muestra la coloración que adquirió la mezcla de reacción en cada etapa). Figura inspirada en la reportada por Chen *et al.* 2011⁹².

Los ejemplos anteriores muestran que no hay un método unificado para realizar la medición electroquímica de TMB oxidado, en algunos casos se optó por realizar la determinación luego del agregado de ácido, en medio fuertemente ácido, y en otros se midió directamente la mezcla de reacción en medio levemente ácido. La elección de la técnica empleada para la etapa de detección del biosensor tampoco está unificada, lo cual se ve reflejado en numerosas publicaciones. A continuación, se discuten cuatro ejemplos (**figura 1.23**), todos tienen en común que son biosensores cuya capa de biorreconocimiento en presencia de analito da lugar a la activación de la DNAzima peroxidasa obteniéndose TMB oxidado como producto. Para los trabajos que reportaron relación señal vs concentración de analito se determinó que la misma resultó logarítmica.

Yuan *et al.* 2020 diseñaron un genosensor para la detección de *Cronobacter sakazakii*. La técnica de detección fue cronoamperometría (C.A.), **figura 1.23 (A)**, y se llevó a cabo luego de detener la reacción en medio fuertemente

ácido⁹³. Chen *et al.* 2020 diseñaron un genosensor para la detección de microARN asociado al cáncer de páncreas. La detección se realizó también en medio levemente ácido por voltametría de onda cuadrada (V.O.C.)⁹⁴, **figura 1.23 (B)**. La señal presentó dos picos muy juntos y poco definidos, para llevar a cabo la cuantificación del analito se determinó la variación de corriente del pico a 0,26 V. Shi *et al.* 2015 desarrollaron un genosensor para detectar un segmento del ADN del virus de la hepatitis B. La detección se llevó a cabo en medio levemente ácido por voltametría de pulso diferencial (V.P.D), **figura 1.23 (C)**⁸⁸. Yu *et al.* 2015 desarrollaron un genosensor para la detección de ADN del virus de influenza aviar A (H7N9). La detección también se llevó a cabo en medio levemente ácido por V.P.D, **figura 1.23 (D)**⁸⁴. En ambos casos se observó un solo pico bien definido. Al aumentar la concentración de analito se observó el corrimiento del pico hacia menores potenciales.

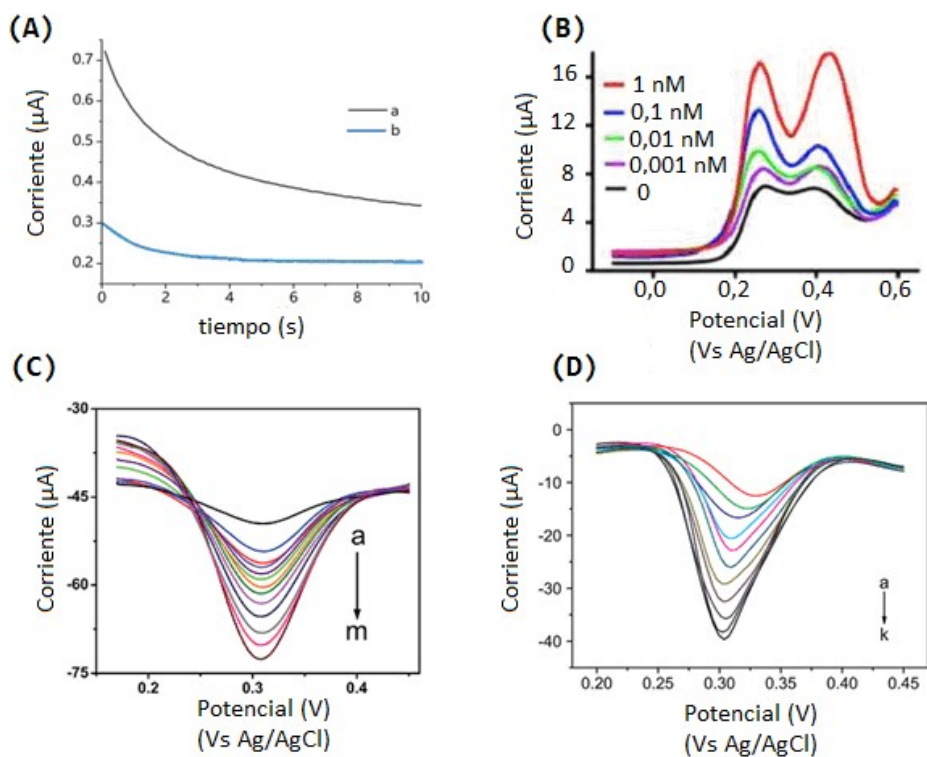


Figura 1.23: Medición de TMB oxidado por reacción catalizada por DNAzima peroxidasa **(A)** señales por C.A. medio fuertemente ácido en presencia (**curva a**) y en ausencia (**curva b**) de analito⁹³. **(B)** Señales por V.O.C. en medio levemente ácido para diferentes concentraciones de analito 0,001 nM a 1 nM y en ausencia del mismo⁹⁴. **(C)** Señales por D.P.V. en medio levemente ácido para diferentes concentraciones crecientes de analito entre 5 pM (**curva b**) a 500 nM (**curva m**) y en ausencia del mismo (**curva a**)⁸⁸. **(D)** Señales por D.P.V.

en medio levemente ácido para diferentes concentraciones crecientes de analito entre 10 fM (**curva b**) a 5 nM (**curva k**) y en ausencia del mismo (**curva a**)⁸⁴.

Este análisis bibliográfico fue la base de la elección de la técnica de medición electroquímica que se discute posteriormente, en el **Capítulo 3**.

1.6 Estudio de la secuencia *PW17* para su aplicación en genosensores

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo central investigar el uso de la DNAzima peroxidasa *PW17* como generadora de señal en construcciones aplicables a genosensores. Se analizaron el funcionamiento de la DNAzima peroxidasa como elemento transductor y la detección de la señal por métodos óptico y electroquímico. Como fase de transducción se diseñó un sistema sonda que adquiere estructura horquilla en ausencia de secuencia analito y que es capaz de activar la función DNAzima en presencia del mismo.

El funcionamiento de este sistema es dependiente de la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa y son muchas las variables que pueden afectarla tanto al momento de formación de las estructuras secundarias como a la reacción de peroxidación en sí. Para facilitar el estudio del sistema se realizó un análisis progresivo de su funcionamiento, desde las condiciones de reacción para la catálisis en solución, pasando por la inmovilización de la secuencia *PW17* y hasta el funcionamiento del sistema de biorreconocimiento inmovilizado.

Cada parte del análisis se desarrolló en un capítulo de forma de facilitar el relato.

En el **Capítulo 3** se desarrolló el estudio de las condiciones de reacción de la DNAzima libre en solución. Se estudiaron puntualmente las condiciones necesarias para la generación y detección de la señal. Si bien se han publicado condiciones de reacción para la catálisis por DNAzima peroxidasa, son muchas las variables a tener en cuenta y que es necesario poner a punto para cada sistema en particular⁸⁰. Se analizaron diferentes variables para la reacción, tales como composición del medio y concentración de las sustancias involucradas en la reacción de peroxidación, en particular los sustratos, y se pusieron a punto las metodologías de medición. Se analizó la detección colorimétrica y la electroquímica y sus rangos de aplicación. Ambas metodologías son ampliamente utilizadas en biosensores por ser el

instrumental requerido robusto, fácil de usar y económico. Además, estas técnicas permiten miniaturizar el sistema de detección y posibilita la conexión a instrumental portátil para determinaciones *in situ*⁸⁶. La detección colorimétrica resulta particularmente atractiva porque permite observar cambios a ojo desnudo pudiendo obtener de forma fácil y rápida información cualitativa del sistema que es de gran utilidad en la etapa de análisis y desarrollo.

La incorporación del sistema de biorreconocimiento a un dispositivo tiene que garantizar su actividad catalítica y la accesibilidad del analito al sitio de unión. Es por eso que el proceso de inmovilización toma gran relevancia en el desarrollo de un biosensor. En este sentido, luego del estudio en solución, se comprobó el funcionamiento de la DNAzima como generadora de señal tras ser inmovilizada, es decir en fase heterogénea. En el **Capítulo 4** se estudiaron estrategias de inmovilización de la secuencia *PW17* y su funcionamiento en estas condiciones. Se utilizó la secuencia con dos modificaciones diferentes en el extremo 5', biotina y disulfuro, con el fin de comparar dos estrategias de inmovilización: la interacción estreptavidina-biotina sobre partículas magnéticas y el enlace covalente tiol-oro sobre láminas del metal¹⁶. Una vez comprobado el funcionamiento de la DNAzima inmovilizada se ajustaron las condiciones de reacción para mejorar la generación de señal.

La última etapa de este trabajo consistió en estudiar y optimizar el armado y funcionamiento de una capa de biorreconocimiento capaz de activar la función DNAzima peroxidasa, en presencia de analito, aplicable a genosensores. Se empleó una secuencia que adquiere estructura horquilla en ausencia de analito y que es capaz de adquirir funcionalidad DNAzima peroxidasa en presencia del mismo⁸⁸.

En el **Capítulo 5** se desarrolló el estudio del funcionamiento de la capa de biorreconocimiento en sí. Para tener un mayor control de las variables en una primera etapa se estudió el comportamiento de la capa de biorreconocimiento en solución en presencia y ausencia de secuencia analito. En una segunda etapa se estudió la interacción sonda- analito en fase heterogénea.

1.7 Bibliografía

1. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Analytical Letters* vol. 34 635–659 at <https://doi.org/10.1081/AL-100103209> (2001).
2. Clark, L. C. J. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **2**, 41–48 (1956).
3. Clark, L. C., Wolf, R., Granger, D. & Taylor, Z. Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol* **3**, 189–193 (1953).
4. Severinghaus, J. W. & Astrup, P. B. *Historical Review HISTORY OF BLOOD GAS ANALYSIS. IV. LELAND CLARK'S OXYGEN ELECTRODE.*
5. Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. & Estrela, P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem.* **60**, 1–8 (2016).
6. Kozitsina, A. N. *et al.* Sensors based on bio and biomimetic receptors in medical diagnostic, environment, and food analysis. *Biosensors* vol. 8 at <https://doi.org/10.3390/bios8020035> (2018).
7. Newman, J. D. & Setford, S. J. Enzymatic Biosensors. *Mol. Biotechnol.* **32**, 249–268 (2006).
8. Dzyadevych, S. V. *et al.* Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *ITBM-RBM* **29**, 171–180 (2008).
9. Borisov, S. M. & Wolfbeis, O. S. Optical biosensors. *Chemical Reviews* vol. 108 423–461 at <https://doi.org/10.1021/cr068105t> (2008).
10. Pingarrón, J. M., Yáñez-Sedeño, P. & González-Cortés, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochim. Acta* **53**, 5848–5866 (2008).
11. Alberts, B., Johnson, A. & Lewis, J. *Biología molecular de la célula. Ediciones Omega* (2008).
12. Prodromidis, M. I. & Karayannis, M. I. Enzyme Based Amperometric Biosensors for Food Analysis. *Electroanalysis* **14**, 241–261 (2002).
13. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* **355**, 850–852 (1992).
14. Teles, F. R. R. & Fonseca, L. P. Trends in DNA biosensors. *Talanta* vol. 77 606–623 at <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.024> (2008).
15. Harris, L. J., Larson, S. B., Hasel, K. W. & Mc Pherson, A. Refined Structure of an Intact IgG2a Monoclonal Antibody. *Biochemistry* **36**, 1581–1597 (1997).
16. Rashida, J. I. A. & Yusof, N. A. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. *Sens. Bio-Sensing Res.* **16**, 19–33 (2017).
17. Franek, M. & Hruska, K. Antibody based methods for environmental and food analysis: A review. *Veterinarni Medicina* vol. 50 1–10 at <https://doi.org/10.17221/5591-VETMED> (2005).
18. Malhotra, B. D. & Chaubey, A. Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sensors Actuators, B Chem.* **91**, 117–127 (2003).
19. Zhaozhao, S. *et al.* Gold nanorods–based multicolor immunosensor for visual detection of enterovirus 71 infection. *Microchim. Acta* **187**, (2020).
20. Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
21. Carr, O. *et al.* Genosensor made with a self-assembled monolayer matrix to detect MGMT gene methylation in head and neck cancer cell lines. *Talanta* **210**, (2020).
22. Famulok, M. Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 324–329 (1999).
23. Ying, Y. L., Wang, H. Y., Sutherland, T. C. & Long, Y. T. Monitoring of an ATP-binding aptamer and its conformational changes using an α -hemolysin nanopore. *Small* **7**, 87–94 (2011).
24. Huizenga, D. E. & Szostak, J. W. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry* **34**, 656–665 (1995).
25. Huo, Y. *et al.* A sensitive aptasensor for colorimetric detection of adenosine triphosphate based on the protective effect of ATP-aptamer complexes on unmodified gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **78**, 315–320 (2016).
26. Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X. & Li, J. Molecular imprinting: Perspectives and applications. *Chemical Society Reviews* vol. 45 2137–2211 at <https://doi.org/10.1039/c6cs00061d> (2016).

27. Kumar, R. *et al.* Revisiting Fluorescent Calixarenes: From Molecular Sensors to Smart Materials. *Chemical Reviews* vol. 119 9657–9721 at <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00605> (2019).
28. Maduraiveeran, G., Sasidharan, M. & Ganesan, V. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics* vol. 103 113–129 at <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.031> (2018).
29. Bigdeli, A. *et al.* Nanoparticle-based optical sensor arrays. *Nanoscale* vol. 9 16546–16563 at <https://doi.org/10.1039/c7nr03311g> (2017).
30. Marx, Í. M. G. *et al.* Assessment of Table Olives' Organoleptic Defect Intensities Based on the Potentiometric Fingerprint Recorded by an Electronic Tongue. *Food Bioprocess Technol.* **10**, 1310–1323 (2017).
31. Hong, K. Y., de Albuquerque, C. D. L., Poppi, R. J. & Brolo, A. G. Determination of aqueous antibiotic solutions using SERS nanogratings. *Anal. Chim. Acta* **982**, 148–155 (2017).
32. Bidwell, D. E. *et al.* The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *BULL. WORLD Heal. ORGAN.* **54**, 129–139 (1976).
33. Sakamoto, S. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines* vol. 72 32–42 at <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z> (2018).
34. Crowther, J. R. Stages in ELISA. in *Methods in Molecular Biology, The ELISA Guidebook* 43–78 (2009). doi:10.1007/978-1-60327-254-4_3.
35. Feng, C. & Zhu, X. Signal amplification. in *Nano-inspired Biosensors for Protein Assay with Clinical Applications* 287–312 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-815053-5.00012-X.
36. Skládal, P. Piezoelectric biosensors. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* vol. 79 127–133 at <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.009> (2016).
37. Durmuş, N. G. *et al.* Acoustic-Based Biosensors. in *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics* 1–15 (Springer US, 2014). doi:10.1007/978-3-642-27758-0_10-2.
38. Martinkova, P., Kostelnik, A., Valek, T. & Pohanka, M. Main streams in the construction of biosensors and their applications. *International Journal of Electrochemical Science* vol. 12 7386–7403 at <https://doi.org/10.20964/2017.08.02> (2017).
39. Yang, M., McGovern, M. E. & Thompson, M. Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry. *Anal. Chim. Acta* **346**, 259–275 (1997).
40. Das, A. P., Kumar, P. S. & Swain, S. Recent advances in biosensor based endotoxin detection. *Biosensors and Bioelectronics* vol. 51 62–75 at <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.07.020> (2014).
41. Abdul Rasheed, P. & Sandhyarani, N. Quartz crystal microbalance genosensor for sequence specific detection of attomolar DNA targets. *Anal. Chim. Acta* **905**, 134–139 (2016).
42. Ronkainen, N. J., Halsall, H. B. & Heineman, W. R. Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1747–1763 (2010).
43. Mahbubur Rahman, M., Li, X. B., Lopa, N. S., Ahn, S. J. & Lee, J. J. Electrochemical DNA hybridization sensors based on conducting polymers. *Sensors (Switzerland)* vol. 15 3801–3829 at <https://doi.org/10.3390/s150203801> (2015).
44. Dzyadevych, S. & Jaffrezic-Renault, N. Conductometric biosensors. in *Biological Identification: DNA Amplification and Sequencing, Optical Sensing, Lab-On-Chip and Portable Systems* 153–193 (Elsevier Ltd, 2014). doi:10.1533/9780857099167.2.153.
45. Dornelles Mello, L. & Tatsuo Kubota, L. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries.* www.elsevier.com/locate/foodchem.
46. Bonanni, A. & Del Valle, M. Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors: A review. *Analytica Chimica Acta* vol. 678 7–17 at <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.022> (2010).
47. Pavlov, V. *et al.* Amplified Chemiluminescence Surface Detection of DNA and Telomerase Activity Using Catalytic Nucleic Acid Labels. *Anal. Chem.* **76**, 2152–2156 (2004).
48. Xu, H., Wu, Q. & Shen, H. A DNAzyme sensor based on target-catalyzed hairpin assembly for enzyme-free and non-label single nucleotide polymorphism genotyping. *Talanta* **167**, 630–637 (2017).

49. Passaro, V. M. N., Dell'olio, F., Casamassima, B. & De Leonardis, F. Guided-Wave Optical Biosensors. *Sensors* **7**, 508–536 (2007).
50. Luo, Y. *et al.* Label-Free, Visual Detection of Small Molecules Using Highly Target-Responsive Multimodule Split Aptamer Constructs. *Anal. Chem.* **91**, 7199–7207 (2019).
51. Pividori, M. I., Merkoçi, A. & Alegret, S. *Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods.* *Biosensors & Bioelectronics* vol. 15 www.elsevier.com/locate/bios (2000).
52. Millan, K. M. & Mikkelsen, S. R. *Sequence-Selective Biosensor for DNA Based on Hybridization Indicators* 2317 *Electroactive. R o c. Natl. Acad. Sci. U.S.A* vol. 65 (1993).
53. Beaucage, S. L. & Caruthers, M. H. DEOXYNUCLEOSIDE PHOSPHORAMIDITES-A NEW CLASS OF KEY INTERMEDIATES FOR DEOXPOLYNUCLEOTIDE SYNTHESIS. *Tetrahedron Letters* vol. 22 (1981).
54. Wilk, A., Grajkowski, A., Phillips, L. R. & Beaucage, S. L. Deoxyribonucleoside cyclic N-acylphosphoramidites as a new class of monomers for the stereocontrolled synthesis of oligothymidyl- and oligodeoxycytidyl- phosphorothioates. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2149–2156 (2000).
55. Ponce, M. B. Aptámeros para la detección de moléculas orgánicas pequeñas. (2015).
56. Bi, S., Yue, S. & Zhang, S. Hybridization chain reaction: A versatile molecular tool for biosensing, bioimaging, and biomedicine. *Chemical Society Reviews* vol. 46 4281–4298 at <https://doi.org/10.1039/c7cs00055c> (2017).
57. Chen, H. *et al.* A review on electronic bio-sensing approaches based on non-antibody recognition elements. *Analyst* **141**, 2335–2346 (2016).
58. Teller, C., Shimron, S. & Willner, I. Aptamer-DNAzyme hairpins for amplified biosensing. *Anal. Chem.* **81**, 9114–9119 (2009).
59. Zhang, D. W. *et al.* Novel homogeneous label-free electrochemical aptasensor based on functional DNA hairpin for target detection. *Anal. Chem.* **85**, 9378–9382 (2013).
60. Paniel, N., Baudart, J., Hayat, A. & Barthelmebs, L. Aptasensor and genosensor methods for detection of microbes in real world samples. *Methods* vol. 64 229–240 at <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.001> (2013).
61. Liu, J., Cao, Z. & Lu, Y. Functional nucleic acid sensors. *Chem. Rev.* **109**, 1948–1998 (2009).
62. Mobed, A. *et al.* Bioassays: The best alternative for conventional methods in detection of Legionella pneumophila. *International Journal of Biological Macromolecules* vol. 121 1295–1307 at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.074> (2019).
63. Cho, E. J., Lee, J. W. & Ellington, A. D. Applications of aptamers as sensors. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2**, 241–264 (2009).
64. Conrad, R., Keranen, L. M., Ellington, A. D. & Newton, A. C. Isozyme-specific inhibition of protein kinase C by RNA aptamers. *J. Biol. Chem.* **269**, 32051–32064 (1994).
65. MINCYT. Los test de diagnóstico rápido NEOKIT-COVID-19 y ELA- CHEMSTRIP empezaron a distribuirse en los hospitales públicos. <https://www.conicet.gov.ar/los-test-de-diagnostico-rapido-neokit-covid-19-y-ela-chemstrip-empezaron-a-distribuirse-en-los-hospitales-publicos/> (2020).
66. Notomi, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* vol. 28 (2000).
67. CONICET, Fundación Instituto Leloir, Laboratorio Lemos.
68. CINDEFI, UNLP, CONICET y Bamboo Biotech SAS y Farmacoop Ltda.
69. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Nación, Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein, CONICET, Laboratorio Pablo Cassará, Y-TEC.
70. Universidad Nacional de San Martín (UNSAM), Universidad de Quilmes (UNQ), CHEMTEST, Fundación Argentina de Nanotecnología (FAN) del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación dentro del Campus de la UNSAM; y Productos Bio-Lógicos (PB-L), una empresa d.
71. Dunford, H. B. & Stillman, J. S. ON THE FUNCTION AND MECHANISM OF ACTION OF PEROXIDASES. *Coordination Chemistry Reviews* vol. 19 (1976).
72. Nakane, P. K. & Kawaoi, A. Peroxidase labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 1084–1091 (1974).
73. Peng, H. *et al.* DNAzyme-Mediated Assays for Amplified Detection of Nucleic Acids and Proteins. *Anal. Chem.* **90**, 190–207 (2018).
74. Kosman, J. & Juskowiak, B. Peroxidase-mimicking DNAzymes for biosensing applications: A review. *Anal. Chim. Acta* **707**, 7–17 (2011).

75. Travascio, P., Li, Y. & Sen, D. DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin complex. *Chem. Biol.* **5**, 505–517 (1998).
76. Jones, P., Mantle, D., Davies, D. M. & Kelly, H. C. *Hydroperoxidase Activities of Ferrihemes: Heme Analogues of Peroxidase Enzyme Intermediates?*
77. Gesteland, R. F., Cech, T. & Atkins, J. F. (John F. *The RNA world: the nature of modern RNA suggests a prebiotic RNA*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999).
78. Li, Y. & Sen, D. *Toward an Efficient DNAzyme* †. (1997).
79. Li, Y., Geyer, C. R. & Sen, D. Recognition of Anionic Porphyrins by DNA Aptamers †. **2960**, 6911–6922 (1996).
80. LIU, Z. L., TAO, C. A. & WANG, J. F. Progress on Applications of G-quadruplex in Biochemical Analysis. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* vol. 48 153–163 at [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(19\)61212-0](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(19)61212-0) (2020).
81. Tao, L., Shaojun, D. & Erkang, W. G-Quadruplex aptamers with peroxidase-like DNAzyme functions: Which the best and how does it work? *Chem. - An Asian J.* **4**, 918–922 (2009).
82. Zhang, Y., Li, B. & Jin, Y. Label-free fluorescent detection of thrombin using G-quadruplex-based DNAzyme as sensing platform. *Analyst* **136**, 3268–3273 (2011).
83. Pelossof, G., Tel-Vered, R., Elbaz, J. & Willner, I. Amplified biosensing using the horseradish peroxidase-mimicking DNAzyme as an electrocatalyst. *Anal. Chem.* **82**, 4396–4402 (2010).
84. Yu, Y. *et al.* Ultrasensitive electrochemical detection of avian influenza A (H7N9) virus DNA based on isothermal exponential amplification coupled with hybridization chain reaction of DNAzyme nanowires. *Biosens. Bioelectron.* **64**, 566–571 (2015).
85. Du, Y. *et al.* G-Quadruplex-based DNAzyme for colorimetric detection of cocaine: Using magnetic nanoparticles as the separation and amplification element. *Analyst* **136**, 493–497 (2011).
86. Taleat, Z., Khoshroo, A. & Mazloum-Ardakani, M. Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013). *Microchim. Acta* **181**, 865–891 (2014).
87. Lu, Y. & Liu, J. Functional DNA nanotechnology: emerging applications of DNAzymes and aptamers. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 17 580–588 at <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.10.004> (2006).
88. Shi, L. *et al.* A label-free hemin/G-quadruplex DNAzyme biosensor developed on electrochemically modified electrodes for detection of a HBV DNA segment. *RSC Adv.* **5**, 11541–11548 (2015).
89. Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N. & Kanda, H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology* vol. 53 at <https://doi.org/10.1007/s12275-015-4656-9> (2015).
90. Rackus, D. G., Shamsi, M. H. & Wheeler, A. R. Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 5320–5340 (2015).
91. Crew, A., Alford, C., Cowell, D. C. C. & Hart, J. P. Development of a novel electrochemical immuno-assay using a screen printed electrode for the determination of secretory immunoglobulin A in human sweat. *Electrochim. Acta* **52**, 5232–5237 (2007).
92. Chen, J. *et al.* ChemComm An ultrasensitive electrochemical biosensor for detection of DNA species related to oral cancer based on nuclease-assisted target recycling and amplification of DNAzyme w. 8004–8006 (2011) doi:10.1039/c1cc11929j.
93. Yuan, Y. *et al.* A signal cascade amplification strategy based on RT-PCR triggering of a G-quadruplex DNAzyme for a novel electrochemical detection of viable: *Cronobacter sakazakii*. *Analyst* **145**, 4477–4483 (2020).
94. Chen, Ss. C., Chen, K. T. & Jou, A. F. J. Polydopamine-gold composite-based electrochemical biosensor using dual-amplification strategy for detecting pancreatic cancer-associated microRNA. *Biosens. Bioelectron.* **173**, 112815 (2021).

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1 Introducción

Este capítulo se organizó en tres secciones. En la primera se listan los reactivos, se describe la composición química de las secuencias oligonucleotídicas, los materiales, consumibles y el instrumental utilizados durante todo el desarrollo del trabajo experimental. En la segunda se describen detalladamente las condiciones experimentales en las que fueron llevados a cabo los diferentes ensayos y mediciones. En la última se discuten los conceptos teóricos básicos de las metodologías y técnicas instrumentales aplicadas.

2.2 Reactivos, materiales e instrumental utilizados para el desarrollo experimental

2.2.1 Reactivos

- ABTS (Sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) 98%, Sigma-Aldrich)
- Ácido cítrico (p.a. 99%, Merck)
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA 98,0%, Sigma-Aldrich)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4 95-97% p.a., Merck)
- Agua ultra pura (18,2 M Ω .cm, equipo Millipore Simplicity)
- Citrato de sodio dihidrato (trisodio 2-hidroxipropano-1,2,3-tricarboxilato dihidratado p.a., Riedel de Haën)
- Cloruro de magnesio hexahidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a., Merck)
- Cloruro de potasio (KCl p.a., Merck)
- Cloruro de sodio (NaCl p.a., Sigma-Aldrich)
- Dimetilsulfóxido (DMSO, p.a., Aberkon Química)
- Ferrocenometanol (Hidroximetil ferroceno 97%, Aldrich)
- Fosfato diácido de sodio (NaH_2PO_4 p.a., Merck)
- Fosfato monoácido de sodio (Na_2HPO_4 p.a., Merck)
- Hemina (97,0%, Aldrich)

- Hepes (Ácido 4-(2-Hidroxetil) piperazina-1-etansulfónico 99,5%, Sigma)
- Hidróxido de amonio (solución de amoníaco, 25% p.a., Merck)
- 6-Mercapto-1-hexanol (MCH, 97%, Sigma-Aldrich)
- Nitrato de sodio (NaNO_3 , 99,0%, Sigma-Aldrich)
- Peróxido de hidrógeno 10 volúmenes (H_2O_2 10 V, Dampharma, medicinal)
- Peróxido de hidrógeno 30% (H_2O_2 , 30% p.a., Anedra)
- 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB, 99%, Aldrich)
- Tris (hidroximetil) aminometano clorhidrato (TRIS, 99,0% grado reactivo, Sigma)
- Tris (2-carboxietil) fosfina clorhidrato (TCEP, Sigma-Aldrich)
- Tritón X-100 (4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol grado laboratorio, Sigma)

2.2.2 Secuencias oligonucleotídicas

Las secuencias fueron sintetizadas a pedido, purificadas por cromatografía líquida (HPLC) y liofilizadas. Una vez en el laboratorio se prepararon soluciones de concentración entre 200 y 600 μM , (ver **sección 2.3.1**) en agua ultra pura y se almacenaron a -20°C . En la **tabla 2.1** se especifican las secuencias utilizadas.

Denominación secuencia	Modificación en 5'	Secuencia 5' - 3'	Proveedor
“Dz” (PW17) ¹	—	GGG TAG GGC GGG TTG GG 17 bases	IDT, EE.UU
“T-Dz”	HO-(CH ₂) ₆ -S-S-(CH ₂) ₆ - Tiol C6 S-S	TTG GGT AGG GCG GGT TGG G 19 bases	Sigma, Alemania
“B-Dz”	C ₅ H ₅ O(NH) ₂ S(CH ₂) ₄ CONH(CH ₂) ₆ Biotina	TTG GGT AGG GCG GGT TGG G 19 bases	Ruralex, Argentina

“sonda”	$C_5H_5O(NH)_2S(CH_2)_4$ $CONH(CH_2)_6$ Biotina	<u>CCG CCC TAT AGT TGC GGC</u> <u>TGC GGA TAT GGT AGT TGC</u> <u>GGT TTT GGG TAG GGC GGG</u> <u>TTG GG^a</u> 59 bases	Ruralex, Argentina
“analito”	—	CCG CAA CTA CCA TAT CCG CAG CCG CAA CTA 30 bases	Ruralex, Argentina

^a Subrayado: segmentos autocomplementarios. Negrita: secuencia *PW17*.

Tabla 2.1: Secuencias oligonucleotídicas utilizadas.

2.2.3 Materiales utilizados en el desarrollo del trabajo experimental

Electrodos serigrafiados: Electrodos impresos por la técnica *screen printed* (figura 2.1)².

Electrodos serigrafiados de área 1 mm² (ES1): electrodo de trabajo tinta de grafito, 1 mm². Electrodo auxiliar tinta de grafito, electrodo de pseudoreferencia tinta de plata.

- Electrodos serigrafiados de área 7 mm² (ES7): electrodo de trabajo tinta de grafito, 7 mm². Electrodo auxiliar tinta de grafito, electrodo de pseudoreferencia mezcla de tintas de plata y grafito y cloruro de plata (Ag/AgCl/C).

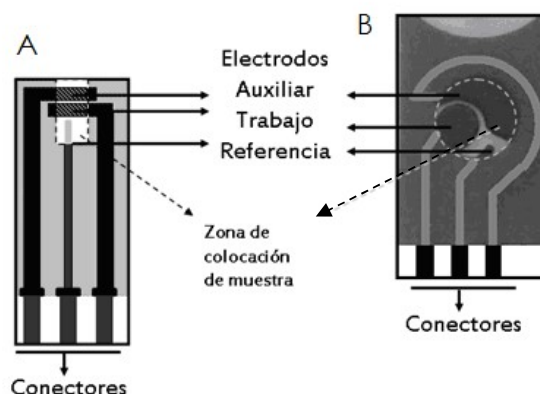
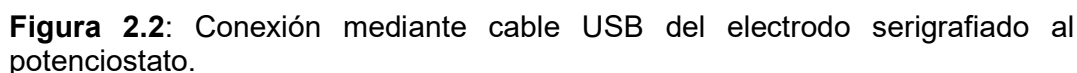


Figura 2.1: Electrodos serigrafiados (A) ES1 y (B) ES7. Se indica la posición de los electrodos de trabajo, referencia y auxiliar y la zona donde se coloca la alícuota de muestra.

En la **figura 2.2** se muestra la conexión entre los electrodos y el potencióstato por medio de un cable con conector USB. El electrodo es introducido en el



- **Partículas P:** “*Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles*”, Promega. Ref Z5481. Consisten en un núcleo paramagnético cubierto con estreptavidina. La suspensión contiene 1 mg de partículas cada 1 mL. La capacidad de unión a oligonucleótidos es de aproximadamente de 1 nmol por miligramo de partículas³.
- **Partículas I:** “*Dynabeads M-280 streptavidin*”, Invitrogen. Ref: 11206D. Consisten en gránulos uniformes y superparamagnéticos rodeados por una monocapa de estreptavidina unida covalentemente a la superficie, bloqueada mediante albúmina de suero bovino (BSA). La suspensión contiene 10 mg de partículas cada 1 mL. Tienen una capacidad de unión a oligonucleótidos de aproximadamente de 0,2 nmol por miligramo de partículas⁴.

Oro policristalino: Láminas de oro de alta pureza (99,99%) de aproximadamente 20 mm de largo y 7 mm de ancho, en las que se realizó una cavidad que permite contener 25 μ L de solución. En la **figura 2.3** se muestra una imagen de las láminas conteniendo la mezcla de reacción.

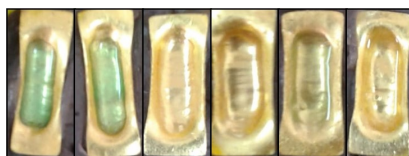


Figura 2.3: Imagen de las láminas de oro policristalino con cavidad que permite contener 25 μ L de solución “mezcla de reacción”.

Alúmina, Metrohm partículas de 0,3 μ m de diámetro para pulir las superficies de oro.

Tubos cónicos, Extragene con tapa para PCR de 200 y 500 μ L.

Tubos cónicos, Molecular BioProducts y Thermo Scientific con tapa para microcentrífuga de 1,5 y 2 mL.

Cubetas plásticas, Brand 1,5 mL de 1 cm de camino óptico.

2.2.4 Instrumental

Agitador vortex, VI-2. CK-Tech. Velocidad máxima 2800 rpm, con dos cabezales intercambiables para un tubo o para diez tubos.

Espectrofotómetro UV-visible, NanoDrop One. Thermo Scientific. Diseñado para análisis de micro-volúmenes de ácidos nucleicos. Puede ser utilizado como espectrofotómetro tradicional en el rango 190 - 850 nm. Permite el ajuste automático del camino óptico y la corrección de la línea de base de punto único. No requiere cubeta, la medición se realiza directamente sobre alícuotas de 2 a 5 μ L. Emplea el *Software* NanoDrop One v1.4.2.

Espectrofotómetro UV-visible, Lambda 25. Perkin-Elmer. Rango de trabajo 190 - 1100 nm. Doble haz.

pH-metro, 827 pH lab, Metrohm.

Pipetas automáticas de volumen variable, Eppendorf. (0,1 – 2,5) μL ; (0,5 – 10) μL ; (10 – 100) μL ; (20 – 200) μL ; (100 – 1000) μL ; (1 – 10) mL.

Potenciostato, PGSTAT204. Autolab. Permite la implementación de técnicas electroquímicas estándar como voltametrías cíclica (C.V.), de onda cuadrada (V.O.C.), de pulso diferencial (V.P.D.) y cronoamperometría (C.A.). Procesamiento de datos *software* Nova 1.10.

Termociclador, Mastercycler personal 5332. Eppendorf.

2.3 Detalle experimental de los ensayos realizados

2.3.1 Soluciones preparadas

Se detallan la composición y concentración de cada una de las soluciones preparadas, así como también la forma en que fueron conservadas.

Oligonucleótidos: a partir de los sólidos liofilizados se prepararon soluciones acuosas de concentraciones entre 200 μM y 600 μM . Se almacenaron a -20°C . Antes de realizar cada ensayo se preparó la dilución adecuada. Para asegurar la eliminación de estructuras secundarias, se calentó a 90°C por 10 minutos y se enfrió a razón de 1°C por minuto hasta 20°C controlando la temperatura en termociclador.

Hemina: solución 0,1 mM en DMSO. Las soluciones se almacenaron a -20°C por una semana como máximo.

TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina): solución 40 mM en DMSO. Se almacenó a 4°C .

Solución reguladora Hepes, Tritón, KCl (*Buffer H*): hepes-NH₄OH 50 mM a pH: 8, tritón X-100 0,05%, KCl 60 mM, DMSO 1%. Se almacenó a 4°C⁵.

Solución reguladora citrato-fosfato (*Buffer C*): citrato de sodio 0,1 M, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 0,2 M pH: 4,4 y KCl 20 mM. Se almacenó a 4°C⁵.

ABTS (Sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)): solución 50 mM en solución *buffer* Tris-HCl. Se almacenó a 4°C.

***Buffer* Tris-HCl:** tris-HCl 25 mM pH: 7,5, KCl 20 mM, NaCl 200 mM, tritón X-100 0,05%. Se almacenó a 4°C⁶.

Cloruro de magnesio (MgCl₂): solución de MgCl₂ 1,5 M en agua. Se almacenó a 4°C.

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂): solución comercial (uso medicinal) de 10 volúmenes (0,88 M). Se almacenó a 4°C.

Ácido sulfúrico (H₂SO₄): solución 1 M en agua. Se almacenó a temperatura ambiente.

TCEP (Tris (2-carboxietil) fosfina clorhidrato): solución 1,5 mM en agua. Se almacenó a -20°C⁷.

MCH (6-Mercapto-1hexanol): solución 100 µM en agua. Se almacenó a -20°C.

Ferrocenometanol (FcMeOH): solución 0,5 mM en hepes-NaNO₃ 50 mM. Se almacenó a 4°C.

2.3.2 Detalle experimental de los ensayos realizados

Durante el trabajo de tesis se estudió la reacción de peroxidación catalizada por DNAzima con el objetivo de incorporarla en una capa de biorreconocimiento aplicable a genosensores. En una primera etapa se

optimizaron las condiciones de reacción de peroxidación catalizada por la DNAzima en solución, se probaron dos sustratos ABTS y TMB. Luego se estudiaron las condiciones de reacción de la DNAzima inmovilizada tanto sobre partículas magnéticas como sobre soportes de oro. Por último, se diseñó una secuencia sonda con el objetivo de que en presencia de una secuencia analito se active la funcionalidad DNAzima peroxidasa generando señal, se estudió su funcionamiento en solución e inmovilizada. A continuación, se detallan los protocolos empleados para cada uno de los ensayos que se describen en los siguientes capítulos.

Protocolos:

Nota: la concentración de oligonucleótido utilizada en cada ensayo se especifica en la discusión de los resultados (**capítulos 3, 4 y 5**). En todos los casos las concentraciones molares de oligonucleótido y hemina se mantuvieron en proporción 1:1.

Reacción catalizada por DNAzima en solución (Capítulo 3)

Sustrato ABTS

Las mezclas de reacción para todos los ensayos, se prepararon conteniendo 1 μM **Dz** y 1 μM hemina en 100 μL finales con Buffer Tris-HCl. Se dejó reaccionar por 20 minutos para permitir la formación de la estructura cuartetos de G. Luego se agregó una mezcla de 440 μL de Tris-HCl, 60 μL ABTS 50 mM y 2,3 μL H_2O_2 0,88 M. Se dejó reaccionar 10 minutos. Se separaron dos alícuotas, sobre una se midió el espectro de absorción entre 290 nm y 800 nm y sobre la otra la intensidad de corriente en función del potencial por voltametría cíclica entre 0,65 V y 0,1 V a 100 mV/s.

Control de reactivos: Se procedió de la misma manera, pero sin agregado de hemina ni **Dz**. A 540 μL de Buffer Tris-HCl se agregó una mezcla de 60 μL ABTS 50 mM y 2,3 μL H_2O_2 0,88 M.

Control de hemina: Se procedió de la misma manera, pero sin agregado de **Dz**. A 540 μL de Buffer Tris-HCl se agregó hemina y una mezcla de 60 μL ABTS 50 mM y 2,3 μL H_2O_2 0,88 M.

Sustrato TMB

Se mezcló **Dz** y hemina en proporción 1:1 y se llevó a volumen final de 10 μL en Buffer H. Se dejó reaccionar por 20 minutos para permitir la formación de la estructura cuartetos de G. Luego de ese tiempo se agregaron 40 μL de Buffer C, 0,25 μL de TMB 40 mM y 0,25 μL H_2O_2 0,88 M. El tiempo de reacción de peroxidación (t_{RX}) varió según el ensayo. Luego se cuantificó el producto de reacción por espectrofotometría y/o voltametría de onda cuadrada (V.O.C.) según el ensayo.

Espectrofotometría: en algunos ensayos se cuantificó directamente el producto de reacción (TMB^+ , azul) midiendo absorbancia a 370 nm y en otros se agregó 10 μL de H_2SO_4 1 M para detener la reacción (al disminuir el pH se inhibe la catálisis por parte de DNAzima deteniéndose la reacción)⁸ y se cuantificó el producto de reacción (TMB_{ox} , amarillo) midiendo absorbancia a 450 nm.

V.O.C.: se realizó un barrido de potencial entre 0,5 y 0,0 V utilizando los electrodos serigrafiados ES1 o ES7.

Control sin TMB: la mezcla de 10 μL de Buffer H, 40 μL de Buffer C y 0,25 μL de H_2O_2 0,88 M se dejó reaccionar (t_{RX}), y se cuantificó el producto de reacción.

Control de reactivos: la mezcla de 10 μL de Buffer H, 40 μL de Buffer C, 0,25 μL de TMB 40 mM y 0,25 μL de H_2O_2 0,88 M se dejó reaccionar (t_{RX}), y se cuantificó el producto de reacción.

Control de hemina: a la cantidad de hemina requerida según el ensayo se agregó Buffer H hasta completar 10 μL , luego se agregó 40 μL de Buffer C, 0,25 μL de TMB 40 mM y 0,25 μL de H_2O_2 0,88 M, se dejó reaccionar (t_{RX}), y se cuantificó el producto de reacción.

Estudio de TMB como sustrato: se utilizó **Dz** 0,5 μM y se dejó reaccionar por 5 minutos. Se separaron dos alícuotas: sobre una se midió el espectro de absorción entre 290 nm y 800 nm y sobre la otra la intensidad de corriente en función del potencial por voltametría cíclica entre 0,65 V y 0,1 V a 100 mV/s.

Se repitió este ensayo agregando H_2SO_4 a los 5 minutos de comenzada la reacción.

Elección del método de medición electroquímico: se utilizó **Dz** 1 μM , se realizaron las mediciones por voltametría de onda cuadrada a diferentes tiempos de reacción con y sin agregado de H_2SO_4 midiendo entre 0,6 V a 0 V.

Análisis del comportamiento de los electrodos serigrafiados: Se midió una solución de ferrocenometanol 0,5 mM por voltametría cíclica entre 0,5 V a 0 V a 100 mV/s y por voltametría de onda cuadrada entre 0,5 V a 0 V.

Señal **Dz** en función del tiempo de reacción: se utilizó **Dz** 1 μM , se realizaron las mediciones a diferentes tiempos de reacción con agregado de H_2SO_4 empleando voltametría de onda cuadrada entre 0,8 V a 0 V.

Análisis de adsorción TMB/TMB_{ox} sobre los electrodos de carbono: Tres ensayos, uno sin **Dz**, otro con **Dz** 0,5 μM y otro con **Dz** 5 μM . Se midió por voltametría cíclica entre 0,6 y 0 V a distintas velocidades de barrido de potencial: 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 mV/s.

Relación entre la concentración de **Dz** y la intensidad de corriente: Se utilizaron diferentes concentraciones de Dz (0,1 μM ; 1 μM ; 2 μM y 3 μM) se dejó reaccionar por 2 minutos, se agregó H_2SO_4 midiendo voltametría de onda cuadrada entre 0,5 V a 0 V.

DNAzima inmovilizada (Capítulo 4)

Sobre partículas magnéticas

Se utilizaron dos marcas comerciales de partículas magnéticas modificadas con estreptavidina, ambas requieren lavados antes de la inmovilización de oligonucleótidos, cumpliendo los protocolos especificados por los respectivos fabricantes.

Partículas **P**: *Promega (Streptavidin Magsphere L: 256660)*. Solución de lavado “SSC” ³: ⁴ NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M en agua.

Partículas I: *Invitrogen (Dynabeads M-280 streptavidin L: 124449420)*. Solución de lavado “*washing buffer (WB)*”⁴: Tris-HCl 5 mM, EDTA 0,5 mM, NaCl 1M en agua.

La reacción de peroxidación en fase heterogénea con **B-Dz** inmovilizada sobre partículas magnéticas se llevó a cabo en 3 pasos:

- 1) Inmovilización de la secuencia **B-Dz** sobre partículas magnéticas: Como paso previo a la inmovilización se llevó a cabo el calentamiento del oligonucleótido a 90°C en termociclador, necesario para favorecer la formación de estructuras cuartetos de G.

Las partículas lavadas según indicaciones del fabricante se resuspendieron en 100 µL de solución de lavado (SSC o WB), se agregó la cantidad adecuada de oligonucleótido según el ensayo y se agitó durante 10 minutos para favorecer la interacción biotina-estreptavidina, inmovilizando oligonucleótido sobre las partículas. Por último, se lavó dos veces con 500 µL de solución de lavado (SSC o WB) y dos veces con 500 µL de Buffer H comprobando por medición de absorbancia que no hubiera oligonucleótido en las aguas de lavado.

- 2) Activación de DNAzima: las partículas modificadas con **B-Dz** se resuspendieron en 100 µL de Buffer H. Se agregó la cantidad de hemina equivalente a la de oligonucleótido inmovilizado. Se dejó reaccionar 20 minutos para permitir la formación de la estructura cuartetos de G y el reconocimiento de la hemina. Se lavó el exceso de hemina dos veces con 500 µL de solución de lavado (SSC o WB) y dos veces con 500 µL de Buffer H.

- 3) Reacción de peroxidación: Las partículas modificadas con **B-Dz** se resuspendieron en 10 µL de Buffer H se agregó 40 µL de Buffer C, 0,25 µL de TMB 40 mM y 0,25 µL de H₂O₂ 0,88 M. Se dejó reaccionar (t_{RX}) y se separaron las partículas del sobrenadante utilizando un imán. En algunos ensayos se cuantificó directamente el producto de reacción (TMB⁺, azul) midiendo absorbancia a 370 nm y en otros se agregó 10

μL de H_2SO_4 1 M para detener la reacción antes de cuantificar (TMB_{ox} , amarillo) midiendo absorbancia a 450 nm.

Control hemina: Se resuspendieron las partículas en 100 μL de Buffer H. Se agregó la cantidad de hemina requerida según el ensayo y se lavó el exceso dos veces con 500 μL de solución de lavado (SSC o WB) y dos veces con 500 μL de Buffer H. Se llevó a cabo la reacción de peroxidación y la cuantificación.

Ensayos de repetitividad sobre partículas modificadas: Luego de realizar la cuantificación correspondiente se lavaron las partículas magnéticas cuatro veces con 250 μL de Buffer H. Se agregó hemina dejando reaccionar 20 minutos para permitir la activación de la DNAzima nuevamente (en algunos ensayos no se realizó el agregado de hemina). Se lavó el exceso de hemina dos veces con 500 μL de buffer de lavado (WB) y dos veces con 500 μL de Buffer H. Se llevó a cabo la reacción de peroxidación y la cuantificación.

Sobre oro

La reacción de peroxidación en fase heterogénea con ***T-Dz*** inmovilizada sobre oro se realizó en 5 pasos.

- 1) Limpieza de las láminas de oro: Se realizó un pulido de las superficies de oro con alúmina, se lavó con agua, se sometió a ultrasonido 15 minutos en agua y se volvió a lavar para eliminar los restos de alúmina. Luego se sumergió en una solución piraña (H_2SO_4 (c) - H_2O_2 30%) 3:1 durante 1 h. Finalmente se lavó con agua destilada y se flameó con llama directa de mechero Mecker con el fin de reordenar la distribución superficial de los átomos, favoreciendo regiones atómicamente planas de $\text{Au}(1,1,1)^9$.
- 2) Reducción de la modificación disulfuro del oligonucleótido: La solución de ***T-Dz*** 100 μM se hizo reaccionar con TCEP 1,5 mM y se dejó 2 h en oscuridad¹⁰ para permitir la reducción del disulfuro obteniendo como productos oligonucleótido tiolado y hexanotiol⁷.

- 3) Inmovilización del oligonucleótido tiolado sobre oro: Luego de la reducción del puente disulfuro se colocaron 20 μL de solución de ***T-Dz*** sobre cada lámina de oro. La concentración se fijó para cada experimento en particular. El tiempo de inmovilización fue de 2 h. Se lavó con Buffer H para eliminar el exceso no inmovilizado. A continuación, se inmovilizó MCH de modo de ocupar sitios vacíos de la superficie de oro y favorecer la orientación hacia la solución de la secuencia oligonucleotídica evitando interacciones inespecíficas nucleótido-oro¹¹. Se colocó sobre la superficie de oro una solución de MCH de concentración 10 veces mayor que la de la solución de oligonucleótido inicial. Se dejó por 30 minutos y luego se lavó con Buffer H para eliminar el exceso que no se hubiera inmovilizado.
- 4) Activación de la DNAzima: a la secuencia ***T-Dz*** inmovilizada sobre oro se agregó hemina y se esperó 20 minutos para permitir la activación de la DNAzima y se lavó con Buffer H.
- 5) Reacción de peroxidación: Sobre cada superficie de oro modificada con ***T-Dz*** se depositaron 20 μL de mezcla de reacción (10 μL de Buffer H, 40 μL de Buffer C, 0,25 μL de TMB 40 mM y 0,25 μL H_2O_2 0,88 M). Se dejó reaccionar un tiempo variable según el ensayo (t_{RX}) y se cuantificó el producto de reacción.

Control hemina: Se realizó el mismo procedimiento que en la reacción de peroxidación, pero obviando el paso 3) de inmovilización del oligonucleótido.

Ensayos de repetitividad sobre superficies de oro modificadas: se lavaron los soportes de oro modificados con ***T-Dz*** 4 veces con 30 μL de Buffer H. Luego se agregó hemina dejando reaccionar 20 minutos para permitir la activación de la DNAzima nuevamente (en algunos ensayos no se agregó hemina). Se lavó el exceso de hemina 4 veces con 25 μL de Buffer H. Por último, se llevó a cabo la reacción de peroxidación y la cuantificación.

Sistema de reconocimiento sonda-analito (Capítulo 5)

En solución

En el capítulo 5 se analizaron las condiciones de incubación **sonda-analito** para la identificación del **analito** mediante la reacción de peroxidación. En primer lugar, se estudiaron las variables: tiempo de incubación, concentración de Mg^{+2} y temperatura de incubación. Luego, en las condiciones optimizadas, se analizó la curva de calibrado incubando sonda 1 μM con concentraciones variables de analito.

Se describe el protocolo general con el cual se llevó a cabo la reacción de peroxidación, cada ensayo tiene sus particularidades detalladas en el **Capítulo 5**. Se incubó **sonda** 1 μM con concentraciones variables de **analito**, según el ensayo, en Buffer H con agregado de $MgCl_2$ 30 mM. Las mezclas se calentaron a 50°C en termociclador durante 1 h. Luego del reconocimiento **sonda-analito** se agregó hemina 1 μM y se llevó a volumen final de 10 μL con Buffer H. Se dejó reaccionar por 20 minutos para permitir la formación de la estructura de cuartetos de G. Luego se agregaron 40 μL de Buffer C, 0,25 μL de TMB 40 mM y 0,25 μL de H_2O_2 0,88 M. Se dejó reaccionar (t_{RX}) y se cuantificó el producto de reacción.

Control de reacción: Se realizó el mismo procedimiento que el anteriormente descrito, pero sin agregado de secuencia **analito**.

Inmovilizado sobre partículas magnéticas

Reconocimiento sonda-analito: se incubó **sonda** con **analito** en relación 1:1 en las mismas condiciones que para los ensayos en fase homogénea. El reconocimiento de la sonda se llevó a cabo en 3 pasos:

- 1) Inmovilización sobre partículas magnéticas I: Se lavaron las partículas según indicaciones del fabricante y luego con Buffer H. Se resuspendió la mezcla en 200 μL de Buffer H y se separó la suspensión en dos alícuotas de 100 μL . A una se le agregó **analito** en concentración 2 μM y otra se dejó tal cual (control). Sobre ambas alícuotas se agregó sonda en concentración 2 μM y se incubó por 1 h a 50°C, luego se agregó hemina para permitir la formación de DNAzima. Se mezcló con partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Ambas alícuotas

se agitaron durante 10 minutos para favorecer la inmovilización. Se lavó dos veces con 500 μL de solución WB y dos veces con 500 μL de Buffer H.

- 2) Activación de la DNAzima: Se resuspendieron las partículas magnéticas de cada alícuota (con analito y control) en 100 μL de Buffer H. Se agregaron 3 nmol de hemina dejando reaccionar 20 minutos para permitir la activación de la estructura de cuartetos de G y el reconocimiento de la hemina. Se lavó el exceso de hemina dos veces con 500 μL de solución WB y dos veces con 500 μL de Buffer H.
- 3) Reacción de peroxidación: A las partículas modificadas resuspendidas en 10 μL de Buffer H se les agregó 40 μL de Buffer C, 0,25 μL de TMB 40 mM y 0,25 μL de H_2O_2 0,88 M. Se dejó reaccionar (t_{RX}) y se separaron las partículas del sobrenadante por imantación. Se cuantificó el producto de reacción midiendo absorbancia a 370 nm.

2.4 Técnicas y metodologías aplicadas para la detección

Se describen las técnicas y metodologías empleadas en todo el trabajo de tesis para la detección de los productos de la reacción de peroxidación catalizada por DNAzima.

2.4.1 Detección espectrofotométrica

Se emplearon dos equipos diferentes. Espectrofotómetro Lambda 25 doble haz, con cubetas de 1,5 mL, y espectrofotómetro NanoDrop, que fue adquirido luego de empezado el trabajo experimental, en el cual las mediciones se realizaron directamente sobre alícuotas de 2 μL de solución. En ambos casos como blanco de absorbancia se utilizó solución reguladora sin agregado de hemina, H_2O_2 ni sustrato. Los productos de reacción y los blancos de reactivos se midieron realizando barridos de longitud de onda entre 290 nm y 800 nm y registrando los valores de absorbancia en las longitudes de onda correspondientes a los máximos de los espectros obtenidos. En el caso del espectrofotómetro NanoDrop se tuvo el recaudo de realizar lavados del

“pedestal” (porta gota) con agua ultra pura entre mediciones. Para ensayos largos, que requirieron varias horas de medición, se controló la estabilidad de la señal midiendo el blanco de absorbancia cada media hora.

Cabe aclarar que para las mediciones de microvolúmenes el *software* del espectrofotómetro NanoDrop One v1.4.2 selecciona automáticamente el mejor camino óptico (entre 1,0 mm y 0,03 mm) en base a la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de análisis. Los valores de absorbancia que arroja el equipo resultan de normalizar el camino óptico a uno de 10 mm por lo tanto los valores de absorbancia que se muestran durante toda la tesis son relativos y la escala no es la habitual, teniendo valores de hasta 10 unidades de absorbancia (u.a.) en la mayoría de los casos.

Control de la concentración de secuencias oligonucleotídicas

Para determinar la concentración de oligonucleótidos en solución se utilizó la aplicación ADN_{mc} del *software* del espectrofotómetro NanoDrop One v1.4.2. La aplicación calcula la concentración de oligonucleótidos en ng/μL a partir de la ecuación de *Beer-Lambert* ($C = A / \epsilon b$, donde **C** es la concentración del oligonucleótido en ng/μL, **A** la absorbancia a 260 nm, ϵ el coeficiente de extinción en ng cm/μL y **b** el camino óptico en cm) con un factor $1/\epsilon b$ de 33 ng cm/μL¹².

2.4.2 Detección electroquímica¹³

Todas las mediciones electroquímicas fueron realizadas con el equipo Autolab PGSTAT204. Para el análisis de datos se empleó el *software* “Nova 1.10”¹⁴. Las técnicas aplicadas fueron de potencial controlado. Se describen brevemente las principales características de cada una.

Técnicas electroquímicas

Voltametría cíclica (V.C.): suele ser empleada como técnica exploratoria ya que permite obtener, en forma rápida, información sobre el sistema. Puede ser utilizada para adquirir información cualitativa de las reacciones electroquímicas, determinar los potenciales redox de las especies electroactivas, analizar la termodinámica de los procesos redox o la cinética de las reacciones por transferencia de electrones. La V.C. también se utiliza para detectar procesos

acoplados a los de oxidación y reducción, por ejemplo, la adsorción o desorción de una especie electroquímicamente activa sobre la superficie del electrodo, o reacciones químicas acopladas al proceso de transferencia de carga. Como desventaja no es una técnica suficientemente sensible para permitir la cuantificación.

Ésta técnica consiste en aplicar una variación lineal del potencial sobre el electrodo de trabajo, barriendo en un sentido en primer lugar y luego en el sentido contrario, de forma triangular (**figura 2.4 (A)**), y registrando la corriente generada de acuerdo al potencial aplicado. En la **figura 2.4 (B)** se muestra, a modo de ejemplo, la forma de la señal esperada para un par redox reversible durante un ciclo simple de barrido de potencial. Se asume que solo la forma reducida R está presente inicialmente. Entonces se aplica un barrido de potencial positivo empezando desde un valor donde no ocurre la oxidación. Cuando el potencial aplicado se acerca al potencial característico para el proceso redox (E^0), la corriente anódica aumenta. Una vez que se completó la oxidación, la corriente vuelve a disminuir observándose un pico (i_{pa}). Luego, al invertir la dirección del barrido de potencial la especie oxidada O es reducida a R observándose un pico catódico (i_{pc}).

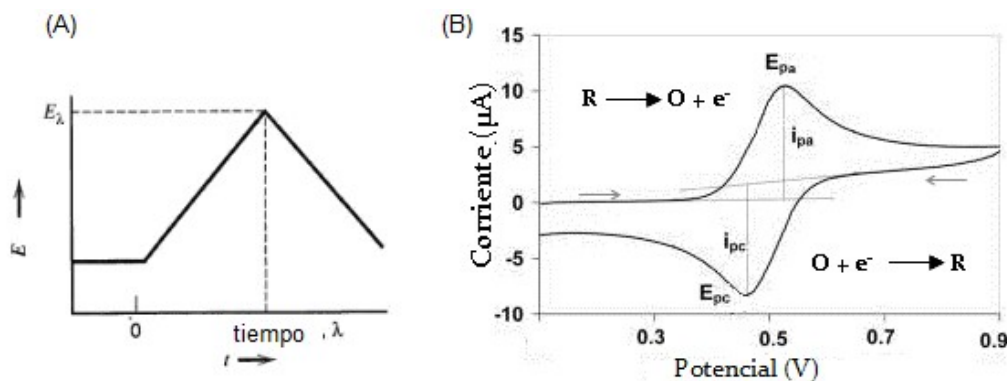


Figura 2.4: Voltametría cíclica. (A) Potencial aplicado en función de tiempo. (B) Curva de corriente en función del potencial aplicado¹⁵.

La forma de la curva de intensidad de corriente en función del potencial aporta información acerca de la reversibilidad del proceso de electrodo. Se identifican dos parámetros que permiten caracterizar la respuesta: la diferencia entre los potenciales del pico anódico y del pico catódico (ΔE_{pico}) y la relación entre las corrientes de pico anódico y catódico (i_{pa}/i_{pc}). El valor de ΔE_{pico} cercano a $59/n$

mV (n: número de electrones transferidos) y el de I_{pa}/I_{pc} cercano a 1, indican que la transferencia electrónica con la superficie del electrodo es rápida y por lo tanto el proceso reversible.

Por otro lado, la relación entre la velocidad de barrido de potencial y la corriente de pico permite analizar la interacción de la sustancia electroactiva con la superficie del electrodo, en términos de control difusional o adsorativo.

Si se considera la hemireacción de oxidación en las condiciones en que en la solución sólo se encuentra la especie reducida, bajo control difusional, es decir, condición de difusión lineal semi infinita y velocidad de transferencia electrónica rápida en la superficie del electrodo, para una reacción reversible, se cumple la ecuación de *Randles-Sevcik* que relaciona la corriente con la velocidad de barrido de potencial (a 298 K) según¹⁶:

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} A D_i^{1/2} C_i^* v^{1/2}$$

Ecuación 1: Donde la corriente de pico (I_p) se expresa en ampere (A), n es el número de electrones intercambiados en la reacción, el área del electrodo (A) se expresa en cm^2 , el coeficiente de difusión (D_i) se expresa en $cm^2 s^{-1}$, la velocidad de barrido de potencial en $V s^{-1}$ y la concentración de la especie electroactiva en el seno de la solución C_i^* en M.

Esta ecuación indica una relación lineal entre la corriente de pico generada por la reacción de la especie electroactiva en solución, que llega al electrodo por difusión, y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial.

Por el contrario, si la especie reducida se encuentra adsorbida sobre la superficie del electrodo, proceso controlado por adsorción, suponiendo que la cantidad adsorbida es independiente del potencial aplicado y que la especie reducida adsorbida se oxida completamente, sin que haya adsorción o desorción durante la medición, sin limitaciones de transferencia de masa; la corriente se relaciona con la velocidad de barrido de potencial (a 298k), según¹⁷:

$$I_p = 9,39 \cdot 10^5 n^2 A \Gamma_i v$$

Ecuación 2: Donde la corriente de pico (I_p) se expresa en ampere (A), n es el número de electrones intercambiados en la reacción, el área del electrodo (A) se expresa en cm^2 , la velocidad de barrido de potencial en $V s^{-1}$ y la concentración superficial de la especie electroactiva (Γ) en $mol cm^{-2}$.

Esta ecuación indica que la corriente de pico, generada por la reacción de la especie electroactiva adsorbida sobre la superficie del electrodo, resulta directamente proporcional a la velocidad de barrido de potencial aplicada.

Control de electrodos serigrafiados: Los electrodos fueron descriptos en la **sección 2.2.3**. Debido al método de fabricación y a que no cuentan con un electrodo de referencia propiamente dicho, sino que el electrodo es de pseudoreferencia impreso con tinta de plata fue necesario realizar un control antes de utilizarlos para asegurar el buen funcionamiento y la reproducibilidad de la respuesta electroquímica entre electrodos distintos. El comportamiento electroquímico se controló midiendo la respuesta por V.C. entre 0,5 V y 0 V con una velocidad de barrido de 100 mV/s, empleando soluciones de ferrocenometanol (0,5 mM en hepes- NaNO_3 50 mM). Esta sustancia presenta un comportamiento electroquímico bien conocido reversible e intercambia un solo electrón¹⁸. Para un proceso de estas características es de esperar que $\Delta E_{\text{pico}} \approx 59$ mV. Sin embargo, para los electrodos utilizados durante este trabajo de tesis se han observado otros valores, típicamente 80 mV, como lo ejemplifica el voltagrama de la **figura 2.5**.

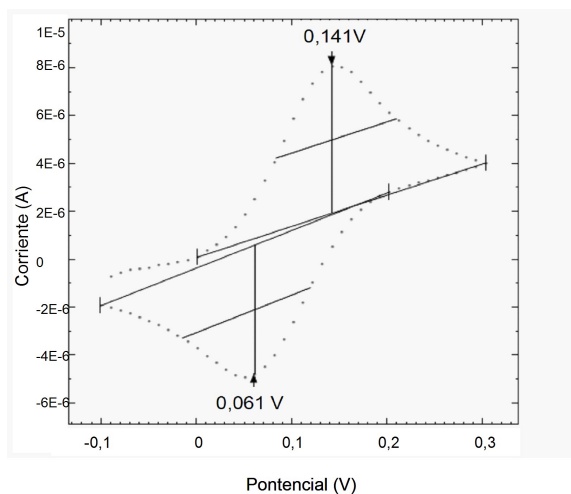


Figura 2.5: Control de los electrodos por V.C. correspondiente a una solución de ferrocenometanol 0,5 mM sobre electrodo serigrafiado. $\Delta E_{\text{pico}} = 0,141 \text{ V} - 0,061 \text{ V} = 0,080 \text{ V}$. (-0,1 V a 0,3 V 125 mV/s).

Estas discrepancias podrían tener origen en las variaciones entre las superficies de los electrodos serigrafiados, donde ocurre la reacción. Antes de

utilizar un electrodo se hizo el control por V.C en ferrocenometanol, se consideraron como aptos los electrodos que presentaron $\Delta E_{\text{pico}} \leq 80 \text{ mV}$ y se descartaron los que presentaron diferencias mayores.

Cronoamperometría (C.A.): consiste en aplicar un escalón de potencial sobre el electrodo de trabajo y monitorear la corriente resultante de los procesos faradaicos en función del tiempo. Para una reacción reversible en una solución sin agitación y un electrodo de trabajo estacionario, es decir bajo la condición de que el transporte de masa sea únicamente por difusión, la curva de corriente-tiempo refleja el cambio del gradiente de concentración cerca de la superficie. A medida que transcurre el tiempo el reactivo se agota aumentando el espesor de la capa de difusión. En consecuencia, la corriente decae con el tiempo según la ecuación de Cottrell (ecuación 3)

$$I = n F A C^0_i D_i^{1/2} (\pi t)^{-1/2}$$

Ecuación 3: Donde la corriente (I) se expresa en A, n es el número de electrones intercambiados en la reacción, la constante de Faraday (F) tiene un valor de 96485 C/mol, el área del electrodo (A) se expresa en cm^2 , el coeficiente de difusión (D_i) se expresa en $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$, la concentración inicial de la especie electroactiva C^0_i en M y el tiempo se expresa en s^{19} .

En la **figura 2.6** se esquematiza el escalón de potencial aplicado, el perfil de concentración respecto a la distancia con la superficie del electrodo y la caída de la corriente con el tiempo.

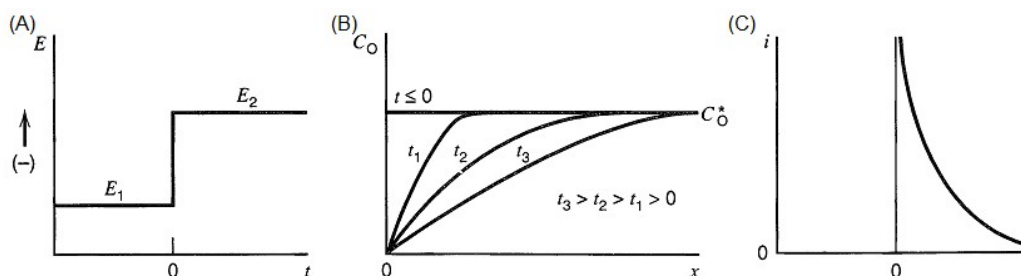


Figura 2.6: Cronoamperometría: (A) escalón de potencial aplicado, (B) perfil de concentración respecto a la distancia con superficie del electrodo, (C) caída de la corriente con el tiempo¹⁹.

Voltametrías de pulso

Voltametría de pulso diferencial (V.P.D.): se aplica un perfil caracterizado por pulsos de potencial de baja amplitud en vez de un barrido lineal de potencial como en la voltametría cíclica. El potencial aplicado al electrodo aumenta entre pulsos con incrementos iguales. La corriente se mide inmediatamente antes de la aplicación del pulso y al final del pulso, y se registra la diferencia entre ellos. Como resultado esta técnica, como todas las de pulso, minimiza la corriente capacitiva lo que le confiere mayor sensibilidad respecto de la de las técnicas no pulsadas²⁰.

Voltametría de onda cuadrada (V.O.C.): también es una voltametría de pulso, presenta una buena línea de base y su sensibilidad es ligeramente superior a la de la V.P.D. siendo generalmente la mejor opción entre los métodos de pulso para hacer análisis cuantitativos²¹.

En la **figura 2.7** se grafican los ciclos de potencial aplicados en forma de escalera en función del tiempo. La voltametría de onda cuadrada se caracteriza por una altura de pulso, ΔE_p , medida con respecto al escalón correspondiente, y un ancho de pulso t_p . La escalera se desplaza ΔE_s al comienzo de cada ciclo; así, la velocidad de exploración puede definirse como $v = \Delta E_s / 2t_p$. El escaneo comienza en un potencial inicial, E_i . La corriente se muestrea dos veces por ciclo, al final de cada pulso. La corriente directa, i_f , se obtiene a partir del primer pulso por ciclo en la dirección en que se escanea la escalera. La corriente inversa, i_r , se toma al final del segundo pulso, en dirección opuesta. La diferencia de corriente Δi se calcula como $i_f - i_r$. Para este tipo de voltametría la capa difusional no se renueva al comienzo de cada ciclo de medición, y los tratamientos teóricos son muy complejos.

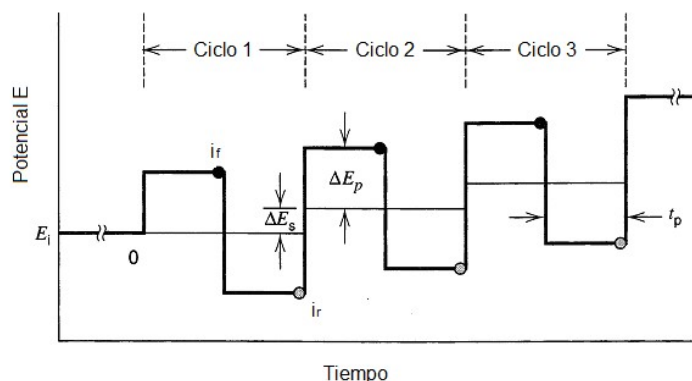


Figura 2.7: Ciclos de potencial aplicados en la V.O.C.

En la **figura 2.8** se muestran los voltagramas adimensionales directo, inverso y la diferencia de ambos para un proceso de reducción con cinética reversible. Asumiendo que: la solución contiene solamente especie oxidada, la concentración es uniforme al comienzo del escaneo y el experimento es lo suficientemente rápido como para asumir difusión lineal semi-infinita.

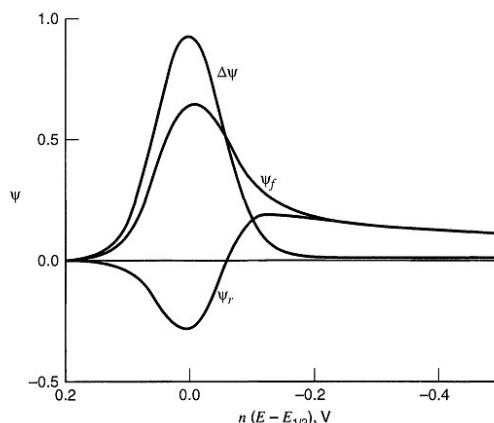


Figura 2.8: voltagramas adimensionales directo, inverso y la diferencia entre ambos²¹.

El voltagrama que representa la diferencia de las corrientes directa e inversa presenta forma de pico simétrico en el potencial de media onda. En las condiciones de V.O.C. la corriente de pico resulta proporcional a la concentración de la especie electroactiva según:

$$I_p = n F A C_i D_i^{1/2} (\pi t)^{-1/2} \Delta\psi_p$$

Ecuación 4: Donde la corriente (I) se expresa en A, n es el número de electrones intercambiados en la reacción, la constante de Faraday (F) tiene un valor de 96485 C/mol, el área del electrodo (A) se expresa en cm^2 , el coeficiente de difusión (D_i) se expresa en $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, la concentración inicial de la especie electroactiva C_i en M, el tiempo se expresa en s y $\Delta\psi_p$ representa la corriente de pico adimensional

Esta ecuación se compone por dos factores. El primero está dado por la ecuación de Cottrell (**ecuación 3**) y el segundo, $\Delta\psi_p$, representa la corriente de pico adimensional que depende del número de electrones intercambiados (n), la altura de pulso (ΔE_p) y el potencial de escalón en el que comienza cada ciclo (ΔE_s)²¹.

2.5 Bibliografía

1. Travascio, P., Li, Y. & Sen, D. DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin complex. *Chem. Biol.* **5**, 505–517 (1998).
2. Electrodo screen printed diseñado por el Dr. Fernando Battaglini, Laboratorio de Sensores Químicos, INQUIMAE, FCEN, UBA.
3. <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/rna/streptavidin-magnosphere-paramagnetic-particles/?catNum=Z5481#protocols> (acceso 04/2023).
4. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11205D#/11205D> (acceso 04/2023).
5. Dellafiore, M. A., Montserrat, J. M. & Iribarren, A. M. Exploring the use of a guanine-rich catalytic DNA for sulfoxide preparation. *PLoS One* **10**, 1–11 (2015).
6. Longinotti, G., Ybarra, G. & Montserrat, J. Optical and electrochemical detection of a verotoxigenic *E. coli* gene using DNAzyme-labeled stem-loops. *J. Electrochem. Sci. Eng.* **7**, 193–200 (2017).
7. Burns, J. A., Butler, J. C., Moran, J. & Whitesides, G. M. *Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine*. *J. Org. Chem.* vol. 56 (1991).
8. Li, B., Du, Y., Li, T. & Dong, S. Investigation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as colorimetric substrate for a peroxidatic DNAzyme. *Anal. Chim. Acta* **651**, 234–240 (2009).
9. Haiss, W., Lackey, D., Sass, J. K. & Besocke, K. H. Atomic resolution scanning tunneling microscopy images of Au(111) surfaces in air and polar organic solvents. *J. Chem. Phys.* **95**, 2193–2196 (1991).
10. Baker, B. R. *et al.* An electronic, aptamer-based small-molecule sensor for the rapid, label-free detection of cocaine in adulterated samples and biological fluids. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 3138–3139 (2006).
11. Levicky, R., Herne, T. M., Tarlov, M. J. & Satija, S. K. *Using Self-Assembly To Control the Structure of DNA Monolayers on Gold: A Neutron Reflectivity Study*. (1998).
12. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-Help-UG-en.pdf> (acceso 04/2023).
13. Montiel León, J. M. Desarrollo de un Método de Análisis Voltamperométrico para la Cuantificación de Acetaminofén Empleando Electrodo Modificado con Polipirrol. 79 (2013).
14. <https://www.metrohm.com/es-ar/products-overview/electrochemistry/autolab%20compact%20line/AUT204S> (acceso 04/2023).
15. Figura inspirada en By Lifer21 - WP:EN, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2042325> (acceso 04/2023).
16. Electrochemical methods. Fundamentals and applications. 2da edición. (2001) Bard, Allen J., Faulkner, Larry R. Capítulo 6. ISBN: 0-471-04372-9.
17. Electrochemical methods. Fundamentals and applications. 2da edición. (2001) Bard, Allen J., Faulkner, Larry R. Capítulo 14. ISBN: 0-471-04372-9.
18. Harris, A. R. *et al.* Efficient strategy for quality control of screen-printed carbon ink disposable sensor electrodes based on simultaneous evaluation of resistance, capacitance and Faradaic current by Fourier transform AC voltammetry. *J. Solid State Electrochem.* **12**, 1301–1315 (2008).
19. Electrochemical methods. Fundamentals and applications. 2da edición. (2001) Bard, Allen J., Faulkner, Larry R. Capítulo 5. ISBN: 0-471-04372-9.
20. Simões, F. R., & Xavier, M. G. (2017). Electrochemical sensors. *Nanoscience and its Applications*, 1, 155-178.
21. Electrochemical methods. Fundamentals and applications. 2da edición. (2001) Bard, Allen J., Faulkner, Larry R. Capítulo 7. ISBN: 0-471-04372-9. 202–210.

Capítulo 3

DNAzima peroxidasa en solución

3.1 Introducción

En este capítulo se desarrolla el estudio de la reacción de peroxidación catalizada por la DNAzima de secuencia *PW17*. Este análisis se llevó a cabo en fase homogénea, con la secuencia libre en solución, como un primer paso hacia la comprensión de las variables que podrían afectar la funcionalidad peroxidasa al incorporar dicha secuencia en un sistema de biorreconocimiento. El principio de funcionamiento del sistema de biorreconocimiento planteado en este trabajo se discute en el **Capítulo 5** y está basado en la activación de la DNAzima peroxidasa como consecuencia del reconocimiento de la secuencia analito. El reconocimiento da lugar a la reacción de peroxidación que genera una cantidad de sustrato oxidado y es transducida como una señal. La intensidad de dicha señal depende de la cantidad de DNAzima peroxidasa activada que, a su vez, depende de la concentración de secuencia analito^{1,2}.

Con el objetivo de hallar una metodología que permita relacionar la concentración de secuencia *PW17* con la intensidad de señal generada se analizaron las condiciones de reacción y la metodología de detección de señal. Se estudiaron dos sustratos para llevar a cabo la reacción de peroxidación, ABTS y TMB, ambos se oxidan a expensas de la reacción de reducción del peróxido de hidrogeno (H_2O_2) catalizada por DNAzima peroxidasa. Como resultado cambian de color y son electroactivos lo cual permiten la detección de la señal mediante métodos ópticos y electroquímicos³⁻⁷.

Los objetivos específicos desarrollados en este capítulo consisten en:

1. Evaluar los sustratos ABTS y TMB como generadores de señal en la reacción de peroxidación catalizada por DNAzima de secuencia *PW17* (**Dz**) en fase homogénea.
2. Evaluar las condiciones necesarias para lograr una respuesta confiable y reproducible para las mediciones tanto espectrofotométricas como electroquímicas.
3. Analizar la relación entre la concentración de secuencia *PW17* y la señal obtenida por ambos métodos de detección.

3.2 Evaluación de los sustratos para la reacción de peroxidación

3.2.1 Consideraciones relevantes para el análisis de la reacción de peroxidación, breve introducción teórica

La actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa se relaciona estrechamente con las condiciones en que se lleva a cabo la reacción. En 1998 Sen *et al.* reportaron un estudio detallado de las variables que afectan a la reacción y que sirvió como base para todos los trabajos posteriores con DNAzima peroxidasa, incluyendo este trabajo de tesis. En ese estudio fueron consideradas como condiciones óptimas de reacción aquellas en las que la relación entre la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa, de secuencia *PS2.M*, y la actividad catalítica intrínseca de la hemina resultó ser máxima; utilizando ABTS como sustrato. Las principales conclusiones desprendidas del trabajo de Sen, en cuanto a las condiciones óptimas de reacción, se enumeran a continuación.

- Se requieren concentraciones iguales de oligonucleótido y hemina para la formación de la estructura cuarteto de G con funcionalidad DNAzima peroxidasa.
- La mezcla de reacción debe contener entre 0,03 % y 0,05 % de detergente iónico (Tritón X-100) para evitar la formación de dímeros de hemina que no poseen actividad peroxidasa intrínseca ni son capaces de funcionar como grupo prostético.
- La concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) debe encontrarse entre 3,6 mM y 6 mM de modo de disminuir la actividad peroxidasa de la hemina sin afectar la de la DNAzima.
- El ion potasio (K^+), fundamental para la formación de la estructura cuartetos de G, debe encontrarse en un rango de concentración de entre 10 mM y 25 mM⁸.

Estas condiciones fueron las que se tomaron como punto de partida para llevar a cabo las reacciones de peroxidación en este trabajo de tesis, cabe aclarar que fue necesario probarlas y ajustarlas ya que la secuencia sc-ADN utilizada durante este trabajo fue *PW17* y no *PS2.M*. Además, esas condiciones fueron testeadas utilizando ABTS como sustrato y no para TMB. Las condiciones utilizadas para cada uno de los ensayos realizados fueron descriptas en el **Capítulo 2**.

Otros factores que afectan tanto a la formación de la estructura cuarteto de G como a la capacidad catalítica de la DNAzima son la composición y el pH del medio. En este sentido el tipo de sustrato empleado durante la reacción de peroxidación también resulta determinante. Para este trabajo de tesis se tomaron las condiciones reportadas como óptimas por investigadores que colaboran con el grupo de trabajo. Para las reacciones con ABTS como sustrato se utilizó tris-HCl 25 mM a pH: 7,5 (Longinotti *et al.* 2017)⁹. Para las reacciones con TMB se utilizó Buffer H (HEPES-NH₄OH 40 mM pH: 8,0) para la formación de la DNAzima y Buffer C (citrato 0,1 M- fosfato 0,2 M pH: 4,4) para llevar a cabo la reacción de peroxidación (Dellafiore *et al.* 2015)¹⁰.

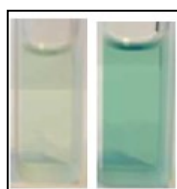
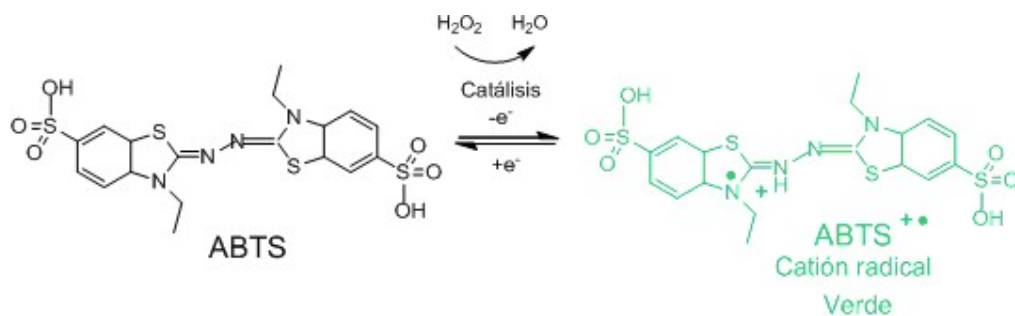
3.2.2 Características de los sustratos de la reacción de peroxidación: ABTS y TMB

La elección del sustrato mediador en la reacción de peroxidación es de suma importancia dado que de su oxidación dependerá la intensidad de la señal generada. En esta sección se describe el comportamiento de los sustratos desde el punto de vista de la señal generada. Los dos sustratos analizados se oxidan como consecuencia de la reacción de peroxidación y con ello cambian de color. Esto permite detectar el producto de oxidación a partir de métodos espectrofotométricos, midiendo absorbancia a la longitud de onda adecuada, y electroquímicos, midiendo la corriente generada tras aplicar un barrido de potencial en sentido reductivo.

Tanto ABTS como TMB se encuentran entre los sustratos más utilizados para las reacciones de peroxidación en general y para la peroxidación catalizada por DNAzima en particular. Numerosas publicaciones reportaron el uso de estos sustratos y la mayoría emplea técnicas colorimétricas para identificación y cuantificación de la reacción^{8,11–20}. Dentro de las publicaciones que aprovechan la señal electroquímica la mayoría utiliza TMB y en menor medida ABTS⁹.

El producto de oxidación del ABTS es un catión radical de color verde, ABTS⁺, cuyo espectro de absorción presenta un máximo a 414 nm^{15,21}. La oxidación de ABTS por H₂O₂ ocurre de forma relativamente rápida, por lo que suele ser utilizado para estudiar cinética de reacciones enzimáticas. Sin embargo, el producto de oxidación, ABTS⁺, no es tan estable y está sujeto a una lenta desproporción en medios acuosos por lo que las mediciones deben realizarse

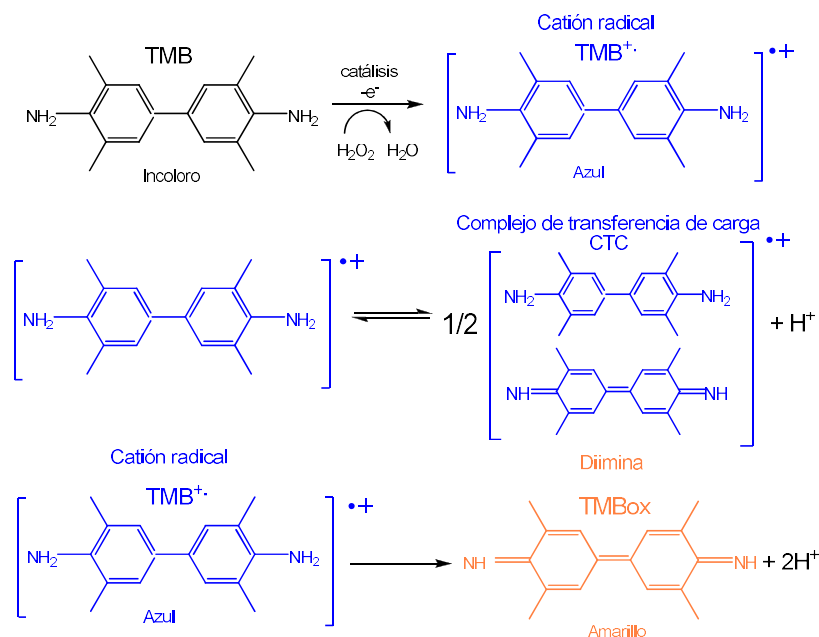
en el momento que finaliza la reacción²². En la **figura 3.1** se esquematiza la reacción de oxidación y los cambios de color para ABTS²¹.

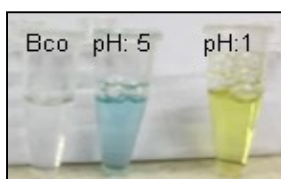


Aspecto de la solución que contiene ABTS y H₂O₂ sin agregado de catalizador (**izquierda**) y luego del agregado de catalizador (**derecha**).

Figura 3.1: Reacción de oxidación de ABTS como sustrato para la reacción de peroxidación mediada por catalizador⁶.

El otro sustrato estudiado, TMB, produce dos compuestos coloreados al oxidarse. En la **figura 3.2** se esquematiza la reacción de oxidación y los cambios de color para TMB²³.





Aspecto de la solución que contiene TMB y H_2O_2 sin agregar catalizador (**izquierda**), luego del agregado de catalizador a pH = 5 (**medio**) y luego de detener la catálisis por agregado de H_2SO_4 pH = 1 (**derecha**).

Figura 3.2: Reacción de oxidación de TMB como sustrato para la reacción de peroxidación mediada por catalizador²⁴.

Si el medio de reacción resulta levemente ácido la reacción ocurre en dos pasos intercambiándose un electrón en cada uno. En el primero se genera una mezcla de diamina y diimina, denominada complejo de transferencia de carga (CTC) que se encuentra en equilibrio con el catión radical (TMB^+). La solución resultante es de color azul y su espectro de absorción presenta dos máximos a 370 nm y 650 nm respectivamente. En el segundo se forma una diimina (TMB_{ox}), de color amarillo, cuyo espectro de absorción tiene un máximo a 450 nm²³. Si el medio se torna suficientemente ácido la oxidación ocurre en un solo paso con intercambio de dos electrones, TMB se oxida directamente a la diimina amarilla que es estable en condiciones fuertemente ácidas²⁵.

Se midieron los espectros de absorción para ABTS y TMB (en medio levemente y fuertemente ácido) (**figuras 3.3, 3.4 y 3.5**), antes y después de llevar a cabo la reacción de peroxidación. Se evaluó la forma de los espectros identificando las longitudes de onda de los máximos de absorbancia y sus líneas de base.

En cuanto a la señal electroquímica, como punto de partida, se empleó la voltametría cíclica (V.C.) (**figuras 3.6, 3.7 y 3.8**) como metodología diagnóstica²⁶ para evaluar el comportamiento electroquímico de cada sistema sustrato-catalizador.

En todos los casos se analizaron posibles interferencias en la señal debidas a catálisis por hemina libre, para ello se prepararon controles de reacción en el mismo medio, pero en ausencia de secuencia *PW17* (**Dz**), es decir hemina como único catalizador. Para todos los ensayos descritos en esta sección las soluciones preparadas se dividieron en sendas alícuotas reservando una para la determinación espectrofotométrica y otra para la electroquímica.

3.2.3 Resultados de la evaluación de la respuesta espectrofotométrica de los sustratos

ABTS: se llevó a cabo la reacción de peroxidación catalizada por **Dz** 1 μM en Buffer Tris pH = 7,5⁹ durante 10 minutos y luego se registró la absorbancia en función de la longitud de onda. El mismo ensayo se repitió en ausencia de **Dz**, pero en presencia de hemina 1 μM a modo de control de la reacción. En la **figura 3.3** se muestran los espectros de absorción de las soluciones resultantes de la reacción de peroxidación catalizada por **Dz** y por hemina (control). En el inserto de esta misma figura se muestra el espectro de la solución de ABTS en el mismo medio de reacción, pero sin catalizador, en el rango de longitudes de onda desde 290 nm hasta 640 nm.

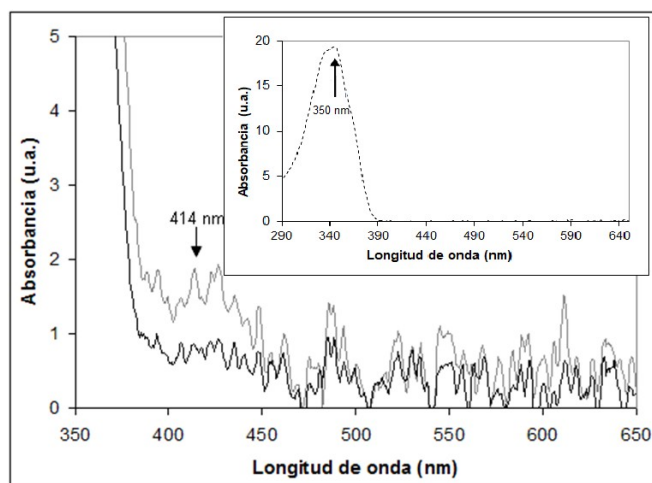


Figura 3.3: Espectros de absorción para la solución resultante de la reacción de peroxidación de ABTS. **Gris:** con **Dz** 1 μM . **Negro:** control hemina 1 μM . **Inserto:** línea punteada, ABTS, en el medio de reacción sin catalizador. Se observa la señal intensa a longitudes de onda menores a 390 nm.

Según se ha reportado, el espectro de absorción para soluciones de ABTS luego de la reacción de peroxidación presenta un máximo alrededor de 414 nm^{15,21}. En los espectros obtenidos, **figura 3.3**, se observaron máximos muy anchos y poco definidos, que se confunden con el ruido, en el rango de longitudes de onda entre 400 y 450 nm. Para el caso de la reacción catalizada por **Dz** (línea gris) la intensidad de absorbancia resultó mayor a la del control que solo tenía hemina (línea negra). En el inserto se amplía el rango de longitudes de onda para mostrar el espectro para ABTS sin oxidar. Este

espectro presentó un máximo a 350 nm con una absorbancia tan alta que la señal de ABTS oxidado, con máximo a 414 nm, resultó despreciable.

Debido a la forma del espectro obtenido en esas condiciones no resultó sencillo determinar la señal de absorbancia para el ABTS oxidado.

TMB: para determinar el espectro de absorción de TMB oxidado en medio levemente ácido, a $\text{pH} = 5$ (TMB^+)²⁷, se llevó a cabo la reacción de peroxidación catalizada por **Dz** 0,5 μM en solución durante 5 minutos. Como control se llevó a cabo la misma reacción, pero utilizando hemina como único catalizador. En la **figura 3.4** se muestran los espectros de las soluciones resultantes de las reacciones de peroxidación catalizada por DNAzima y por hemina utilizando TMB como sustrato a $\text{pH} = 5$.

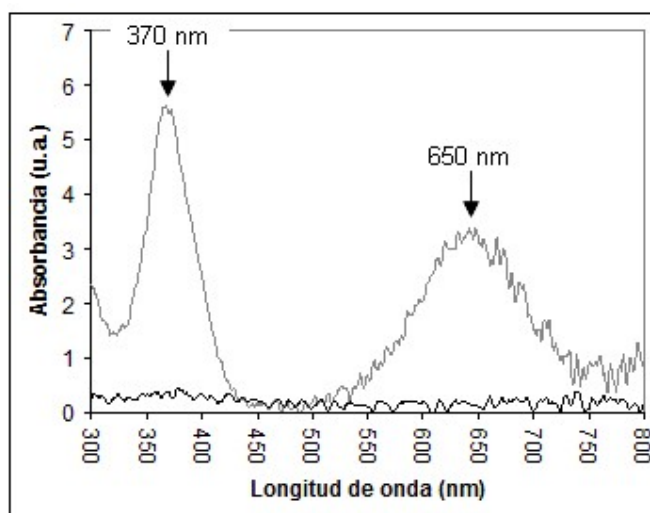


Figura 3.4: Espectros de absorción para la solución resultante de la reacción de peroxidación de TMB ($\text{pH} = 5$). **Gris:** con **Dz** 0,5 μM . (máximos 370 nm 5,55 u.a. 650 nm 3,30 u.a.) **Negro:** control hemina 0,5 μM .

Se ha reportado que el espectro de absorción para soluciones de TMB luego de la reacción de peroxidación a $\text{pH}=5$ presenta dos máximos alrededor de 370 nm y 650 nm respectivamente²³. El espectro medido (**figura 3.4**, línea gris), coincide con los datos bibliográficos; se observan los dos máximos a 370 nm y 650 nm siendo sus valores de absorbancia 5,55 u.a. y 3,30 u.a. respectivamente. La cantidad de TMB^+ generado en la reacción catalizada por **Dz** resultó suficiente para ser detectado mediante este método. Por el contrario, para la reacción con hemina como único catalizador (**figura 3.4**, línea negra),

no se observaron valores de absorbancia distinguibles respecto de los de la línea de base. La actividad catalítica de hemina resultó mucho menor que la de **Dz** en las condiciones en que se llevó a cabo la reacción. La presencia de hemina libre, al menos para la concentración ensayada (0,5 μM) no incrementa significativamente la señal de absorbancia generada por la catálisis con **Dz**.

Estas condiciones de reacción permiten detectar **Dz** a partir de la señal de absorbancia.

La reacción de peroxidación, con TMB como sustrato, puede ser detenida por agregado de H_2SO_4 hasta alcanzar $\text{pH} = 1$. En este medio la actividad catalítica de la DNAzima es inactivada, deteniéndose la reacción, aunque se ha reportado que la actividad catalítica de la hemina no se ve afectada por la disminución de pH y podría seguir catalizando la reacción de peroxidación^{14,28}. En este contexto adquiere aun más importancia el control de la catálisis por hemina, en ausencia de **Dz**.

En la **figura 3.5** se muestran los espectros para la reacción de peroxidación catalizada por DNAzima y por hemina utilizando TMB como sustrato en medio levemente ácido, pero deteniendo la reacción por disminución del pH ($\text{pH} = 1$). En este caso el producto de reacción obtenido fue TMB_{ox} (amarillo).

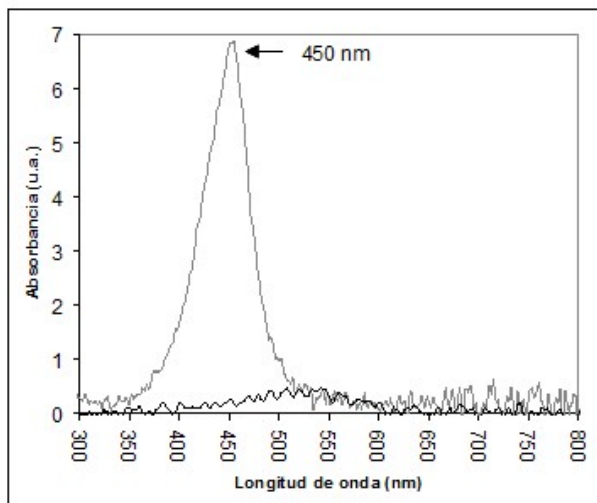


Figura 3.5: Espectros de absorción para la solución resultante de la reacción de peroxidación de TMB ($\text{pH} = 1$). **Gris:** con **Dz** 0,5 μM (máximo 450 nm 6,86 u.a.). **Negro:** control hemina 0,5 μM .

Se ha reportado que el espectro de absorción para soluciones de TMB luego de la reacción de peroxidación a $\text{pH} = 1$ presenta un máximo de absorbancia alrededor de 450 nm²³. El espectro medido (**figura 3.5**, línea gris) coincide con los datos bibliográficos, se observó un máximo de absorbancia a 450 nm siendo su valor 6,86 u.a. En este caso también se observó que el control de hemina (**figura 3.5**, línea negra) no aportó valores de absorbancia distinguibles respecto de los de la línea de base evidenciando que para las condiciones de reacción la catálisis por hemina no significa una interferencia.

La elección del sustrato más adecuado para seguir la reacción de peroxidación por la técnica espectrofotométrica se basó en la comparación de los tres ensayos anteriores. Para el sustrato ABTS no fue posible definir una longitud de onda en la que se observe un máximo de absorbancia definido, siendo los valores alrededor de 414 nm mucho menores en comparación con los valores de absorbancia máximos obtenidos al usar TMB como sustrato. Por otro lado, en el caso de los ensayos control, que no contenían catalizador, para TMB se observó que el espectro no presentaba absorbancia apreciable entre 300 y 800 nm. Mientras que el espectro de ABTS mostró una señal de absorbancia muy intensa a 350 nm. Dado que, para la fabricación de un biosensor, es importante la rapidez con que se obtiene la señal y que esta pueda ser distinguida respecto de la del control de reactivos, y que se hallaron condiciones en las cuales TMB resultó ser un sustrato adecuado para las mediciones espectrofotométricas, se decidió no utilizar ABTS como sustrato para llevar a cabo este tipo de determinaciones. En cuanto al uso de TMB como sustrato las dos posibilidades, detectar $\text{TMB}^{+\cdot}$ o TMB_{ox} , resultaron adecuadas, aunque para el segundo caso la señal resultó más intensa; lo que podría ser beneficioso para el armado de un genosensor ya que podría dar lugar a una mayor sensibilidad de la respuesta.

Por todo lo expuesto, de permitirlo las condiciones experimentales, se decidió realizar el seguimiento de la reacción de peroxidación en solución deteniendo la reacción por agregado de ácido, aunque por las características de algunos ensayos no fue posible su aplicación en todos los casos.

3.2.4 Resultados de la evaluación de la respuesta electroquímica de los sustratos

Paralelamente a la evaluación espectrofotométrica de la reacción de peroxidación con los diferentes sustratos se estudió la respuesta electroquímica utilizando voltametría cíclica (V.C.) como técnica exploratoria. Como se mencionó en la sección anterior los ensayos se dividieron en sendas alícuotas reservando una para la medición electroquímica.

Las mediciones se realizaron sobre electrodos serigrafiados en lugar de celdas electroquímicas tradicionales de modo de reducir la cantidad de oligonucleótido y el volumen de solución utilizados en cada ensayo.

ABTS: en la **figura 3.6** se muestran los voltagramas para las soluciones obtenidas como resultado de llevar a cabo la reacción de peroxidación por 10 minutos con ABTS como sustrato. Se comparó la señal obtenida tras la reacción de peroxidación con la de los controles de reactivos. Los voltagramas de la **figura 3.6 a)** y **b)** son el resultado de los controles negativos de reacción, es decir que en la solución no ha ocurrido la reacción de peroxidación. La **figura 3.6 a)** muestra el voltagrama obtenido para el medio de reacción con H_2O_2 en ausencia de ABTS, la **figura 3.6 b)** muestra voltagrama para ABTS en el medio de reacción con H_2O_2 , pero sin agregado de ningún catalizador. El voltagrama de la **figura 3.6 c)** es el resultado de llevar a cabo la reacción de con H_2O_2 , ABTS y hemina, pero en ausencia **Dz**. Por último, el voltagrama mostrado en la **figura 3.6 d)** es el resultado de llevar a cabo la reacción de peroxidación con H_2O_2 , ABTS y **Dz** 1 μM .

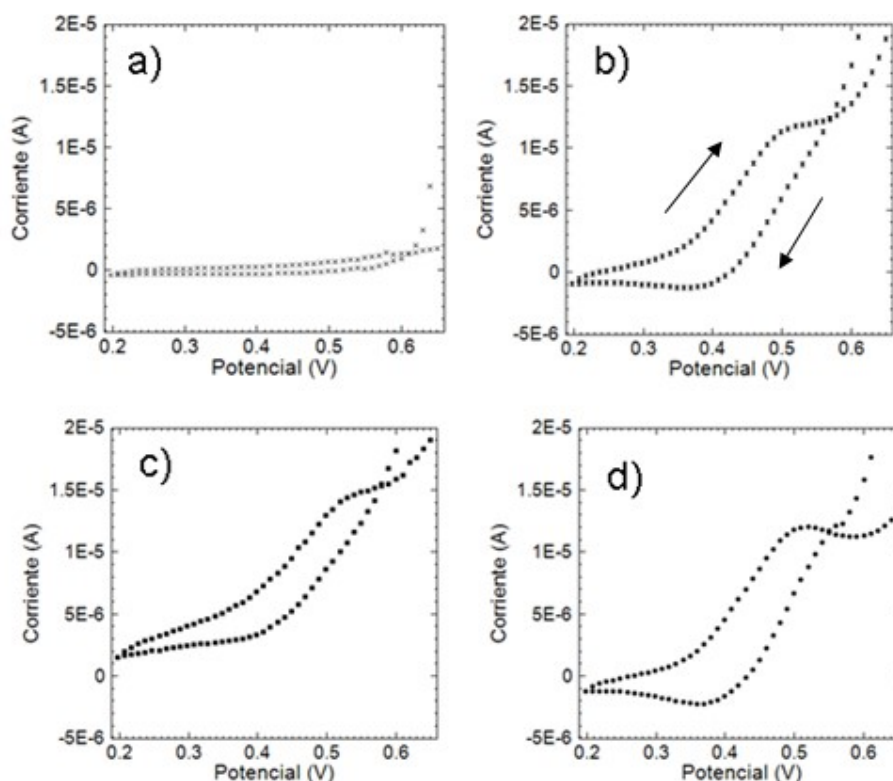
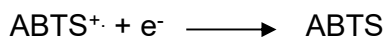


Figura 3.6: Voltagramas para las soluciones obtenidas como resultado de llevar a cabo la reacción de peroxidación de ABTS. Controles negativos de la reacción **a)** medio de reacción en ausencia de ABTS, **b)** ABTS (ausencia de catalizador). **c)** control hemina: ABTS y hemina 1 μM . **d)** reacción catalizada por **Dz** 1 μM . (100 mv/s electrodo pseudoreferencia tinta de plata). Las flechas indican el sentido del barrido de potencial que fue idéntico para todos los ensayos.

La **figura 3.1** muestra la reacción de oxidación de ABTS a expensas de la reducción de H_2O_2 donde el producto de reacción es el catión radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ de color verde²⁹. Para el análisis electroquímico se siguió la hemireacción de reducción dada por:



En el voltagrama mostrado en la **figura 3.6 a)** se observó que el medio de reacción en ausencia de ABTS no aporta una señal apreciable. Para los voltagramas restantes (**figura b)-d)**), en las condiciones de reacción ensayadas las formas de las señales resultaron poco definidas y la diferencia entre pico reductivo y oxidativo mayor a la esperada para el caso de una cupla reversible que intercambia un solo electrón (ΔE_{pico} 60 mV, ver **Capítulo 2, sección 2.4.2**). Además, la forma de las señales tanto en presencia como ausencia de

DNAzima resultaron muy similares. Por estas razones se descartó el uso de ABTS como sustrato de la reacción.

TMB: en la **figura 3.7** se muestran los voltagramas para las soluciones obtenidas como resultado de llevar a cabo la reacción de peroxidación por 5 minutos con TMB como sustrato a pH = 5. Se comparó la señal obtenida tras la reacción de peroxidación con la de los controles de reactivos. Los voltagramas de la **figura 3.7 a)** y **b)** son el resultado de los controles negativos de reacción, es decir que en la solución no ha ocurrido la reacción de peroxidación del TMB. El de la **figura 3.7 a)** es el voltagrama obtenido para el medio de reacción con H_2O_2 en ausencia de TMB, el de la **figura 3.8 b)** es el voltagrama para TMB en el medio de reacción con H_2O_2 , pero sin agregado de ningún catalizador. El voltagrama de la **figura 3.8 c)** es el resultado de llevar a cabo la reacción con H_2O_2 , TMB y hemina, pero en ausencia de **Dz**. Por último, el voltagrama mostrado en la **figura 3.8 d)** es el resultado de llevar a cabo la reacción de peroxidación con H_2O_2 , TMB y **Dz**.

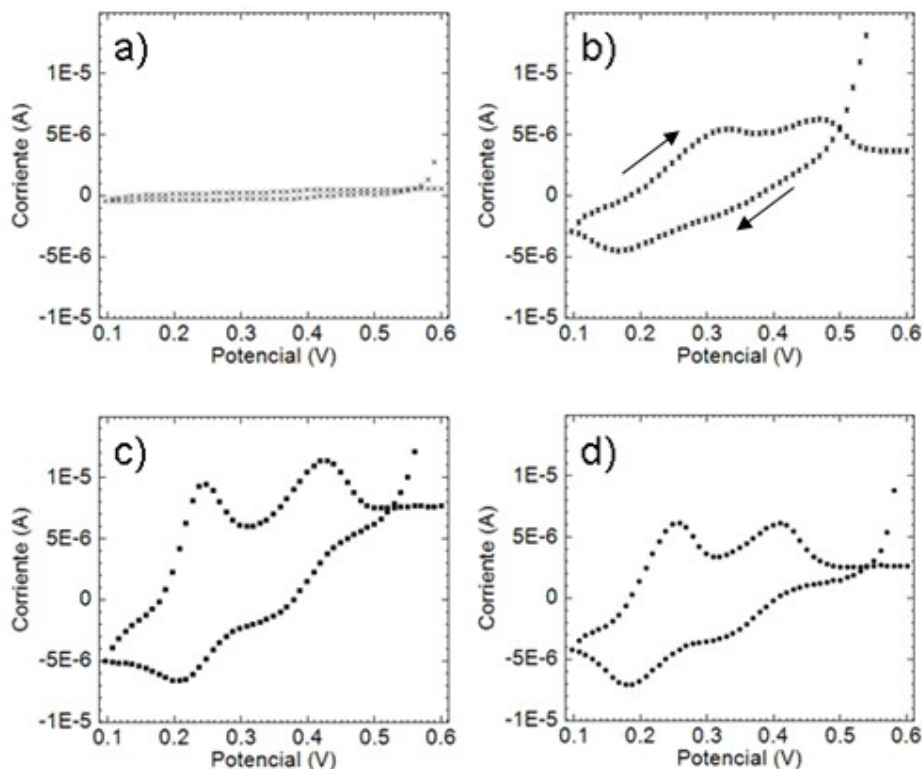
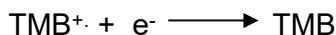


Figura 3.7: Voltagramas para las soluciones obtenidas como resultado de llevar a cabo la reacción de peroxidación de TMB a pH=5. Controles negativos

de la reacción **a)** medio de reacción en ausencia de TMB, **b)** TMB (ausencia de catalizador). **c)** control hemina: TMB y hemina 0,5 μ M. **d)** reacción catalizada por **Dz** 0,5 μ M. (100 mv/s electrodo pseudoreferencia tinta de plata). Las flechas indican el sentido del barrido de potencial que fue idéntico para todos los ensayos.

En la **figura 3.2** se mostró la reacción de oxidación de TMB que ocurre a expensas de la reducción de H_2O_2 , a pH = 5, siendo el producto el catión radical $TMB^{+\cdot}$ de color azul que se encuentra en equilibrio con el CTC³⁰. Para el análisis electroquímico se siguió la hemireacción de reducción de $TMB^{+\cdot}$, dada por:



En las V.C., **figura 3.7** se observó que el medio de reacción (voltagrama **a)**) no aportó una señal apreciable. Al agregar TMB a ese medio (voltagrama **b)**) se observó una incipiente señal a 0,35 V aproximadamente en el sentido del barrido oxidativo. Esta señal podría explicarse considerando que pudo ocurrir oxidación electroquímica. Una parte del TMB se oxidó sobre el electrodo al inicio de la V.C., tras aplicar +0,6 V de potencial, y luego volvió a reducirse al llevar a cabo el barrido reductivo. Finalmente, con el barrido oxidativo se observó la señal a 0,35 V indicando la oxidación de esa cantidad de TMB. En presencia de hemina (voltagrama **c)**) y de **Dz** (voltagrama **d)**) se observó que al aplicar barrido reductivo aparece un pico poco definido alrededor de 0,35 V y uno mas definido a 0,2 V. En cuanto al barrido oxidativo aparecen dos picos a 0,25 V y 0,45 V^{31,32}. Estos resultados sugieren que ocurre más de un proceso sobre el electrodo ya que de ocurrir un único proceso y siendo que la reacción intercambia un solo electrón se vería un único pico reductivo y un único pico oxidativo. Teniendo en cuenta que $TMB^{+\cdot}$ se encuentra en equilibrio con el CTC se puede explicar la aparición de los dos picos en el barrido reductivo debido a la co-existencia de las dos cuplas redox con transferencia de un electrón cada una²⁵. La intensidad de la señal resultó mayor cuando la catálisis fue llevada a cabo por hemina que por **Dz** lo cual contradice lo observado en los espectros de absorción mostrados anteriormente. Dada la forma de la señal obtenida no se encontró una manera sencilla y directa de relacionar la señal medida por voltametría con la cantidad de TMB oxidado en estas condiciones.

En la **figura 3.8** se muestran los voltagramas para las soluciones obtenidas como resultado de llevar a cabo la reacción de peroxidación y detenerla a los 5 minutos por agregado de H_2SO_4 con TMB como sustrato a $\text{pH} = 1$. Se comparó la señal obtenida tras la reacción de peroxidación con la de los controles de reactivos. Los voltagramas de la **figura 3.8 a)** y **b)** son el resultado de los controles negativos de reacción, es decir que en la solución no ha ocurrido la reacción de peroxidación del TMB. En la **figura 3.8 a)** se muestra el voltagrama obtenido para el medio de reacción con H_2O_2 en ausencia de TMB, en la **figura 3.8 b)** se muestra el voltagrama para TMB en el medio de reacción con H_2O_2 , pero sin agregado de ningún catalizador. El voltagrama de la **figura 3.8 c)** es el resultado de llevar a cabo la reacción de peroxidación con H_2O_2 , TMB y hemina, pero en ausencia de **Dz**. Por último, el voltagrama mostrado en la **figura 3.8 d)** es el resultado de llevar a cabo la reacción de peroxidación con H_2O_2 , TMB y **Dz**.

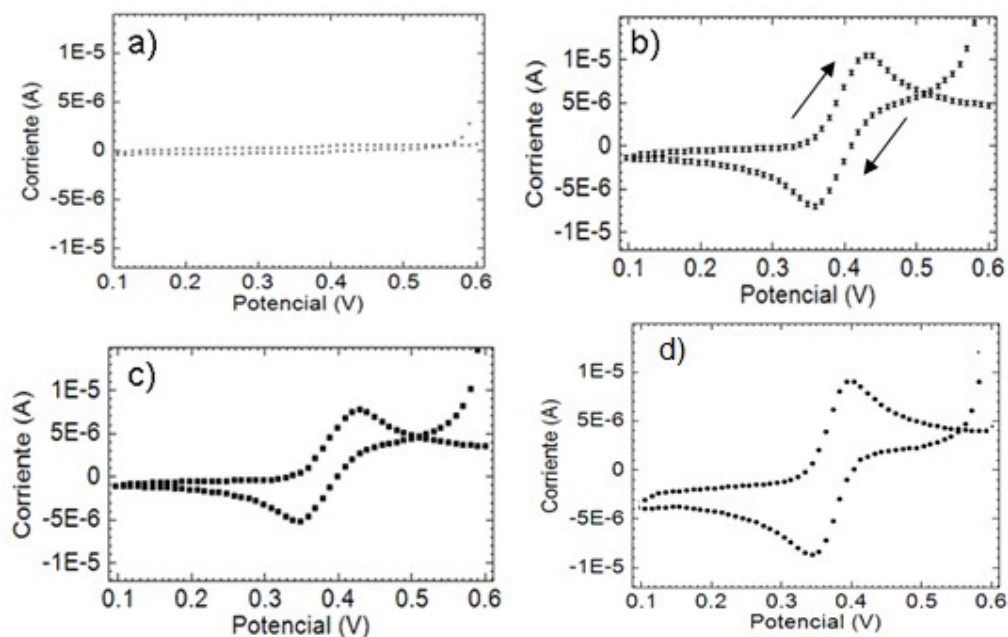


Figura 3.8: Voltagramas para las soluciones obtenidas como resultado de llevar a cabo la reacción de peroxidación de TMB y detenerla a $\text{pH}=1$. Controles negativos de la reacción **a)** medio de reacción en ausencia de TMB, **b)** TMB (ausencia de catalizador). **c)** control hemina: TMB y hemina $0,5 \mu\text{M}$. **d)** reacción catalizada por **Dz** $0,5 \mu\text{M}$. (100 mV/s electrodo pseudoreferencia tinta de plata). Las flechas indican el sentido del barrido de potencial que fue idéntico para todos los ensayos.

Al detener la reacción de oxidación de TMB que ocurre a expensas de la reducción de H_2O_2 por agregado de H_2SO_4 , a $\text{pH} = 1$, se forma TMB_{ox} de color amarillo. Para el análisis electroquímico se siguió la hemireacción de reducción de TMB_{ox} , dada por³³:



En las voltametrías cíclicas, **figura 3.8**, se observó que el medio de reacción (voltagrama **a**)) no aportó una señal apreciable. Al agregar TMB a ese medio (voltagrama **b**)), en presencia de hemina (voltagrama **c**)) y de DNAzima (voltagrama **d**)) se observó que al barrer el potencial en sentido reductivo apareció un pico alrededor de 0,35 V y al barrer en sentido oxidativo uno alrededor de 0,40 V. La forma de los voltagramas y la diferencia de los potenciales de pico (ΔE_{pico}) que resultó ser aproximadamente de 40-50 mV pueden explicarse como un proceso redox reversible donde se intercambian dos electrones²⁵. Para esta última afirmación se tuvo en cuenta que para los electrodos utilizados para un proceso reversible que intercambia un solo electrón se aceptó un $\Delta E_{\text{pico}} \approx 80$ mV (ver **capítulo 2 sección 2.4.2**). Cabe destacar que para los controles que contenían TMB, pero no DNAzima (tanto en ausencia de catalizador como en presencia de hemina) se observaron corrientes de pico no despreciables, es decir que para poder determinar la concentración de DNAzima a partir de la corriente medida será necesario tener en cuenta la corriente aportada por los otros componentes del medio de reacción.

De las tres condiciones de medición analizadas esta última fue la que presentó picos mejor definidos y respuesta reversible. Por esto se concluyó que utilizar TMB como sustrato y detener la reacción por agregado de ácido sulfúrico es la estrategia más adecuada para obtener una señal que pueda relacionarse con la cantidad de producto oxidado formado a partir de la catálisis por **Dz**.

Tanto para la medición espectrofotométrica como para la electroquímica el ABTS oxidado demostró producir señales poco definidas. En el caso de TMB oxidado, que puede ser detectado en dos condiciones de pH diferentes, la determinación espectrofotométrica dio señales similares para las dos condiciones. En el caso de la determinación electroquímica resultó más sencillo de analizar el voltagrama para la condición de $\text{pH} = 1$, ya que a $\text{pH} = 5$ se observaron dos señales acopladas con una diferencia de potencial de pico muy

pequeña, aproximadamente 0,2 V. Dicho todo esto, el sustrato que permitió obtener mejores señales en las condiciones analizadas fue TMB. Por lo tanto, de aquí en adelante todos los ensayos fueron realizados utilizando TMB como sustrato.

3.3 Evaluación de las condiciones para la detección electroquímica de TMB oxidado por la reacción de peroxidación.

En esta sección se describe el análisis para la cuantificación indirecta de la DNAzima en solución a partir de la medición electroquímica de TMB oxidado en la reacción de peroxidación. La elección de la técnica electroquímica se basó en el análisis de las señales obtenidas durante la exploración por V.C. del sistema **Dz**/H₂O₂/TMB y en las técnicas reportadas en bibliografía para sistemas similares (**Capítulo 1 sección 1.4**). Se analizaron las ventajas y desventajas de las tres técnicas mas comúnmente utilizadas cronoamperometría (C.A.), voltametría de onda cuadrada (V.O.C) y voltametría de pulso diferencial (V.D.P.) (**Capítulo 2 sección 2.4**).

La C.A. es una de las técnicas más utilizadas en la construcción de sensores electroquímicos por su alta sensibilidad, por ser pocas las variables a optimizar y por la posibilidad de adaptarla a equipamiento portátil. La técnica consiste en aplicar un potencial fijado previamente sobre el electrodo de trabajo y monitorear la corriente en función del tiempo.

Tanto en el sistema estudiado en este trabajo como en algunas de las señales reportadas en bibliografía, que se discutieron en el **Capítulo 1**, se observó que ocurren grandes corrimientos, de hasta 50 mV, en el potencial de pico (ver **figuras 1.23 (D)** y **3.12**). Estos corrimientos en el potencial se observaron aún al medir alícuotas de una misma solución tanto sobre el mismo electrodo como sobre electrodos independientes y representan una desventaja para realizar la cuantificación por C.A. La cuantificación mediante esta técnica requeriría establecer los potenciales para cada ensayo, lo cual resultaría muy trabajoso y poco práctico, por lo que en los ejemplos mencionados se optó por la técnica de V.D.P. (**figura 1.23 C y D**). Los resultados reportados mostraron que, aún para señales con corrimiento en los potenciales de pico, se determinó una relación entre la señal medida y la concentración de analito.

En lo que respecta a este trabajo de tesis la técnica elegida para llevar a cabo la detección de sustrato oxidado fue V.O.C. debido a que aporta información similar a la de V.D.P. pero con algunas ventajas. Esta técnica combina los mejores aspectos de las voltametrías de pulso. Algunas ventajas a resaltar son una gran sensibilidad para la cuantificación, la supresión de las señales de fondo y la forma de la señal, que permite observar la intensidad de corriente para cada potencial en todo el rango aplicado³⁹. En particular para el sistema estudiado fue importante poder advertir en forma directa corrimientos del potencial para así poder determinar correctamente la corriente de pico (I_p).

Se estudió la respuesta por V.O.C. para el sistema DNAzima peroxidasa con TMB como sustrato. Para ello se llevó a cabo la reacción con **Dz** y se separaron alícuotas a diferentes tiempos de reacción (1 minuto, 10 minutos y 17 minutos). Cada una de esas alícuotas se dividió en dos. Sobre una se midió directamente en el medio de reacción (levemente ácido) (**figura 3.9**). Sobre la otra se agregó H_2SO_4 para acidificar el medio antes de llevar a cabo la medición (**figura 3.10**).

Los tiempos elegidos para seguir la reacción fueron los más cortos que permitió el diseño experimental con el que se realizaron las mediciones, ya que para un biosensor es esperable una respuesta rápida.

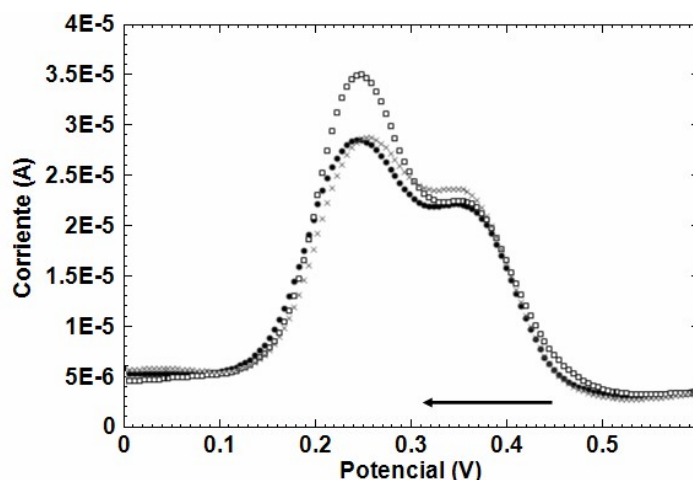


Figura 3.9: Respuestas electroquímicas por V.O.C. para la reacción con **Dz** 1 μM a distintos tiempos: 1 minuto ($\square$), 10 minutos ($\bullet$), 17 minutos ($\times$). Mediciones realizadas en medio levemente ácido sobre un mismo electrodo. La flecha horizontal indica el sentido del barrido de potencial.

Tal como se observó por V.C. para este mismo sistema (**figura 3.7**) y en el trabajo reportado por Chen *et al.* 2020 (**figura 1.23 (B)**), la señal obtenida por V.O.C presenta dos picos al barrer el potencial en sentido reductivo. Se observó que los picos no llegaron a resolverse, no fue posible identificar cada pico en forma independiente. A medida que transcurrió el tiempo se observó un aumento en la intensidad del color azul pero que no se correspondió con un aumento en la señal medida por V.O.C. por lo que esta condición de reacción no parece ser útil para cuantificar mediante la técnica de V.O.C.

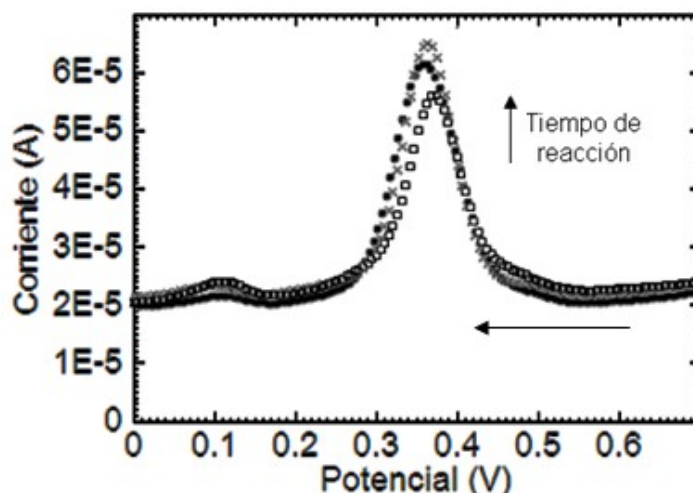


Figura 3.10: Respuestas electroquímicas por V.O.C. para la reacción con **Dz** 1 μM a distintos tiempos. Se detallan las corrientes máximas (I_p) obtenidas para cada señal 1 minuto ($\square$) $I_p = 33,9 \mu A$, 10 minutos ($\bullet$) $I_p = 41,0 \mu A$, 17 minutos ($\times$) $I_p = 43,4 \mu A$. Mediciones realizadas luego de la acidificación con H_2SO_4 sobre un mismo electrodo. La flecha horizontal indica el sentido del barrido de potencial.

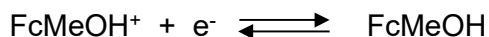
El comportamiento electroquímico de TMB_{ox} , generado tras la acidificación del producto de peroxidación por agregado de H_2SO_4 , también se correspondió, como era de esperar, por ambas técnicas V.O.C. (**figura 3.10**) y V.C. (**figura 3.8**); al realizar el barrido en sentido reductivo se obtuvo un solo pico simétrico, alto y bien definido con un máximo de intensidad de corriente a 0,35 V. La señal obtenida por V.O.C. se vio levemente incrementada con el tiempo de reacción, es decir al aumentar la concentración de TMB oxidado. A partir de estas observaciones se concluyó que la corriente de pico (I_p) parece ser un buen parámetro para llevar a cabo la detección de TMB oxidado. Es importante destacar el corrimiento de los potenciales de pico que se evidenciaron en la

señal obtenida por V.O.C. Este corrimiento, del orden de 10-50 mV, para el mismo electrodo con el mismo electrodo de referencia no puede ser despreciado y fue la causa por la que se descartó C.A. como técnica de cuantificación para este sistema mientras que la determinación por V.O.C. no se vio perjudicada. Por todo lo expuesto se decidió llevar a cabo la cuantificación electroquímica de TMB_{ox} , es decir detener la reacción por agregado de H_2SO_4 llevando el medio de reacción a $\text{pH} = 1$ por V.O.C.

Una vez establecidas las condiciones de reacción y la técnica de detección se analizaron estrategias posibles para llevar a cabo las mediciones de forma de disminuir la dispersión de las respuestas, teniendo en cuenta tanto las características del sistema como las de los electrodos serigrafiados. Se ha reportado que los electrodos serigrafiados suelen presentar algunas limitaciones; la composición de las tintas utilizadas puede afectar a la selectividad y sensibilidad de los análisis. Algunos componentes desconocidos en estas tintas podrían influir de manera impredecible en la detección y análisis. Se ha demostrado que las diferencias en la composición de la tinta por ejemplo tipo, tamaño o carga de partículas de grafito y en las condiciones de impresión y curado pueden afectar fuertemente a la transferencia electrónica y al rendimiento analítico general de los sensores⁴⁰.

Teniendo en cuenta estas limitaciones se analizó la variabilidad de las señales debida a la naturaleza de los electrodos en sí y debida a la interacción superficie del electrodo-componentes de la mezcla de reacción. Para ello se compararon las señales obtenidas para mediciones repetitivas de la especie electroactiva utilizando un único electrodo y utilizando diferentes electrodos.

Para simplificar el análisis de la variabilidad de las señales se estudiaron las posibles causas de forma separada. En primer lugar, se analizó el comportamiento de los electrodos en sí. Para eso se prescindió de la mezcla de reacción de peroxidación, utilizando ferrocenometanol (FcMeOH) como sonda electroactiva. Esta especie presenta un comportamiento electroquímico reversible, muy estudiado y bien caracterizado en diversas superficies, en particular sobre carbono, que es el caso de los electrodos serigrafiados utilizados⁴¹⁻⁴³.



Siendo que FcMeOH intercambia un solo electrón y su comportamiento electroquímico es reversible se supone que se cumplen los parámetros de reversibilidad, es decir, que el voltagrama arroje una diferencia de potencial $\Delta E_{pico} \approx 59$ mV y que la relación $I_{pa}/I_{pc} \approx 1$ (ver **Capítulo 2 sección 2.4**). Por lo tanto, cualquier desviación sería adjudicable a los electrodos en sí. Por ejemplo, corrimientos en el E_p para mediciones del mismo sistema sobre diferentes electrodos indicarían diferencias en los electrodos de pseudoreferencia. Cambios en las intensidades de pico reflejarían la no reproducibilidad de las mediciones causada por diferencias entre las superficies de los electrodos^{33,44}.

En la **tabla 3.1** se muestran los parámetros obtenidos por V.C. para alícuotas de una misma solución de FcMeOH 0,5 mM sobre 6 electrodos serigrafiados independientes: potencial de pico anódico (E_{pa}) y catódico (E_{pc}), diferencia entre potenciales ($\Delta E_p: E_{pa} - E_{pc}$), corriente de pico anódica (I_{pa}) y catódica (I_{pc}), relación entre las corrientes de pico (I_{pa}/I_{pc}). Para todos esos parámetros se calcularon los valores de promedio y desviación estándar (DS) entre los 6 electrodos, resultando $\Delta E_p: 69$ mv $\pm$ 4 mv y $I_{pa}/I_{pc}: 1,18 \pm 0,02$ lo que sugirió, comparando con los valores esperados para una cupla con comportamiento reversible que intercambia un electrón $\Delta E_{pico} \approx 59$ mV y que la relación $I_{pa}/I_{pc} \approx 1$, que el comportamiento de ferrocenometanol sobre los electrodos serigrafiados se puede aproximar a la reversibilidad. Sin embargo, se detectó una dispersión no despreciable entre electrodos, de aproximadamente el 7 %, tanto para los potenciales (E_{pc}) como para las corrientes (I_p).

Electrodo	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (mV)	I_{pa} (A)	I_{pc} (A)	I_{pa}/I_{pc}
E1	0,188	0,127	60	0,48	0,42	1,15
E2	0,188	0,117	71	0,39	0,33	1,18
E3	0,188	0,117	71	0,44	0,38	1,17
E4	0,178	0,107	70	0,47	0,39	1,21
E5	0,178	0,107	70	0,44	0,37	1,19
E6	0,188	0,117	71	0,45	0,38	1,17
Promedio	0,184	0,116	69	0,45	0,38	1,18
DS	0,005	0,008	4	0,03	0,03	0,02

Tabla 3.1: Parámetros obtenidos por V.C. (0,5 a 0 V 100 mV/s) para FcMeOH 0,5 mM sobre 6 electrodos serigrafiados independientes.

Potencial de pico anódico (E_{pa}) y catódico (E_{pc}), diferencia entre ambos potenciales (ΔE_p), corriente de pico anódica (I_{pa}) y catódica (I_{pc}) y la relación entre ambas (I_{pa}/I_{pc}). Promedio y desviación estándar (DS) para todos los parámetros.

Los resultados obtenidos por V.C. sugieren un comportamiento reversible del FcMeOH sobre la superficie de los electrodos serigrafiados, por lo tanto, la dispersión entre mediciones fue adjudicada a las variaciones entre las superficies de los electrodos. Sin embargo, teniendo en cuenta que la técnica de medición elegida para el sistema en estudio fue V.O.C., resulta interesante conocer la variabilidad de las mediciones por esta técnica, así como también los corrimientos de potencial de las I_p .

El análisis de repetitividad de la señal por V.O.C., **figura 3.11**, se llevó a cabo midiendo alícuotas de FcMeOH 0,5 mM, como sonda redox modelo, sobre 8 electrodos independientes. Sobre cada uno se realizaron 6 mediciones sucesivas de forma tal de tener información sobre la variabilidad entre electrodos y entre mediciones sobre un mismo electrodo.

Cabe aclarar que durante todo el trabajo de tesis para independizar las señales medidas del área de electrodo se informó densidad de corriente (j): corriente medida /área geométrica del electrodo de trabajo en $\mu A / mm^2$.

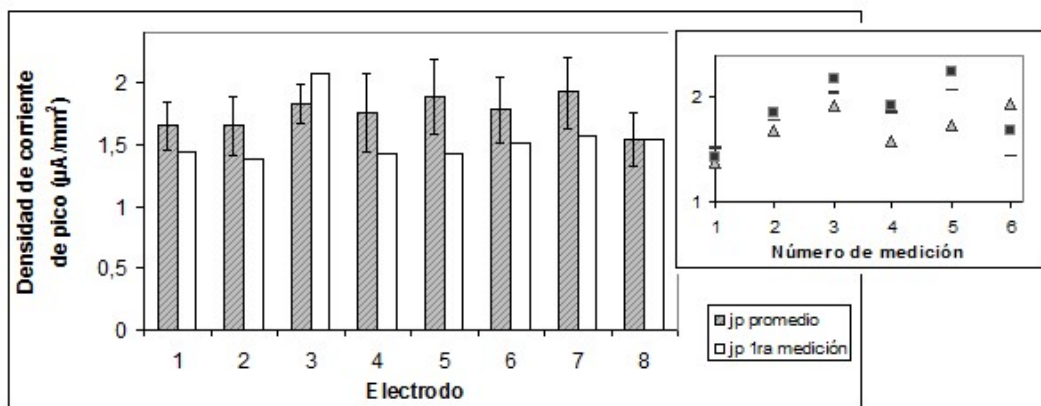


Figura 3.11: Densidad de corriente de pico (j_p), 8 electrodos independientes. Blanco: primera medición. Gris: promedio de las 6 mediciones con su barra de error (DS de las 6 repeticiones). Inserto: j_p para cada una de las mediciones de la misma solución sobre un único electrodo (se muestran las señales para 3 de los 6 electrodos), Electrodo: (Δ)1, (*)2, (-)3. V.O.C. 0,5 a 0,0 V.

Para cada electrodo se determinó el promedio de las 6 mediciones (gris) con su desviación estándar como barra de error y la primera medición sobre cada uno (blanco). El rango de los promedios se encontró entre $1,5 \mu\text{A}/\text{mm}^2$ y $1,9 \mu\text{A}/\text{mm}^2$ y las desviaciones estándar entre $0,2 \mu\text{A}/\text{mm}^2$ y $0,3 \mu\text{A}/\text{mm}^2$. Es decir, el porcentaje de variabilidad de la medición de densidad de corriente para cada electrodo (el porcentaje en que cada medición se modifica respecto a la anterior sobre un mismo electrodo) fue entre 9 % y 18 %. En cuanto a la repetitividad para la medición entre distintos electrodos, se calculó el promedio para la primera medición realizada sobre cada uno de los 8 electrodos, se obtuvo un valor de $1,5 \mu\text{A}/\text{mm}^2$ siendo el desvío estándar $0,2 \mu\text{A}/\text{mm}^2$ es decir un 14 % de variabilidad entre electrodos para las primeras mediciones. Para la mayoría de los ensayos la densidad de corriente resultó menor para el primer uso respecto del promedio de las 6 mediciones. Esto podría significar que existen interacciones entre alguno de los componentes de la solución y la superficie del electrodo. En cuanto a los potenciales de pico (E_p) en promedio fue de 0,17 V con una desviación estándar de 0,01 V tanto para repeticiones sobre un mismo electrodo como para mediciones sobre electrodos distintos. Los corrimientos de los E_p no fueron despreciables (alrededor de 10 mV) y se debieron a los electrodos intrínsecamente, no al sistema medido. Estos resultados mostraron una variabilidad no despreciable tanto para las mediciones sobre un mismo electrodo como para las mediciones entre electrodos diferentes.

En base a los resultados obtenidos se planteó una estrategia para minimizar la variabilidad entre mediciones debida a los electrodos. Esta estrategia consistió realizar una V.C. con FcMeOH como mediador redox, a modo de control, sobre los electrodos y elegir los que presentaron menor variabilidad entre ellos, es decir E_p e I_p lo mas similares posible. Realizar la medición del ensayo correspondiente y volver a controlar por V.C. con FcMeOH. Cada electrodo se reutilizó hasta que los parámetros de la V.C. (E_p , I_p) para FcMeOH se vieron modificados.

Uno de los objetivos planteados para este capítulo consiste en analizar la relación entre la cantidad de **Dz** y la señal medida por V.O.C. debida a TMB_{ox} generado. En este sentido resulta relevante establecer una relación entre la señal de corriente de pico y la concentración de la especie electroactiva⁴⁵.

Teniendo en cuenta que se comprobó la variabilidad de respuesta debida a los electrodos es indispensable poder verificar que la misma resulte despreciable frente a la señal de la especie electroactiva. Por ser el sistema **Dz/H₂O₂/TMB** complejo, y debido a que el costo de las secuencias hace menos viable realizar un número grande de mediciones, el análisis se realizó en una primera instancia utilizando FcMeOH como sonda electroactiva modelo. En la **figura 3.12** se muestra la relación entre la intensidad de señal por V.O.C. para un rango de concentraciones de FcMeOH entre 0,1 mM y 0,4 mM sobre un único electrodo que fue lavado con agua entre mediciones.

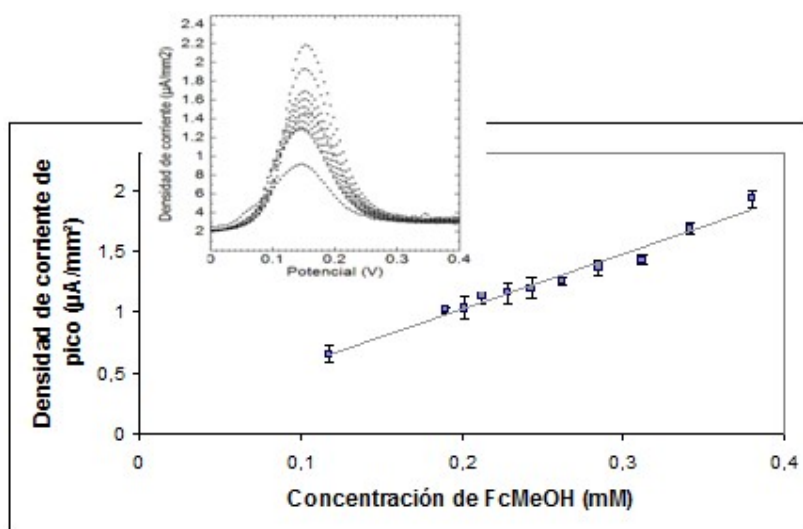


Figura 3.12: Relación entre la j_p y la concentración de FcMeOH. Inserto: señales obtenidas por V.O.C. (0,4 V a 0,0 V) para soluciones de FcMeOH de concentración entre 0,1 mM y 0,4 mM. Las barras de dispersión corresponden a duplicados. $j_p = 4,5272 [\text{FcMeOH}] + 0,1143$ ($R^2 = 0,9757$).

A partir de la **figura 3.12** se observó que la relación entre la intensidad de señal y la concentración de FcMeOH presenta tendencia lineal, al menos en el rango de concentraciones explorado, entre 0,1 mM y 0,4 mM. Este resultado confirmó que tanto los electrodos serigrafiados como la técnica electroquímica elegida fueron adecuados para la cuantificación de analitos electroactivos. La variabilidad propia de las mediciones sobre el electrodo no significó un impedimento y los resultados obtenidos pudieron ajustarse al modelo de la **ecuación 4** (ver **Capítulo 2 sección 2.4**) que establece que para un sistema con comportamiento reversible y controlado por difusión la corriente de pico

obtenida por V.O.C. se relaciona de forma directa con la concentración de la especie electroactiva.

$$I_p = n F A C_o D_o^{1/2} (\pi t)^{-1/2} \Delta\psi_p \text{ (Ecuación 4)}$$

El siguiente paso fue investigar la posibilidad de aplicar el método de cuantificación al sistema de interés, con TMB como especie electroactiva. Se analizó la relación entre la señal medida por V.O.C. y el tiempo de reacción, lo que conduce a evaluar el incremento de concentración de TMB oxidado. Se controló el electrodo por V.C. con FcMeOH (según la estrategia detallada anteriormente). Como la variabilidad entre mediciones resultó menor al 10 %, se utilizó un solo electrodo para todo el ensayo. En la **figura 3.13** se muestran las señales obtenidas por V.O.C. para el producto de reacción de peroxidación con TMB como sustrato, detenida por agregado de H₂SO₄, a distintos tiempos de reacción sobre un mismo electrodo lavando con agua entre mediciones. Cabe destacar que, a diferencia de lo que se observó en otros ensayos por V.O.C., en este en particular no se observaron corrimientos del E_p. Las señales medidas para todos los tiempos de reacción sobre el mismo electrodo presentaron I_p a 0,36 V.

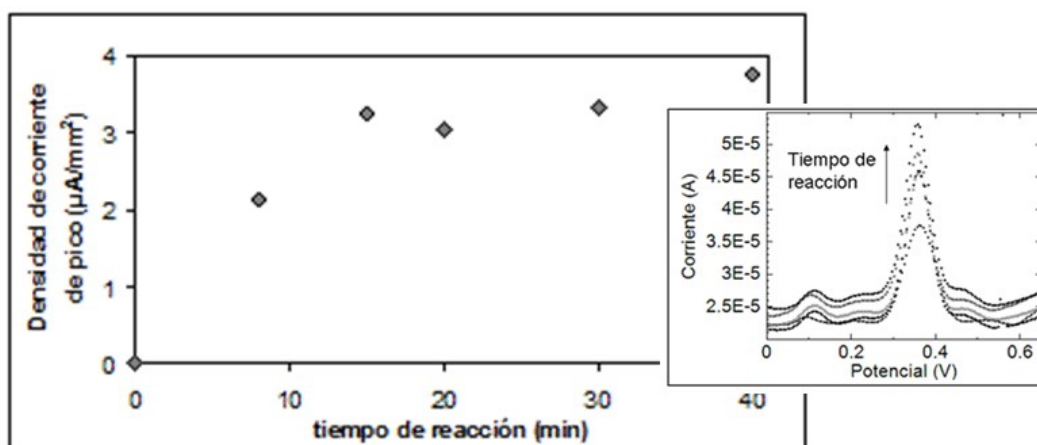


Figura 3.13: Relación entre la j_p y el tiempo de reacción de peroxidación. Inserto: señales por V.O.C para la reacción de peroxidación catalizada por DNAzima 1 μM. Se midió sobre un único electrodo (0,8 V a 0,0 V), lavando con agua entre mediciones.

La intensidad de corriente de pico se vio incrementada al inicio y hasta aproximadamente los 15 minutos de reacción. Luego alcanzó una meseta, lo que podría deberse a que la concentración de TMB oxidado generado alcanzó un máximo y luego se mantuvo constante^{11,16,18}. Sin embargo, se observó que el color de la solución siguió intensificándose en todo el rango de tiempo estudiado. Es decir, que la reacción siguió avanzando y la concentración de TMB oxidado aumentó. El hecho de que no se haya visto reflejado este aumento de concentración en la intensidad de corriente podría deberse a interacciones entre el medio de reacción y la superficie del electrodo. Es posible que esto se debiera a que algo de TMB o TMB_{ox} se hubiera adsorbido y por lo tanto a medida que se realizaron las mediciones su concentración superficial se incrementó hasta alcanzar un máximo por saturación de la superficie del electrodo.

En algunos sistemas la adsorción del analito en la superficie del electrodo representa una ventaja⁴⁶. A la cantidad de analito que llega a la superficie de forma difusional se adiciona la que se acumula por adsorción superficial, de este modo las dos contribuyen a la señal. El tiempo de interacción analito-superficie del electrodo es un factor a controlar ya que contribuye a la adsorción y afecta a la intensidad de señal medida.

Para el sistema estudiado se tiene como objetivo realizar la cuantificación de manera indirecta, determinando la concentración de **Dz** a partir de la señal de TMB oxidado generado. Si ocurriera adsorción habría que poder asegurar que la cantidad de TMB oxidado acumulada sobre los electrodos resulte uniforme independientemente del electrodo utilizado. Además, habría que tener en cuenta el efecto de la matriz de la muestra ya que alguno de sus componentes podría interferir en la adsorción de TMB afectando a la intensidad de señal medida.

Dadas estas desventajas y para simplificar la detección, se buscó evitar la adsorción de TMB sobre la superficie del electrodo. Se analizó el tipo de respuesta tanto del reactivo, TMB, como del producto, TMB_{ox}, sobre la superficie de los electrodos para encontrar las condiciones en las cuales el proceso sea controlado por difusión⁴⁷. Para ello se determinó la relación entre de la intensidad de corriente y la velocidad de barrido por V.C. (ver **Capítulo 2 sección 2.4**). La relación está dada por varios factores, entre ellos la velocidad

de reacción de la especie electroactiva sobre la superficie del electrodo, su coeficiente de difusión y las posibles reacciones acopladas en el seno de la solución⁴⁸. Para el caso de una reacción reversible, es decir que la especie reacciona rápido en la superficie del electrodo sin que ocurra adsorción, se cumple (a 298 K) la **ecuación 1** (ver **Capítulo 2 sección 2.4**)

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 \, n^{3/2} \, A \, D_R^{1/2} \, C^* \, v^{1/2} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Esto implica que, si el proceso es controlado por difusión, la corriente de pico (I_p) aumenta linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial ($v^{1/2}$)³³.

En el caso de que la sustancia oxidada se adsorba sobre el electrodo y que la reacción de reducción ocurra sobre la superficie, sin cambios apreciables de la concentración superficial durante el tiempo del ensayo, se cumple (a 298 K) la **ecuación 2** (ver **Capítulo 2 sección 2.4**)

$$I_p = 9,39 \cdot 10^5 \, n^2 \, A \, \Gamma_0 \, v \quad (\text{Ecuación 2})$$

Esto implica que, si el proceso es adsortivo, la corriente de pico varía linealmente con la velocidad de barrido de potencial (v)⁴⁹.

En primer lugar, se analizó el comportamiento de TMB sobre la superficie del electrodo. En la **figura 3.14** se muestra el efecto de la velocidad de barrido de potencial en la corriente de pico medida por V.C. para una solución de TMB 0,2 mM.

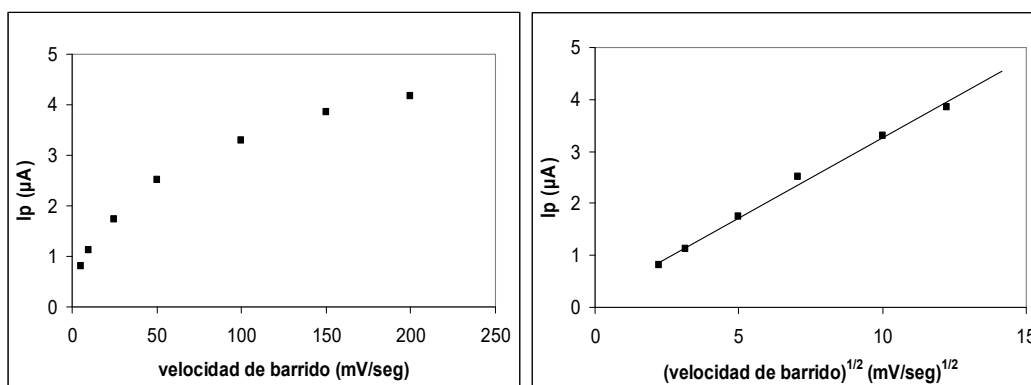


Figura 3.14: Efecto de la velocidad de barrido de potencial en la corriente de

pico (I_p). **Izquierda** vs velocidad de barrido **derecha** vs ($\text{velocidad de barrido}$)^{1/2}. Electrodo independiente. V.C. 0,4 a 0,0 V, v_{barrido} : 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 mV/s.

La relación entre la corriente de pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido resultó ser lineal, el comportamiento se ajustó mejor a la **ecuación 1**, es decir que TMB no se adsorbió de manera apreciablemente sobre los electrodos. Esto implica que el TMB en exceso, el que no se oxidó, no se adsorbe de manera significativa sobre la superficie del electrodo y por lo tanto no afecta a la independencia de las mediciones sucesivas sobre un mismo electrodo.

Siendo TMB_{ox} la sustancia a cuantificar, se evaluó su comportamiento sobre la superficie del electrodo. Por ser un producto de la reacción de peroxidación su concentración dependerá de la cantidad de DNAzima y de las condiciones del medio. Para analizar la adsorción en un amplio rango de concentraciones de TMB_{ox} se llevaron a cabo dos ensayos utilizando dos concentraciones muy diferentes de **Dz**: 0,5 μM y 5 μM , respectivamente. Por otro lado, también se tuvo en cuenta el re uso de los electrodos. Se estudió el tipo de respuesta obtenida para ambas concentraciones de **Dz** midiendo la señal de TMB_{ox} sobre un único electrodo en dos condiciones: mediciones sucesivas a distintas velocidades de barrido y mediciones a distintas velocidades de barrido lavando el electrodo con H₂SO₄ entre ellas. La **figura 3.15** muestra el efecto de la velocidad de barrido de potencial sobre la corriente de pico por V.C. para TMB_{ox} generado por catálisis con **Dz** 5 μM . **Figura 3.15 (A)** mediciones sucesivas de una misma alícuota. **Figura 3.15 (B)** Se lavó el electrodo con H₂SO₄ 1 M entre mediciones.

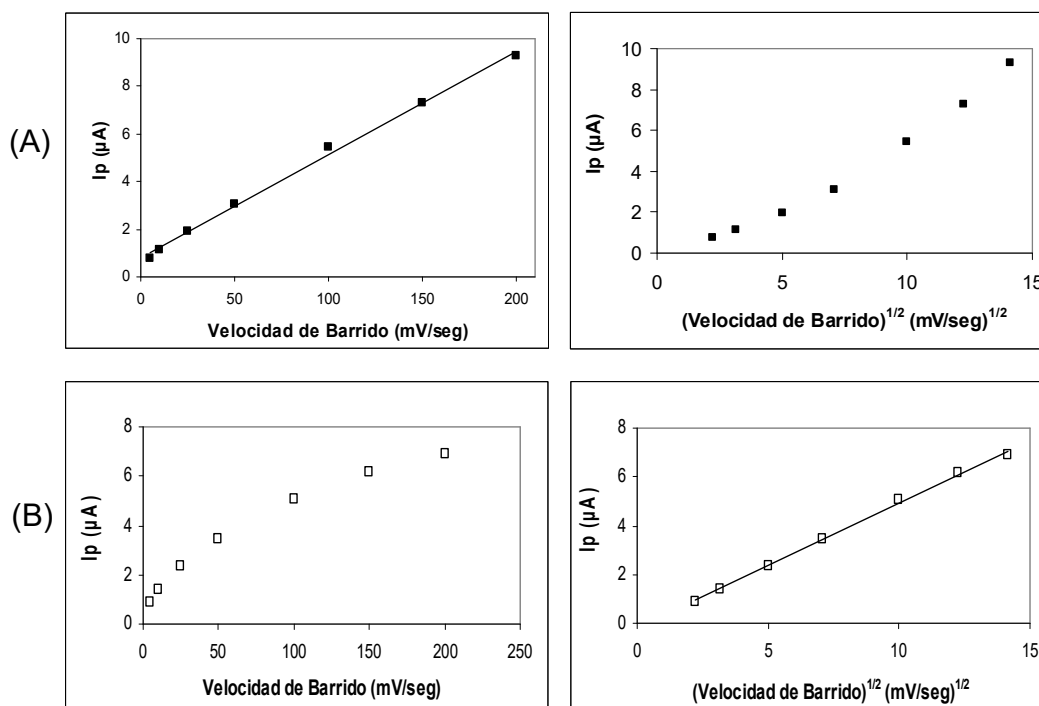


Figura 3.15: Efecto de la velocidad de barrido de potencial en la corriente de pico (I_p). **(A)** Sin lavado entre mediciones. **(B)** Lavando entre mediciones. Intensidad de corriente de pico (I_p) **izquierda** vs velocidad de barrido **derecha** vs $(\text{velocidad de barrido})^{1/2}$. **Dz** 5 μM , TMB 0,2 mM, H_2O_2 4 mM, la reacción se detuvo por agregado de H_2SO_4 a los 2 minutos de reacción, luego se midió una alícuota por V.C. 0,6 a 0,2 V. v_{barrido} : 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 mV/s.

Para el ensayo donde no se lavó el electrodo entre mediciones, **figura 3.15 (A)**, se observó una relación lineal entre la corriente de pico y la velocidad de barrido (v), tal como lo indica la **ecuación 2**, la respuesta del sistema resultó ser adsorptiva. El TMB oxidado se adsorbió sobre la superficie del electrodo y allí ocurrió el intercambio electrónico. En estas condiciones el electrodo no puede ser reutilizado, dado que la superficie no se renueva, sino que contiene residuos de TMB_{ox} adsorbido.

Como se discutió previamente, para el funcionamiento del sensor se quiere evitar el control adsorptivo. Cuando la adsorción del analito no es un proceso conocido y controlado resulta más compleja la cuantificación⁴⁶, y aún más en el caso en que la misma sea indirecta. Por lo tanto, se descartó llevar a cabo las mediciones en esta condición.

Para el ensayo donde el electrodo se lavó entre mediciones, **figura 3.15 (B)**, se observó una relación lineal entre la corriente de pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, tal como lo indica la **ecuación 1**, la respuesta resultó ser

de tipo difusional. Esto sugiere que el lavado fue eficiente para recuperar la condición inicial de la superficie, no quedó una cantidad significativa de TMB oxidado adsorbida sobre el electrodo, es decir, es posible realizar mediciones independientes sobre electrodos re usados. Además, para las condiciones del sistema estudiado, el comportamiento difusional del analito implica una cuantificación más directa y sencilla⁴⁶.

A continuación, se muestran resultados de este mismo análisis realizado para menores concentraciones de TMB oxidado, obtenidas a partir de catálisis con **Dz** de menor concentración 0,5 μM . La **figura 3.16** muestra el efecto de la velocidad de barrido de potencial sobre la corriente de pico por V.C. para TMB_{ox} , obtenido por catálisis con **Dz** 0,5 μM . **Figura 3.16 (A)** sobre una única alícuota sin enjuagar el electrodo entre mediciones. **Figura 3.16 (B)** enjuagando el electrodo con H_2SO_4 1 M entre mediciones.

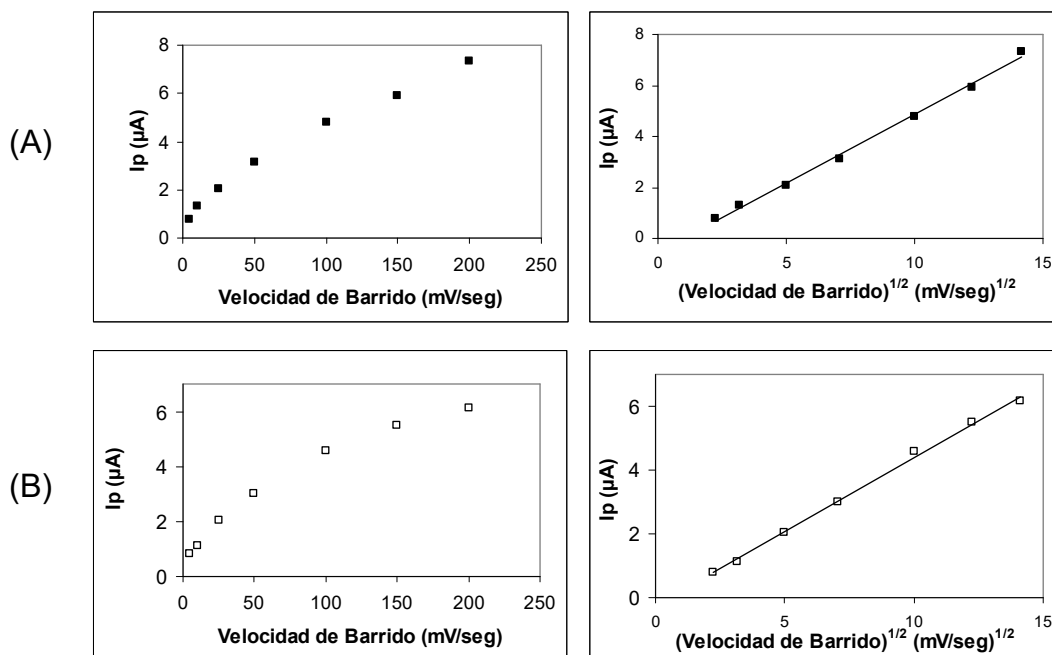


Figura 3.16: Efecto de la velocidad de barrido de potencial en la corriente de pico (I_p). **(A)** Sin lavado entre mediciones. **(B)** Lavando entre mediciones. Intensidad de corriente de pico (I_p) **izquierda** vs velocidad de barrido **derecha** (velocidad de barrido)^{1/2}. **Dz** 0,5 μM , TMB 0,2 mM, H_2O_2 4 mM, la reacción se detuvo por agregado de H_2SO_4 a los 2 minutos de reacción, luego se midió una alícuota por V.C. 0,6 a 0,2 V. v_{barrido} : 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 mV/s.

Para el ensayo donde no se lavó el electrodo entre mediciones, **figura 3.16 (A)**, se obtuvo una relación lineal entre la corriente de pico y la raíz cuadrada de la

velocidad de barrido ($v^{1/2}$) que, según la **ecuación 1** implica una respuesta difusional. Para concentraciones tan bajas de TMB oxidado generado la adsorción no afecta significativamente a la señal medida.

El ensayo donde el electrodo se lavó entre mediciones, **figura 3.16 (B)**, confirmó lo observado en los ensayos anteriores. La respuesta también resultó de tipo difusional. Al disminuir la concentración de **Dz** y por lo tanto la de TMB oxidado también se redujo su adsorción sobre la superficie del electrodo.

A partir del estudio de adsorción se concluyó que para reusar un mismo electrodo y poder asegurar independencia entre los ensayos, simplificando la determinación indirecta de **Dz**, es necesario realizar lavados con H_2SO_4 entre mediciones. De esta forma se evita la adsorción de TMB oxidado sobre la superficie del electrodo.

Para finalizar con el análisis de la medición electroquímica se estudió la factibilidad de hallar una relación entre la concentración de **Dz** y la intensidad de corriente medida por V.O.C. Para eso se realizaron reacciones de peroxidación a partir de diferentes concentraciones de **Dz** como catalizador. Teniendo en cuenta los resultados descriptos anteriormente se decidió que un electrodo puede ser reutilizado si se lo lava con H_2SO_4 entre ensayos y se lo controla por V.C. con FcMeOH entre mediciones. El electrodo se reemplazó por otro (con perfil similar determinado por V.C.) en el momento en que dos controles sucesivos por V.C. en FcMeOH dieron una diferencia de I_p mayor al 10 %. En la **figura 3.17** se muestra la señal obtenida para la reacción de peroxidación catalizada por dos concentraciones diferentes de **Dz** 0,1 y 3 μM comparada con la de un control, preparado como mezcla de reactivos sin hemina y sin **Dz**.

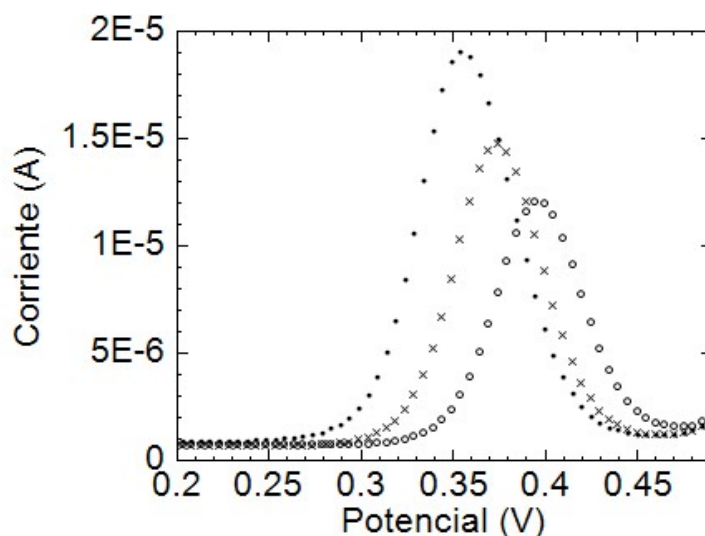


Figura 3.17: Intensidad de corriente en función del potencial para diferentes concentraciones de DNAzima. (o) Control (x) Dz 0,1 μM (*) Dz 3,0. Sobre un mismo electrodo, lavando con H₂SO₄ entre mediciones.

La señal del control resultó bastante intensa, posiblemente debido a la presencia de TMB oxidado en la mezcla o porque se generó al iniciar el barrido de potencial para llevar a cabo la medición. Se descartó que hubiera TMB oxidado en la mezcla de reacción debido a que las soluciones control eran incoloras y su absorbancia a 450 nm muy cercana a cero. Por otro lado, se observó un corrimiento significativo de los E_p entre mediciones, del orden de 50 mV. Tal como se esperaba la intensidad de la corriente de pico aumentó con la concentración de **Dz**.

Para establecer una relación entre concentración e intensidad se aumentó el número de datos del ensayo repitiendo las mediciones para otras concentraciones de **Dz** 0 μM (control), 0,1 μM; 1 μM; 2 μM y 3 μM. Para cada concentración la medición se realizó por duplicado. En la **figura 3.18** se muestra la relación entre la densidad de corriente de pico y la concentración de DNAzima.

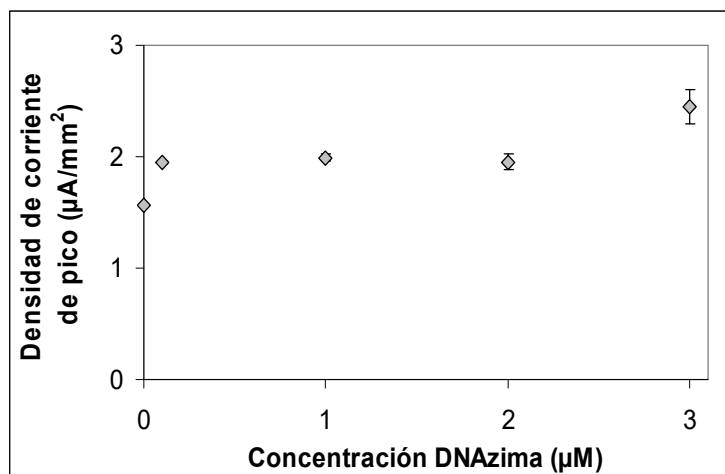


Figura 3.18: Relación entre la j_p y la concentración de **Dz**, 2 minutos de reacción. V.O.C. 0,5 V a 0,0 V. Para duplicados se utilizaron electrodos independientes.

Comparando entre duplicados con igual concentración de **Dz** las j_p resultaron similares mientras que para los E_p no se detectaron fluctuaciones. Al aumentar la concentración de **Dz** el E_p se vio modificado. En principio no se observó una clara dependencia de la j_p con la concentración de **Dz**. Esta metodología no parece ser útil para establecer una relación entre la señal medida por V.O.C. y la concentración de **Dz** en la solución. Sin embargo, no se ha tenido en cuenta el aporte a la señal por parte del ensayo control y la dispersión entre los E_p . Siendo que en los ensayos control no hay agregado de catalizador, el origen de la oxidación de TMB, y por lo tanto de las señales, tiene que ser electroquímico. Suponiendo que en todas las mezclas existe un porcentaje de TMB que es oxidado electroquímicamente y no por catálisis de DNAzima, para obtener el componente de la señal debida a la acción de la DNAzima es necesario descontar la parte de la señal debida a la oxidación electroquímica. Adicionalmente, debido a los corrimientos de los E_p entre mediciones, hay que tener en cuenta que la corriente del ensayo control a descontar es la que aparece al mismo potencial en el que el ensayo en cuestión presenta la corriente de pico. De esta forma la corriente corregida, debida exclusivamente a la oxidación de TMB por catálisis con DNAzima peroxidasa, se calculó de la siguiente manera: densidad de corriente de pico obtenida (j_p) para un ensayo (e) (por catálisis con DNAzima) menos densidad de corriente de la señal del control al potencial E_p de (e) j_{control} (en E_p). En la **figura 3.19** se muestra la

relación entre la señal determinada como $(j_p - j_{\text{control}} \text{ (en } E_p))$ “densidad de corriente corregida” y la concentración de DNAzima en la reacción.

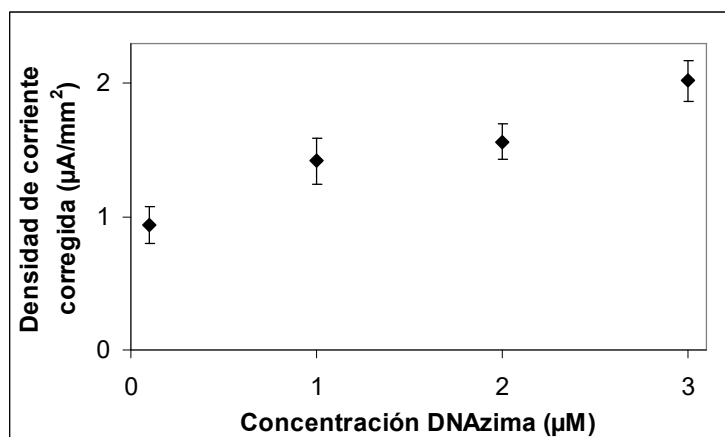


Figura 3.19: Relación entre j_p corregida y la concentración de DNAzima. Las barras de dispersión corresponden a duplicados.

$$j_{\text{corregida}}: 0,3485 [\text{Dz}] + 0,9548 \quad (R^2 = 0,9602)$$

Se observó un aumento de la intensidad de corriente de pico corregida con la concentración de DNAzima, esta relación puede ser modelada según la **ecuación 4** (ver **Capítulo 2 sección 2.4**):

$$I_p = n F A C_o D_o^{1/2} (\pi t)^{-1/2} \Delta\psi_p \text{ (ecuación 4)}$$

La relación **I_p** vs **C** se ajustó bastante bien a una recta, teniendo en cuenta la dispersión entre los electrodos y las correcciones que fue necesario hacer a la señal.

Para ensayos con igual concentración de **Dz**, es decir misma cantidad de TMB oxidado generado, midiendo sobre electrodos independientes la señal obtenida resultó similar, siendo las diferencias del orden del 10 % (barras de dispersión), que puede ser adjudicada a la variabilidad propia de los electrodos. Como desventaja de este método se observó que, aún después de la corrección, el valor de la ordenada al origen de la recta obtenida resultó muy elevado, debido a que en ausencia de catalizador igualmente se generó algo de TMB oxidado.

La relación lineal entre la concentración de DNAzima en solución y la densidad de corriente de pico se obtuvo a partir de la aplicación de la corrección de la señal. Tanto el control entre mediciones de los electrodos, a partir del análisis

del perfil electroquímico por C.V, como los lavados con H_2SO_4 entre mediciones para evitar adsorción de TMB oxidado, fueron fundamentales para disminuir la variabilidad entre señales.

3.4 Relación entre la concentración de Dz y la señal obtenida por las dos técnicas de medición.

La detección de TMB oxidado por catálisis con DNAzima peroxidasa fue desarrollada en primera instancia para métodos ópticos⁵⁰. El aumento de la intensidad de color con el avance de la reacción y con el aumento de la concentración de catalizador es fácilmente observable lo que permite realizar un análisis cualitativo, a simple vista, o cuantitativo por medición espectrofotométrica. Las determinaciones por técnicas electroquímicas implican una mayor complejidad por lo que su desarrollo comenzó más recientemente³¹. Para ambas técnicas de medición la señal obtenida, en alguna condición de reacción, resulta proporcional a la cantidad de TMB oxidado generado. Obtener una relación entre las señales medidas por dos técnicas totalmente independientes permitiría aumentar la confiabilidad del método²⁵. Además, tener dos opciones de detección aumenta la posibilidad de aplicación a diversos diseños de biosensores.

En esta sección se analiza la reproducibilidad de la relación obtenida entre la concentración de DNAzima en solución y la señal medida tanto por espectrofotometría como por V.O.C. Se estudió el comportamiento de la señal obtenida por ambas técnicas para diferentes concentraciones de **Dz** y el rango de concentraciones en el que es factible correlacionar ambas señales. La reacción se detuvo a los 2 minutos de reacción por agregado de H_2SO_4 , se midió absorbancia a 450 nm y V.O.C. Para realizar las mediciones electroquímicas se testearon los electrodos con FcMeOH por V.C. eligiendo aquellos que presentaban un perfil similar (I_p y E_p) para usarlos en un mismo experimento. Con el fin de minimizar la dispersión cada electrodo se reutilizó mientras el perfil por V.C. no se viera modificado y se lavó con H_2SO_4 entre mediciones. Para todos los ensayos se preparó un control de reactivos, sin catalizador, para tener el valor de referencia que permitió calcular la densidad de corriente corregida (Ver **figura 3.19**).

A continuación, se describen tres ensayos independientes a partir de los cuales se ajustaron los tiempos de reacción y rangos de concentración de **Dz**.

En la **figura 3.20** se muestran los resultados para la reacción de peroxidación con un rango de concentraciones de **Dz** entre 0,05 μM y 1,5 μM .

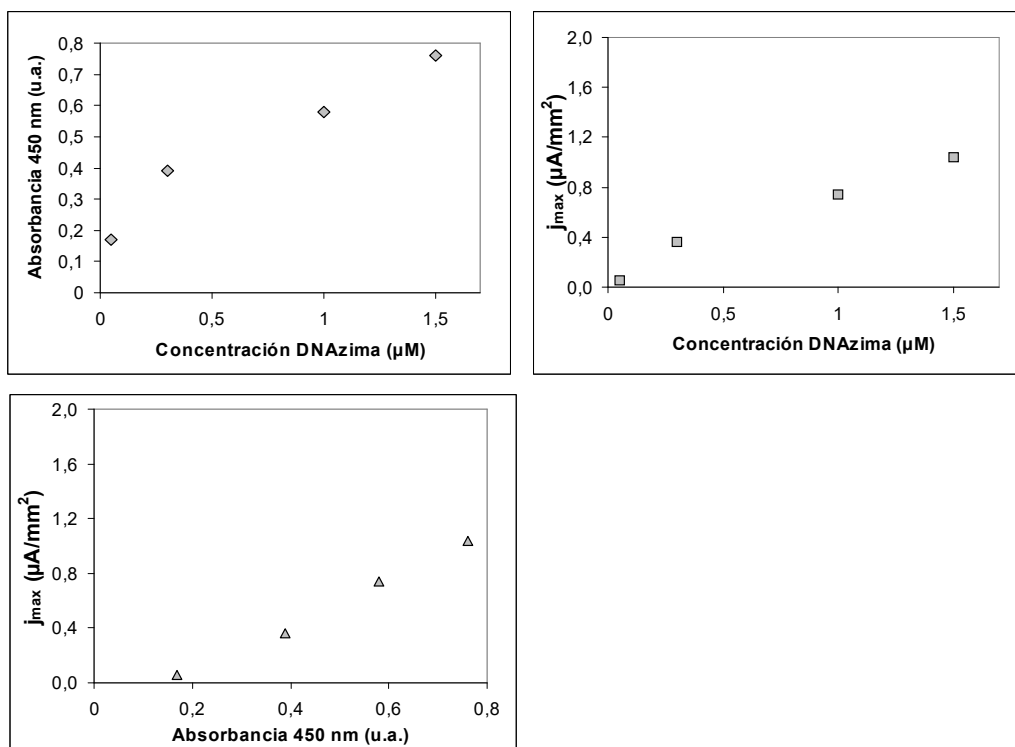


Figura 3.20: Correlación entre a) absorbancia y concentración de **Dz**. b) j_p y concentración de **Dz**. c) j_p y absorbancia.

Cabe aclarar que en este caso la absorbancia se midió en espectrofotómetro usando una cubeta clásica de 10 mm de paso óptico, por eso los valores de absorbancia obtenidos son menores a 1 u.a. Si bien los resultados se informaron como densidad de carga, para independizarlos de la superficie del electrodo de trabajo, también cabe señalar que en este caso el electrodo utilizado fue el de menor área (ES1). Las tres correlaciones analizadas resultaron lineales para el rango de concentraciones de **Dz** entre 0,05 y 1,5 μM . Para el siguiente ensayo se amplió el rango de concentraciones de **Dz** para analizar la respuesta a mayores valores, en este caso 0,01 a 6 μM . En la **figura 3.21** se muestran los resultados.

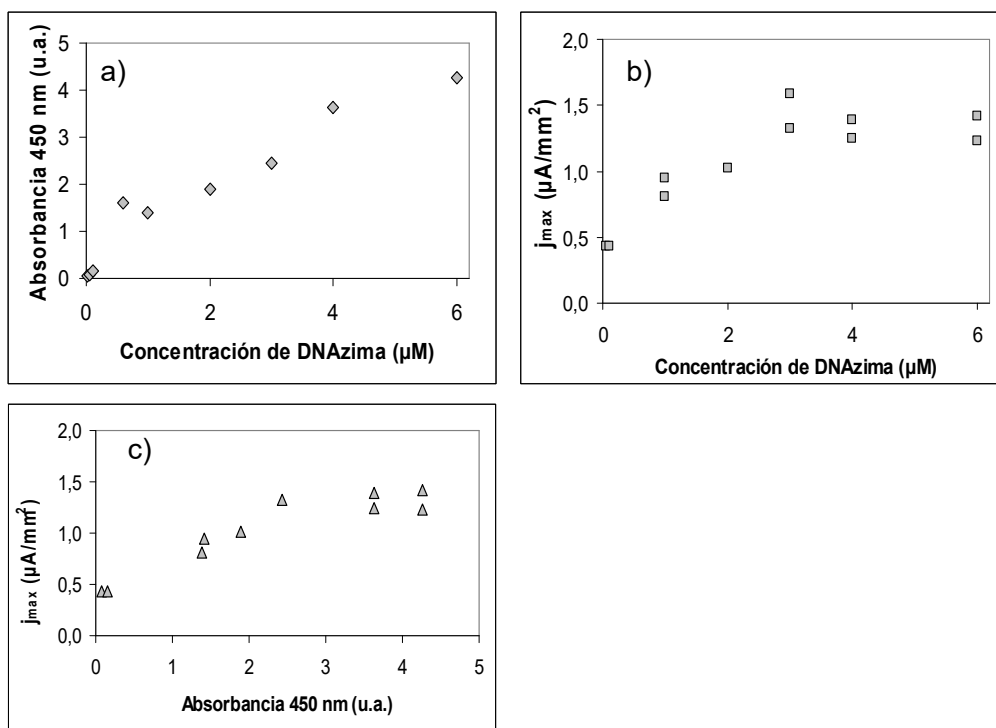


Figura 3.21: Correlación entre a) absorbancia y concentración de **Dz**. b) j_p y concentración de **Dz**. c) j_p y absorbancia.

En este caso la absorbancia se midió en espectrofotómetro NanoDrop obteniéndose valores de unidades de absorbancia mayores a los habituales (ver **Capítulo 2, sección 2.4.1**). Los electrodos utilizados, igual que en el ejemplo anterior, fueron ES1. La correlación entre la absorbancia y la concentración de **Dz** resultó lineal en todo el rango analizado. En cuanto a la relación entre la densidad de corriente y la concentración resultó lineal para concentraciones de **Dz** menores a 3 μM . Se observó que para concentraciones de **Dz** mayores la densidad de corriente se mantuvo aproximadamente constante. Como consecuencia la relación entre ambas señales, densidad de corriente vs absorbancia, también resultó lineal para un rango acotado.

La relación lineal entre la señal y la concentración se extendió hasta 3 μM para la señal electroquímica y al menos hasta 6 μM para la espectrofotométrica.

El siguiente ensayo se realizó utilizando los electrodos de área más grande ES7. El rango de concentraciones de DNAzima fue de 0,05 μM a 3 μM aumentando la cantidad de ensayos con menor concentración de **Dz** tener más información en este rango. En la **figura 3.22** se muestran los resultados obtenidos.

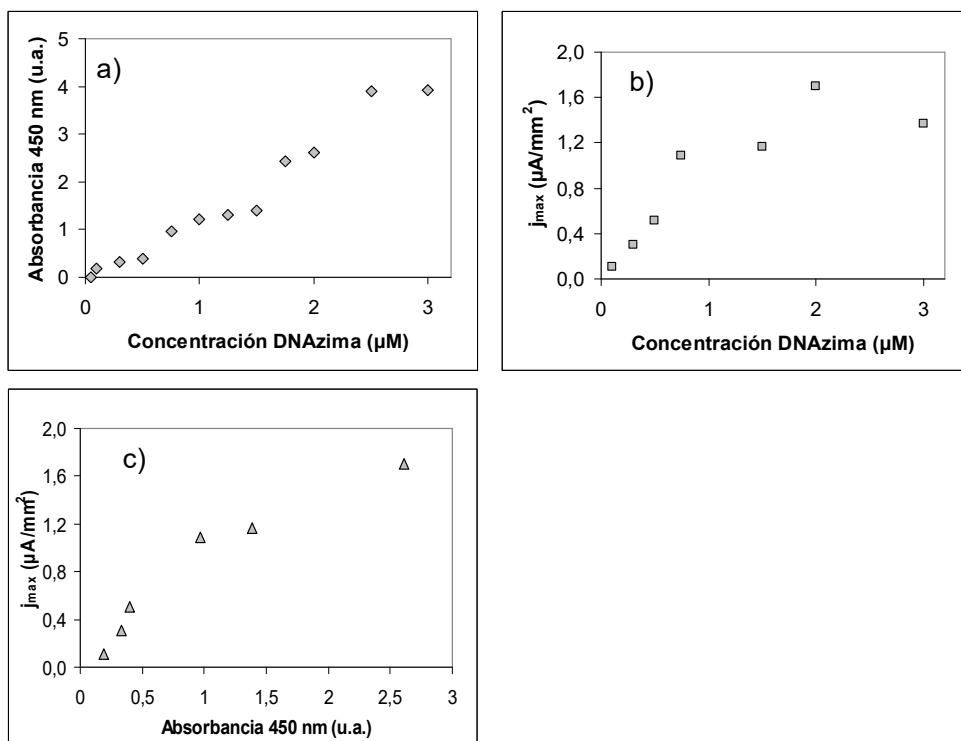


Figura 3.22: Correlación entre a) absorbancia y concentración de **Dz**. b) j_p y concentración de **Dz**. c) j_p y absorbancia.

En este caso, igual que en el anterior, la correlación entre la absorbancia y la concentración de **Dz** resultó aproximadamente lineal en el rango de concentraciones de 0,05 μM a 3 μM . La correlación entre la densidad de corriente y la concentración resultó lineal para concentraciones de **Dz** menores a 2 μM y esta linealidad se perdió para concentraciones mayores de modo similar al ensayo anterior. En cuanto a la correlación entre ambas señales se mantuvo lineal para concentraciones de **Dz** muy bajas, menores a 1 μM .

El análisis de estos resultados permitió confirmar que las señales obtenidas a partir de ambas técnicas de medición correlacionan con la concentración de **Dz** en cierto rango. Para la determinación espectrofotométrica la relación resultó lineal en todo el rango de concentraciones explorado de 0,01 μM a 6 μM . En las determinaciones por V.O.C. la señal resultó lineal para concentraciones de **Dz** menores a 2 μM , para concentraciones mayores se mantuvo casi constante. El tiempo de reacción de 2 minutos fue suficiente para detectar señal, aún para las concentraciones más bajas de **Dz** (del orden de 0,01 μM) es decir, se generó suficiente cantidad de TMB_{ox} para ser detectado en ese tiempo de reacción. En el rango de concentraciones de **Dz** 0,01 μM a 2 μM se obtuvo una

correlación lineal para las señales obtenidas mediante ambas técnicas de medición.

Teniendo en cuenta los ensayos preliminares, con el objetivo de comparar entre ensayos independientes para analizar reproducibilidad, se realizaron varias replicas de experimentos similares a los mostrados anteriormente donde se determinó la relación entre las señales medidas por espectrofotometría y V.O.C y la concentración de **Dz**.

Se preparó un control para tener el valor de referencia para la corrección de la corriente. La **figura 3.23** muestra la relación obtenida para la señal de absorbancia a 450 nm (medida en NanoDrop) en función de la concentración de DNAzima para cinco ensayos (E-1, E-2, E-3, E-4 y E-5) independientes entre sí. La **tabla 3.2** resume los resultados obtenidos para cada ensayo individual. Cada uno de estos ensayos resultó ajustarse al modelo lineal. La dispersión entre las pendientes obtenidas para cada ensayo resultó relativamente baja siendo el promedio de los valores obtenidos para las cinco pendientes 1,5 u.a/μM y su desviación estándar 0,2 u.a/μM.

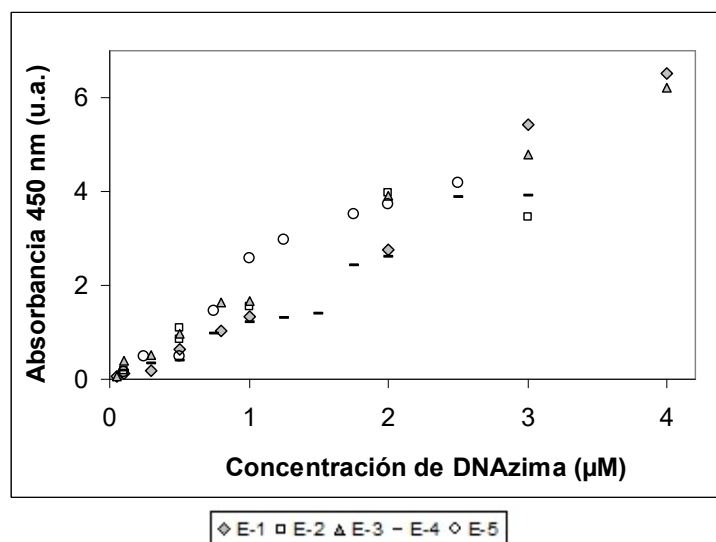


Figura 3. 23: Relación entre la absorbancia (450nm) del producto de la reacción de peroxidación y la concentración de **Dz** para cinco ensayos independientes.

ENSAYO	n	RANGO (μM)	PENDIENTE	ORDENADA	R ²
1 ^a	9	0,05 – 4,0	1,71	0,23	0,9878

2 ^a	7	0,1 – 3,0	1,26	0,36	0,8421
3 ^a	9	0,05 – 4,0	1,56	0,20	0,9868
4 ^a	12	0,05 – 3,0	1,42	-0,19	0,9621
5 ^b	9	0,1 – 2,5	1,82	0,13	0,9301

Tabla 3.2: Resultados obtenidos por ensayo individual. Se especifican, la cantidad de mediciones por ensayo (n), el rango de concentraciones de **Dz** analizado, la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de regresión lineal (R^2)^a. Los ensayos 1 a 4 se dividieron en dos alícuotas sobre una se midió absorbancia y sobre la otra electroquímica. ^b para el ensayo 5 sólo se midió absorbancia.

Al reunir todos los datos de los cinco ensayos en un mismo gráfico, **figura 3.24**, se observó un comportamiento lineal para todo el conjunto de datos. La linealidad se cumplió en todo el rango de concentraciones de DNAzima ensayado (0,05 a 4,0 μM). La pendiente de esta recta resultó ser 1,57 u.a./ μM y el coeficiente de correlación (R^2) 0,9941. Un valor aceptable para un sistema de medición indirecta que es muy dependiente de las variables experimentales y del tiempo de reacción.

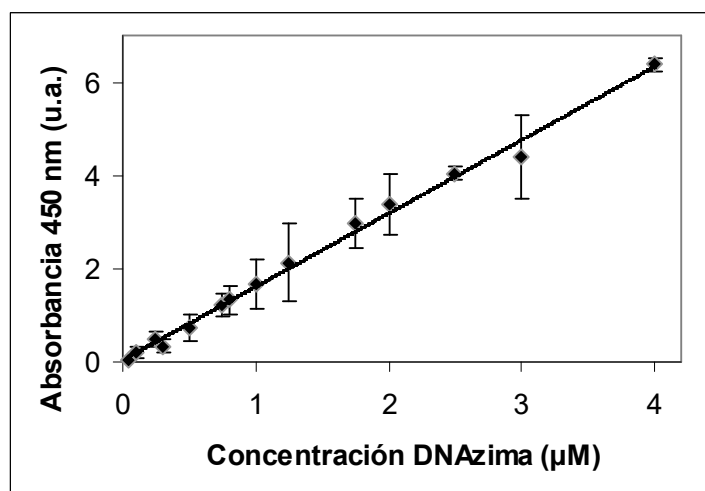


Figura 3.24: Relación entre la señal de absorbancia y la concentración de **Dz** en solución. Todos los datos de cinco ensayos independientes unificados.

Por otro lado, se analizó la respuesta obtenida a partir de la medición electroquímica. En la **figura 3.25** se muestra la relación obtenida para la señal de densidad de corriente corregida j_p en función de la concentración de Dz agregada a la solución en la reacción de peroxidación. Se muestran los

resultados de siete ensayos (E-1 a E-7) independientes entre si, y en todos los casos se utilizaron electrodos ES7.

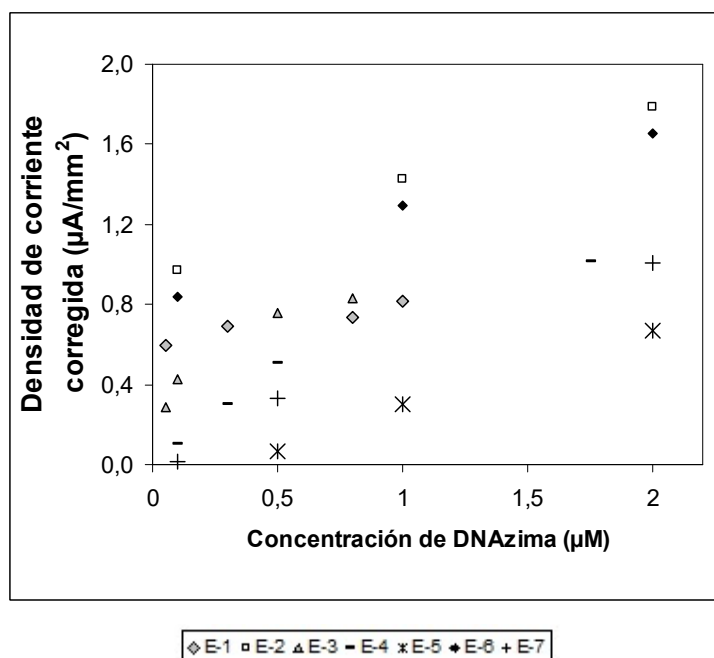


Figura 3.25: Relación entre la densidad de corriente corregida y la concentración de **Dz** para siete experimentos totalmente independientes.

La **tabla 3.3** reúne los resultados obtenidos para cada ensayo individual. Cada ensayo se ajustó razonablemente al modelo lineal. Sin embargo, la dispersión entre las pendientes obtenidas no fue despreciable siendo el promedio de los valores obtenidos para las siete pendientes ($0,4 \mu\text{A}/\text{mm}^2 \mu\text{M}$) y su desviación estándar ($0,2 \mu\text{A}/\text{mm}^2 \mu\text{M}$). Si bien cada ensayo individual mostró una correlación lineal entre la señal electroquímica obtenida y la concentración de **Dz**, al unificar los valores de todos los ensayos la relación no se mantuvo. Esta dispersión podría atribuirse a la variabilidad entre los electrodos que se usaron en cada ensayo. También hay que tener en cuenta que las señales que se comparan son las corregidas, restando la señal del blanco, y que este procedimiento podría estar introduciendo errores y aumentando la incertidumbre.

ENSAYO	n	RANGO (μM)	PENDIENTE	ORDENADA	R ²

1 ^a	4	0,05 – 1,0	0,20	0,60	0,9327
2 ^a	4	0,1 – 2,0	0,43	0,95	0,9911
3 ^a	4	0,05 – 0,80	0,70	0,32	0,9128
4 ^a	4	0,10 – 1,75	0,51	0,14	0,9549
5 ^b	4	0,5 – 2,0	0,40	-0,12	0,9965
6 ^b	4	0,1 – 2,0	0,43	0,82	0,9904
7 ^b	3	0,1 – 2,0	0,50	0,01	0,9852

Tabla 3.3: Resultados obtenidos por ensayo individual. Se especifican, la cantidad de mediciones por ensayo (n), el rango de concentraciones de **Dz** analizado, la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de regresión lineal (R^2). ^aLos ensayos 1 a 4 se dividieron en dos alícuotas sobre una se midió absorbancia y sobre la otra electroquímica. ^b para los ensayos 5 a 7 sólo se realizó la medición electroquímica.

Los ensayos 1 a 4 permitieron comparar la respuesta obtenida por ambas técnicas. Al igual que lo mostrado al principio de esta sección para los tres ensayos individuales la concentración máxima de **Dz** para la que se obtuvo respuesta lineal fue menor para el caso de medición electroquímica que para la espectrofotométrica. Para las señales electroquímicas obtenidas a partir de concentraciones de **Dz** mayores a 2 μM se observó pérdida de la linealidad. La dispersión entre los resultados obtenidos para ensayos independientes resultó ser tan grande que no fue posible realizar un análisis conjunto. En estas condiciones no fue posible hallar una relación entre la señal electroquímica y la concentración de **Dz**. Para la señal espectrofotométrica sí fue posible hallar una relación con la concentración y resultó ser de tipo lineal:

$$\text{Señal medida} = 1,5726 [\text{Dz}] + 0,0453$$

Con un coeficiente de correlación lineal de 0,9941 para el rango de concentraciones de **Dz** entre 0,05 μM y 4,0 μM .

A partir de todas las observaciones realizadas durante el trabajo experimental, puntualmente por el análisis realizado en esta última parte, se concluyó que la determinación de la señal electroquímica resultó muy compleja. Fue necesario elegir, controlar y lavar los electrodos de modo de poder asegurar perfiles electroquímicos similares, aun así, la variabilidad de señales entre ensayos

independientes resultó muy grande. Para la medición espectrofotométrica, en cambio, si se pudieron optimizar las condiciones de reacción y pudo establecerse una relación entre la señal medida y la concentración de **Dz**. Se decidió dejar de lado la medición electroquímica y continuar con el estudio del funcionamiento de DNAzima peroxidasa en fase heterogénea y de la construcción de una fase de reconocimiento aplicable a genosensores utilizando exclusivamente detección espectrofotométrica.

3.5 Bibliografía

1. Li, X. *et al.* A Both-End Blocked Peroxidase-Mimicking DNAzyme for Low-Background Chemiluminescent Sensing of miRNA. *ACS Sensors* **2**, 810–816 (2017).
2. Chiorcea-Paquim, A. M. & Oliveira-Brett, A. M. Guanine quadruplex electrochemical aptasensors. *Chemosensors* **4**, (2016).
3. Zhang, S., Bi, S. & Song, X. *Nucleic acid amplification strategies for biosensing, bioimaging and biomedicine. Nucleic Acid Amplification Strategies for Biosensing, Bioimaging and Biomedicine* (Springer Singapore, 2019). doi:10.1007/978-981-13-7044-1.
4. Kosman, J. & Juskowiak, B. Peroxidase-mimicking DNAzymes for biosensing applications: A review. *Anal. Chim. Acta* **707**, 7–17 (2011).
5. Kosman, J. & Juskowiak, B. Bioanalytical Application of Peroxidase- Mimicking DNAzymes: Status and Challenges. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* (2017) doi:10.1007/10_2017_7.
6. Stefan, L., Denat, F. & Monchaud, D. Insights into how nucleotide supplements enhance the peroxidase-mimicking DNAzyme activity of the G-quadruplex / hemin system. **40**, 8759–8772 (2012).
7. Nakayama, S. & Sintim, H. O. *Analytica Chimica Acta Investigating the interactions between cations , peroxidation substrates and G-quadruplex topology in DNAzyme peroxidation reactions using statistical testing. Anal. Chim. Acta* **747**, 1–6 (2012).
8. Travascio, P., Li, Y. & Sen, D. DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin complex. *Chem. Biol.* **5**, 505–517 (1998).
9. Longinotti, G., Ybarra, G. & Montserrat, J. Optical and electrochemical detection of a verotoxigenic E. coli gene using DNAzyme-labeled stem-loops. *J. Electrochem. Sci. Eng.* **7**, 193–200 (2017).
10. Dellafiore, M. A., Montserrat, J. M. & Iribarren, A. M. Exploring the use of a guanine-rich catalytic DNA for sulfoxide preparation. *PLoS One* **10**, 1–11 (2015).
11. Wang, Z., Zhao, J., Bao, J. & Dai, Z. Construction of Metal-Ion-Free G □ quadruplex-Hemin DNAzyme and Its Application in S1 Nuclease Detection. (2016) doi:10.1021/acsami.5b10165.
12. Freage, L. *et al.* Addressing, Amplifying and Switching DNAzyme Functions by Electrochemically Triggered Release of Metal Ions. *Chem. Sci.* (2015) doi:10.1039/b000000x.
13. Zhang, Y., Li, B. & Jin, Y. Label-free fluorescent detection of thrombin using G-quadruplex-based DNAzyme as sensing platform. *Analyst* **136**, 3268–3273 (2011).
14. Li, B., Du, Y., Li, T. & Dong, S. Investigation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as colorimetric substrate for a peroxidatic DNAzyme. *Anal. Chim. Acta* **651**, 234–240 (2009).
15. Qi, C. *et al.* Activity enhancement of G-quadruplex/hemin DNAzyme by spermine. *RSC Adv.* **4**, 1441–1448 (2014).
16. Deng, M., Zhang, D., Zhou, Y. & Zhou, X. Highly effective colorimetric and visual detection of nucleic acids using an asymmetrically split peroxidase DNAzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13095–13102 (2008).
17. Jiang, X. *et al.* G-quadruplex DNA biosensor for detection of genetically modified food. *Talanta* (2014) doi:10.1016/j.talanta.2014.05.002.
18. Lu, N., Shao, C. & Deng, Z. Rational design of an optical adenosine sensor by conjugating a DNA aptamer with split DNAzyme halves w. 6161–6163 (2008) doi:10.1039/b810812a.
19. Fu, R., Li, T., Lee, S. S. & Park, H. G. DNAzyme Molecular Beacon Probes for Detection of Nucleic Acids. **83**, 494–500 (2011).
20. Kosman, J. & Juskowiak, B. Optimization study of the catalytic activity of DNAzymes based on telomeric G-quadruplexes. **10**, 368–372 (2012).
21. Childs, B. R. E. & Bardsley, W. G. The Steady-State Kinetics of Peroxidase with 2,2'-Azino-di-(3-ethyl- benzthiazoline-6-sulphonic acid) as Chromogen. *Biochem. J.* **145**, 93–103 (1975).
22. Tao, L., Shaojun, D. & Erkang, W. G-Quadruplex aptamers with peroxidase-like DNAzyme functions: Which the best and how does it work? *Chem. - An Asian J.* **4**, 918–922 (2009).
23. Josephy, D., Eling, T. & Mason, R. The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'- Tetramethylbenzidine. *J. Biol. Chem.* **257**, 3669–3675 (1982).

24. Gu, S., Risse, S., Lu, Y. & Ballauff, M. Mechanism of the oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine catalyzed by peroxidase-like Pt nanoparticles immobilized in spherical polyelectrolyte brushes: A kinetic study. *ChemPhysChem* doi:10.1002/cphc.201901087.
25. Crew, A., Alford, C., Cowell, D. C. C. & Hart, J. P. Development of a novel electrochemical immuno-assay using a screen printed electrode for the determination of secretory immunoglobulin A in human sweat. *Electrochim. Acta* **52**, 5232–5237 (2007).
26. Flores, E. B. VOLTAMETRIA CICLICA: LA ESPECTROSCOPIA ELECTROQUIMICA PARTE I. *Rev. Química - Pontif. Univ. Católica del Perú* **IX**, 165–172 (1995).
27. Dellafiore, M. A., Montserrat, J. M. & Iribarren, A. M. Exploring the use of a guanine-rich catalytic DNA for sulfoxide preparation. *PLoS One* **10**, (2015).
28. Bos, E. S., van der Doelen, A. A., van Rooy, N. & Schuurs, A. H. W. M. 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine As An Ames Test Negative Chromogen For Horse-Radish Peroxidase In Enzyme-Immunoassay. *J. Immunoassay* **2**, 187–204 (1981).
29. Gulaboski, R., Mirčeski, V. & Mitrev, S. Development of a rapid and simple voltammetric method to determine total antioxidative capacity of edible oils. *Food Chem.* **138**, 116–121 (2013).
30. Liu, M., Zhang, Y., Chen, Y., Xie, Q. & Yao, S. EQCM and in situ FTIR spectroelectrochemistry study on the electrochemical oxidation of TMB and the effect of large-sized anions. *J. Electroanal. Chem.* **622**, 184–192 (2008).
31. Chen, J. *et al.* ChemComm An ultrasensitive electrochemical biosensor for detection of DNA species related to oral cancer based on nuclease-assisted target recycling and amplification of DNAzyme w. 8004–8006 (2011) doi:10.1039/c1cc11929j.
32. Zhang, X. *et al.* An ultrasensitive label-free electrochemical biosensor for microRNA-21 detection based on a 2'-O-methyl modified DNAzyme and duplex-specific nuclease assisted target recycling. *Chem. Commun.* **50**, 12375–12377 (2014).
33. Fanjul-Bolado, P., González-García, M. B. & Costa-García, A. Amperometric detection in TMB/HRP-based assays. *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, 297–302 (2005).
34. Rackus, D. G., Shamsi, M. H. & Wheeler, A. R. Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 5320–5340 (2015).
35. Yuan, Y. *et al.* A signal cascade amplification strategy based on RT-PCR triggering of a G-quadruplex DNAzyme for a novel electrochemical detection of viable: *Cronobacter sakazakii*. *Analyst* **145**, 4477–4483 (2020).
36. Chen, Ss. C., Chen, K. T. & Jou, A. F. J. Polydopamine-gold composite-based electrochemical biosensor using dual-amplification strategy for detecting pancreatic cancer-associated microRNA. *Biosens. Bioelectron.* **173**, 112815 (2021).
37. Shi, L. *et al.* A label-free hemin/G-quadruplex DNAzyme biosensor developed on electrochemically modified electrodes for detection of a HBV DNA segment. *RSC Adv.* **5**, 11541–11548 (2015).
38. Yu, Y. *et al.* Ultrasensitive electrochemical detection of avian influenza A (H7N9) virus DNA based on isothermal exponential amplification coupled with hybridization chain reaction of DNAzyme nanowires. *Biosens. Bioelectron.* **64**, 566–571 (2015).
39. Electrochemical methods. Fundamentals and applications. 2da edición. (2001) Bard, Allen J., Faulkner, Larry R. Capítulo 7. ISBN: 0-471-04372-9. 202–210.
40. Taleat, Z., Khoshroo, A. & Mazloun-Ardakani, M. Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013). *Microchim. Acta* **181**, 865–891 (2014).
41. Harris, A. R. *et al.* Efficient strategy for quality control of screen-printed carbon ink disposable sensor electrodes based on simultaneous evaluation of resistance, capacitance and Faradaic current by Fourier transform AC voltammetry. *J. Solid State Electrochem.* **12**, 1301–1315 (2008).
42. Cannes, C., Kanoufi, F. & Bard, A. J. Cyclic voltammetry and scanning electrochemical microscopy of ferrocenemethanol at monolayer and bilayer-modified gold electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **547**, 83–91 (2003).
43. Dauphin-Ducharme, P. *et al.* Simulation-Based Approach to Determining Electron Transfer Rates Using Square-Wave Voltammetry. *Langmuir* **33**, 4407–4413 (2017).
44. Wang, J., Tian, B., Nascimento, V. B. & Angnes, L. Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. *Electrochim. Acta* **43**, 3459–3465 (1998).
45. Kadara, R. O., Jenkinson, N. & Banks, C. E. Screen printed recessed microelectrode arrays. *Sensors Actuators, B Chem.* **142**, 342–346 (2009).

46. Electrochemical methods. Fundamentals and applications. 2da edición. (2001) Bard, Allen J., Faulkner, Larry R. Capítulo 14. ISBN: 0-471-04372-9.
47. Wopschall, R. H. & Shain, I. Effects of Adsorption of Electroactive Species in Stationary Electrode Polarography. *Anal. Chem.* **39**, 1514–1527 (1967).
48. Nicholson, R. S. & Shain, I. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. *Anal. Chem.* **36**, 706–723 (1964).
49. Arvand, M. & Dehsaraei, M. A simple and efficient electrochemical sensor for folic acid determination in human blood plasma based on gold nanoparticles-modified carbon paste electrode. *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 3474–3480 (2013).
50. Kosman, J. & Juskowiak, B. Peroxidase-mimicking DNAzymes for biosensing applications: A review. *Analytica Chimica Acta* vol. 707 7–17 at <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.050> (2011).

Capítulo 4

DNAzima peroxidasa inmovilizada

4.1 Introducción

En el capítulo anterior se analizó la DNAzima peroxidasa de secuencia *PW17* como catalizador en fase homogénea, en este capítulo se presentan los resultados del estudio del funcionamiento de esa misma secuencia en fase heterogénea, es decir, inmovilizada sobre una superficie sólida, como paso previo al estudio de una fase de biorreconocimiento aplicable a genosensores (ver **capítulo 5**).

La inmovilización de secuencias oligonucleotídicas es un tema bien conocido y se utiliza en diferentes aplicaciones. Las secuencias modificadas se comercializan con una amplia variedad de grupos funcionales que posibilitan la interacción con diferentes superficies. Sin embargo, la inmovilización de la DNAzima peroxidasa y el estudio de su funcionamiento son temas de investigación novedosos que se encuentran en etapa de ensayo y perfeccionamiento¹⁻³.

Se ha reportado que la inmovilización de secuencias no afecta a la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa (siempre y cuando el soporte no sea capaz de adsorber hemina). Esta es una de las ventajas que poseen las secuencias de ADN frente a las enzimas ya que estas últimas pueden perder actividad catalítica al ser inmovilizadas, debido a cambios conformacionales^{4,5}.

En este trabajo se estudiaron dos tipos de superficies como soporte para la inmovilización de DNAzima peroxidasa: partículas magnéticas comerciales modificadas superficialmente con estreptavidina y superficies de oro policristalino. Para llevar a cabo la inmovilización sobre las partículas magnéticas se utilizó la secuencia *PW17* modificada con biotina en el extremo 5' (**B-Dz**) (ver **Capítulo 2, sección 2.2**). La interacción biotina-estreptavidina es una de las interacciones biológicas más fuertes, siendo su constante de disociación pequeña, aproximadamente 10^{-14} mol/L⁶, lo que resulta en una unión estable. Para la inmovilización sobre superficies de oro la secuencia *PW17* fue modificada con disulfuro S-S-C6 en el extremo 5' (**T-Dz**) (ver **Capítulo 2, sección 2.2**). La inmovilización de secuencias oligonucleotídicas

por interacción azufre-oro (S-Au) ha sido muy utilizada y son bien conocidos los factores que posibilitan tanto el cubrimiento superficial como su ordenamiento⁷. Las características tanto de las partículas magnéticas como las del oro hacen que sean compatibles con el sistema estudiado. Las partículas magnéticas permiten tener la secuencia sc-ADN inmovilizada y separarla fácilmente de la solución sobrenadante por imantación. Además su tamaño reducido permite llevar a cabo la reacción en volúmenes pequeños de suspensión⁸⁻¹². Las superficies de oro son muy resistentes y permiten el armado controlado de monocapas bien ordenadas y estables lo que habilita a agregar o quitar soluciones sin afectar a la construcción¹³⁻¹⁵.

Este trabajo busca aportar conocimiento al estudio del funcionamiento de la DNAzima peroxidasa inmovilizada partiendo de la experiencia previa en fase homogénea y de las condiciones reportadas en los trabajos publicados hasta el momento. Los objetivos específicos desarrollados en este capítulo consisten en analizar y optimizar el funcionamiento de la DNAzima peroxidasa en fase heterogénea:

1. inmovilizada sobre partículas magnéticas, e
2. inmovilizada sobre soportes de oro.

4.2 Secuencia *PW17* inmovilizada sobre partículas magnéticas

Las partículas magnéticas se comercializan para ser utilizadas en técnicas rutinarias de biología molecular, con el fin de aislar secuencias de ADN simple cadena. Sin embargo, en este caso se utilizaron como superficie de inmovilización para llevar a cabo la reacción de peroxidación. En principio se siguió el protocolo de inmovilización indicado por los fabricantes, pero fue necesario realizar ajustes para los propósitos específicos que requirió este trabajo. En la **figura 4.1** se esquematiza la inmovilización seguida de la reacción de peroxidación. La inmovilización se llevó a cabo por agregado de una solución de **B-Dz** de concentración conocida sobre un volumen determinado de suspensión de partículas magnéticas, teniendo en cuenta la cantidad máxima de oligonucleótido que admiten las partículas informada por cada fabricante. El exceso de secuencia, no inmovilizada, se eliminó por lavado con *buffer* (según indicación del fabricante) separando las partículas por imantación. Para permitir la formación de estructura cuarteto de G y activar la

funcionalidad DNAzima se agregó hemina (en medio conteniendo ión K^+ y pH adecuado) y se repitió el lavado para eliminar el exceso de hemina. La reacción de peroxidación se llevó a cabo agregando los reactivos, TMB y H_2O_2 , a la suspensión de partículas modificadas con **B-Dz** y hemina. Finalmente se separaron las partículas por imantación y se midió absorbancia a 370 nm.

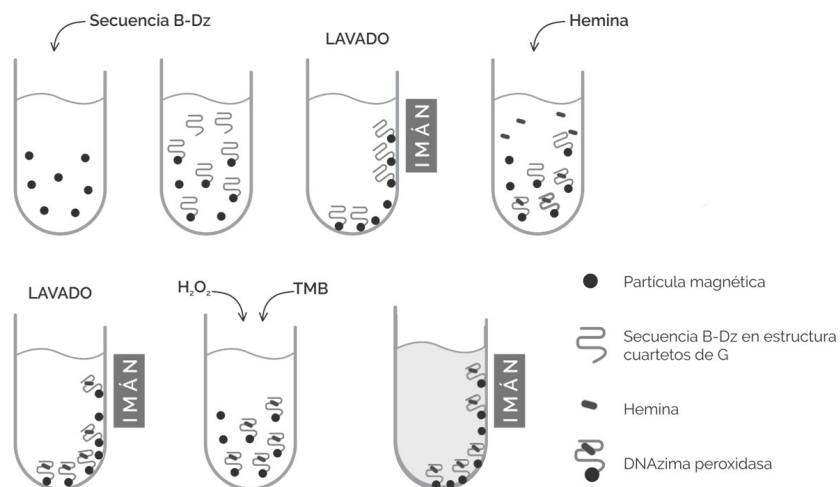


Figura 4.1: Esquema de las etapas de la reacción en fase heterogénea: agregado de **B-Dz** sobre la suspensión de partículas magnéticas, separación por imantación y lavado para eliminar **B-Dz** no inmovilizadas, agregado de hemina (activación de funcionalidad DNAzima), separación por imantación y lavado para eliminar el exceso de hemina, agregado de reactivos para la reacción de peroxidación (TMB y H_2O_2), separación de las partículas por imantación y medición de absorbancia en el sobrenadante a 370 nm.

Como punto de partida para analizar la reacción de peroxidación en fase heterogénea sobre partículas magnéticas se ensayaron las mismas condiciones experimentales que las utilizadas para llevar a cabo la reacción en solución (**Capítulo 3**). La reacción se llevó a cabo en un medio conteniendo buffer H y buffer C (ver **Capítulo 2**), con la concentración de iones y de detergente iónico necesarias para favorecer la formación de estructuras cuarteto de G a pH = 5. Para la detección del producto de reacción se separaron las partículas por magnetización y se midió absorbancia a 370 nm, sin acidificar el medio, respetando las condiciones declaradas que establecen un rango de pH entre 5 y 9¹⁶. Las partículas, por ser de color oscuro, impiden la visualización del avance de reacción a simple vista. Para los ensayos exploratorios fue necesario separar alícuotas del sobrenadante a distintos

tiempos de reacción, lo que permitió observar la intensidad de color y por lo tanto estimar el avance de reacción.

4.2.1 Ensayos exploratorios

Se analizó el funcionamiento de la DNAzima inmovilizada sobre partículas magnéticas de dos marcas comerciales diferentes: “*Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles Z5481*” Promega (partículas **P**) y “*Dynabeads M-280 streptavidin*” Invitrogen (partículas **I**) (ver sus características en el **Capítulo 2, sección 2.2**). La composición exacta de las partículas magnéticas recubiertas por estreptavidina no fue informada por ninguno de los dos fabricantes por lo que no pudo determinarse *a priori* si alguna presentaba mejores propiedades para llevar a cabo la reacción de peroxidación con DNAzima como catalizador en fase heterogénea. Para ello se llevó a cabo la reacción sobre ambos tipos de partículas y se compararon las señales generadas por la reacción de peroxidación catalizada por DNAzima y por controles sin **B-Dz** pero con hemina. Se inmovilizó 0,3 nmol sobre las partículas **P** y 0,3 nmol sobre las partículas **I** y se agregó 0,3 nmol de hemina para permitir la formación de DNAzima. Teniendo en cuenta las posibles interacciones entre la hemina y la superficie de las partículas también se realizaron ensayos control; para ello se agregó 0,3 nmol de hemina sobre sendas porciones de cada marca de partículas magnéticas. Se compararon las señales obtenidas por catálisis heterogénea con DNAzima inmovilizada sobre partículas **P** y sobre partículas **I** con las señales obtenidas por los controles sin DNAzima pero con hemina. Se llevó a cabo la reacción, midiendo absorbancia a 370 nm a diferentes tiempos. En la **figura 4.2** se muestra la señal obtenida para cada ensayo a los 2 minutos de reacción.

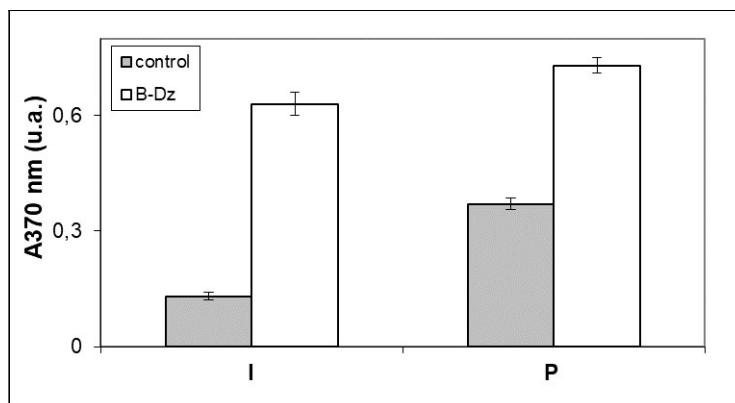


Figura 4. 2: Comparación de la señal obtenida por catálisis heterogénea a los 2 minutos de reacción para DNAzima inmovilizada sobre partículas **I** y sobre partículas **P** (blanco) y para los respectivos controles (gris). Las barras de dispersión corresponden a duplicados.

Las señales de absorbancia para DNAzima inmovilizada sobre ambos tipos de partículas magnéticas resultaron similares. La señal del control resultó menos intensa para las partículas **I**. Esta diferencia de intensidad de señal entre los controles de ambas marcas fue decisiva al momento de elegir las partículas para los siguientes ensayos. Como los controles solamente contenían partículas y hemina una señal más intensa se puede interpretar como que o bien las partículas son capaces de catalizar la reacción de peroxidación o bien retienen hemina que cataliza la reacción de peroxidación. Cualquiera sea el caso cuanto menor sea la señal de los controles menor será la interferencia del soporte.

Por otro lado, al comparar las características físicas de los sistemas se observó que, tras ser imantadas, las partículas de **I** se separaban mejor del sobrenadante y se aglomeraban menos que las de **P**. Por estos motivos se decidió realizar los siguientes ensayos utilizando partículas **I**.

Una vez elegido el soporte de inmovilización se comparó el funcionamiento de la secuencia **B-Dz** inmovilizada con el de **Dz** en solución (ya analizado **Capítulo 3**) de modo de tener una referencia conocida. En ambos casos se utilizó 0,1 nmol de **B-Dz**, la reacción de peroxidación se llevó a cabo en un volumen final de 100 μ L y se midió absorbancia para distintos tiempos de reacción. En la **figura 4.3** se muestran los resultados obtenidos.

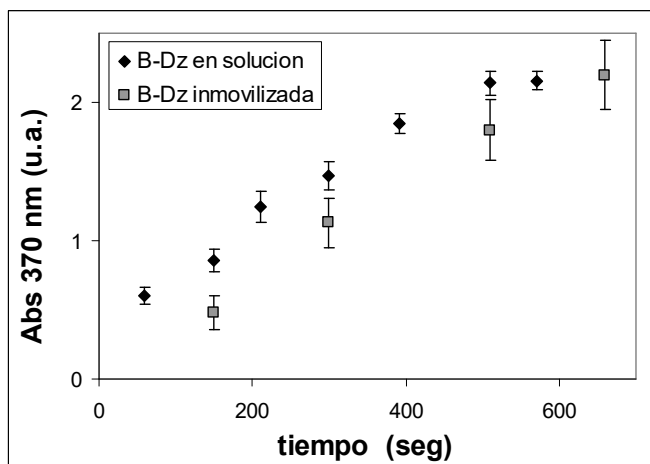


Figura 4.3: Señal de absorbancia en función del tiempo de reacción para 0,1 nmol en un volumen final de 100 μ L **B-Dz** en solución (rombos negros) e inmovilizada sobre partículas magnéticas (cuadrado gris). Las barras de dispersión corresponden a triplicados.

Para ambos sistemas se obtuvieron señales altas y similares, aunque de menor intensidad para la DNAzima inmovilizada. Lo que indica que la DNAzima peroxidasa funcionó en fase heterogénea y que las condiciones en que se llevó a cabo la reacción fueron adecuadas. En base a estas observaciones se decidió continuar los siguientes ensayos en fase heterogénea en las mismas condiciones experimentales utilizadas para llevar a cabo la reacción con la DNAzima en solución.

Hay que considerar que el funcionamiento del sistema en fase heterogénea presenta una mayor complejidad respecto al del sistema en fase homogénea, y que, por lo tanto, depende de una mayor cantidad de parámetros. Además de las variables de la reacción de peroxidación se consideraron las posibles interacciones entre los diferentes componentes del medio de reacción y la superficie de las partículas. En el **Capítulo 3** se mostró que la señal de absorbancia medida para el blanco de reactivos en solución, aun conteniendo hemina, resultó despreciable comparada a la del sistema con DNAzima. Para la reacción en fase heterogénea se consideró adicionalmente el aporte de la superficie a la señal de absorbancia. Las partículas magnéticas contienen hierro en su composición y podrían ser capaces de catalizar la reacción de peroxidación^{8,17}. Por otro lado, la hemina agregada a la suspensión para la formación de DNAzima, aún después de los lavados podría presentar algún tipo de interacción con las partículas magnéticas y catalizar la reacción de

peroxidación. Para poder definir controles de reactivos y determinar correctamente la señal aportada por catálisis de DNAzima se analizaron las señales aportadas por las partículas en el medio de reacción luego de ser expuestas a hemina y sin haber sido expuestas. Para ello se realizaron tres ensayos sobre tres suspensiones idénticas de partículas magnéticas (0,1 mg): una no se modificó, a la otra se le agregó 0,1 nmol hemina (control hemina) y se sometió a lavados y sobre la última se inmovilizó 0,1 nmol de secuencia **B-Dz**, se agregó 0,1 nmol hemina y se sometió a lavados (ver el protocolo de lavado en el **Capítulo 2, sección 2.3**). Por último, se agregaron los reactivos TMB y H₂O₂ en un volumen final de reacción de 100 µL y se midió absorbancia a 370 nm para distintos tiempos de reacción. En la **figura 4.4** se comparan las intensidades de señal de los tres ensayos: partículas sin modificar, partículas expuestas a hemina y partículas con DNAzima inmovilizada, cada ensayo se realizó por cuadruplicado.

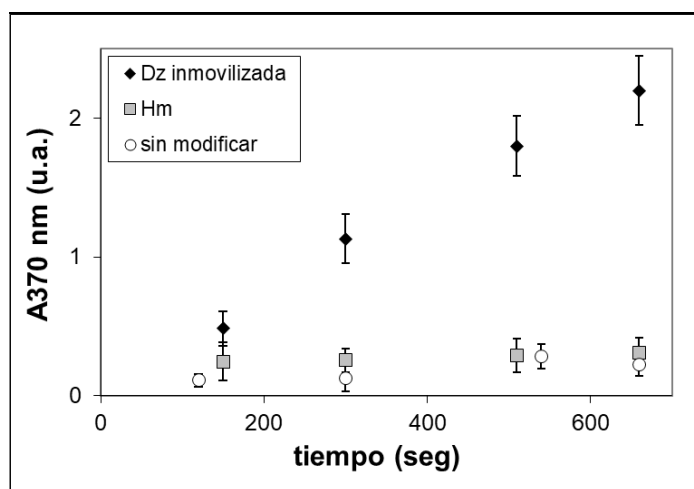


Figura 4.4: Comparación de las señales de absorbancia obtenidas a 370 nm a diferentes tiempos de reacción para partículas: con DNAzima inmovilizada (rombo negro), expuestas a hemina (cuadrado gris) y sin modificar (círculo blanco). Las barras de dispersión corresponden a cuadruplicados.

Los resultados muestran que tanto para las partículas sin modificar como para las expuestas a hemina las señales resultaron poco intensas y constantes en todo el tiempo de reacción. A tiempos de reacción cortos la intensidad de estas señales representó un gran porcentaje respecto a la señal de las de partículas con **B-Dz**. Sin embargo, como la señal de **B-Dz** aumentó con el tiempo de

reacción mientras que las otras dos se mantuvieron constantes fue posible diferenciarlas bien a partir de los 200 segundos.

Son pocos los trabajos publicados que utilizan la interacción biotina-estreptavidina como estrategia de inmovilización de la secuencia que forma DNAzima. Uno de ellos, el de Loic *et. al*¹⁸ reportó una relación entre las intensidades de señal a partir de catálisis por DNAzima y hemina muy similar a la obtenida en este trabajo de tesis para tiempos de reacción mayores a 200 segundos. En ambos casos se concluyó que el soporte tanto antes como después del agregado de hemina no mostró un aporte significativo a la señal generada a partir de la reacción de peroxidación.

4.2.2 Relación entre la cantidad de secuencia *B-Dz* inmovilizada y la intensidad de señal

Partiendo de los conocimientos y la experiencia adquiridos en el armado y medición del sistema en solución y sumando las observaciones para los ensayos exploratorios en fase heterogénea que se mostraron anteriormente, se buscó establecer una relación entre la señal medida y la cantidad de secuencia ***B-Dz*** inmovilizada sobre partículas magnéticas.

Las características del sistema hacen que sea difícil garantizar la cantidad exacta de secuencia inmovilizada que se toma. Las partículas se encuentran suspendidas en un medio líquido, tomar un volumen conocido de suspensión no asegura una cantidad exacta de partículas, sino que puede estimarse una masa aproximada. Con el objetivo de conseguir alícuotas de suspensión de partículas con cantidades crecientes de secuencia ***B-Dz*** inmovilizada, minimizando los errores por pérdidas, se agregó la cantidad total de secuencia ***B-Dz*** a utilizar sobre la totalidad de partículas magnéticas (en una única suspensión), se agregó hemina para activar la función DNAzima y luego se separó en alícuotas conteniendo cada una la cantidad correspondiente de ***B-Dz***. Finalmente se agregó TMB y H₂O₂ para llevar a cabo la reacción de peroxidación y se midió la señal.

En la **figura 4.5** se muestra la relación entre la cantidad de ***B-Dz*** agregada y la señal obtenida por absorbancia a 370 nm a los 8 minutos de reacción a pH = 5. Se agregó 0,34 nmol de secuencia ***B-Dz*** sobre un volumen de suspensión equivalente a 1,7 mg de partículas magnéticas, luego hemina para permitir la

activación de la función DNAzima y se separaron alícuotas de suspensión de partículas conteniendo respectivamente 0,005 nmol, 0,010 nmol, 0,025 nmol, 0,050 nmol, 0,10 nmol y 0,15 nmol de DNAzima. Se realizaron dos ensayos control en los que se agregaron 0,175 nmol de hemina sobre un volumen de suspensión equivalente a 0,87 mg de partículas magnéticas y se separaron en dos alícuotas conteniendo 0,025 nmol y 0,15 nmol de hemina respectivamente. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado y en un volumen final de 100 μ L.

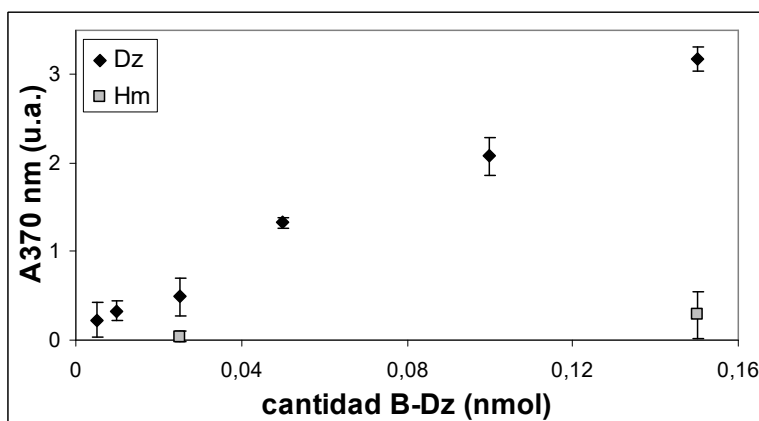


Figura 4.5: Relación entre la señal de absorbancia a 370 nm y la cantidad de **B-Dz** (rombos negros). Se obtuvo una relación lineal dada por: $A: 20,282$ (moles **B-Dz**) + $0,1223$ ($R^2 = 0,9911$). Controles de hemina (cuadrados grises). Tiempo de reacción 8 minutos. Las barras de dispersión corresponden a triplicados.

La intensidad de señal aumentó linealmente con la cantidad de **B-Dz**, tal como ocurrió para el sistema en solución. La DNAzima inmovilizada funcionó como catalizadora de la reacción de peroxidación, al menos en el rango estudiado, entre 0,005 nmol y 0,15 nmol. Por otro lado, la intensidad de señal de los ensayos control (partículas con hemina) resultó menor que la de los ensayos que contenían la menor cantidad de **B-Dz**.

En el **Capítulo 3**, se mostró que a igualdad de condiciones el espectro de absorción para TMB_{ox} a $\text{pH} = 1$ presentó un máximo a 450 nm cuya intensidad resultó mayor que el máximo de absorbancia a 370 nm para TMB^+ a $\text{pH} = 5$. Por lo tanto, para los ensayos en solución la curva de concentración se determinó en medio muy ácido, $\text{pH} = 1$. Volviendo al ensayo en fase heterogénea, se obtuvo una buena correlación entre señal a 370 nm y cantidad de DNAzima. No obstante, para evaluar la posibilidad de mejorar la sensibilidad

de la respuesta se repitió el ensayo a pH = 1 midiendo absorbancia a 450 nm. Si bien la acidificación del medio agrega un paso experimental y aumenta la complejidad operativa de la medición, resulta interesante explorar si con esto se consigue mejorar la sensibilidad de la respuesta.

Se repitió el ensayo anterior, pero acidificando cada alícuota justo antes de la medición. En la **figura 4.6** se muestra la relación entre la cantidad de **B-Dz** inmovilizada y la señal obtenida por absorbancia a 450 nm a los 8 minutos de reacción a pH = 1.

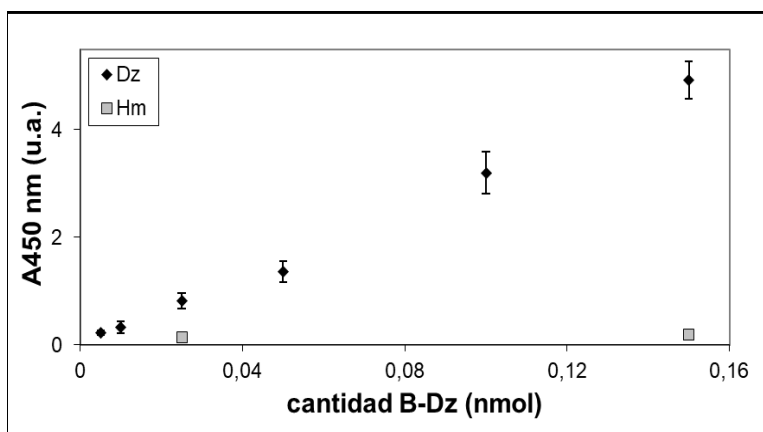


Figura 4.9: Relación entre la señal de absorbancia a 450 nm y la cantidad de **B-Dz** (rombos negros). Se obtuvo una relación lineal dada por $A: 32,604 \text{ (moles B-Dz)} - 0,0392$ ($R^2 = 0,9959$). Controles de hemina (cuadrados grises). Tiempo de reacción 8 minutos, inmediatamente se acidificó el medio por agregado de H_2SO_4 . Las barras de dispersión corresponden a triplicados.

En estas condiciones de medición también se obtuvo una relación lineal entre la señal y la cantidad de **B-Dz** inmovilizada sobre las partículas. En cuanto a los controles la intensidad de señal resultó similar independientemente de la cantidad de hemina agregada y menor que la de los ensayos que contenían la menor cantidad (0,005 nmol) de **B-Dz**.

La curva obtenida a partir de la medición en medio fuertemente ácido presentó una mayor sensibilidad respecto a la obtenida en medio levemente ácido. Las pendientes obtenidas fueron 32,604 u.a./nmol para las señales medidas a 450 nm pH = 1 y 20,282 u.a./nmol para las señales medidas a 370 nm pH = 5. Ambas condiciones de medición permiten distinguir entre pequeñas cantidades de **B-Dz** (al menos 0,025 nmol) y los ensayos control. Sin embargo, acidificar el medio antes de la medición incrementa la complejidad operativa.

Por todo lo anteriormente mencionado se decidió que en los ensayos en que fuera posible, la medición se realizó a 370 nm pH = 5 y en los que fuera necesaria una mayor sensibilidad, a 450 nm pH = 1.

4.2.3 Reuso del sistema

Una característica deseable para los sensores cuyas capas de reconocimiento se encuentran inmovilizadas consiste en que pueden ser re utilizados. Se analizó la reproducibilidad de señal luego de usos sucesivos para **B-Dz** inmovilizada sobre partículas magnéticas. Luego del primer uso, es decir tras llevar a cabo la reacción de peroxidación en fase heterogénea y registrar la señal de absorbancia, las partículas magnéticas se sometieron a lavados y se volvió a llevar a cabo la reacción. Un factor que se tuvo en cuenta fue la posibilidad de que tras los lavados se desarmara la estructura cuartetos de G, perdiéndose hemina y función peroxidasa. Para probarlo, luego del primer uso y tras los lavados se llevaron a cabo dos ensayos, a uno se agregó hemina antes de llevar a cabo por segunda vez la reacción de peroxidación y al otro no. En la **figura 4.10** se muestra la señal para 0,1 nmol de **B-Dz** inmovilizada sobre partículas magnéticas en 100 μ L de mezcla de reacción en comparación con la señal para los controles de partículas con 0,1 nmol de hemina en las mismas condiciones de reacción para tres usos consecutivos. Luego de cada uso se lavaron las partículas magnéticas y se repitió el ensayo. Tras el primer uso se realizaron dos ensayos en paralelo uno con y otro sin agregado de 0,1 nmol de hemina, se lavó el sistema, se llevó a cabo la reacción de peroxidación midiendo la señal y se repitió el ensayo para analizar el tercer uso con y sin agregado de hemina. En todos los casos se midió absorbancia a 370 nm a los 8 minutos de reacción.

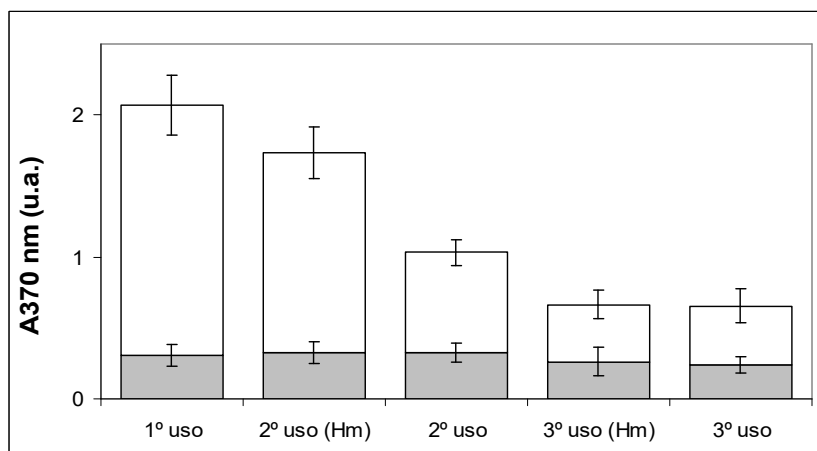


Figura 4.10: Señal de absorbancia a 370 nm a los 8 minutos de reacción con 0,1 nmol de **B-Dz** (blanco) y control hemina 0,1 nmol (gris) en 100 μ L de mezcla de reacción para tres usos sucesivos del sistema con y sin agregado de hemina entre usos. Las barras de dispersión corresponden a cuadruplicados.

La intensidad de señal para **B-Dz** disminuyó luego de cada uso mientras que para los controles de hemina se obtuvieron señales similares y de baja intensidad en todos los ensayos. Al comparar las señales para el primer uso respecto del segundo se observó que la pérdida fue menor cuando se agregó hemina. La señal disminuyó en un 20 % con agregado y en un 60 % sin agregado de hemina para el segundo uso respecto de la del primero. Esto indica que se perdió algo de funcionalidad DNAzima luego del primer uso y que esta se restituyó parcialmente con el agregado de hemina. Para el tercer uso la señal disminuyó en un 77 % respecto del primer uso tanto con cómo sin agregado de hemina.

Cabe aclarar que las partículas magnéticas no fueron diseñadas para re-usos, no obstante, al comparar las señales de los controles de hemina, que resultaron mantenerse constantes en los ensayos sucesivos se comprobó que pueden ser lavadas y vueltas a utilizar sin afectar su funcionalidad. En cuanto al sistema con **B-Dz** inmovilizada este perdió eficiencia con los usos. La regeneración con hemina mejoró un poco la señal, pero no se logró reestablecer con la misma intensidad que para el primer uso.

Son pocos los trabajos publicados que reportan re-usos para DNAzima inmovilizada por lo que se tienen escasas referencias para comparar con los resultados obtenidos. Shi *et al.* 2015¹⁹ diseñaron un genosensor electroquímico para la detección de una secuencia sc-ADN específica relacionada con el virus

de la hepatitis B. El sistema de biorreconocimiento, una secuencia sc-ADN sonda capaz de formar DNAzima peroxidasa, se inmovilizó sobre un electrodo de carbono vítreo modificado con nanopartículas de oro. Reportaron que tras utilizar el electrodo y guardarlo por una semana la señal disminuyó en un 10 % respecto de la inicial, al volver a utilizarlo. Sun *et al.* 2019²⁰ diseñaron un aptasensor quimioluminiscente para la detección de estreptomicina. El sistema de biorreconocimiento estaba formado por dos secuencias sc-ADN: el aptámero de estreptomicina y PS2.M (capaz de funcionar como DNAzima peroxidasa) e inmovilizado sobre grafeno. Reportaron una disminución del 7,2 % de la intensidad de señal luego del reuso del sensor. Dellafiore *et al.* 2015²¹ analizaron el funcionamiento de la DNAzima peroxidasa inmovilizada sobre partículas de poliestireno. Reportaron que luego del primer uso, tras separar el sobrenadante por centrifugación y volver a llevar a cabo la reacción de peroxidación por agregado de hemina, TMB y H₂O₂, en el segundo uso la intensidad de la señal disminuyó en un 14 % y luego del quinto uso un 33 %. En este trabajo la disminución de señal entre el primer y segundo uso resultó comparable a la informada en las publicaciones mencionadas.

4.3 Secuencia *PW17* inmovilizada sobre oro

La estrategia de inmovilización de secuencias oligonucleotídicas modificadas con grupos tiol sobre superficies de oro es una de las más ampliamente utilizada. Los enlaces covalentes entre el azufre y el oro permiten la formación de monocapas estables de secuencias sc-ADN²².

Estas modificaciones se comercializan en su forma oxidada, como disulfuro S-S-C6. Si bien el disulfuro puede interactuar con la superficie de oro, en la mayoría de los casos, para aumentar la eficiencia de inmovilización, se agrega un agente reductor que rompe el enlace disulfuro y lo transforma en tiol. De esta forma la secuencia expuesta a la superficie queda inmovilizada por una interacción S-Au.

Cabe señalar que una secuencia modificada con S-S-C6 tiene un costo de más del doble respecto del de la misma secuencia modificada con biotina. Por este motivo fue indispensable minimizar las cantidades utilizadas y en consecuencia los volúmenes en los cuales se llevó a cabo la reacción. Para disminuir los costos por ensayo se buscó una relación de compromiso donde la cantidad de

secuencia **T-Dz** utilizada fuera la mínima que permitiera obtener señales diferenciables respecto de las de los controles.

Como ensayo preliminar se analizó, cualitativamente, el cambio de color resultante luego de llevar a cabo la reacción de peroxidación con DNAzima como catalizador inmovilizada sobre diferentes soportes de oro. Se probaron superficies de aproximadamente 1 cm² de diferente conformación y construcción: oro depositado sobre vidrio por evaporación, nanopartículas de oro de forma y tamaño controlados tanto nanoesferas (de 8 nm y de 19 nm de diámetro) como nanobastones (57 nm x 16 nm) inmovilizadas sobre vidrio²³ y láminas de oro policristalino de alta pureza (99,99 %). En el primer caso, oro sobre vidrio, no se observó un cambio de color apreciable al llevar a cabo la reacción de peroxidación. En el caso de las nanopartículas inmovilizadas sí se observó el viraje de incoloro a celeste para todas las formas y tamaños de nanopartículas. En el último caso, oro macizo, se observó un viraje de incoloro a azul con una mayor intensidad de señal respecto a los sistemas armados sobre las otras superficies. En la **figura 4.11** se esquematizan los diferentes soportes de oro y la señal colorimétrica obtenida a partir de la reacción en fase heterogénea sobre cada uno de ellos.



Figura 4.11: A) Oro depositado sobre vidrio por evaporación. B) Nanopartículas de oro depositadas sobre vidrio. C) Lámina de oro policristalino. El color de las gotas representa la intensidad del color del producto de la reacción.

En todos los casos, uno de los mayores inconvenientes fue el trabajo con soluciones sobre superficies planas. Debido a la composición del medio de reacción la tensión superficial no resultó suficiente para mantener una gota formada en los tiempos necesarios para inmovilización y reacción perdiéndose parte del líquido y tornándose dificultoso recoger alícuotas para cuantificar el producto, TMB oxidado. La forma de resolverlo fue modificar las láminas de oro macizo generando una concavidad de forma tal que pudieran contener 30 µL de solución (Ver **Capítulo 2 sección 2.2**). Por ser la superficie con la que se obtuvieron señales más intensas y en la que mejor contenidas quedaban las

soluciones todos los ensayos se realizaron inmovilizando la secuencia **T-Dz** sobre superficies cóncavas de oro policristalino.

La formación de monocapas de secuencias **T-Dz** fue clave para el funcionamiento del sistema. Existen diversos factores que pueden influir en el proceso de inmovilización y que afectan tanto a la orientación espacial de las hebras²⁴ como al grado de cubrimiento superficial²⁵ y a la cinética de formación de la monocapa. Para llevar a cabo la reacción de peroxidación, es necesario que las hebras se orienten hacia la solución, quedando disponibles para interactuar con hemina. Tanto la quimisorción como la interacción repulsiva entre cadenas vecinas son factores a tener en cuenta para llevar a cabo la inmovilización. La quimisorción está dada por la interacción entre los grupos amina de los nucleótidos y la superficie de oro, provoca que las hebras se aplanen sobre la superficie y por lo tanto queden menos disponibles hacia la solución²⁶. La interacción repulsiva entre cadenas vecinas de ADN, se produce por ser polielectrolitos cargados negativamente. Este efecto impide la formación de monocapas ordenadas afectando negativamente a la distribución superficial. Una forma de mejorar la distribución superficial consiste en inmovilizar sobre la superficie de oro una molécula pequeña que actúe como agente de bloqueo, por ejemplo 6-mercaptohexanol (MCH). El grupo tiol del MCH es capaz de desplazar rápidamente adsorbentes inespecíficos más débiles (como las interacciones N-Au), dejando las secuencias sc-ADN unidas principalmente a través del extremo tiol. Después del tratamiento con MCH las secuencias, inicialmente compactas, adquieren una conformación extendida hacia la solución^{26,27}. En la **figura 4.12** se esquematiza el armado de una monocapa mixta en dos pasos. En un primer paso se inmoviliza la secuencia sc-ADN, en concentraciones de orden micromolar, y luego se agrega MCH, en concentraciones de orden milimolar.

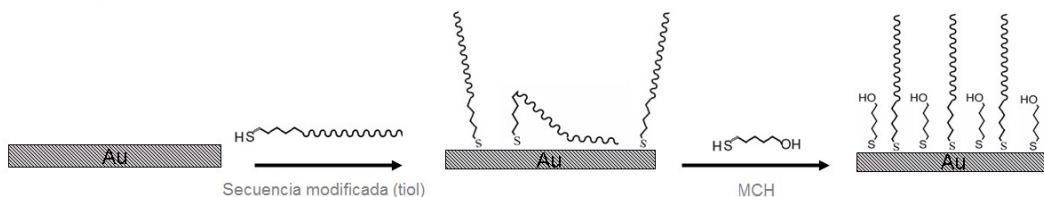


Figura 4.12: Armado en dos pasos de una monocapa mixta. Inmovilización sobre un soporte de oro de la secuencia sc-ADN modificada con tiol seguida por la formación del autoensamblado mixto con mercaptohexanol (MCH).

La importancia de las concentraciones escogidas radica en que permiten controlar la cantidad de oligonucleótido efectivamente inmovilizado²⁸. Este proceso de dos pasos para la formación de monocapas mixtas oligonucleótido / MCH permite eliminar oligonucleótido adsorbido no específicamente y generar monocapas más estables e incrementar la orientación de las secuencias sc-ADN hacia la solución²⁹ favoreciendo una capa superficial más ordenada⁷.

Otro factor que puede afectar a la disponibilidad de las secuencias es el grado de cubrimiento superficial. Se ha reportado³⁰ que si la interacción S-Au se produce a través de grupos tiol (-S) en vez de disulfuro (-S-S-) la densidad superficial podría aumentar hasta el doble. Por otro lado, si la densidad superficial es muy grande la repulsión electrostática podría interferir en los cambios estructurales para la formación de estructuras secundarias, como por ejemplo los cuartetos de G³¹. Siendo tan importante el grado de cubrimiento superficial resultó imprescindible analizar el efecto de la reducción del disulfuro a tiol previo a la inmovilización. Para llevar a cabo la reducción se utilizó tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP). Este reductor tiene la ventaja de que no se adsorbe sobre la superficie de oro y por lo tanto no es necesario eliminarlo de la solución. En la **figura 4.13** se esquematiza la reacción de reducción altamente selectiva para disulfuros³².



Figura 4.13: Reacción de reducción de la modificación disulfuro en el extremo 5' de la secuencia **T-Dz** con TCEP. Como productos se obtienen la secuencia sc-ADN modificada con tiol en el extremo 5' y MCH.

Al igual que lo descrito en el apartado anterior, se realizaron ensayos exploratorios para analizar las mejores condiciones tanto para la inmovilización como para la activación de la función DNAzima peroxidasa en fase heterogénea sobre superficies de oro de la secuencia ***T-Dz***; con el objetivo de obtener señales significativas y reproducibles.

4.3.1 Ensayos exploratorios

Se determinó el tiempo de interacción entre la secuencia **T-Dz** y la superficie de oro necesario para la inmovilización. Para ello se pusieron en contacto soluciones de **T-Dz** con las superficies de oro y se dejaron en contacto por diferentes periodos de tiempo. En la **figura 4.14** se muestra la señal obtenida a diferentes tiempos de reacción para tres tiempos de inmovilización: 30, 60 y 120 minutos repitiendo cada ensayo por duplicado. En el inserto se detalla la relación entre las señales obtenidas a los 8 minutos de reacción y el tiempo de interacción. Sobre 6 soportes se colocó 20 μL de solución conteniendo 0,12 nmol de secuencia **T-Dz**. Luego del tiempo de interacción se lavó el sistema para eliminar el exceso de secuencia no inmovilizada y se agregó hemina para permitir la formación de DNAzima. Por último, se agregó mezcla de reacción conteniendo TMB y H_2O_2 . Se realizó el mismo tratamiento sobre soportes de oro en ausencia de secuencia **T-Dz**, a modo de control.

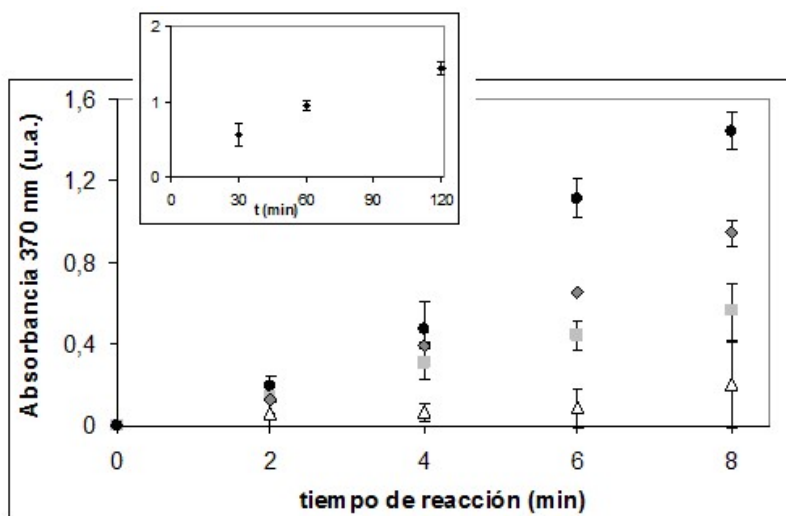


Figura 4.14: Señal de absorción a 370 nm en función del tiempo de reacción. Obtenido a partir de la interacción entre 0,12 nmol de **T-Dz** y la superficie de oro para cuatro tiempos de inmovilización: 30 minutos (cuadrado gris claro), 60 minutos (rombo gris oscuro), 120 minutos (círculo negro), control (triángulo blanco). Inserto: señal de absorción a 370 nm a los 8 minutos de reacción en función del tiempo de inmovilización.

A mayor tiempo de inmovilización más intensa resultó la señal. Dado que la señal observada proviene de la **T-Dz** inmovilizada, se evidenció la dependencia directa entre el cubrimiento superficial y el tiempo de interacción. En el mismo

sentido, a mayor tiempo de reacción más intensa resultó la señal medida. Para no alargar los tiempos de ensayo se decidió usar tiempo de inmovilización de 120 minutos y tiempo de reacción de 8 minutos porque en estas condiciones la señal en presencia de **T-Dz** puede diferenciarse bien de la de los controles.

Como se mencionó anteriormente, una monocapa más estable y ordenada podría afectar positivamente al funcionamiento del sistema. Para comprobarlo se estudió el efecto de la inmovilización de MCH así como también el de la reducción del disulfuro con TCEP previa a la inmovilización. Se analizó el efecto de cada factor por separado en pos de hallar las condiciones para las cuales la señal de absorbancia resultante de la oxidación de TMB fuera la mayor posible.

Se probó inmovilizar **T-DZ** directamente sobre oro, inmovilizar **T-DZ** y luego MCH, reducir **T-DZ** a tiol para luego inmovilizarlo sobre oro y por ultimo reducir **T-DZ** a tiol e inmovilizar y luego agregar MCH. También se realizó un ensayo control, en ausencia de secuencia **T-Dz**. A continuación, se detallan cada uno de los cuatro ensayos de inmovilización y el control.

- A. Inmovilización directa de la secuencia **T-Dz** sobre oro (por interacción disulfuro-oro). "**T-Dz**"
- B. Reducción del disulfuro de la secuencia **T-Dz** a tiol por reacción con TCEP en solución. Seguido de la inmovilización (por interacción tiol-oro). "**TCEP/T-Dz**"
- C. Inmovilización directa de la secuencia **T-Dz** (por interacción disulfuro-oro). Seguida de la inmovilización de MCH para la formación de una monocapa autoensamblada mixta. "**T-Dz/MCH**"
- D. Reducción del disulfuro de la secuencia **T-Dz** a tiol por reacción con TCEP en solución. Seguido de la inmovilización (por interacción tiol-oro). Finalmente, inmovilización de MCH para la formación de una monocapa autoensamblada mixta. "**TCEP/T-Dz/MCH**"
- E. MCH inmovilizado sobre la superficie de oro. "control"

En la **figura 4.15** se esquematiza la configuración teórica que adquiriría la superficie en cada uno de los ensayos realizados.

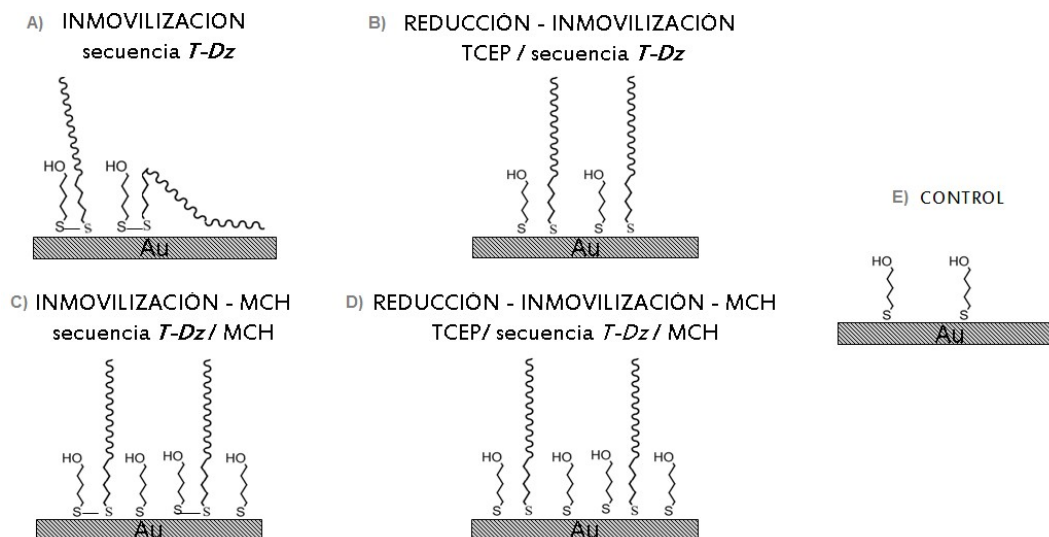


Figura 4.15: Esquema de las cuatro condiciones de inmovilización y del control (sin secuencia **T-Dz**). **A)** secuencia **T-Dz**, **B)** secuencia **T-Dz** luego de la reducción del disulfuro TCEP/**T-Dz**, **C)** inmovilización **T-Dz** seguida de MCH **T-Dz**/MCH, **D)** inmovilización **T-Dz** luego de la reducción del disulfuro y seguida de inmovilización de MCH TCEP/**T-Dz**/MCH y **E)** ensayo control: inmovilización de MCH.

Se tomaron cuatro alícuotas de 20 μ L conteniendo 0,12 nmol **T-Dz** cada una. A dos de esas alícuotas se las dejó tal cual y sobre las otras dos se agregó TCEP y se llevó a cabo la reducción del disulfuro a tiol. Cada una de las cuatro alícuotas se colocó sobre una superficie cóncava de oro por 2 h para llevar a cabo la inmovilización. De este modo se obtuvieron dos ensayos donde la secuencia **T-Dz** se inmovilizó sobre oro a través del grupo funcional disulfuro (**figura 4.15 A)** y **C)**) y otros dos donde la secuencia **T-Dz** reducida se inmovilizó sobre oro a través del grupo funcional tiol (**figura 4.15 B)** y **D)**). Se lavaron todas las superficies para eliminar el exceso de secuencia no inmovilizada. Sobre una de las superficies conteniendo disulfuro-oro (**figura 4.15 C)**) y sobre otra tiol-oro (**figura 4.15 D)**) se agregó MCH de modo de permitir la formación del autoensamblado mixto y se dejó inmovilizar por 30 minutos, luego se lavó para eliminar el exceso. Sobre todas las superficies se agregó hemina para activar la funcionalidad DNAzima y se lavó para eliminar el exceso. Se agregó la mezcla de reactivos conteniendo TMB y H_2O_2 y se midió la señal de absorbancia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se comparó contra controles que se llevaron a cabo de igual forma, pero sin

agregado de secuencia **T-Dz** (figura 4.15 E)). En la figura 4.16 se muestran las señales medidas por absorbancia a 370 nm a los 8 minutos de reacción para cada una de las condiciones estudiadas.

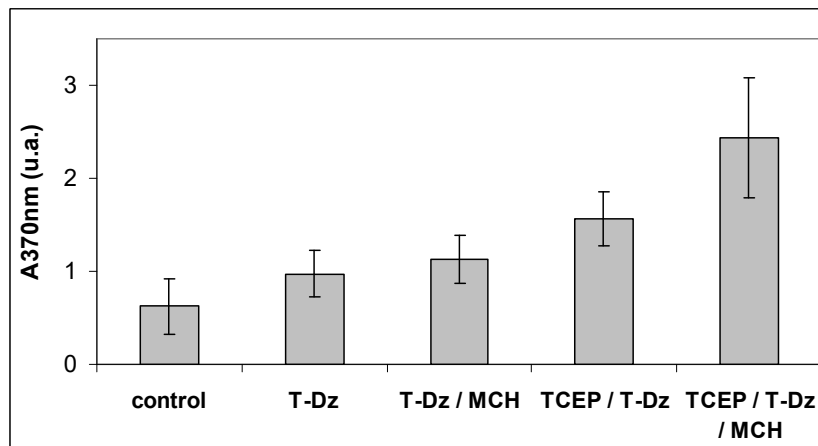


Figura 4.16: Comparación de las señales de absorbancia a 370 nm a los 8 minutos de reacción para distintas condiciones de inmovilización de 0,12 nmol de **T-Dz**: sobre oro (**T-Dz**), inmovilización con MCH (**T-Dz/MCH**) reducción previa a la inmovilización (TCEP/**T-Dz**), reducción previa a la inmovilización y posterior inmovilización de MCH (TCEP/**T-Dz/MCH**). Control sin secuencia **T-Dz**. Las barras de dispersión corresponden a triplicados.

La señal del control resultó ser bastante intensa en comparación con las de los otros ensayos, de hecho, no pudo diferenciarse de la señal obtenida para los ensayos con **T-Dz** inmovilizada directamente sobre oro. Al agregar MCH la señal aumentó muy poco, el ordenamiento de las hebras debido a la capa mixta no produjo una mejora importante en las condiciones para la reacción de peroxidación. La reducción del disulfuro a tiol (con TCEP) favoreció a la reacción, se observó una mayor intensidad de señal. Como se discutió previamente la inmovilización a través de grupos tiol en lugar de disulfuro aumenta el cubrimiento superficial, al haber más hebras disponibles hay más DNAzima disponible y por lo tanto la señal resulta más intensa. Pero la señal más intensa se obtuvo para el sistema con **T-Dz** previamente reducido y con inmovilización de MCH. La inmovilización a través de grupos tiol y la formación de una monocapa mixta ordenada fueron claves para lograr un incremento de la señal. La dispersión de los replicados resultó bastante grande, posiblemente debido a la baja uniformidad de las superficies de oro utilizadas sumada a la

dispersión de la reacción de peroxidación *per se*, que resultó aproximadamente del 10 % (ver **Capítulo 3**).

A partir de estos resultados se decidió realizar los siguientes ensayos reduciendo el disulfuro **T-Dz** previo a la inmovilización y con agregado de MCH. Con estos pasos operativos extra se obtuvieron señales más intensas y distinguibles de los controles, aunque con la desventaja de que se incrementó el tiempo por ensayo.

4.3.2 Relación entre la cantidad de secuencia T-Dz inmovilizada y la intensidad de señal

Se analizó la intensidad de señal para cantidades crecientes de **T-Dz** 0,06 nmol, 0,1 nmol, 0,25 nmol y 0,5 nmol. Se realizó la reducción con TCEP, seguida de la inmovilización por 2 h y agregado de MCH para formar la capa autoensamblada mixta. Luego de 30 minutos de exposición al MCH se agregó hemina y se llevó a cabo la reacción de peroxidación por agregado de TMB y H₂O₂. Se midió absorbancia a 370 nm a los 8 minutos de reacción. A los controles se les realizó el mismo tratamiento en ausencia de secuencia **T-Dz** pero agregando 0,06 nmol y 0,5 nmol de hemina respectivamente. En la **figura 4.17** se muestra la relación entre la cantidad de **T-Dz** expuesta a la superficie de oro y la señal de absorbancia medida. Cada ensayo se realizó por cuadruplicado.

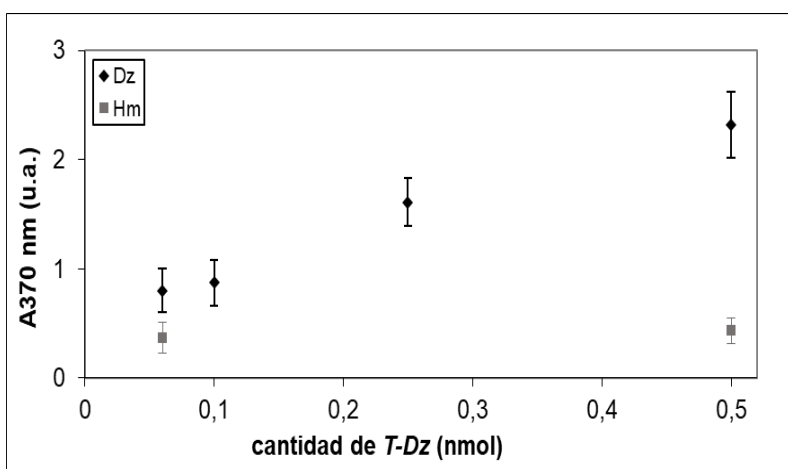


Figura 4.17: Relación entre la señal de absorbancia a 370 nm y la cantidad de **T-Dz** (rombos negros). Se obtuvo una relación lineal dada por: $A: 3,5512 \text{ (moles T-Dz)} + 0,5933$ ($R^2: 0,9840$). Controles con 0,06 nmol y 0,5 nmol de

hemina respectivamente (cuadrados grises). Tiempo de reacción 8 minutos. Las barras de dispersión corresponden a triplicados.

La intensidad de señal resultó proporcional a la cantidad de DNAzima agregada. Es decir que, al igual que en el caso de las partículas magnéticas, la DNAzima inmovilizada conservó su función como peroxidasa. La intensidad de señal correspondiente a los controles de hemina resultó menor que la obtenida para igual concentración de **T-Dz** y la diferencia entre ambas señales se fue incrementando al aumentar la concentración de **T-Dz**.

Al comparar estos resultados con la curva de concentración de **B-Dz** se observó que, en el caso de la superficie de oro, las señales resultaron menos intensas para cantidades agregadas de **T-Dz** iguales o mayores a las de **B-Dz**. Esto puede explicarse teniendo en cuenta en el cubrimiento superficial. Según Steel *et al.* 2000 y Levicky *et al.* 1998 el cubrimiento promedio de secuencias de sc-ADN de 19 bases modificadas con disulfuro sobre una superficie de oro en un tiempo de inmovilización de 2 h y agregado de MCH 1mM resulta en aproximadamente 0,02 nmol oligonucleótido/cm² ^{26,27}. Los soportes de oro utilizados para llevar a cabo la inmovilización tienen una superficie de aproximadamente 1 cm², por lo tanto, con 0,02 nmol de **T-Dz** sería suficiente para lograr el cubrimiento máximo. Sin embargo en el ensayo anterior se agregaron entre 0,06 nmol y 0,5 nmol y se observó un incremento de señal lo que sugiere que no se inmovilizó la cantidad total de **T-Dz** agregada sino que se requiere un exceso respecto de la cantidad teórica necesaria para generar el máximo cubrimiento superficial³³.

4.3.3 Reuso del sistema

De la misma forma que para **B-Dz** inmovilizada sobre partículas magnéticas se analizó el reuso de la secuencia **T-Dz** inmovilizada sobre oro. Se probaron las dos condiciones, regenerar el sistema por agregado de hemina para permitir la activación de la DNAzima luego de cada uso y no regenerar el sistema suponiendo que la estructura cuartetos de G y la funcionalidad DNAzima no se vieron afectadas luego del uso.

Se realizó el primer ensayo en las condiciones mencionadas en el apartado **4.3.2** sobre alícuotas conteniendo 0,12 nmol **T-Dz** cada una. Luego de la inmovilización de la secuencia reducida se inmovilizó MCH sobre la superficie

de oro, se agregó hemina para activar la funcionalidad DNAzima y se lavó para eliminar el exceso. Se agregó la mezcla de reactivos conteniendo TMB y H_2O_2 y se midió la señal de absorbancia. Este procedimiento se realizó sobre 4 superficies cóncavas de oro y a cada una se le realizó un control sin agregado de **T-Dz**. Se estudió el re-uso del sistema luego de finalizado el primer ensayo y nuevamente luego del segundo ensayo. Luego de medir la señal todas las superficies se lavaron, a dos se les agregó hemina y dos se las dejó tal cual. Se volvió a llevar a cabo la reacción de peroxidación y medición de la señal. Por último, se lavaron las superficies y se volvió a repetir por tercera vez el ensayo de reuso. En todos los casos se midió absorbancia a 370 nm a los 8 minutos de reacción. Los resultados se muestran en la **figura 4.18**.

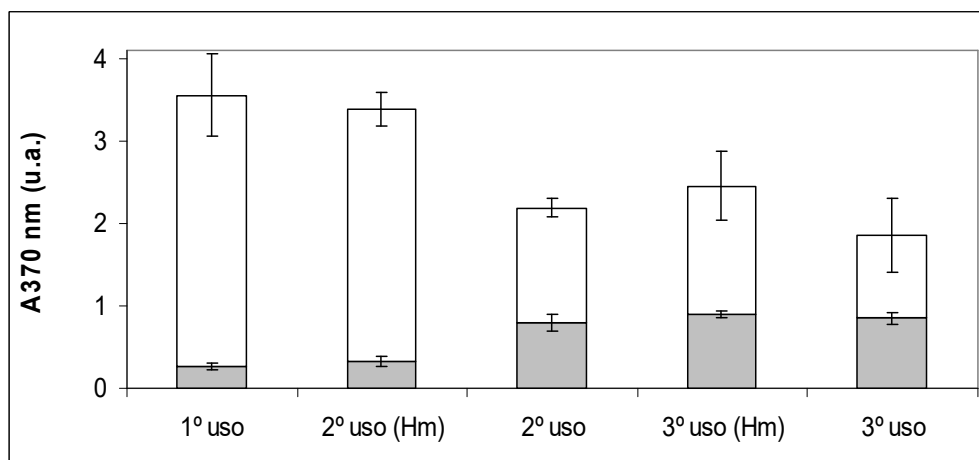


Figura 4.18: Intensidad señal de absorbancia a 370 nm a los 8 minutos de reacción con 0,12 nmol de **T-Dz** (blanco) y control hemina 0,12 nmol (gris) en 20 μ L de mezcla de reacción para tres usos sucesivos del sistema con y sin agregado de hemina entre usos. Las barras de dispersión error corresponden a cuadruplicados.

Se pudo confirmar la factibilidad del reuso del sistema formado por la secuencia **T-Dz** inmovilizada sobre oro como catalizador de la reacción de peroxidación. El agregado de hemina, es decir la reactivación de la DNAzima, fue indispensable para recuperar la señal. Esto se evidenció en la señal considerablemente mayor respecto a la de los ensayos donde no se agregó hemina. Para los ensayos de segundo uso en los se llevó a cabo la reactivación la señal resultó ser un 90 % respecto de la inicial en cambio en los que no se llevó a cabo la reactivación las señales resultaron aproximadamente

de la mitad de las iniciales. Para el tercer uso la señal resultó ser aproximadamente la mitad de la inicial a pesar de que también se llevó a cabo la reactivación con hemina. En todos los casos la señal pudo distinguirse de la de los controles, cabe señalar que la señal de los controles no fue idéntica para todos los ensayos, sino que se observó una variabilidad entre ellas.

4.4 Comparación entre ambos soportes

En esta sección se discuten las principales características de ambos soportes en base a los resultados de los ensayos mostrados anteriormente. Se ponderó a las más adecuadas para el armado de una capa de biorreconocimiento y para el funcionamiento de la DNAzima inmovilizada.

Las partículas magnéticas ocupan poco volumen y son fácilmente adaptables para el trabajo en recipientes pequeños. La inmovilización de la secuencia **B-Dz** resultó sencilla de llevar a cabo y muy estable. La separación magnética fue sumamente práctica para realizar los lavados y mediciones de absorbancia. La principal desventaja de este soporte radica en que no es posible controlar la cantidad de partículas que se toman en cada alícuota de la suspensión. También se observó algo de aglomeración de partículas y pérdida de masa tras varios lavados sucesivos. Esto, sumado a la variabilidad de la reacción de peroxidación ya observada en los ensayos en solución incrementa la dispersión de la señal medida.

El oro policristalino aportó un soporte sencillo, robusto y reutilizable. La inmovilización de la secuencia **T-Dz**, así como los lavados y mediciones de absorbancia resultaron sencillos de llevar a cabo. Se comprobó que para maximizar la intensidad de señal es necesario reducir el disulfuro de **T-Dz** antes de la inmovilización y agregar MCH para favorecer el orden de la capa autoensamblada. Esto favorece a la reacción de peroxidación, pero con la desventaja de que se incrementa el tiempo de preparación del soporte. No pudo asegurarse homogeneidad entre las superficies utilizadas por ser de fabricación rudimentaria, es decir, no pudo asegurarse homogeneidad en el tamaño, geometría y rugosidad de las superficies. La dispersión de los resultados resultó bastante alta, sin embargo, fue posible comparar entre ensayos independientes, realizados sobre diferentes superficies de oro.

Otro factor de relevancia para el análisis de las señales fueron los ensayos control, aquellos en los que se puso en contacto el soporte con hemina, pero en ausencia de secuencia sc-ADN. En ambos casos la señal del control representó menos del 20 % respecto a la señal a partir de la reacción de peroxidación catalizada con DNAzima inmovilizada y este porcentaje disminuyó para tiempos de reacción mayores a 8 minutos. Este valor resultó comparable con los publicados en otros trabajos similares con DNAzima inmovilizada sobre diferentes materiales⁴.

Para ambos soportes la señal aumentó de forma lineal con la concentración de **Dz** agregada, pero en el caso de las partículas magnéticas la curva resultó más sensible. La intensidad de señal obtenida a partir de la reacción con **T-Dz** inmovilizada sobre oro resultó menor que la intensidad de señal para la misma cantidad de **B-Dz** inmovilizada sobre partículas magnéticas. La eficiencia de inmovilización fue menor sobre oro, fue necesario agregar más cantidad de secuencia para tener señales del mismo orden que con **B-Dz**.

Respecto al re-uso, para ambos sistemas se observó que la intensidad de señal resultó mayor cuando se incorpora una etapa de reactivación de la DNAzima por agregado de hemina. En estas condiciones para el sistema soportado sobre partículas magnéticas la señal fue del 80 % respecto del primer uso y para el sistema soportado sobre oro del 90 % siendo resultados comparables con los publicados en bibliografía²⁰. En cuanto al tercer uso para ambos sistemas se perdió más del 50 % de la señal tanto con como sin reactivación de la DNAzima. La dispersión de los valores de señal medida fue de alrededor del 10 %. En cuanto a la dispersión entre las intensidades de señal para los controles resultó menor para el sistema inmovilizado sobre partículas magnéticas que sobre oro, lo que muestra que este último es un sistema menos reproducible.

Ambos soportes presentaron ventajas y desventajas, y mostraron ser útiles para llevar a cabo la reacción de peroxidación catalizada por DNAzima en fase heterogénea.

Tanto las partículas magnéticas como el oro policristalino podrían funcionar como soporte para la fase de reconocimiento con DNAzima como generadora de señal aplicable a genosensores. El sistema inmovilizado sobre partículas magnéticas demostró una menor variabilidad en la señal, mayor versatilidad,

mayor sensibilidad de la curva de concentración y menor tiempo por ensayo, además la secuencia **B-Dz** resulta menos costosa que **T-Dz**, por lo que se eligieron las partículas magnéticas como soporte para continuar con el análisis de funcionamiento de la capa de biorreconocimiento.

4.5 Bibliografía

1. Alizadeh, N., Hallaj, R. & Salimi, A. A highly sensitive electrochemical immunosensor for hepatitis B virus surface antigen detection based on Hemin/G-quadruplex horseradish peroxidase-mimicking DNAzyme-signal amplification. *Biosens. Bioelectron.* **94**, 184–192 (2017).
2. Hughes, N. *et al.* Comparison of DNAzyme activity for the development of an immobilized heme sensor. *MRS Adv.* **3**, 1491–1496 (2018).
3. Shekari, Z., Zare, H. R. & Falahati, A. Electrochemical sandwich aptasensor for the carcinoembryonic antigen using graphene quantum dots, gold nanoparticles and nitrogen doped graphene modified electrode and exploiting the peroxidase-mimicking activity of a G-quadruplex DNAzyme. *Microchim. Acta* **186**, (2019).
4. Ito, Y. & Hasuda, H. Immobilization of DNAzyme as a Thermostable Biocatalyst. *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 72–77 (2004).
5. Zhang, X. *et al.* An ultrasensitive label-free electrochemical biosensor for microRNA-21 detection based on a 2'-O-methyl modified DNAzyme and duplex-specific nuclease assisted target recycling. *Chem. Commun.* **50**, 12375–12377 (2014).
6. Green, N. M. Avidin. *Adv Protein Chem* **29**, 85–133 (1975).
7. Herne, T. M. & Tarlov, M. J. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8916–8920 (1997).
8. Fu, X., Zhang, H., Zhang, J., Wen, S. T. & Deng, X. C. A highly sensitive and label-free microbead-based 'turn-on' colorimetric sensor for the detection of mercury(II) in Urine using a peroxidase-like split g-quadruplex-hemin dnzyme. *Aust. J. Chem.* **71**, 945–952 (2018).
9. Zhang, Y., Ren, W., Luo, H. Q. & Li, N. B. Label-free cascade amplification strategy for sensitive visual detection of thrombin based on target-triggered hybridization chain reaction-mediated in situ generation of DNAzymes and Pt nanochains. *Biosens. Bioelectron.* **80**, 463–470 (2016).
10. Bi, S., Li, L. & Zhang, S. Triggered polycatenated DNA scaffolds for DNA sensors and aptasensors by a combination of rolling circle amplification and dnzyme amplification. *Anal. Chem.* **82**, 9447–9454 (2010).
11. Liu, S. *et al.* A sensitive colorimetric aptasensor based on trivalent peroxidase-mimic DNAzyme and magnetic nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **1018**, 86–93 (2018).
12. Du, Y. *et al.* G-Quadruplex-based DNAzyme for colorimetric detection of cocaine: Using magnetic nanoparticles as the separation and amplification element. *Analyst* **136**, 493–497 (2011).
13. Singh, V., Zharnikov, M., Gulino, A. & Gupta, T. DNA immobilization, delivery and cleavage on solid supports. *J. Mater. Chem.* **21**, 10602–10618 (2011).
14. Ballav, N., Koelsch, P. & Zharnikov, M. Orientation and ordering in monomolecular films of sulfur-modified homo-oligonucleotides on gold. *J. Phys. Chem. C* **113**, 18312–18320 (2009).
15. Oberhaus, F. V., Frense, D. & Beckmann, D. Immobilization techniques for aptamers on gold electrodes for the electrochemical detection of proteins: A review. *Biosensors* **10**, (2020).
16. <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/rna/streptavidin-magnosphere-paramagnetic-particles/?catNum=Z5481#protocols> (acceso 04/2023).
17. Wei, H. & Wang, E. Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H₂O₂ and glucose detection. *Anal. Chem.* **80**, 2250–2254 (2008).
18. Stefan, L., Lavergne, T., Spinelli, N., Defrancq, E. & Monchaud, D. Surface-immobilized DNAzyme-type biocatalysis. *Nanoscale* **6**, 2693–2701 (2014).
19. Shi, L. *et al.* A label-free hemin/G-quadruplex DNAzyme biosensor developed on electrochemically modified electrodes for detection of a HBV DNA segment. *RSC Adv.* **5**, 11541–11548 (2015).
20. Sun, Y. *et al.* Highly selective and sensitive streptomycin chemiluminescence sensor based on aptamer and G-quadruplex DNAzyme modified three-dimensional graphene composite. *Sensors Actuators, B Chem.* **301**, 127122 (2019).
21. Dellafiore, M. A., Montserrat, J. M. & Iribarren, A. M. Exploring the use of a guanine-rich catalytic DNA for sulfoxide preparation. *PLoS One* **10**, (2015).
22. Radecki, J. & Radecka, H. Redox-active monolayers deposited on gold electrode surface-universal platforms for electrochemical sensing. *Sensors Mater.* **32**, 1065–1078 (2020).

23. Cortesía Ing. Marina Gutierrez Grupo de nanofotonica- Laboratorio de óptica y metrología aplicada. Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Delta San Martin 1171, Campana, Buenos Aires, Argentina.
24. Rant, U. *et al.* Structural properties of oligonucleotide monolayers on gold surfaces probed by fluorescence investigations. *Langmuir* **20**, 10086–10092 (2004).
25. Carrascosa, L. G., Martínez, L., Huttel, Y., Román, E. & Lechuga, L. M. Understanding the role of thiol and disulfide self-assembled DNA receptor monolayers for biosensing applications. *Eur. Biophys. J.* **39**, 1433–1444 (2010).
26. Levicky, R., Herne, T. M., Tarlov, M. J. & Satija, S. K. *Using Self-Assembly To Control the Structure of DNA Monolayers on Gold: A Neutron Reflectivity Study.* (1998).
27. Steel, A. B., Levicky, R. L., Herne, T. M. & Tarlov, M. J. Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: Effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophys. J.* **79**, 975–981 (2000).
28. Kick, A. *et al.* Controlling structural properties of self-assembled oligonucleotide-mercaptohexanol monolayers. *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena* **172**, 36–41 (2009).
29. Lee, C. Y. *et al.* Surface coverage and structure of mixed DNA/Alkylthiol monolayers on gold: Characterization by XPS, NEXAFS, and fluorescence intensity measurements. *Anal. Chem.* **78**, 3316–3325 (2006).
30. Balamurugan, S., Obubuafo, A., Soper, S. A., McCarley, R. L. & Spivak, D. A. Designing highly specific biosensing surfaces using aptamer monolayers on gold. *Langmuir* **22**, 6446–6453 (2006).
31. Demers, L. M. *et al.* A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Anal. Chem.* **72**, 5535–5541 (2000).
32. Burns, J. A., Butler, J. C., Moran, J. & Whitesides, G. M. *Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine.* *J. Org. Chem* vol. 56 (1991).
33. Wang, Y. *et al.* Electrochemical strategy for pyrophosphatase detection Based on the peroxidase-like activity of G-quadruplex-Cu²⁺ DNAzyme. *Talanta* **178**, 491–497 (2018).

Capítulo 5

Sistema de biorreconocimiento

5.1 Introducción

En este capítulo se analiza el funcionamiento de una capa de biorreconocimiento aplicable a genosensores con detección colorimétrica. La misma consiste en una secuencia sc-ADN “*sonda*” capaz de reconocer específicamente, por afinidad, a la secuencia sc-ADN “*analito*”. La secuencia de la sonda incluye al segmento *PW17* que se activa como DNAzima peroxidasa al producirse el evento de reconocimiento.

Los genosensores que utilizan DNAzima como generadora de señal son relativamente novedosos, comenzaron a desarrollarse hace menos de 15 años, y aún se encuentran en etapa de investigación^{1,2}. Su principio de funcionamiento está inspirado en los ensayos de tipo ELISA y en algunos inmunosensores, en particular aquellos que utilizan anticuerpos acoplados a la enzima *horseradish* peroxidasa (HRP) como elemento de señalización^{3–5}, (**Capítulo 1**). A diferencia de las proteínas, la DNAzima puede estar incluida dentro de la secuencia sonda. Es decir, el elemento de biorreconocimiento se encuentra en la misma sonda, sin necesidad de acoplarlo en un paso previo. Esto es una ventaja porque simplifica y da versatilidad al diseño del sensor^{6,7}.

En bibliografía se describen dos estrategias para la generación de señal en genosensores que utilizan DNAzima peroxidasa. Ambas estrategias, esquematizadas en la **figura 5.1**, buscan evitar la formación de estructuras cuartetos de G en ausencia de secuencia analito. La primera, **figura 5.1 A**, consiste en comenzar el ensayo con la secuencia sonda en estructura horquilla, tras el reconocimiento del analito (segmento verde) la secuencia sonda sufre un cambio conformacional permitiendo la formación de cuartetos de G (formados entre los segmentos azul y marrón) y dando lugar a la reacción de peroxidación^{1,8–12}. La segunda estrategia, **figura 5.1 B**, consiste en dividir la secuencia sonda en dos fragmentos (segmentos rojo y gris). Estos fragmentos tienen la particularidad de que al acoplarse dan lugar a la secuencia *PW17* con alta afinidad por hemina. Con los fragmentos separados resulta poco favorable la formación de cuartetos de G¹³. Tras el reconocimiento del analito (segmento

negro), por interacción entre zonas complementarias, se obtiene una configuración que favorece la formación de la estructura cuartetos de G y la reacción de peroxidación^{14–16}.

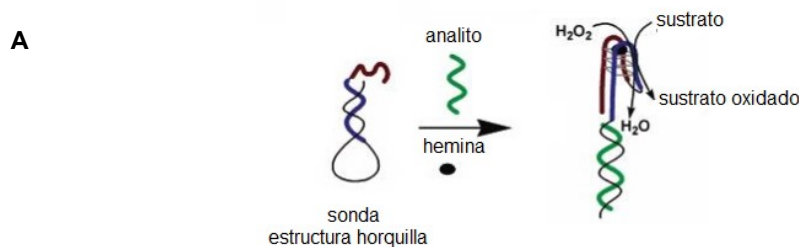


Figura inspirada en el trabajo de Xiao *et al.* (2004)

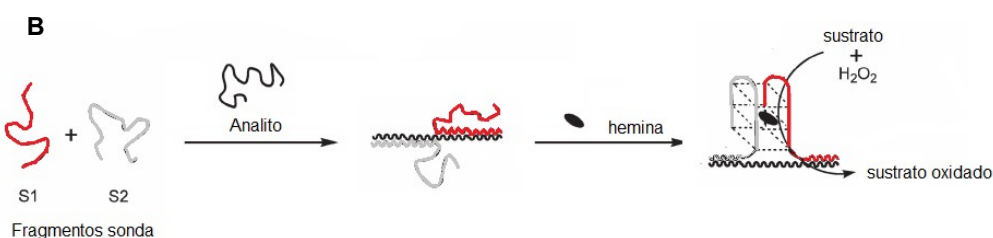


Figura inspirada en el trabajo de Li *et al.* (2007)

Figura 5.1: Esquema de las estrategias utilizadas para favorecer la reacción de peroxidación en presencia de secuencia analito. A) Inicialmente la sonda se encuentra en estructura horquilla. Al reconocer al analito (segmento verde) se produce un cambio conformacional dejando expuesto el segmento de la sonda de secuencia *PW17* que da lugar a la formación de cuarteto de G (segmentos azul y marrón) y a la reacción de peroxidación¹⁰. B) El analito (segmento negro) es complementario de dos fragmentos sonda independientes (segmentos rojo y gris). Luego del reconocimiento estos fragmentos forman estructura cuartetos de G que da lugar a la reacción de peroxidación¹³.

Esta tesis doctoral se basó en la primera estrategia. La secuencia utilizada como analito consta de un segmento de 30 bases perteneciente a la secuencia oligonucleotídica de 99 bases que codifica $\alpha 2$ -gliadina¹⁷, una proteína de trigo que afecta la salud de las personas celiacas¹⁸. La elección de este segmento no responde a un problema analítico en particular, sino que se tomó a modo de prueba de funcionamiento del sistema. La sonda consta de 59 bases con dos segmentos de 8 bases autocomplementarias. En la **figura 5.2** se esquematiza la sonda y su funcionamiento. En ausencia de analito la sonda adquiere estructura de horquilla (*stem-loop*) sin actividad peroxidasa. En contacto con el analito (segmento verde) se produce la hibridación con el segmento de 30

bases de sonda complementario (en rojo), desplazando por diferencia de afinidad a la estructura horquilla y dando lugar a la formación de estructura cuartetos de G. En presencia de hemina, peróxido de hidrógeno y TMB, se produce la reacción de peroxidación generándose una señal colorimétrica.

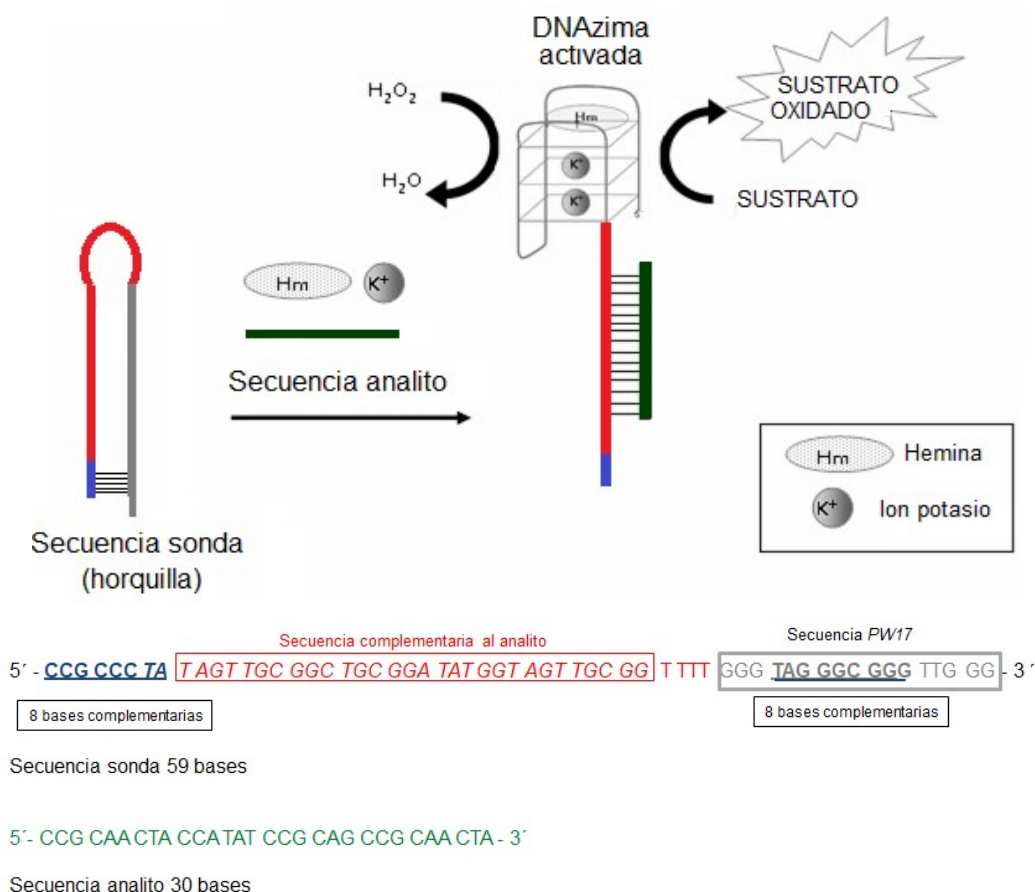


Figura 5.2: Esquema del reconocimiento sonda-analito. En ausencia de secuencia analito la sonda adquiere estructura horquilla, sin actividad peroxidasa. Al producirse el reconocimiento sonda-analito ocurre un cambio conformacional en la sonda que permite la activación de la funcionalidad peroxidasa y la generación de señal. Se detalla la composición de las secuencias sonda y analito.

En la secuencia sonda se distinguen distintos segmentos. Los dos subrayados y en azul y gris respectivamente (que constan de 8 bases) son complementarios entre sí y permiten la formación de la estructura horquilla. El segmento central, de color rojo, (30 bases) es complementario a la secuencia analito. El segmento de 17 bases más cercano al extremo 3', en color gris, es la secuencia *PW17*, generadora de señal.

Adicionalmente la sonda tiene una modificación biotina en el extremo 5' lo que permite realizar ensayos tanto en solución como en fase heterogénea, inmovilizada sobre partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina.

Los objetivos específicos desarrollados en este capítulo consisten en analizar el funcionamiento de la secuencia sonda como elemento de biorreconocimiento a partir de la señal obtenida tanto en ausencia como en presencia de diferentes concentraciones de secuencia analito:

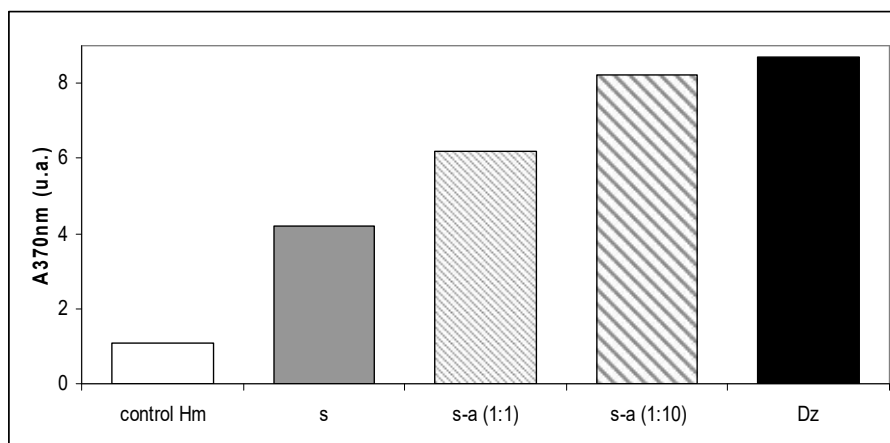
1. en fase homogénea (en solución), y
2. en fase heterogénea, inmovilizada sobre partículas magnéticas.

5.2 Resultados obtenidos para el biorreconocimiento en fase homogénea

En los capítulos anteriores se analizaron diferentes variables que afectan a la reacción de peroxidación catalizada por la DNAzima de secuencia *PW17* tanto en solución como inmovilizada. Los resultados obtenidos permitieron determinar condiciones adecuadas para llevar a cabo esta reacción. Tomando como base dichos resultados, en esta sección se describe el análisis de las condiciones para el reconocimiento sonda-analito y la generación de señal. Se decidió comenzar por el reconocimiento en fase homogénea, por ser un sistema menos complejo que no involucra superficies, de forma de disminuir la cantidad de factores que pudieran afectar tanto al reconocimiento como a la generación de señal. Como ensayo exploratorio del funcionamiento de la reacción de biorreconocimiento en fase homogénea se llevó a cabo la reacción de peroxidación para: sonda en ausencia de secuencia analito, mezcla de secuencias sonda-analito, incubadas en proporciones 1:1 y 1:10, secuencia *PW17* (Dz) (sin ser parte de la secuencia sonda) y hemina libre. Estos dos últimos ensayos (Dz sin ser parte de la sonda y hemina libre) se realizaron como referencia y a modo de control por ser ya conocida su respuesta (ver **Capítulo 3**).

En la **figura 5.3** se muestran las señales obtenidas para los distintos sistemas analizados: hemina libre 1 μM , sonda 1 μM en ausencia de secuencia analito, sonda 1 μM incubada con soluciones 1 μM y 10 μM de analito respectivamente y **Dz** 1 μM . La incubación se llevó a cabo por 48 h a temperatura ambiente con concentración de Mg^{+2} 10 mM^{19} . En todos los casos se agregó hemina, TMB y

H₂O₂, se llevó a cabo la reacción de peroxidación y a los 10 minutos se determinó la absorbancia a 370 nm.



Dz: 5'- GGG TAG GGC GGG TTG GG- 3'

Secuencia analito (a): 5'- CCG CAA CTA CCA TAT CCG CAG CCG CAA CTA - 3'

Secuencia sonda (s): 5'-CCG CCC TAT AGT TGC GGC TGC GGA TAT GGT AGT TGC GGT TTT GGG TAG GGC GGC TTG GG - 3'

Figura 5.3: Comparación de la señal de peroxidación a los 10 minutos de reacción para distintos sistemas. Hemina libre 1 μ M (control Hm), sonda en ausencia de analito (s), sonda 1 μ M en presencia de analito 1 μ M relación s-a (1:1), sonda 1 μ M en presencia de analito 10 μ M relación s-a (1:10), DNAzima 1 μ M en solución (Dz).

La baja intensidad de señal obtenida a partir del control hemina respecto de las de las otras construcciones (10 % respecto de la señal de DNAzima en solución) ratifica las observaciones discutidas en el **Capítulo 3**, la catálisis por hemina libre no afecta significativamente a la señal obtenida con DNAzima. El ensayo con **Dz**, es decir la secuencia *PW17* en presencia de hemina, dio la señal mas intensa, lo que era de esperar por ser catalizador de la reacción de peroxidación.

Para el funcionamiento de un biosensor es deseable que la intensidad de señal aumente con la concentración de analito y sea lo mas baja posible en ausencia del mismo. En la **figura 5.3** se puede observar el incremento de intensidad de señal al aumentar la concentración de analito de 1 μ M a 10 μ M, sugiriendo que en presencia de analito la sonda es capaz de reconocerlo, desarmar la estructura horquilla y formar estructura DNAzima. Sin embargo, la señal en ausencia de analito (sistema sonda) resultó ser mayor de lo esperado,

alrededor del 60 % respecto de la señal del sistema **Dz**, lo que evidencia que no toda la secuencia formó estructura horquilla, sino que una parte sufrió un cambio conformacional adquiriendo estructura cuarteto de G y activando la funcionalidad DNAzima. Este es un problema común en las construcciones con DNAzima peroxidasa. Se han reportado diferentes estrategias para disminuir la señal del sistema en ausencia de analito como, por ejemplo: el rediseño de las secuencias, de forma de bloquear la formación de la DNAzima, o el agregado de reactivos supresores de la actividad de la hemina^{8,15,20}. Esto último no aplica al sistema discutido ya que, como se mencionó antes, la señal obtenida a partir de hemina libre resultó muy poco intensa. En cuanto al rediseño de la secuencia, implica altos costos y mayores tiempos porque habría que comprar las nuevas secuencias y realizar los ensayos de prueba de funcionamiento. Por estos motivos es que no se optó por rediseñar la sonda, quedando como pendiente para futuros trabajos. En este trabajo se buscó maximizar la señal de reconocimiento sonda-analito minimizando la señal en ausencia de analito a partir de las condiciones de reacción, tales como tiempo de reacción de peroxidación, tiempo de incubación, concentración de ion magnesio (Mg^{+2}) y temperatura de incubación.

5.2.1 Tiempo de reacción de peroxidación

Tanto para el reconocimiento sonda-analito, como para sonda en ausencia de analito se llevó a cabo la reacción de peroxidación midiendo absorbancia a 370 nm a los 2, 5, 10 y 15 minutos. Como control se repitió el ensayo en ausencia de sonda y de analito. En la **figura 5.4** se muestra la evolución de la señal de peroxidación para el sistema sonda 1 μM en ausencia de analito, para el sistema sonda 1 μM en presencia de analito 10 μM “s-a” (1:10) y para el control con hemina 1 μM . La incubación se llevó a cabo por 48 h a temperatura ambiente con concentración de Mg^{+2} 10 mM (los tres ensayos fueron mostrados en la **figura 5.3**).

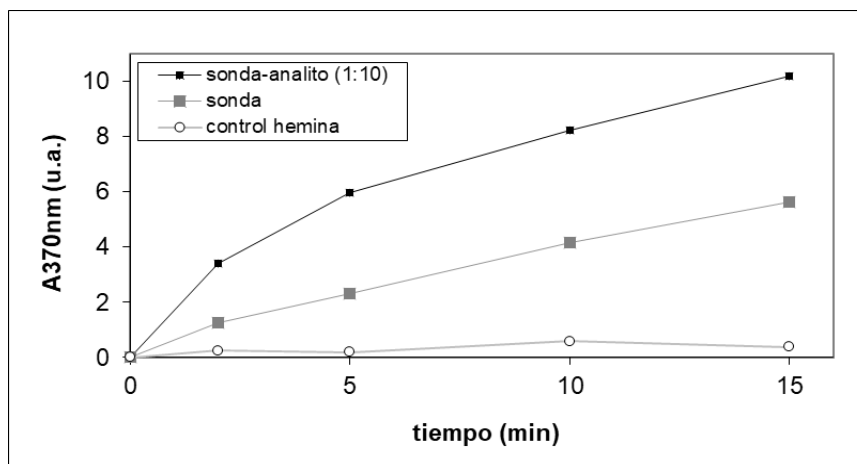


Figura 5.4: Evolución de la señal con el tiempo de peroxidación para los sistemas sonda en ausencia de analito 1 μM , sonda-analito 1 μM :10 μM (s-a 1:10) y control hemina, en ausencia de sonda y analito.

El control con hemina presentó una señal de intensidad baja y constante en el tiempo de reacción. Para la sonda tanto en presencia como en ausencia de analito las señales aumentaron con el tiempo de reacción, siendo más intensas para el primer caso. Se buscaron las condiciones en las que fuera posible detectar analito en el menor tiempo de ensayo posible. A tiempos cortos, menores a 5 minutos, las diferencias entre las señales de sonda-analito con la de sonda resultaron muy pequeñas. A partir de los 5 minutos de reacción esta diferencia se incrementó, pero muy gradualmente. A partir de estos resultados se decidió realizar las mediciones posteriores a tiempos de reacción entre 5 y 10 minutos.

5.2.2 Tiempo de incubación

Para los ensayos preliminares el tiempo de incubación sonda-analito fue de 48 h, lo cual es demasiado para una capa de biorreconocimiento compatible con un genosensor. De todas maneras, se utilizó este tiempo para realizar análisis exploratorios de modo de asegurar que ocurrieran todos los cambios conformacionales necesarios, por tratarse de un sistema más complejo que en los ensayos anteriores (**Capítulos 3 y 4**). Luego se analizaron las señales obtenidas para tiempos de incubación más cortos de forma de determinar cuánto es posible reducir el tiempo de incubación. Los resultados de este ensayo se muestran en la **figura 5.5**, donde se comparan tres tiempos de incubación 1, 24 y 48 h. Cada ensayo se llevó a cabo de manera independiente

por triplicado utilizando una concentración de ion Mg^{+2} 10 mM. Se utilizaron concentraciones de las secuencias *sonda* y *analito* 1 μM y 1 μM (s:a 1:1) respectivamente y se realizaron paralelamente ensayos control con sonda 1 μM (s) en ausencia de analito. Se llevó a cabo la reacción de peroxidación y se determinó la señal a los 10 minutos de reacción.

Para tener independencia de la variabilidad de la señal de sonda en ausencia de analito se calculó la “señal corregida” como la resta entre la absorbancia a 370 nm de sonda en presencia de analito ($A(s:a)$ 1:1) y la absorbancia a 370 nm de sonda ($A(s)$) dividido por la absorbancia a 370 nm de la sonda ($A(s)$).

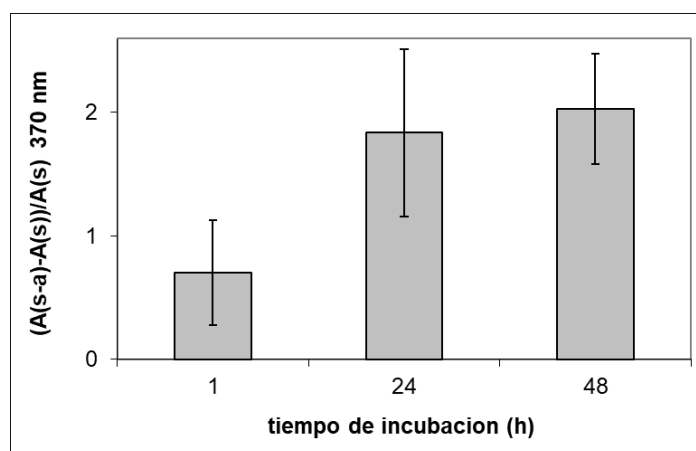


Figura 5.5: Señal corregida para distintos tiempos de incubación 1, 24 y 48 h respectivamente. Las barras de dispersión corresponden a triplicados

Los resultados mostrados en la **figura 5.5** sugieren que el tiempo de incubación afecta a la intensidad de señal, a mayor tiempo de incubación mayor resultó la señal corregida. También se observó que la dispersión en los resultados para cada ensayo es muy grande.

Con 1 h de incubación se obtuvieron diferencias de señal bastante menores, alrededor del 50 % respecto de los ensayos con 24 h de incubación. A pesar de esto y de la gran variabilidad de los resultados fue posible distinguir la presencia o ausencia de sonda.

Dado que los tiempos largos de ensayo son inaceptables para el funcionamiento de una capa de biorreconocimiento (potencialmente aplicable a situaciones reales), se optó por realizar las incubaciones por 1 h. De esta forma se buscó acotar el tiempo total de ensayo.

En los siguientes ensayos se analizaron distintas condiciones de reacción con el objetivo de establecer aquellas en que se favorezca el aumento de señal en presencia de analito y se desfavorezca en ausencia del mismo.

5.2.3 Concentración de ion magnesio (Mg^{+2})

Como se discutió en capítulos anteriores la composición del medio de reacción es uno de los factores más relevantes para el funcionamiento de la DNAzima peroxidasa, siendo particularmente importante la concentración de ion potasio (K^{+})²¹. Para los sistemas estudiados en este capítulo hay que tener en cuenta que también son importantes la formación de la estructura horquilla y el reconocimiento sonda-analito. En este contexto cobra relevancia la concentración de catión magnesio (Mg^{+2}). Se ha reportado que este ión es fundamental en la solución de incubación para la formación de estructuras ADN doble cadena^{22,23}.

Se analizó el efecto de la concentración de Mg^{+2} en la reacción de reconocimiento sonda-analito incubada por 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 7 ensayos por triplicado. En cada uno se incubó sonda con analito en relación 1:1 (1 μM) y se comparó con sonda en ausencia de analito en idénticas condiciones. Las concentraciones de Mg^{+2} ensayadas fueron 0,1, 5, 20, 30, 50 y 100 mM. Luego de la incubación se llevó a cabo la reacción de peroxidación por 10 minutos por agregado de hemina, TMB y H_2O_2 y se compararon las señales independizándolas de las señales de sonda. Los resultados se muestran en la **figura 5.6**.

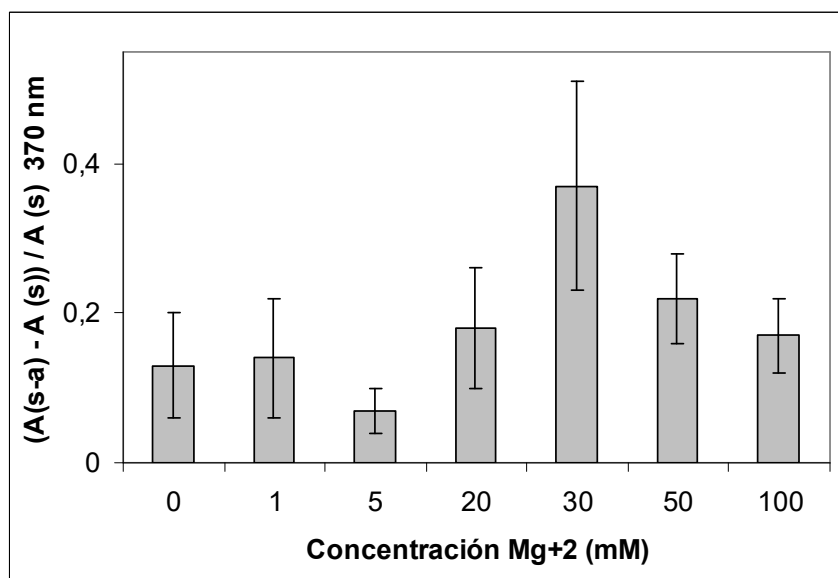


Figura 5.6: Señal corregida para distintas concentraciones de ion magnesio 0,1,5, 20, 30, 50 y 100 mM. Las barras de dispersión corresponden a triplicados de cada ensayo.

Los resultados confirmaron que la señal se ve afectada por la concentración de Mg²⁺. El reconocimiento sonda-analito se vio mas favorecido con Mg²⁺ 30 mM, se obtuvo mayor intensidad de señal aún teniendo en cuenta la gran dispersión entre los triplicados. Los siguientes ensayos se llevaron a cabo con esa concentración.

5.2.4 Temperatura de incubación

La temperatura de incubación adecuada para llevar a cabo la hibridación de un duplex de oligonucleótidos, por ejemplo, para la técnica de PCR (*polymerase chain reaction*), se determina a partir del cálculo de *melting temperature* (*T_m*). La *T_m* es un parámetro que indica la temperatura a la cual un duplex de oligonucleótidos se encuentra 50 % como simple cadena y el otro 50 % formando doble cadena. Para obtener el valor de *T_m* se tienen en cuenta parámetros termodinámicos calculados para la secuencia y los publicados para el vecino más cercano. La metodología de cálculo esta optimizada para secuencias lineales²⁴.

En el caso de este trabajo fue necesario hallar una temperatura de hibridación tal que en ausencia de analito los dos segmentos de ocho bases complementarias hibridicen para formar la estructura horquilla pero que en ausencia del mismo se favorezca la hibridación con la secuencia sonda de

treinta bases. Para calcular las T_m para los oligonucleótidos de ocho bases y treinta bases respectivamente se utilizó la herramienta “OligoAnalyzer™”²⁵. Los resultados obtenidos fueron 43,4°C para la secuencia de ocho bases y 76,7°C para la de 30 bases, si bien estas temperaturas son aproximaciones calculadas para secuencias lineales libres (y no para segmentos dentro de una secuencia) sirven como referencia para estimar el rango donde debería hallarse la temperatura de incubación óptima que es intermedia entre esas dos. Teniendo los valores calculados como referencia, se realizaron ensayos para determinar la temperatura de hibridación más adecuada en función del objetivo propuesto. Se realizaron cinco ensayos a diferentes temperaturas de incubación: temperatura ambiente (sin control), 40, 50, 60 y 70°C. Para cada temperatura de incubación se calculó la señal corregida. Cada ensayo se realizó por triplicado. La incubación se llevó a cabo controlando la temperatura elegida mediante un termociclador con concentración de Mg^{+2} 30 mM durante 1 h. Luego se agregó hemina, se llevó a cabo la reacción de peroxidación con TMB y H_2O_2 y se midió absorbancia a 370 nm. Los resultados se muestran en la **figura 5.7**.

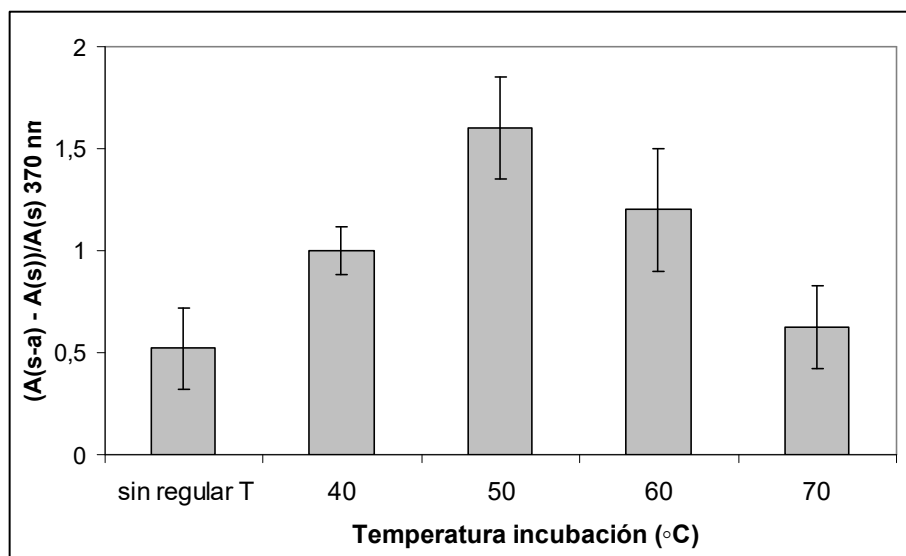


Figura 5.7: Señal corregida para distintas temperaturas de incubación: temperatura ambiente (sin ninguna regulación) 40, 50, 60 y 70°C, las barras de dispersión corresponden a triplicados de cada ensayo.

Los resultados confirmaron que la temperatura de incubación afecta a la intensidad de señal medida. Se eligió 50°C como temperatura de incubación

para los siguientes ensayos por ser la que dio mayor diferencia de señal para sonda-analito respecto de analito.

Todos estos ensayos sirvieron para definir las condiciones de reacción que maximizan la diferencia de señal para sonda en presencia de analito respecto a sonda en ausencia de analito a la vez que controlan el tiempo por ensayo para que no se torne demasiado largo. Los ensayos posteriores se llevaron a cabo utilizando las mejores condiciones obtenidas: tiempo de reacción 5-10 minutos, tiempo de incubación de 1 h, concentración de ión Mg^{+2} 30 mM y temperatura de incubación 50°C.

El estudio de funcionamiento de la capa de biorreconocimiento se completó con el análisis de la relación entre la señal medida y la cantidad de analito presente en la muestra²⁶.

Para poder establecer esta relación se realizó una curva de concentración de analito. La reacción de peroxidación se llevó a cabo por 5 minutos y se determinó la señal de absorbancia a 370 nm. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado. En la **figura 5.8** se muestra la intensidad de la señal para las distintas concentraciones de analito ensayadas: ausencia de analito, 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 10 μM .

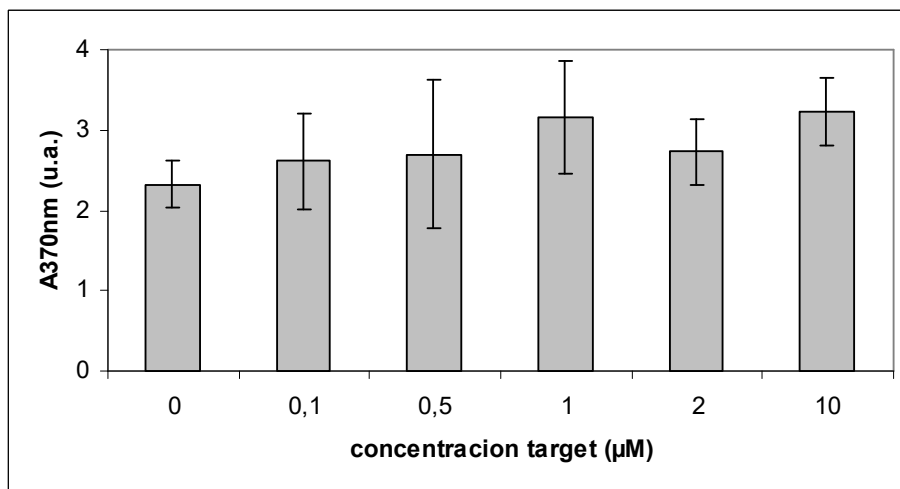


Figura 5.8: Intensidad de señal obtenida para las diferentes concentraciones de secuencia analito: 0 μM (ausencia de analito), 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 10 μM incubada con “sonda” 1 μM . Las barras de dispersión corresponden a triplicados de cada ensayo.

En el análisis de los ensayos preliminares (ver **figura 5.3**) se observó el aumento de la señal con la concentración de analito. Sin embargo, ese análisis contaba con pocos datos. La curva de concentración mostrada en la **figura 5.8** amplió el número de replicados y agregó diferentes concentraciones de analito. En este caso se observó una variabilidad de señal muy alta. La diferencia de señal entre ensayos resultó muy pequeña en comparación con la dispersión de los resultados. En este contexto no fue posible diferenciar la presencia o ausencia de analito. Por lo tanto, tampoco fue posible establecer una relación entre la intensidad de señal y la concentración de analito.

A partir de estos resultados se pudo concluir que el sistema tal cual está planteado no responde adecuadamente como capa de biorreconocimiento. Es necesario volver a diseñar la secuencia para favorecer la formación de estructura horquilla en ausencia de analito y el reconocimiento del mismo, que de lugar a la formación de DNAzima peroxidasa, cuando esté presente en la muestra.

Aún así se continuó con los ensayos para analizar el comportamiento de la sonda inmovilizada sobre partículas magnéticas.

5.3 Biorreconocimiento en fase heterogénea

Para la inmovilización se utilizaron las partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina, por ser la superficie que mejor funcionó para la reacción de peroxidación catalizada por DNAzima en fase heterogénea, descrito en el **Capítulo 4**.

Las condiciones de incubación elegidas fueron las mismas que para los ensayos en fase homogénea 1 h a 50°C y concentración de ion Mg^{+2} 30 mM.

En cada ensayo se comparó la señal obtenida para sonda inmovilizada en contacto con analito (en relación 1:1) con la obtenida para sonda inmovilizada como control de reacción. En la **figura 5.9** se esquematiza la reacción de peroxidación en fase heterogénea junto con el ensayo control. Tanto al ensayo con analito en solución (2 μM) como al control se agregó sonda (concentración final 2 μM) y se incubó por 1 h a 50°C, luego se agregó hemina para permitir la formación de DNAzima. Se mezcló con partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina para llevar a cabo la inmovilización. Por último, se llevó a cabo la

reacción de peroxidación por agregado de TMB y H_2O_2 y se determinó la señal de absorbancia.

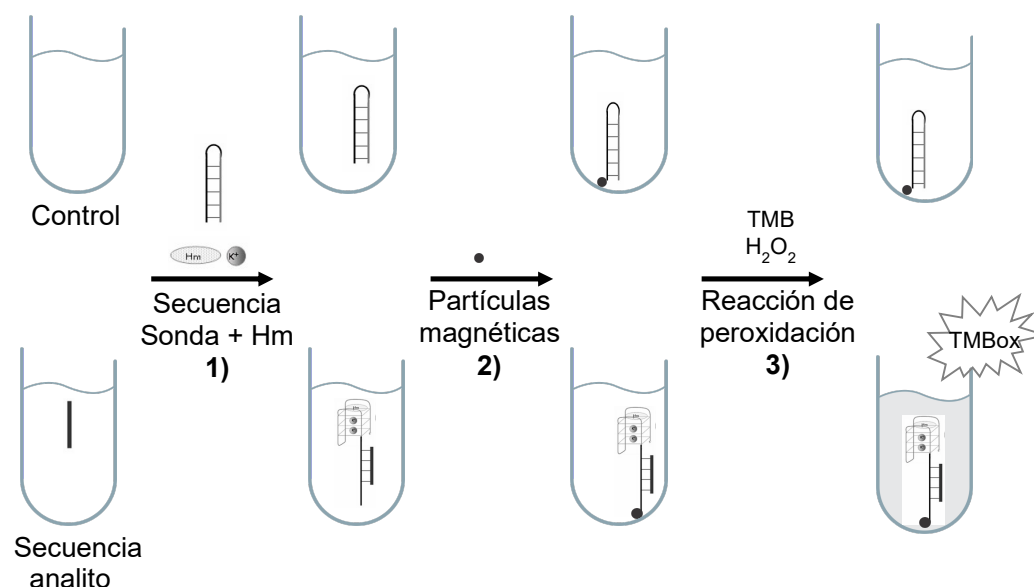


Figura 5.9: Esquema de reconocimiento sonda-analito señalizada a través de la reacción de peroxidación en fase heterogénea. Ensayos control y con secuencia analito en paralelo. 1) Agregado de sonda y de hemina para formar DNAzima. 2) Inmovilización sobre partículas magnéticas. 3) Reacción de peroxidación por agregado de TMB y H_2O_2 .

En la **figura 5.10** se muestran los resultados obtenidos para el ensayo en fase heterogénea. Sonda en comparación con sonda-analito, ensayo por triplicado.

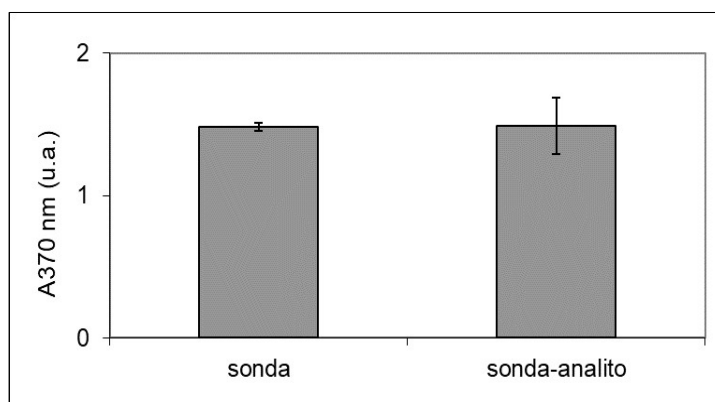


Figura 5.10: Ensayo de reconocimiento sonda-analito señalizada a través de la reacción de peroxidación en fase heterogénea. Se compara la intensidad del ensayo control con el que contiene analito (sonda-analito en proporción 1:1). Las barras de dispersión corresponden a triplicados.

No se observaron diferencias significativas entre los dos ensayos por lo que no fue posible distinguir la presencia de analito. Esto mismo ocurrió para los ensayos en fase homogénea, aunque en ese caso las señales de los ensayos control fueron un poco menores. En la **figura 5.11** se comparan los ensayos en fase homogénea y heterogénea para la sonda en presencia de analito en relación 1:1 y para el control en ausencia de analito. Se observó que el incremento de la señal en presencia de analito fue mayor en fase homogénea, aunque no suficiente para poder asegurar presencia de analito debido a la alta dispersión de las señales medidas.

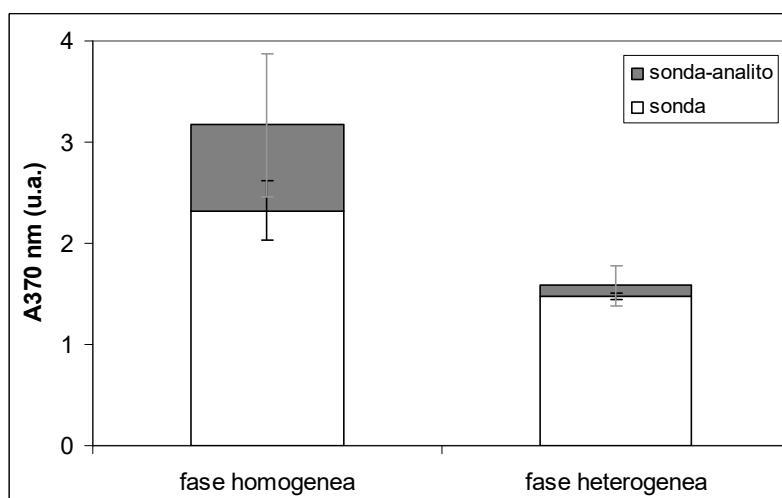


Figura 5.11: Incremento de señal para el ensayo de reconocimiento sonda-analito (1:1) (gris) respecto de la señal del ensayo control, con sonda sola (blanco). Comparación de resultados en fase homogénea y heterogénea. Las barras de dispersión corresponden a triplicados.

A pesar de haber realizado los ensayos con las condiciones optimizadas no fue posible diferenciar la señal en presencia o ausencia de analito. Los resultados fueron más desfavorables que los obtenidos en fase homogénea confirmando que es necesario realizar ajustes sobre el diseño de la secuencia sonda.

A partir de las respuestas obtenidas se concluyó que la sonda puede ser utilizada como generadora de señal a partir de la reacción de peroxidación. Sin embargo, el sistema de biorreconocimiento no funcionó como se esperaba. Es necesario re diseñar la sonda de forma de minimizar la señal en ausencia de analito, favoreciendo la formación de horquilla, pero cuidando a la vez que pueda ser desarmada en presencia del mismo.

La aparición de señales no despreciables en ausencia de analito es un problema común para estos sistemas. Se han reportaron estrategias para mejorar la relación señal en presencia/ señal en ausencia de analito aunque en ningún caso se obtuvo señal nula en ausencia de analito^{10,12,13}. Algunas estrategias fueron aumentar la cantidad de bases autocomplementarias para formar estructura horquilla a 9 en lugar de 8¹⁸. En otros casos con 5 bases complementarias fue suficiente para detectar presencia de analito¹. En algunos trabajos, como en este, la secuencia *PW17* se encuentra cercana al extremo 3' de la sonda^{7,8} pero en otros plantean un mejor funcionamiento del sistema si *PW17* se encuentra cercana al extremo 5' de la secuencia sonda²⁷.

La aplicación de los sistemas con sondas de ADN que incorporan la secuencia *PW17* como generadora de señal se encuentra en una etapa inicial. Se evidencia que es necesario analizar diferentes configuraciones de sonda y una vez elegida la más adecuada considerar y ajustar numerosas variables para optimizar su funcionamiento.

5.4 Bibliografía

1. Li, H. *et al.* Biosensors and Bioelectronics Ultrasensitive label-free amplified colorimetric detection of p53 based on G-quadruplex MBzymes. *Biosens. Bioelectron.* **50**, 180–185 (2013).
2. Pandey, R. *et al.* Biosensors and Bioelectronics Electrochemical DNAzyme-based biosensors for disease diagnosis. *Biosens. Bioelectron.* **224**, 114983 (2023).
3. Xiaoming, M. *et al.* A universal multicolor immunosensor for semiquantitative visual detection of biomarkers with the naked eyes. *Biosens. Bioelectron.* **87**, 122–128 (2017).
4. Luo, R. *et al.* A colorimetric assay method for invA gene of Salmonella using DNAzyme probe self-assembled gold nanoparticles as single tag. *Sensors Actuators, B Chem.* **198**, 87–93 (2014).
5. Hormozi Jangi, A. R., Hormozi Jangi, M. R. & Hormozi Jangi, S. R. Detection mechanism and classification of design principles of peroxidase mimic based colorimetric sensors: A brief overview. *Chinese J. Chem. Eng.* **28**, 1492–1503 (2020).
6. Tao, L., Shaojun, D. & Erkang, W. G-Quadruplex aptamers with peroxidase-like DNAzyme functions: Which the best and how does it work? *Chem. - An Asian J.* **4**, 918–922 (2009).
7. Longinotti, G., Ybarra, G. & Montserrat, J. Optical and electrochemical detection of a verotoxigenic E. coli gene using DNAzyme-labeled stem-loops. *J. Electrochem. Sci. Eng.* **7**, 193–200 (2017).
8. Lee, S. M. *et al.* Washing-free Electrochemical Strategy to Detect Target DNA Utilizing Peroxidase Mimicking DNAzyme. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **25**, 707–714 (2020).
9. Zhang, D. W. *et al.* Novel homogeneous label-free electrochemical aptasensor based on functional DNA hairpin for target detection. *Anal. Chem.* **85**, 9378–9382 (2013).
10. Pavlov, V. *et al.* Amplified Chemiluminescence Surface Detection of DNA and Telomerase Activity Using Catalytic Nucleic Acid Labels. *Anal. Chem.* **76**, 2152–2156 (2004).
11. Zhang, H., Jiang, B., Xiang, Y., Chai, Y. & Yuan, R. Label-free and amplified electrochemical detection of cytokine based on hairpin aptamer and catalytic DNAzyme. *Analyst* **137**, 1020–1023 (2012).
12. Deng, L. *et al.* Improving the signal-to-background ratio during catalytic hairpin assembly through both-end-blocked DNAzyme. *ACS Sensors* **3**, 1190–1195 (2018).
13. Li, T. & Wang, E. Enhanced catalytic DNAzyme for label-free colorimetric detection of DNA. *Anal. Chem.* **79**, 4209–4211 (2007) doi:10.1039/b712165b.
14. Deng, M., Zhang, D., Zhou, Y. & Zhou, X. Highly effective colorimetric and visual detection of nucleic acids using an asymmetrically split peroxidase DNAzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13095–13102 (2008).
15. Zhang, C., Zhang, H., Wu, P., Zhang, X. & Liu, J. Suppressing the background activity of hemin for boosting the sensitivity of DNAzyme-based biosensors by SYBR Green I. *Biosens. Bioelectron.* **169**, (2020).
16. Kolpashchikov, D. M. Split DNA Enzyme for Visual Single Nucleotide Polymorphism Typing. 2934–2935 (2008).
17. Shan, L. *et al.* Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science (80-.).* **297**, 2275–2279 (2002).
18. Martín-Fernández, B., De-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M. J. & López-Ruiz, B. Hairpin-based DNA electrochemical sensor for selective detection of a repetitive and structured target codifying a gliadin fragment. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, (2015).
19. Zhang, J., Li, C., Zhi, X. & Ramón, G. A. Hairpin DNA-templated silver nanoclusters as novel beacons in strand displacement amplification for microRNAs detection Hairpin DNA-templated silver nanoclusters as novel beacons in strand displacement amplification for microRNAs detection. (2015) doi:10.1021/acs.analchem.5b03729.
20. Cui, X. *et al.* Low-background and visual detection of antibiotic based on target-activated colorimetric split peroxidase DNAzyme coupled with dual nicking enzyme signal amplification. *Analytica Chimica Acta* vol. 997 1–8 at <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.009> (2018).
21. Travascio, P., Li, Y. & Sen, D. DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin complex. *Chem. Biol.* **5**, 505–517 (1998).
22. Pasternak, K., Kocot, J. & Horecka, A. Biochemistry of magnesium. *Journal of Elementology* vol. 15 601–616 at <https://doi.org/10.5601/jelem.2010.15.3.601-616> (2010).

23. Owczarzy, R., Moreira, B. G., You, Y., Behlke, M. A. & Wälder, J. A. Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations. *Biochemistry* **47**, 5336–5353 (2008).
24. Allawi, H. T. & Santalucia, J. Thermodynamics and NMR of internal G-T mismatches in DNA. *Biochemistry* **36**, 10581–10594 (1997).
25. <https://www.idtdna.com/calc/analyser> (acceso abril 2023).
26. Liu, Z. *et al.* A turn-off colorimetric DNAzyme-aptasensor for ultra-high sensitive detection of viable *Cronobacter sakazakii*. *Sensors Actuators, B Chem.* **322**, (2020).
27. Jafari, M., Rezaei, M., Kalantari, H., Tabarzad, M. & Daraei, B. DNAzyme–aptamer or aptamer–DNAzyme paradigm: Biochemical approach for aflatoxin analysis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **65**, 274–280 (2018).

Capítulo 6

Conclusiones y proyecciones a futuro

6.1 Conclusiones

En este trabajo se planteó, como hipótesis inicial, que la DNAzima peroxidasa podría ser utilizada como elemento de señalización aplicable en genosensores. Para probarla se realizó un análisis progresivo del funcionamiento de la DNAzima, estudiando individualmente las variables que modulan su comportamiento. Se estudió el funcionamiento de la DNAzima peroxidasa libre en solución, en fase heterogénea e incluida en una secuencia sc-ADN (sonda) que actúa como elemento de biorreconocimiento.

La DNAzima efectivamente funcionó como catalizador, tanto en solución como inmovilizada. Se demostró que la composición del medio es de suma importancia para incrementar la eficiencia de la reacción de peroxidación y también para reducir la catálisis intrínseca de la hemina. En las condiciones de reacción seleccionadas, la señal generada por la hemina resultó despreciable frente a la de la DNAzima. El sustrato elegido, TMB, permitió señalar la reacción de peroxidación por un método óptico, empleando espectrofotometría y por un método electroquímico, empleando voltametría de onda cuadrada. Para ambos métodos, la detección se realizó sobre pequeños volúmenes de solución, utilizando poca cantidad de oligonucleótido, del orden de nanomoles, lo que redujo el costo por ensayo. El tiempo de reacción necesario para el desarrollo de la señal, dos minutos, resultó lo suficientemente corto para que sea aplicable al funcionamiento de un sensor.

El procedimiento para llevar a cabo la determinación de la señal de absorbancia resultó sencillo y no presentó mayores dificultades. Por el contrario, la señal electroquímica se vio afectada por diversos factores como: la interacción entre los componentes de la muestra y la superficie del electrodo, la variabilidad del perfil electroquímico entre electrodos, la limpieza superficial de los electrodos entre mediciones y la definición del blanco de reactivos. Todos estos factores fueron

analizados y se hallaron las condiciones de trabajo que permitieron obtener perfiles electroquímicos similares tanto para electrodos diferentes como para el mismo electrodo reutilizado y lavado. Aun así, la dispersión entre las corrientes medidas no disminuyó del 10 %. Los blancos de reacción, que contenía hemina en ausencia de DNAzima dieron señales de corriente del mismo orden que las reacciones que si contenían DNAzima. Contrariamente, la señal de absorbancia para el mismo blanco resultó nula. Esto sugiere que el origen de esa señal es la oxidación electroquímica y no la catálisis.

Para ambas técnicas de medición (electroquímica y óptica) se obtuvieron señales proporcionales a la concentración de la DNAzima. Para las señales de absorbancia se halló una relación lineal en el rango de concentraciones de la DNAzima de entre 0,05 μM y 4,0 μM . Para la medición electroquímica la señal medida resultó ser proporcional a la concentración de la DNAzima para cada uno de los ensayos, sin embargo, no pudo establecerse una relación señal-concentración de DNAzima debido a la gran dispersión entre ensayos independientes.

En cuanto a la DNAzima inmovilizada, se estudiaron las condiciones de reacción con el objetivo de maximizar la respuesta a partir de la reacción de peroxidación en fase heterogénea sobre dos superficies diferentes: partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina y láminas de oro. Se optimizaron las condiciones de reacción que permitieron obtener señales intensas, para tiempos cortos de reacción. Al igual que en solución, se obtuvo una relación lineal entre las señales medidas por absorbancia y la cantidad de DNAzima agregada para ambas superficies. Las partículas magnéticas mostraron características más adecuadas para una superficie de inmovilización: menor variabilidad de la señal, mayor versatilidad, mayor sensibilidad de la curva de concentración y menor tiempo de preparación de ensayo. Por lo que se eligieron las partículas magnéticas como soporte para continuar con el análisis de funcionamiento de la capa de biorreconocimiento.

Para estudiar el funcionamiento de la DNAzima como elemento de biorreconocimiento se analizó la reacción de peroxidación al ser incluida la DNAzima en una secuencia sc-ADN, es decir como parte de una sonda. Se estudiaron las condiciones de funcionamiento de esta secuencia sonda bajo la hipótesis de que en presencia de secuencia analito ocurriría la reacción de peroxidación generándose señal, pero en ausencia de la misma la señal resultaría muy poco intensa o despreciable. Esta hipótesis pudo comprobarse en parte, ya que, efectivamente se obtuvo señal en presencia del analito. Sin embargo, en ausencia del analito también se observó una señal importante, aunque de menor intensidad. Para verificar o rechazar la hipótesis será necesario realizar más ensayos con sondas de diferentes secuencias, poniendo el foco en reducir la señal en ausencia de analito.

6.2 Proyecciones a futuro

Para darle continuidad a este trabajo, y sobre la base de las condiciones optimizadas en el capítulo 5, queda por analizar el funcionamiento de distintas secuencias sonda. Con el objetivo de hallar una configuración tal que se favorezca la formación de estructura horquilla evitando la generación de señal en ausencia de analito. Para ello se proponen dos estrategias de diseño de la sonda. Por un lado, que la DNAzima se encuentre más cercana al extremo 5' de la sonda en lugar de estar en el extremo 3'. Por otro lado, aumentar la cantidad de bases autocomplementarias en la secuencia sonda, para darle mayor estabilidad a la estructura de horquilla, aunque procurando que la misma pueda reorganizarse en presencia de secuencia analito, dando lugar a que adquiera funcionalidad DNAzima.

Por otro lado, un desafío a seguir desarrollando, es la implementación de la detección electroquímica. Es necesario hallar las condiciones de trabajo en las cuales disminuya la variabilidad entre señales, así como también la señal del blanco de reactivos.

También resulta de interés el análisis de superficies de bajo costo, para el armado del sensor por inmovilización de la sonda modificada con biotina. Una superficie

adecuada sería un pocillo de unos 50 μL de capacidad recubierto con estreptavidina. Sobre el cual se pueda llevar a cabo la inmovilización de la sonda y la reacción de peroxidación.