

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

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

*Modificación de superficies de oro con oligonucleótidos para la detección
de moléculas pequeñas*

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

Autor: Mg. Helena Margarita Ceretti

Directora: Dra. Silvana Andrea Ramírez
Co-Director: Dr. Javier Marcelo Montserrat

Fecha: 26 de febrero de 2016

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

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. (Elegido)*
- b) *Liberar el contenido de la tesis solamente a la comunidad universitaria de la UNGS:*
- c) *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: Modificación de superficies de oro con oligonucleótidos para la detección de moléculas pequeñas

b. Presentado por (Apellido/s y Nombres completos del autor): Ceretti, Helena Margarita

c. E-mail del autor: hceretti@ungs.edu.ar

d. Estudiante del Posgrado (consignar el nombre completo del Posgrado):
Doctorado en Ciencia y Tecnología UNGS

e. Institución o Instituciones que dictaron el Posgrado (consignar los nombres desarrollados y completos): Universidad Nacional de General Sarmiento

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

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

f. Para recibir el título de (consignar completo): Dra. en Ciencia y Tecnología,
UNGS

a) Grado académico que se obtiene: doctora

b) Nombre del grado académico:

g. Fecha de la defensa: / /
 día mes año

h. Director de la Tesis (Apellidos y Nombres): Ramírez, Silvana Andrea;
Montserrat, Javier Marcelo

i. Tutor de la Tesis (Apellidos y Nombres): Zalts, Anita

j. Colaboradores con el trabajo de Tesis: Battaglini, Fernando

k. Descripción física del trabajo de Tesis (cantidad total de páginas, imágenes,
planos, videos, archivos digitales, etc.):

l. Alcance geográfico y/o temporal de la Tesis:

m. Temas tratados en la Tesis (palabras claves): aptámero, AMP, adenosina, ADN,
espectroscopia de impedancia electroquímica, microbalanza de cuarzo con disipación,
sistema nanoporoso estructurado, nanopartículas de oro.

n. Resumen en español (hasta 1000 caracteres): El objetivo general de este trabajo
se orienta hacia la comprensión de los fenómenos de adsorción de los ácidos nucleicos,
en particular ADN, sobre superficies de oro, de forma de poder avanzar en el diseño

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

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

racional de dispositivos de reconocimiento selectivo y cuantificación electroquímica (biosensores electroquímicos de base aptamérica).

Se utilizó como sistema modelo la secuencia aptamérica que reconoce adenosina/AMP/ADP/ATP y como sustrato metálico superficies de oro reutilizables y descartables. Se emplearon distintas técnicas electroquímicas (espectroscopía de impedancia, voltametría cíclica, voltametría de onda cuadrada, cronocoulombimetría) y microbalanza de cuarzo con disipación.

Los resultados obtenidos se aplicaron a un sistema nanoporoso estructurado de aluminio-óxido de aluminio y nanopartículas de oro, que permitió la inmovilización y cuantificación selectiva del analito (AMP) en bajas concentraciones (nM).

o. Resumen en portugués (hasta 1000 caracteres): Este trabalho tem como objetivo geral compreender os fenômenos de adsorção de ácidos nucleicos, particularmente DNA em superfícies de ouro, de modo a avançar no desenho racional de dispositivos de reconhecimento seletivo e quantificação eletroquímica (biossensores eletroquímicos aptaméricos).

O aptâmero que reconhece a adenosina/AMP/ADP/ATP foi usado como sistema modelo e como substrato, superfícies metálicas de ouro reutilizáveis e descartáveis. Se usaram várias técnicas eletroquímicas (espectroscopia de impedância, voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada, cronocoulombimetria) e microbalança de quartzo com dissipação.

Os resultados obtidos são aplicados a um sistema estruturado nanoporoso de óxido de alumínio - alumínio e nanopartículas de ouro, permitindo a fixação do aptâmero e a quantificação seletiva da substância de interesse (AMP) em baixas concentrações (nM).

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

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

p. Resumen en inglés (hasta 1000 caracteres): The main goal of this work is the comprehension of the parameters governing the adsorption of single stranded nucleic acids (particularly DNA) on gold surfaces, in order to apply this knowledge for the rational design of biosensors. The thiol-aptamer for adenosine/AMP/ADP/ATP was employed as model system to study chemisorption on disposable and non disposable gold electrodes. Different electrochemical techniques (cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, chronocoulombimetry, square wave voltammetry) and quartz crystal microbalance with dissipation were used to study the modified surface.

Finally, an array of gold nanoelectrodes in alumina modified/aluminum nanopores modified with the thiol-aptamer allowed the selective assessment of AMP in the nM range.

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

Firma y aclaración de la firma del Presidente del Jurado:

Firma del autor de la tesis:

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

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

*Modificación de superficies de oro con oligonucleótidos para la detección
de moléculas pequeñas*

Publicaciones:

Ceretti, H., Ponce, B., Ramirez, S., Montserrat, J. M. 2010. "Adenosine reagentless electrochemical aptasensor using a phosphorothioate immobilization strategy". *Electroanalysis*, vol. 22, p. 147-150.

Peinetti, A. S., Ceretti, H., Mizrahi, M., González, G. A., Ramírez, S. A., Requejo, F. G., Montserrat, J. M., Battaglini, F. 2015. "Confined gold nanoparticles enhance the detection of small molecules in label-free impedance aptasensors". *Nanoscale*, vol. 7, p. 7763-7769.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

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

Aportes Originales:

Los aptámeros son oligonucleótidos funcionales versátiles para el diseño de arquitecturas de armado de una capa de reconocimiento molecular y estrategias de detección para cuantificar analitos de interés, como las moléculas pequeñas. Las técnicas electroquímicas fueron seleccionadas para este trabajo (cap. 3, 4 y 6) debido a que las mismas son sensibles a la presencia de especies químicas adsorbidas sobre una superficie y a cambios derivados de la interacción entre moléculas quimisorbidas y especies presentes en el entorno químico. Con fines comparativos y complementarios se empleó una técnica acústica: microbalanza de cristal de cuarzo con disipación, QCM-D (cap. 5).

Se evaluó el cubrimiento superficial para tres estrategias de anclaje de oligonucleótidos tiolados a superficies de oro. Se emplearon superficies de oro reutilizables y descartables obtenidas por serigrafía y posterior electrodeposición galvanostática (cap. 3 y 4). La respuesta obtenida por voltametría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) mostró buena reproducibilidad en la obtención del depósito metálico y la quimisorción del aptámero tiolado. El sistema permitió detectar el evento de reconocimiento aptámero-analito (AMP) empleando una sonda redox en solución (estrategia *label free*) (cap. 4).

En el capítulo 6 se presentan los resultados obtenidos con un arreglo de nanopartículas de oro electrogeneradas confinadas en una matriz de alúmina nanoporosa. Las dimensiones del sistema resultan del mismo orden que el cambio conformacional promovido cuando el aptámero reconoce al analito. El cambio en la resistencia a la transferencia de carga de una sonda redox en solución, antes y después del evento de reconocimiento permitió cuantificar de manera selectiva al analito en concentración submicromolar.

El aptámero alojado en el fondo de un nanoporo también evidenció respuesta frente a su hebra complementaria (hibridización), para una concentración aún menor que la alcanzada con el AMP, a modo de prueba de concepto para una potencial aplicación hacia genosensores.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

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

A la memoria de mi madre y de Nelson Facundo

Agradecimientos

A Silvana Ramírez y Javier Montserrat mis directores, por ofrecerme un tema de trabajo que constituyó un estimulante desafío intelectual.

A Anita Zalts por aceptar ser mi consejera de estudios y por su eficiente coordinación del Área Química que hace todo más fácil en la UNGS.

A la UNGS y OPCW por el financiamiento.

A Fernando Battaglini quien me “adoptó” en su laboratorio, dedicándome tiempo y aportando su gran experiencia y conocimiento en el tema de sensores.

A Adolfo Iribarren, su estímulo en mis épocas de estudiante fue decisivo para que siguiera adelante. También mi agradecimiento por abrirnos las puertas del laboratorio bajo su dirección en el INGEBI.

A Fabio Cukiernik por acercarme nuevamente al camino de la investigación.

A Belén Ponce y Ana Sol Peinetti con quienes compartí el trabajo de mesada, excelentes compañeras, entusiastas y tolerantes con mis errores, hicieron el día a día mucho más ameno.

A Federico Williams por las medidas de XPS realizadas en el equipo de Tenaris.

A Ale Daniel por sus aportes al “embellecimiento” de mi tesis.

A Belén nuevamente, por la traducción al portugués del resumen y por las construcciones doble cadena.

A Henry Hughes por haber estado siempre presente en infinidad de detalles, y por “Belena” que aportó una cuota de optimismo y humor imprescindibles al trabajo cotidiano.

A Ignacio Pedre por sus lecciones para convertir e importar archivos y por su excelente disposición para compartir los equipos de uso común en el laboratorio.

A Lorena Cortez por su colaboración en los experimentos con OsPa y su disposición a responder mis dudas sobre ese sistema.

A Laura Robaldo por su asistencia en los días de trabajo en INGEBI y su buena onda.

A Matías Barrionuevo por los sitios de Internet que me sugería consultar referidos al ADN.

A Ana Janeiro por la foto de la “sandwichera” y también por su optimismo y creatividad.

A Guido Enrico Deluchi por su ayuda para representar las estructuras de los metalocenos.

A Javi y Andrea por tantos trámites de compras de reactivos e insumos en la UNGS.

A Javi también por introducirme en las “Tardes negras”.

A Graciela González por los infaltables cafecitos y los ricos chocolates.

A Silvia Cerdeira por el afecto y el estímulo a lo largo de tantos años.

A Susanita Socolovsky por el afecto de toda una vida. Su ejemplo y estímulo me alentaron a seguir química.

A Tomás y Sharon mis queridos sobrinos por el afecto y el entusiasmo.

A Pintita y Naná por la gata compañía que me brindaron durante la redacción de la tesis.

A Marce por todo.

Indice

Indice XIII

<i>Abreviaturas</i>	XVII
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Moléculas pequeñas.....	2
1.2 Acidos nucleicos.....	4
1.2.1 Aptámeros.....	13
1.3 Superficies para sensores.....	16
1.3.1 Serigrafía	16
1.3.2 Fotolitografía: “impresión con luz”	16
1.3.3 Estructuras nanoporosos	17
1.3.4 Modificación de superficies	18
1.4 Aptasensores	22
1.4.1 Tipos de aptasensores	25
1.4.2 Detección “label free”	30
1.5 Motivación y objetivos	31
Capítulo 2. Materiales y métodos.....	33
2.1 Métodos instrumentales	34
2.1.1 Técnicas electroquímicas.....	34
2.1.1.1 Conceptos generales	34
2.1.1.2 Voltametría cíclica.....	37
2.1.1.3 Cronoamperometría	42
2.1.1.4 Voltametría diferencial de pulso.....	45
2.1.1.5 Voltametría de onda cuadrada	46
2.1.1.6 Impedancia.....	49
2.1.1.7 Instrumentación	60
2.1.2 Balanza de cristal de cuarzo con disipación	60

2.2 Materiales y procedimientos experimentales	61
2.2.1 Secuencias oligonucleotídicas	61
2.2.1.1 Reducción del enlace disulfuro (-S-S-) en secuencias oligonucleotídicas	63
2.2.2. Síntesis de N-{2-[(3-mercaptopropanoil)amino]etil}ferrocen-1-carboxamida (3MPAFc).....	63
2.2.3 Electrodo.....	66
2.2.3.1 Electrodo de trabajo comerciales	66
2.2.3.2 Láminas de Au macizo	67
2.2.3.3 Electrodo descartables.....	68
2.2.3.4 Nanoelectrodo	69
2.2.4. Limpieza de los electrodo de trabajo	71
2.2.4.1 Electrodo de Au comerciales	71
2.2.4.2 Láminas de Au macizo	72
2.2.4.3 Electrodo descartables.....	72
2.2.5 Modificación de los electrodo de trabajo.....	72
2.2.5.1 Láminas de Au macizo	72
2.2.5.2 Electrodo descartables.....	73
2.2.5.3 Nanoelectrodo	74
2.3 Protocolos de preparación de las soluciones empleadas	76
Resultados y discusión	79
Capítulo 3. Modificación de superficies de oro con oligonucleótidos	81
3.1. Introducción.....	82
3.2 Diseño de un aptasensor y estrategia de detección electroquímica	83
3.2.1. Respuesta electroquímica del marcador redox en solución.....	83
3.2.2. Sistema modelo para evaluar la respuesta electroquímica del marcador redox inmovilizado.	85
3.2.3 Quimisorción de secuencias oligonucleotídicas	87
3.2.4 Desorción reductiva de secuencias oligonucleotídicas tioladas	92

3.3 Electroodos de oro descartables	95
3.3.1 Electrodeposición de oro sobre pistas de grafito serigrafiadas de 0,385 cm ²	95
3.3.2 Respuesta electroquímica de pistas de grafito serigrafiadas de área pequeña (0,071cm ²)	99
3.4 Conclusiones.....	102
Capítulo 4. Aplicación de espectroscopia de impedancia electroquímica al estudio de superficies de oro modificadas con aptámeros	104
4.1. Introducción.....	105
4.2 Respuesta de electrodos descartables por CV y EIS	105
4.2.1 Evaluación de las superficies de Au obtenidas por electrodeposición galvanostática	106
4.2.2 Modificación de los electrodos con secuencias oligonucleotídicas	109
4.2.2.1 Coadsorción de una mezcla equimolar aptámero/tiol corto	109
4.2.2.2 Quimisorción del aptámero disulfuro	112
4.2.2.3 Sistema aptámero-hebra complementaria.....	114
4.2.3 Efecto del tipo de sonda redox en solución	117
4.2.4 Efecto de la sonda redox inmovilizada (Os-PA)	119
4.3. Detección del analito (AMP).....	124
4.4 Conclusiones.....	128
Capítulo 5. Estudio de superficies de oro modificadas con aptámeros por microbalanza de cristal de cuarzo con disipación	129
5.1. Introducción.....	130
5.2. Quimisorción de oligonucleótidos mediante interacción S-Au.....	133
5.3 Reconocimiento molecular de la hebra complementaria (hibridización) y de AMP (molécula pequeña).....	141
5.4. Otros efectos de la capa de reconocimiento que permite explorar QCM-D.....	147
5.4.1. Efecto del [Mg(H ₂ O) ₆] ²⁺ sobre la conformación de secuencias de oligonucleótidos	147

5.4.2. Rehidratación de la superficie modificada con hebras de ADN.....	151
5.5 Conclusiones.....	153
Capítulo 6. Nanopartículas de oro confinadas modificadas con secuencias oligonucleotídicas.....	155
6.1. Introducción.....	156
6.2. Breve descripción del sistema y respuesta electroquímica.....	157
6.3. Quimisorción de secuencias oligonucleotídicas sobre nanopartículas de oro confinadas	160
6.4 Detección de AMP.....	162
6.5 Detección de la hebra complementaria.....	169
6.6 Conclusiones.....	171
Capítulo 7. Conclusiones y discusión final	173
Referencias	176

Abreviaturas

AMP: adenosina monofosfato

AuNP: nanopartícula de oro

CV voltametría cíclica (cyclic voltammetry)

EIS: electrochemical impedance spectroscopy

Fc: ferroceno

MCE: mercaptoetanol

MCH: mercaptohexanol

MOP: molécula orgánica pequeña

QCM-D: microbalanza de cristal cuarzo con disipación (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation)

R_{tc} : resistencia a la transferencia de carga

SAM: monocapa autoensamblada (self assembled monolayer)

SPR: resonancia del plasmón superficial (surface plasmon resonance)

SWV: voltametría de onda cuadrada (square wave voltammetry)

TCEP: clorohidrato de tris-(2-carboxietil)fosfina

Capítulo 1. Introducción

1.1 Moléculas pequeñas

Muchos de los principios activos de los medicamentos son moléculas pequeñas. Un ejemplo bien conocido es el ácido acetilsalicílico (masa molar 180 Da) componente activo de la aspirina. Sus propiedades medicinales datan de la época de los antiguos egipcios quienes lo extraían de la corteza del sauce blanco (*Salix alba*). Hipócrates (460 - 370 a. C.), padre de la medicina griega, describió su uso para aliviar dolores y fiebre. La primera síntesis en el laboratorio se atribuye a Charles Gerhardt en 1853 y unos años más tarde en 1897, Félix Hoffmann un investigador de los laboratorios Bayer logró obtener el compuesto con alto grado de pureza.

Más recientemente, desde hace dos décadas aproximadamente, la química farmacéutica comenzó a seleccionar compuestos de interés farmacológico empleando el diseño asistido por computadora, conocido como método *in silico*. Esta estrategia hace uso de tres bases de datos en constante actualización y expansión, una de ellas comprende a las moléculas pequeñas (*small molecules*), otra almacena información estructural 3D y una tercera base contiene información sobre fragmentos moleculares. En este contexto, las moléculas pequeñas tienen como blanco terapéutico a proteínas que cumplen funciones biológicas específicas tales como receptores nucleares, enzimas, transportadores de membrana. También se dirige el interés hacia los ácidos nucleicos, ADN y ARN.

Una pregunta a formular sería entonces, ¿qué compuestos se ingresan a la base de datos de las moléculas pequeñas? o ¿cuáles son los criterios que se adoptan para decidir si un compuesto puede ser catalogado como tal? La definición de molécula pequeña es operacional, comprende sustancias de baja masa molar (500 - 1000 Da), de dimensiones nanométricas ($1 \cdot 10^{-9}$ m), permeables a la barrera celular debido a su función como fármaco.

Contrariamente, las moléculas pequeñas cuando son liberadas al ambiente de manera no controlada, pueden tener efectos perjudiciales, dada su capacidad para actuar como disruptores del sistema endocrino, pudiendo estar asociadas a enfermedades o alteraciones en los organismos vivos (Fetchner et al, 2014).

En el ámbito de investigación y desarrollo, resulta relevante determinar aspectos cinéticos, termodinámicos y estructurales con respecto a la interacción entre una molécula pequeña y su blanco terapéutico (proteínas, ácidos nucleicos). Para ello se dispone de robustos métodos instrumentales, por ejemplo, espectrometría de masa

(MS), difracción de rayos X (XRD) o resonancia magnética nuclear (NMR). Además, el uso y la propagación de las moléculas pequeñas conlleva la necesidad de su detección y cuantificación en bajas concentraciones (del orden submicromolar), de manera selectiva, empleando pequeñas cantidades de muestra (microlitros), en diferentes tipos de matrices, y en algunos casos en tiempo real.

Estos desafíos pueden ser abordados desde el campo de los biosensores. La interacción antes mencionada entre una molécula pequeña y una proteína o ácido nucleico, es la base para el desarrollo de un biosensor. Este se define como un dispositivo capaz de proporcionar información analítica específica, cuantitativa o semicuantitativa, utilizando un receptor o elemento de reconocimiento biológico el cual está en contacto directo con el elemento transductor (IUPAC, 1992). Si bien puede inmovilizarse la molécula pequeña, en general se fija a la superficie una proteína o un ácido nucleico. El procedimiento de inmovilización debe preservar la interacción entre ambos componentes. La Figura 1.1 presenta un esquema general de un biosensor:

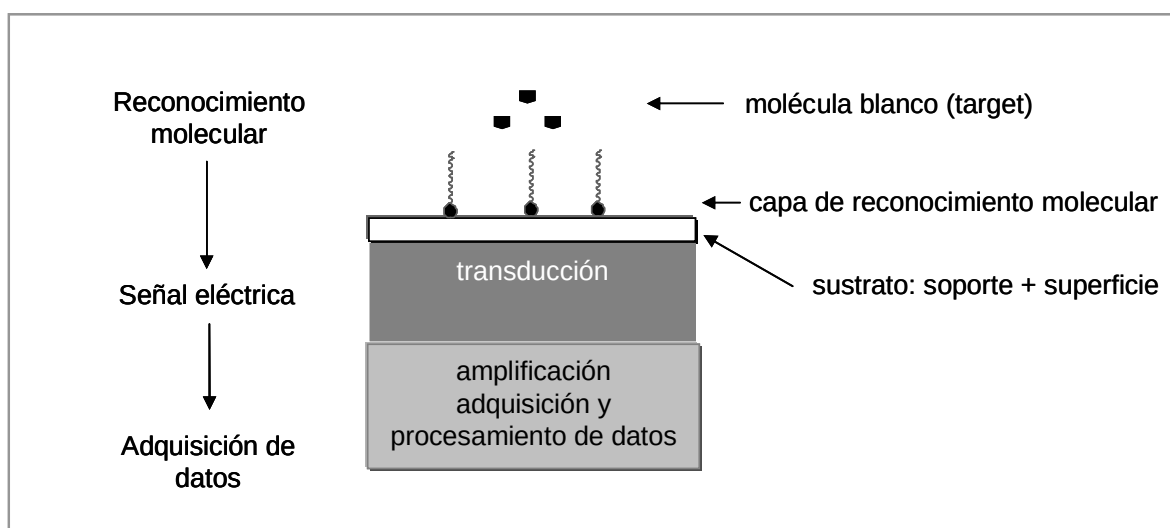


Figura 1.1 Esquema de un biosensor

El elemento *transductor* permite transformar el evento fisicoquímico producido (luz, calor, intercambio de electrones) en una señal analítica y, como tal, no presenta selectividad (Hulanucki et al, 1991). Los sensores químicos se clasifican de acuerdo al principio de funcionamiento del transductor en: dispositivos ópticos, electroquímicos, eléctricos, magnéticos, termométricos, dispositivos sensibles a cambios de masa, etc.

En este trabajo de tesis se han empleado como elemento de reconocimiento molecular secuencias de ADN simple cadena conocidas como aptámeros, modificadas con tioles para permitir su quimisorción sobre superficies de oro. A continuación se introducen algunos aspectos generales sobre la estructura química de los ácidos nucleicos (una descripción más detallada se encuentra en la obra de Egli y Saenger (1984)). Para transformar el evento de reconocimiento en una señal analítica se ha recurrido a los métodos electroquímicos, los cuales se describen brevemente en el capítulo 2.

1.2 Ácidos nucleicos

En el interior de una célula, el ácido desoxirribonucleico (ADN o DNA) contiene la información genética hereditaria, necesaria para la síntesis de proteínas. Químicamente el ADN es un polímero lineal cuyos monómeros se denominan nucleótidos. Cada nucleótido está formado a su vez, por una base nitrogenada, una unidad de desoxirribosa (un azúcar) y un grupo fosfato. Las bases son cuatro: adenina (A), guanosina (G), timina (T) y citosina (C) y cada una está unida al azúcar mediante un enlace β -glicosídico. Los nucleótidos están conectados entre sí por uniones fosfodiéster a través de los átomos de oxígeno O3' y O5'. En el caso del ARN la unidad de azúcar es la ribosa y la base uracilo (U) reemplaza a la timina (T) (Figura 1.2).

Dado el pequeño conjunto de elementos de la Tabla Periódica (C, H, O, N, P) que están presentes en los ácidos nucleicos, la diversidad y especificidad de los mismos se sustenta en la posibilidad de construir estructuras químicas muy organizadas y complejas capaces de llevar adelante funciones extraordinariamente específicas (Lipsitz y Montserrat, 2016).

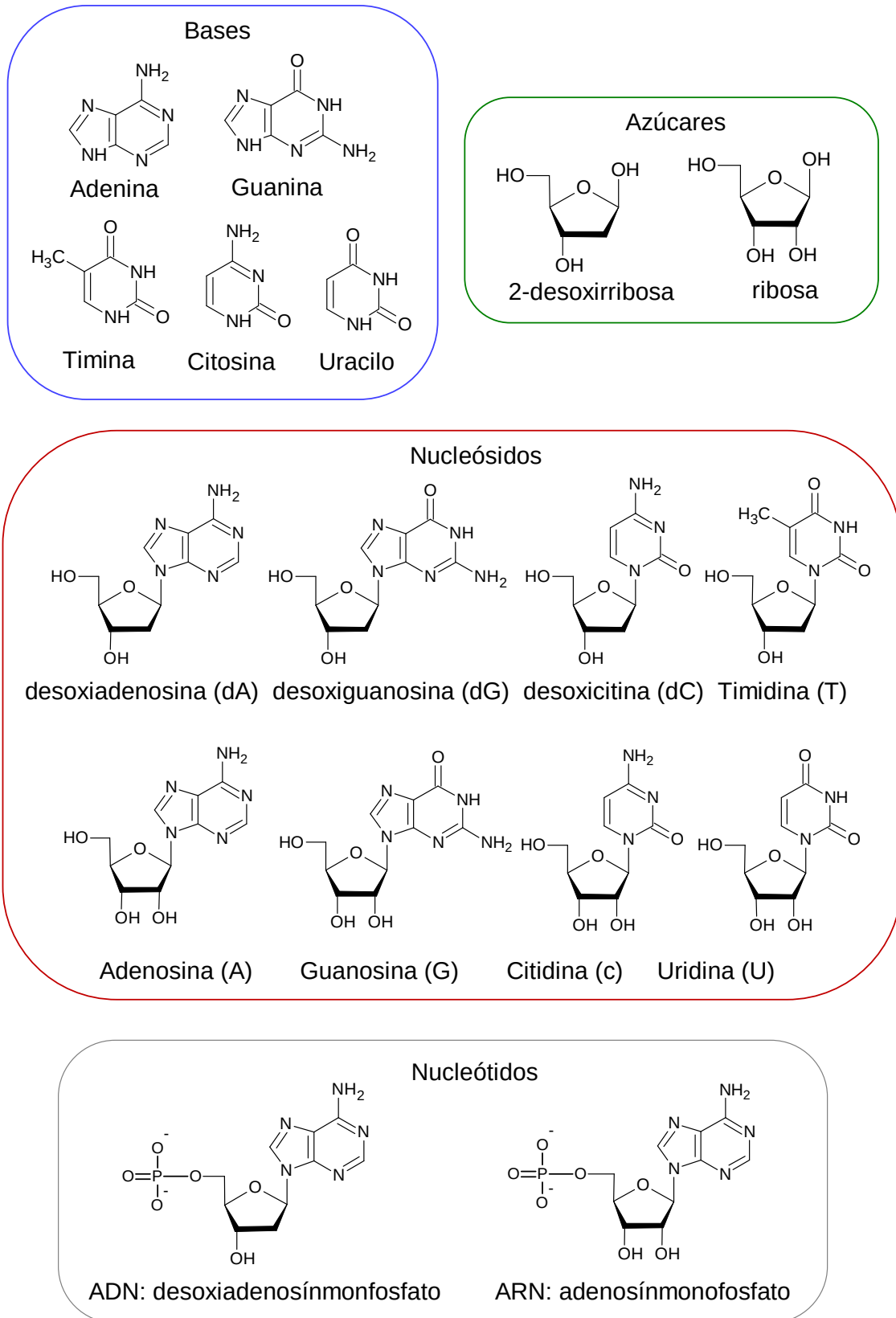


Figura 1.2 Estructura química de bases, azúcares, nucleósidos y nucleótidos de ADN y ARN

Las bases nitrogenadas tienen un papel relevante en el reconocimiento molecular, es por eso que se detallan a continuación algunas de sus propiedades fisicoquímicas. La numeración de los átomos endo y exocíclicos se muestra en la Figura 1.3.

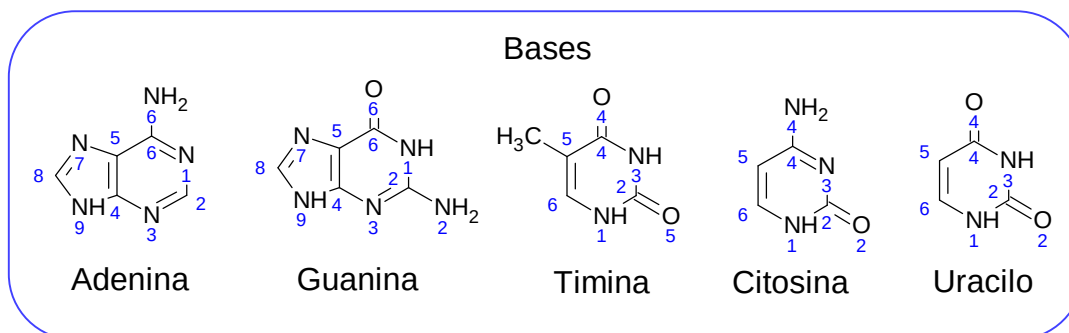


Figura 1.3 Numeración de las bases de ADN y ARN

Las bases presentan carácter aromático y en general una desviación muy leve respecto del plano (inferior a 0,01 nm). Los grupos amino ($-NH_2$) exocíclicos participan de la resonancia del sistema aromático, razón por la cual la longitud del enlace C-N es menor que en el caso alifático. La distribución de densidad de carga determina la formación de interacciones por puente de hidrógeno (puente H). En adenina y guanina, los átomos de H de los grupos $-NH_2$ pueden actuar como donores pues tienen alta densidad electrónica. En la guanina los átomos O6, N3 y N7 se comportan como aceptores de puente H, mientras que en la adenina el carácter aceptor lo poseen N1, N3 y N7. La Figura 1.4 muestra la distribución de densidad de carga calculada por el método semiempírico MNDO para los nucleósidos guanosina y adenosina.

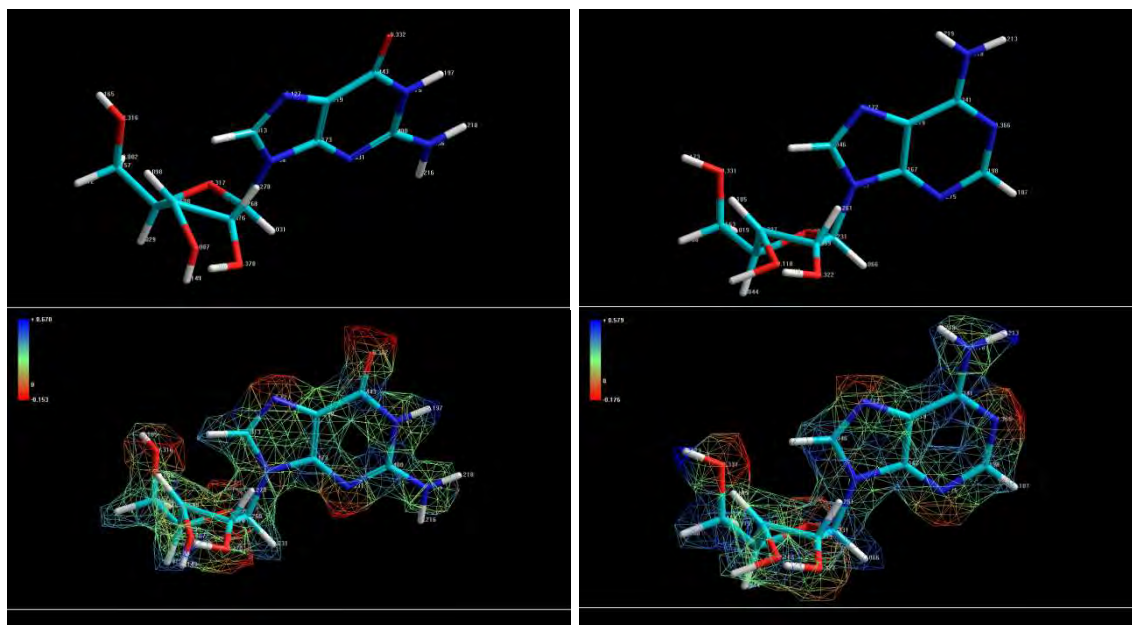


Figura 1.4 Representación espacial y densidad electrónica: guanosina (izq.), adenosina (der.)

En un nucleótido individual el grupo fosfato ocupa la posición 5' del azúcar. A su vez puede estar integrado por una, dos o tres unidades fosfato, como se muestra en la Figura 1.5 para la adenina.

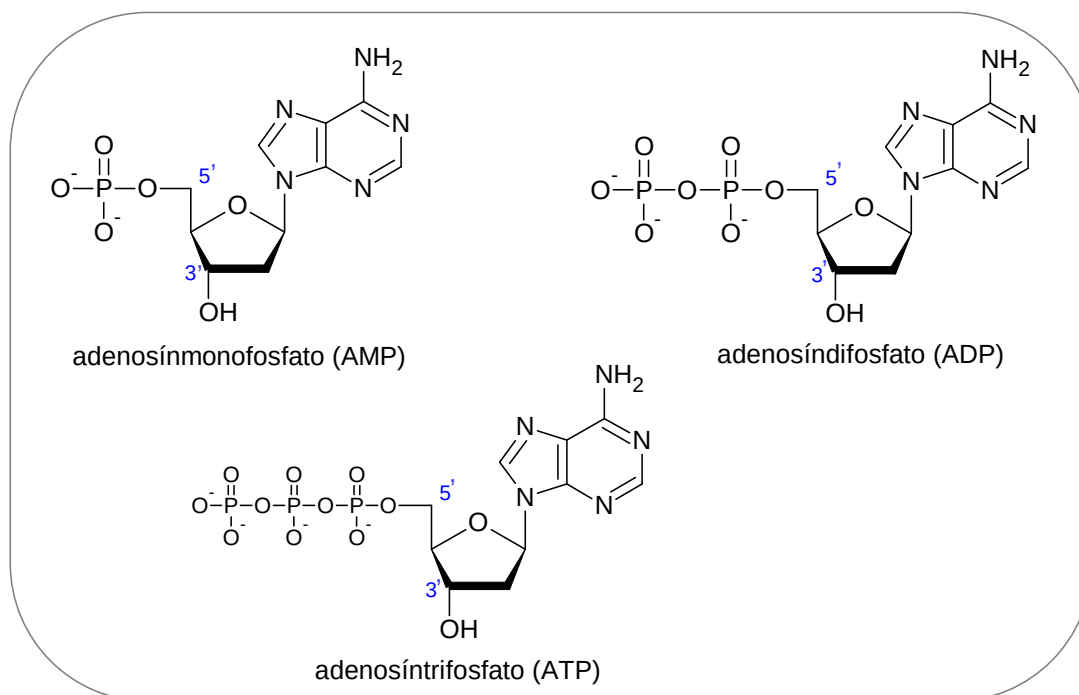


Figura 1.5 Estructura química de los desoxirribonucleótidos AMP, ADT, ATP

La propagación de la cadena en los ácidos nucleicos se realiza mediante enlaces fosfodiéster a través de las posiciones 5' y 3' del azúcar. Por tratarse de polímeros lineales quedan determinados 2 extremos, cuando se describe una secuencia de nucleótidos los mismos se designan empleando las siglas de las bases, respetando el sentido de propagación (Figura 1.6).

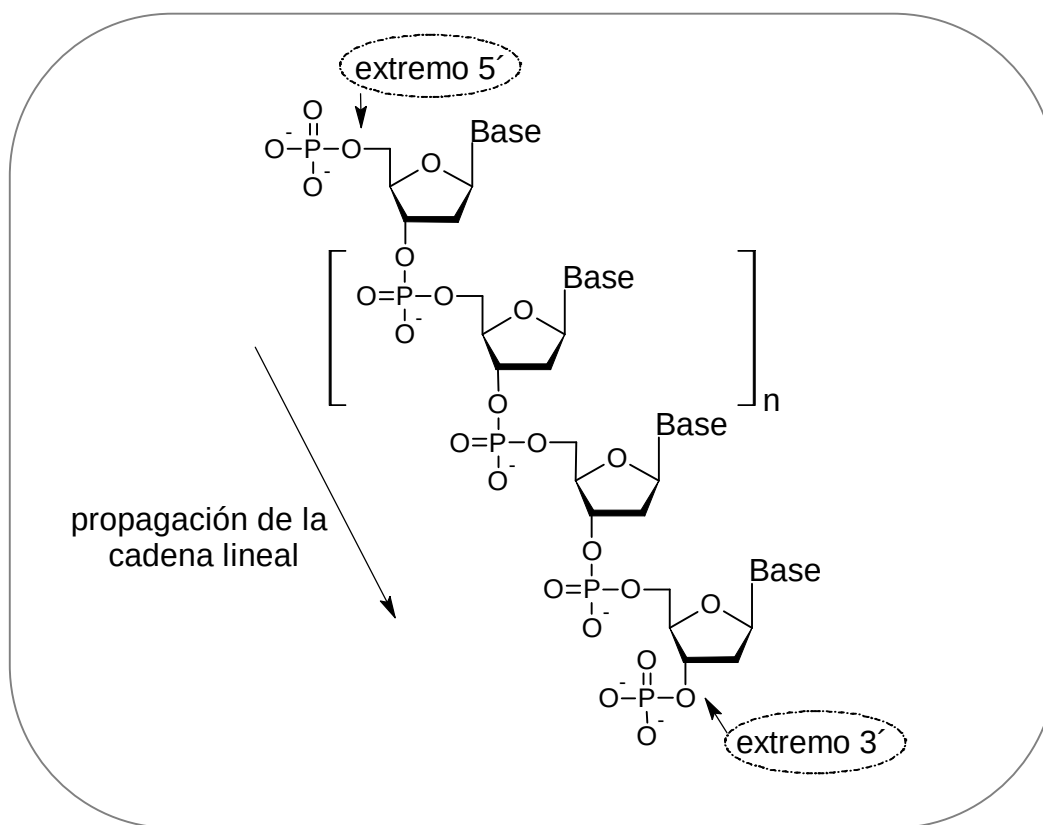


Figura 1.6 Estructura química de una hebra de ADN simple cadena

La estructura tridimensional de una secuencia de ADN o ARN depende de las propiedades y la conformación de los nucleótidos que la integran. La rotación respecto a cada uno de los enlaces confiere flexibilidad a la cadena nucleotídica y determina las propiedades macromoleculares. Debido a la elevada densidad de carga negativa, dicha flexibilidad es necesaria para minimizar las repulsiones electrostáticas y estabilizar energéticamente la estructura.

Las interacciones más importantes que presentan los ácidos nucleicos son las que involucran a las bases nitrogenadas y las relacionadas con el solvente e iones del medio. Las bases nitrogenadas que se encuentran en el mismo plano horizontal, forman puentes

H (Figura 1.7). A su vez en el plano perpendicular se dan interacciones por apilamiento o *stacking* (Figura 1.8). El reconocimiento entre las bases tiene lugar a través de interacciones puente H. En los ácidos nucleicos naturales, el modo más común de interacción es el propuesto por Watson y Crick (Figura 1.7 a) (Watson y Crick, 1953). Las características de este apareamiento son la preferencia por la coplanaridad de las dos bases con la formación de tres interacciones puente H para el apareamiento C-G y de dos enlaces puente H para el apareamiento T/U-A.

También han sido descritas interacciones no convencionales entre dos purinas o pirimidinas. Por ejemplo, los apareamientos de Hoogsteen y Hoogsteen reverso, involucran la participación de otros átomos de nitrógeno (Figura 1.7 b y c) (Hoogsteen, 1963). Las propiedades de simetría de los pares de bases determinan las características estructurales de los ordenamientos superiores como es el caso de la estructura de doble cadena. Los apareamiento tipo Hoogsteen, por ejemplo, son responsables de estructuras del tipo triples hélices.

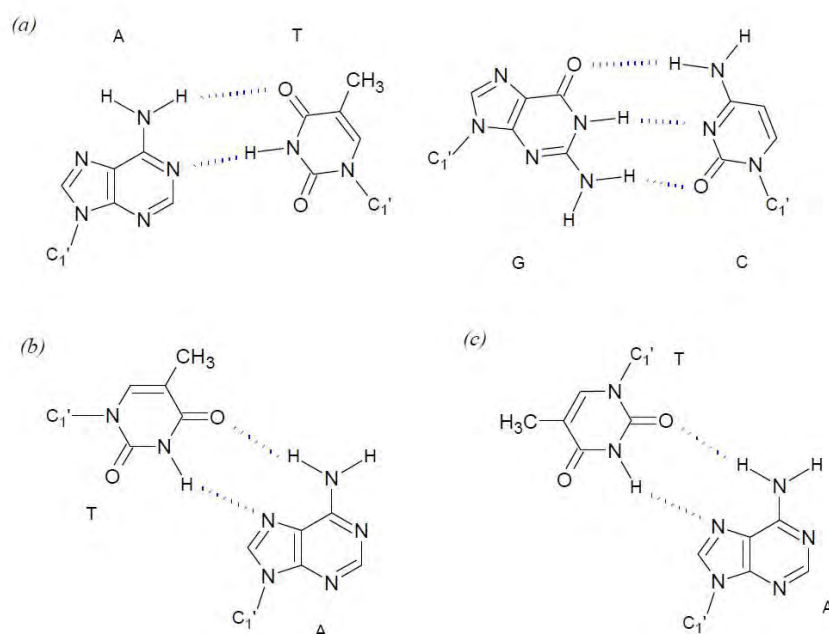


Figura 1.7 Interacciones puente H entre bases de ADN: (a) Watson y Crick; (b) Hoogsteen, (c) Hoogsteen reverse

Además de estar involucrados en el reconocimiento horizontal entre bases, los enlaces puente H participan de las interacciones de los ácidos nucleicos con proteínas o ligandos pequeños.

El apilamiento o *stacking* entre las bases se debe a interacciones de tipo dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido. Las mismas dependen de las bases involucradas, es decir de la secuencia de la cadena oligonucleotídica y son relevantes en la determinación y estabilización de las estructuras secundaria y terciaria del ADN y ARN (Egli y Saenger, 1984). Las interacciones puente H y *stacking* dan origen a la formación de una doble hélice entre dos cadenas complementarias de ADN o ARN. El esqueleto hidrofílico, formado por los grupos fosfato y los azúcares, está expuesto al entorno mientras que las bases se orientan hacia el interior de la hélice, con sus planos perpendiculares al eje de propagación de la misma. Esta disposición espacial determina dos dominios en la superficie de la hélice conocidos como gruta mayor (*major groove*) y gruta menor (*minor groove*). La proporción de pares C-G modula la estabilidad de la doble hélice. En la Figura 1.8 se indican valores medios para el ancho de las grutas mayor y menor. Cada nucleótido tiene una altura que oscila entre 0,256 y 0,338 nm en la dirección del eje z.

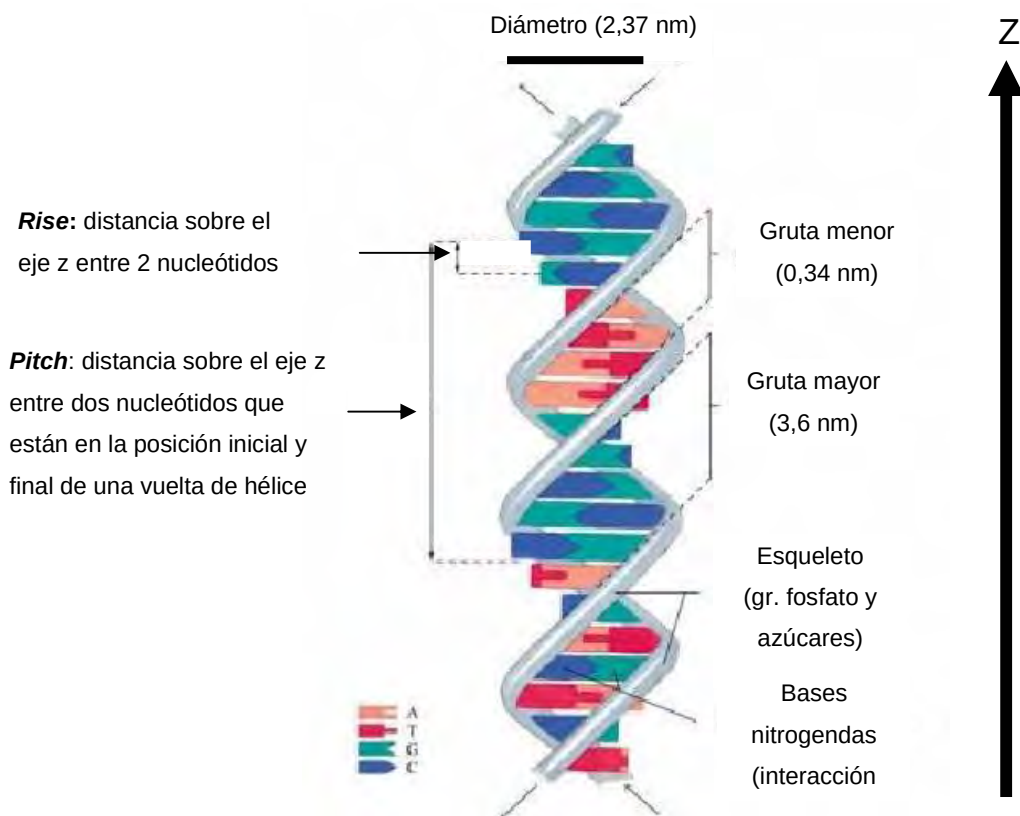


Figura 1.8 Estructura de la doble hélice

Empleando técnicas de difracción de RX, RMN de alta resolución y cálculo computacional, se pueden determinar las dimensiones y tipo de hélice que forman los ácidos nucleicos. La doble hélice de la familia A resulta en una estructura más compacta y ancha. Las bases están desplazadas del eje de la hélice y por eso la gruta mayor es considerablemente más profunda. En cambio para la familia tipo B la doble hélice resulta más alargada y angosta. Ambas grutas tienen aproximadamente la misma profundidad pero la gruta mayor es más ancha. (Figura 1.9).

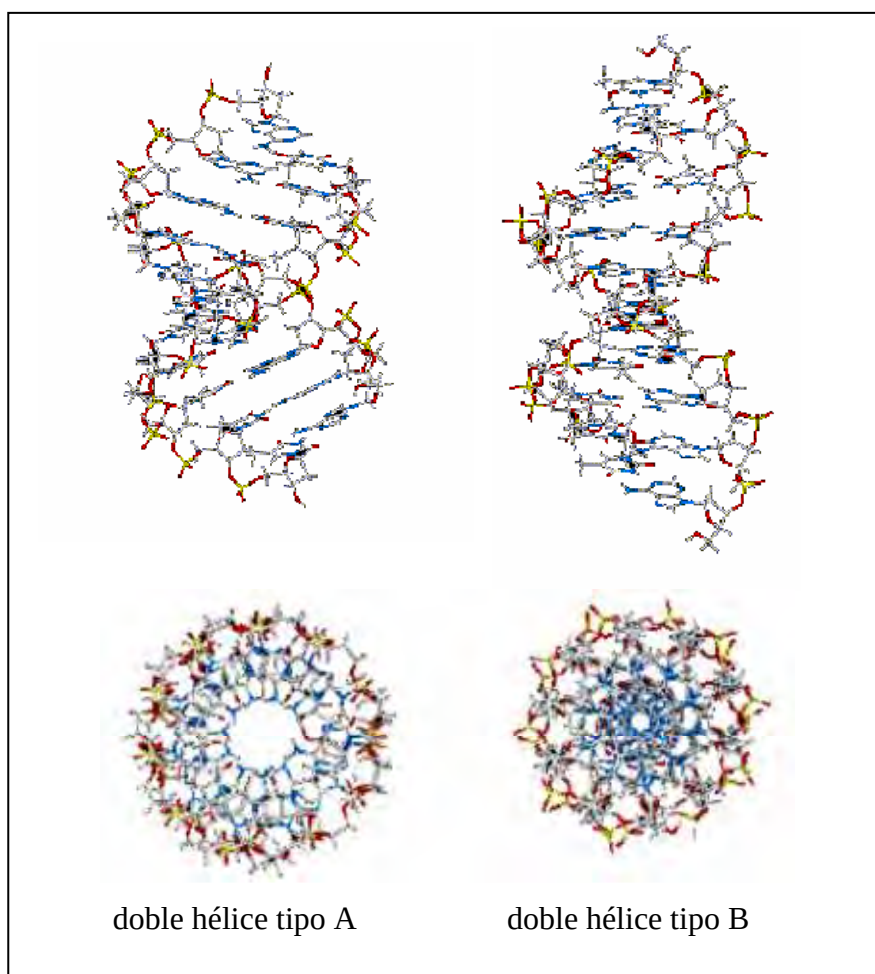


Figura 1.9 Doble hélice tipo A y B

La solvatación tiene un papel relevante en los cambios conformacionales de los ácidos nucleicos, y pueden distinguirse diversos grados de hidratación e interacción con los componentes del medio acuoso. La primera esfera de hidratación corresponde a las moléculas de agua que interaccionan directamente con los grupos fosfato y los azúcares.

Debido a su carácter polianiónico en condiciones fisiológicas, los ácidos nucleicos interaccionan con iones o moléculas que apantallan las repulsiones de carga entre los grupos fosfato. La concentración intracelular de cationes es del orden μM , siendo los más frecuentes Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} . Los cationes monovalentes interactúan de manera poco específica, en cambio los divalentes se unen a los átomos de oxígeno del fosfato, aunque también pueden interactuar con los átomos de las bases y los azúcares o bien coordinarse a moléculas de agua para favorecer zonas específicas de interacción con el ácido nucleico. Los iones contribuyen a la estabilización de los ácidos nucleicos, pero en concentraciones muy elevadas pueden producir el efecto contrario.

Como resultado de las numerosas interacciones entre los componentes de los ácidos nucleicos y el entorno, se generan estructuras tridimensionales secundarias y terciarias complejas y variadas. La Figura 1.10 muestra algunos de los patrones de estructura secundaria descritos en ácidos nucleicos naturales o sintéticos. Los oligonucleótidos simple cadena (single strand, ss) pueden adoptar diferentes formas tridimensionales (*motif*, en inglés) en las cuales es posible reconocer zonas doble cadena (double strand, ds) helicoidales, formación de *loops*, *junctions*, etc. (Tian et al, 2004). A diferencia de las estructuras simple cadena, la interacción de dos hebras complementarias conlleva a la formación de una hélice cuyas características pueden ser definidas con bastante precisión. Como se mencionó previamente, las interacciones puente H, *stacking*, y las que tienen lugar con los iones y el solvente contribuyen a estabilizar dichas estructuras (Yakovchuk et al, 2006).

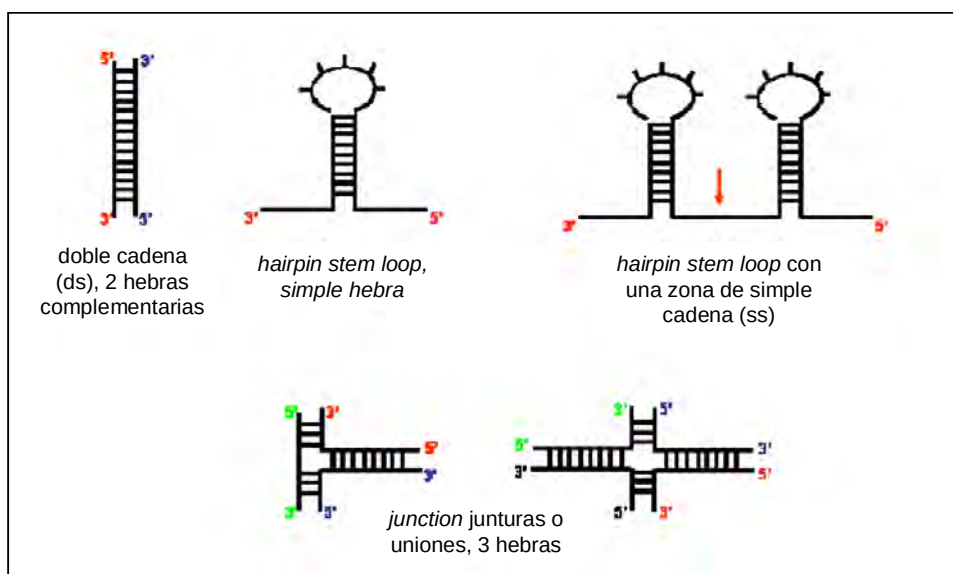


Figura 1.10. Motivos o estructuras secundarias de ácidos nucleicos

1.2.1 Aptámeros

Un aptámero es una secuencia de ADN o ARN simple cadena que es capaz de reconocer moléculas específicas. Se obtiene a partir de bibliotecas combinatorias de ácidos nucleicos sintéticos mediante un proceso iterativo de adsorción, recuperación y amplificación. Dichas secuencias poseen potenciales aplicaciones para el desarrollo de dispositivos analíticos, biosensores y agentes terapéuticos (James, 2000).

El método de obtención de estos oligonucleótidos funcionales se desarrolló de manera simultánea en tres laboratorios independientes de Estados Unidos en 1990 y se denominó SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) o evolución molecular *in vitro* (Ellington y Szostak, Tuerk y Gold, Robertson y Joyce). La Figura 1.11 muestra un esquema muy resumido de las etapas del proceso.

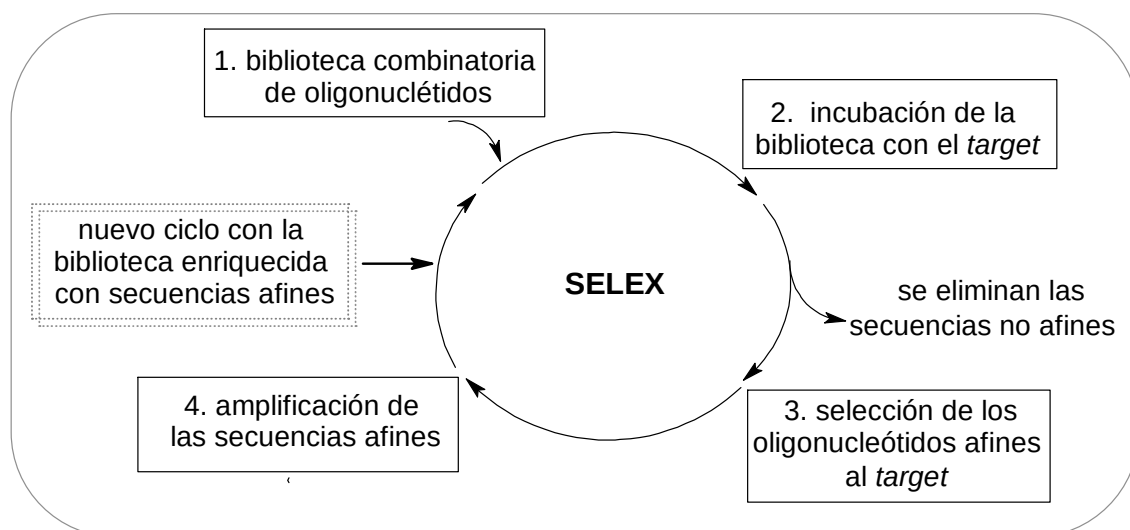


Figura 1.11 Esquema de las etapas del proceso de SELEX

Como punto de partida se diseña una biblioteca combinatoria de secuencias de ADN o ARN sintética. La misma posee una región aleatoria o *random* formada por 40 a 60 nucleótidos, flanqueada por dos zonas de secuencia fija llamadas *primer* (Figura 1.12). La posición de cada nucleótido en la región aleatoria se sintetiza a partir de una mezcla de fosforoamiditas que contiene las cuatro bases nitrogenadas (A, G, C y T).

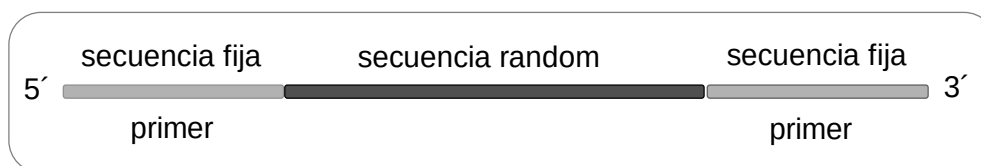


Figura 1.12 Esquema de una secuencia de una biblioteca combinatoria para SELEX

La diversidad estructural de la biblioteca combinatoria radica en la diversidad de formas tridimensionales y este aspecto es clave para el reconocimiento a nivel molecular del *target*. Así por ejemplo, para una zona random integrada por 40 nucleótidos, el número de combinaciones matemáticamente posibles resulta $1,2 \cdot 10^{24}$ (4^{40})! Sin embargo, en la práctica, la diversidad de una biblioteca combinatoria oligonucleotídica típica obtenida por síntesis en fase sólida resulta del orden de $10^{14} - 10^{15}$ secuencias individuales, consecuencia de las limitaciones en la cantidad de masa de biblioteca de la cual se parte. La molécula blanco o *target* debe inmovilizarse a un soporte sólido para llevar a cabo la etapa de incubación con la biblioteca combinatoria (ver Figura 1.11). Hay diferentes opciones de soportes, entre los más usados se encuentran las columnas de agarosa, sefarosa o resinas sintéticas, membranas de nitrocelulosa y esferitas magnéticas (*magnetic beads*) (Gopinath, 2007).

La etapa de amplificación de las secuencias que muestran afinidad por el *target* se realiza mediante la técnica de PCR (polymerase chain reaction) para el caso del ADN (Kinzler y Vogelstein, 1989). Para este propósito son necesarias las secuencias fijas o *primers* (ver Figura 1.12).

La síntesis química de oligonucleótidos está inspirada en el desarrollo de péptidos en fase sólida realizado por Robert Merrifield a comienzos de la década del '60. La idea básica es que en la síntesis de un polímero hay una serie de pasos químicos que se repiten por cada ciclo (*mer*) hecho que hace posible la automatización del proceso. El primer sintetizador comercial de oligonucleótidos se desarrolló en Canadá en 1981 (Ogilvie et al, 1981). En la práctica el término oligonucleótido se aplica a secuencias que tiene un máximo de 150 nucleótidos, valor límite para la síntesis química en la actualidad. Algunas de las ventajas que presenta el método químico es que admite nucleótidos químicamente modificados en cualquiera de las subunidades (base, furanosa

o fosfato); estas modificaciones pueden introducir nueva funcionalidad o ampliar las existentes. Como desventaja debe mencionarse que el rendimiento es menor que para la síntesis enzimática, los costos de producción y purificación son elevados, y la cantidad de nucleótidos es limitada, como se mencionó.

La incorporación de modificaciones químicas en la estructura de los ácidos nucleicos, permite además, aumentar la estabilidad de estas moléculas frente de la degradación mediada por nucleasas. Las posiciones susceptibles de modificar se muestran en la Figura 1.13, ejemplificadas para el nucleótido que tiene U (uracilo) como base nitrogenada. En particular la sustitución del puente fosfodiéster por un puente fosforotioato resulta de interés en este trabajo de tesis, pues además de su resistencia a la degradación, ofrece un átomo de S a través del cual puede unirse a la superficie de un metal noble como el oro.

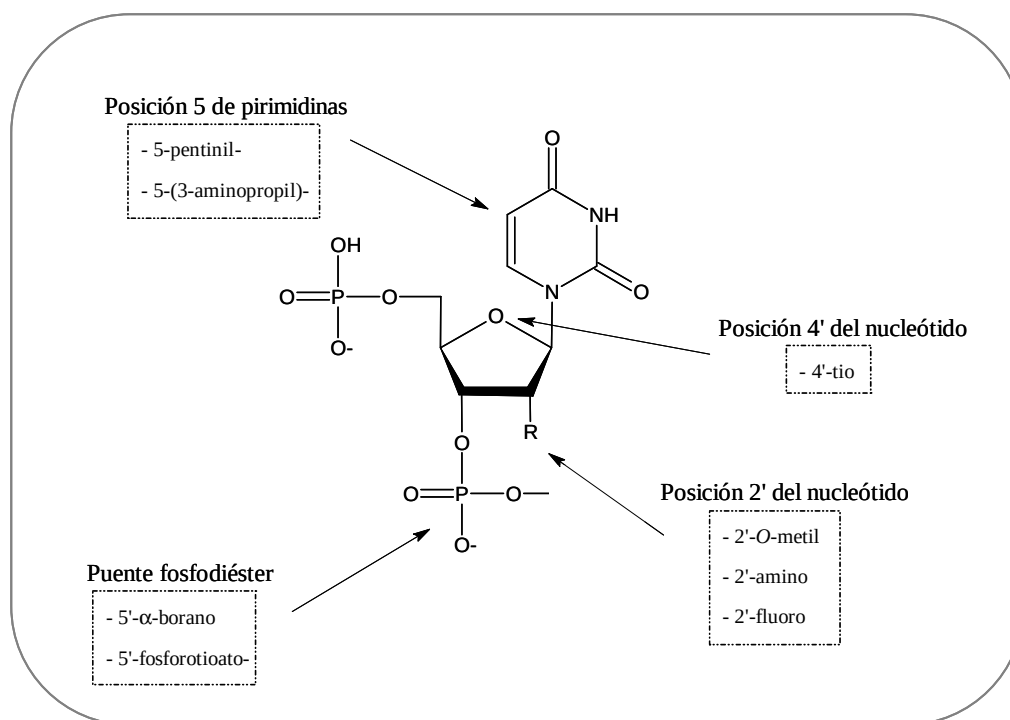


Figura 1.13 Posiciones susceptibles de modificación química en un nucleótido

1.3 Superficies para sensores

En un sensor, el conjunto que integran la superficie y el soporte que la sustenta se denomina sustrato (ver Figura 1.1). A continuación se describen brevemente algunas de las técnicas que permiten obtener estos dispositivos y modificarlos luego para su aplicación específica.

1.3.1 Serigrafía

La serigrafía es un sistema de impresión milenario usado para reproducir documentos e imágenes sobre diferentes materiales. La técnica consiste en transferir una tinta a través de una malla tensada sobre un bastidor. El paso de la tinta se bloquea selectivamente, mediante una emulsión o barniz delimitando las áreas donde no habrá imagen.

Para la construcción de sensores se utiliza una tinta conductora de grafito en la cual se suspenden los componentes del ensayo. La principal ventaja de este sistema es que, una vez realizado el primer prototipo, la impresión puede repetirse sin perder definición y a un costo relativamente bajo, permitiendo la producción en serie. Además, dadas las propiedades conductoras del grafito es posible realizar la electrodeposición de un metal, como oro sobre la superficie en una etapa posterior tal como se ha realizado en este trabajo (ver 2.2.3.3). Una de las desventajas es que la tinta conductora contiene solventes orgánicos, además del polvo de grafito, los cuales imponen condiciones poco compatibles con los componentes que deben suspenderse en la misma (sustancias biológicas, como enzimas por ejemplo). Otra limitación de los sensores obtenidos por serigrafía es que tales componentes no están firmemente unidos a la superficie y con el tiempo pueden ir disolviéndose en la muestra, por lo tanto no resultan adecuados para sistemas en flujo. Un ejemplo de aplicación es el electrodo de glucosa, basado en el trabajo pionero de H. Allen O. Hill y colaboradores (Cass et al, 1984).

1.3.2 Fotolitografía: “impresión con luz”

Este proceso se basa en la transferencia de un patrón a un polímero fotosensible (*fotoresist*) mediante la exposición a una fuente de luz a través de una máscara óptica. Dicha máscara por lo general consta de patrones opacos (por ejemplo, óxido de cromo o de hierro) sustentados sobre un soporte transparente (cuarzo) el cual se utiliza para

definir las características del diseño sobre la oblea. El patrón del polímero fotosensible es transferido al sustrato subyacente por disolución (*etching*) o depósito. La combinación de una alineación precisa de una serie sucesiva de fotomáscaras con distintos patrones, conduce a complejas estructuras multicapa.

La industria de los semiconductores aplicó la fotolitografía, a comienzos de los años '70, para el desarrollo de diversos sensores químicos con sistemas de transducción amperométrico, potenciométrico, térmico o acústicos (ver por ejemplo, Zemel, 1990).

La construcción de un sensor, por ejemplo un electrodo, se realiza en varios pasos. La primera etapa consiste en calentar la oblea de silicio con una corriente de oxígeno, para producir una película aislante de dióxido de silicio. A continuación, se depositan secuencialmente capas de titanio y un metal noble. Posteriormente se agrega el polímero fotosensible mediante la técnica de revestimiento por rotación (*spin-coating*) y se expone a la radiación UV a través de una máscara que define el área activa del sensor. Las partes expuestas a la luz producen una capa resistente, que corresponde al área que tendrá el sensor. La oblea se pone en contacto con una solución que disuelve los metales en las áreas desprotegidas y luego de un paso de lavado, el polímero fotosensible es removido con un solvente químico exponiendo los patrones de los electrodos diseñados. El proceso se repite usando una máscara que define las líneas de conducción y los contactos eléctricos. Finalmente, se modifica la superficie con los materiales necesarios (moléculas biológicas por ejemplo) para darle especificidad al sistema.

Esta técnica también se emplea para el desarrollo de dispositivos que integran funciones propias de un laboratorio en un chip, conocidos como *lab on chip* (Ehrfeld, 2003). Los mismos evolucionaron gracias al desarrollo de la microfluídica (Whitesides, 2006). Debido a su relevancia en la construcción de circuitos integrados, la fotolitografía ha avanzado vertiginosamente en los últimos cinco años, muestra de ello es la microimpresión de patrones 3D (ver por ejemplo, Hohmann et al, 2015).

1.3.3 Estructuras nanoporosos

Los sistemas nanoporosos estructurados sintetizados mediante anodizado electroquímico han cobrado gran interés por sus potenciales aplicaciones en el desarrollo de sensores. Este proceso aplicado sobre aluminio o titanio genera nanoporos ordenados, alineados verticalmente, de geometría definida (ver Figura 1.14). Una adecuada combinación de tamaño y propiedades químicas de la superficie ofrece la

posibilidad de un transporte selectivo y una interacción con dicha superficie, integrando los procesos de separación (por tamaño) con las funciones de detección en un mismo dispositivo (Santos et al, 2013). Los nanoporos de aluminio anodizado (AAO) son eléctricamente aislantes pero pueden modificarse con un material conductor (por ej. Au, Pt, SnO_2 , polímeros conductores, nanotubos de carbono) que funcione como transductor de una respuesta electroquímica. A su vez, la superficie interna de los nanoporos puede funcionalizarse con moléculas específicas que permitan la detección selectiva de un analito de interés. Los trabajos de Smirnov y colaboradores (Vlassiuk et al, 2005), pioneros con este sistema en el campo de los genosensores, mostraron que la hibridación de una hebra de ADN con su secuencia complementaria previamente inmovilizada sobre nanoporos de AAO, podía ser detectada por un aumento en la impedancia debido al bloqueo de los nanoporos al formarse la estructura doble cadena. También se ha demostrado por mediciones electroquímicas (EIS, CV, conductancia) la importancia del tamaño de los nanoporos en la detección (Vlassiuk et al, 2005, Takmakov et al, 2006).

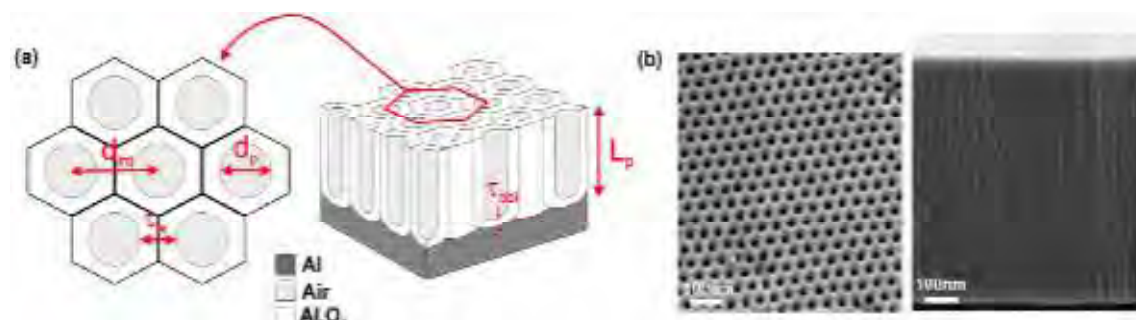


Figura 1.14. Oxido de aluminio anodizado: a) estructura de los nanoporos, b) Imagen SEM del AAO (vista superior y lateral) (Santos et al, 2013)

1.3.4 Modificación de superficies

La superficie es una delgada región del espacio, cuyo espesor es de dimensiones submicrométricas en general, en la cual las propiedades de un material (composición química, índice de refracción, fuerza mecánica, conductividad, carga, etc.) son significativamente diferentes respecto de las que exhibe el seno del mismo.

La modificación de una superficie consiste en su transformación fisicoquímica, con el fin de introducir cambios en sus propiedades los cuales inciden sobre su funcionalidad. Para ello existen diversas metodologías basadas en procesos físicos y químicos.

Cuando se depositan monocapas o películas moleculares sobre sustratos conductores se obtienen *electrodos modificados*. Este campo fue desarrollado por Hubbard (Lane y Hubbard, 1970), Murray (Moses et al, 1975) y Millar (Millar et al, 1975). Tal como se muestra en la Figura 1.14, los electrodos modificados pueden obtenerse por diferentes técnicas que incluyen la adsorción irreversible, la unión covalente de una monocapa molecular y el recubrimiento del electrodo con películas de polímeros u otros materiales.

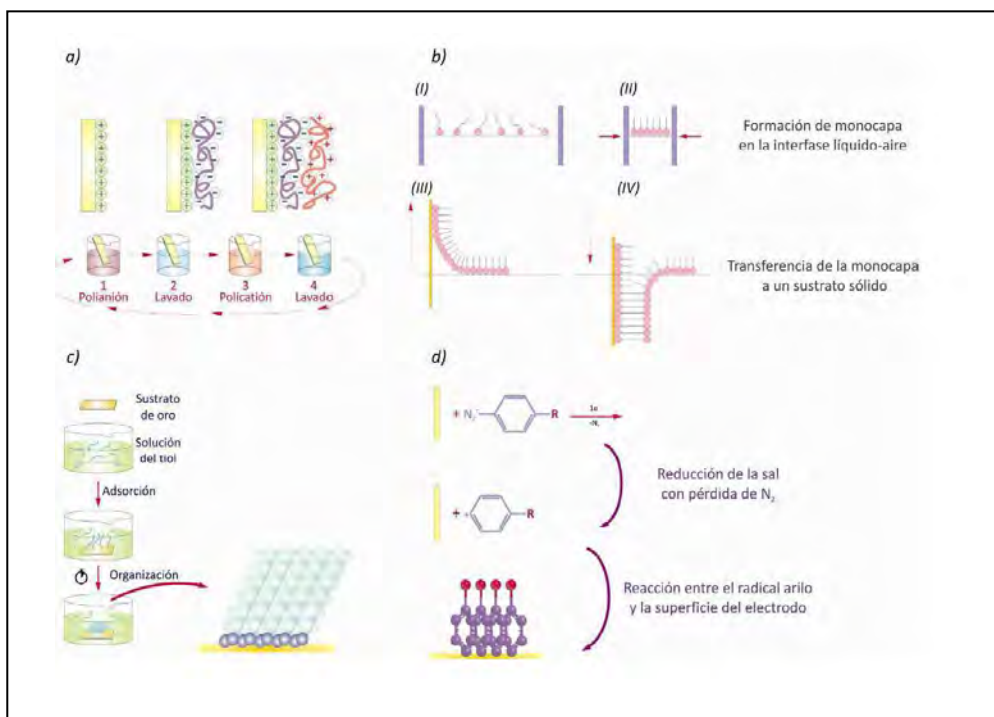


Figura 1.15 Estrategias para modificar superficies: a) autoensamblado de polielectrolitos, b) formación de capas delgadas, c) autoensamblado de compuestos órganosulfurados, d) reducción electroquímica de sales de diazonio (Ricci, 2010)

En el autoensamblado capa por capa (Figura 1.15 a), la superficie se modifica mediante el recubrimiento con un polielectrolito y luego se introduce la especie electroactiva por intercambio iónico (Oyama y Anson, 1980). El recubrimiento con el polielectrolito puede realizarse por diversos métodos, el más simple consiste en dejar secar una

alícuota de la solución (recubrimiento por secado o *casting* o *drop coating*). Una técnica para obtener películas de espesor controlado y homogéneo consiste en sumergir el sustrato en la solución del polímero, retirarlo lentamente y dejarlo secar (recubrimiento por inmersión o *dip coating*). Otra posibilidad es agregar la solución del polímero en exceso y remover parte de la misma por centrifugación (revestimiento por rotación o *spin coating*). Los polielectrolitos catiónicos como la poli(4-vinilpiridina) (4-PVP) se emplean para inmovilizar cuplas redox aniónicas, por ejemplo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$. Los polianiones como el poliestirensulfonato (PSS) o Nafion, resultan aptos para incorporar cationes tales como por ejemplo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3/2+}$ o $[\text{Os}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Una limitación de las superficies modificadas por esta estrategia es que al no existir una unión covalente entre la especie redox y el electrodo, la primera puede ser liberada gradualmente al entorno.

Las películas obtenidas por el método de Langmuir-Blodgett (Figura 1.15 b) contienen moléculas anfifílicas (compuestas por un extremo hidrofílico y otro hidrofóbico) depositadas sobre la superficie. En una primera etapa, dichas moléculas forman una monocapa en la interfaz líquido-aire y luego son transferidas por inmersión (o emersión) del mismo en (o desde) el líquido. Esta técnica permite generar películas que contienen una o más monocapas de espesor controlado.

La electrorreducción de sales de diazonio (Figura 1.15 d) genera un radical arilo que reacciona con el electrodo, formando una unión covalente con el mismo.

Las monocapas autoensambladas (*self assembled monolayers*, SAMs) (Figura 1.15 c) se pueden preparar usando diferentes tipos de moléculas y sustratos. Las moléculas que forman el autoensamblado poseen un átomo o grupo de átomos con buena afinidad por la superficie, hecho que favorece el desplazamiento de moléculas adsorbidas de manera inespecífica. Las SAMs son materiales dinámicos que pueden adoptar distintas formas y estructuras especialmente cuando están inmersos en un fluido. En consecuencia, el grado de cubrimiento o densidad superficial, las interacciones laterales entre especies adsorbidas y los cambios conformacionales de dichas especies, son algunas de las propiedades que interesa caracterizar en estos sistemas. El estudio de las monocapas autoensambladas formadas por compuestos tiolados sobre superficies metálicas ha impulsado las aplicaciones en nanotecnología, una detallada descripción sobre el tema puede consultarse en el trabajo de Whitesides y colaboradores (Love et al, 2005).

La Figura 1.16 muestra algunos compuestos con átomos de S que se emplean para la formación de SAMs de alcanotioles sobre Au(111).

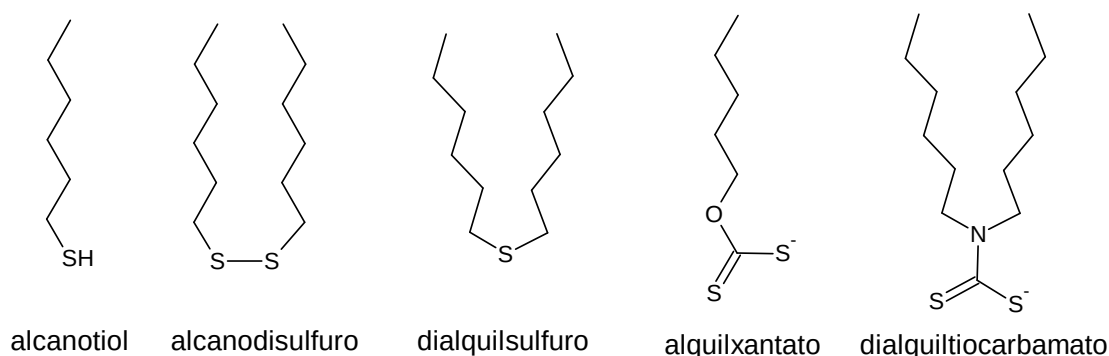
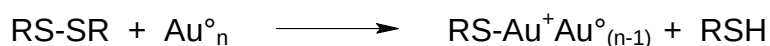


Figura 1.16 Compuestos tiolados que forman monocapas con Au

Para la adsorción de alcanotioles desde soluciones diluidas (concentración del orden mM) sobre Au(111) la cinética del proceso comprende dos etapas. La primera es rápida (minutos), al final de la misma el espesor de la capa es aproximadamente un 80-90% del máximo. La segunda etapa es lenta, pudiendo requerir algunas horas para alcanzar el espesor final (Bain et al, 1989). La cinética de la primera etapa está gobernada por la interacción entre la superficie y el grupo funcional involucrado (tiol), la energía de activación depende de la densidad electrónica sobre el átomo de S. La segunda etapa se ve afectada por el grado de desorden de la cadena alquílica, el tipo de interacciones entre dichas cadenas carbonadas y la movilidad de las mismas en la superficie. En el caso de alcanotioles de cadena larga, se observa que la cinética es rápida probablemente debido a las interacciones de tipo van der Waals entre cadenas laterales. La quimisorción de alcanotioles y dialquildisulfuros sobre superficies limpias de Au produce monocapas indistinguibles y se postula la formación de la especie Au(I) y RS⁻. En el caso del disulfuro (-S-S-) se propone una adición oxidativa (Ullman, 1996):



La adsorción de un disulfuro asimétrico (distintas cadenas carbonadas), conduce a la formación de una SAM que contiene igual proporción de ambas cadenas (Biebuyck y Whitesides, 1993). Esta observación es consistente con el mecanismo oxidativo

propuesto para el disulfuro. Además, experimentos de reemplazo de $S(CH_2)_{10}CF_3$ adsorbido por $S(CH_2)_{10}CN$, sugieren que la estabilidad de una SAM formada por tioles sobre Au depende de la densidad electrónica sobre el átomo de S.

En el caso de alcanotioles, la reacción puede considerarse como una adición oxidativa del enlace S-H a la superficie de Au, seguida de una reducción y eliminación de H_2 :



La unión de grupos tiolados al Au es muy estable (alrededor de 167 kJ.mol^{-1}). Empleando datos de energía de enlace y según la ecuación anterior, para el caso de un alcanotiol se estima un valor de -23 kJ.mol^{-1} mientras que para el disulfuro el valor calculado es -100 kJ.mol^{-1} , es decir aproximadamente -50 kJ.mol^{-1} por cada grupo $R-S^-$. Con respecto a la estabilidad térmica de las monocapas de alcanotioles, para temperaturas entre $170 - 230 \text{ }^\circ\text{C}$ comienza a observarse desorción (Ullman, 1996).

1.4 Aptasensores

Los aptasensores constituyen la familia de dispositivos en los cuales un aptámero funciona como elemento de reconocimiento molecular (Walter et al, 2012).

La interacción de un aptámero con su molécula blanco o *target* forma un complejo o conjugado aptámero-target con una estructura tridimensional definida, cuya constante de disociación puede estar en el rango nM e incluso pM. El reconocimiento a nivel molecular se basa en interacciones puente H, hidrofóbicas y electrostáticas. La aproximación del analito al aptámero, promueve cambios conformacionales los cuales maximizan la interacción entre ambos componentes. Dichos cambios pueden ser aprovechados para detectar el evento de reconocimiento. De acuerdo a la posición espacial relativa del *target* y el aptámero en el complejo formado, los *targets* se clasifican en dos categorías: grupo integrado (*embedded group*) y grupo de unión externa (*outside-binding group*). Los ligandos que pertenecen a la primera categoría se localizan en un “bolsillo molecular” formado por una secuencia determinada de oligonucleótidos del aptámero (gruta, según se indica en la Figura 1.9). Las moléculas

pequeñas, tales como adenosintrifosfato (ATP) (Lin y Patel, 1997), cocaína (Stojanovic, et al, 2001) o teofilina (Zimmermann et al, 1997) son ejemplos que pertenecen a este grupo. Las biomacromoléculas, típicamente los *targets* proteicos, que poseen estructuras espaciales complejas y voluminosas, pertenecen al grupo de unión externa. Algunas proteínas, como la trombina, tienen más de un sitio de unión al aptámero (Tasset et al, 1997), lo cual ofrece diversos diseños en las estrategias de sensado.

El desarrollo de sistemas de detección que emplean proteínas, más específicamente anticuerpos, como elementos de reconocimiento molecular ha sido ampliamente empleado con fines diagnósticos. En el caso de los aptasensores los ácidos nucleicos (aptámeros) cumplen la función de elemento de reconocimiento frente a un analito de interés. En tal sentido resulta interesante hacer una comparación entre ambos, desde la perspectiva de su potencial aplicación para el desarrollo de un sensor (Tabla 1.1).

Anticuerpo (proteína)	Aptámero (ácido nucleico)	Consecuencias en el desarrollo de aptasensores
Su desarrollo depende de animales. No son aplicables a todos los blancos, en el caso de moléculas pequeñas se requiere la asociación a una macromolécula.	Se identifican por selección <i>in vitro</i> . Aplicables a prácticamente cualquier blanco, incluidos aquellos de alta toxicidad o de baja respuesta inmune dado que no está en juego este proceso para su selección.	Los aptámeros pueden usarse como elementos de reconocimiento frente a cualquier blanco, tóxico o no tóxico.
El proceso de selección <i>in vivo</i> es costoso y puede tener variaciones de un batch a otro.	La síntesis química permite optimizar los costos de producción. La reproducibilidad es muy buena.	Es posible reducir el costo. Se obtiene un producto de alta calidad mediante síntesis química.
Las modificaciones químicas (linkers, colorantes, etc.) se producen en posiciones al azar.	Se pueden introducir modificaciones en posiciones definidas durante la síntesis química del aptámero.	La modificación química permite controlar la inmovilización. Pueden introducirse colorantes o marcadores electroactivos para desarrollar biosensores.

Para el reconocimiento del blanco se requieren condiciones fisiológicas o leves variaciones de las mismas.	Pueden adaptarse las condiciones durante el proceso de selección del aptámero para que resulte activo en dicho entorno, aunque no sean condiciones fisiológicas.	Los aptasensores pueden ser diseñados con elementos de reconocimiento funcionales bajo determinadas condiciones de ensayo. No se requiere preparación de la muestra.
Son biomoléculas altamente conservadas por lo tanto, diferentes anticuerpos pueden tener comportamiento similar.	Presentan mayor variabilidad estructural (DNA, RNA, cantidad de oligonucleóticos 25-125, formas de plegado) y también en su comportamiento.	Las condiciones de armado y funcionamiento de un aptasensor deben ser adaptadas para cada aptámero individual.
Son sensibles a la temperatura, la desnaturalización resulta irreversible.	Son estables térmicamente, la desnaturalización es reversible.	Los aptasensores pueden ser usados en un amplio rango de condiciones.
La vida media es limitada, el proceso de regeneración puede resultar en pérdida de la actividad.	La vida media es prolongada, pueden ser regenerados sin pérdida de actividad.	Los aptasensores son estables por largos periodos de tiempo y pueden ser regenerados.
Son macromoléculas de alta masa molar (~ 100 kDa).	Son moléculas de masa molar intermedia (13 – 26 kDa).	Los aptámeros pueden ser inmovilizados en mayor densidad, pudiendo así ampliar el rango dinámico.

Tabla 1.1 Comparación entre proteínas y ácidos nucleicos como elementos de reconocimiento molecular par el diseño de sensores (adaptado de Walter et al, 2012)

Un factor a tener en cuenta, es que la estabilidad de los aptámeros puede verse amenazada en presencia de nucleasas, enzimas que están presentes en los fluidos biológicos. Este problema puede resolverse por tres estrategias diferentes. Una de ellas consiste en modificar químicamente el aptámero en las posiciones lábiles en una etapa posterior al proceso de SELEX (modificación post-selección). La otra consiste en llevar adelante el proceso SELEX con nucleótidos modificados que sean sustrato de la

maquinaria enzimática aumentando su resistencia a la degradación (ver 1.2.1) (Hollenstein, 2012; Kong y Bym, 2013). Otra opción consiste en diseñar un dispositivo que permita la selección por tamaño, por ejemplo si el aptámero se encuentra en el fondo de un nanoporo suficientemente pequeño, una molécula voluminosa como una nucleasa tendría un acceso muy restringido o impedido (ver 1.3.3).

1.4.1 Tipos de aptasensores

Además de los aspectos mencionados en la Tabla 1.1, dos factores propios de la estructura de los ácidos nucleicos introducen diversidad en las posibles arquitecturas de la capa de reconocimiento y la estrategia de detección para un aptasensor:

- La mayoría de los aptámeros experimentan cambios conformacionales cuando reconocen a su analito.
- Puesto que los aptámeros son secuencias oligonucleotídicas poseen una hebra complementaria con la cual hibridizan. Es posible entonces, diseñar ensayos de competencia en los cuales el analito desplace a dicha hebra.

A partir de estas consideraciones, Han y colaboradores (Han et al, 2010) clasificaron los aptasensores según el modo de detección del siguiente modo:

- a) Cambio estructural inducido por el analito (*target-induced structure switching*, TISS)
- b) Disociación inducida por el analito (*target-induced dissociation mode*, TID)
- c) Reemplazo competitivo
- d) Sandwich

A continuación se describen brevemente los principios de funcionamiento de cada una de estas categorías y se dan ejemplos reportados en bibliografía.

- a) Cambio estructural inducido por el analito (*target-induced structure switching*, TISS)

La interacción del analito con el aptámero induce un cambio conformacional en la secuencia oligonucleotídica, el cual se aprovecha para generar una señal cuantificable. Esta estrategia ha sido ampliamente empleada en apt sensores de base electroquímica en los cuales se une covalentemente uno de los extremos del aptámero a la superficie de un electrodo, mientras que en el extremo opuesto se introduce un marcador electroactivo como ferroceno (Fc) o azul de metileno (MB, methylene blue) por ejemplo. Otra posibilidad es emplear un marcador y un atenuador de fluorescencia. A temperatura ambiente, el aptámero se encuentra en equilibrio conformacional entre una estructura extendida o desplegada (random coil) y una forma plegada (stem-loop). En ausencia del analito es posible favorecer la forma extendida de modo tal que el marcador redox esté alejado de la superficie y no se detecte la señal (White et al, 2010). Cuando se produce la interacción con el analito, el plegamiento del aptámero acerca el marcador redox a la superficie del electrodo produciendo una señal cuantificable. En esta estrategia de detección la señal electroquímica aumenta con la concentración del analito (signal-on) (Figura 1.17 a). En la variante conocida como signal-off, la interacción del aptámero con el analito conduce a una disminución de la señal. Un ejemplo es el sensor para cocaína propuesto por Stojanovic y colaboradores ya mencionado (Figura 1.17 b). En presencia del analito se produce un cambio conformacional en el aptámero que aproxima el fluoróforo (F) y el atenuador de fluorescencia (D) y la señal disminuye.

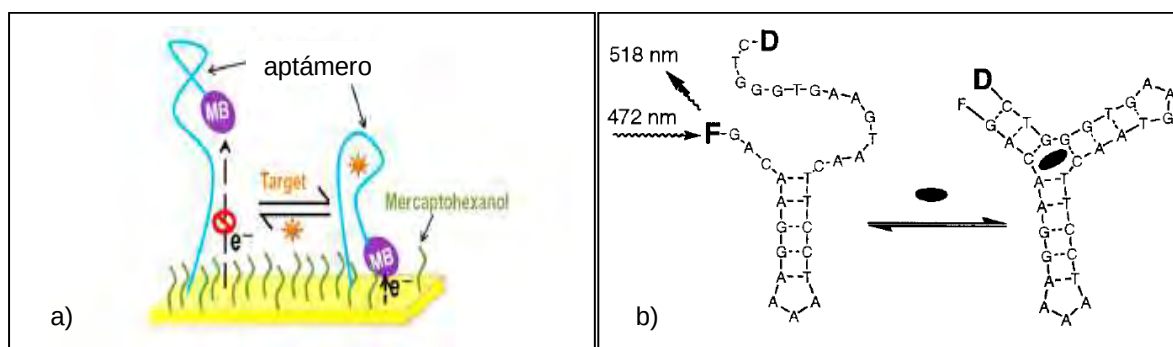


Figura 1. 17 Esquema de un aptasensor basado en el cambio estructural del analito (TISS): a) *signal on* (Liu et al, 2014) con detección electroquímica, b) *signal off* con detección por fluorescencia (Stojanov et al, 2001)

b) Disociación inducida por el analito (*target-induced dissociation mode*, TID)

En este caso el aptámero se inmoviliza sobre la superficie del sensor y se incuba con la hebra complementaria para formar la doble hebra. A continuación se agrega el analito que compite con la secuencia complementaria por el aptámero. Al producirse la disociación del sistema doble cadena, el complejo aptámero-analito adopta una estructura compleja producto del reconocimiento. Para favorecer la competencia a favor del analito, se puede emplear una hebra complementaria de menor cantidad de nucleótidos (“hebra corta”) o introducir alguna mutación puntual en la misma. La disociación puede ser detectada ópticamente si el aptámero fue previamente modificado con un fluoróforo y la hebra complementaria con un quencher (ver por ejemplo Nutiu y Li, 2003 y 2005, Chen et al, 2012). El sensor se regenera incubando nuevamente con la hebra complementaria. La misma estrategia fue utilizada por Zuo y colaboradores (2007) para la detección electroquímica de ATP, inmovilizando sobre la superficie de un sensor de Au el aptámero modificado con Fc y formando la doble hebra con la secuencia complementaria. Debido a la rigidez del híbrido, el Fc no puede dar la transferencia de carga por estar alejado de la superficie (aprox. 10 nm) (forma “*off*”). Al incubarse con ATP se produce la deshibridización, el aptámero adopta una forma compleja, que permite aproximar el marcador electroactivo a la superficie dando una señal (forma “*on*”). La Figura 1.18 muestra ejemplos de esta estrategia.

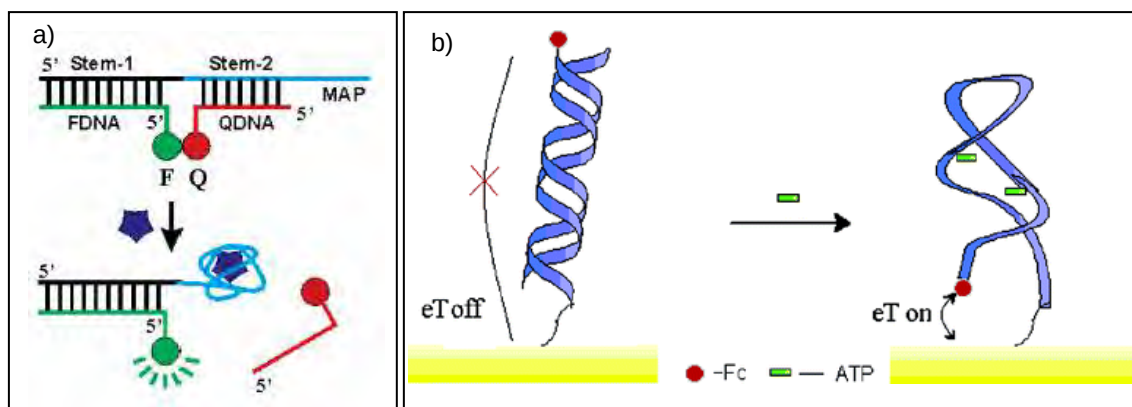


Figura 1. 18 Aptasensores basados en la disociación inducida por el analito (TID), *signal on*: a) detección fluorescente (Nutiú et al, 2003), b) detección electroquímica (Zuo et al, 2007)

c) Reemplazo competitivo

Dado que los aptámeros comparten algunas características con los anticuerpos (ver Tabla 1.1) fue posible adaptar estrategias de los inmunoensayos al caso de los aptámeros. Un ejemplo son los ensayos competitivos basados en el desplazamiento de analitos previamente marcados. Hansen y colaboradores (2006) propusieron un sensor para la detección conjunta de trombina y lisozima en el cual emplean quantum-dots para marcar ambos analitos (Figura 1.19). Se inmovilizaron conjuntamente los aptámeros para trombina y lisozima sobre Au, y luego se los incubó con trombina y lisozima marcadas con partículas de CdS y PbS respectivamente. Al incubar el sistema con la muestra, si ésta contiene los analitos, se produce un intercambio entre las formas marcadas (previamente inmovilizadas) y no marcadas (provenientes de la muestra), liberándose al medio los analitos marcados. Finalmente se detectan electroquímicamente.

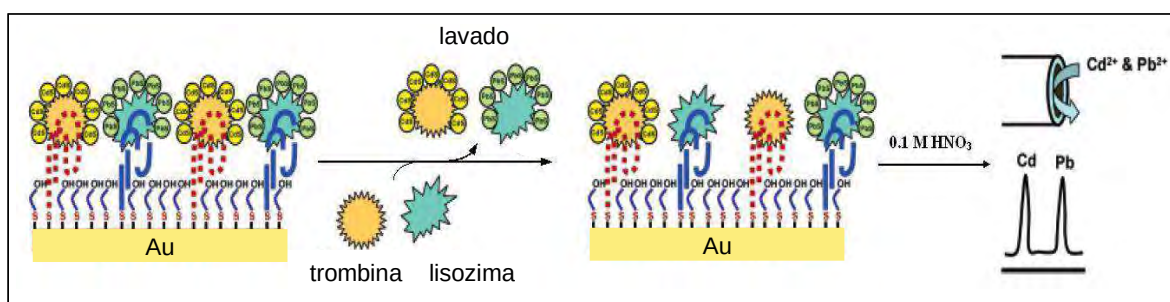


Figura 1. 19 Aptasensor basado en el reemplazo por competencia (Hansen et al, 2006)

Otra opción consiste en inmovilizar la molécula blanco o *target* a la superficie del sensor. Un ejemplo para moléculas pequeñas es el sensor desarrollado para neomicina B. Al incubar con la muestra conteniendo el analito, el aptámero se une al mismo generando un cambio en la superficie que puede ser detectado por impedancia faradaica o SPR (*surface plasmon resonance*) (Santos-Alvarez et al, 2007 y 2009).

d) Sandwich

Esta estrategia se usa habitualmente para la detección de proteínas o moléculas de gran tamaño porque el analito debe tener dos sitios de reconocimiento diferentes. Se inmoviliza sobre la superficie del sensor un aptámero y se incubó con el analito. La

detección se hace con un segundo aptámero que se une a un sitio de reconocimiento distinto del primero. En el caso de analitos pequeños la estrategia es limitada puesto que el primer aptámero “envuelve” prácticamente al *target*.

Sin embargo, mediante una ingeniosa y no menos laboriosa construcción que involucra al aptámero y su hebra complementaria es posible aplicar la estrategia para cuantificar moléculas pequeñas. La Figura 1.20 muestra el ejemplo de un aptasensor para adenosina desarrollado por Zhang y colaboradores (2008). Sobre un electrodo de Au se inmovilizan nanopartículas (AuNPs) del mismo metal y una hebra de ADN simple cadena (“sonda de captura”) mediante formación de enlaces S-Au. Por otro lado, se arma una construcción que contiene el aptámero de adenosina y AuNPs. La misma se hibridiza con la sonda inmovilizada al electrodo y a continuación se agrega $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ el cual se une al ADN por interacciones electrostáticas permitiendo realizar la detección electroquímica. Cuando el electrodo finalmente se incuba con adenosina se libera la construcción que tenía las AuNPs y también el $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, produciendo una disminución de la señal electroquímica.

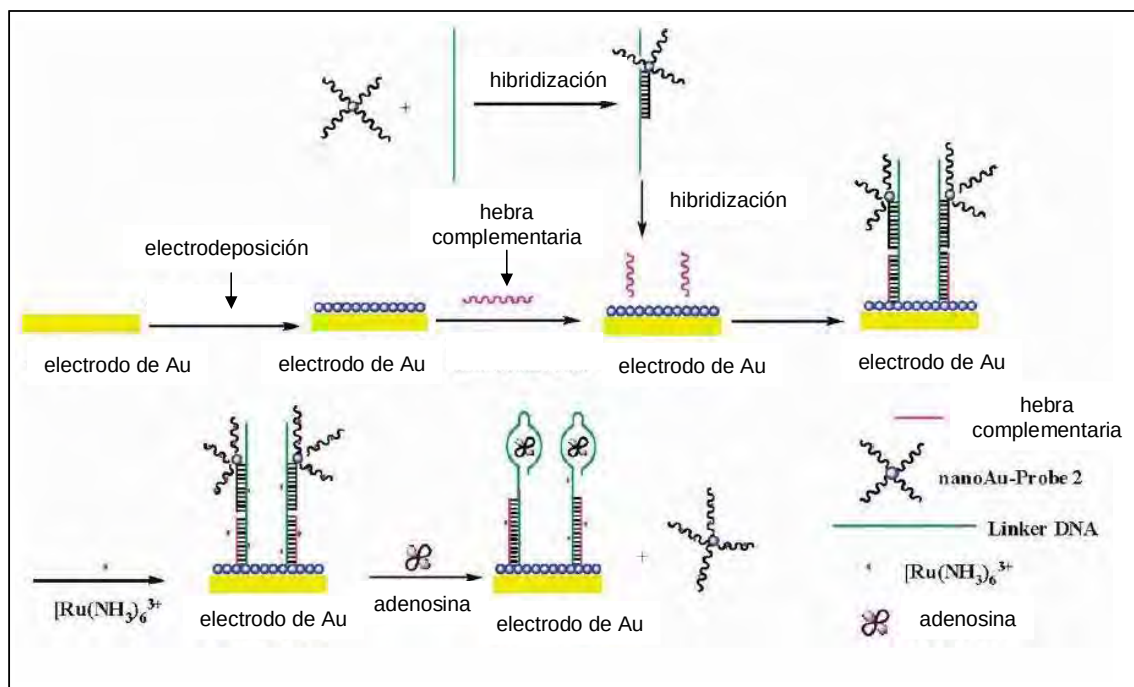


Figura 1. 20 Aptasensor basado en el reemplazo por competencia (Zhang et al, 2008)

Además de las cuatro estrategias descritas por Han y colaboradores, Walter y colaboradores (2012) identifican otro principio de construcción basado en una propiedad estructural que poseen los aptámeros que consiste en la reorganización de fragmentos inducida por la molécula blanco (TIR target-induced reassembly). El aptámero se divide en dos partes que no interactúan entre sí en ausencia del blanco. En presencia del mismo se forma un conjugado con los tres componentes. Este método fue aplicado por Zhou et al (2011) para la detección de cocaína (Figura 1.21).

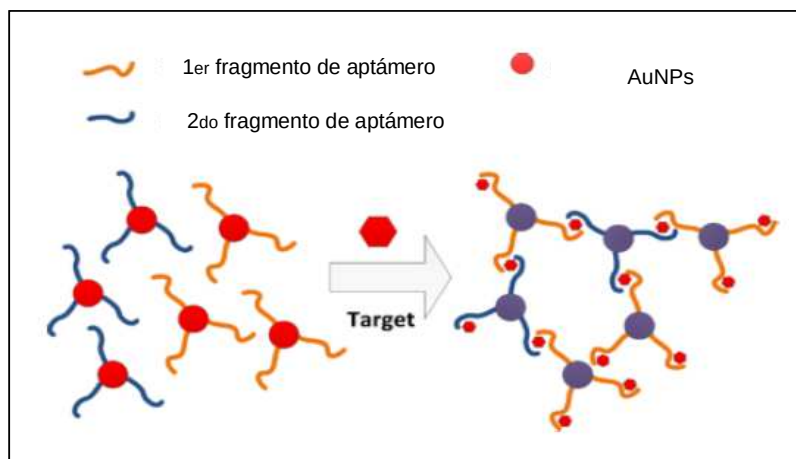


Figura 1. 21 Aptasensor basado en la reorganización de fragmentos de ADN (TIR) (Zhou et al, 2011)

1.4.2 Detección “label free”

Muchos diseños de biosensores requieren la presencia de un marcador para la etapa de transducción (ver Figura 1.1). Dependiendo del modo de detección, dicho marcador será un fluoróforo, una enzima, partículas magnéticas (“*magnetic beads*”), una especie electroactiva, etc. Sin embargo, la introducción del marcador puede afectar la interacción con el analito, particularmente cuando se emplean proteínas como elementos de reconocimiento molecular (Haabs, 2003). Además este procedimiento suma una etapa más en la construcción del biosensor.

La estrategia de detección tipo sándwich discutida previamente (ver 1.4.1) resuelve de manera indirecta el primer inconveniente. Una vez realizado el reconocimiento entre la molécula inmovilizada y el analito, se lava el sistema y se introduce una segunda molécula marcada la cual se une al conjugado haciendo posible la detección con buena sensibilidad.

En cambio cuando se diseña una estrategia *label free*, la detección directa del evento de reconocimiento evita los inconvenientes mencionados. Otra ventaja adicional, es que además de cuantificar, algunas técnicas experimentales como QCM (*quartz crystal microbalance*) o SPR permiten determinar constantes de afinidad y parámetros cinéticos a partir del análisis del sensorgrama o curva de respuesta en función del tiempo (Daniels y Pourmand, 2007). La técnica conocida como espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) también permite la detección a través de una sonda redox en solución, y por eso se ha aplicado para el desarrollo de sensores, basados en la estrategia *label free*. La funcionalización de una superficie conductora con un biomaterial se ha empleado para la etapa de transducción, permitiendo el desarrollo de inmunosensores, sensores basados en ADN o en enzimas. El trabajo de Katz y Willner (2003) ofrece una amplia descripción sobre los principios y aplicaciones empleando impedancia.

1.5 Motivación y objetivos

Esta tesis, junto a la de M. Belén Ponce, inició el camino en un nuevo proyecto de investigación enmarcado en el Área Química de la UNGS, cuyo interés ha sido desde su creación en 1996, el estudio de temas ambientales sustentados en una sólida base disciplinar desde la química. Más concretamente, el objetivo general se orienta hacia la detección y cuantificación de analitos de interés ambiental, en particular plaguicidas de uso frecuente (deltametrina, imazetapir, entre otros) a través del diseño de biosensores de base aptamérica con detección electroquímica.

La idea de iniciar una línea de trabajo experimental en un nuevo contexto, conlleva en sí misma un gran desafío desde la perspectiva de poner en marcha técnicas diferentes, procurar los insumos, diseñar o adaptar dispositivos para medir con el instrumental disponible, etc. Por otro lado, la necesidad de ensamblar conocimientos provenientes de al menos dos campos disciplinares bien establecidos y con largas trayectorias consolidadas como son la electroquímica y la química de los ácidos nucleicos, constituye un desafío intelectual interesante.

En este marco de referencia, el objetivo específico del presente trabajo de tesis consistió en estudiar de un modo sistemático la modificación de superficies de oro con secuencias

de oligonucleótidos y la aplicación de las mismas a la detección de moléculas pequeñas. Se usó como sistema modelo el aptámero desarrollado por Huizenga y Szostak (1995) para adenosina/AMP/ADP/ATP con el fin de explorar estrategias de desarrollo de señal por técnicas electroquímicas.

Más puntualmente todavía, si quisiera reflejarse en una pregunta el objetivo de este trabajo de investigación, la misma podría formularse del siguiente modo: *¿es posible para el caso de moléculas pequeñas, transformar el cambio conformacional promovido por el evento de reconocimiento entre un aptámero inmovilizado a una superficie de oro y su analito, en una señal electroquímica cuantificable en términos analíticos?* Los capítulos siguientes intentan responderla.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Métodos instrumentales

En esta tesis se han empleado distintas técnicas experimentales, la mayoría de ellas electroquímicas, que permitieron caracterizar los sistemas de detección objeto de estudio. A continuación se presenta una breve descripción del fundamento teórico de las mismas, la información que brindan, sus ventajas y limitaciones como así también el instrumental necesario para su implementación, haciendo especial énfasis en las aplicaciones.

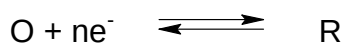
2.1.1 Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas de potencial controlado, requieren del uso de un potencióstato para mantener constante dicho potencial y medir la corriente, empleándose una celda electroquímica de tres electrodos en la mayoría de los casos. Dichas técnicas son seguramente las más antiguas, conocidas, estudiadas y versátiles. En general son de fácil implementación y el instrumental asociado es relativamente económico en comparación con otras técnicas instrumentales. Hay disponibles relevantes textos de referencia sobre los fundamentos y las técnicas electroquímicas entre los cuales se encuentran los trabajos de Bard y Faulkner (2000), Kissinger y Heineman (1996) y Sawyer (1995).

2.1.1.1 Conceptos generales

Una reacción de electrodo es un proceso interfacial que necesariamente involucra un paso de transferencia de carga desde o hacia una superficie conductora. La reacción de electrodo comprende a todos los procesos (reacción química, reorganización estructural, adsorción) que acompañan el paso de transferencia de carga. Se trata de un proceso anódico si las especies son oxidadas perdiendo electrones, o bien es un proceso catódico si las especies son reducidas en la interfaz, ganando electrones. Las especies electroactivas pueden estar en solución o formando una película sobre la superficie del electrodo o el material del electrodo en sí mismo.

La siguiente ecuación representa una reacción de electrodo general:



donde O y R son las especies oxidada y reducida respectivamente, y n es el número de electrones. Dicha reacción involucra una secuencia de pasos que puede incluir el transporte de reactivos hacia la superficie del electrodo, la transferencia de electrones y la remoción del producto de la superficie del electrodo. En consecuencia, la velocidad del proceso estará determinada por la velocidad del paso más lento de la secuencia (Bard y Faulkner, 2000; Pletcher et al, 2001).

La mayoría de las técnicas electroquímicas utilizan una celda de tres electrodos. El *electrodo de trabajo* (WE) es aquél donde ocurren los procesos electroquímicos de interés. En este tipo de celdas la corriente circula desde el electrodo de trabajo por un circuito externo y luego hacia el *electrodo auxiliar* o *contraelectrodo* (CE); el circuito se cierra por el transporte de iones en la solución. El contraelectrodo debe tener un área suficientemente grande (en la práctica, mayor que la del electrodo de trabajo) para no limitar el flujo de carga eléctrica. El tercer electrodo es el *electrodo de referencia* (RE) por el cual no circula corriente debido a su alta impedancia; su función es controlar el potencial del electrodo de trabajo.

Las medidas electroquímicas se han realizado empleando electrodos de trabajo (WE) de dimensiones milimétricas (comerciales, láminas de oro macizo y electrodos descartables). Los procesos electroquímicos que tienen lugar en los mismos, pueden ser descritos mediante los modelos de electrodo plano infinito y difusión semi-infinita. También se han empleado arreglos de electrodos de dimensiones nanométricas. De acuerdo a la definición operacional dada en el libro de Bard y Faulkner antes citado, alguna de las dimensiones del sistema debe ser menor que el espesor de la capa difusional. Para una discusión más detallada se sugiere consultar las obras antes mencionadas.

Para hacer mediciones con los electrodos de oro y carbono vítreo comerciales se diseñó una celda de vidrio con una cubierta y tapa de teflón (Figura 2.1 (izq.)). Para las láminas de oro macizo, fue necesario cambiar el diseño experimental de la celda, la misma se muestra en la Figura 2.1 (der.). Dicha celda de teflón, consta de un orificio circular de 1,6 mm de diámetro para delimitar el área de las láminas de oro a emplearse como electrodos de trabajo. La misma consta de 2 piezas de teflón que se mantienen unidas por 4 tornillos pasantes (ver Figura 2.1 (der.)). El electrodo de trabajo se inserta entre ambas piezas formando un sándwich. El volumen máximo de solución es de 5 mL.

Como electrodo de referencia se usó en todos los casos Ag/AgCl (KCl 3 M), el contraelectrodo es de Pt. Ambos se sujetan desde orificios realizados en la tapa de teflón de la celda.

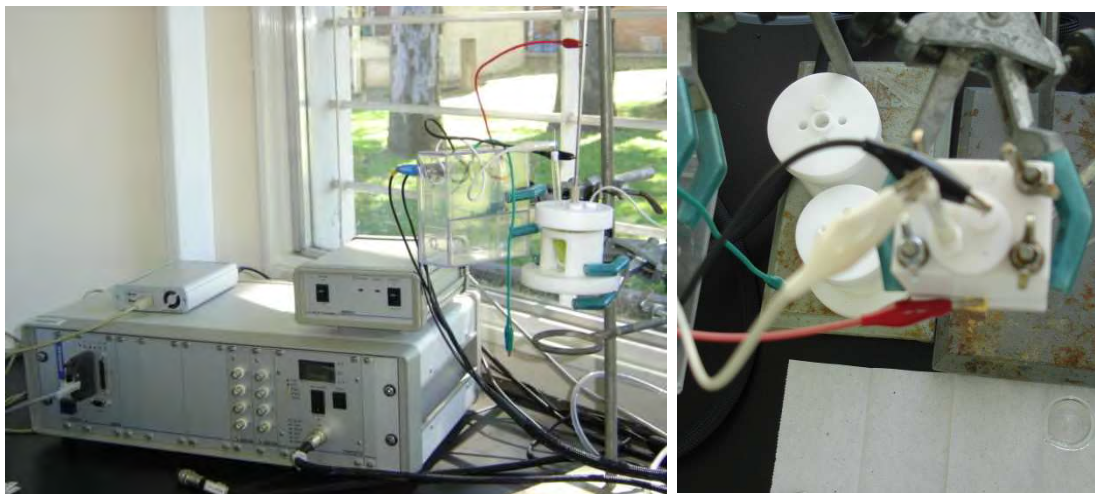


Figura 2.1 Celda para electrodos: electrodo comercial (izq.), láminas de oro macizo (der.)

El potenciostato es el instrumento que controla el potencial entre el electrodo de trabajo y el electrolito. El electrodo de trabajo normalmente se conecta a tierra y el potencial se mide respecto del electrodo de referencia. En la actualidad los potenciostatos permiten aplicar distintas funciones de potencial al electrodo de trabajo, generando diferentes tipos de respuesta de corriente.

Los procesos electroquímicos generalmente no son sencillos, y pueden involucrar varias etapas que incluyen: procesos heterogéneos de transferencia de electrones, transporte de masa, reacciones químicas en fase homogénea que pueden estar acopladas, procesos superficiales tales como adsorción, etc. Un análisis completo de cualquiera de estos procesos electroquímicos requiere conocer cada paso individual. Como mínimo es necesario conocer la constante de velocidad estándar, los coeficientes de los procesos que involucran transferencia de electrones, el número de electrones involucrados y, si hay especies en solución, los correspondientes coeficientes de difusión.

Existe una amplia variedad de técnicas electroquímicas desarrolladas para determinar los parámetros cinéticos y termodinámicos de las reacciones de electrodo. La técnica a utilizar dependerá del sistema químico y de la información que se desee obtener.

En este trabajo de tesis se utilizaron principalmente cuatro técnicas electroquímicas: voltametría cíclica, voltametría diferencial de pulso, voltametría de onda cuadrada y

espectroscopia de impedancia electroquímica. A continuación se describe brevemente el fundamento de cada una de ellas. Para mayores detalles puede consultarse la bibliografía citada previamente.

2.1.1.2 Voltametría cíclica

En la voltametría cíclica (CV) se aplica sobre el sistema una variación lineal del potencial, a partir de un potencial inicial E_1 . En cada momento, el potencial aplicado, E , responde a la ecuación:

$$E = E_i^o + vt \quad (2.1)$$

El potencial se varía linealmente con el tiempo, a una dada velocidad de barrido, v , desde un valor E_1 a un valor E_2 , luego se puede regresar al mismo valor inicial E_1 u otro valor E_3 y así sucesivamente (Figura 2.2). La velocidad de barrido usada generalmente se encuentra entre unos pocos mV s^{-1} hasta 100 V s^{-1} .

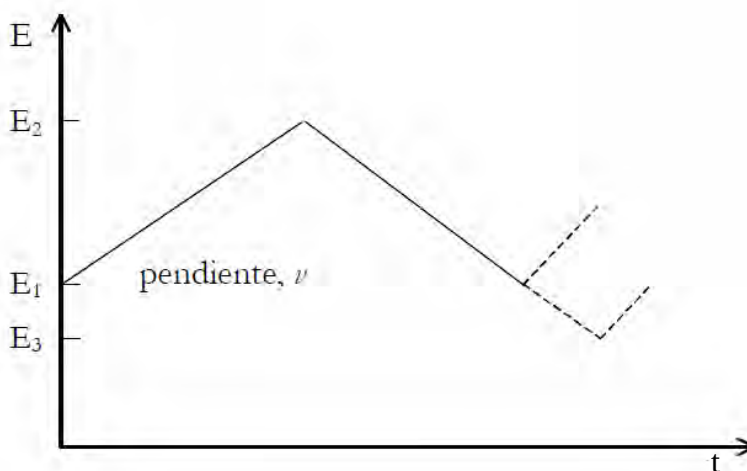


Figura 2.2 Perfil de potencial en función del tiempo para voltametría cíclica

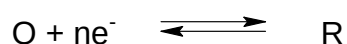
Se grafica la corriente en función del potencial aplicado (el eje de potencial es también un eje de tiempo), obteniéndose la curva intensidad de corriente –potencial (i vs. E) o curva voltamétrica. La forma exacta de la misma depende del tipo de proceso que tiene lugar en el electrodo de trabajo. Los límites de potencial definen las reacciones que pueden producirse, y la velocidad de barrido de potencial define la escala de tiempo en la que se estudia el proceso electroquímico.

En la práctica, las mediciones electroquímicas generalmente se inician con una voltametría cíclica. La forma de la curva i vs. E ., aporta información acerca de la reversibilidad del proceso de electrodo. El análisis de las mismas también permite detectar procesos acoplados a los de oxidación y reducción, por ejemplo adsorción o desorción de una especie electroquímicamente activa, o reacciones químicas acopladas al proceso de transferencia de carga.

A continuación se describe la técnica para especies electroquímicas en solución y también para especies inmovilizadas a la superficie del electrodo, ambas modalidades fueron empleadas en este trabajo de tesis.

2.1.1.2.1 Especie electroquímica en solución

Nuevamente, para el proceso:



donde O y R son las especies oxidada y reducida solubles, en el marco del análisis de la curva i vs. E , la corriente depende del control cinético y difusional, observándose un crecimiento de la misma a medida que el sobrepotencial aplicado aumenta, llegando a un valor de corriente máximo o corriente de pico (i_p) cuando el control de la reacción pasa de cinético a difusional. Dicha corriente de pico es un parámetro característico de la voltametría. La Figura 2.3 presenta el voltagrama obtenido para una *reacción reversible* donde se transfiere $1 e^-$. Si el potencial se barre a través del intervalo donde se produce la reacción de oxidación $R \rightarrow O$, inicialmente, y como consecuencia del cambio en el potencial aplicado, la oxidación de R en la superficie se ve favorecida y por lo tanto la corriente anódica aumenta. La misma continúa aumentando hasta que la concentración superficial se hace cero y por lo tanto la reacción pasa a estar controlada por difusión. Como la concentración superficial se mantiene en cero, y con el tiempo el flujo hacia la superficie disminuye, la densidad de corriente también decae, y por consiguiente la respuesta presenta un pico (i_{pa}). Para el barrido de retorno, la reacción de transferencia electrónica en el electrodo es la inversa: $O \rightarrow R$, por lo tanto la corriente cambiará de signo. La corriente catódica pasará de nuevo a través de un pico (i_{pc}), en un proceso similar al descrito anteriormente.

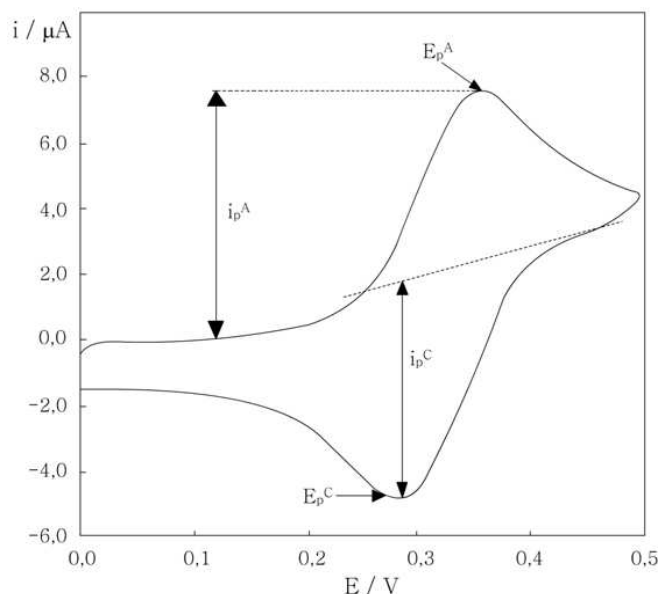


Figura 2.3 Voltametría cíclica típica para un *proceso reversible* de una especie en solución. E_p^C , i_p^C , E_p^A , i_p^A : potenciales y corrientes de pico catódico y anódico respectivamente

La respuesta de la voltametría cíclica para una reacción de transferencia electrónica de una especie en solución puede modelarse teniendo en cuenta la velocidad de reacción de la especie electroactiva en la superficie del electrodo, su difusión y las posibles reacciones acopladas en el seno de la solución (Nicholson y Shain, 1964). El modelo predice que la forma de la curva es independiente de la velocidad de barrido de potencial para una cupla reversible. El análisis de la voltametría cíclica puede conducir a obtener parámetros termodinámicos y el coeficiente de difusión.

Para el caso de una especie que reacciona muy rápido con la superficie de un electrodo (caso reversible), el potencial formal para la cupla se obtiene a partir de la ecuación:

$$E^{\circ'}_{o/r} = (E_p^C + E_p^A) / 2 \quad (2.2)$$

donde E_p representa el potencial de la corriente pico y los supraíndices C y A a los procesos catódicos y anódicos respectivamente.

El coeficiente de difusión puede determinarse graficando la corriente de pico, i_p , en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, v , utilizando la ecuación de Randles-Sevcik, para una temperatura de 298 K:

$$i_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} A D_R^{1/2} v^{1/2} C_R^* \quad (2.3)$$

donde la corriente de pico i_p se expresa en Ampère (A), el área del electrodo, A en cm^2 , la concentración de la especie electroactiva en el seno de la solución, C_R^* tiene unidades de mol cm^{-3} , el coeficiente de difusión, D_R se expresa en $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ y la velocidad de barrido de potencial, v en V s^{-1} . La ecuación 2.3 muestra claramente, que si el control es difusional, la corriente de pico i_p varía linealmente con $v^{1/2}$.

A partir de la forma del voltograma experimental se puede comprobar la reversibilidad del sistema. Para una cupla reversible, se cumple que:

- $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 0,059 \text{ V} / n$
- $-i_p^c = i_p^a$
- i_p^c proporcional a $v^{1/2}$
- E_p independiente de v

En los *procesos irreversibles*, la velocidad de transferencia de electrones es insuficiente para mantener las especies en equilibrio en la interfaz electrodo - solución, en consecuencia la forma de la voltametría cíclica cambia. A baja velocidad de barrido el sistema se comporta reversiblemente ya que el cambio de potencial es lento y el sistema tiene tiempo para que el material adyacente a la superficie del electrodo se equilibre según el potencial aplicado. A medida que la velocidad de barrido se incrementa, la velocidad de transferencia electrónica no se equipara y las concentraciones superficiales del sistema redox no alcanzan a equilibrarse. Se evidencia entonces, un retraso en la aparición de la corriente de pico. En consecuencia se produce una separación de los picos de potencial anódico y catódico, por lo tanto el potencial de pico, E_p , depende de la velocidad de barrido. Si el proceso es completamente irreversible se observa la ausencia de pico cuando se invierte el barrido de potencial.

2.1.1.2.2 Especie electroquímica adsorbida

Las propiedades del voltograma de especies adsorbidas están determinadas por el número de sitios sobre la superficie electrónica donde se produce la adsorción. Consideremos el caso más simple en el cual sólo las formas O y R se encuentran

adsorbidas sobre el electrodo y son electroquímicamente activas en el intervalo de potencial de trabajo. En estas condiciones es posible despreciar los efectos de transporte de materia ya que las especies están confinadas en la interfaz.

La Figura 2.4 muestra la forma de la curva corriente-potencial para un proceso reversible. La principal diferencia entre el voltagrama de una especie adsorbida y una especie en solución es que los picos son simétricos y más agudos puesto que las cargas asociadas con los procesos anódicos y catódicos son iguales.

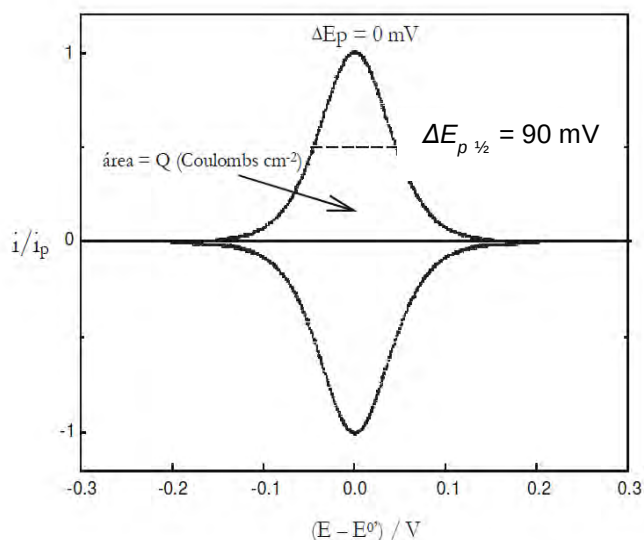


Figura 2.4 Voltametría cíclica teórica para una especie adsorbida sobre el electrodo, comportamiento reversible ($n = 1$). $\Delta E_{p\ 1/2}$: ancho del pico a mitad de altura

La simetría de los picos ocurre porque sólo puede ser reducida la cantidad de reactivo O presente sobre la superficie del electrodo. La corriente aumenta desde cero hasta la corriente de pico y cae nuevamente a cero cuando el reactivo se consume totalmente. La corriente de pico es proporcional a la velocidad de barrido del potencial. La carga requerida para oxidar la capa adsorbida, representada por el área bajo la curva, puesto que el eje de potenciales es también de tiempo, es independiente de la velocidad de barrido del potencial. Además la separación entre los picos de oxidación y reducción es 0 mV para un par con transferencia electrónica rápida, ya que la difusión no interviene en el proceso. Nuevamente, existen criterios de diagnóstico para el voltagrama de una

cupla reversible correspondiente a la transferencia de $1e^-$, donde O o R se encuentran adsorbidos sobre la superficie del electrodo, ellos son:

- $\Delta E_p = 0 \text{ mV}$
- $-i_p^c = i_p^a$
- i_p proporcional a v
- E_p independiente de v
- $q_a = q_c$

Teniendo en cuenta que el rango de potencial donde se observa una corriente faradaica corresponde a un determinado período de tiempo (como se mencionó previamente, el eje de potenciales se convierte en un eje de tiempo al considerarse la velocidad de barrido), la carga total intercambiada puede obtenerse por integración de la corriente en función del tiempo. En virtud de la ley de Faraday, es posible determinar la cantidad adsorbida de la especie electroactiva integrando el voltograma ($Q/nF =$ moles de sustancia electroactiva depositada).

En el caso de un *sistema irreversible*, el pico de ida no es simétrico y no se observa pico para el proceso inverso. Si el sistema fuera cuasirreversibles, existe un pico de vuelta, pero los picos no son simétricos y no coinciden los potenciales de pico.

Cuando una especie electroquímica se encuentra unida químicamente al electrodo, éste recibe el nombre de *electrodo químicamente modificado*. Este tipo de electrodos ha sido extensamente estudiado por su aplicación en catálisis. Su comportamiento es similar al mencionado anteriormente y la voltametría cíclica puede ser analizada de la misma manera.

Los procesos superficiales debidos a especies adsorbidas pueden estar combinados con procesos asociados a especies que difunden desde la solución.

2.1.1.3 Cronoamperometría

La cronoamperometría es una técnica en la cual el potencial del electrodo de trabajo se cambia instantáneamente y se mide la corriente en función del tiempo. En la Figura 2.5 se muestra esquemáticamente la perturbación de potencial aplicada al electrodo de

trabajo en función del tiempo. Al valor de potencial E_1 no ocurre la reacción electroquímica.

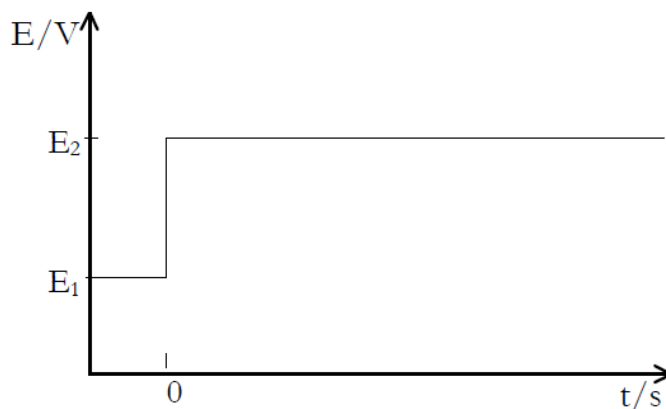
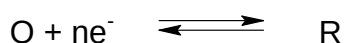


Figura 2.5 Potencial en función del tiempo para un experimento de cronoamperometría

Para una reacción donde O y R son las especies oxidada y reducida respectivamente, ambas presentes en la solución:



y E_2 es tal que la reducción de O transcurre a una velocidad controlada por difusión, el proceso queda caracterizado por las leyes de Fick. Imponiendo las siguientes condiciones de contorno:

para $t=0$, $C_O(x,0) = C_O^*$

para $t > 0$, $x \rightarrow \infty$ $\lim C_O(x,t) = C_O^*$

$C_O(0,t) = 0$

donde C_O^* es la concentración de O en el seno de la solución. Inicialmente ($t=0$) la concentración de O es uniforme ($C_O = C_O^*$), luego de aplicar la perturbación, la concentración de la especie O sobre la superficie del electrodo se agota. En todo momento $C_O = C_O^*$ lejos del electrodo (difusión lineal seminfinita). Las ecuaciones pueden ser resueltas aplicando la transformada de Laplace a la expresión correspondiente a la segunda ley de Fick, permitiendo obtener las expresiones para el

perfil de concentración de la especie O en función del tiempo y de la distancia. La dependencia de la corriente con el tiempo viene dada por:

$$i = nFAD_O \left[\frac{\partial C_O}{\partial x} \right]_{x=0} \quad (2.4)$$

que lleva a la respuesta cronoamperométrica conocida como la ecuación de Cottrell:

$$i = \frac{nFAD_O^{1/2} C_O^*}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (2.5)$$

donde i es la intensidad de corriente, n el número de electrones intercambiados en la reacción, A es el área del electrodo, D_O es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva, en este caso O , F la constante de Faraday y t el tiempo. Esta ecuación relaciona la corriente i con $t^{-1/2}$. A partir del gráfico i vs. $t^{-1/2}$ puede obtenerse el coeficiente de difusión de la especie O . Para obtener información confiable es recomendable analizar los datos de corriente en un amplio intervalo de tiempo. Teniendo en cuenta que a tiempos cortos aquellos están dominados por los procesos de carga de la doble capa electroquímica y, a tiempos largos están determinados por convección natural y posibles vibraciones.

La forma del transitorio de corriente depende del tipo de proceso que esté controlando la velocidad de la reacción de electrodo. En la Figura 2.6 se muestran distintos tipos de transitorios posibles. Cuando la reacción está controlada por difusión, la respuesta corriente - tiempo tiene la forma de la curva dada en la Figura 2.6 a). Cuando la reacción está controlada cinéticamente la respuesta de corriente es del tipo representado en la curva b). Cuando la constante de la velocidad de la reacción es pequeña (o cuando el valor de E_2 impone un sobrepotencial muy bajo para la reacción), la concentración de la especie O no cambia de manera significativa ya que el potencial aplicado no es muy grande y por lo tanto la difusión no es relevante para determinar la velocidad de la reacción. En una situación intermedia entre ambos los casos se tiene el transitorio correspondiente a la curva c), en la cual la velocidad de transferencia de carga y la velocidad de difusión son comparables y la corriente cae en el tiempo, pero de una manera más suave. En este caso el sistema se encuentra bajo control mixto.

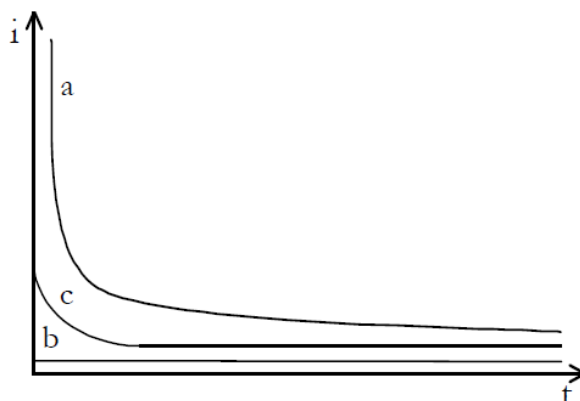


Figura 2.6 Corriente vs. tiempo para experimentos de salto de potencial. a) control difusional, b) control cinético, c) control mixto

2.1.1.4 Voltametría diferencial de pulso

En la voltametría diferencial de pulso (DPV) el barrido de potencial no se realiza de forma lineal como en la voltametría cíclica, sino que se aplica un perfil caracterizado por pulsos de potencial de baja amplitud (Figura 2.7).

En esta técnica se toman dos medidas de corriente por cada pulso de potencial aplicado, la primera de ellas a tiempo τ' , inmediatamente antes del pulso, y la segunda a tiempo τ , justo antes de la finalización del pulso. En esta última medición, la corriente capacitiva, correspondiente a la carga de la doble capa, ya habrá caído a cero (Figura 2.8), haciendo que la corriente medida sea netamente faradaica. De esta forma, la técnica gana sensibilidad respecto de las técnicas no pulsadas. El registro del experimento corresponde a un gráfico de la diferencia de corriente, $\delta i = i(\tau) - i(\tau')$ en función del potencial base, E .

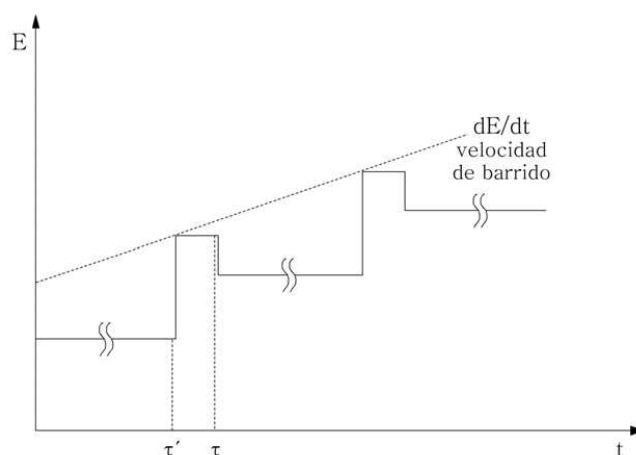


Figura 2.7 Programa de potencial en un experimento de voltametría diferencial de pulso

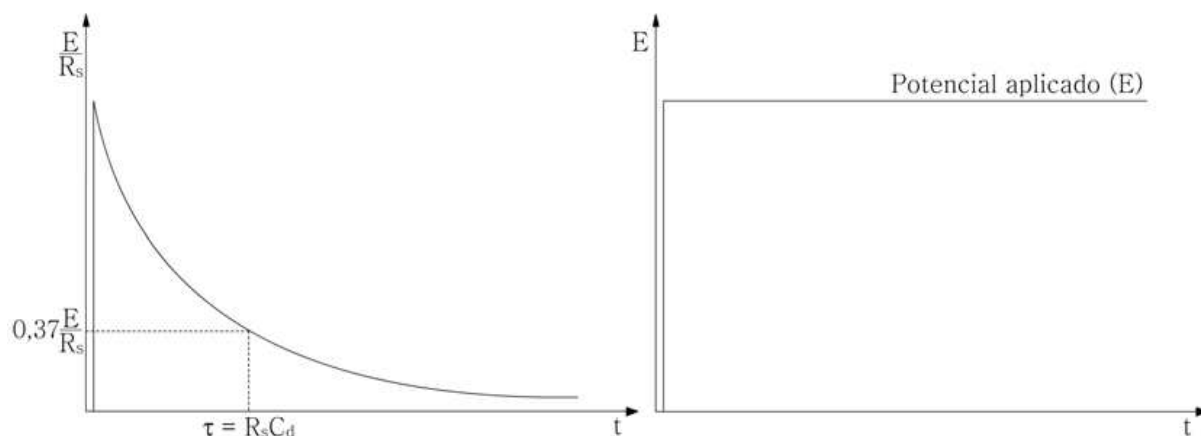


Figura 2.8 Decaimiento de la corriente de carga de la doble capa luego de la aplicación de un pulso de potencial

La forma de la función respuesta y la altura del pico pueden tratarse cuantitativamente. Desde $t = 0$ hasta la aplicación del pulso de potencial a $t = \tau'$, el potencial corresponde al potencial base E . A mayores tiempos, el potencial es $E + \Delta E$, donde ΔE corresponde a la altura del pulso. El período de preelectrólisis τ' típicamente es entre 20 y 100 veces mayor que la duración del pulso $\tau - \tau'$. De esta forma, la preelectrólisis establece una capa difusional gruesa, y el pulso sólo es capaz de modificar una pequeña parte de ésta. De hecho, el experimento puede aproximarse asumiendo que el pulso no distingue el perfil de concentración al inicio de aquel correspondiente a la concentración del seno de la solución. En consecuencia, la función de la preelectrólisis es establecer la condición de “concentración aparente del seno de la solución” en la cercanía del electrodo. De este modo la técnica gana en sensibilidad respecto de la voltametría cíclica.

2.1.1.5 Voltametría de onda cuadrada

La voltametría de onda cuadrada (*square wave voltammetry*, SWV) combina los mejores atributos de los métodos voltamétricos de pulso, una buena línea de base, la sensibilidad de la voltametría diferencial de pulso, la capacidad diagnóstica de la voltametría normal de pulso y la habilidad para caracterizar productos de manera directa. También permite medir en un amplio rango de escala temporal como en el caso de las técnicas polarográficas de pulso. La forma del pulso puede ser interpretada como un caso particular de la voltametría diferencial de pulso (DPV, Figura 2.8) en el cual el periodo de preelectrólisis y el pulso son de igual duración, y éste tiene la dirección opuesta al barrido aplicado. La interpretación de los resultados se facilita considerando

la forma de la onda como un barrido en estado estacionario, al cual se superpone un doble pulso simétrico, uno en la dirección directa y otra en la inversa, tal como se muestra en la Figura 2.9:

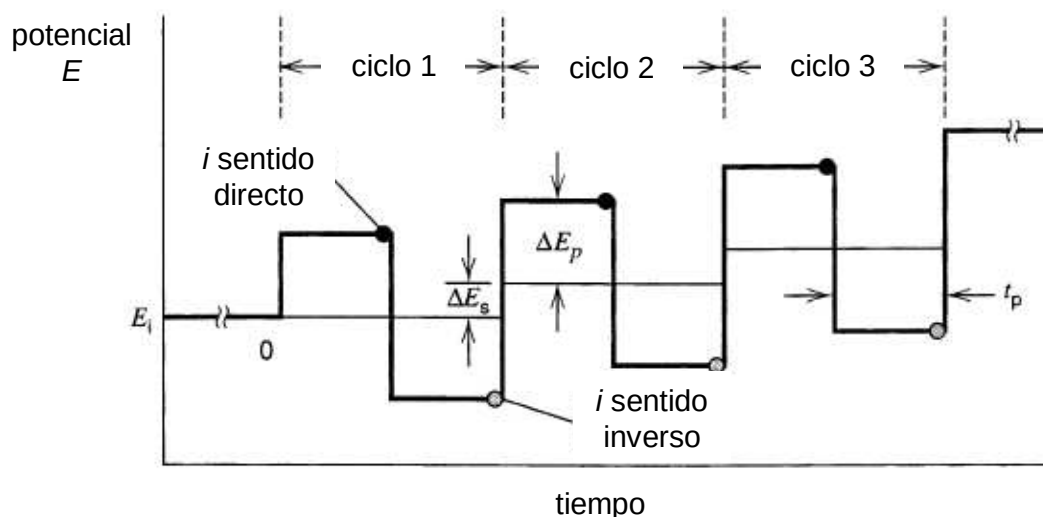
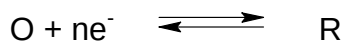


Figura 2.9 Esquema de la forma del pulso y medición en SWV

La onda cuadrada se caracteriza por una altura de pulso ΔE_p y un ancho de pulso t_p , el cual puede ser expresado en términos de la frecuencia de onda cuadrada $f = 1/2 t_p$. El estado estacionario tiene un valor de ΔE_s al comienzo de cada ciclo, siendo la velocidad de barrido $v = \Delta E_s / 2 t_p = f \Delta E_s$. La corriente i se mide 2 veces por ciclo, al final de cada pulso. La corriente directa i_f se mide al comienzo del primer pulso de cada ciclo en la dirección del barrido. La corriente inversa i_r se mide al final del segundo pulso en la dirección opuesta. La diferencia entre ambas corrientes es $\Delta i = i_f - i_r$.

Dado que la capa difusional no se renueva al inicio de cada ciclo, la condición inicial de la misma es el resultado de su evolución en los pulsos previos. Dicha capa es función, no sólo de la forma de la onda aplicada, sino de la cinética y los procesos químicos asociados al electrodo.

Sea nuevamente una reacción de electrodo con una cinética reversible:



donde la solución contiene sólo la especie O. El potencial inicial E_i se selecciona a un valor más positivo que $E^{o'}$ de modo que el perfil de concentraciones sea uniforme al

inicio del barrido. El experimento es suficientemente rápido para considerar un comportamiento de difusión lineal seminfinita de modo que vale la segunda ley de Fick para ambas especies O y R. La forma de la onda de potencial aplicado se relaciona con la concentración a través de la ecuación de Nernst. Se considera dicha onda como una serie de ciclos sucesivos desde $m=1$ en adelante.

El voltagrama alcanza un máximo en $E_{1/2} = E^{\circ'} + RT/nF \ln(D_R/D_O)^{1/2}$ y tiene una corriente pico adimensional, $\Delta\Psi_p$, que depende de n , ΔE_p y ΔE_s como se muestra en la Figura 2.10

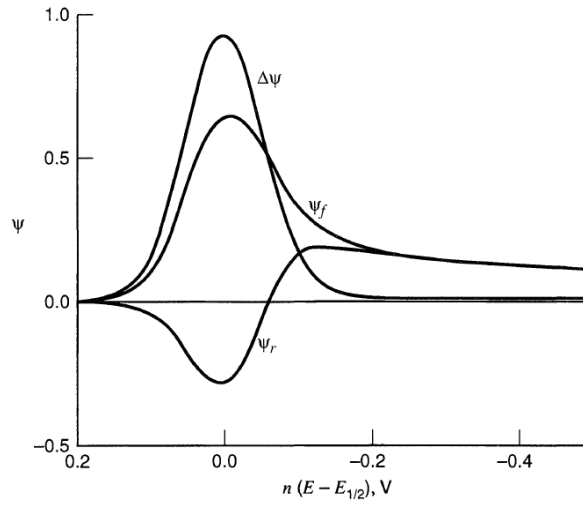


Figura 2.10 SWV para una cupla O/R reversible, inicialmente $R = 0$, $\Delta\psi_f$ corriente directa, $\Delta\psi_r$ corriente inversa, $\Delta\psi$ diferencia vs. eje de potencial “reversible” $E_{1/2} = E^{\circ'} + RT/nF \ln(D_R/D_O)^{1/2}$

La expresión para Δi_p es:

$$\Delta i_p = \frac{nFAD\sigma^{1/2}Co^*}{\pi^{1/2}t_p^{1/2}} \Delta\Psi_p \quad (2.6)$$

Para analizar la corriente de base, se emplea el mismo tratamiento aplicado para DPV. Si t_p es cinco veces mayor que la constante de la celda, no se observa contribución de la corriente de carga a las corrientes individuales. Los procesos faradaicos controlan el límite de detección en SWV. En electrodos sólidos puede ser medible el efecto de la corriente directa e inversa pero se suprime de manera efectiva al hacer la diferencia entre ambas.

Con respecto a las aplicaciones, al igual que la voltametría cíclica, SWV posee una gran capacidad diagnóstica especialmente cuando se analizan las corrientes directa e inversa. La técnica permite obtener información sobre los procesos de electrodos para un amplio rango de potencial en un tiempo acotado. La ventaja con respecto a CV es la supresión de la corriente de base, por lo tanto, es posible medir a concentraciones menores que las requeridas para una voltametría cíclica. En un sentido amplio SWV es mejor que CV para evaluar parámetros cuantitativos para sistemas en los cuales se conocen los mecanismos. Una de las debilidades de SWV con respecto a CV, es que resulta intuitivamente más difícil de interpretar en términos químicos que CV. Además en CV el barrido inverso cubre un amplio rango de potencial, hecho que permite detectar procesos que están separados por una brecha de potencial más grande. Finalmente, CV cubre una mayor escala de tiempo que SWV.

Para hacer análisis cuantitativo, SWV es generalmente la mejor opción en cuanto a métodos de pulso. Las respuestas más reproducibles y con mejor límite de detección se obtienen en general con el electrodo gotero de mercurio.

2.1.1.6 Impedancia

En voltametría cíclica y en cronoamperometría el sistema es alejado del equilibrio mediante barridos y saltos de potencial respectivamente y, frente a dichas perturbaciones, se mide su respuesta. Cuando se emplean técnicas basadas en el concepto de impedancia el enfoque es diferente: se introduce una perturbación mediante una señal alterna de pequeña magnitud y se observa la forma en que el sistema sigue la perturbación en estado estacionario.

En la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*), se mide la impedancia de la celda en función de la frecuencia de la fuente AC (f). Las medidas se interpretan en términos de un circuito eléctrico equivalente, conformado por resistencias y capacitores, que busca describir el comportamiento del sistema.

La técnica emplea una señal de excitación de baja amplitud y se basa en el hecho de que a bajos sobrepotenciales, la relación corriente - potencial es prácticamente lineal. En esas condiciones, una excitación de frecuencia $\omega = 2\pi f$ genera una corriente también de frecuencia ω . Por otro lado, un sistema que no posee una relación $i - E$ lineal, presentará una respuesta distorsionada no sinusoidal, que es una superposición de señales a frecuencias ω , 2ω , 3ω , etc.

Por lo tanto, en un sistema que se comporta linealmente el potencial aplicado y la corriente resultante se pueden expresar como:

$$E = E_0 \sin(\omega t) \quad (2.7)$$

$$I = I_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (2.8)$$

donde E_0 e I_0 son las amplitudes del potencial aplicado y la corriente resultante respectivamente, mientras que φ es la constante de fase entre la corriente y el potencial. Puesto que la respuesta que se obtiene se analiza sobre la base del circuito eléctrico modelo que mejor describe el sistema electroquímico en estudio, es necesario conocer cómo se comportan los elementos de un circuito frente a perturbaciones alternas como las descritas.

- *Resistencia*: considerando válida la ley de Ohm ($E = IR$), la corriente resultante es $I = (E/R) \sin(\omega t)$, es decir que no se desfasa respecto del potencial ($\varphi = 0$).

- *Capacitor*: para un capacitor puro se cumple que $q = C (dE/dt)$ y por lo tanto:

$$I = \omega C E \cos(\omega t) = \omega C E \sin(\omega t + \pi/2) \quad (2.9)$$

La corriente está desfasada en $\pi/2$ respecto del potencial. En este caso para simplificar el tratamiento matemático se utiliza notación compleja. De esta manera, se puede expresar I como:

$$E = -j/(\omega C) I \quad (2.10)$$

donde $j = \sqrt{-1}$.

- *Resistencia en serie con un capacitor (circuito RC en serie)*: al aplicar un potencial alterno, éste debe ser igual a la suma de las caídas en cada uno de los elementos:

$$E = E_R + E_C$$

$$E = I (R - j/\omega C) = I Z \quad (2.11)$$

donde Z es el vector *impedancia* que relaciona el potencial con la corriente. El mismo se puede representar como:

$$Z(\omega) = Z_{Re} - jZ_{Im} \quad (2.12)$$

donde Z_{Re} y Z_{Im} son las componentes real e imaginaria de la impedancia respectivamente. En este caso, $Z_{Re} = R$ y $Z_{Im} = 1/\omega C$.

La impedancia es un tipo de resistencia generalizada, la ecuación (2.11) es una versión generalizada de la ley de Ohm. El ángulo de fase, φ , expresa el desfase entre los componentes resistivos y capacitivos del circuito en serie. Para una resistencia pura, $\varphi = 0$, y para una capacidad pura, $\varphi = \pi/2$. Para mezclas de ambos, φ toma valores intermedios.

La variación de la impedancia con la frecuencia se puede visualizar de dos formas. En un *gráfico de Bode* se presenta la variación de $\log(|Z|)$ y de φ en función de $\log(\omega)$. Una forma alternativa es emplear un *gráfico de Nyquist* en el que se muestra la variación de Z_{Im} en función de Z_{Re} para diferentes valores de ω . En la Figura 2.11 se presentan ejemplos de cada uno de estos gráficos para un circuito RC en serie y en paralelo.

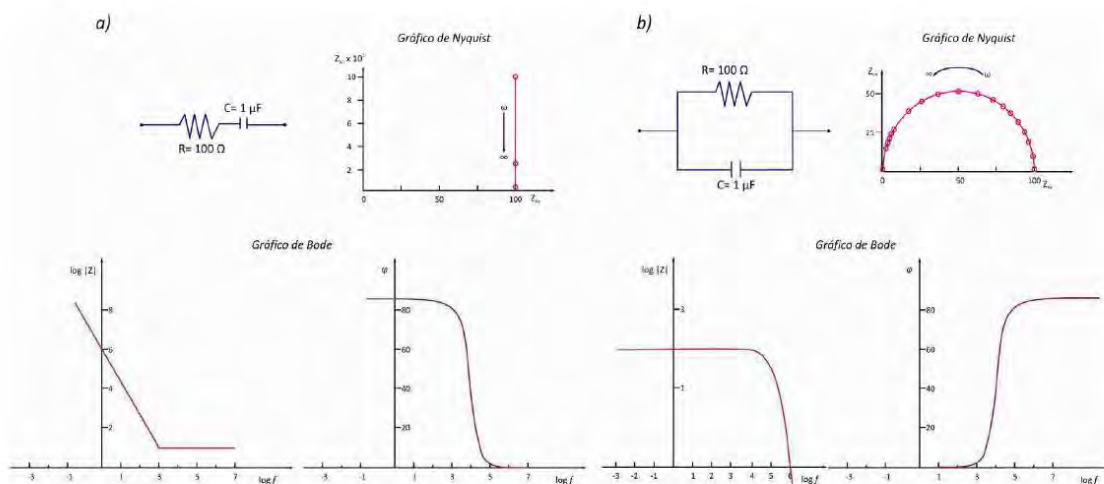


Figura 2.11 Gráficos Nyquist y Bode para un circuito RC, a) en serie; b) en paralelo

A veces es más útil analizar los circuitos en términos de *admitancia*, Y , que es la inversa de la impedancia, $1/Z$, y por ende representa un tipo de conductancia.

Una celda electroquímica puede ser considerada como un circuito equivalente de resistencias y capacitores por los que circula la misma corriente, con la misma amplitud y ángulo de fase que en la celda real, bajo una dada excitación. Un circuito

frecuentemente empleado es el *circuito de Randles*, que se muestra en la Figura 2.12 a). En él, la capacidad de la doble capa se representa como un capacitor puro, C_d . El proceso faradaico no puede ser descrito por elementos de un circuito tales como resistencias y capacitores, cuyos valores son independientes de la frecuencia, por lo que se representa mediante una impedancia general, Z_f que está en paralelo con la capacidad de la doble capa. La impedancia faradaica puede representarse como una resistencia R_s en serie con una pseudocapacitancia C_s . Otra manera de representarla es separándola en un término de resistencia a la transferencia de carga R_{ct} y un segundo término conocido como impedancia de Warburg Z_w el cual puede ser interpretado como una resistencia a la transferencia de masa (Figura 2.12 b)). Ambos términos dependen de la frecuencia. La impedancia de Warburg se introduce como un elemento del circuito equivalente si el sistema cumple la condición de difusión lineal seminfinita, en la práctica corresponde al caso de un electrodo plano infinito. Finalmente, la resistencia de la solución, R_Ω está en serie con el conjunto mencionado, ya que toda la corriente ($i_c + i_f$) debe pasar la misma.

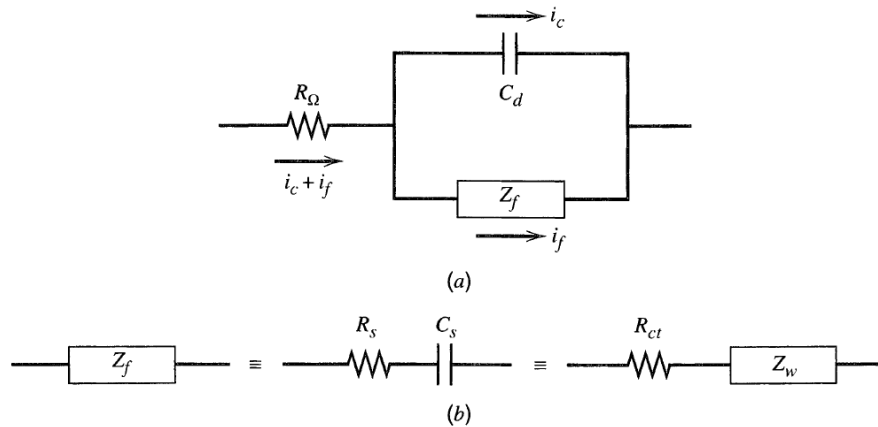


Figura 2.12 a) Circuito equivalente de una celda de electroquímica (circuito de Randles) frente a una pequeña perturbación sinusoidal; b) representación de la impedancia faradaica

Cuando una corriente sinusoidal pasa a través de la impedancia, el voltaje es:

$$E = i R_s + q/C_s \quad (2.13)$$

$$dE/dt = R_s di/dt + i/C_s \quad (2.14)$$

si la corriente es:

$$i = I \sin(\omega t) \quad (2.15)$$

se llega a:

$$dE/dt = R_S I \omega \cos(\omega t) + (I/C_S) \sin(\omega t) \quad (2.16)$$

Para el sistema $O + ne \rightarrow R$ donde O y R son especies solubles, el potencial E depende de: $E = E[i, C_O(0,t); C_R(0,t)]$.

Reemplazando en (2.16):

$$\frac{dE}{dt} = \left(\frac{\partial E}{\partial t} \right) \frac{di}{dt} + \left[\frac{\partial E}{\partial C_O(0,t)} \right] \frac{dC_O(0,t)}{dt} + \left[\frac{\partial E}{\partial C_R(0,t)} \right] \frac{dC_R(0,t)}{dt} \quad (2.17)$$

$$\frac{dE}{dt} = R_{ct} \frac{di}{dt} + \beta_O \frac{dC_O(0,t)}{dt} + \beta_R \frac{dC_R(0,t)}{dt} \quad (2.18)$$

$$R_{ct} = \left(\frac{\partial E}{\partial t} \right)_{C_O(0,t), C_R(0,t)} \quad (2.19)$$

$$\beta_O = \left[\frac{\partial E}{\partial C_O(0,t)} \right]_{i, C_R(0,t)} \quad (2.20)$$

$$\beta_R = \left[\frac{\partial E}{\partial C_R(0,t)} \right]_{i, C_O(0,t)} \quad (2.21)$$

Los parámetros R_{CT} , β_O y β_R dependen de la cinética de la reacción en el electrodo.

Aplicando condiciones de contorno y transformada de Laplace se llega a:

$$C_O(0,t) = C_O^* + \frac{I}{nFA\sqrt{2D_O\omega}} + (\sin\omega t - \cos\omega t) \quad (2.22)$$

$$C_R(0,t) = C_R^* + \frac{I}{nFA\sqrt{2D_R\omega}} + (\sin\omega t - \cos\omega t) \quad (2.23)$$

$$\frac{dC_O(0,t)}{dt} = \frac{I}{nFA} \sqrt{\frac{\omega}{2D_O}} (\sin\omega t + \cos\omega t) \quad (2.24)$$

$$\frac{dC_R(0,t)}{dt} = -\frac{I}{nFA\sqrt{2D_R}}(\sin\omega t + \cos\omega t) \quad (2.25)$$

De donde reemplazando en la ecuación (2.18) se obtiene:

$$\frac{dE}{dt} = \left(R_{ct} + \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} \right) I\omega \cos\omega t + I\sigma\sqrt{\omega}\sin\omega t \quad (2.26)$$

siendo

$$\sigma = \frac{1}{nFA\sqrt{2}} \left(\frac{\beta_O}{\sqrt{D_O}} - \frac{\beta_R}{\sqrt{D_R}} \right) \quad (2.27)$$

Comparando con la ecuación (2.16) se obtiene:

$$R_S = R_{CT} + \sigma/\omega^{1/2} \quad (2.28)$$

$$C_S = 1/\sigma\omega^{1/2} \quad (2.29)$$

La evaluación de R_S y C_S depende de la relación entre R_{CT} , β_O y β_R .

Es posible también obtener parámetros cinéticos a partir de medidas de impedancia. Cuando se aplica una pequeña perturbación sinusoidal en torno al potencial de equilibrio, la relación entre la corriente y el sobrepotencial:

$$i = nFAk^0 \left[C_O(0,t)e^{-\alpha n f (E-E^0)} - C_R(0,t)e^{-(1-\alpha)n f (E-E^0)} \right] \quad (2.30)$$

se puede linealizar:

$$\eta = \frac{RT}{F} \left[\frac{C_O(0,t)}{C_O^*} - \frac{C_R(0,t)}{C_R^*} + \frac{i}{i_0} \right] \quad (2.31)$$

derivando la ecuación (2.31) con respecto al tiempo se obtienen los siguientes parámetros:

$$R_{CT} = RT/(Fi_0) \quad (2.32)$$

$$\beta_O = RT/(FC_O^*) \quad (2.33)$$

$$\beta_R = RT/(FC_R^*) \quad (2.34)$$

$$R_S = \frac{1}{\omega C_S} = R_{ct} = \frac{RT}{Fi_0} \quad (2.35)$$

De modo que la corriente y k° pueden ser evaluadas cuando se conocen R_S y C_S .

Las ecuaciones (2.28) y (2.29) predicen que R_S y $1/(\omega C_S)$ son lineales con respecto a $\omega^{-1/2}$ siendo σ la pendiente de ambas rectas:

$$\sigma = \frac{RT}{F^2 A \sqrt{2}} \left(\frac{1}{C_O^* \sqrt{D_O}} + \frac{1}{C_R^* \sqrt{D_R}} \right) \quad (2.36)$$

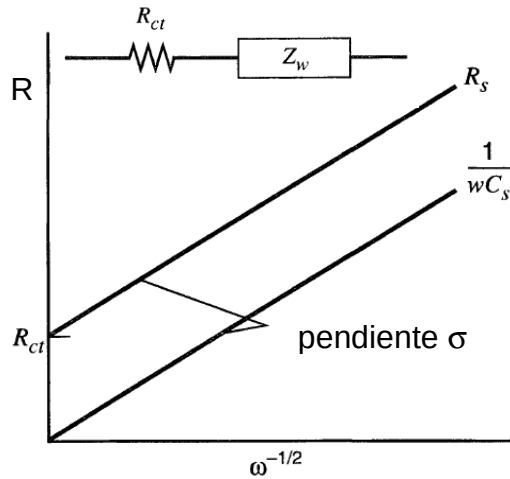


Figura 2.13 Dependencia de R_S y $1/(\omega C_S)$ con la frecuencia; inserto: circuito R_{CT} en serie con impedancia de Warburg

El término $\sigma = 1 / (\sqrt{2} Y_O)$ donde Y_O es la admitancia, como se mencionó anteriormente. Este parámetro es calculado habitualmente por los programas que hacen el ajuste de datos con un circuito equivalente.

La impedancia total de la celda, de acuerdo con el circuito equivalente que muestra la Figura 2.12., posee una componente real y una componente imaginaria:

$$Z_{Re} = R_{\Omega} + \frac{R_{ct} + \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}}{\left(C_d \sigma \sqrt{\omega} + 1\right)^2 + \omega^2 C_d^2 \left(R_{ct} + \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}\right)^2} \quad (2.37)$$

$$Z_{Im} = \frac{\omega C_d \left(R_{ct} + \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}\right)^2 + \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} (\sqrt{\omega} C_d \sigma + 1)}{\left(C_d \sigma \sqrt{\omega} + 1\right)^2 + \omega^2 C_d^2 \left(R_{ct} + \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}\right)^2} \quad (2.38)$$

A partir del gráfico de Z_{Im} vs. Z_R para las diferentes frecuencias ω (gráfico de Nyquist), se obtiene información química sobre el sistema en estudio. En particular, hay dos casos límite que resultan de interés: las mediciones a bajas frecuencias, donde predomina el control por transferencia de masa (control difusional) y la región de altas frecuencias, controlada por la transferencia de carga:

➤ *Bajas frecuencias*

A partir de las ecuaciones anteriores, las expresiones para Z_R y Z_{Im} resultan:

$$Z_{Re} = R_{\Omega} + R_{ct} + \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} \quad (2.39)$$

$$Z_{Im} = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} + 2\sigma^2 C_d \quad (2.40)$$

combinando ambas expresiones se tiene:

$$Z_{Im} = Z_R - R_{\Omega} - R_{CT} + 2\sigma^2 C_d \quad (2.41)$$

Acorde con la ecuación (2.39), el gráfico Z_{Im} vs. Z_R debe ser una recta de pendiente igual a 1, cuya extrapolación con el eje x es $R_\Omega + R_{CT} - 2\sigma^2 C_d$ tal como se muestra en la Figura 2.14:

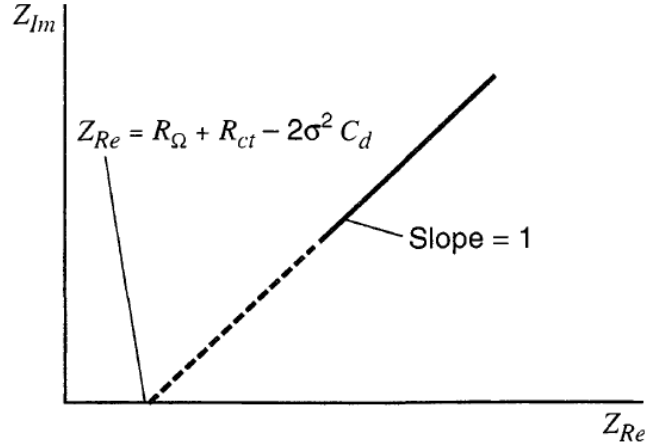


Figura 2.14 Gráfico Nyquist para bajas frecuencias

➤ *Altas frecuencias*

Para altas frecuencias la impedancia de Warburg se torna despreciable frente a la resistencia a la transferencia de carga. La impedancia Z viene dada por la ecuación (2.42):

$$Z = R_\Omega - j \left(\frac{R_{ct}}{R_{ct} C_d \omega - j} \right) \quad (2.42)$$

donde

$$Z_{Re} = R_\Omega + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{ct}^2} \quad (2.43)$$

$$Z_{Im} = \frac{\omega C_d R_{ct}^2}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{ct}^2} \quad (2.44)$$

Combinando ambas expresiones se llega a:

$$(Z_R - R_\Omega - R_{CT}/2)^2 + Z_{Im}^2 = (R_{CT}/2)^2 \quad (2.45)$$

De acuerdo con la ecuación (2.45) al graficar Z_{Im} vs. Z_R se obtiene un círculo centrado en $Z_R = R_\Omega + R_{CT}/2$ y $Z_{Im} = 0$, cuyo radio es $R_{CT}/2$. La Figura 2.15 muestra el gráfico y el circuito equivalente para altas frecuencias.

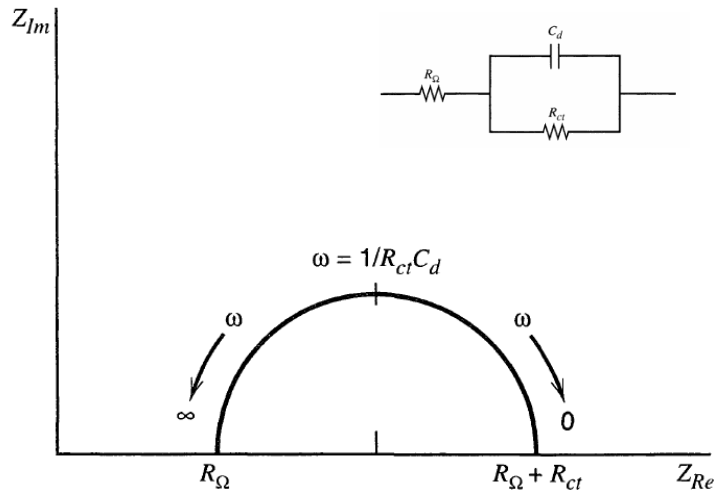


Figura 2.15 Gráfico Nyquist y circuito equivalente (inserto) para altas frecuencias

En general, los sistemas que se estudian en la práctica, presentan gráficos de impedancia donde se combinan los dos casos límite analizados (Figura 2.16). Incluso, ambas regiones pueden no estar bien definidas. El factor determinante es la resistencia a la transferencia de carga R_{CT} y su relación con la impedancia de Warburg, la cual es controlada por σ .

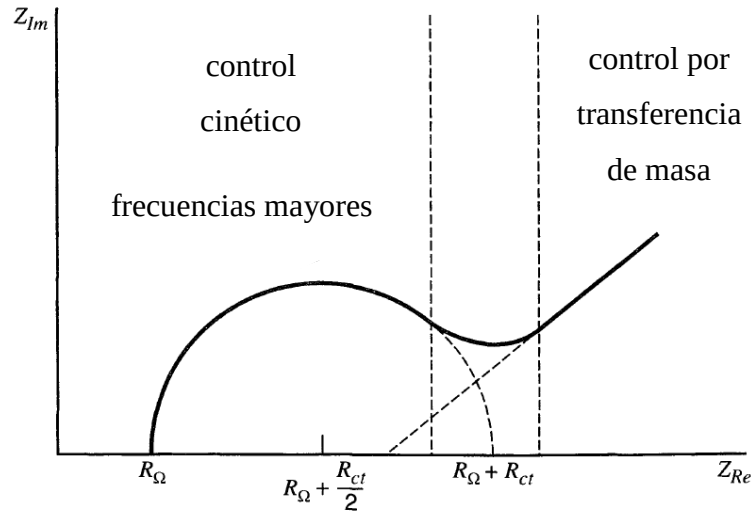


Figura 2.16 Gráfico de impedancia para un sistema electroquímico

Elemento de fase constante (CPE)

En algunos sistemas reales el arco del círculo del gráfico Nyquist presenta una desviación hacia abajo respecto del eje x (Figura 2.17). La misma se atribuye a diferentes fenómenos relacionados con inhomogeneidades del sistema en estudio. Se introduce entonces el elemento de fase constante *CPE* (Constant Phase Element) al circuito, el cual no posee una explicación física intuitiva. Matemáticamente CPE se expresa como:

$$1/Z = Y = Q^\circ (j\omega)^n \quad (2.46)$$

donde Q° es numéricamente igual a la admitancia ($1/|Z|$) para $\omega = 1 \text{ rad.s}^{-1}$. En consecuencia el ángulo de fase de CPE es independiente de la frecuencia, lo que da origen a su nombre, y su valor es $-(90.n)$. Si $n = 1$ el elemento de fase constante se asemeja a un capacitor ideal, en la práctica correspondería al caso de una superficie plana perfecta, como por ejemplo Hg (liq.). Para $n = 0,5$ se tiene un electrodo poroso y si $0,5 < n < 1$ la superficie es rugosa. En general el valor de n se encuentra entre 0,8 y 1. La rugosidad de la superficie es una de las formas de inhomogeneidad del sistema que explica el elemento de fase constante. Otro factor de inhomogeneidad puede ser atribuido a la velocidad de reacción sobre el electrodo. Las distintas caras de un metal policristalino o la superficie del carbono vítreo ofrecen sitios activos con energías de

activación diferentes. El estado de oxidación de los átomos de carbono superficiales también puede afectar la velocidad de reacción.

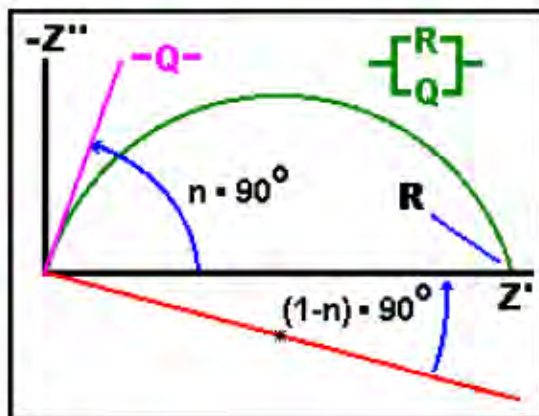


Figura 2.17 Gráfico Nyquist mostrando el elemento de fase constante (CPE)

2.1.1.7 Instrumentación

Las mediciones electroquímicas se realizaron con el siguiente instrumental:

- Lab. Electroanálisis – UNGS:

PGSTAT 10 EcoChemie. Las mediciones de CV, SWV y DPV se hacen empleando el software GPES.

- Lab. Dr. Fernando Battaglini - FCEyN-UBA:

PGSTAT μ AUTOLAB type III EcoChemie, además del software GPES, para las mediciones y análisis de datos de impedancia se emplea el programa FRA.

Potenciostato TEQ 02

Bi-Potenciostat PINE Instrumental Company Model AFRDES

2.1.2 Balanza de cristal de cuarzo con disipación

Los experimentos fueron realizados con un equipo Q-Sense Instrument (QCM-D, Q-Sense E1, Suecia), provisto de un módulo para operar en flujo (Q-Sense Flow Module, QFM 401). El volumen mínimo de muestra que requiere la celda de medición es de 300 μ L, el rango de temperatura de trabajo es 15 a 65 $^{\circ}$ C controlado por el software, con una

estabilidad de $\pm 0,02$ °C. La celda de medición se ubica sobre una mesada antivibratoria. Para trabajar en flujo se empleó una bomba peristáltica ISMATEC, ISM 596D Glattbrugg, Switzerland. La adquisición y análisis de datos se realizó empleando el software con que es provisto el instrumento.

Se usaron sensores comerciales que consisten en un cristal de cuarzo (5MHz, AT-cut) de geometría circular (14 mm de diámetro) con recubrimiento de Au de 0,3 mm pulido hasta lograr una rugosidad inferior a 3 nm (QXS 301). Inmediatamente antes de usar el sensor se limpia con O₃ y luz UV durante 15 min. Se midió la respuesta del sensor en el 3^{er} sobretono debido a la mayor sensibilidad del equipo.

La limpieza del sensor para su reutilización se hizo sumergiendo el mismo en una solución de H₂O:NH₃ 25%:H₂O₂ 100 v (5:1:1) a 75°C, 20 minutos, luego se enjuaga con H₂O MilliQ, y se seca con N₂ (g). ***¡Trabajar en campana, solución muy corrosiva!***

En el capítulo 5, se presenta una descripción de la técnica y sus alcances.

Las medidas fueron realizadas en el laboratorio que dirige el Dr. Fernando Battaglini (Depto. de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, INQUIMAE, FCEyN-UBA).

2.2 Materiales y procedimientos experimentales

2.2.1 Secuencias oligonucleotídicas

Todas las secuencias de ADN empleadas en este trabajo fueron sintetizadas y purificadas por desalado o HPLC por Sigma-Genosys, USA.

La secuencia del aptámero que reconoce ATP/AMP/adenosina reportada por Huizenga y Szostak (1995) posee 27 nucleótidos (Mr 8076,1 Da) y es la siguiente:



Se emplearon las siguientes modificaciones (extremos 5' o 3') de dicha secuencia también disponibles comercialmente:

5Ts-Apt: La secuencia tiene 5 fosforotioatos en el extremo 5' seguidos de 5 timidinas (T) adicionales como *linkers*:

5'-TsTsTs TsTsT TTT TAC CTG GGG GAG TAT TGC GGA GGA AGG T-3'
(M_w 11607,1 Da)

T-Apt: La secuencia tiene 5 timidinas adicionales como *linkers* en el extremo 5':

5'-TTT T TA CCT GGG GGA GTA TTG CGG AGG AAG GT-3'
(M_w 10006,2 Da)

C₆-S-S-C₆-Apt: La secuencia tiene un puente disulfuro (-S-S-) unido al extremo 5' del aptámero a través de una cadena de 6 átomos de carbono y 5 timidinas adicionales como *linkers*:

5'-CH₃-(CH₂)₅-S-S-(CH₂)₆-TTT T TA CCT GGG GGA GTA TTG CGG AGG AAG GT-3'
(M_w 10334,4 Da)

Secuencias complementarias del aptámero que reconoce ATP

Se utilizaron 2 secuencias complementarias a la secuencia del **Apt-ATP** de diferente longitud:

C11: 5'- CTC CCC CAG GT-3' (M_w 3253,2 Da)

C27: 5'-ACC TTC CTC CGA AAT ACT CCC CCA GGT-3' (M_w 8076,1 Da)

Secuencia scramble

Esta secuencia posee los 27 nucleótidos del aptámero desarrollado por Huizenga y Szostak pero ordenados al azar, en el extremo 5' posee la modificación disulfuro para permitir el anclaje al Au:

5'-CH₃-(CH₂)₅-S-S-(CH₂)₆-ACG AAG GGC GGG GGT AGG GTA TTT ACG-3'
(M_w 8815 Da)

Secuencia poliT

Para explorar el anclaje a la superficie de Au minimizando las interacciones inespecíficas se empleó una secuencia corta de 7 timidinas (poliT) con distintas modificaciones para unirse al Au:

poliT (inespecífico): TTT TTT T (M_w 2067,3 Da)

poliT fosforotioato: TsTT TTT T (M_w 2083,3 Da)

poliT disulfuro: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5\text{-S-S-}(\text{CH}_2)_6\text{-TTT TTT T}$ (M_w 2395,5 Da)

2.2.1.1 Reducción del enlace disulfuro (-S-S-) en secuencias oligonucleotídicas

Se hace reaccionar la secuencia oligonucleotídica que posee el grupo -S-S- (concentración final $1\mu\text{M}$) con TCEP, tris-(2-carboxietil)fosfina (concentración final 1,5 mM) a temperatura ambiente y oscuridad durante 2 hs, agitando ocasionalmente (Baker et al, 2006). Para otra concentración de ADN mantener una relación de concentración oligonucleótido:TCEP de 1:1000. El producto de la reacción (Figura 2.18) se usó sin purificar (Getz et al, 1999).

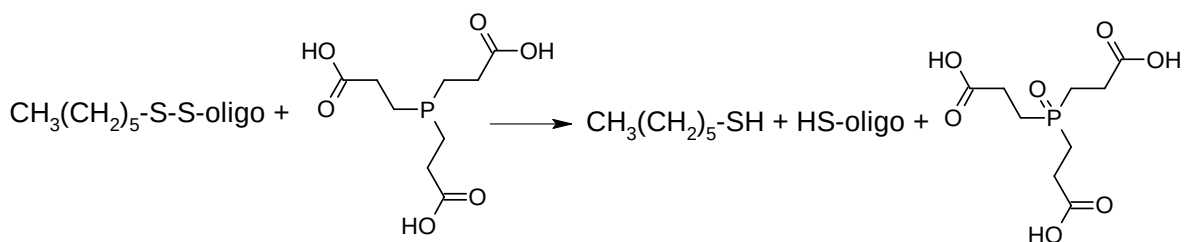


Figura 2.18 Reacción de reducción del grupo disulfuro (-S-S-) por TCEP

2.2.2. Síntesis de N-{2-[(3-mercaptopropanoil)amino]etil}ferrocen-1-carboxamida (3MPAFc)

Para explorar la señal electroquímica del grupo ferroceno (Fc), se sintetizó el compuesto de N-{2-[(3-mercaptopropanoil)amino]etil}ferrocen-1-carboxamida (3MPAFc), a partir de ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA), etilendiamina y carboxiferroceno según se

muestra en la Figura 2.19. Se purificó por cromatografía en columna de sílica gel y se verificó su estructura por RMN ^1H .

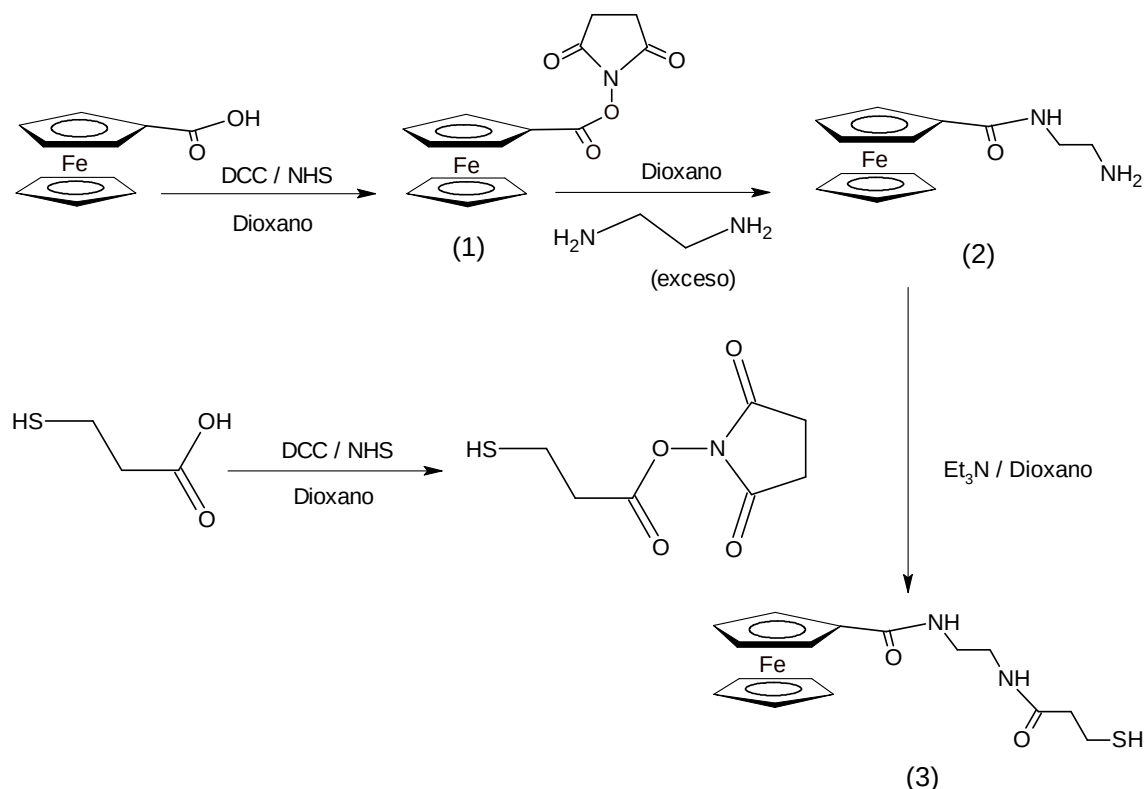


Figura 2.19. Esquema de síntesis de N-{2-[(3-mercaptopropanoil)amino]etil}ferrocen-1-carboxamida (3MPAFc)

a) Activación del carboxiferroceno (1):

Reactivo	Origen	Moles (10^{-3})	Cantidad
carboxiferroceno	Aldrich	2,2	0,50 g
DCC (1,3-diciclohexilcarbodiimida)	Aldrich	2,4	0,50 g
Dioxano	Aberkon		25 mL
NHS (N-hidroxisuccinimida)	Aldrich	2,7	0,31 g

Se disolvieron 5,0 mL de DCC en dioxano. Se agregó gota a gota bajo atmósfera de N_2 y durante aproximadamente 30 minutos, una solución de carboxiferroceno y NHS en 25 mL de dioxano. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente por 20 horas, bajo atmósfera de N_2 . Se observó la formación de un sólido blanco, se filtró y se descartó dicho sólido. Se evaporó el solvente a presión reducida, obteniéndose un sólido naranja (1). Se

purificó por columna de sílica gel sembrando el residuo disuelto en CHCl_3 :MeOH 99:1. Como solvente de elución se utilizó CHCl_3 :MeOH 99:1. Rendimiento: 96%.

Rf. 0,40 en CHCl_3 : CH_3OH , 99:1

b) Obtención del compuesto 2:

Reactivo	Origen, pureza	cantidad	Moles (10^{-3})
FcNHS	síntesis	0,69 g	2,12
etilendiamina	Aldrich 99%	1,27 g	21,2

En un balón se agregó el compuesto FcNHS disuelto en dioxano, y la etilendiamina. Se tapó el balón y dejó agitando bajo campana 1 hora aproximadamente. El avance de la reacción se siguió por cromatografía en capa delgada, solvente CHCl_3 : CH_3OH : Et_3N 4:1:0,1.

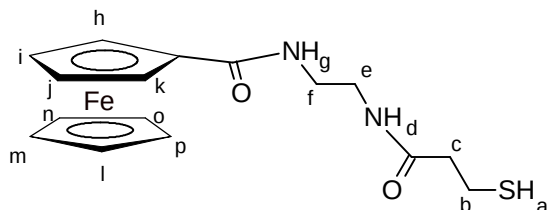
c) Obtención del compuesto 3:

Reactivo	Origen, pureza	cantidad	Moles (10^{-3})
3-MPA (ácido 3-mercaptopropiónico)	Aldrich 99%	0,37 mL	4,24
DCC (diciclhilcarbodiimida)	Aldrich 99%	0,87 g	4,24
NHS (<i>N</i> -hidroxisuccinimida)	Aldrich 98%	0,49 g	4,24
1	Síntesis	0,15 g	2,12

En un balón se resuspendió el compuesto 2 en 20 mL de dioxano. Se agregó NHS y DCC disueltos en 5 mL de dioxano y se agregó 3-MPA disuelto en 10 mL de dioxano. Se tapó el balón y se dejó agitando bajo campana, 2 hs a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por cromatografía igual que en el paso anterior. Se evaporó el solvente. Se purificó por cromatografía en columna de sílica gel.

Rf : 0,6 en CH_2Cl_2 : CH_3OH , 5:1

^1H -RMN (CDCl_3 / TMS) (δ ppm): 3,69 (m, 1H, H_a); 2,80 (m, 2H, H_b); 2,38 (m, 2H, H_c); 3,50 (m, 2H, H_e); 3,69 (m, 2H, H_f); 4,57 (t, 2H, H_h , H_k); 4,34 (s, H_j); 4,35 (s, 5H, H_l , H_m , H_n , H_o , H_p); 4,94 (t, 2H, H_i , H_j)



2.2.3 Electrodos

En todas las mediciones electroquímicas realizadas los potenciales fueron medidos respecto del electrodo de Ag/AgCl (KCl 3 M), empleado como referencia.

2.2.3.1 Electrodos de trabajo comerciales

Electrodos comerciales Metrohm, de carbono vítreo (diámetro 1,6 mm, área geométrica $0,0314 \text{ cm}^2$) y de Au policristalino (Figura 2.20) (diámetro 1,6 mm, área geométrica $2,0 \text{ mm}^2$).



Figura 2.20 Imagen de los electrodos de Au comerciales

Evaluación del área electroquímica del electrodo de Au comercial

Se midió por voltametría cíclica la respuesta del electrodo de trabajo en solución de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,02M, para diferentes velocidades de barrido (0,01 a 0,5 Vs^{-1}). Aplicando la ecuación de Randles-Sevcik (2.3), se graficó i_p vs. $v^{1/2}$ (Figura 2.21) y de la pendiente de la recta se obtuvo el valor del área electroquímica (A), sabiendo que el coeficiente de difusión (D) del anión $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ es $7,60 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y n (moles de e^- intercambiados) = 1

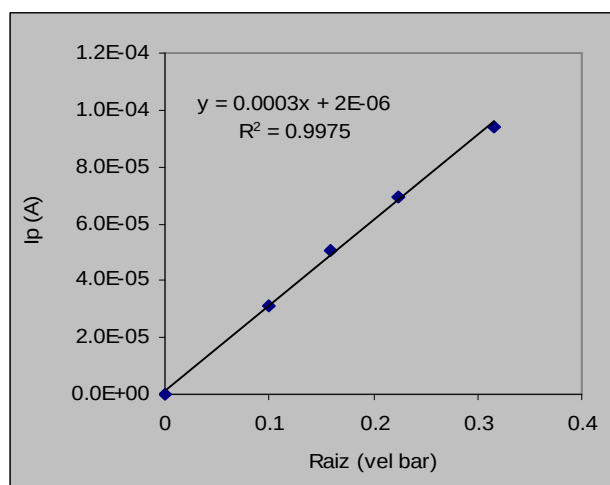


Figura 2.21 Intensidad de corriente en función de la velocidad de barrido medida en $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 20 mM, electrodo de trabajo de Au (Metrohm)

El área electroquímica obtenida fue $(2,0 \pm 0,1) \text{ mm}^2$.

2.2.3.2 Láminas de Au macizo

A partir de una lámina de oro de joyería (pureza del metal > 99,9%), se cortaron superficies rectangulares de 1 cm x 0,5 cm (Figura 2.22). El área de trabajo queda delimitada por el orificio de la celda empleada para modificar los electrodos o hacer las mediciones electroquímicas (ver Figura 2.1 (der.)).



Figura 2.22 Láminas de Au macizo empleadas como electrodos de trabajo

2.2.3.3 Electrodo descartables

Se llevó a cabo la electrodeposición galvanostática de Au sobre una placa de mylar de 350 μm de espesor donde previamente se hizo el diseño de las pistas que funcionan como electrodos. El desarrollo fue realizado por el Dr. Fernando Battaglini (Priano et al, 2008) empleando la técnica de serigrafía presentada en 1.3.1. Brevemente, se depositó una primera capa de pintura de plata conductora y luego se cubrió con tinta de grafito quedando así delimitadas las áreas de los electrodos (8 o 12 dependiendo del diseño, ver Figura 2.23). Finalmente se empleó una tinta aislante resistente a alto voltaje (color verde). Para obtener el depósito de Au se partió de una solución comercial de $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$ (15 mg/mL) libre de níquel (VM 357, espesor Rosé, Vilmet, Bs. As. Argentina). Se hizo pasar una corriente de 5 mA cm^{-2} . Se dispuso la celda sobre un agitador orbital para permitir una velocidad de agitación controlada y suave (80 rpm) que permitió la homogeneización, esta operación duró 20 minutos. Luego se enjuagó la lámina con abundante agua destilada, se sumergió 5 minutos en agua a ebullición y finalmente se dejó 12 hs en estufa a 140°C , procedimiento que mejoró la calidad de la superficie de Au. Antes de usar, los electrodos deben limpiarse según se indica en 2.2.3. Las placas pueden almacenarse por un cierto tiempo, verificando siempre la calidad electroquímica del depósito de Au antes de usarlas.

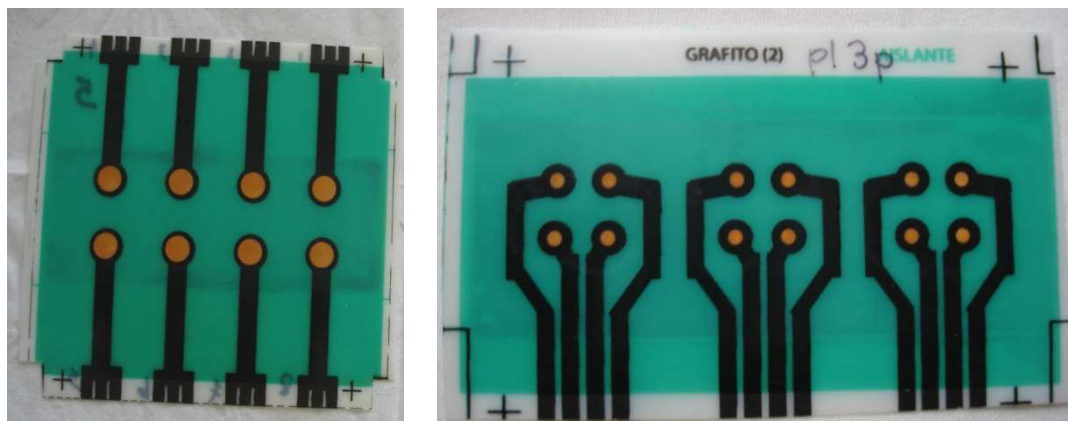


Figura 2.23 Placa con electrodos de Au: diseño de 8 electrodos, 0,38 de área geom. (izq.) ,
diseño de 12 electrodos, 0,07 cm² de área geom. (der.)

2.2.3.4 Nanoelectrodos

Preparación de nanoporos y clusters de oro

1. Pulido mecánico y electropulido

- a) Se pulieron con lija fina los extremos de un bastón de aluminio (dimensiones: 2x3x10 mm, ver Figura 2. 24).
- b) Se aplicaron 18 V durante 15 s empleando una fuente de corriente continua. El bastón de Al se usó como ánodo, como cátodo se empleó una barra de plomo, previamente pulida. Ambos electrodos se sumergieron en una solución de etanol y HClO₄ (5:1).
- c) Se enjuagó con agua MilliQ el bastón de Al.
- d) Se recubrieron con barniz (esmalte de uñas) los laterales del bastón pulidos previamente.

2. Anodizado

- e) El bastón de Al se sumergió en H₂SO₄ 15% V/V se aplicaron 15V durante 1 minuto con agitación. Como contraelectrodo se usó un segundo electrodo de Pb también pulido.
- f) Se dejó el sistema con agitación durante 5 min. sin aplicar voltaje.

g) Se enjuagó con agua MilliQ el bastón de Al.

3. Electrodeposición de Au

h) El bastón de Al (electrodo de trabajo) se sumergió en una solución comercial de $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$ (15g/L) (VM 357, espesor Rosé, Vilmet, Argentina), como contraelectrodo se empleó una lámina de Au, el electrodo de referencia usado fue Ag/AgCl (KCl 3M). El depósito de Au en los nanoporos se realizó en las siguientes condiciones: 1) $-3 \text{ mA}/\text{cm}^{-2}$ durante 8 ms (deposición del metal); 2) $3 \text{ mA}/\text{cm}^{-2}$ durante 2 ms (al invertir la polaridad se descarga la superficie); 3) $0 \text{ mA}/\text{cm}^{-2}$ durante 500 ms (se recupera la concentración de iones por difusión). Se aplicaron 3000 ciclos.

i) Se enjuagó con agua MilliQ el bastón de Al.

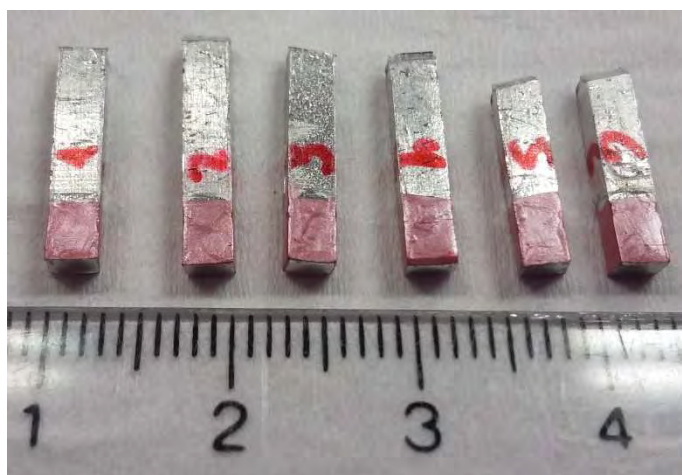


Figura 2.24 Bastones de aluminio para obtener el arreglo de nanoporos.

4. Respuesta electroquímica

Para verificar la respuesta de los nanoporos con el depósito de nanopartículas de Au, se realizaron las siguientes mediciones electroquímicas, empleando una solución de $\text{K}_4[(\text{Fe}(\text{CN})_6)]$ 50 mM en buffer Hepes 50 mM, pH 7,2:

j) Voltametría cíclica (CV): ventana de potencial $-0,1\text{V}$ a $0,4 \text{ V}$, v 50 mVs^{-1} .

k) Voltametría de onda cuadrada (SWV): ventana de potencial $-0,1\text{V}$ a $0,5 \text{ V}$.

- l) Impedancia (EIS): se registra el espectro para un rango de frecuencias entre 1 Hz y 10 kHz (cada 100 Hz), se mide al potencial (E°) de la cupla redox 0,2 V.

Pueden consultarse para más detalles los trabajos de Peinetti et al, 2013 y 2015.

2.2.4. Limpieza de los electrodos de trabajo

2.2.4.1 Electrodos de Au comerciales

- Se preparó sobre tela esmeril una suspensión de alúmina ($0,5\ \mu\text{m}$) en H_2O MilliQ
- Se pulieron los electrodos haciendo “8”.
- Se enjuagaron los electrodos con H_2O MilliQ
- Se secaron empelando papel tissue
- Se midió la respuesta electroquímica (CV) en medio ácido (H_2SO_4 1,8 M o HClO_4 0,2 M).

La Figura 2.25 muestra una voltametría cíclica típica de un electrodo comercial limpio.

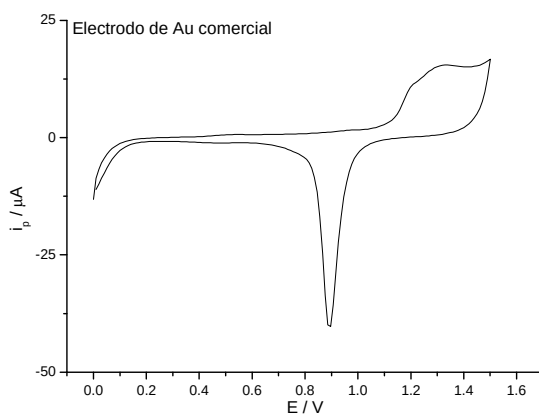


Figura 2.25 Voltametría cíclica de un electrodo de Au comercial medida en HClO_4 0,2M; v $0,05\ \text{Vs}^{-1}$

2.2.4.2 Láminas de Au macizo

Las láminas de Au macizo fueron sumergidas en solución piraña (H_2SO_4 98%: H_2O_2 30%, 3:1) durante 30 minutos aproximadamente. **¡Precaución la reacción es muy exotérmica, trabajar en campana!.**

Se enjuagaron con agua MilliQ por inmersión y se secaron al aire.

Se verificó electroquímicamente el estado de la superficie. De ser necesario se repite el procedimiento de limpieza.

La solución remanente se neutralizó antes de desechar.

2.2.4.3 Electrodo descartable

La superficie de Au fue pulida sucesivamente con una suspensión de alúmina de 0,3 y 0,05 μm , empleando un hisopo. Se enjuagó con agua MilliQ. La limpieza se realizó inmediatamente antes de usar el electrodo. Se verificó electroquímicamente el estado de la superficie.

2.2.5 Modificación de los electrodos de trabajo

2.2.5.1 Láminas de Au macizo

Se diseñó una celda de teflón con el mismo principio de construcción que la celda de medición presentada en Figura 2.1 (der.) con 4 cavidades independientes para introducir las láminas de Au. El área de la lámina de Au a modificar, queda determinada por un orificio con capacidad para introducir hasta 50 μL de solución. Para evitar pérdidas de la solución en cada compartimento se emplea un O-ring de 16 mm de diámetro.

Las láminas metálicas se ubicaron en la celda tal como se muestra en la Figura 2.26. Se preparó una solución del compuesto con que se desea modificar los electrodos y se agregó un volumen de 25-30 μL de modo que toda la superficie metálica quede sumergida. Se cubrió la celda con una película plástica (*Parafilm*[®]) para evitar la evaporación de la solución. Se dejó durante 12 hs a temperatura ambiente. Se retiró la solución remanente con una micropipeta, tomando la precaución de no tocar la superficie del metal modificada. Finalmente se enjuagó con buffer o agua MilliQ.

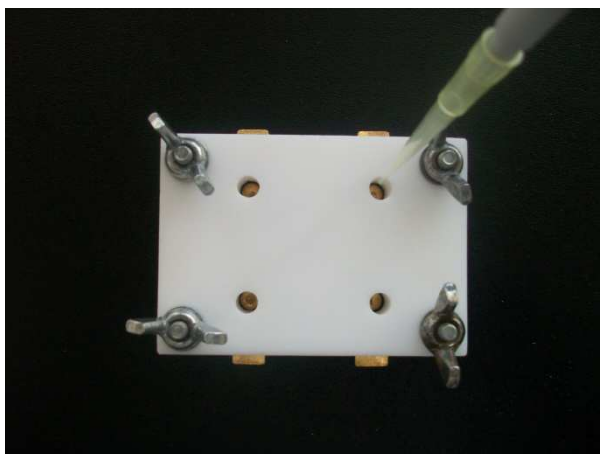


Figura 2.26 Celda de teflón para modificar láminas de Au macizo

2.2.5.2 Electrodo descartables

Se empleó una celda circular de acrílico con el mismo principio de construcción de la celda para modificar las láminas de Au macizo previamente descripta. Se trabajó con un conjunto de cuatro electrodos (ver Figura 3.17) simultáneamente donde cada compartimento es independiente del resto. El volumen máximo de solución que puede alojarse en cada cavidad es 100 μL , el volumen mínimo requerido para lograr cubrir toda la superficie del electrodo es de 25 μL . La celda se dispuso sobre un agitador orbital y se trabajó a 80 rpm aproximadamente.

La celda para realizar las mediciones electroquímicas posee un diseño similar pero posee una tapa superior con orificios para el electrodo de referencia y el contraelectrodo.

Para el trabajo con los electrodos descartables se empleó el instrumental y dispositivos (celdas) disponibles en el laboratorio del Dr. Fernando Battaglini.

Los ensayos para evaluar la respuesta frente al buffer y al analito (AMP) se realizaron según el siguiente protocolo:

- a) Se armó la celda con los electrodos modificados y se agregaron 50 μL de buffer Tris-HCl 25 mM pH 8,2 se dejó agitando durante 30 a temperatura ambiente.
- b) Se retiró la solución remanente con una micropipeta.

- c) Se transfirió la placa con los cuatro electrodos a la celda de medición. Se agregó la solución de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,025 M/Hepes 0,1 M/ KNO_3 0,2 M, pH 7,2 y se hicieron las medidas electroquímicas (CV, EIS).
- d) Se enjuagaron el electrodo con buffer Tris-HCl 25 mM, pH 8,2.
- e) Se armó la celda con los electrodos modificados y se agregaron 50 μL de AMP de la concentración deseada en buffer Tris-HCl 25 mM, pH 8,2. Se dejó agitando durante 30 min a temperatura ambiente.
- f) Se retiró la solución remanente con una micropipeta. Se enjuagaron los electrodos con buffer Tris-HCl 25 mM, pH 8,2.
- g) Se transfirió la placa con los 4 electrodos a la celda de medición. Se agregó la solución de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,025 M/Hepes 0,1 M/ KNO_3 0,2 M, pH 7,2 y se hicieron las medidas electroquímicas (CV, EIS).
- h) Se repitieron los pasos a), b) y c)

2.2.5.3 Nanoelectrodos

Modificación de nanoelectrodos con secuencias oligonucleotídicas y mediciones electroquímicas:

- a) En un tubo Eppendorf de 500 μL se colocaron 30 μL de solución de oligonucleótido 1 μM preparada en agua calidad MilliQ. Se introdujo el bastón de Al de modo que quede sumergida la base del mismo donde se encuentra el arreglo de nanoelectrodos. Se dejó 30 minutos a temperatura ambiente.
- b) Se enjuagó el electrodo con agua calidad MilliQ empleando una piseta.
- c) Se hicieron las medidas electroquímicas (CV, SWV, EIS) en las mismas condiciones que se describieron previamente (ver 2.2.2.4)
- d) Se enjuagó el electrodo con agua calidad MilliQ.

La densidad de poros en cada bastón de Al de 0,06 cm^2 de área es $6,5 \cdot 10^{10}$ poros. cm^{-2} , resultando así $3,9 \cdot 10^9$ poros por bastón. Teniendo en cuenta el volumen de solución de oligonucleótido, y suponiendo que la reacción de reducción tiene 100% de rendimiento,

hay $1,8 \cdot 10^{13}$ moléculas de oligonucleótido. La proporción entre moléculas de oligonucleótido y cantidad de poros es 4600:1. Cabe señalar que la misma relación se da entre moléculas de tiol corto y cantidad de poros.

Los ensayos para evaluar la respuesta frente al buffer y al analito (AMP) se realizaron según el siguiente protocolo:

- a) En un tubo Eppendorf de 500 μL se colocaron 30 μL de buffer Tris-HCl 25 mM pH 8,2. Se sumergió la barra de aluminio (electrodo de trabajo) durante 15 min. a temperatura ambiente.
- b) Se enjuagó el electrodo con agua MilliQ.
- c) Se hicieron las medidas electroquímicas (SWV, EIS) en las mismas condiciones que antes.
- d) Se enjuagó el electrodo con agua MilliQ.
- e) Se sumergió la barra de aluminio durante 15 min. a temperatura ambiente, en 30 μL de solución conteniendo el analito disuelto en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8,2, en la concentración seleccionada (0,05-100 μM).

Ensayos de hibridización en nanoporos:

- a) Se midió la respuesta por SWV y EIS de los nanoelectrodos modificados con el aptámero según se indica en 2.2.2.4.
- b) Se incubaron los electrodos durante 15 minutos, a temperatura ambiente en buffer Tris 50 mM, pH 7,2. Se enjuagaron con agua MilliQ.
- c) Se repitieron las mediciones electroquímicas. Se enjuagó con agua MilliQ para remover los restos de solución de ferricianuro.
- d) Se incubaron los electrodos durante 30 minutos, a temperatura ambiente con una solución de la hebra complementaria en distintas concentraciones, las diluciones se prepararon en buffer Tris 50 mM, pH 7,2.

- e) Se repitieron las mediciones electroquímicas. Se enjuagó con agua MilliQ para remover los restos de solución de ferricianuro.

2.3 Protocolos de preparación de las soluciones empleadas

En todos los casos el agua empleada fue provista por un equipo Millipore (H₂O MilliQ 18 MΩ.cm). Todos los reactivos usados son grado analítico.

-Acido clorhídrico 1M

Para 50 mL de solución se vertieron 4,2 mL de HCl 37% m/m en un matraz aforado (M_w 36,5 Da, δ 1,19 g/mL, Merck) y se llevó a volumen con H₂O MilliQ. Se trabajó en campana debido a que la reacción es exotérmica.

- Acido perclórico 0,2M

Para 100 mL de solución, en un matraz aforado se vertieron H₂O MilliQ, se agregaron gota a gota 1,3 mL de HClO₄ 65% (Carlo Erba), se llevó a volumen con H₂O MilliQ. Se trabajó en campana debido a la reacción es exotérmica.

- Acido sulfúrico 5% m/V

Para 100 mL de solución, en un matraz aforado se vertieron H₂O MilliQ, se agregaron gota a gota 2,6 mL de H₂SO₄ 98% (Carlo Erba), se llevó a volumen con H₂O MilliQ. Se trabajó en campana debido a que la reacción es fuertemente exotérmica.

- Buffer Hepes 100 mM, KNO₃ 200 mM, pH 7,2

Para 100 mL de solución, se pesaron 2,383 g de Hepes (M_w 238,31 Da, J. T. Baker) y se disolvieron en KNO₃ 200 mM. Se ajustó el pH con NaOH 0,5 M o 1M.

- Buffer Tris (tris(hidroxietil)aminometano) 50 mM, pH 7,2

Para 250 mL de solución, se pesaron 1,5142 g de Tris (C₄H₁₁NO₃, Mr 121,14 Da, Carlo Erba; pK_a= 8,06, rango aplicación pH 7,0- 9,2) se disolvieron en H₂O MilliQ y se ajustó el pH con HCl 1M. Se conservó a 4°C.

- Clorohidrato de tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 1,5 mM (agente reductor para el grupo disulfuro)

Para preparar 5 mL de solución madre 15 mM: se pesaron 0,0213 g de TCEP ($C_9H_{15}O_6P.HCl$, M_w 286,65 Da, Sigma-Aldrich) y se llevaron a volumen con H_2O calidad MilliQ. La solución se fraccionó y se conservó a $-18^\circ C$. El reactivo sólido y sus soluciones son fotosensibles, deben conservarse y utilizarse en oscuridad. Se realizó una dilución 1:10 antes de usar.

- Cloruro de magnesio 100 mM

Para 50 mL de solución, se pesan 0,2033 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (M_w 203,30 Da, Merck), se lleva a volumen con H_2O MilliQ. El reactivo es muy higroscópico, guardar en desecador bien tapado.

- Cloruro de sodio 0,5M

Para preparar 50 mL de solución, se pesaron 1,4611 g de NaCl (M_w 58,443 Da, Carlo Erba), y se llevó a volumen con H_2O calidad MilliQ.

- Hidróxido de sodio 1M

Para preparar 100 mL de solución, se pesaron 4,0 g de NaOH (M_w 40,0 Da, Carlo Erba), se llevó a volumen con H_2O calidad MilliQ.

- Ferrocenometanol 0,52 mM en buffer Hepes 100 mM, KNO_3 200 mM, pH 7,2

Para preparar 50 mL de solución, se pesaron 0,0056 g de ferrocenometanol ($C_{11}H_{12}FeO$, M_w 216,07 Da, Sigma-Aldrich, 97%), se llevó a volumen con el buffer indicado.

- $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ 25 mM en buffer Hepes 100 mM, KNO_3 200 mM, pH 7,2

Para preparar 5 mL de solución se pesaron 0,0528 g de $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ (M_w 422,41 Da, Carlo Erba) y se llevó a volumen en el buffer indicado. La solución deber ser preparada en el día.

- $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ 50 mM en buffer Hepes 50 mM, pH 7,2

Para preparar 10 mL de solución se pesaron 0,212 g de $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ (M_w 422,41 Da, Carlo Erba) se llevó a volumen en el buffer indicado. La solución deber ser preparada en el día.

-Nitrato de potasio 0,300 M

Para preparar 50 mL de solución se pesaron 1,5166 g de KNO_3 (M_w 101,11 Da, Carlo Erba), se llevó a volumen con H_2O calidad MilliQ.

Medidas de protección ambiental

Los descartes de las soluciones que contienen metales fueron dispuestos en bidones para tal fin, identificados de acuerdo a la normativa vigente.

Resultados y discusión

Cuando hay señal todo es posible

Helena dixit

Capítulo 3. Modificación de superficies de oro con oligonucleótidos

3.1. Introducción

La modificación de superficies de oro con oligonucleótidos simple cadena encuentra diversas aplicaciones en biotecnología y nanotecnología. En particular el desarrollo de aptasensores de base electroquímica hace uso de dichas superficies aprovechando las propiedades del metal (ver 1.3.4 y 1.4). El oro ocupa el tercer lugar entre los metales por sus propiedades conductoras a temperatura ambiente y su inercia química que previene la formación de óxidos que actúan como aislantes. La ventana de potencial del metal en medio acuoso (0,1 V – 0,65 V vs Ag/AgCl (KCl 3M)) lo hace apto para funcionar como electrodo de trabajo en las técnicas de detección electroquímica.

El desarrollo de sensores electroquímicos es una de las áreas de mayor crecimiento en química analítica, hecho que motiva la búsqueda de dispositivos con mejores atributos analíticos (reproducibilidad, sensibilidad, estabilidad, entre otros) (Lowinsohn et al, 2006). A pesar de la gran versatilidad y las interesantes perspectivas exhibidas por los sensores electroquímicos, la utilidad de los electrodos se ve limitada por el desgaste de la superficie. Este problema puede resolverse con el empleo de electrodos descartables. Entre los atributos que debe poseer un electrodo para ser considerado descartable se encuentran: bajo costo de construcción, reproducibilidad y posibilidad de producción en gran escala. Aunque los requerimientos para las diferentes aplicaciones pueden variar, el depósito de Au debe mostrar alta pureza, rugosidad controlada y buena adherencia al sustrato.

El objetivo de este capítulo es presentar los resultados experimentales obtenidos en la modificación de superficies de Au policristalino con secuencias de oligonucleótidos y la exploración de posibles estrategias de desarrollo de señal electroquímica para detectar AMP como sistema modelo de moléculas pequeñas.

3.2 Diseño de un aptasensor y estrategia de detección electroquímica

3.2.1. Respuesta electroquímica del marcador redox en solución

Tal como se mencionó en el Capítulo 1, una de las estrategias de detección para los aptasensores se basa en la disociación del híbrido formado por el aptámero y su hebra complementaria, inducida por el analito (target-induce dissociation mode, TID, Han et al, 2010). Un posible diseño experimental para esta estrategia se muestra en la Figura 3.1. El aptámero modificado con biotina en uno de sus extremos, se fija a una resina de sefarosa que contiene estreptavidina mediante la formación del complejo estreptavidina-biotina ($K_{af} \sim 10^{14}$). La incubación con una hebra complementaria modificada a su vez con un marcador electroactivo, conduce a la formación del híbrido doble cadena (Figura 3.1, Etapa 1).

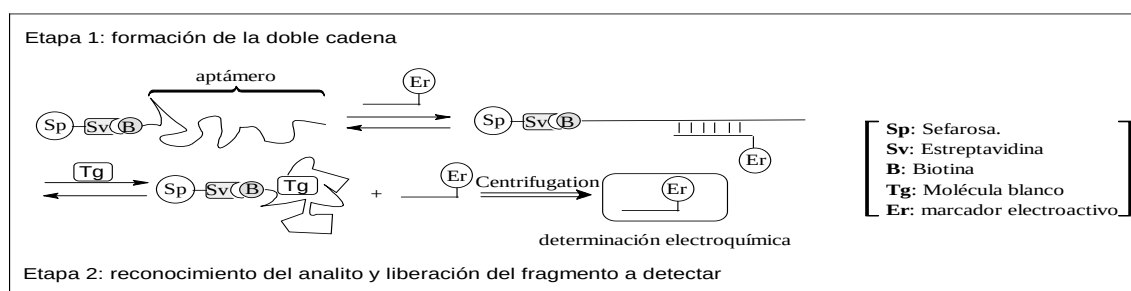


Figura 3.1 Esquema de la estrategia de desarrollo de un aptasensor basado en la disociación de un híbrido por el target

A continuación (Figura 3.1, Etapa 2), la incubación con el analito promueve la disociación del híbrido, liberando el fragmento que contiene el marcador electroactivo. Dicho fragmento se separa por centrifugación y se detecta electroquímicamente en solución, para ello se requiere una técnica de cuantificación con un límite de detección suficientemente bajo (rango inferior a μM).

El trabajo comenzó entonces, explorando este aspecto analítico con el instrumental disponible en el laboratorio de electroquímica de la UNGS. Se seleccionó el compuesto *N*-hidroxisuccinimidilcarboxiferroceno (Fc-NHS) (Figura 3.2) como marcador electroactivo, dado que el grupo ferroceno da una respuesta reversible en la ventana de potencial del carbono vítreo y del oro (Laforge et al, 2004).

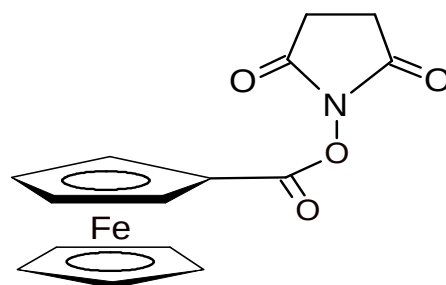


Figura 3.2. Estructura química del compuesto *N*-hidroxisuccinimidilcarboxiferroceno (Fc-NHS)

Se comparó la respuesta por voltametría cíclica de una solución de Fc-NHS 2 mM en buffer HAcO / NaAcO 0,5 M (pH 5,2), empleando electrodos comerciales de carbono vítreo (C vítreo) y oro (Au) (ver celda de medición Figura 2.1 (izq.) y electrodo de Au Figura 2.20). Sobre carbono vítreo se obtuvieron valores de $E_{pa} = 0,449$ V, $E_{pc} = 0,388$ V y $\Delta E_p = 0,061$ V, mientras que sobre Au, $E_{pa} = 0,473$ V, $E_{pc} = 0,370$ V y $\Delta E_p = 0,103$ V. Es buena la concordancia con los parámetros típicos para esta cupla redox, teniendo en cuenta que se trata de un derivado de ferroceno en este caso (Batterjee et al, 2003). Se observó mayor reversibilidad sobre carbono vítreo que sobre oro (Figura 3.3), hecho que se evidencia por el menor ΔE_p (Bard y Faulkner, 2000).

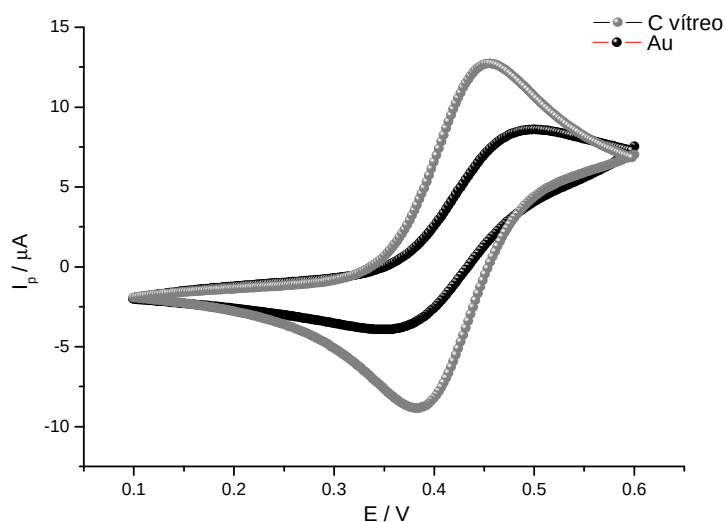


Figura 3.3 Voltametría cíclica de Fc-NHS 2 mM en buffer HAcO/NaAcO 0,5M (pH 5,2)

v : $0,1 \text{ Vs}^{-1}$, $0,1 \text{ V} \rightarrow 0,6 \text{ V}$. Electrodo de referencia Ag/AgCl (KCl 3 M)

Para explorar el rango de respuesta lineal y el límite de detección se empleó voltametría de onda cuadrada (SWV), técnica más sensible que la voltametría cíclica (ver 2.1.1.5). Las curvas de calibración en función de la concentración de Fc-NHS se midieron en buffer acético-acetato, pH 5,2, empleando electrodos de trabajo de carbono vítreo y Au (Figura 3.4). Para el electrodo de carbono vítreo, la técnica SWV dio un límite de detección de 0,1 μM , mientras que el electrodo de Au dio un valor mayor aún (0,5 μM). En función de estos resultados se concluyó que para hacer la detección de la sonda redox en solución, el límite de detección de las técnicas electroquímicas disponibles en el laboratorio no resultaba suficientemente bajo (SWV, ASV, CV, cronoamperometría). Se decidió entonces, explorar otra estrategia de detección.

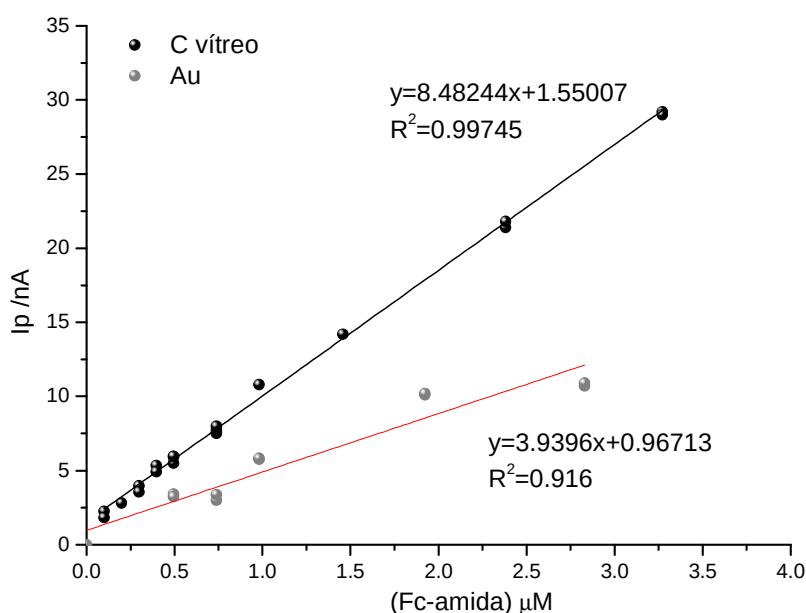


Figura 3.4 Curva de respuesta (i_p vs. concentración de Fc-NHS) medida por voltametría de onda cuadrada.

3.2.2. Sistema modelo para evaluar la respuesta electroquímica del marcador redox inmovilizado.

Como alternativa a la detección en solución, se propuso evaluar la señal del grupo ferroceno (Fc) unido a una hebra de ADN inmovilizada a la superficie del electrodo vía enlace S-Au. Para ello, se sintetizó el compuesto N -{2-[(3-mercaptopropanoil)amino]etil}ferrocen-1-carboxamida (3MPAFc, Figura 3.5), según se

describió en 2.2.2. El mismo fue diseñado con un grupo tiol terminal como punto de anclaje y un grupo Fc electroactivo en el extremo opuesto. El objetivo de trabajar con este compuesto sencillo, fue adquirir experiencia en la inmovilización a una superficie de Au y la posterior detección electroquímica del marcador redox inmovilizado empleando un compuesto de bajo costo.

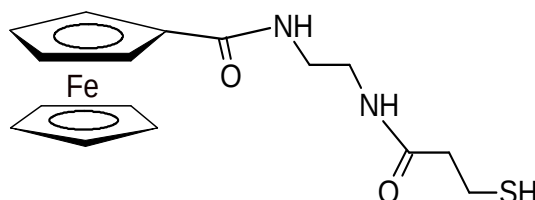
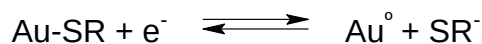


Figura 3.5 Estructura N-{2-[(3-mercaptopropionil)amino]etil}ferrocen-1-carboxamida (3MPAFc)

Como electrodo de trabajo se emplearon láminas de oro macizo (ver 2.2.3.2), las cuales se trataron con una solución 20 mM de 3MPAFc disuelto en EtOH - H₂O 9:1 para permitir la quimisorción del compuesto al Au (ver 2.2.5.1). Empleando voltametría cíclica se cuantificó la señal del marcador redox en buffer Tris 50 mM / NaNO₃ 0,2 M, pH 7,4, obteniéndose un valor de $(1,1 \pm 0,9) \cdot 10^{14}$ moléc.cm⁻².

Con fines comparativos en el grupo de trabajo, se realizó la modificación de láminas de oro macizo con ácido 3-mercaptopropiónico y a continuación se llevó a cabo el acoplamiento del grupo Fc siguiendo el esquema de síntesis presentado en la Figura 2.19. En este caso fue posible detectar la señal del grupo Fc por voltametría diferencial de pulso (DPV), pero resultó muy poco intensa para emplearla en la cuantificación por voltametría cíclica (ver Ponce, M. B., 2015, tesis DCyT-UNGS).

Para estimar el cubrimiento por una vía alternativa y también el grado de introducción del marcador Fc, se exploró la detección de la señal de desorción de tioles. Los compuestos tiolados en medio alcalino, se desorben cuando se aplica un potencial negativo al electrodo de trabajo. El proceso ha sido ampliamente estudiado para el caso de monocapas autoensambladas de alcanotioles sobre superficies de Au(111) tal como se discutió en 1.3.4. La reacción asociada es la siguiente:



El compuesto tiolado y la superficie metálica se solvatan y el tiol difunde hacia el seno de la solución. El proceso es reversible, si se detiene la aplicación del potencial negativo, o se revierte el barrido de potencial, puede ocurrir una re-adsorción oxidativa. La forma, magnitud y potencial del pico ($E_{\text{desorción}}$) asociado a la desorción de un tiol dependen de un número de factores que incluyen el tipo de molécula adsorbida, el largo de la cadena carbonada, el grado de ordenamiento y cubrimiento superficial, el tipo e intensidad de interacciones intermoleculares entre moléculas adsorbidas y la estructura cristalina del sustrato (Kawaguchi et al, 2000). Cuando se emplea voltametría cíclica, se puede estimar el cubrimiento superficial, a partir del área de la señal de desorción del tiol empleando para ello la carga electroquímica asociada a dicho proceso (Walczak, 1991).

Los voltagramas obtenidos en KOH 0,5 M permitieron observar cambios en los sucesivos barridos de potencial (0,2 V a -1,35 V) para un valor de potencial característico de -1 V aproximadamente, lo cual sugiere la desorción del tiol. Sin embargo no fue posible estimar un valor de cubrimiento superficial debido a la dificultad de integrar el pico.

Suponiendo una eficiencia de 100% en la introducción del Fc, sería esperable que la relación entre las señales de Fc y tiol fuera 1:1 puesto que cada molécula de compuesto adsorbida tiene un grupo tiol y un grupo Fc. Las respuestas obtenidas no permiten su estimación.

3.2.3 Quimisorción de secuencias oligonucleotídicas

Otra de las categorías de aptasensores descrita por Han et al (ver 1.4.1), se basa en el cambio estructural inducido por el analito (*target-induced structure switching*, TISS) para generar una señal cuantificable. Esta opción ha sido ampliamente explorada para moléculas pequeñas, usando detección electroquímica (Walter et al, 2012). El diseño que se propone para un aptasensor que reconozca AMP/adenosina basado en dicha estrategia se esquematiza a continuación (Figura 3.6):

Aptámero que reconoce AMP/ATP/adenosina:

5'-NH₂-C₆TACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGTTTTtStStSttT-3'

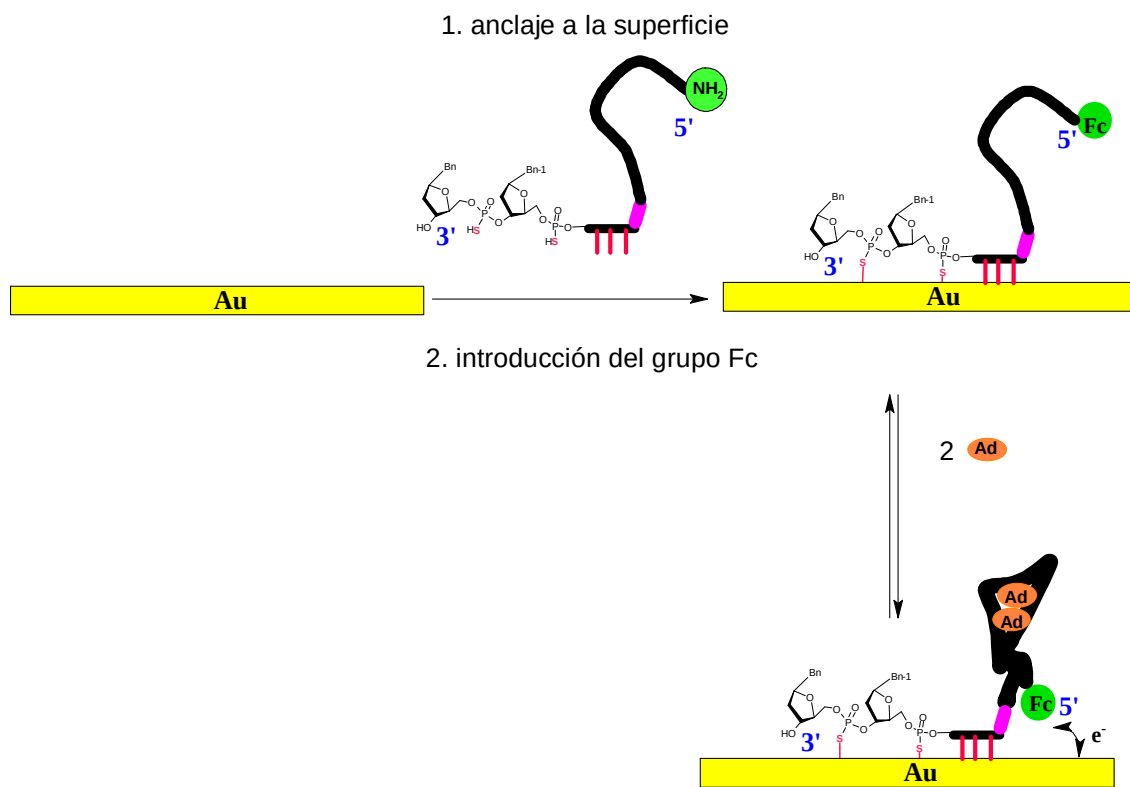


Figura 3.6 Diseño de un aptasensor basado en la estrategia del cambio estructural inducido por el analito (Ad: adenosina/AMP)

La secuencia de etapas para el desarrollo de un aptasensor electroquímico serían las siguientes: 1) inmovilización del aptámero a la superficie del electrodo, 2) reacción química para introducir el marcador electroactivo al extremo libre del aptámero, 3) detección de la señal electroquímica producto del reconocimiento aptámero-analito.

Una alternativa al esquema propuesto en la Figura 3.6 consiste en introducir el grupo Fc por modificación química y luego inmovilizar el aptámero a la superficie del electrodo. Se comenzó a trabajar en la puesta a punto de dicha modificación y la posterior purificación del aptámero por HPLC (ver Ponce, M. B., 2015, tesis DCyT-UNGS).

Es interesante señalar que el anclaje a superficies de Au de secuencias de ADN simple cadena modificadas en el extremo 5' con un grupo tiol, y la presencia de un grupo Fc como marcador electroactivo en el extremo 3' (etapas 1 y 2 de la construcción propuesta en la Figura 3.6), ha sido empleado como sistema modelo para estudiar el efecto de la

flexibilidad de la hebra de ADN en la modulación de la velocidad y eficiencia en la transferencia de carga (Anne et al, 2003).

A partir de este punto se dejó de lado el carbono vítreo como superficie y se continuó trabajando con electrodos de oro dado que a través de la quimisorción (formación de enlaces S-Au) empleando oligonucleótidos tiolados es posible lograr un mejor control en el armado de la capa de reconocimiento molecular.

Un primer aspecto a estudiar fue la modificación de la superficie metálica con secuencias oligonucleotídicas que contienen átomos de S para formar el enlace S-Au. De la bibliografía de SAM formadas por alcanotioles sobre superficies de Au, mencionada previamente, se sabe que cuanto mayor es la densidad electrónica sobre el átomo de S, más favorable resulta la interacción con los átomos del metal. En el caso de secuencias oligonucleotídicas, el anclaje más frecuentemente empleado es a través de un grupo tiol (S-H) (Love et al, 2005), el cual puede encontrarse directamente como tal o como disulfuro (-S-S-) en cuyo caso se introduce un paso previo de reducción (se emplea en general TCEP como agente reductor) (Anne et al, 2003; Baker et al, 2006), y puede ser necesario purificar la secuencia oligonucleotídica para separarla del fragmento de alcanotiol de cadena corta producto de la ruptura del disulfuro (ver 2.2.1.1).

Otra opción, menos discutida en la bibliografía relacionada con aptsensores, es la modificación con grupos fosforotioato terminales que consisten, por ejemplo, en timidinas (T) donde el átomo de O sp^2 del grupo fosfato ha sido reemplazado por un átomo de S (Ts) (Figura 3.7), siendo isoelectrónico con su análogo fosforodiéster de origen natural. Esta modificación se emplea en la síntesis en fase sólida de oligonucleótidos mencionada en 1.2.1, también puede consultarse, por ejemplo, el trabajo de Iyer y colaboradores (1990).

La cantidad de nucleótidos modificados terminales puede ser variable, permitiendo así tener diferentes puntos de anclaje a la superficie. Si bien el entorno químico del átomo de S hace que tenga menor densidad electrónica que un grupo tiol, esta variante presenta la ventaja de ser más resistente a la acción de nucleasas (Eckstein, 1991), tener menor costo que la modificación con un grupo tiol y no requerir un paso de reducción y/o

purificación. Además la cantidad de grupos fosfortioato terminales puede ser variable, teniendo así más puntos de anclaje a la superficie metálica.

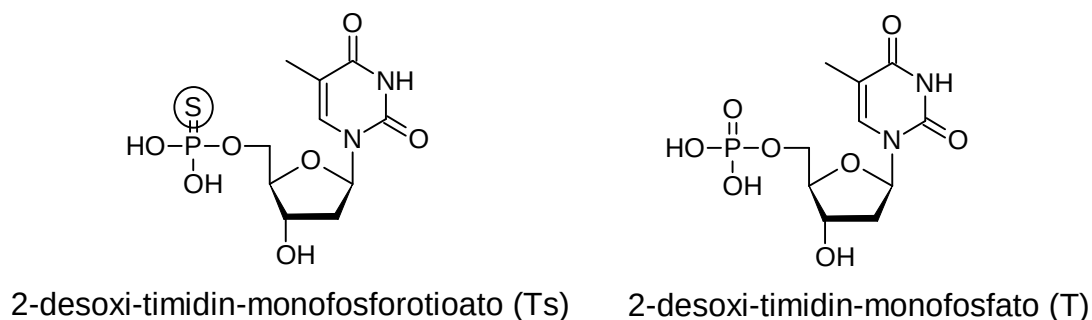


Figura 3.7 Estructura química de timidina fosfortioato (Ts) y timidina (T)

Se exploró la inmovilización del aptámero sobre Au usando la opción de anclaje con fosfortioato. Con fines comparativos se empleó el aptámero con un grupo disulfuro, el cual se redujo con TCEP previo a la adsorción a la superficie.

La modificación del electrodo de Au se evaluó por voltametría cíclica en solución de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,02 M en buffer Hepes 25 mM, pH 7,2. Se observó una disminución de la corriente y un comportamiento menos reversible de la cupla redox. Este resultado es consistente con presencia del aptámero, un polianión, sobre la superficie de Au, el cual dificulta la transferencia de carga del $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ también aniónico. Luego de modificar la superficie con el aptámero, se trató con MCH (6-mercaptop-1-hexanol), con el fin de minimizar las interacciones inespecíficas Au-N de las bases nitrogenadas del aptámero (Herne y Tarlov, 1997).

Comparando con la señal de Au no modificado, se observó una disminución en la corriente y la carga anódica y catódica luego del tratamiento con el aptámero (Figura 3.8 A). También se produjo un corrimiento del potencial de pico (E_p) hacia valores más negativos para el proceso de reducción, mientras que el E_p correspondiente a la oxidación experimentó un desplazamiento hacia valores más positivos (Figura 3.8A). Luego del tratamiento con MCH se observó una leve disminución de la corriente. En ambas situaciones, antes y después de dicho tratamiento, la señal debida a la oxidación del $[Fe(CN)_6]^{4-}$ experimentó un sobrepotencial y la cupla redox presentó un comportamiento menos reversible producto de las interacciones electrostáticas repulsivas con el ADN adsorbido (Ceretti et al, 2010).

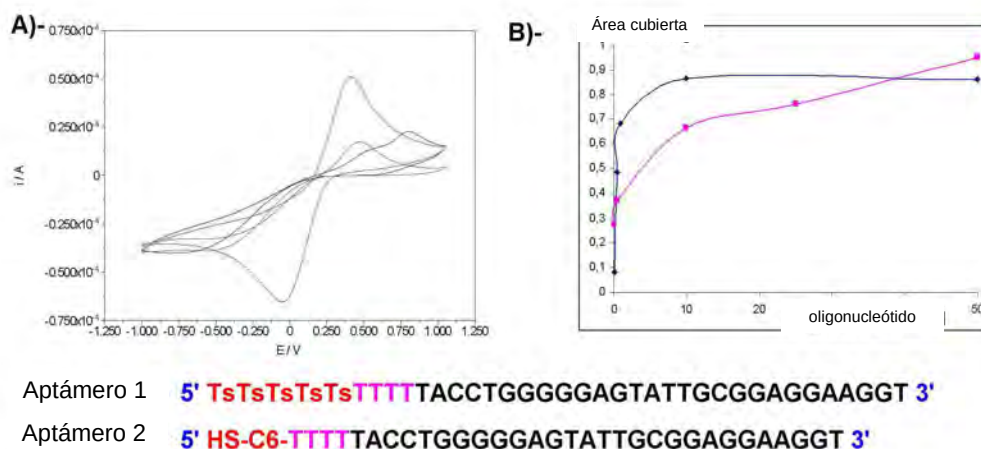


Figure 3.8 A): CV en $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,02 M en buffer Hepes 25 mM, pH 7: Au (rojo), Au/Aptámero 1 (azul), Au/Aptámero 1/ MCH (verde). B) Fracción del área cubierta por el aptámero 1 (magenta) y aptámero 2 (coadsorción) (azul)

Con el fin de obtener información del cubrimiento superficial por una técnica de superficies de naturaleza no electroquímica, se modificaron láminas de Au con el aptámero fosforotioato y MCH, para hacer mediciones empleando espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS, *X-ray photoelectron spectroscopy*). Las mismas fueron realizadas por el Dr. Federico Williams.

De acuerdo con la información publicada para el caso de ADN, las señales típicas de los elementos de interés, sobre superficies de Au corresponden a: P 2p, C 1s, N 1s, O 1s, S 2p y Au 4f. Los espectros de alta resolución descritos en bibliografía que permiten obtener información sobre el tipo de elemento y la cantidad de materia adsorbida, se miden generalmente con una energía de 20 eV, las señales se refieren a los picos de Au-4f medidos a 84 eV (Chi-Ying Lee et al., 2006). Se evaluó la señal correspondiente a los electrones 4f del Au, que dan un doblete característico. La intensidad de dicha señal es inversamente proporcional a la cantidad de material depositado sobre la superficie. Se obtuvo buena correlación entre las medidas realizadas por XPS y voltametría cíclica en solución de $K_4[Fe(CN)_6]$ 0,02 M, tal como se muestra en la Figura 3.9.

No fue posible realizar una asignación de las señales obtenidas, debido a limitaciones en la resolución del equipo empleado.

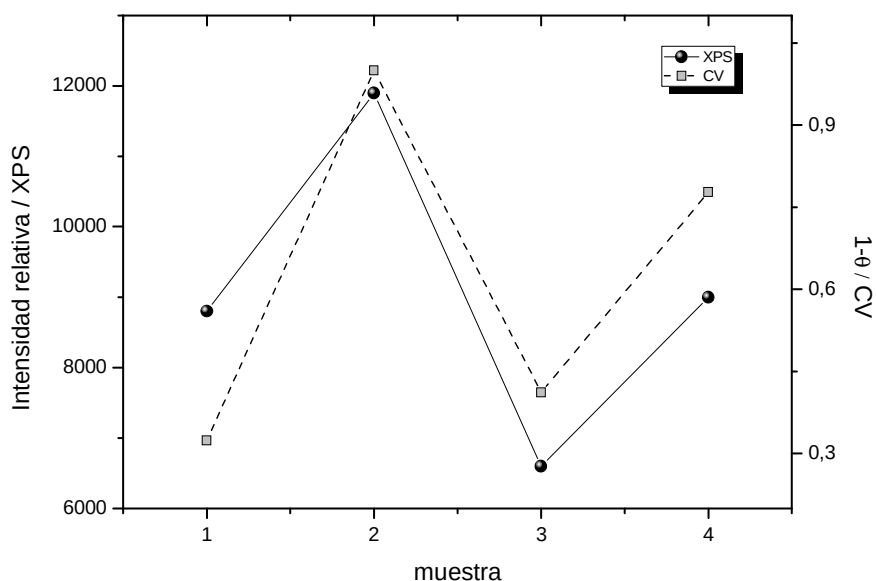


Figura 3.9 Comparación del área libre en láminas de Au macizo, intensidad relativa $e^- 4f$ del Au (XPS) (izq.); voltametría cíclica en $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,02 M (der.): 1. Au/MCH 1,5 mM; 2. Au limpio; 3. Au/ Oligo 5Ts 50 μ M; 4. Au/ Oligo 5Ts 50 μ M/ MCH 1,5 mM

3.2.4 Desorción reductiva de secuencias oligonucleotídicas tioladas

De manera análoga a lo realizado con el compuesto 3MPAFc (ver 3.2.2) se exploró la señal debida a la reducción desortiva de oligonucleótidos sobre láminas de Au macizo. Se emplearon las siguientes secuencias:

TTTTTTT (poliT sin tiol)

TsTTTTTT (Ts-poliT)

$CH_3-(CH_2)_2-S-S-(CH_2)_3$ -TTTTTTT (HS-poliT)

El uso de dichas secuencias formadas por pocos nucleótidos del mismo tipo (7 timidinas este caso), responde al interés de minimizar la adsorción inespecífica de los átomos de N de las bases nucleotídicas a la superficie de Au. Un dato a tener en cuenta es que a diferencia de los alcanotioles, los oligonucleótidos no son estables en medio alcalino, por lo tanto el ensayo puede no ser rigurosamente extrapolable debido a posibles reacciones secundarias.

La Figura 3.10 muestra las voltametrías cíclicas medidas en NaOH 0,5 M. El oligonucleótido sin átomos de S (poliT sin tiol) se usó como ejemplo de adsorción inespecífica, se detectó una señal tenue a -0,89 V que podría atribuirse a interacciones N-Au. Para el caso de la coadsorción de la secuencia con el grupo tiol (HS-poliT) y el alcanotiol de cadena corta producto de la reducción con TCEP se observaron dos señales a potenciales -1,14 V y -0,93 V (Figura 3.10 a)). De acuerdo con datos bibliográficos, la señal a potencial -1,14V podría atribuirse a la desorción del MCH (Pensa et al, 2010), mientras que la señal a potencial -0,93 V podría ser la correspondiente al HS-poliT que en situación de coadsorción se adsorbe menos que el alcanotiol. La secuencia con el grupo fosforotioato (Ts-poliT) (Figura 3.10 b)) presenta una señal a -1,08 V.

La intensidad de las señales obtenidas por voltametría cíclica no es suficiente para hacer una cuantificación, debido a que se usó una concentración 5,5 μ M de las secuencias de poliT para modificar la superficie del electrodo de Au. La concentración empleada en este ensayo respondió al interés por correlacionar los datos medidos por CV con los obtenidos por cronocoulombimetría y γ - 32 P-ATP empleando la enzima T4 polinucleótido quinasa la cual cataliza la transferencia de un grupo fosfato marcado con 32 P al extremo 5' de la secuencia de ADN. También se evaluó el reconocimiento molecular aptámero-analito empleando γ - 32 P-ATP (Ceretti et al, 2010; Ponce, M. B. 2015, tesis DCyT-UNGS).

Los experimentos realizados sugieren que en las condiciones ensayadas se modificó la superficie de Au con el oligonucleótido empleando ambos tipos de anclaje, tiol y fosforotioato.

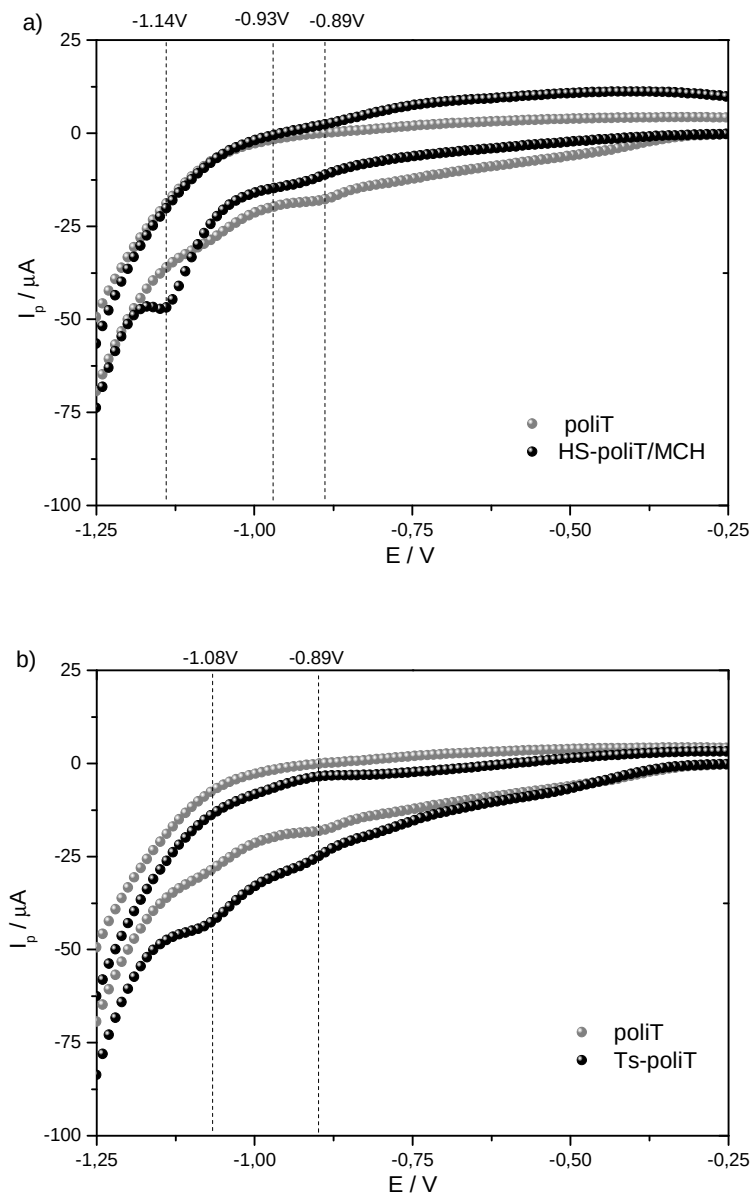


Figura 3.10 CV en NaOH 0,5 M de láminas de Au macizo modificadas con secuencias poliT (5,5 μM): medidas por, vel. de barrido 0,1 Vs⁻¹: a) poliT sin tiol (○), Ts-poliT (●); b) poliT sin tiol (○), HS-poliT/tiol corto (●)

3.3 Electroodos de oro descartables

3.3.1 Electrodeposición de oro sobre pistas de grafito serigrafiadas de 0,385 cm²

Las láminas de oro macizo y los electrodos comerciales empleados en los experimentos precedentes, pusieron de manifiesto un aspecto ampliamente discutido en la bibliografía relacionado con la limpieza de la superficie. La diversidad de protocolos descriptos sugiere que este aspecto no resulta trivial, más aún cuando se trata de reutilizar una superficie como sucede en este caso (ver por ejemplo, Carvalhal et al, 2005, Angnes et al, 2000).

Además, pensando en futuras aplicaciones en el campo de los biosensores, resulta de interés disponer de superficies descartables, de bajo costo, que puedan obtenerse en gran cantidad y de manera sencilla, con buena reproducibilidad y en un lapso de tiempo corto de ser posible, tal como se mencionó en 3.1.

Con este objetivo, en una primera etapa, se emplearon pistas de carbono grafito de 0,385 cm² de área geométrica sobre las cuales se llevó a cabo la electrodeposición galvanostática de Au a partir de una solución de K[Au(CN)₂] (ver 2.2.3.3) (Priano et al, 2008).

Las características del depósito metálico fueron evaluadas por voltametría cíclica en medio ácido (HClO₄ 0,2 M). A partir de la señal correspondiente a la reducción del óxido de Au ($E_p \sim 0,845$ V) se estimó un valor de densidad de carga de (2363 ± 334) $\mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 8$) y un factor de rugosidad de 5,25 calculado a partir del cociente entre el área electroquímica y el área geométrica. La Figura 3.11 (izq.) muestra un voltagrama típico para una superficie limpia de Au policristalino. Se obtuvo buena reproducibilidad entre los ocho electrodos que integran una placa sobre la cual se realiza la electrodeposición conjuntamente. Con fines comparativos se muestra también el voltagrama correspondiente a una lámina de Au macizo de área geométrica 0,16 cm², cuya densidad de carga resultó (515 ± 292) $\mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 16$) y el factor de rugosidad: 1,14.

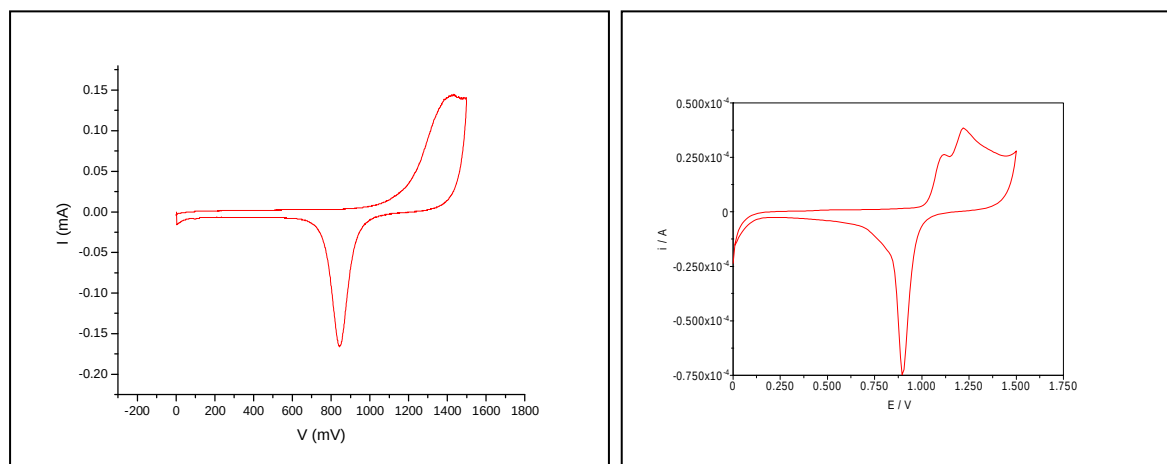


Figura 3.11 CV en HClO_4 0,2 M del electrodo de Au obtenido por electrodeposición galvanostática (izq.) y láminas de Au macizo (der.); $0 \text{ V} \rightarrow 1,5 \text{ V}$; v : $0,05 \text{ Vs}^{-1}$, electrodo de ref. Ag/AgCl (KCl 3M)

Para evaluar la señal del marcador redox (Fc), los electrodos se modificaron con cistamina 20 mM, una concentración suficientemente alta para asegurar la detección por voltametría cíclica. A continuación se introdujo el grupo ferroceno mediante reacción *in situ* empleando carboxiferrocenaldehído para formar la base de Schiff o imina, en presencia de NaH_3BCN como reductor (Jentoff y Dearborn, 1979) (Priano, G., tesis doctoral, 2006, FCEyN-UBA) (Figura 3.12)

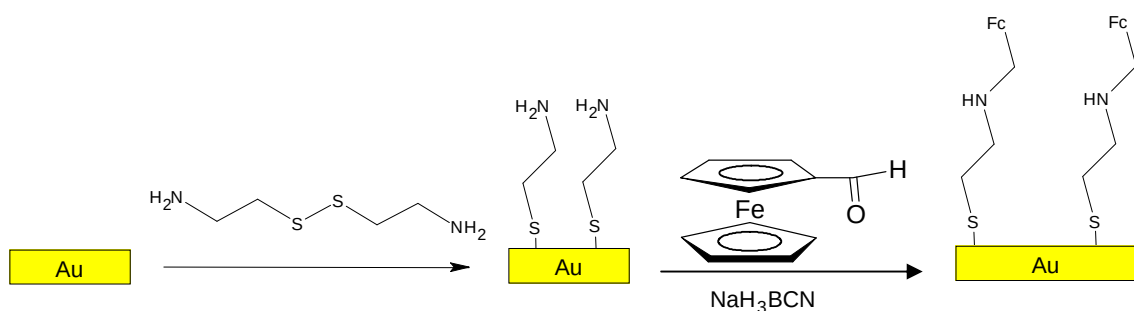


Figura 3.12 Esquema de modificación de superficies de Au descartables con cistamina y carboxiferrocenaldehído

Se evaluó la respuesta electroquímica correspondiente a la señal del grupo ferroceno empleando voltametría cíclica en buffer Tris. A continuación se exploró la desorción reductiva del grupo tiol en medio alcalino (KOH 0,5 M) con el objeto de estimar el

cubrimiento superficial. Con fines comparativos, la misma secuencia de modificación y medición se aplicó a las láminas de Au macizo que se venían empleando en este trabajo.

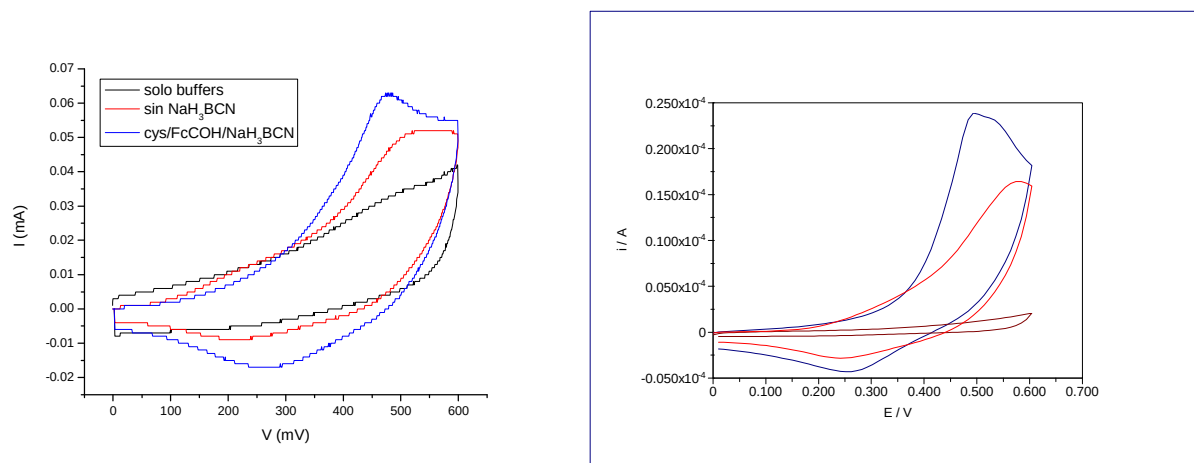


Figura 3.13 CV de electrodos modificados con cistamina y carboxiferroceno: buffer Tris 50 mM, pH 7,4, KNO₃ 0,2 M, por CV (0 V → 0,6 V), v : 0,05 Vs⁻¹, (Ag/AgCl, KCl 3 M), electrodos descartables (izq.); láminas de Au macizo (der.)

Tal como se observa en la Figura 3.13, a partir de la señal a potencial 0,300 V correspondiente a la transferencia de carga del grupo Fc, se estimó la densidad superficial obteniéndose un valor de $(8,8 \pm 2,0) \cdot 10^{14}$ moléc.cm⁻² ($n = 5$) para los electrodos descartables. Para los electrodos de Au macizo el valor obtenido fue algo menor $(3,7 \pm 2,7) \cdot 10^{14}$ moléc.cm⁻² ($n = 6$) ($E_p = 0,232$ V – 0,282 V).

La densidad superficial estimada a partir de la señal de desorción en KOH 0,2 M, resultó en el rango de $(0,3 - 4,4) \cdot 10^{15}$ moléc.cm⁻² (valor promedio: $1,6 \cdot 10^{15}$, $n = 5$) para los electrodos descartables (Figura 3.14, izq). En el caso de las láminas de Au macizo se obtuvieron señales menos definidas que dificultaron la cuantificación (Figura 3.14, der.).

La relación de señales tiol:Fc obtenida para los electrodos descartables estuvo en el rango 0,3 – 6.

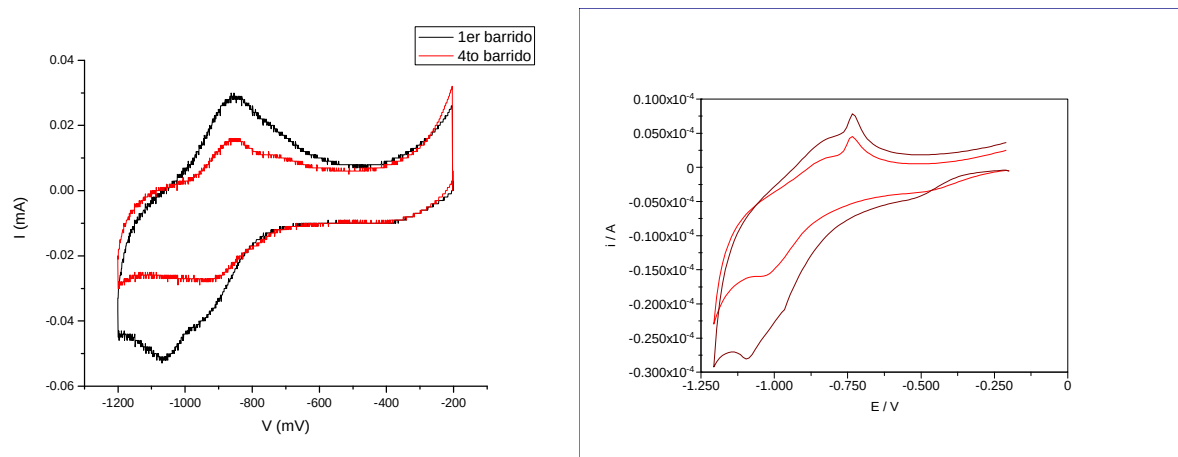


Figura 3. 14 Señal de desorción de tiol, CV en KOH 0,2 M, ventana de potencial: -0,2 V a -1,35 V, v : $0,05 \text{ Vs}^{-1}$, electrodo de referencia Ag/AgCl (KCl 3M): electrodos descartables (izq.), láminas de Au macizo (der.)

Con fines comparativos se modificaron los electrodos descartables, con el compuesto sintetizado en fase homogénea 3MPAFc en concentración 20 mM y se midieron las señales de Fc y desorción por voltametría cíclica en las mismas condiciones que en el caso anterior (Figura 3.15). El interés en este ensayo radica en la posibilidad de modificar en un único paso la superficie con un compuesto que ya tiene incorporado el marcador electroactivo, minimizando la manipulación de la superficie.

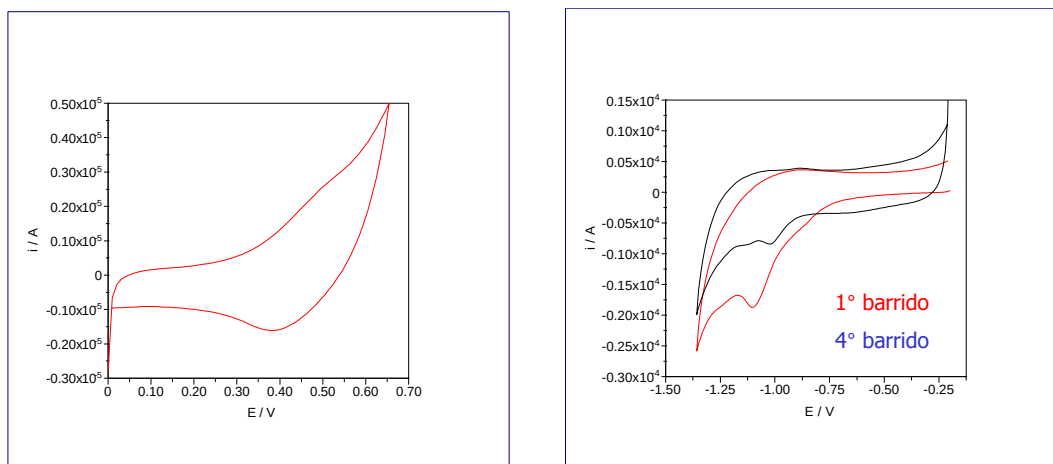


Figura 3.15 CV de electrodos descartables: señal de ferroceno, buffer Tris 50 mM, pH 7,4, KNO_3 0,2 M, (0 V $\rightarrow$ 0,6 V), v : $0,05 \text{ Vs}^{-1}$, (izq); señal de desorción de tiol, KOH 0,2 M, (-0,2 V $\rightarrow$ -1,35 V), v : $0,05 \text{ Vs}^{-1}$ (der.). Electrodo de referencia Ag/AgCl (KCl 3M)

A modo de resumen, la Tabla 3.1 condensa la información de los experimentos de desorción de tiol y señal de ferroceno obtenida para los electrodos descartables y las láminas de Au macizo:

	Fc (moléc.cm ⁻²)		Tiol (moléc.cm ⁻²)	
	Cys/Fc	3MPAFc	Cys/Fc	3MPAFc
Electrodos descartable	(8,8±2,0).10 ¹⁴ (n=5)	(1,7±1,2).10 ¹³ (n=4)	(3,0 – 44). 10 ¹⁴ (prom.: 1,6 10 ¹⁵ (n=5)	(2,1±0,3).10 ¹⁴ (n=4)
Láminas de Au macizo	(3,7± 2,7).10 ¹⁴ (n=6)	(1,2±0,8).10 ¹⁴ (n=6)	-	-

Tabla 3.1 Comparación de las señales de Fc y desorción de tiol para electrodos descartables y láminas de Au macizas.

Ambas estrategias de modificación de las superficies de Au (cys/Fc y 3MPAFc) resultaron efectivas para detectar por voltametría cíclica la señal de Fc y la desorción de tiol a valores de potenciales típicos, $E_p = 0,300 \text{ V} - 0,400 \text{ V}$ aproximadamente para Fc adsorbido y $E_p = -0,875 \text{ V}$ a $-1,112 \text{ V}$ para tiol. Los cubrimientos superficiales obtenidos resultaron comparables para ambas superficies, sin embargo las láminas de Au macizo mostraron una mayor dispersión hecho que puede afectar la reproducibilidad del autoensamblado.

3.3.2 Respuesta electroquímica de pistas de grafito serigrafiadas de área pequeña (0,071cm²)

Debido al costo de las secuencias oligonucleótidas, resulta útil disponer de electrodos de Au de menor área geométrica que requieran cantidades menores de ADN para ser modificados. A partir de la experiencia adquirida con las superficies obtenidas por electrodeposición galvanostática, se adaptó la técnica para aplicarla sobre pistas de C grafito obtenidas también por serigrafía, de área geométrica menor que las anteriores,

0,071 cm² (ver 2.2.2.3) (Figura 3.16). Las placas serigrafiadas fueron diseñadas por el Dr. Fernando Battaglini. Una ventaja adicional de este diseño es que permite obtener conjuntamente 12 electrodos en lugar de 8 como en el caso anterior.

La Figura 3.16 muestra un voltagrama obtenido en HClO₄ 0,2 M para estos electrodos. A partir de la señal de reducción del óxido de oro se estimó la densidad de carga resultando un valor de $(1177 \pm 321) \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 10$) y un factor de rugosidad de 2,6.

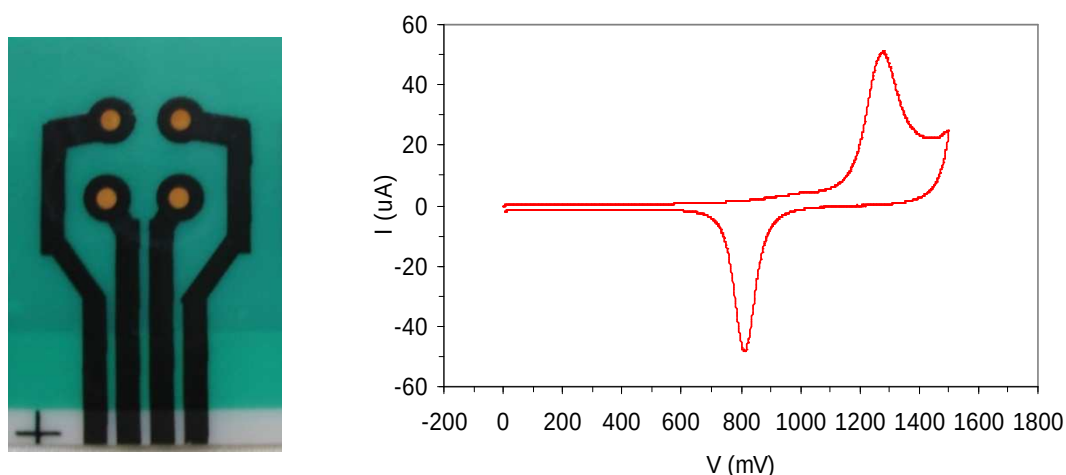


Figura 3.16 Electrodos de área geométrica 0,071 cm²: imagen de cuatro electrodos independientes (izq.); voltametría cíclica en HClO₄ 0,2 M, 0 V a 1,5 V, v : 0,05 V/s (electrodo de ref. Ag/AgCl (KCl 3M) (der.)

También se modificaron los electrodos con el compuesto 3MPAFc en concentración 50 μM y se detectó la señal correspondiente al grupo Fc por voltamperometría de pulso diferencial (DPV) técnica más sensible que la voltametría cíclica (Figura 3.17).

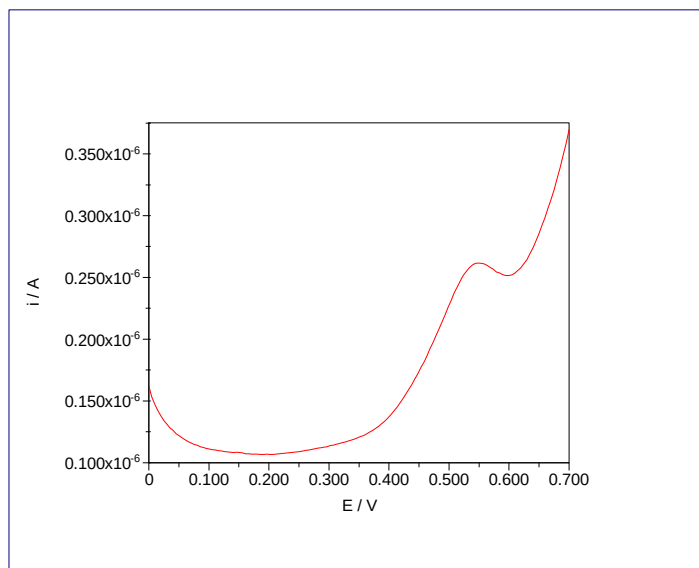


Figura 3.17 Respuesta por DPV de un electrodo de Au descartable modificado con 3MPAFc 50 μM medida en buffer Tris 50 mM pH 7,4 / NaNO_3 0,2 M; 0 V a 0,65 V, v : 0,05 Vs^{-1} , electrodo de referencia Ag/AgCl (KCl 3 M)

El paso siguiente consistió en evaluar el cubrimiento superficial de los electrodos con el aptámero que reconoce ATP/AMP/adenosina usando cronocoulombimetría en solución de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 50 μM (Steel et al, 1998). Los datos se presentan en la Tabla 3.2, junto con los valores obtenidos para las láminas de Au macizo y los electrodos de Au comerciales. Se exploró también el anclaje vía tiol, previa reducción con TCEP en condiciones de coadsorción, y a través de la interacción con cinco grupos fosforotiatos (5Ts) terminales (ver 3.2.3). Para evaluar las interacciones inespecíficas de los átomos de N de los oligonucleótidos con la superficie, se realizó el ensayo en las mismas condiciones empleando el aptámero sin átomos de S. En todos los casos se empleó una concentración de aptámero igual a 5,5 μM , puesto que no se observaron cubrimientos significativamente mayores al aumentar la concentración de ADN (ver Ponce, M. B. tesis DCyT-UNGS, 2015).

Los electrodos descartables presentaron valores de cubrimiento superficial comparables a los obtenidos con las restantes superficies de Au empleadas. La reproducibilidad lograda en los ensayos de inmovilización también resultó aceptable para futuras aplicaciones.

	Aptámero SH (moléc. cm ⁻²)	Aptámero 5Ts (moléc. cm ⁻²)	Aptámero sin S (moléc. cm ⁻²)
Electrodos descartables (área 0,071 cm ²)	(1,2±0,6).10 ¹³	(3,1±0,8).10 ¹²	(2,6±1,9).10 ¹²
Láminas de Au macizo	(1,3±0,5).10 ¹³	(1,9±0,1).10 ¹³	(5,0±3,2).10 ¹²
Electrodos comerciales (Ponce, 2015)	(3,88±0,02).10 ¹³	(3,4±1,6).10 ¹²	(7 ± 3).10 ¹¹
γ- ³² P-ATP (Ponce, 2015)		(2,0±0,2).10 ¹²	

Tabla.3.2 Evaluación del cubrimiento superficial sobre distintos tipos de electrodos de Au del aptámero (5,5 μM) medido por cronocoulombimetría.

3.4 Conclusiones

De la variedad de ensayos presentados en este capítulo pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- El empleo de una molécula sintética bifuncional (3-MPAFc) de bajo costo fue un primer paso efectivo para explorar la metodología de modificación de superficies de Au con tioles y a su vez avanzar sobre las técnicas de detección del marcador electroactivo (grupo ferroceno).
- Con respecto a la superficie de oro, se trabajó con láminas de Au macizo y electrodos comerciales, ambos tipos de superficies son reutilizables. Como alternativa para obtener electrodos de oro descartables se recurrió a la electrodeposición galvanostática del metal sobre pistas de carbono grafito obtenidas por serigrafía. El procedimiento de obtención de dichos electrodos es sencillo y reproducible, el costo de los mismos tampoco resulta excesivo. La ventaja de trabajar con electrodos descartables radica en independizarse de los procedimientos de limpieza de las superficies de Au que en general demandan tiempo y en ocasiones no se logra regenerar los perfiles típicos electroquímicos esperados para una superficie de Au limpia. Estos electrodos resultaron adecuados para las etapas siguientes del trabajo de investigación como se describe en el capítulo 4.

- El cubrimiento superficial para ambos tipos de superficies de Au, electrodos reutilizables y electrodos descartables, resulta comparable ya sea que se emplee la coadsorción de una mezcla equimolar de aptámero y tiol corto producto de la reducción en fase homogénea del grupo disulfuro, o la variante de anclaje a través del grupo fosforotioato.
- La quimisorción a través del grupo fosforotioato también pudo ser explorada lográndose cubrimientos superficiales comparables a los obtenidos con la modificación con tiol.

***Capítulo 4. Aplicación de
espectroscopia de impedancia
electroquímica al estudio de
superficies de oro modificadas con
aptámeros***

4.1. Introducción

La técnica conocida como espectroscopia de impedancia electroquímica ha sido ampliamente aplicada en biosensores de base electroquímica (Kats y Willner, 2003; Daniels y Pourmand, 2007). Al diseñar un biosensor “*label free*” basado en la detección por impedancia, un aspecto clave es preguntarse acerca del efecto responsable del cambio en la respuesta a medir, por ejemplo: desplazamiento de agua, cambio en las propiedades dieléctricas, aumento de la resistencia a la transferencia de carga debido a repulsiones electrostáticas, etc. Dichos cambios son más pronunciados cuando el analito es voluminoso, como sucede en el caso de la trombina y de la lisozima, por ejemplo (Willner y Zayats, 2007; Du et al, 2008). Sin embargo, para moléculas orgánicas pequeñas como por ejemplo, el insecticida sistémico acetamiprida (Fan et al, 2013), o el nucleósido adenosina (Wang et al, 2014), la detección impedimétrica también ha sido reportada.

La impedancia es particularmente sensible al estado de la superficie, de ahí su aplicación para caracterizar electrodos modificados con especies adsorbidas. Una ventaja adicional que presenta la técnica desde una perspectiva analítica, es que puede aplicarse a la detección de especies químicas que no sean electroactivas (ver por ejemplo, Rodríguez et al, 2005).

El objetivo de este capítulo es estudiar el armado de la capa de reconocimiento y la detección de la señal asociada a la interacción aptámero-analito empleando espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS).

4.2 Respuesta de electrodos descartables por CV y EIS

El acceso a equipamiento electroquímico para hacer mediciones de impedancia en el laboratorio del Dr. Fernando Battaglini, abrió la posibilidad de explorar esta técnica para estudiar de manera sistemática la modificación de superficies de Au con aptámeros. Una ventaja de la misma radica en la posibilidad de cambiar la estrategia de desarrollo de señal evitando la introducción de un marcador electroactivo en la secuencia aptamérica como se había propuesto inicialmente (ver Figura 3.7). Es decir,

es posible explorar un diseño de aptasensor donde el marcador electroactivo se encuentre en solución (“label free impedance aptasensor”) (Daniels y Pourmand, 2007).

4.2.1 Evaluación de las superficies de Au obtenidas por electrodeposición galvanostática

Debido a que los electrodos obtenidos por electrodeposición galvanostática de Au sobre pistas de carbono de $0,071 \text{ cm}^2$ de área geométrica resultaron efectivos frente a la modificación con aptámeros (ver 3.3.2), el desarrollo experimental continuó empleando dichas superficies como electrodos de trabajo para las mediciones electroquímicas. La evaluación electroquímica de los electrodos se inició haciendo una voltametría cíclica. A modo de ejemplo, la Figura 4.1 muestra la curva corriente-potencial (i vs. E) obtenida para uno de dichos electrodos en solución de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,025 M como sonda redox, ($E_{pa} = 0,341 \text{ V}$, $E_{pc} = 0,178 \text{ V}$, $\Delta E_p = 0,133 \text{ V}$). También se muestra el ajuste de los datos experimentales que se obtuvo con el programa GPES para la cupla redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$ asumiendo un comportamiento cuasi reversible ($E^\circ = 0,244 \text{ V}$, $\chi^2 = 83,7$). Todos los valores de potencial informados en este trabajo se refieren al electrodo de Ag/AgCl (KCl 3M).

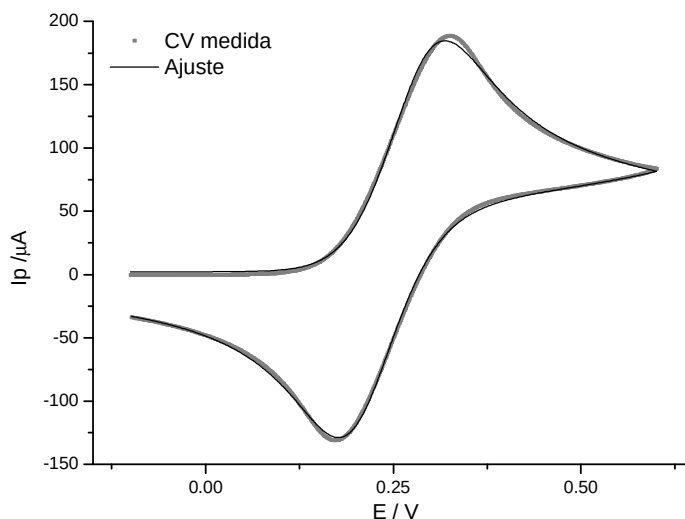


Figura 4.1 Voltametría cíclica de un electrodo de Au obtenido por electrodeposición galvanostática: $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,025 M / Hepes 0,1 M / KNO_3 0,2 M, pH 7,2 (-0,1 V $\rightarrow$ 0,6 V),
v: $0,05 \text{ Vs}^{-1}$

Comparando los voltagramas de los doce electrodos de una misma placa medidos en las mismas condiciones, se obtuvo un valor promedio de $E^o = (0,249 \pm 0,001)$ V, siendo la diferencia entre el potencial de pico anódico (E_{pa}^o) y catódico (E_{pc}^o), $\Delta E_p = (0,149 \pm 0,009)$ V. A partir de estos valores se infiere que el comportamiento redox de la cupla $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$ es reproducible porque la respuesta no muestra un cambio significativo entre los electrodos.

A continuación se midió, en las mismas condiciones experimentales, el espectro de impedancia electroquímica para un rango de frecuencias de 0,1 Hz - 10 kHz. La Figura 4.2 muestra, a modo de ejemplo, dicho espectro en la representación conocida como gráfico Nyquist (Z_i vs. Z_r), el valor de frecuencia indicado en el gráfico corresponde al máximo del semicírculo (Z_i). El pequeño dominio semicircular medido en la primera porción del espectro para altas frecuencias, es indicador de un rápido proceso de transferencia de carga, limitado por la difusión de la especie electroactiva hacia la superficie del electrodo (porción lineal) (ver 2.1.1.6). La línea en el gráfico corresponde al ajuste obtenido con el programa FRA empleando el circuito equivalente que se muestra en el inserto. Los términos R_s y CPE fueron definidos en 2.1.1.6.

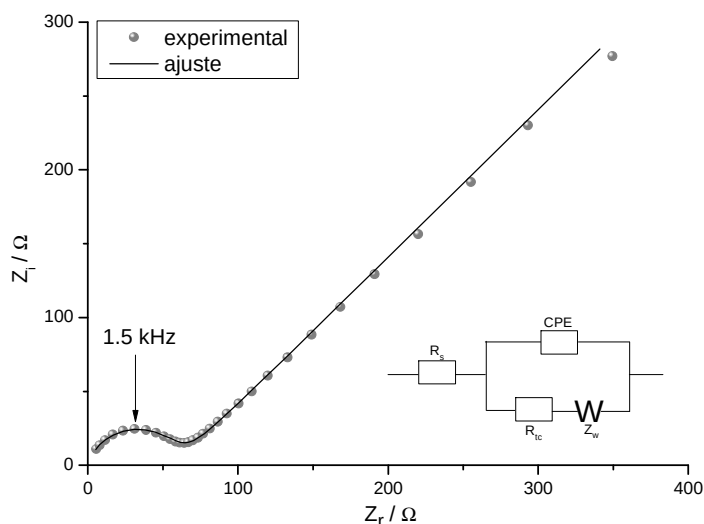


Figura 4.2 EIS de un electrodo de Au descartable medido en $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,025 M / Hepes 0,1M / KNO_3 0,2M, pH 7,2 ($E^o = 0,250$ V, frecuencias: 0,1 Hz - 10 kHz, amplitud de voltaje 10 mV). Inserto: circuito Randles modificado

La Tabla 4.1 muestra los valores promedio y la desviación estándar para el conjunto de 12 electrodos de una misma placa. Se indican los parámetros obtenidos para el ajuste con el circuito equivalente de Randles modificado (R_s , R_{tc} , Z_w , Y_o y n) que se muestra en el inserto de la Figura 4.2, y los obtenidos a partir de la curva de impedancia (Z_r , Z_i y la frecuencia correspondiente al máximo del semicírculo). Los parámetros Y_o y n corresponden en el circuito equivalente al elemento constante de fase (CPE). Con respecto al valor de n , si $0,5 < n < 1$, la superficie se considera rugosa, típicamente para superficies metálicas el valor de n se encuentra en 0,8 y 1 (ver 2.1.1.6). El parámetro Y_o es la inversa de la impedancia y se denomina admitancia.

		Electrodos de Au no modificados (n=12)
Ajuste con el circuito equivalente (programa FRA)	$R_s (\Omega)$	$170,4 \pm 22,1$
	$R_{tc} (\Omega)$	$109,9 \pm 45,0$
	Z_w	$(3,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$
	Y_o	$(6,7 \pm 5,6) \cdot 10^{-6}$
	n (rugosidad)	$0,78 \pm 0,12$
Obtenidos del gráfico Z_i vs Z_r	Frecuencia (kHz)	$1,38 \pm 0,36$
	$Z_r (\Omega)$	$54,0 \pm 18,3$
	$Z_{im} (\Omega)$	$41,8 \pm 19,2$

Tabla 4.1 Electrodos de Au no modificados. Parámetros obtenidos por ajuste (programa FRA), circuito equivalente: R_s resistencia de la solución, R_{tc} resistencia a la transferencia de carga, n rugosidad, Z_w impedancia de Warburg, Y_o admitancia; y a partir del gráfico Nyquist

Los valores presentados en la Tabla 4.1 pueden diferir de una placa a otra, por ejemplo para la resistencia a la transferencia de carga, R_{tc} , el rango de valores que se han obtenido va de 100Ω a 500Ω aproximadamente. Por tal motivo, cada medición realizada fue comparada siempre con la medida correspondiente al mismo electrodo no modificado (Au limpio). La diferencia entre la resistencia a la transferencia de carga medida para el electrodo modificado y sin modificar ΔR_{tc} resultó un parámetro útil para evaluar cambios en la superficie.

4.2.2 Modificación de los electrodos con secuencias oligonucleotídicas

4.2.2.1 Coadsorción de una mezcla equimolar aptámero/tiol corto

Por su sensibilidad y el hecho de ser una técnica no destructiva, la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) es ampliamente empleada para caracterizar electrodos funcionalizados. La inmovilización de biomateriales sobre un electrodo altera la capacidad y la resistencia a la transferencia de carga R_{tc} , por lo tanto, EIS resulta una herramienta eficaz para el estudio de las propiedades interfaciales en electrodos modificados (Katz y Willner, 2003; Ding et al, 2005; Long et al, 2004; Priano et al, 2008).

Se procedió entonces a inmovilizar el aptámero que reconoce adenosina/AMP/ADP/ATP sobre la superficie de los electrodos previamente descritos. Se comenzó empleando la modificación que contiene el grupo disulfuro en un extremo, previa reducción con TCEP (ver 2.2.1.1). Puesto que no se purificó el producto de reacción, se trabajó en condiciones de coadsorción de la mezcla equimolar (5,5 μ M) del aptámero tiolado (apt-SH) y el alcanotiol de cadena corta producto de la ruptura del puente disulfuro ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{SH}$, mercaptohexano). Se cubrió la superficie del electrodo con la mezcla aptámero/tiol corto y se dejó durante una noche a temperatura ambiente, finalmente se retiró la solución remanente y se enjuagó con buffer Hepes 0,1 M / KNO_3 0,2 M, pH 7,2 para remover las moléculas no adsorbidas (ver 2.2.4.3). Este protocolo de modificación evita que el depósito se deshidrate sobre la superficie del electrodo.

Una primera evidencia de la presencia de material quimisorbido, se obtuvo al comparar las voltametrías cíclicas medidas en solución de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ del electrodo de Au limpio y luego de la modificación (ver Figura 4.3). El material depositado dificulta la transferencia de carga debido al bloqueo parcial de la superficie metálica, además, por ser un polianión al pH de trabajo, la cadena oligonucleotídica ejerce repulsión electrostática sobre la sonda redox también aniónica (ver Capítulo 3.2.3).

Con el fin de evaluar la reproducibilidad de la modificación con el aptámero y el alcanotiol corto, se repitió el experimento en las mismas condiciones anteriores con los once electrodos restantes de una misma placa, obteniéndose un valor de $E_{prom}^o = (0,270 \pm 0,007)$ V y $\Delta E_p = (0,452 \pm 0,071)$ V ($n = 12$).

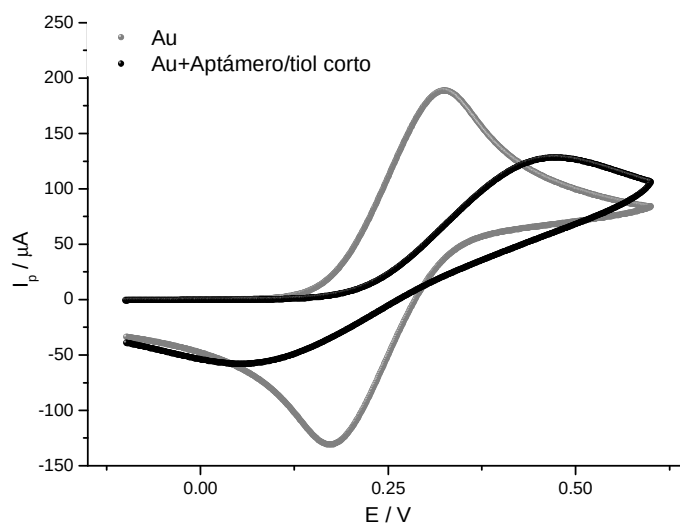


Figura 4.3 CV de un electrodo de Au antes y después de la modificación con la mezcla aptámero/tiol corto (5,5 μM): solución de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,025 M / Hepes 0,1 M / KNO_3 0,2 M, pH 7, 2 (-0,1 V $\rightarrow$ 0,6 V), v : 0,05 Vs^{-1}

La Figura 4.4 muestra el cambio drástico que tuvo lugar cuando se midió el espectro de impedancia electroquímica en un electrodo de Au modificado con la mezcla equimolar aptámero/tiol corto. El segmento correspondiente al semicírculo en el gráfico Nyquist se incrementó notablemente respecto de la porción lineal correspondiente al proceso difusional de la especie redox. Este aumento en la resistencia a la transferencia de carga R_{tc} , evidencia la presencia del oligonucleótido quimisorbido. El valor de la frecuencia correspondiente a Z_i máximo se desplazó hacia frecuencia menores indicando un predominio del efecto capacitivo respecto del control difusional.

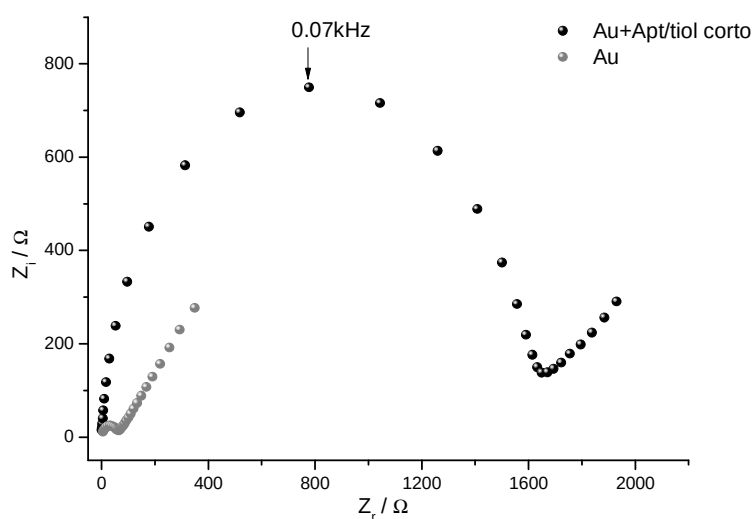


Figura 4.4 EIS de un electrodo de Au antes (●) y después de la modificación con aptámero/thiol corto (5,5 μM) (●); K₃[Fe(CN)₆] 0,025 M/ Hepes 0,1 M /KNO₃ 0,2 M, pH 7,2, (E° = 0,250 V, frecuencias: 0,1 Hz-10 kHz, amplitud de voltaje 10 mV)

La Tabla 4.2 muestra los valores promedio y la desviación estándar para el conjunto de doce electrodos modificados con la mezcla equimolar aptámero/thiol corto (5,5 μM).

		Electrodos modificados con aptámero/thiol corto (5,5 μM) (n=12)
Ajuste con el circuito equivalente (programa FRA)	R_s (Ω)	$184,2 \pm 21,7$
	R_{tc} (Ω)	$1620,8 \pm 544,4$
	Z_w	$(2,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$
	Y_o	$(2,1 \pm 0,6) \cdot 10^{-6}$
	n (rugosidad)	$0,95 \pm 0,02$
Obtenidos del gráfico Z_i vs Z_r	Frecuencia (kHz)	$0,08 \pm 0,04$
	Z_r (Ω)	$794,8 \pm 293,1$
	Z_i (Ω)	$771,4 \pm 293,6$

Tabla 4.2 Electrodos de Au modificados con aptámero/thiol corto (5,5 μM). Parámetros obtenidos por ajuste (programa FRA) y a partir del gráfico Nyquist

Con respecto a la reproducibilidad que se obtuvo al modificar los electrodos, se observó una dispersión del orden del 34% en el valor de R_{tc} , 37% para Z_r y 38% para Z_i comparando los 12 electrodos de una misma placa. Sin embargo, desde el punto de vista operativo, por las condiciones geométricas de la celda de medida y la disposición del diseño de los electrodos (ver Figura 3.16), los experimentos se realizaron en grupos de cuatro electrodos, donde la dispersión de los parámetros mencionados resultó inferior al 15%.

Cuando se compararon los valores de los electrodos con y sin modificación (Tablas 4.1 y 4.2 respectivamente), la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}) fue el parámetro que presentó mayor variación:

$$\Delta R_{tc} = R_{tc} \text{ Au/apt} - R_{tc} \text{ Au}$$

Por lo tanto se empleó este valor como criterio para evaluar la modificación de la superficie. Se observó un incremento de aproximadamente un orden de magnitud ($\Delta R_{tc} \sim 0,9 \text{ k}\Omega$) como consecuencia de la presencia del aptámero y el tiol de cadena corta quimisorbidos. La frecuencia correspondiente al máximo de la componente Z_i en la sección semicircular del espectro de impedancia, se desplazó hacia valores más bajos indicando un incremento de la componente capacitiva debida a la presencia de material adsorbido sobre la superficie del electrodo, la misma tendencia se observó en los valores de Z_i y Z_r .

4.2.2.2 Quimisorción del aptámero disulfuro

Una manera alternativa al anclaje del aptámero vía enlace S-Au en condiciones de coadsorción, a partir de la mezcla aptámero/tiol corto resultante de la reducción con TCPE, consiste en exponer la superficie metálica al aptámero disulfuro (-S-S-) directamente. Se ha reportado en bibliografía, que los disulfuros se adsorben sobre superficies de Au, hecho que promueve el clivaje del enlace -S-S- (Nuzzo, 1987). Con fines comparativos se exploró la modificación de los electrodos directamente con el aptámero disulfuro sin hacer la reducción con TCEP. A modo de ejemplo se presenta la voltametría cíclica (Figura 4.5) medida en solución de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$ del electrodo de Au antes y después de la modificación con el aptámero disulfuro. Se obtuvieron valores de

$E^{\circ} = (0,252 \pm 0,005) \text{ V}$ y $\Delta E^{\circ} = (0,211 \pm 0,005) \text{ V}$ ($n=4$). Al comparar con las medidas de la modificación aptámero/tiol corto presentadas en la Figura 4.3, se observó que la cupla redox muestra una menor dificultad para alcanzar la superficie del electrodo cuando se emplea el aptámero disulfuro.

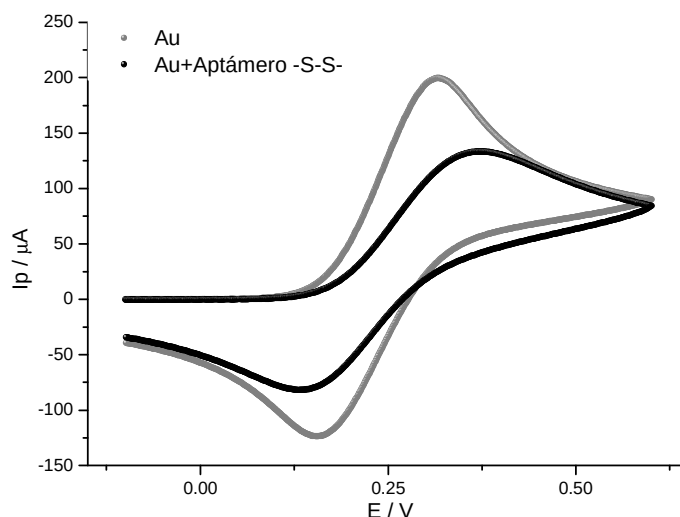


Figura 4.5 CV de un electrodo de Au antes (Au) y después (Au+Appt) de la modificación con el aptámero –S-S- (5,5 μM): solución de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,025 M/Hepes 0,1 M / KNO_3 0,2 M, pH 7, 2 (-0,1 V $\rightarrow$ 0,6 V), ν : 0,05 Vs^{-1}

Las medidas de impedancia (Figura 4.6) también sugirieron una menor dificultad de la sonda redox para alcanzar la superficie del electrodo y producir la transferencia electrónica. Se empleó el mismo circuito equivalente que en el caso anterior para el ajuste de los datos. Al comparar con el espectro obtenido en condiciones de coadsorción (Figura 4.4), se observó que la porción lineal correspondiente al control difusional, es menor para la superficie modificada en condiciones de coadsorción que empleando el aptámero –S-S-. Asimismo, la diferencia en la resistencia a la transferencia de carga del electrodo modificado respecto del mismo electrodo sin modificar (ΔR_{tc}) fue 0,5 $\text{k}\Omega$ aproximadamente, mientras que para la coadsorción $\Delta R_{tc} = 1 \text{ k}\Omega$. Consistentemente el valor de frecuencia a la cual se alcanza Z_i máximo es mayor (0,3 kHz y 0,07 kHz respectivamente) para la modificación con aptámero disulfuro que con aptámero –SH. Cuando se lleva a cabo la modificación del electrodo con una mezcla equimolar del aptámero y el alcanotiol de cadena corta, se produce una competencia entre ambas

especies por la superficie y es más probable que el tiol corto se adsorba en mayor proporción que el aptámero puesto que se trata de una molécula pequeña y sin carga. En estas condiciones se estaría produciendo un cubrimiento más efectivo de la superficie. En cambio cuando se emplea el aptámero disulfuro, la repulsión electrostática entre las moléculas del polianión podría dificultar la quimisorción. De este modo la modificación en condiciones de coadsorción produciría un mayor bloqueo de la superficie metálica dificultando así la transferencia de carga del anión $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$.

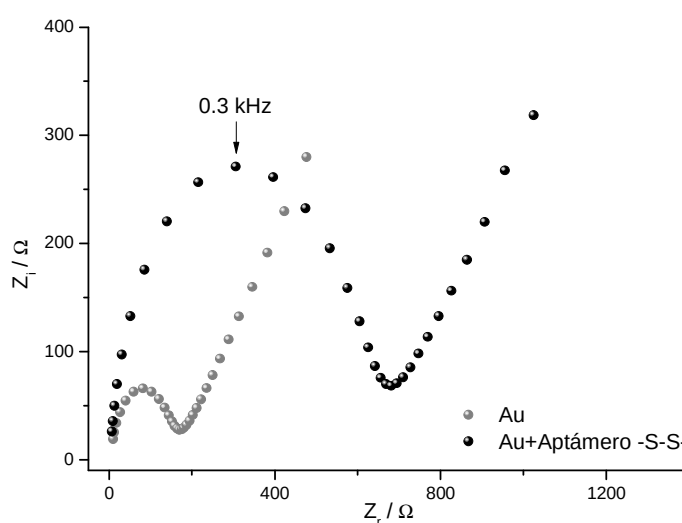


Figura 4.6 EIS de un electrodo de Au antes (●) y después (●) de modificarlo con el aptámero -S-S- (5,5 μM), medido en $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,025 M/Hepes 0,1 M / KNO_3 0,2 M, pH 7,2 ($E^\circ = 0,236 \text{ V}$, frecuencias: 0,1 Hz-10 kHz, amplitud de voltaje 10 mV)

4.2.2.3 Sistema aptámero-hebra complementaria

Tal como se describió en el Capítulo 3, Figura 3.1, una de las estrategias propuestas para el diseño de un aptasensor se basa en la disociación de un híbrido formado por el aptámero y su hebra complementaria, en presencia del analito (ver por ejemplo, Willner y Zayat, 2007).

En este caso con el fin de favorecer la competencia del analito por el aptámero, se emplea un sistema de ADN doble cadena cuya hebra complementaria posee sólo 11 nucleótidos en lugar de 27. La secuencia del aptámero es la siguiente:

5'-CH₃-(CH₂)₅-S-S-(CH₂)₆-TTT T TA CCT GGG GGA GTA TTG CGG AGG AAG GT-3'

Como se mencionó en 2.2.1, las cinco timidinas (T) en el extremo 5' se agregan como separadores entre la secuencia que reconoce AMP y la superficie.

La hebra empleada para hacer la hibridización es complementaria de los 11 nucleótidos que están próximos al extremo 5', a continuación del separador, el cual quedará más cerca de la superficie del Au pues tiene el grupo tiol (ver Figura 4.7):

5' CTCCCCCAGGT 3'

El ensayo de hibridización y la verificación por gel de poliacrilamida (PAGE) de la construcción obtenida en solución previa a la modificación del electrodo, fueron realizados por la Lic. M. Belén Ponce (ver tesis doctoral de Ponce, M. B., 2015).

Igual que en los casos anteriores, se empleó una concentración 5,5 μM de la mezcla que contiene la doble hebra y el tiol corto producto de la reducción con TCEP (Figura 4.7). Se cubrió la superficie del electrodo con la solución y se dejó durante 12 hs a temperatura ambiente. Estos experimentos se hicieron en un buffer de hibridización (Tris 25 mM, pH 8,2, NaCl 300 mM).

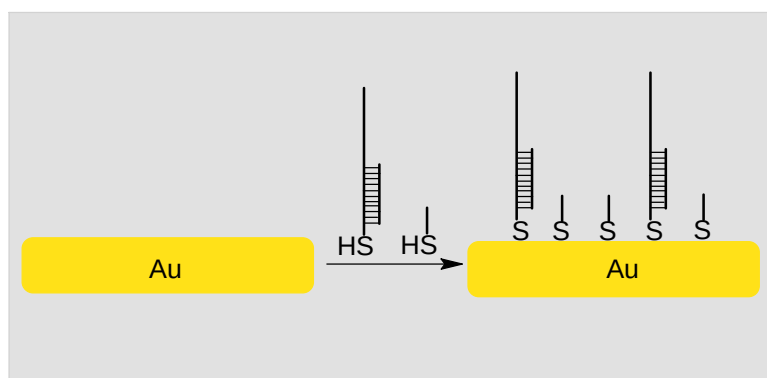


Figura 4.7 Esquema de la modificación del Au con ADN doble hebra

A continuación se midieron la respuesta por CV y el espectro de impedancia en solución de K₃[Fe(CN)₆] 0,025 M/ Hepes 0,1 M / KNO₃ 0,2 M, pH 7,2. Las Figuras 4.8 y 4.9 muestran las curvas respectivas para esta construcción doble cadena. La voltametría cíclica evidenció el cambio producido sobre la superficie, la cupla redox se

comportó menos reversiblemente que antes de la modificación. A su vez el espectro de impedancia también reflejó un aumento en la resistencia a la transferencia de carga debido al polianión adsorbido. El valor de $\Delta R_{tc} \sim 1,8 \text{ k}\Omega$ fue sensiblemente mayor que el obtenido para la simple hebra en las mismas condiciones (ver 4.2.2.1). Resulta razonable este incremento en la resistencia a la transferencia de carga pues la carga del polianión presente en la superficie es mayor para la doble hebra que para la simple hebra.

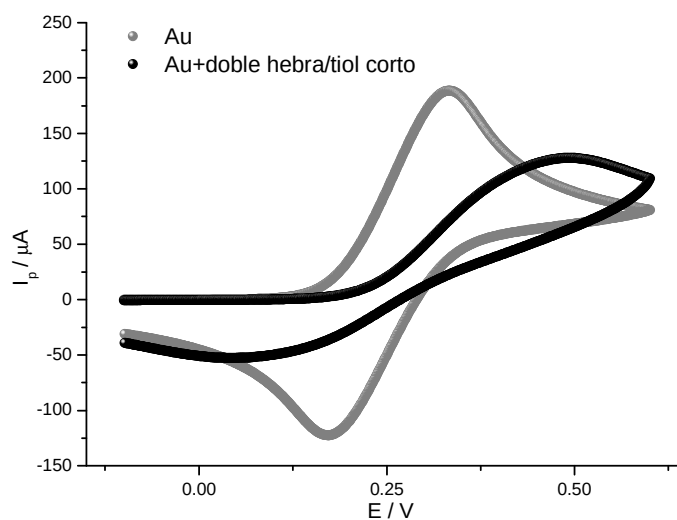


Figura 4.8 CV de un electrodo de Au antes (Au) y después de la modificación (Au+doble hebra/tiol corto), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,025 M / Hepes 0,1 M / KNO_3 0,2 M, pH 7, 2 (-0,1 V $\rightarrow$ 0,6 V), v : 0,05 Vs^{-1}

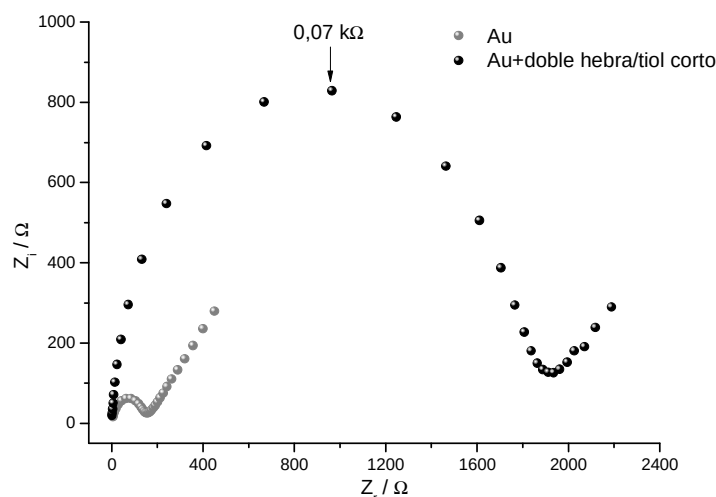


Figura 4.9 EIS de un electrodo de Au antes (●) y después (●) de su modificación con la mezcla doble hebra/tiol corto (5,5 μM): $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,025 M/ Hepes 0,1 M / KNO_3 0,2 M, pH 7,2 ($E^\circ = 0,254$ V, frecuencias: 0,1 Hz -10 kHz, amplitud de voltaje 10 mV)

En síntesis, en relación con las secuencias oligonucleotídicas se exploraron tres variantes de modificación de electrodos. En las dos primeras se usó la misma hebra de ADN simple cadena (aptámero que reconoce adenosina/AMP/ADP/ATP) variando el grupo funcional que interacciona con la superficie de Au. En el primer caso se hizo la reducción en fase homogénea con TCEP y se aplicó la mezcla equimolar aptámero-SH/tiol corto en condiciones de coadsorción, en el segundo caso se usó directamente el aptámero con el grupo disulfuro produciéndose la reducción en fase heterogénea sobre la superficie del electrodo. La tercera modificación explorada consistió en una etapa de construcción de un sistema doble cadena en solución en el cual el aptámero se hibridizó con una secuencia complementaria de 11 nucleótidos. La inmovilización de la doble hebra de ADN a la superficie del electrodo se hizo a través del grupo tiol que posee el aptámero, previa reducción en solución con TCEP. Es decir se coadsorbió una mezcla equimolar doble hebra-SH / tiol corto, como en el primer caso de simple hebra.

4.2.3 Efecto del tipo de sonda redox en solución

Para minimizar la repulsión electrostática entre el polianión (aptámero) quimisorbido sobre la superficie del electrodo y el marcador redox en solución, se exploró la respuesta por CV y EIS del compuesto ferrocenometanol, una especie molecular sin carga (Figura

4.10) que presenta una respuesta reversible en la ventana de potencial del Au en medio acuoso.

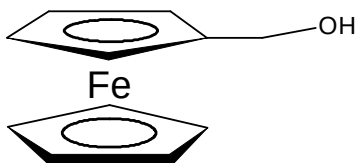


Figura 4.10 Estructura del compuesto ferroceno metanol

Al igual que otros derivados del bis-(η^5 -ciclopentadienil)-hierro, como la amida del carboxiferroceno discutida en el capítulo anterior (ver 3.2.1), la reacción del par redox ferroceno/ferricinio involucra la transferencia de un electrón, siendo el $E^\circ = 0,225$ V, la cupla tiene un comportamiento reversible sobre Au. A modo de ejemplo, la Figura 4.11 muestra las voltametrías cíclicas obtenidas para un electrodo de Au antes y después de modificarlo con la mezcla equimolar aptámero/tiol corto empleando una solución de ferrocenometanol 0,52 mM como sonda redox. Ambas curvas son prácticamente superponibles, siendo $E^\circ = 0,218$ V y $\Delta E^\circ = 0,055$ V, valores que indicaron un comportamiento reversible independientemente de la presencia del aptámero y el alcanotiol de cadena corta adsorbidos. La pequeña concentración de la sonda redox en este caso respecto de la concentración de $K_3[Fe(CN)_6]$ respondió a su baja solubilidad en medio acuoso.

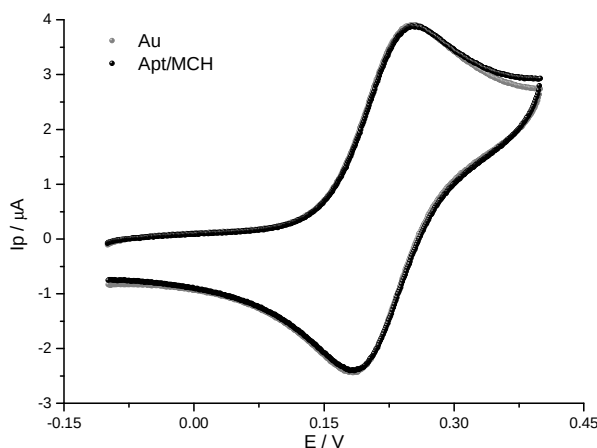


Figura 4.11 CV de un electrodo de Au antes y después de modificarlo con la mezcla aptámero/tiol corto (5,5 μ M): ferrocenometanol 0,52 mM /Hepes 0,1 M / KNO_3 0,2 M, pH 7,2, (-0,1 V $\rightarrow$ 0,4 V), v : 0,05 Vs^{-1}

El espectro de impedancia electroquímica para el mismo electrodo antes y después de la modificación con la mezcla aptámero/tiol corto tampoco presentó diferencias significativas (Figura 4.12).

Para verificar que efectivamente los electrodos habían sido modificados con la mezcla aptámero/tiol corto, se volvieron a medir empleando la cupla aniónica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$, obteniéndose la respuesta irreversible que evidencia la presencia del polianión quimisorbido.

Se puede concluir que el ferrocenometanol no resultó adecuado para hacer visible este tipo de modificaciones de la superficie. Generalizando, es posible decir que la carga de la sonda redox seleccionada para caracterizar electroquímicamente la modificación de una superficie, es un factor importante a considerar.

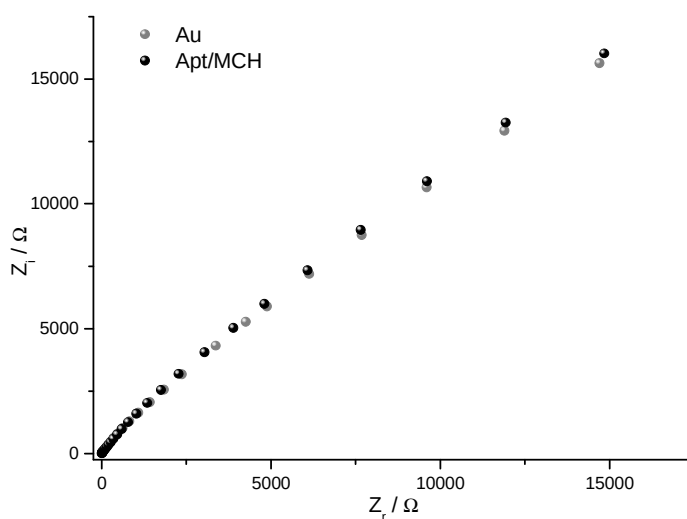


Figura 4.12 EIS de un electrodo de Au antes y después de modificarlo con la mezcla aptámero/tiol corto (5,5 μM) medido en ferrocenometanol 0,52 mM / Hepes 0,1 M / KNO_3 0,2 M, pH 7,2 ($E^\circ = 0,217$ V, frecuencias: 0,1 Hz -10 kHz, amplitud de voltaje 10 mV)

4.2.4 Efecto de la sonda redox inmovilizada (Os-PA)

En el campo de los biosensores amperométricos se ha empleado la estrategia de inmovilizar una enzima mediante la interacción con un hidrogel que contenga una sonda

redox, siendo el sensor de glucosa el dispositivo comercial más conocido (Heller, 1990). El hidrogel provee un medio con alto contenido de agua en el cual las especies solubles, como la glucosa por ejemplo, pueden difundir fácilmente hasta el sitio activo de la enzima. Tal como se describió en 1.3.4, los sistemas autoensamblados pueden construirse a partir de un polielectrolito y un surfactante como contraión, sobre la base de la fuerte interacción electrostática de las especies (ver tesis doctoral de Cortez, M. L, 2011).

Inspirado en este tipo de biosensores, en una primera etapa, se exploró una arquitectura para el electrodo de trabajo en la cual la especie electroactiva se encuentra inmovilizada o confinada en la superficie a través de las interacciones electrostáticas con el aptámero (Figura 4.13 a)).

Como primer paso, se modificaron electrodos de Au con la mezcla aptámero/tiol corto igual que en el caso anterior (ver 4.2.2.1). A continuación se cubrieron los electrodos con una solución del complejo de Os electroactivo unido a poli(alilamina), un polielectrolito con carga positiva a pH ~ 7 , debido al equilibrio ácido-base de los grupos $-\text{NH}_2$. El compuesto fue sintetizado por la Dra. Lorena Cortez (ver tesis citada previamente y Danilowicz et al, 1998), su estructura se presenta en la Figura 4.13 b).

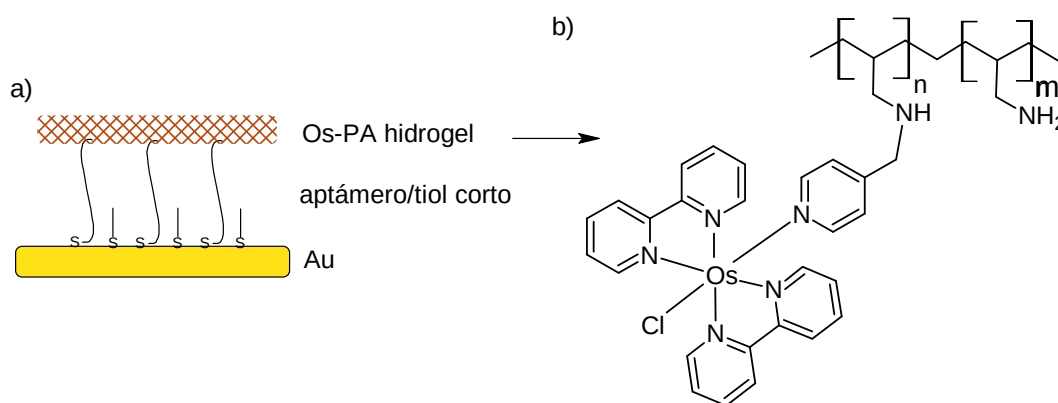


Figura 4.13 a) Esquema de la capa construida sobre el electrodo.

b) Estructura química del polielectrolito redox Os-PA

La Figura 4.14 muestra la curva corriente-potencial para el sistema en función de la velocidad de barrido, el centro metálico de Os(II) se oxida a Os(III) al hacer el barrido de potencial en sentido anódico y vuelve a reducirse al invertir el sentido del mismo:

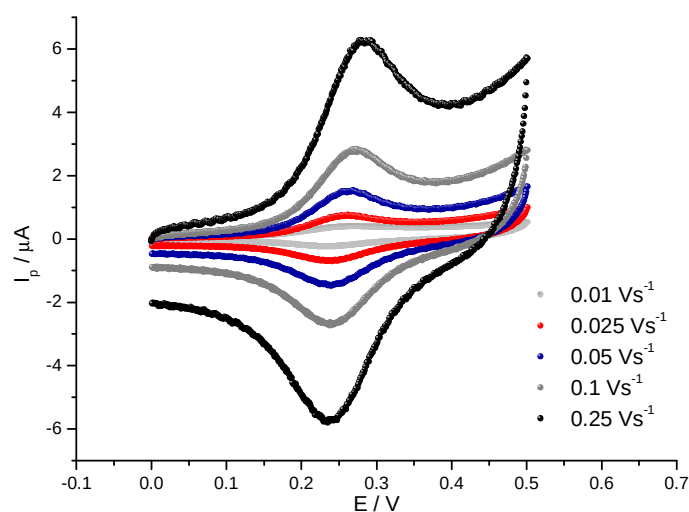


Figura 4.14 CV de un electrodo de Au modificado con el sistema aptámero / tiol corto / Os-PA (0 V $\rightarrow$ 0,5 V), para diferentes velocidades de barrido, medida en buffer Hepes 0,1 M, pH 7,2.

Las voltametrías cíclicas obtenidas indican la presencia de una especie electroactiva inmovilizada, hecho que confirma las interacciones electrostáticas entre el aptámero (un polianión) y el Os-PA (catiónico). Cabe señalar que el complejo Os-PA no se adsorbe a una superficie de Au limpia (Dra Lorena Cortez, comunicación personal). La corriente de pico (i_p) varía linealmente con la velocidad de barrido hecho consistente con la respuesta de una especie electroactiva adsorbida. Cuando se trabaja a baja velocidad de barrido ($0,05 \text{ Vs}^{-1}$), todos los sitios redox en el polímero pueden oxidarse y reducirse, la integración del área bajo la curva en esa condición indicó una carga de $0,03 \text{ mC.cm}^{-2}$ para la reducción, valor consistente con la presencia de $3,6 \cdot 10^{-10} \text{ moles.cm}^{-2}$ o $2,1 \cdot 10^{14} \text{ moléc.cm}^{-2}$ de especie electroactiva. Este valor resultó menor que el reportado por Danilovic et al (1998) ($0,1 - 1 \text{ mC.cm}^{-2}$), sin embargo, debe tenerse en cuenta que el mismo depende de la concentración de Os(II) / Os(III) en el hidrogel y de la capacidad del mismo para interactuar con el aptámero y el tiol corto previamente quimisorbidos al Au. A continuación sobre el mismo electrodo modificado se midió el espectro de impedancia electroquímica (Figura 4.15).

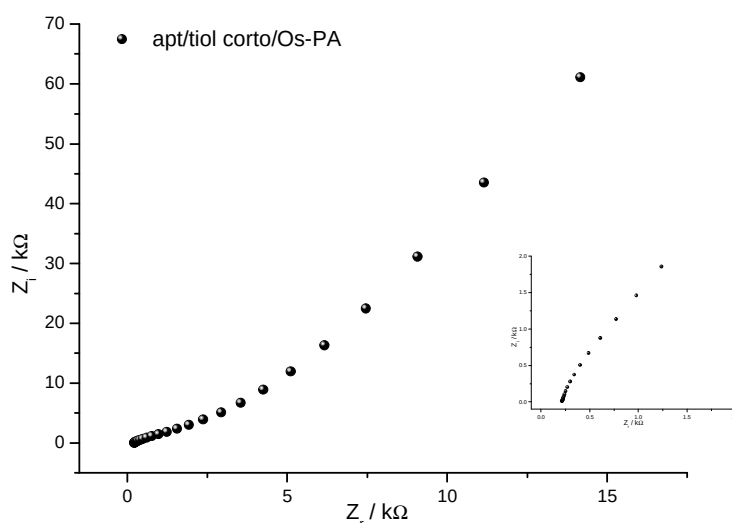


Figura 4.15 EIS de un electrodo de Au modificado con el sistema aptámero / tiol corto / Os-PA ($E^0 = 0,252V$, frecuencias: 0,1 Hz -10 kHz, amplitud de voltaje 10 mV). Inserto: ampliación del segmento 10 Hz -10 kHz

Estos resultados exploratorios sugieren que las moléculas de aptámero quimisorbidas estarían funcionando como “conductores” entre el polímero de Os-PA y la superficie metálica, lo cual podría aprovecharse para diseñar otras arquitecturas de electrodo.

Una variante empleando el mismo polímero de osmio, consistió en armar el electrodo con la construcción que se muestra en la Figura 4.16 a. El primer paso de modificación fue la adsorción de una monocapa de 3-mercaptopropil-sulfonato de sodio (MPS, Figura 4.16 b) ($pK_a \sim 2$). Esta molécula bifuncionalizada permitió la quimisorción al Au mediante el grupo tiol, mientras que las interacciones electrostáticas con el Os-PA tienen lugar a través del grupo sulfonato cargado negativamente a $pH > 2$.

Los electrodos de Au limpios fueron sumergidos en una solución 20 mM de MPS en H_2SO_4 10 mM durante 30 minutos. La solución de MPS se preparó en el momento de su utilización, para evitar la oxidación del tiol con el O_2 del aire. A continuación los electrodos fueron expuestos a una solución de Os-PA (0,06 mM aproximadamente, buffer Tris 50 mM (pH 7,2), durante 10 minutos).

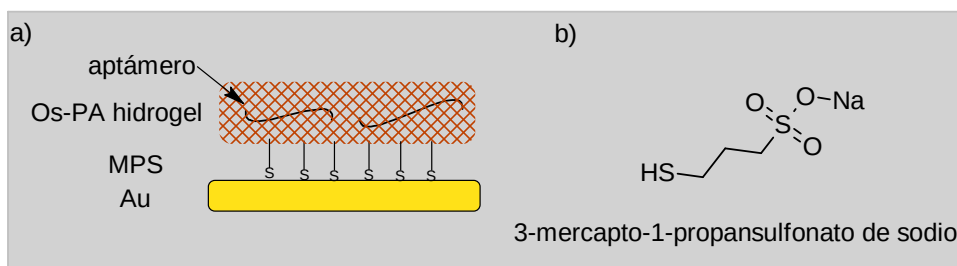


Figura 4.16 a) Esquema de la capa construida sobre el electrodo, b) Estructura química del MPS

Las curvas corriente - potencial en función de la velocidad de barrido (Figura 4.17) mostraron la respuesta de estos dos primeros pasos de modificación.

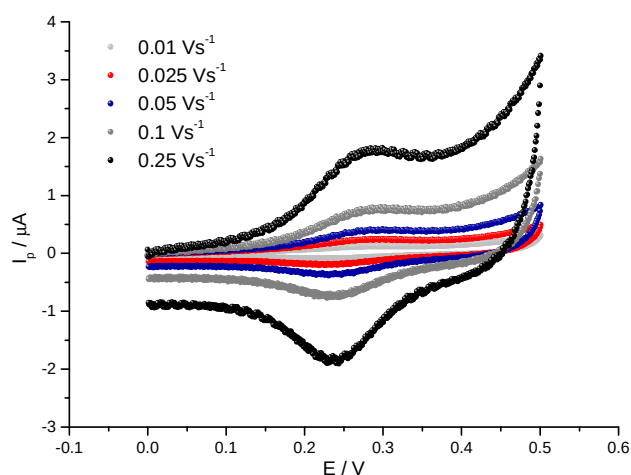


Figura 4.17 CV de un electrodo de Au modificado con el sistema MPS / Os-PA (0 V→0,5 V), para diferentes de velocidades de barrido, medida en buffer Hepes 0,1 M / KNO₃ 0,2 M, pH 7,2.

Nuevamente se obtuvo una correlación lineal entre la velocidad de barrido (v) y la corriente pico (i_p) lo que evidenció la presencia del polímero con el complejo redox inmovilizado sobre el electrodo. Sin embargo al comparar con la construcción anterior, se observó en este caso una menor intensidad de corriente. Otra diferencia entre ambos tipos de construcciones fue la necesidad de incrementar la fuerza iónica del buffer Hepes por agregado de un electrolito (KNO₃) para mejorar la respuesta electroquímica. Estos hechos podrían atribuirse a un mayor bloqueo de la superficie del electrodo debido a que se usó una mayor concentración de MPS (20 mM) que en el caso del aptámero/tiol corto (5,5 μ M).

Finalmente los electrodos se expusieron a una solución de aptámero 5,5 μM disuelto en buffer Hepes 0,1 M / KNO_3 0,2 M, pH 7,2, durante 1 h a temperatura ambiente. En este caso se empleó la secuencia aptamérica que reconoce adenosina/AMP/ADP/ATP sin el grupo tiol terminal (ver 2.2.1), dado que la idea fue explorar si la misma puede quedar contenida en la matriz del hidrogel por interacciones electrostáticas. La respuesta del sistema MPS/Os-PA/aptámero por voltametría cíclica e impedancia electroquímica, mostró sólo leves cambios después de esta etapa de modificación de los electrodos (Figura 4.18).

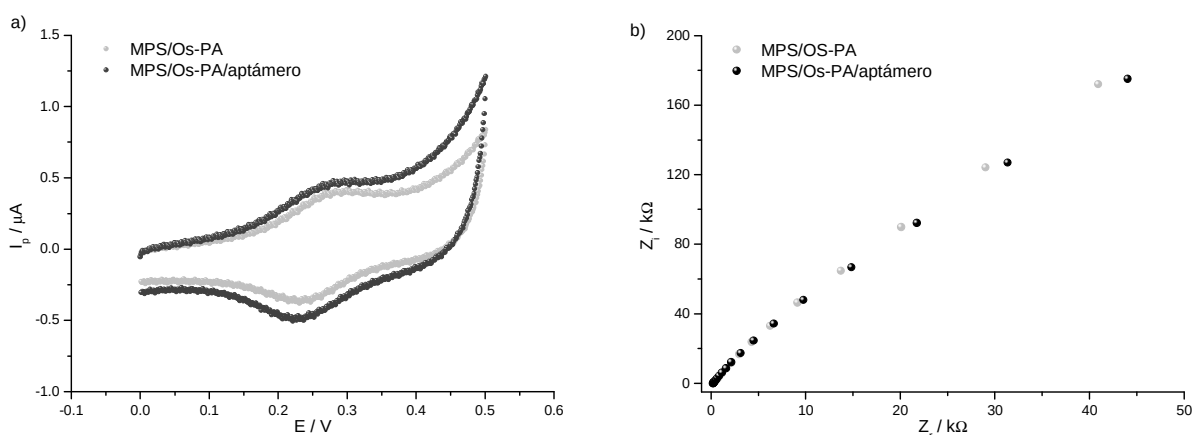


Figura 4.18 a) CV de un electrodo de Au modificado con MPS/Os-PA y MPS/Os-PA/aptámero (0V $\rightarrow$ 0,5V; v : 0,05 Vs^{-1}). b) EIS para las mismas modificaciones. Buffer de medida: Hepes 0,1 M / KNO_3 0,2 M, pH 7,2

En las condiciones ensayadas mediante detección electroquímica, no pudo confirmarse la incorporación del aptámero al hidrogel. Para ello, podría explorarse la técnica de microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (QCM-D) cuya aplicación se presenta en el capítulo siguiente.

4.3. Detección del analito (AMP)

Habiendo adquirido experiencia en el armado de distintas arquitecturas de electrodo empleando el aptámero que reconoce adenosina/AMP/ADP/ATP como sistema modelo, como así también en la técnica de impedancia electroquímica, se avanzó hacia la exploración de la detección del analito de interés.

Tal como se mencionó en 4.1 se espera que la respuesta del espectro de impedancia cambie al producirse el reconocimiento aptámero-AMP. Como se discutió en el Capítulo 3 en ausencia de AMP, el aptámero en un ambiente acuoso a pH ~ 7 aún inmovilizado a la superficie de Au por quimisorción, presenta un equilibrio conformacional entre la forma desplegada (“random coil”) y la forma plegada (“stem-loop”) que se esquematiza en la Figura 4.19:

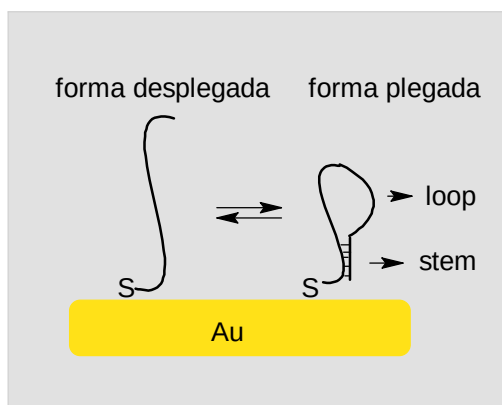


Figura 4.19 Esquema del equilibrio conformacional del aptámero quimisorbido a la superficie de Au en un ambiente acuoso

A temperatura ambiente y en ausencia del analito o de iones que estabilicen la forma plegada, predomina la estructura desplegada. Las moléculas de aptámero inmovilizadas se comportarían como un “cepillo molecular aniónico” dificultando (“barriendo”) el acceso del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$ a la superficie. El analito es la fuerza impulsora que favorece el predominio de la forma plegada (“stem-loop”) sobre la forma “random coil”. En la metáfora del “cepillo molecular” equivaldría a decir que las “fibras del cepillo” se encuentran enrolladas e interfieren menos con la sonda redox aniónica que se aproxima a la superficie del electrodo. El espectro de impedancia debería reflejar este mejor acceso de la sonda redox a la superficie del electrodo.

Otro aspecto relevante en el armado de la capa de reconocimiento es el bajo cubrimiento superficial (alrededor del 1%) obtenido al realizar el autoensamblado con el aptámero (ver 5.2), hecho que puede disminuir la sensibilidad del aptasensor. Para mejorar la cuantificación cuando se emplea EIS como técnica analítica, se introduce un paso adicional en el armado de la capa de reconocimiento, que consiste en el tratamiento con un alcanotiol de cadena corta (MCH) (ver por ejemplo, Eissa et al, 2013). Además el

mismo resulta eficaz para minimizar las interacciones inespecíficas de la secuencia oligonucleotídica al Au (ver 3.2.3).

La voltametría cíclica evidenció la modificación del electrodo realizada, pero la sensibilidad de esta técnica no resultó suficiente para detectar la interacción del aptámero con AMP 500 nM (Figura 4.20).

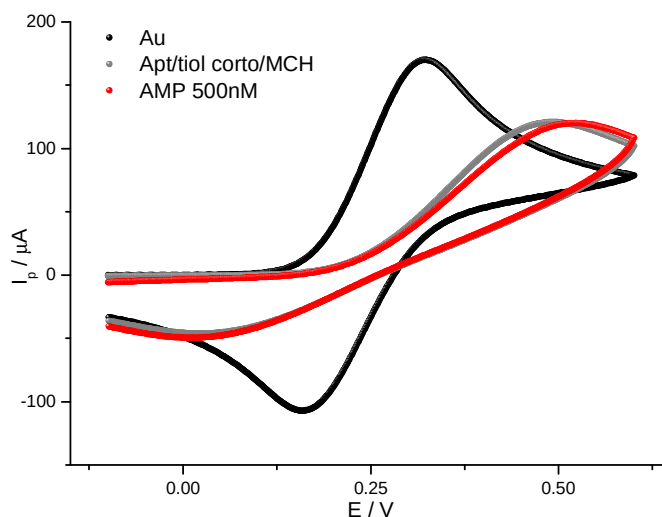


Figura 4.20 CV en $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,025 M/Hepes 0,1 M / KNO_3 0,2 M, pH 7,2 (-0,1 V $\rightarrow$ 0,6 V), vel. de barrido 0,05 Vs^{-1} . Electrodo de Au (●); Au/aptámero/tiol corto (5,5 μM) / MCH (1,5 mM) (●); Au/aptámero/tiol corto (5,5 μM) / MCH (1,5 mM) / AMP 500 nM (●)

En cambio el espectro de impedancia electroquímica mostró un cambio que puede explicarse teniendo en cuenta que al reconocer AMP la población de moléculas de aptámero quimisorbidas está mayoritariamente en la forma plegada (“*stem loop*”). Si bien esta estructura es más voluminosa que la forma desplegada, la misma posee menor libertad de movimiento. Dado que la superficie del electrodo es de dimensiones milimétricas, el cambio debido al plegamiento del aptámero no impide el acercamiento de la sonda redox para dar la transferencia de carga. Dicho plegamiento del aptámero se traduciría en una disminución de R_{tc} (Figura 4.21).

Un modo de cuantificar el cambio producido por el analito, consistió en calcular la diferencia en la resistencia a la transferencia de carga antes y después de agregar el AMP, de manera análoga a lo expuesto previamente (4.2.2.1):

$$\Delta R_{tc} = R_{tc \text{ apt./tiol corto/MCH}} - R_{tc \text{ apt./tiol corto/MCH/AMP}}$$

Se consideró en ambos casos el valor de R_{tc} luego de hacer la incubación con el buffer como se indica en 2.2.4.2. Para una concentración de AMP 500 nM, $\Delta R_{tc} = 500 \Omega$.

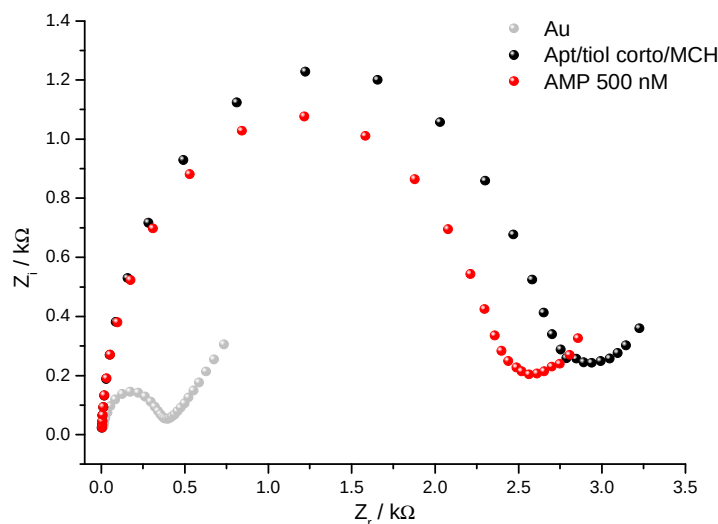


Figura 4.21 EIS en $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,025 M/Hepes 0,1 M / KNO_3 0,2 M, pH 7,2. Electrodo de Au (●); Au/aptámero/tiol corto (5,5 μ M) / MCH (1,5 mM) (●), Au/aptámero/tiol corto (5,5 μ M) / MCH (1,5 mM) / AMP 500 nM (●)

Si bien este resultado confirmó que es posible la detección de AMP por EIS con la construcción de la capa de reconocimiento descrita, desde el punto de vista analítico tiene el problema de una baja sensibilidad, el cambio medido es de $1 \Omega / nM$ con respecto a la concentración de AMP. La detección de adenosina por espectroscopia de impedancia electroquímica fue descrita por Wang y colaboradores (Wang et al, 2014) empleando una construcción de electrodo que comprende 3 pasos de modificación sucesivos (aptámero, ditiotretol y MCH) para lograr un mayor bloqueo de la superficie libre de Au mejorando así la sensibilidad.

Cabe señalar que la presencia de cationes divalentes como Mg^{2+} (ac) es un factor que afecta el equilibrio conformacional entre la forma plegada y la estructura random coil del oligonucleótido debido al efecto de compensación de carga de los aniones fosfato. Dado que el principio de detección de la adenosina está basado en dicho cambio conformacional, la composición de los buffers de incubación es un aspecto a evaluar En

este trabajo de tesis se decidió estudiarlo más sistemáticamente empleando como técnica instrumental balanza de cuarzo con disipación (ver 5.4.1).

4.4 Conclusiones

La espectroscopía de impedancia electroquímica permitió obtener información acerca de la modificación de superficies de Au con secuencias oligonucleótidas, empleando diferentes estrategias de quimisorción. La resistencia a la transferencia de carga resultó un parámetro sensible a dichos cambios. Por tratarse de una técnica no destructiva, luego de la verificación del armado de la capa de reconocimiento, fue posible monitorear el evento de reconocimiento molecular en presencia del analito empleando el mismo electrodo.

En el contexto de la detección de moléculas pequeñas como el AMP, una de las ventajas que presenta la técnica de EIS consiste en la posibilidad de diseñar estrategias de detección que no requieran la modificación química de la secuencia aptamérica. Sin embargo el tipo de sonda redox a emplear es un factor a considerar en un aptasensor de tipo “*label free*” basado en mediciones de impedancia.

La modificación del electrodo mediante autoensamblado con el sistema Os-PA permitió obtener una señal electroquímica que aprovecha las propiedades de la hebra de ADN como polianión al interactuar electrostáticamente con un polication. La construcción obtenida permitió la conducción eléctrica, funcionando como un “cable molecular” entre la superficie metálica y el centro redox contenido en el hidrogel.

Finalmente, fue posible la detección de AMP como ejemplo de una molécula pequeña empleando EIS. Sin embargo, la superficie de Au libre luego de la modificación con el aptámero, resultó un factor limitante de la sensibilidad.

***Capítulo 5. Estudio de superficies de
oro modificadas con aptámeros por
microbalanza de cristal de cuarzo con
disipación***

5.1. Introducción

La técnica acústica conocida como *microbalanza de cristal cuarzo con disipación* (QCM-D) permite registrar los cambios en función del tiempo que tienen lugar sobre la superficie del sensor cuando se adsorbe una especie, midiendo simultáneamente la frecuencia (F) y la energía disipada (D). Al colocar el cristal entre dos electrodos y aplicar un voltaje determinado, oscila a su frecuencia de resonancia acústica (ver Figura 5.1.). Cuando se interrumpe el voltaje la oscilación decae exponencialmente. Este fenómeno se debe a las propiedades piezoeléctricas del material (del griego “presión-electricidad”). Cuando se aplica presión sobre un material piezoeléctrico se genera carga eléctrica superficial. Contrariamente, si se somete el material a un campo eléctrico oscilante se produce una deformación del mismo.

En 1959 Sauerbrey demostró que existe una relación lineal entre la masa de un depósito rígido adsorbido sobre la superficie y la frecuencia de resonancia del cristal en aire o vacío:

$$\Delta f = -\frac{2 f_o^2 \Delta m}{A \sqrt{\mu_q \rho_q}} \quad (5.1)$$

donde Δf es el cambio de frecuencia medido, f_o es la frecuencia de resonancia fundamental del cristal de cuarzo, Δm es la masa de la película adsorbida, A el área activa piezoeléctrica, μ_q es la densidad del cuarzo ($2,648 \text{ g cm}^{-3}$) y ρ_q es el módulo de corte del cuarzo (AT-cut: *analog temperature controlled crystal oscillator*, $2,947 \cdot 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$). La ecuación de Sauerbrey relaciona los cambios en la frecuencia resonante Δf con los cambios de masa adsorbida Δm , por unidad de área A , y vale si $\Delta f \ll f_o$, el espesor de la película depositada es menor que el del cristal y la capa está acoplada rígidamente al cristal, es decir si la onda acústica se propaga a igual velocidad en ambos medios (Buttry y Ward, 1992). Si no se cumple la última condición, es necesario considerar el espesor y las propiedades viscoelásticas de la película.

Las aplicaciones de la técnica a sistemas biológicos fueron posibles cuando se desarrollaron circuitos capaces de oscilar en medio líquido (Nomura y Okuhara, 1982).

Los equipos comerciales usan micro o macrofluidica para poner en contacto de manera controlada la solución que contiene el analito con la superficie del cristal convenientemente modificada (Cooper y Singleton, 2007).

El término D se define como el cociente entre la energía disipada o perdida (E_{lost}) por oscilación y la energía total almacenada en el cristal (E_{store}):

$$D = E_{lost} / (2\pi E_{store}) \quad (5.2)$$

Los datos medidos en experimentos de QCM-D pueden ser analizados de manera cualitativa a partir de los gráficos de ΔF y ΔD vs. tiempo o ΔD vs. ΔF . También puede obtenerse información cuantitativa, para lo cual debe considerarse el tipo de depósito o película sobre el cristal. Para un depósito rígido, delgado y homogéneamente distribuido sobre la superficie, el cambio en la frecuencia correlaciona linealmente con la masa adsorbida mediante la siguiente expresión derivada de la ecuación de Sauerbrey (ecuación 5.1):

$$\Delta m = (C / n) \Delta F \quad (5.3)$$

La constante específica de masa C vale $17,7 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$ cuando se mide a la frecuencia fundamental (5 MHz), y n son los sobretonos ($n=1, 3, 5, \dots$) (Höök et al, 2001).

Una película viscoelástica no acompaña la oscilación del cristal cuando se interrumpe el voltaje aplicado. La Figura 5.1 muestra la diferencia en el decaimiento exponencial de la señal para ambos tipos de depósitos.

Cuando el material depositado sobre el cristal es una película homogénea viscoelástica, el modelo de Voight permite caracterizarlo mediante el cálculo de cuatro parámetros que dependen de la frecuencia: densidad ρ_f , espesor δ_f , módulo elástico μ_f y viscosidad η_f . Para estos cálculos se requiere medir la frecuencia y la energía disipada a diferentes sobretonos (ΔF_s y ΔD_s respectivamente). La masa que detecta el sensor durante la oscilación (“masa dinámica”), puede ser mayor o menor que la masa medida en reposo (“masa estática”) dependiendo de las propiedades de dicho depósito (Höök et al, 2001).

A su vez, el cociente acústico ($\Delta D/\Delta F$), definido como la energía disipada por unidad de masa acoplada a la superficie, puede usarse para obtener información estructural (rigidez relativa, contenido de agua, etc.) (Höök et al, 2001; Tsortos et al, 2008; Papadakis et al 2012). Para el caso de macrobiomoléculas, un cambio grande en la energía disipada o en el cociente acústico se asocia a una alta flexibilidad conformacional y un elevado contenido de agua. Contrariamente, cuando dichas biomoléculas forman estructuras compactas o capas rígidas poco hidratadas los valores de energía disipada son bajos (Peh et al, 2007).

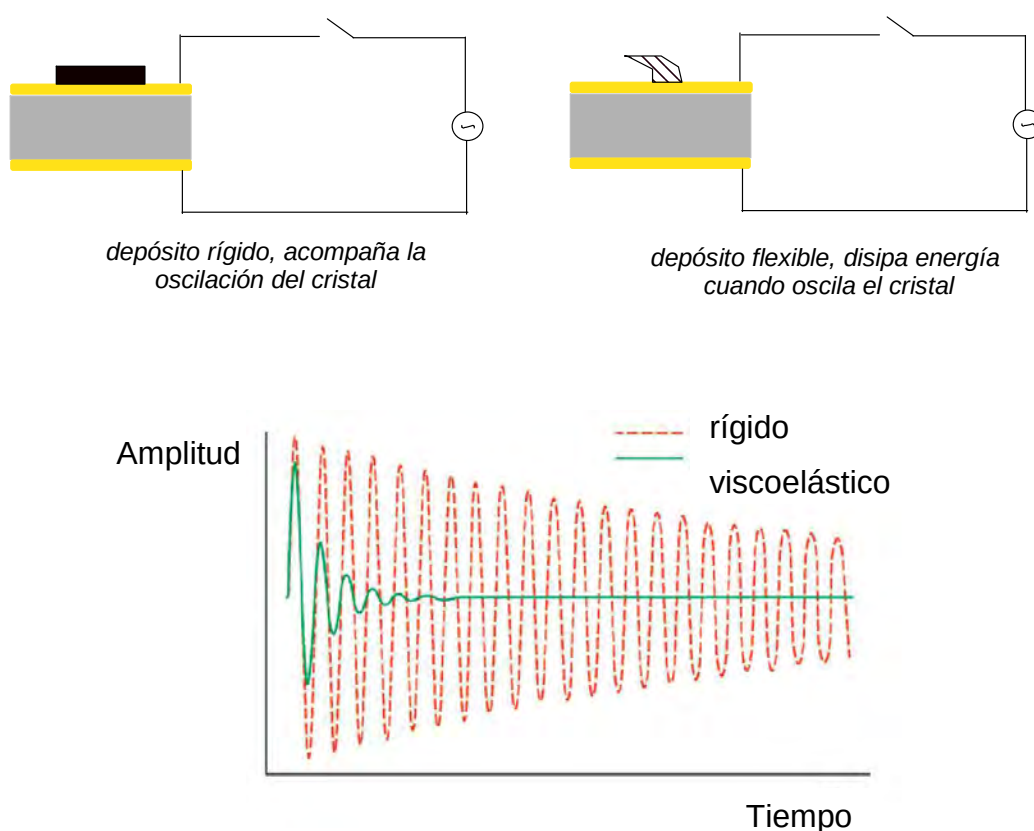


Figura 5.1 Esquema del sensor y diferencia en la señal de disipación para un depósito rígido (izq.) y viscoelástico (der.)

En el contexto de las biomacromoléculas, particularmente proteínas y ADN, la técnica de microbalanza de cuarzo con disipación ha sido ampliamente empleada para obtener información sobre los cambios de masa y estructura que tienen lugar en la interfaz

líquido - sólido (Xia et al, 2010 y referencias indicadas en dicho trabajo). A su vez, las aplicaciones relacionadas con el campo de los biosensores se han incrementado en los últimos quince años (ver las recopilaciones de Cooper y Singleton, 2007; Becker y Cooper, 2010).

El objetivo de este capítulo es estudiar por una técnica acústica, las etapas de construcción de un sensor de base aptamérica y evaluar el efecto del entorno sobre la capa de reconocimiento.

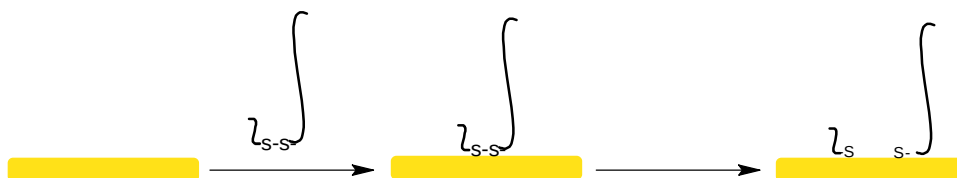
5.2. Quimisorción de oligonucleótidos mediante interacción S-Au

Cuando se utilizan aptámeros como agentes de reconocimiento molecular en el desarrollo de biosensores, es necesario desarrollar una estrategia de inmovilización de los mismos que preserve sus propiedades biofísicas y su capacidad de interactuar con el analito (Zhang y Yadavalli, 2011). Como se mencionó en los capítulos 3 y 4, para el caso de los oligonucleótidos están disponibles comercialmente diferentes modificaciones con átomos de S que permiten la quimisorción a una superficie de Au. El tiol terminal, ubicado en el extremo 3' o 5' según resulte más conveniente, habitualmente está protegido como puente disulfuro (-S-S-) y se reduce previamente a su adsorción. La reducción se lleva a cabo empleando un reductor suave como el TCEP (clorohidrato de tris-(2-carboxietil)fosfina) (ver 2.2.1.1). Otra modificación para introducir átomos de S consiste en el empleo de uno o más grupos fosforotioato (ver capítulo 3).

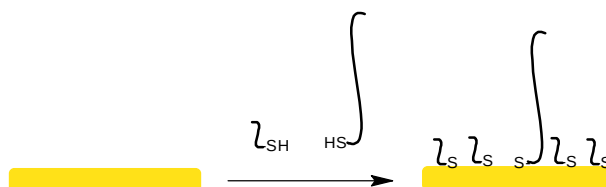
Se exploraron tres estrategias diferentes de quimisorción de la secuencia oligonucleotídica al sensor de Au, las cuales se esquematizan en la Figura 5.2.

La técnica de microbalanza de cuarzo permitió monitorear el proceso de adsorción de la hebra de ADN a través del cambio en la frecuencia. Cuando se adsorbe una monocapa de alcanotiol como el MCH (Mr 134 Da) por ejemplo, se produce un cambio en la frecuencia de 4 Hz (cubrimiento superficial de $7,7 \cdot 10^{-10}$ moles/cm²) (Strong y Whitesides, 1988). Los valores de ΔF obtenidos con las tres estrategias de modificación suponiendo válido el modelo de Sauerbrey (ecuación 5.3) fueron los siguientes: 22,5 Hz (adsorción del disulfuro, esquema A, Figura 5.2), 14,4 Hz (coadsorción, esquema B,

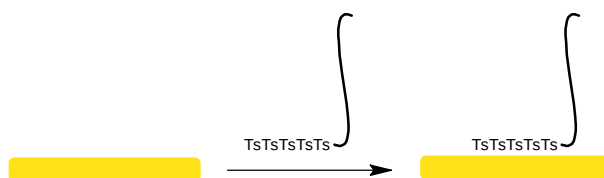
Figura 5.2) y 10 Hz (fosforotioato, esquema C, Figura 5.2), por lo menos un 50% mayores que los esperados para la adsorción de un alcanotiol, confirmando así la quimisorción de la hebra de ADN.



Esquema A: exposición directa a la hebra de ADN modificada con un grupo disulfuro (-S-S-)



Esquema B: coadsorción de una mezcla equimolar de la hebra de ADN y un tiol de cadena corta



Esquema C: exposición directa de la hebra de ADN modificada con 5 grupos fosforotioato (5Ts)

Figura 5.2 Esquema de las diferentes estrategias de anclaje del oligonucleótido al Au

Las tres variantes de enlace S-Au presentaron cubrimientos superficiales del mismo orden de magnitud. Para el caso de la modificación con fosforotioato se obtuvo buena correlación con los valores medidos por marcación radiactiva con ^{32}P , voltametría cíclica en $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y cronocoulombimetría en solución de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (Ceretti et al, 2010) (ver capítulo 3).

Otra estrategia habitual de anclaje a la superficie de Au presentada en bibliografía, consiste en usar la hebra de ADN modificada con un grupo tiol en uno de sus extremos, 5`en general, HS-ADN. Xia y colaboradores (2010) reportan valores de cubrimiento superficial medidos por QCM-D a pH 4,5 y 8,5 de $3,8 \cdot 10^{13}$ y $5,1 \cdot 10^{13}$ moléc. cm^{-2} respectivamente, para una hebra de 27 nucleótidos. Dichos valores, aunque un poco mayores, están en el mismo orden que los obtenidos por las técnicas usadas previamente para las estrategias presentadas en este trabajo.

Algunos trabajos publicados describen el uso de secuencias oligonucleotídicas biotiniladas como estrategia de anclaje a superficies de Au modificadas con streptavidina para estudios de hibridización (ver por ejemplo Papadakis et al, 2012). El argumento para emplear esta forma de armado de la capa de reconocimiento consiste en obtener un mayor control de las moléculas que se unen y minimizar los espacios libres de la superficie metálica por la adsorción de la macromolécula streptavidina. Sin embargo, Mannelli y colaboradores (2005) mostraron en un estudio comparativo empleando QCM-D y SPR, que las modificaciones con biotina dan resultados comparables al uso de ADN modificado con tioles.

Moléculas adsorbidas	QCM-D (modelo de Sauerbrey)	
	Moles/cm^2	Molec./cm^2
Aptámero disulfuro (Mr 10.334 Da)	$3,9 \cdot 10^{-11}$	$2,3 \cdot 10^{13}$
Scramble disulfuro (Mr 8.815 Da)	$3,5 \cdot 10^{-11}$	$2,1 \cdot 10^{13}$
Aptámero/tiol (Mr _{apt} 10.200 Da; Mr _{MCH} 134 Da)	$2,6 \cdot 10^{-11}$	$1,6 \cdot 10^{13}$
Aptámero fosforotioato (5Ts) (Mr _{apt5Ts} 11.607,1)	$1,3 \cdot 10^{-11}$	$7,8 \cdot 10^{12}$

Tabla 5.1 Cubrimiento superficial en función de la estrategia de quimisorción del oligonucleótido (concentración de ADN 1 μM en todos los casos)

Para el anclaje vía fosforotioato se observó buena correlación con los resultados obtenidos por otras técnicas experimentales en el grupo de trabajo (^{32}P , voltametría cíclica, cronocoulombimetría, $5,8 \cdot 10^{-13}$ – $4,6 \cdot 10^{-11}$ moles/ cm^2 , Ceretti et al, 2010; Ponce, M. B., 2015).

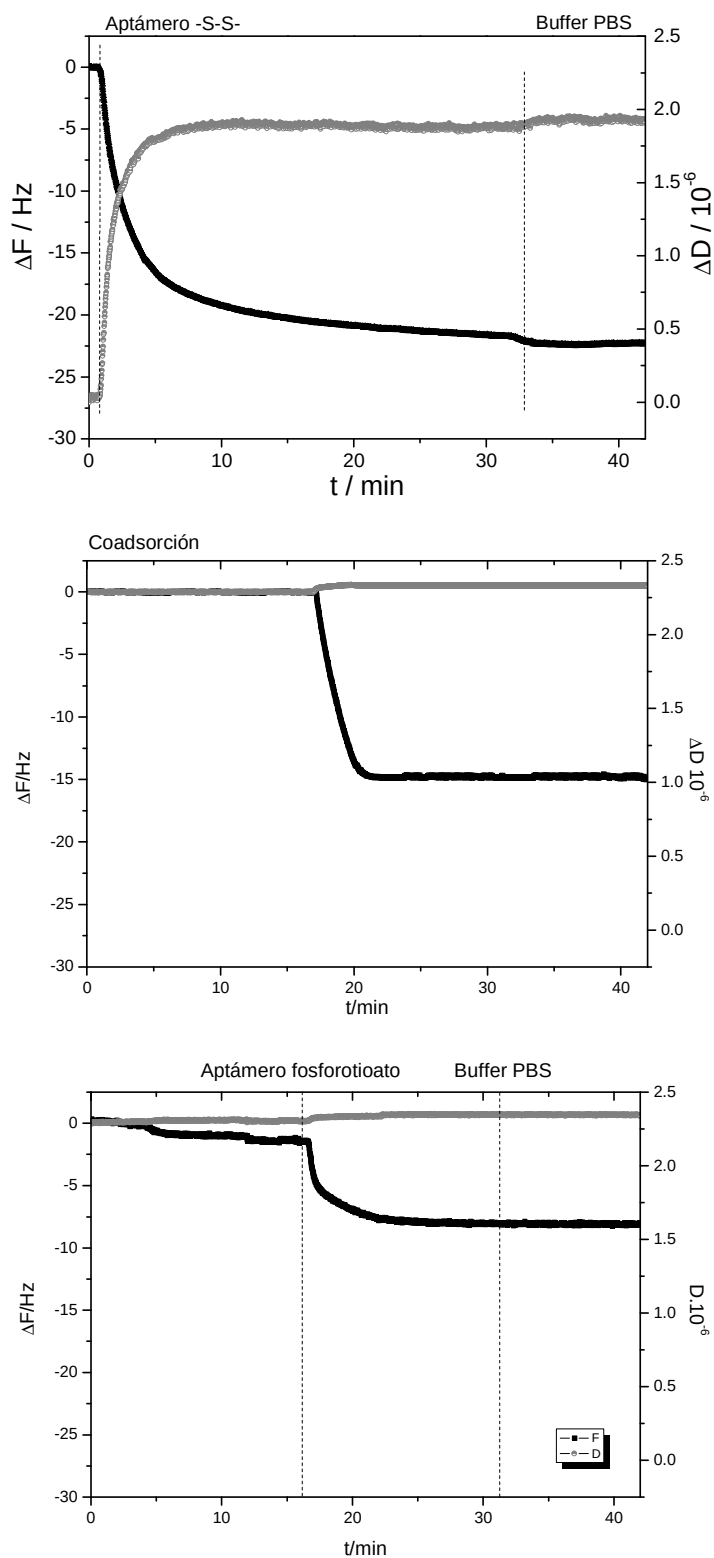


Figura 5.3 A. Cambios en la frecuencia (F , en negro) y la energía disipada (D , en gris) durante la exposición del sensor al aptámero: aptámero disulfuro (sup.); coadsorción mezcla equimolar aptámero/tiol corto (centro); aptámero fosforotioato (inf.)

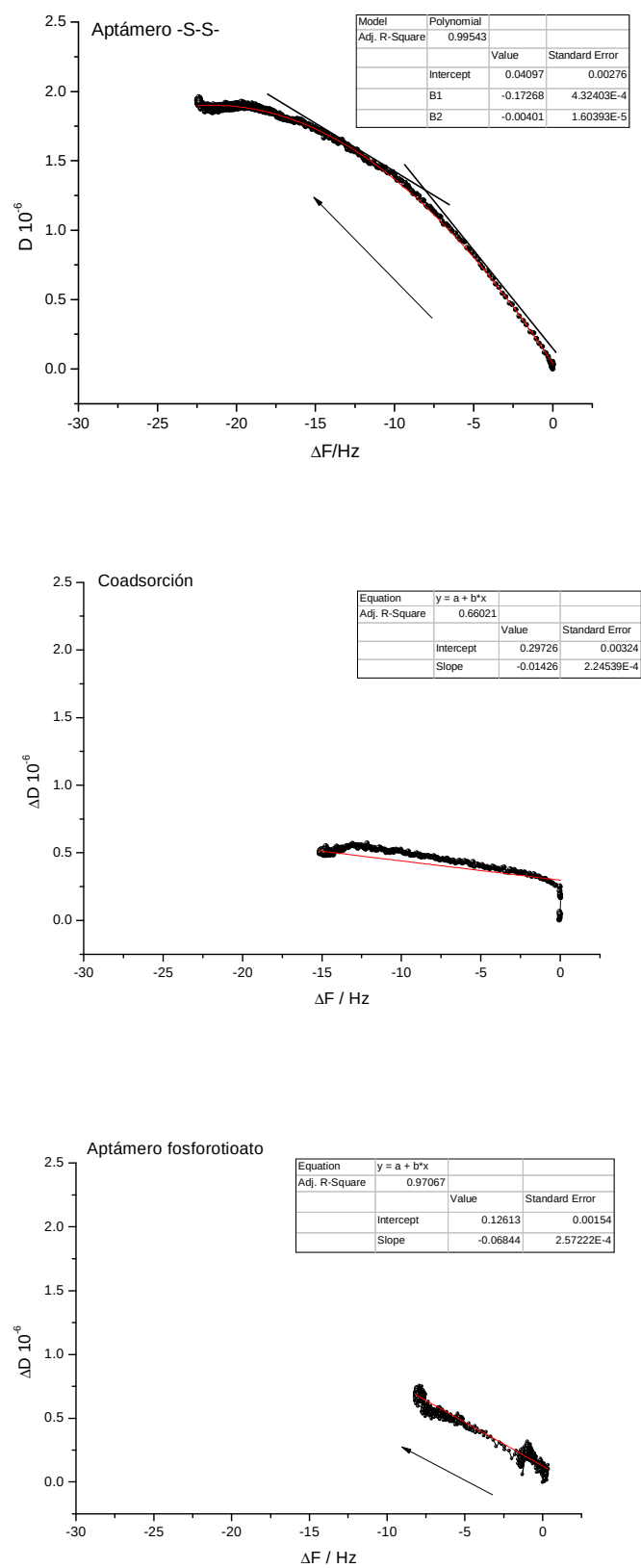


Figura 5.3 B. ΔD vs ΔF durante la exposición del sensor al aptámero: aptámero disulfuro (sup); coadsorción mezcla equimolar aptámero/tiol corto (centro); aptámero fosforotioato (inf.). La flecha indica el avance en función del tiempo

La Figura 5.3 muestra los cambios en función del tiempo en la frecuencia y la energía disipada para las tres estrategias de adsorción. Para una concentración $1\ \mu\text{M}$ de oligonucleótido, se observó que la interacción con el sustrato metálico es rápida, alcanzando un valor estable en 30 minutos aproximadamente. En el caso de la formación de monocapas autoensambladas de compuestos tiolados sobre superficies de oro policristalino los tiempos necesarios para modificar la superficie fueron similares a los observados en este trabajo (Ullman, 1996). Empleando QCM-D, Xia y colaboradores observaron que la quimisorción de secuencias simple cadena de 27 oligonucleótidos con un grupo tiol (HS-) alcanzó un valor estable de frecuencia (ΔF) para un tiempo inferior a los 60 minutos (Xia et al, 2010).

Además del cambio en la frecuencia, también se observó un incremento de la energía disipada (ΔD), respecto de la superficie de Au no modificada, debido al hecho que las moléculas quimisorbidas poseen libertad conformacional pues están ancladas a la superficie sólo por un extremo. Cabe señalar que para el caso de una película rígida o compacta los valores de ΔD medidos en experimentos de QCM-D se encuentran en el rango $0 - 2 \cdot 10^{-6}$, mientras que para un depósito viscoso, no rígido, se alcanzan valores del orden de $1,4 \cdot 10^{-5}$. En estos casos debe emplearse el modelo viscoelástico para obtener información cuantitativa (ver por ejemplo Beleguinou et al, 2008).

Los gráficos de ΔD vs ΔF sugieren que en el caso de la adsorción del aptámero disulfuro, por cada unidad de masa adsorbida, se obtuvo sobre la superficie una capa menos rígida, más disipativa, debido a la quimisorción de una mayor cantidad de hebras de ADN que se propagan hacia el seno de la solución. El ajuste de la curva no es lineal, sugiriendo un proceso en dos etapas que consistiría en la adsorción del aptámero disulfuro y la posterior ruptura del puente -S-S- análogamente a la quimisorción disociativa observada para compuestos orgánicos con un puente disulfuro (Nuzzo et al, 1987). En condiciones de coadsorción, la proporción de hebras de ADN adsorbidas es menor debido a la competencia con las moléculas de tiol corto. En este caso fue posible hacer un ajuste lineal de los datos medidos, hecho consistente con un proceso de una sola etapa. Se observó la misma tendencia para el anclaje del aptámero vía fosforotioato. Sin embargo la pendiente para este último tipo de anclaje resultó más pronunciada que para la coadsorción, hecho que sugiere la presencia de una capa superficial más disipativa.

En el caso de la quimisorción del aptámero usando 5 grupos fosforotioato, la interacción entre la superficie de Au y las hebras de ADN involucra 5 posiciones consecutivas que son los 5 átomos de S de las timinas terminales. Estos pueden actuar como separadores entre las hebras de ADN (ver Figura 5.2, esquema C). Además, dichos átomos de S resultan menos nucleofílicos que los del grupo tiol unidos a una cadena carbonada, por lo tanto es posible que la afinidad por los átomos de Au de la superficie sea menor en el caso del fosforotioato.

Con el fin de comparar el anclaje tipo disulfuro (-S-S-) frente al anclaje fosforotioato (5Ts), se agregó 2-mercaptoetanol (MCE) $1\mu\text{M}$ posteriormente a la adsorción del oligonucleótido. Los valores de cubrimiento superficial obtenidos a partir de las medidas de QCM-D se presentan en la Tabla 5.2.

	Moles. cm^{-2}		Moles. cm^{-2}
Oligo -S-S- (scramble)	$3,5 \cdot 10^{-11}$	Oligo 5Ts	$1,3 \cdot 10^{-11}$
+ MCE	$7,7 \cdot 10^{-10}$	+ MCE	$3,31 \cdot 10^{-10}$
MCE/Oligo -S-S- = 22		MCE/Oligo 5Ts = 25	

Tabla 5.2 Efecto de la adsorción de MCE (tiol corto) sobre el anclaje via disulfuro y fosforotioato

El cambio en la frecuencia medido luego de la interacción del MCE con la superficie de Au modificada con la hebra de ADN, fue 3,40 Hz para el disulfuro (scramble) y 1,48 Hz para el fosforotioato. En ninguno de los dos casos se observó un aumento de la frecuencia (ΔF). Este resultado podría sugerir que el tiol corto ocupa espacios libres en la superficie del sensor, sin desplazar a las moléculas de ADN quimisorbidas.

Estos resultados experimentales permitieron extrapolar condiciones de modificación de superficies de Au “limpias” (tipo de modificación concentración, tiempo, etc.) para armar una capa de reconocimiento con el fin de detectar un analito (ver capítulo 6).

De acuerdo con información de bibliografía el cubrimiento típico de una superficie de Au con una monocapa de alcanotioles de cadena corta es aproximadamente 30% (Strong y Whitesides, 1988). A partir de la estructura cristalina del Au (cúbica compacta) (Figura 5.4.) y los parámetros de la celda ($a = b = c = 407,82 \text{ pm}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$), se calcula que hay 1 átomo de Au por celda unidad, el cual ocupa una superficie de

$0,166 \text{ nm}^2$, de donde se infiere que hay $6,04 \cdot 10^{14}$ átomos de $\text{Au} \cdot \text{cm}^{-2}$, lo que equivale a $1,0023 \cdot 10^{-9} \text{ moles} \cdot \text{cm}^{-2}$.

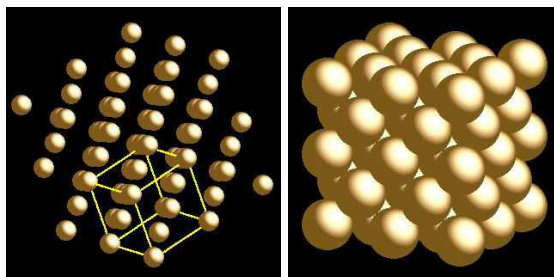


Figura 5.4 Estructura cristalina del Au: (izq.) red cúbica compacta, (der.) empaquetamiento compacto, tomado de http://www.webelements.com/_media/elements/crystal_structure_image/Au-bs.jpg

Empleando los datos de cubrimiento superficial obtenidos por QCM-D suponiendo válida la ecuación Suaerbrey (Tabla 5.1.), se concluyó que sólo el 1% de la superficie de Au está modificada. Partiendo de una concentración de oligonucleótido $1 \mu\text{M}$ y luego de 30 minutos de exposición, quedan aproximadamente $3,4 \cdot 10^{-10}$ moles de ADN sin adsorber, lo cual prueba que la cantidad de ADN no es el factor limitante. Los bajos cubrimientos superficiales obtenidos, sugieren que las hebras de ADN quimisorbidas se comportan como moléculas discretas y no como una película homogénea depositada sobre la superficie (Tsortos et al, 2008). Con fines comparativos, cabe señalar que el cubrimiento calculado para una monocapa de alcanotioles de 21 átomos de C, con un espaciado de $0,5 \text{ nm}$ entre moléculas, sobre una superficie de Au con empaquetamiento hexagonal compacto (hcp) es $7,76 \cdot 10^{-10} \text{ moles} \cdot \text{cm}^{-2}$ (Strong y Whitesides, 1988).

Este resultado resultó significativo a la hora de evaluar la respuesta frente al analito, pues si el cambio que se espera medir es pequeño (cambio conformacional debido al reconocimiento aptámero-AMP en este caso, o el cambio en la masa por el ingreso del analito) no resultará distinguible de la señal de base correspondiente a la superficie de Au no modificado con el ADN.

5.3 Reconocimiento molecular de la hebra complementaria (hibridización) y de AMP (molécula pequeña)

Los experimentos de hibridización permitieron obtener una medida indirecta de la presencia de oligonucleótido adsorbido (Tabla 5.3.) y de su funcionalidad frente al reconocimiento de la hebra complementaria tal como sugieren Ohshiro y Madedo (2010).

Secuencia oligonucleotídica	Moles/cm ²	Moléc./cm ²	Porcentaje de hibridización
Aptámero disulfuro (esquema A)	$3,9 \cdot 10^{-11}$	$2,3 \cdot 10^{13}$	56
Hebra complementaria	$2,2 \cdot 10^{-11}$	$1,3 \cdot 10^{12}$	
Aptámero tiolado (coadsorción) (esquema B)	$2,6 \cdot 10^{-11}$	$1,6 \cdot 10^{13}$	75*
Hebra complementaria	$1,9 \cdot 10^{-11}$	$1,2 \cdot 10^{13}$	
Aptámero fosforotioato (5Ts) (esquema C)	$1,3 \cdot 10^{-11}$	$7,8 \cdot 10^{12}$	60
Hebra complementaria	$7,75 \cdot 10^{-12}$	$4,67 \cdot 10^{12}$	

Tabla 5.3 Porcentaje de hibridización en función de la estrategia de modificación de la superficie

Debe tenerse en cuenta que la hibridización de una hebra inmovilizada a una superficie resulta en general menos favorable que en solución. Al menos tres factores pueden afectar al proceso en fase heterogénea: la repulsión electrostática entre hebras vecinas inmovilizadas, el impedimento estérico en función del cubrimiento superficial, y las interacciones inespecíficas de la hebra inmovilizada a la superficie (Ravan et al, 2014). La estrategia de coadsorción mostró un mayor porcentaje de hibridización, este resultado es consistente con lo observado por Herne y Tarlov (1997).

La técnica de QCM-D se ha aplicado con fines analíticos en algunos casos de genosensores (ver por ejemplo, Papadakis et al, 2012) y aptasensores (ver por ejemplo, Zhang y Yadavalli, 2011, sensor para IgE). Para correlacionar la señal con la concentración se puede evaluar el cambio en la frecuencia (ΔF), en la energía disipada (ΔD) o el cociente acústico ($\Delta D/\Delta F$). Cuando la especie a detectar tiene una masa molar relativamente grande, el reconocimiento por parte de las moléculas adsorbidas produce un cambio en la frecuencia posible de medir. Sin embargo, cuando el analito es una molécula de baja masa molecular ($M_r < 1000$ Da) el cambio en la frecuencia de oscilación está prácticamente en el límite de detección del instrumento ($1,8 \text{ ng/cm}^2$, $\Delta F = 0,1 \text{ Hz}$).

En el caso del sistema aptámero-AMP la relación entre la masa del aptámero con las dos moléculas de AMP respecto de la masa de aptámero es 1,1; es decir las dos moléculas de AMP ($M_{w_{AMP}} = 347,22$) representan aproximadamente un 7% de la masa del aptámero ($M_{w_{apt}} = 10.334$). Con respecto a la energía de disipación, el máximo de sensibilidad del instrumento está en $4 \cdot 10^{-8}$, la sensibilidad típica es $1 \cdot 10^{-7}$ aproximadamente.

La Figura 5.5 presenta las medidas correspondientes a la quimisorción del aptámero y el posterior evento de hibridización, para las tres formas de anclaje vía tiol.

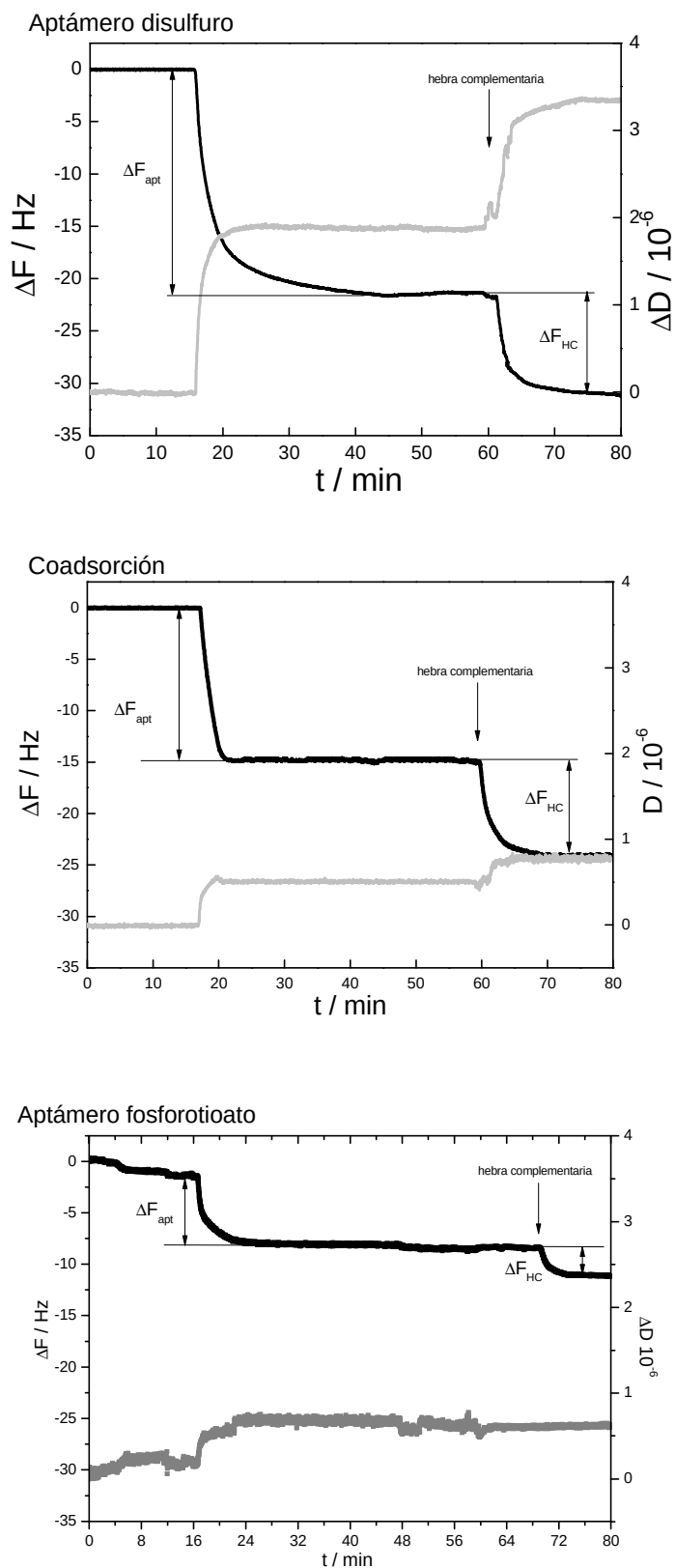


Figura 5.5 A: Cambios en la frecuencia (F , en negro) y la energía disipada (D , en gris) durante la hibridización de aptámero disulfuro, coadsorción aptámero+MCH y aptámero fosforotioato

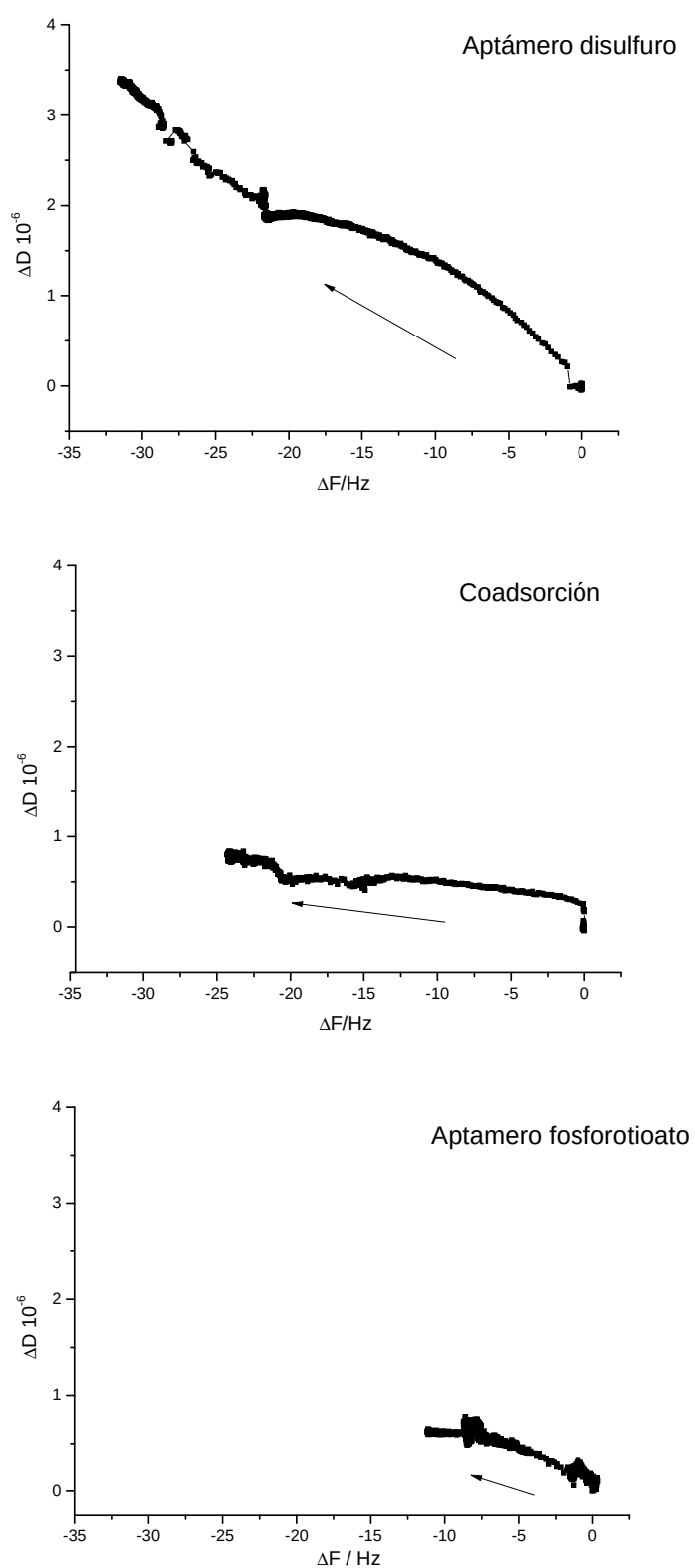


Figura 5.5 B: ΔD vs ΔF durante la hibridización: aptámero disulfuro (sup.), coadsorción aptámero+MCH (centro), aptámero fosforotioato (inf.)

Cuando el sensor modificado con el aptámero que reconoce AMP se puso en contacto con el analito, el cambio de la frecuencia no fue suficientemente significativo como para darle una aplicación analítica, tal como sugerían los cálculos realizados. Con respecto a la energía disipada se observó una disminución leve consistente con una mayor rigidización de las moléculas del aptámero quimisorbidas debido a que se favorece la estructura plegada (stem-loop) en presencia de AMP. Para las concentraciones de AMP más altas ensayadas ($[AMP] > 1000 \text{ nM}$) dicha disminución resultó algo más significativo (ver Figura 5.6).

Con fines comparativos se muestran en la Tabla 5.4 los valores de ΔF y ΔD medidos para el reconocimiento de la hebra complementaria como ejemplo de un analito de masa comparable al ADN, y para AMP una molécula pequeña. Un dato que también resulta relevante frente al reconocimiento molecular, es el grado de afinidad dado por la constante de afinidad o disociación (K_d) la cual también favorece a la hebra complementaria en este caso.

Molécula a reconocer ($1\mu\text{M}$)	Mr (Da)	K_d (μM)	ΔF medido (Hz) aptámero –S-S- quimisorbido	ΔD (10^{-6})
Hebra complementaria	8.076	0,83 *	10,17	1,46
AMP	347,22	6	0,38	0,29

Tabla 5.4 Respuesta del aptámero –S-S- frente a su hebra complementaria y AMP

* Valor de referencia para un oligonucleótido de 10 unidades y su hebra complementaria tomado de Okahata et al, 2000.

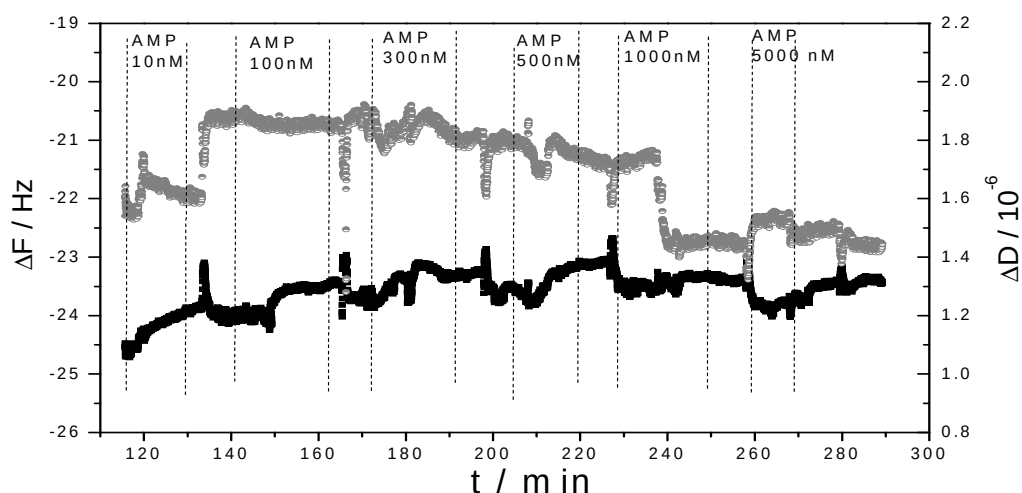


Figura 5.6 Cambios en función del tiempo en la frecuencia (negro) y la energía disipada (gris) frente al agregado de concentraciones crecientes de AMP (10-5.000 nM) al sensor modificado con el aptámero según el esquema A

El agregado de guanosina en concentración 1 μM , que no es reconocido por el aptámero inmovilizado, no generó cambios significativos en la frecuencia ni en la energía disipada.

Para resolver las limitaciones asociadas a la detección de moléculas pequeñas, algunas estrategias que se describen en bibliografía proponen construcciones más complejas con el fin de magnificar el cambio frente al evento de reconocimiento (ver por ejemplo, Zheng et al, 2013).

5.4. Otros efectos de la capa de reconocimiento que permite explorar QCM-D

5.4.1. Efecto del $[Mg(H_2O)_6]^{2+}$ sobre la conformación de secuencias de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos a pH 7 se encuentran como polianiones debido a los equilibrios ácido-base de los grupos fosfato. En medio acuoso salino los cationes mono o divalentes interactúan con dichos grupos compensando las cargas (ver por ejemplo Sines et al, 2000). En particular los cationes Mg^{2+} habitualmente forman parte de la composición de los buffers usados para hibridización, estudios con nucleasas, procesos de SELEX, etc. Se han reportados trabajos en bibliografía que muestran que los cambios en el espesor de una capa de oligonucleótidos en función de la concentración de Mg^{2+} pueden ser evaluados usando QCM-D (Papadakis et al, 2010; Osypova et al, 2015).

El ingreso a la celda de medición de un flujo de buffer Tris 50 mM, pH 7,2 conteniendo Mg^{2+} 10 mM, produjo una disminución en la energía disipada, consecuencia de una rigidización de la hebra de ADN ($\Delta D \sim 1.10^{-6}$). A su vez, se registró un aumento en la frecuencia ($\Delta F \sim 3$ Hz) que puede atribuirse a una disminución de la cantidad de moléculas de agua de la esfera de hidratación dado que la hebra de ADN puede adquirir una estructura más compacta si están compensadas las cargas del polianión. Cuando se diluyó el catión por agregado de buffer Tris sin Mg^{2+} , se revirtieron los cambios en la frecuencia y la energía, mostrando que el proceso es reversible. La forma de la curva ΔD vs ΔF resultó lineal sugiriendo que la entrada y salida de Mg^{2+} estaría ocurriendo en una etapa (Figura 5.7).

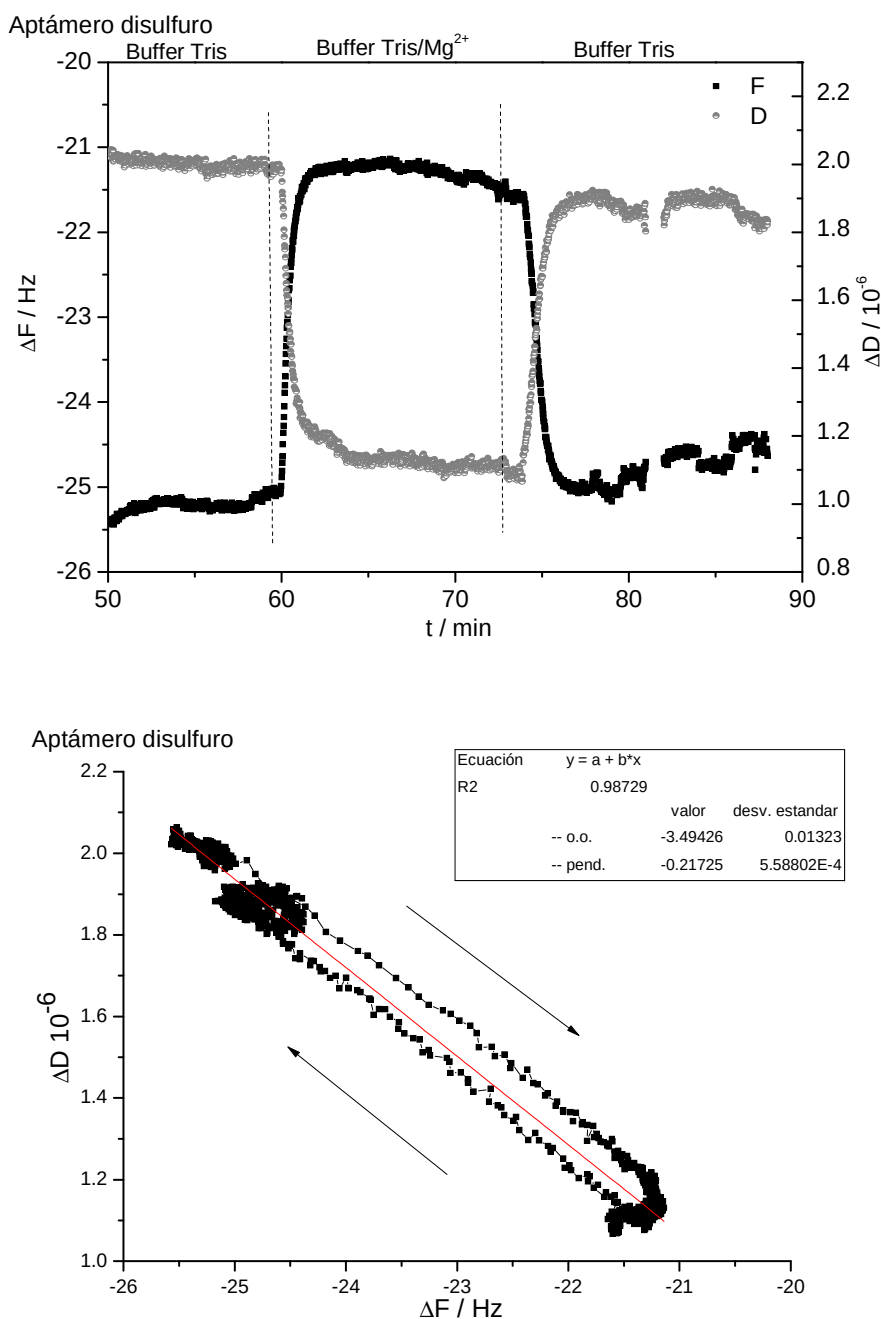


Figura 5.7 Respuesta medida por QCM-D de la superficie modificada con el aptámero disulfuro frente al agregado de buffer Tris 50 mM/MgCl₂ 10 mM.

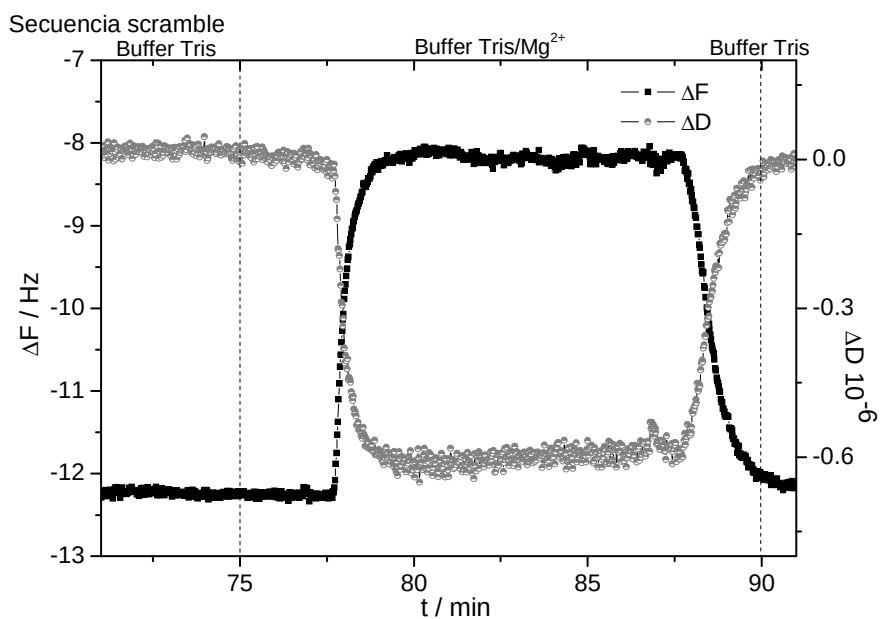
La Tabla 5.5 muestra la relación entre moléculas de H₂O y aptámero calculada a partir del cambio en la frecuencia asumiendo válida la ecuación de Sauerbrey (ecuación 5.3). Considerando que cada aptámero posee 32 nucleótidos con un grupo fosfato cada uno, el cociente entre las moléculas de H₂O intercambiadas y grupos fosfato presente, resulta aproximadamente igual a 24. Este valor es coherente pensando en términos de las

moléculas de H_2O de la red de hidratación del polianión que pueden ser intercambiadas al ingresar $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$.

	Moléculas cm^{-2}	Cociente
H_2O	$1,8 \cdot 10^{15}$	783
Aptámero (disulfuro)	$2,3 \cdot 10^{13}$	
Grupos fosfato por aptámero	$7,4 \cdot 10^{14}$	24

Tabla 5.5 Relación entre moléculas de H_2O intercambiadas y aptámero

Con fines comparativos, se realizó el mismo experimento empleando la secuencia scramble (Figura 5.8). Dado que se observó la misma tendencia que en el caso del aptámero, se infiere que ambos tipos de hebras de ADN pueden experimentar cambios conformacionales independientemente de la secuencia nucleotídica y de la presencia de un analito.



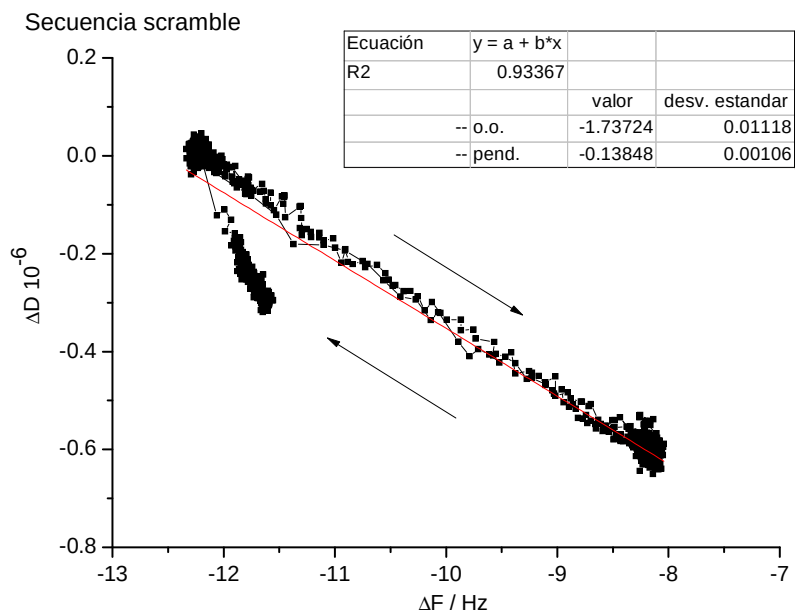


Figura 5.8 Respuesta medida por QCM-D de la superficie modificada con la secuencia scramble frente al agregado de buffer Tris 50 mM/MgCl₂ 10 mM.

Ambas secuencias de ADN poseen temperaturas de desnaturalización similares ($T_{m_{apt}} = 77,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{m_{scramble}} = 76,1\text{ }^{\circ}\text{C}$), sin embargo, para el caso del aptámero la pendiente de la curva ΔD vs. ΔF resultó un 35% más pronunciada que en el caso de la secuencia scramble; además el desplazamiento del Mg^{2+} mostró cierta histéresis que no fue observada cuando se usó la secuencia scramble.

El aptámero tiene la posibilidad de formar una estructura secundaria con dos regiones de complementariedad por interacciones tipo Watson y Crick (“stem”) y dos regiones circulares (“loop”) no complementarias tal como se esquematiza en la Figura 5.9. La presencia de una elevada fuerza iónica favorece la formación de dichas estructuras (Egli y Saenger, 1984). Dado que la secuencia scramble tiene un orden aleatorio de los nucleótidos, es menos probable que forme estructuras secundarias.

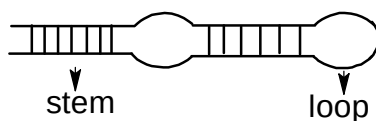


Figura 5.9 Esquema de la estructura secundaria del aptámero de AMP

5.4.2. Rehidratación de la superficie modificada con hebras de ADN

Un aspecto experimental que resulta de interés cuando se modifican superficies metálicas con moléculas que tienen capacidad de reconocimiento como es el caso de los aptámeros, es la estrategia de aplicación. Una metodología posible consiste en agregar una gota de la solución cubriendo la superficie y dejarla el tiempo necesario para lograr una efectiva interacción. Cuando por razones de orden práctico se deja llegar a sequedad (evaporación total del solvente), debe evaluarse el efecto sobre las moléculas adsorbidas que implica la solvatación.

La Figura 5.10 muestra que luego de haber llevado a sequedad el sensor modificado con el aptámero, la posterior rehidratación con buffer produce un cambio relativo similar en magnitud para F y D que al principio del experimento cuando se expone la superficie de Au limpia.

Los experimentos de hibridización que se hicieron a continuación sobre el sensor rehidratado, sugieren que la capacidad de reconocimiento del aptámero no se ve afectada por este proceso puesto que se obtuvieron porcentajes de hibridización similares cuando no se sometió al sensor a una etapa de secado y rehidratación. A su vez, se obtuvieron resultados análogos cuando se usó la estrategia del esquema C, modificación con fosforotioato.

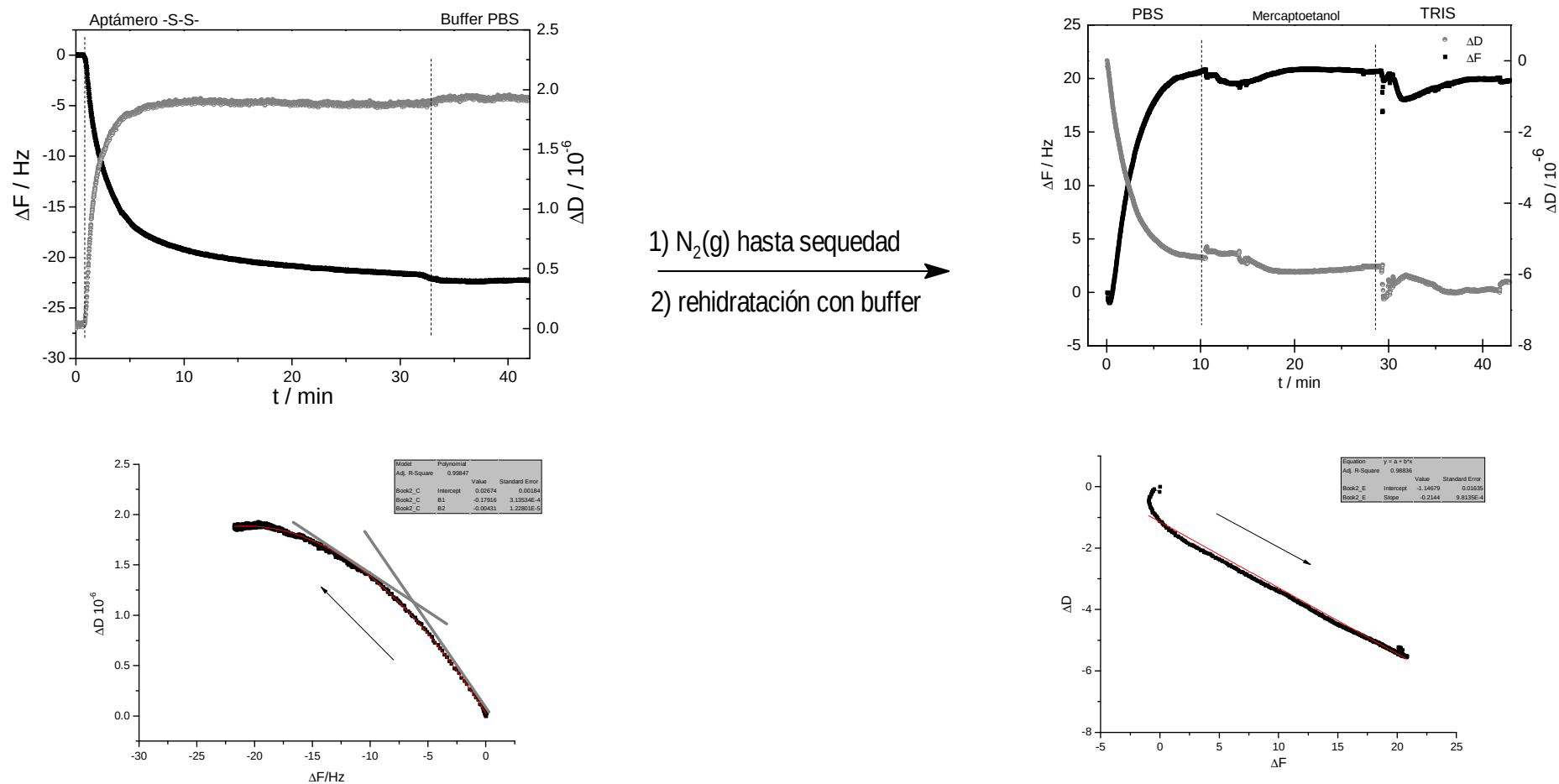


Figura 5.10 Cambios en función del tiempo en F y D y gráficos ΔD vs ΔF debidos a la quimisorción del aptámero disulfuro (Figura 5.2 esquema A) sobre el sensor de Au (izq.) y rehidratación (der.).

Al comparar la forma de los gráficos ΔD vs ΔF se observó una curvatura para el caso de la quimisorción sugiriendo un proceso con más de una etapa como se discutió en la sección 5.2 para el caso del aptámero disulfuro, mientras que la rehidratación estaría sucediendo en una sola etapa. Este tipo de análisis a partir de los gráficos de ΔD vs. ΔF permitió estudiar el efecto del pH y otros parámetros en la adsorción de proteínas sobre superficies modificadas con polímeros (Belegrinou et al, 2008) y también se ha aplicado al estudio de hebras de ADN (ver por ejemplo Xia et al, 2010).

Un aspecto importante cuando se trabaja con biomoléculas es el modo de evaluar el agua de la interfaz (agua bulk) que está en contacto con el depósito. Si el mismo es rígido, el agua bulk introduce un incremento de la masa y una disminución de la viscosidad, mientras que para el caso de una película disipativa el efecto es diferente y está contemplado en el modelo de Voight.

La opción de hacer la modificación de la superficie por inmersión, debe atender al tiempo necesario para que se logre la modificación superficial. Los experimentos de QCM-D mostraron que tiempos de contacto del orden de 30 minutos eran suficientes. Un factor a considerar es la necesidad de emplear un mayor volumen de solución, que implica un mayor costo.

Desde el punto de vista analítico, la rehidratación de la capa de reconocimiento molecular cobra relevancia cuando se hacen estudios de reutilización de un sensor basado en la funcionalidad de dicha capa. En un proceso de producción del dispositivo, el efecto del tiempo de almacenamiento del mismo también debe ser evaluado.

5.5 Conclusiones

Los datos obtenidos por una técnica experimental con un principio de funcionamiento distinto al de las técnicas electroquímicas discutidas con anterioridad, abrió otra ventana de observación y aportó información para comprender los fenómenos de inmovilización de secuencias oligonucleotídicas sobre superficies de Au. En este trabajo de tesis, la técnica de microbalanza de cristal de cuarzo con disipación permitió interrogar la superficie de Au frente a diferentes estrategias de modificación con secuencias de oligonucleótidos, explorar la funcionalidad de las mismas frente al reconocimiento molecular y obtener información práctica con vistas a una potencial aplicación en el desarrollo de sensores aptaméricos.

Los cambios conformacionales del oligonucleótido en función del entorno químico, como por ejemplo la presencia de $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ pudieron ser detectados, con esta técnica.

QCM-D tiene también aplicaciones analíticas, pero no se aplicó con ese fin en este trabajo.

La técnica resulta adecuada para detectar los cambios conformacionales del ADN en presencia de cationes en medio acuoso. Esta interacción resulta clave en otras aplicaciones funcionales que se han descripto para los ácidos nucleicos de cadena simple como por ejemplo la actividad enzimática (DNAzimas).

Para la interpretación de los resultados obtenidos, se asumió válida la relación de Sauerbrey, sin embargo sería de interés emplear el modelo viscoelástico para estudiar el comportamiento de las secuencias de ADN quimisorbidas dada la posibilidad de estimar parámetros de la capa como el espesor y la viscosidad.

Las mediciones presentadas en este capítulo fueron realizadas con la colaboración de la Lic. Ana Sol Peinetti en el laboratorio del Dr. Fernando Battaglini (FCEyN-UBA) a quien se agradece muy especialmente el acceso al equipamiento y el asesoramiento brindado en torno a la técnica y sus posibilidades.

***Capítulo 6. Nanopartículas de oro
confinadas modificadas con
secuencias oligonucleotídicas***

6.1. Introducción

Los dispositivos basados en nanomateriales han cobrado importancia en los últimos años en el desarrollo tecnológico de sensores con aplicaciones químicas y bioquímicas debido a sus interesantes propiedades electrónicas, ópticas, químicas, catalíticas y electroquímicas. En particular, los nanomateriales porosos obtenidos por anodizado electroquímico permiten sintetizar estructuras autoordenadas, de geometría controlada, siendo la alúmina (Al_2O_3) porosa uno de los ejemplos más conocidos. Esta técnica presenta ventajas sobre las técnicas litográficas que son más costosas y demandan mayores tiempos de producción. Las estructuras nanoporosas de alúmina son fácilmente modificables y permiten la interacción con polielectrolitos. En general, los nanomateriales poseen una favorable relación superficie/volumen que incrementa la señal correspondiente a la interacción analito-superficie. Además, el tamaño y la superficie de los nanoporos permiten un transporte selectivo a nivel molecular integrando procesos de separación y detección en un solo dispositivo (Santos et al, 2013).

Los nanomateriales basados en óxido de aluminio anodizado encuentran aplicaciones para el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos de tipo voltamétrico, amperométrico e impedimétrico, entre otros principios de detección (ver 1.3.3). Puesto que el óxido de aluminio es aislante, debe ser modificado con un material conductor. Para ello se electrodeposita un metal, Au o Pt por ejemplo, el cual está en contacto con la base de aluminio del poro a través de una barrera de alúmina (Figura 6.1). De este modo se sintetizan agregados metálicos que contienen entre 2 y 200 átomos de metal denominados clusters o nanoclusters (Lantiat et al, 2010; Peinetti et al, 2013).

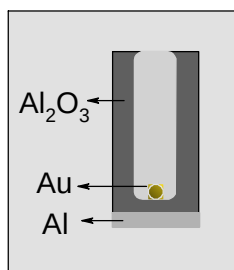


Figura 6.1 Esquema de un nanoporo de Al_2O_3 modificado con Au

En este capítulo se estudia la modificación de nanopartículas de Au confinadas en una matriz de alúmina con secuencias oligonucleotídicas para la detección electroquímica de moléculas pequeñas, empleando como sistema modelo el aptámero desarrollado por Szostak para el reconocimiento de adenosina/AMP/ATP. Esta parte del trabajo de investigación fue desarrollada en colaboración con la Lic. Ana Sol Peinetti y el Dr. Fernando Battaglini.

6.2. Breve descripción del sistema y respuesta electroquímica

El tratamiento de la alúmina con H_2SO_4 como electrolito permite obtener una estructura nanoporosa ($\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3$). La caracterización por FE-SEM (*field emission scanning electron microscope*) permitió determinar el tamaño de poro (11 ± 1 nm), la distancia interporo (35 ± 4) nm y la profundidad de los mismos (1000 nm) (Peinetti et al, 2013). Con el fin de obtener un arreglo de nanoelectrodos ($\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{AuNP}$) a la estructura nanoporosa, sumergida en una solución de $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$, se le aplicó una secuencia de pulsos de electrodeposición según se describe en 2.2.3.4.

El análisis por EXAFS (*extended X-ray absorption fine structure*) de las nanopartículas formadas en el fondo de los nanoporos, asumiendo una geometría esférica, mostró un diámetro promedio de ($2,3 \pm 0,4$) nm (Peinetti et al, 2015). La superficie metálica de las nanopartículas obtenidas por electrodeposición está libre de agentes estabilizantes y por lo tanto presenta una eficiente respuesta frente a la transferencia de carga y la modificación por quimisorción.

La respuesta electroquímica del arreglo de nanoelectrodos obtenido se evaluó por voltametría cíclica (CV), voltametría de onda cuadrada (SWV) e impedancia (EIS) en solución de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ según se detalla también en 2.2.3.4. La Figura 6.2 muestra la respuesta electroquímica (CV, SWV y EIS) empleando $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ como sonda redox. La corriente faradaica obtenida confirmó que dicha sonda puede alcanzar la superficie de la nanopartícula de Au depositada en el fondo del nanoporo.

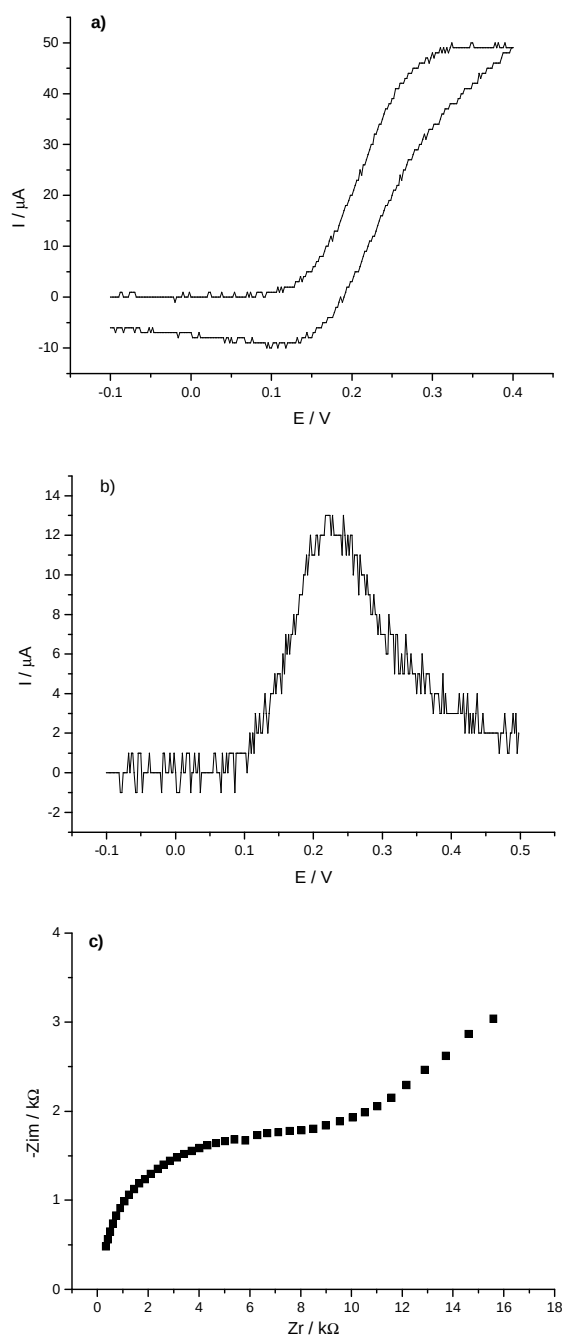


Figura 6.2 Respuesta electroquímica del arreglo de nanoelectrodos (Al/Al₂O₃/AuNP) en K₄[Fe(CN)₆] 50 mM / Hepes 50 mM, pH 7,4: a) voltametría cíclica (-0,1 V a 0,4 V, 50 mV/s); b) voltametría de onda cuadrada (-0,1 V a 0,5 V); c) impedancia (medida al potencial formal de la cupla redox, $E^{\circ} = 0,2$ V vs. Ag/AgCl (KCl 3M), frecuencias: 1 Hz – 10 kHz, amplitud 10 mV)

La separación entre nanoelectrodos, el radio y la altura del poro son parámetros del material que afectan la respuesta amperométrica en función de la velocidad de barrido. A bajas velocidades de barrido predomina la difusión radial, el voltograma adopta una forma sigmoidea. En cambio a altas velocidades de barrido predomina la difusión lineal, puesto que la capa difusional es muy delgada y cada nanoelectrodo se comporta independientemente (Bard y Faulkner, 2000). En este caso, se observó para la voltametría cíclica un comportamiento mixto de difusión radial y lineal (Figura 6.2 a)) (Peinetti et al, 2013).

El espectro de impedancia del arreglo de nanoelectrodos (Al/Al₂O₃/AuNP) (Figura 6.2 c), presentó la forma característica con una zona de control cinético a altas frecuencias (semicírculo) y una región donde predomina el control por transferencia de masa a bajas frecuencias tal como se explicó en el Capítulo 2 (ver Figura 2.16).

Sin embargo, luego de modificar la superficie de las AuNPs con la secuencia oligonucleotídica, el gráfico de Nyquist cambió significativamente (ver Figura 6.5). El proceso limitante es el que tiene lugar en la base del nanoporo donde se encuentra la nanopartícula de Au. A altas frecuencias el gráfico resultó consistente con una cinética lenta, mientras que a bajas frecuencias es muy acotada la región donde predomina el control por transferencia de masa. Tal como se expuso en 2.1.1.6, en estas condiciones es posible despreciar el aporte de la componente de Warburg (Z_w) frente a la resistencia a la transferencia de carga, R_{ct} . El circuito equivalente empleado entonces para ajustar los datos medidos es el siguiente (Figura 6.3):

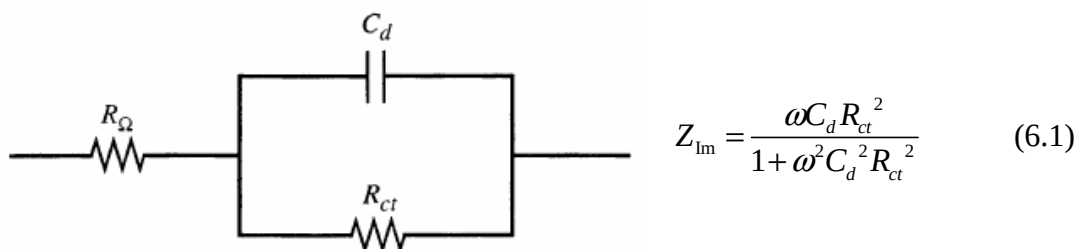


Figura 6.3 Circuito equivalente para el ajuste de la curva de impedancia, cuando la impedancia de Warburg es despreciable: R_{Ω} resistencia de la solución, C_d componente capacitiva, R_{ct} resistencia a la transferencia de carga

Empleando los valores de R_{ct} , Z_{im} y la ecuación (6.1), fue posible evaluar el cambio en la componente capacitiva (C_d) en función del reconocimiento molecular.

6.3. Quimisorción de secuencias oligonucleotídicas sobre nanopartículas de oro confinadas

La experiencia adquirida con los electrodos de Au de dimensiones milimétrica discutidos en los capítulos 3 y 4, junto con los resultados obtenidos para las distintas estrategias de modificación de la superficie de Au medidos por microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (capítulo 5), fueron el punto de partida para avanzar en la modificación de las AuNPs con una secuencia oligonucleotídica (Figura 6.4). Se hicieron ensayos en diferentes condiciones de concentración de oligonucleótido, tiempo de inmersión, composición del buffer de incubación y tipo de anclaje, evaluando la respuesta electroquímica del sistema por SWV y EIS en solución de $K_4[Fe(CN)_6]$.

La inmersión de los nanoelectrodos durante 30 minutos en una mezcla equimolar (1 μ M) de oligonucleótido y mercaptohexano, producto de la reducción con TCEP en fase homogénea, resultó efectiva para modificar la superficie de las nanopartículas (ver 2.2.5.3). Concentraciones menores de oligonucleótido (0,5 o 0,1 μ M) requerían tiempos de inmersión mayores a 1 hora. El anclaje del oligonucleótido a la superficie de la AuNP produjo un marcado descenso de la corriente medida por voltametría de onda cuadrada y un corrimiento de la señal hacia potenciales mayores (ver Figura 6.5 b). Ambos efectos se deben al bloqueo parcial que produce sobre la superficie metálica la quimisorción del polianión, y a la repulsión electrostática entre éste y la sonda redox también de carácter aniónico, lo que conduce a un aumento de la irreversibilidad de la cupla redox.

Paralelamente, el análisis por absorción de rayos X mostró que el cubrimiento de la superficie de Au con tiol en condiciones de coadsorción fue aproximadamente 60%. Ramallo-Lopez y colaboradores (2006) determinaron por las mismas técnicas de estudio, que la adsorción de hexanotioles sobre nanopartículas de Au depende del tamaño de las mismas. Para clusters de nanopartículas de 2,4 nm de diámetro, dichos autores obtienen un cubrimiento de 65 %, valor muy próximo al obtenido con el sistema en estudio en este trabajo. Es interesante mencionar que dicho valor duplica el reportado

para la adsorción de alcanotioles sobre Au(111) (Strong y Whitesides, 1988) poniendo de manifiesto la capacidad de las AuNPs obtenidas frente a la quimisorción de tioles como se mencionó previamente.

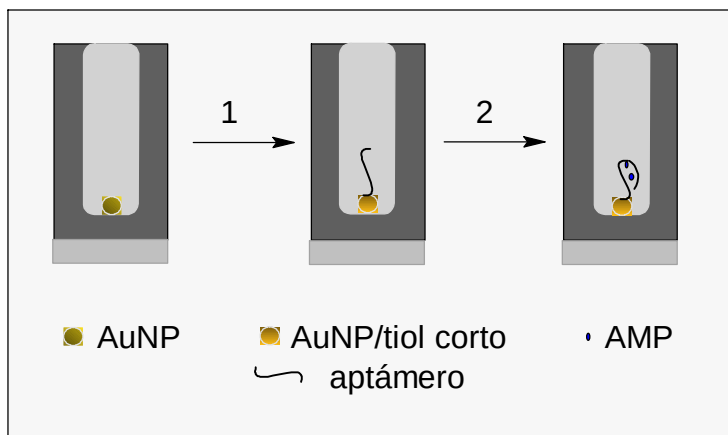


Figura 6.4 Representación de las etapas de modificación de un nanoporo de alúmina. 1: Coadsorción del aptámero y MCH. 2: Reconocimiento de AMP

Con fines comparativos se modificaron las AuNPs directamente con el oligonucleótido disulfuro (-S-S-) en concentración 1 μM sin reducción previa, empleando las mismas condiciones experimentales que en el caso anterior. La voltametría de onda cuadrada mostró un abrupto descenso de la señal de la cupla redox (Figura 6.5 b). Este resultado indicó, por un lado, que el tiempo de incubación empleado (30 minutos) fue suficiente para que se produzcan, sobre la superficie de la nanopartícula, la adsorción del oligonucleótido y la reducción del puente disulfuro (-S-S-) (reducción en fase heterogénea). Por otro lado, la mayor disminución de la señal electroquímica respecto de la modificación por coadsorción descrita previamente, evidenció un mayor bloqueo de la superficie, puesto que en ausencia de un tiol corto, sólo se adsorben secuencias oligonucleotídicas las cuales son más voluminosas y de carácter polianiónico. Una vez más, estos resultados son consistentes con los experimentos realizados por QCM-D sobre oro bulk, donde se obtuvieron mayores cubrimientos superficiales con secuencias oligonucleotídicas para la estrategia de anclaje a la superficie de Au vía el oligonucleótido disulfuro que para el caso de coadsorción (ver 5.2). Dadas las dimensiones nanométricas del arreglo de nanoelectrodos confinados en el fondo de los poros, es razonable pensar que la competencia por la superficie resulta más favorable para el tiol corto por su menor tamaño que para las hebras de ADN. Es importante

destacar que la presencia del alcanotiol de cadena corta, minimiza la adsorción inespecífica de moléculas de oligonucleótido sobre la nanopartícula.

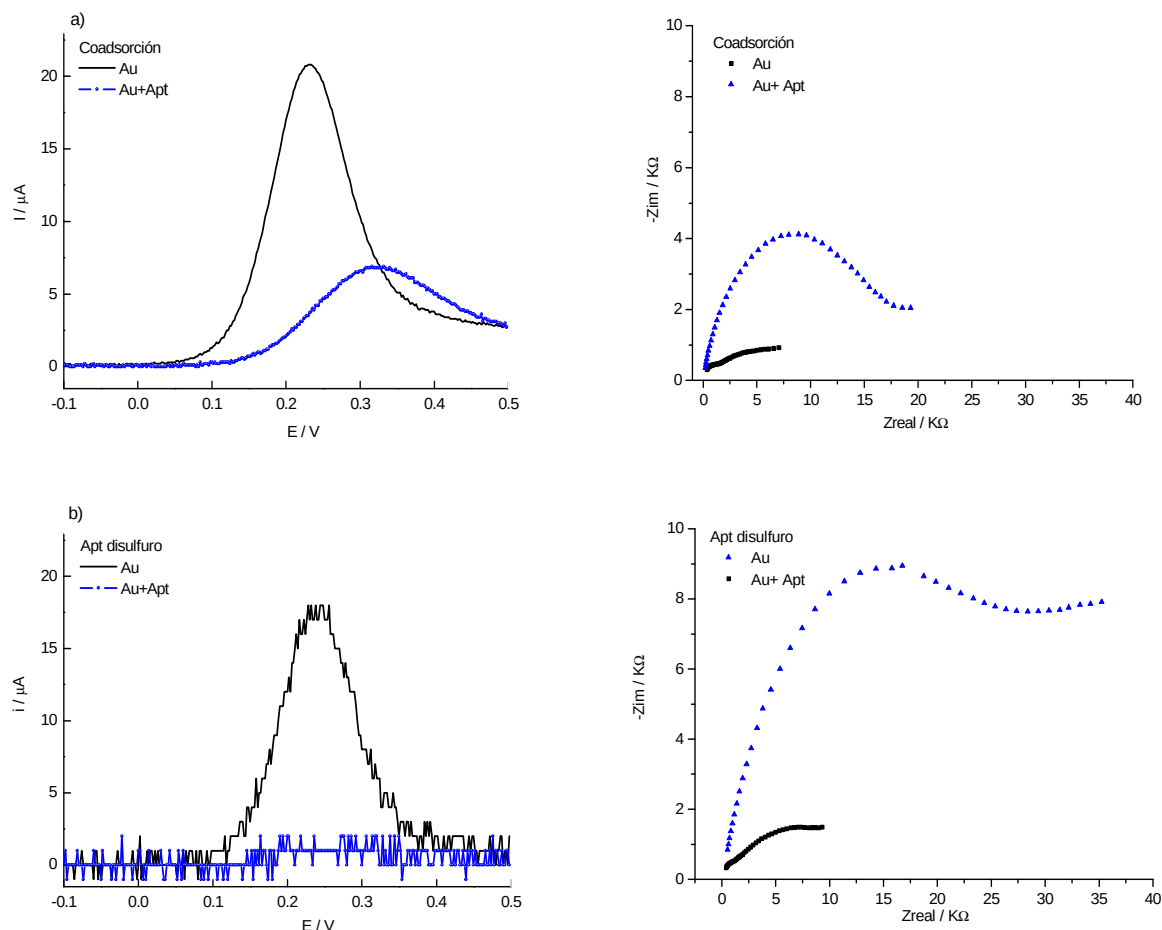


Figura 6.5 Respuesta en solución de $[Fe(CN)_6]^{4-}$ 50 mM / Hepes 50 mM pH 7,2 medida por SWV y EIS para la modificación de AuNPs: a) coadsorción aptámero/tiol corto, b) adsorción de oligonucleótido disulfuro

6.4 Detección de AMP

Puesto que ambas estrategias de modificación de las AuNPs resultaron efectivas, se avanzó en la exploración de la respuesta electroquímica frente al analito (AMP). Para ello se incubaron los nanoelectrodos modificados con buffer Tris 50 mM, pH 7,2 durante 15 minutos, se midió la respuesta en solución de $[Fe(CN)_6]^{4-}$, luego se incubó con solución de AMP (500 nM) en el mismo buffer y se volvió a medir. La Figura 6.6

muestra los espectros de impedancia obtenidos para ambas estrategias de modificación empleando la misma concentración de ADN ($1 \mu\text{M}$). En el caso de la coadsorción aptámero/tiol corto, se incrementó la R_{tc} luego de incubar con buffer (Figura 6.6 b) sugiriendo que la hebra de ADN adsorbida modifica su conformación, dificultando la transferencia de carga de la sonda redox sobre la superficie. Cuando se produce el reconocimiento de AMP, el cambio es más drástico aún, consecuencia de una mayor proporción de la estructura plegada (“*stem-loop*”) frente a la estructura desplegada (“*random coil*”).

Sin embargo, las nanopartículas modificadas con el aptámero disulfuro, prácticamente no presentaron cambios en el espectro de impedancia luego de incubar con el buffer. El mayor impedimento estérico sobre la superficie de la AuNP debido a la adsorción de más hebras de ADN, estaría restringiendo los cambios conformacionales en este entorno confinado. Consecuentemente, tampoco se observó un cambio muy significativo frente al reconocimiento del AMP.

Estos ensayos mostraron que al modificar las AuNPs en condiciones de coadsorción se obtiene una capa de reconocimiento molecular sensible frente a la detección de AMP. De aquí en adelante para modificar las nanopartículas se empleó la mezcla equimolar aptámero/tiol corto obtenida por reducción con TCEP.

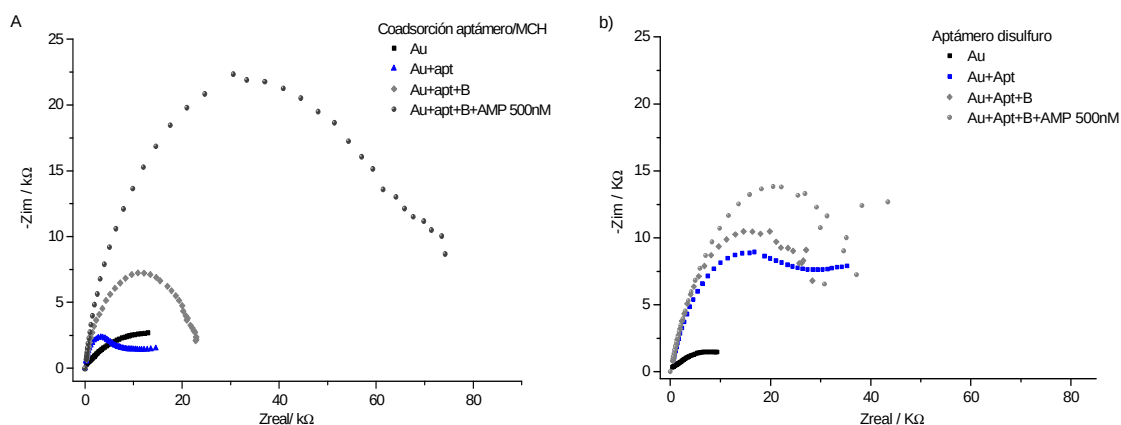


Figura 6.6 EIS en $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 50 mM / Hepes 50 mM pH 7,2. a) coadsorción aptámero/tiol corto, b) aptámero disulfuro

A diferencia del caso de los electrodos de área geométrica $0,071 \text{ cm}^2$ presentados en el capítulo 4, las dimensiones nanométricas de la nanopartícula hacen que sea innecesario el tratamiento posterior con MCH para armar la capa de reconocimiento luego de la incubación con la mezcla aptámero/tiol de cadena corta. Se evita un paso en la construcción de dicha capa, otra ventaja del sistema aquí presentado respecto de las construcciones sobre electrodos de dimensiones milimétricas.

La etapa siguiente consistió en explorar la respuesta de las nanopartículas modificadas en condiciones de coadsorción frente a distintas concentraciones de AMP. Se evaluó la diferencia en el valor de la resistencia a la transferencia de carga en presencia y ausencia de AMP ($\Delta R_{tc} = R_{tc} (\text{Al/Al}_2\text{O}_3/\text{AuNP/Apt-AMP}) - R_{tc} (\text{Al/Al}_2\text{O}_3/\text{AuNP/Apt})$) luego de la incubación con el buffer, de manera análoga a lo realizado con los electrodos de área geométrica $0,071 \text{ cm}^2$ (ver 4.3). Cada experimento se realizó por triplicado empleando electrodos independientes. El gráfico Nyquist (Figura 6.7) indicó que cuanto mayor fue la concentración de AMP empleada, mayor resultó la resistencia a la transferencia de carga del sistema. El resultado experimental obtenido, puede explicarse considerando el cambio conformacional del aptámero frente al reconocimiento del analito. Tal como se mencionó en 1.4 y se muestra en la Figura 4.19, la presencia de AMP favorece la estructura plegada (“stem-loop”) frente a la forma desplegada (“random coil”) del aptámero. Este cambio conformacional duplica el radio promedio del aptámero pasando de 1 a 2 nm aproximadamente, según los cálculos teóricos reportados a partir de la estructura obtenida por RMN en solución para el sistema aptámero-AMP (ver Figura 6.9). En consecuencia, se ve dificultado el acceso de la sonda redox a la nanopartícula lo cual se traduce en un aumento de la respuesta capacitiva del sistema.

Desde el punto de vista analítico, es interesante comparar la sensibilidad del sistema $\text{Al/Al}_2\text{O}_3/\text{AuNP/Apt}$ con respecto a los electrodos descartables. Para una concentración 500 nM de AMP el arreglo de nanoelectrodos mostró una sensibilidad de $58 \text{ } \Omega/\text{nM}$, mientras que el valor obtenido con los electrodos descartables fue tan solo $1 \text{ } \Omega/\text{nM}$ según se discutió en 4.3.

El límite de cuantificación obtenido para la detección de AMP en las condiciones de trabajo, fue 10 nM valor comparable con datos de bibliografía (ver por ejemplo, Willner y Zayats, 2007).

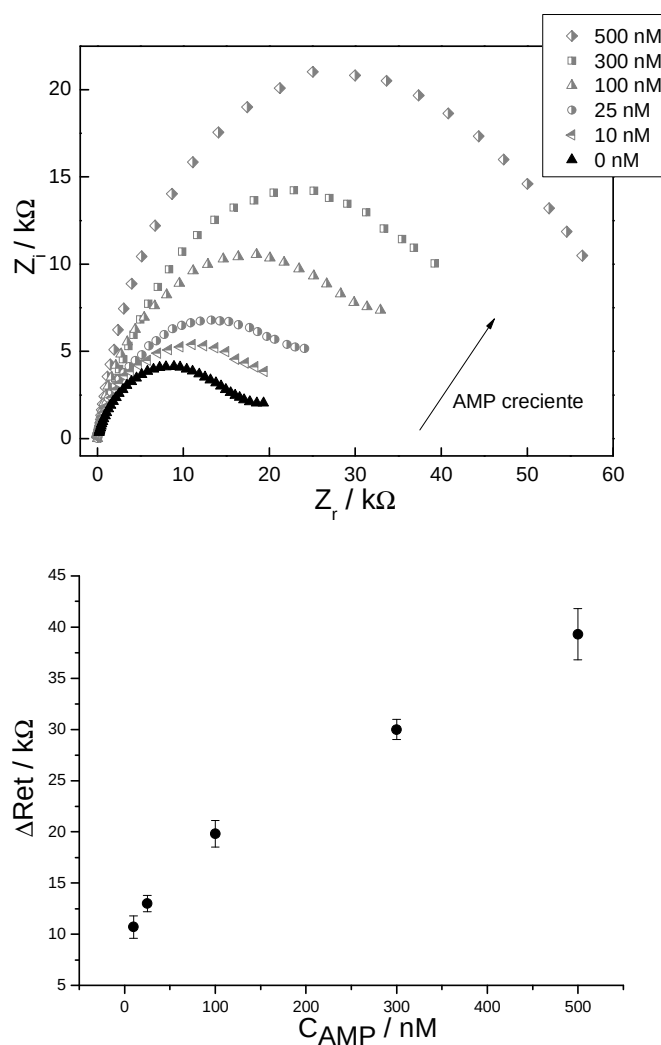


Figura 6.7 Gráfico Nyquist en función de la concentración de AMP (sup.); efecto de la concentración de AMP en la R_{tc} para el electrodo modificado en condiciones de coadsorción

$$\Delta R_{tc} = R_{tc}(\text{Al/Al}_2\text{O}_3/\text{AuNP/Apt-AMP}) - R_{tc}(\text{Al/Al}_2\text{O}_3/\text{AuNP/Apt}) (\text{inf.})$$

Para estudiar la selectividad del sistema, se realizaron los siguientes experimentos control. Se evaluó la respuesta por EIS de las nanopartículas modificadas con el aptámero frente a AMP (500 nM) y a guanosina G (1000 nM), cuyas estructuras se muestran en la Figura 6.8. El cambio en la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}) permitió distinguir entre ambas moléculas. El aptámero desarrollado por Huizenga y Szostak (Huizenga y Szostak, 1995) posee el mismo valor de K_{af} para ATP, ADP, AMP y adenosina, debido a que el reconocimiento molecular involucra interacciones con los

grupos funcionales de la base nitrogenada y el azúcar pero no con los grupos fosfato (Lin y Patel, 1997). La Figura 6.8 muestra las interacciones entre las bases del aptámero y las dos moléculas de AMP (A_I y A_{II}):

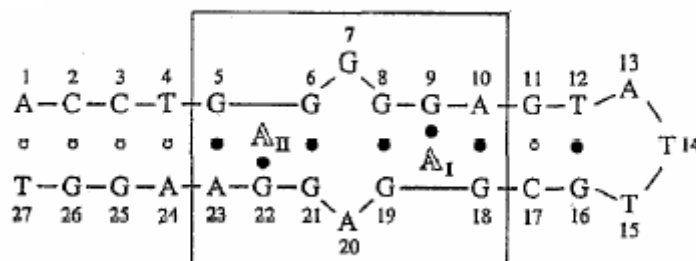


Figura 6.8 Estructura secundaria del complejo AMP-aptámero determinada por RMN en solución

En la estructura secundaria del complejo AMP-aptámero, determinada por RMN en solución, se observa una zona de interacciones tipo Watson-Crick (○), pares de “mismatches” G•G (interacciones de tipo Hoogsteen reversa) y G•A y dos sitios de reconocimiento G•AMP no equivalentes (A_I y A_{II}) (ver 1.2).

Los dos sitios de unión de AMP, que se ubican en la gruta menor de la hélice de ADN, se extienden sobre un segmento de seis “mismatches” de bases conteniendo residuos de guaninas y adeninas adoptando un ángulo de torsión glicosídico *anti*. Las moléculas de AMP se intercalan entre las bases purínicas y se aparean a través de sus extremos de Watson-Crick con los extremos de los residuos de guanina de la gruta menor. La hélice está desenrollada en los sitios de unión del AMP [(G5-G6)•(G21-G22-A23) y (G18-G19)•(G8-G9-A10)] e inclinada hacia la gruta mayor centrada sobre las moléculas de AMP unidas.

Se observa el apilamiento entrecruzado (“*cross-strand stacking*”) entre bases de distintas hebras en pares de “mismatch” adyacentes (entre G9 y G18 y entre A_{MPI} y A10) (Figura 6.9).

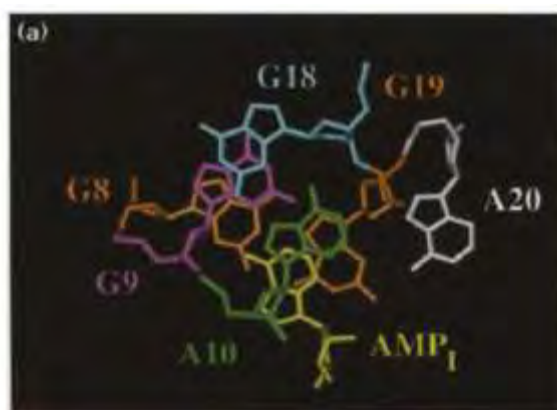
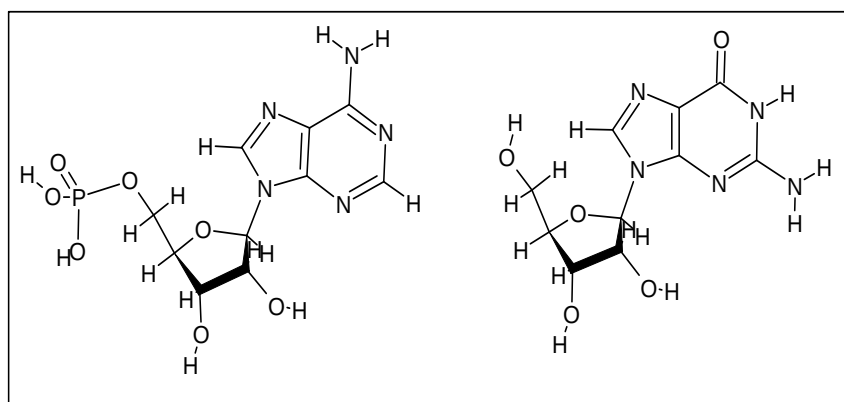


Figura 6.9 Geometría del segmento (G8-G9-A10) • (G18-G19-A20) más el AMP₁ unido.

Además, los residuos G19 y A20 son aproximadamente coplanares, como también lo son los residuos G6 y G7, resultando en la formación de dos plataformas de tres bases mutuamente apiladas (G8•G19)-A20 y (G21•G6)-G7. Esta arquitectura única de plataforma de tres bases está asociada con una gruta menor rectangular expandida que funciona como bolsillo de unión capaz de acomodar 2 moléculas de AMP adyacentes. También contribuye al desplazamiento de aproximadamente 0,4 nm en el eje de la hélice, que está centrada entre dichas plataformas adyacentes.

Si en lugar de la base purínica adenina se usa guanosina, de estructura química similar (ver Figura 6.9), el cambio conformacional asociado al evento de reconocimiento que favorece la estructura plegada sobre la forma “*random coil*” no ocurre, en consecuencia el $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ puede alcanzar la superficie y se produce la transferencia de carga (Tabla 6.1).



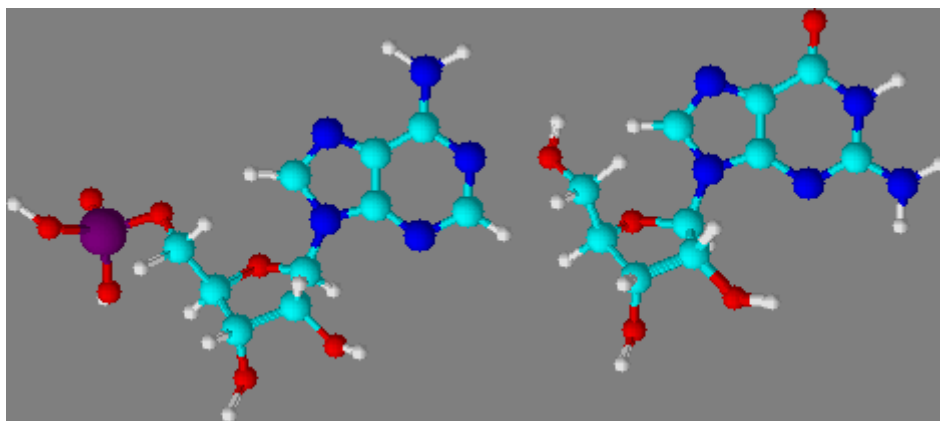


Figura 6.10 Estructura química y representación 3D de adenosinmonofosfato (AMP) (izq.) y guanosina (G) (der.)

En otro experimento control, se modificaron las AuNPs con una secuencia oligonucleotídica tiolada que contiene los mismos nucleótidos que el aptámero que reconoce AMP pero ordenados al azar (scramble). Dicha secuencia fue empleada en el estudio de quimisorción y el efecto del catión $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ por QCM-D (ver capítulo 5). La exposición a AMP (500 nM) no mostró un cambio significativo en la R_{tc} hecho que se explica por la ausencia de reconocimiento molecular (Tabla 6.1).

Este resultado indica que el aumento en la R_{ct} está asociado específicamente al cambio conformacional que experimenta el aptámero en presencia de su analito. Al favorecer la estructura plegada (“*stem-loop*”) de mayor diámetro (2 nm) (ver dimensiones en la Figura 6.11) que la forma desplegada (“*random coil*”) (1 nm) se produce un mayor bloqueo de la nanopartícula de Au. A diferencia de lo que ocurre cuando se emplean electrodos de Au de dimensiones milimétricas, el cambio conformacional es detectado de manera directa con un sistema de dimensiones nanométricas.

Secuencia	Analito	[Analito] / μM	ΔR_{tc} / $\text{k}\Omega$
Aptámero	AMP	500	39 ± 2
Aptámero	G	1.000	4 ± 1
Scramble	AMP	500	2 ± 1

Tabla 6.1. Experimentos de selectividad del sistema Al/Al₂O₃/AuNP/Apt

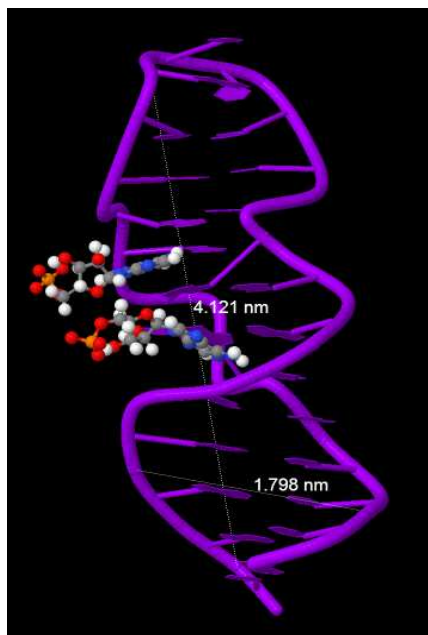


Figura 6.11 Representación del aptámero plegado y reconocimiento de AMP (se indican las dimensiones calculadas con JSmol para una de las 7 estructuras determinadas por RMN en solución) DOI:10.2210/pdb1aw4/pdb

6.5 Detección de la hebra complementaria

Dado el interés que poseen las estructuras doble cadena en el campo de los biosensores, con fines exploratorios y pensando en futuras aplicaciones analíticas, se hicieron ensayos de hibridización en el sistema Al/Al₂O₃/AuNP/Apt. La mayor constante de afinidad que posee el aptámero por su hebra complementaria respecto del AMP (ver Tabla 5.4) y la diferencia estructural entre una molécula orgánica pequeña y una hebra de ADN de igual cantidad de nucleótidos que el aptámero, permiten suponer que podría bajarse más aún el límite de detección frente al reconocimiento de la hebra complementaria.

Usando las mismas condiciones de ensayo que para la detección de AMP descritas previamente, para una concentración 5 nM de la hebra complementaria, no se observó un cambio significativo en R_{tc} respecto de la incubación con el buffer (Tris 50 mM, pH 7,2). Sin embargo cuando se repitió el ensayo incubando un tiempo mayor, 30 minutos en lugar de 15 minutos, se obtuvo una señal distinguible respecto del buffer (ver Figura

6.10), obteniendo un valor de $\Delta R_{tc} = (39 \pm 4) \text{ k}\Omega$ ($n = 2$). Este resultado mostró que fue posible la detección de la hebra complementaria en las condiciones del ensayo.

Es interesante señalar que el valor de ΔR_{tc} para la hebra complementaria en concentración 5 nM es muy similar al obtenido para una concentración de AMP dos órdenes de magnitud mayor (500 nM) (ver Tabla 6.1 y Figura 6.7).

Si bien los experimentos de hibridización realizados por QCM-D mostraron un reconocimiento casi inmediato del aptámero inmovilizado frente a la hebra complementaria, es razonable pensar que en un sistema confinado la difusión de la hebra de ADN desde la solución hacia la nanopartícula de Au ubicada en el fondo del nanoporo requiera un tiempo mayor. En concordancia con este resultado, cabe señalar que cuando se emplearon concentraciones de aptámero menores que $1 \mu\text{M}$ para modificar las AuNPs se requerían tiempos de incubación mayores a 30 minutos.

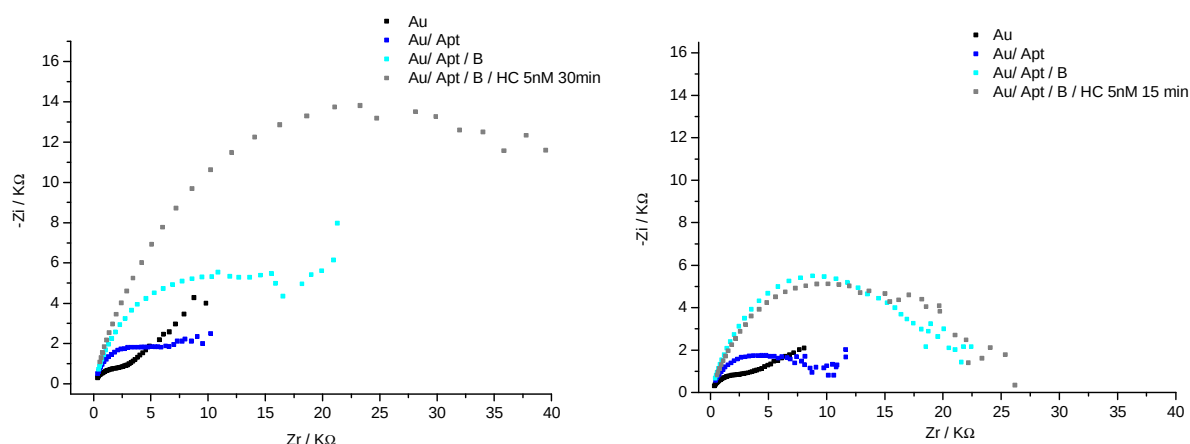


Figura 6.10. Efecto del tiempo de incubación para el ensayo de reconocimiento de la hebra complementaria (5 nM). EIS en $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 50 mM / Hepes 50 mM, pH 7,2: 30 minutos (izq.), 15 minutos (der.)

Otro aspecto a señalar es que habitualmente el buffer para hibridización contiene una fuerza iónica elevada (NaCl 150 mM, MgCl_2 10 mM), en este caso se usó sólo buffer Tris 50 mM, pH 7,2.

A futuro sería de interés estudiar más detalladamente el efecto del $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ dada la relevancia que posee en los cambios conformacionales del aptámero y la frecuencia con que se emplea en los buffers que muestran aplicaciones de aptámeros para el desarrollo de sensores.

6.6 Conclusiones

Las nanopartículas de Au obtenidas por electrodeposición mostraron buena capacidad frente a la modificación química con hebras de ADN simple cadena tioladas. La metodología para lograr dicha modificación es rápida y sencilla. Luego de la reducción en fase homogénea del enlace disulfuro, la coadsorción del aptámero y el tiol corto resultante se realiza en un solo paso. Dadas las dimensiones nanométricas del arreglo de electrodos, el armado de la capa de reconocimiento molecular no requiere un tratamiento adicional con alcanotioles de cadena corta, como se describe a menudo en bibliografía, para evitar las interacciones inespecíficas con la superficie de Au. La estrategia “label free” es aplicable lo que evita la modificación química de la hebra de ADN para introducir un marcador electroactivo por ejemplo.

Los cambios conformacionales experimentados por el aptámero frente a su analito pueden ser detectados de manera directa dado que todo el sistema está en la misma escala.

El arreglo de nanoporos con nanopartículas de Au modificadas con el aptámero, resulta sensible a la presencia de AMP en el rango de concentración nM, la detección es directa y rápida a partir de la sonda redox en solución. La respuesta es selectiva y permite discriminar entre moléculas de estructura química muy similar como son AMP y guanosina.

La intensidad de las señales medidas electroquímicamente es claramente distinguible del blanco correspondiente. La reproducibilidad tanto en la obtención y modificación del arreglo de nanoelectrodo, como en las medidas frente al reconocimiento del analito resulta adecuada.

La detección electroquímica puede realizarse empleando impedancia (EIS), técnica que no requiere equipamiento de alto costo, ni largos tiempos de medición o análisis de datos. Este aspecto es de interés pensando en futuras aplicaciones analíticas.

Los resultados obtenidos con este sistema sugieren una gran potencialidad del mismo frente a futuras aplicaciones analíticas. Los ensayos de hibridización realizados indican que podría ser menor aún la concentración de la hebra complementaria a detectar. Este aspecto resulta de interés por su vinculación directa con el campo de aplicación de los genosensores.

Otro aspecto, relacionado con las dimensiones nanométricas del sistema, que resulta interesante explorar es la posibilidad de hacer una selección por tamaño de especies que pueden o no ingresar al nanoporo tal como se menciona en la Introducción. A partir de ensayos realizados en solución se observó que la exposición del aptámero a un medio con nucleasas produce degradación del ADN en un tiempo de 30 minutos aproximadamente. Concretamente podría explorarse la detección de AMP en presencia de nucleasas las cuales por su mayor tamaño tendrían dificultad para ingresar al nanoporo y degradar ADN.

Los resultados presentados en este capítulo son el producto de un trabajo en colaboración con la Lic. Ana Sol Peinetti y el Dr. Fernando Battaglini (FCEyN-UBA). Los estudios de caracterización del sistema (dimensiones y cubrimiento superficial) fueron realizados por el Dr. Félix Requero (INIFTA, UNLP). A todos ellos se les agradece muy especialmente la dedicación, entusiasmo e interés puesto en esta colaboración.

Capítulo 7. Conclusiones y discusión final

En la Introducción se enunció a modo de desafío, una pregunta que resumía el objetivo general de este trabajo: *¿es posible para el caso de moléculas pequeñas, transformar el cambio conformacional promovido por el evento de reconocimiento entre un aptámero inmovilizado a una superficie de oro y su analito, en una señal electroquímica cuantificable en términos analíticos?* Desde una perspectiva experimental, la misma fue desglosada en una secuencia de interrogaciones más puntuales y acotadas, cuyas respuestas permitieron el avance hacia la comprensión del problema en estudio.

El primer interrogante se centró en torno a la modificación de superficies de oro con secuencias de oligonucleótidos tiolados y su detección electroquímica. Como punto de partida, se diseñó una molécula sencilla con un grupo tiol para permitir la interacción S-Au, y un grupo ferroceno como marcador electroactivo para explorar las técnicas de detección. A continuación, se estudió la modificación de superficies de Au con secuencias de oligonucleótidos, con vistas al armado de la capa de reconocimiento molecular de un biosensor. Se exploraron distintas superficies de Au como sustrato y se evaluó la conveniencia de disponer de electrodos descartables, fáciles de obtener y caracterizar.

¿Qué técnicas electroquímicas resultan más convenientes para evaluar las modificaciones de la superficie de Au? Se seleccionó la espectroscopia de impedancia faradaica como herramienta de respuesta rápida para evidenciar la modificación de la superficie metálica con el aptámero. Una ventaja interesante de la misma en términos del armado de un sensor, es la posibilidad diseñar estrategia del tipo “label free” para detectar la señal de una sonda redox en solución. Las mismas resultan convenientes pues no requieren de la modificación química de la hebra de ADN para introducir un marcador electroactivo. Empleando electrodos descartables, fue posible también detectar el evento de reconocimiento aptámero-analito, luego del tratamiento con un tiol corto para “tapizar” la superficie libre de Au. Sin embargo la sensibilidad obtenida en las condiciones de trabajo plantea una limitación para futuras aplicaciones.

Los experimentos realizados con microbalanza de cristal cuarzo con disipación, aportaron información complementaria sobre distintas estrategias de quimisorción de aptámeros tiolados a superficies de oro. Los valores de cubrimiento superficial resultaron en el mismo orden de magnitud que los obtenidos por mediciones

electroquímicas. Además, permitieron corroborar que el porcentaje de la superficie de Au que se encuentra modificado por el aptámero no supera el 5% del total del área expuesta.

La técnica también resultó adecuada para explorar algunos aspectos más operativos como el efecto de los cationes divalentes presentes en los buffers para el armado de sensores, o la rehidratación de la capa de reconocimiento. Sin embargo la técnica mostró limitaciones para la detección sensible del evento de reconocimiento aptámero-analito en las condiciones experimentales exploradas.

Finalmente, toda la experiencia adquirida previamente confluyó en la posibilidad de evaluar mediante el diseño de un sistema de dimensiones nanométricas, el evento de reconocimiento del aptámero frente a su analito, cuando el mismo implica una molécula pequeña. El arreglo de nanoelectrodos permitió detectar el reconocimiento de AMP por parte de su aptámero. Las dimensiones de dicho arreglo de nanoelectrodos se encuentran en la misma escala que el cambio conformacional que se produce cuando el aptámero reconoce al analito. De este modo no fue necesario introducir complejas construcciones supramoleculares para amplificar el evento de reconocimiento, ni intervenir la superficie recubriéndola con tioles de cadena corta para minimizar la señal de fondo. Nuevamente la espectroscopía de impedancia faradaica, más precisamente, el cambio en la resistencia a la transferencia de carga de una sonda redox en solución, antes y después del evento de reconocimiento permitió cuantificar de manera selectiva al analito en concentración submicromolar.

El aptámero confinado en el fondo de un nanoporo también evidenció respuesta por la misma técnica, frente a su hebra complementaria (hibridización), para una concentración aún menor que la alcanzada con el AMP, a modo de prueba de concepto para una potencial aplicación hacia genosensores.

La selectividad por tamaño del nanoporo resultó otro aspecto interesante del sistema de dimensiones nanométricas, pues permitiría avanzar hacia la detección de un analito sin la necesidad de introducir etapas previas de purificación, preservando la integridad de la capa de reconocimiento frente a la degradación por nucleasas por ejemplo, minimizando desde el punto de vista analítico el efecto de la matriz.

Referencias

Capítulo 1

Bain, C. D., Troughton, E. B., Tao, Y.-T, Evall, J., Whitesides, G. M., Nuzzo, R. G.. 1989. "Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiol from solution onto gold". *J. Am. Chem. Soc.*, vol 111, p. 321-335.

Biebuyck, H. A., Whitesides, G. M. 1993. "Interchange between monolayers on gold from unsymmetrical disulfides and solutions of thiols: evidence for sulfur-sulfur bond cleavage by gold metal". *Langmuir*, vol. 9, p. 1766-1770.

Cass, A., Davis, G., Francis, G., Hill, H., Aston, W., Higgins, W., Plotkin, E., Scott, L., Turner, A. 1984. "Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose". *Anal. Chem.*, vol. 56, p. 667-671.

De-los-Santos-Alvarez, N., Lobo-Castañón M. J., Miranda-Ordieres, A. J., Muñón-Blanco, P. 2007. "Modified-RNA aptamer-based sensor for competitive impedimetric assay of neomycin B" *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, p. 3808-3809.

De-los-Santos-Alvarez, N., Lobo-Castañón M. J., Miranda-Ordieres, A. J., Muñón-Blanco, P. 2009. "SPR sensing of small molecules with modified RNA aptamers: Detection of neomycin B". *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, p. 2547-2553.

Egli, M., Saenger, W. 1984. "*Principles of nucleic acid structure*". Ed. Springer Verlag, N.Y. ISBN 13-978-0-387-90761-1.

Ehrfeld, W. 2003. "Electrochemistry and microsystems". *Electrochem. Acta*, vol. 48, p. 2857-2868.

Ellington A. D., Szostak J. W. 1990. "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands". *Nature*, vol. 346, p. 818-822.

Fechner, P., Bleher, O., Ewald, M., Freudenberger, K., Furin, D., Hilbig, U., Kolarov, F., Krieg, K., Leidner, L., Markovic, G., Proy, G., Pröll, F., Rau, S., Riedt, J., Schwarz, B., Weber, P., Widmaier, J. 2014. "Size does matter! Label-free detection of small molecule–protein interaction". *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, p. 4033–4051.

Foster, K., McCormac, T. 2006. "Electrochemical properties of an osmium (II) copolymer film and its electrocatalytic ability towards the oxidation of ascorbic acid in acidic and neutral pH". *Electroanal.*, vol. 18, p. 1097-1104.

Gopinath, S. Ch, B. 2007. "Methods developed for SELEX". *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 387, p.171–182.

Haabs, B. 2003. "Methods and applications of antibody microarrays in cancer research". *Proteomics*, vol. 3, p. 2116-2122.

Han, H., Liang, Z. y Zhou, N. 2010. "Design strategies for aptamer-based biosensors". *Sensors*, vol 10, p. 4541-4557.

Hohmann, J., Renner, M., Waller, E., von Freymann, G. 2015. "Three-dimensional μ -printing: an enabling technology". *Adv. Optical Mater.* DOI: 10.1002/adom.201500328.

Hollenstein, M. 2012. "Nucleoside Triphosphates-Building Blocks for the Modification of Nucleic Acids". *Molecules*, vol. 17, p. 13569-13591.

Hulanicki, A., Geab, S., Ingman, F. 1991. "Chemical Sensors." Definitions and Classification in Analytical Chemistry Division, Commission on General Aspects of Analytical Chemistry, IUPAC, Editor.

IUPAC Recommendations. 1992. [doi:10.1351/goldbook.B00663](https://doi.org/10.1351/goldbook.B00663) (acceso, set. 2015). K. Hoogsteen, K. 1963. "The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine". *Acta Crystallogr.*, vol. 16, p. 907-916.

James, W. 2000. "Encyclopedia of Analytical Chemistry", p. 4848-4871.

Kinzler, K., Vogelstein, B. 1989. "Whole genome PCR: application to the identification of sequences bound by gene regulatory proteins". *Nucleic Acids Res.*, vol. 17, p. 3645-3653.

Kong, H.Y., Bym, J. 2013. "Nucleic Acid Aptamers: New Methods for Selection, Stabilization and Application in Biomedical Science". *Biomol. Ther.*, vol. 21, p. 423-434.

Lane, R, Hubbard, A. 1973. "Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents". *J. Phys. Chem.*, vol. 77, p.1401-1410.

Lane, R, Hubbard, A. 1973. "Electrochemistry of chemisorbed molecules. II. The influence of charged chemisorbed molecules on the electrode reactions of platinum complexes". *J. Phys. Chem.*, vol. 77, p.1411-1421.

Lin, C. H., Patel, D. 1997. "Structural basis of DNA folding and recognition in an AMP-DNA aptamer complex: distinct architectures but common recognition motifs for DNA and RNA aptamers complexed to AMP". *Chem. Biol.*, vol. 4, p. 817-832.

Lipsitz, M., Montserrat, J. 2016. "*De la astrobiología a la filosofía, ida y vuelta*". Ed. UNGS.

Liu, J., Wagan, S., Dávila Morris, M., Taylor, J., White, R. 2014. "Achieving reproducible performance of electrochemical, folding aptamer-based sensors on microelectrodes: challenges and prospects". *Anal. Chem.*, vol. 86, p. 11417-11424.

Love, J. C., Estroff, L., Kriebel, J., Nuzzo, R., Whitesides, G. 2005. "Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology". *Chem. Rev.*, vol. 105, p. 1103-1169.

Microfluidic Techniques. 2006. D. Shelley, Editor. Humana Press Inc.: New Jersey, EEUU, Chapter 2. p. 5.

Miller, L. L., Kariv, E., Behling, J. R., Watkins, B. F. 1975. "Chiral electrode." *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 97, p. 3549-3550.

Moses, P., Wier, L., Murria, R. 1975." Chemically Modified Tin Oxide Electrode". *Anal. Chem.*, vol. 47, p. 1880-1886.

Nutiu, R., Li, Y. 2003. "Structure-Switching Signaling Aptamers". *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, p. 4171-4178.

Nutiu, R., Li, Y. 2005. "In Vitro Selection of Structure-Switching Signaling Aptamers". *Angew. Chem.*, vol. 117, p. 1085-1089.

Alvarado-Urbina, G., Sathe, G. M., Liu, W-Ch., Gillen, M., Duck, P., Bender, R., Ogilvie, K. 1981. "Automated synthesis of gene fragments". *Science*, vol. 214, p. 270-274.

Oyama, N., Anson, F. C. 1980. "Factors affecting the electrochemical responses of metal complexes at pyrolytic graphite electrodes coated with films of poly (4-vinylpyridine)". *J. Electrochem. Soc.*, vol. 127, p. 640-647.

Ricci, A. 2010. "Modificación redox de superficies para electrónica molecular y electrocatálisis". Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. www.digital.bl.fcen.uba.ar.

Robertson, D. L., Joyce, G. F. 1990. "Selection in-vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA". *Nature*, vol. 344, p. 467-468.

Santos, A., Kumeria, T., Losic, D. 2013. "Nanoporous anodic aluminium oxide for chemical sensing and biosensors". *Trends in Anal. Chem.*, vol. 44, p.25-38.

Stojanovic, M., de Prada, P., Landry, D. 2001. "Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine". *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, p. 4928-4931.

Takmakov, P., Vlassiuk, H., Smirnov, S. 2006. "Hydrothermally shrunk alumina nanopores and their application to DNA sensing". *Analyst*, vol. 131, p. 1248-1253.

Tasset, D. M., Kubik, M. F., Steiner, W. 1997. "Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes". *J. Mol. Biol.*, vol 272, p. 688-698.

Tian, B., Bevilacqua, P. C., Diegelman-Parente, A., Mathews, M. B. 2004. "The doubled-stranded-RNA binding motif: interfeerente and much more". *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, p. 1013-1023.

Tuerk, C., Gold, L. 1990. "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polimerase". *Science*, vol. 249, p. 505-510.

Ullman, A. 1996. "Formation and structure of self-assembled monolayers". *Chem. Rev.*, vol. 96, p.1533-1554.

Vlassiuk, H., Takmakov, P., Smirnov, S. 2005. "Sensing DNA hybridization via ionic conductance through a nanoporous electrode". *Langmuir*, vol. 21, p. 4776-4778.

Walter, J-G, Heilkenbrinker, A., Austerjost, J., Timur, S., Stahl, F. y Scheper, T. 2012. "Aptasensors for small molecules detection". *Naturforsch., B: Chem. Sci.*, vol. 67b, p. 976-986.

Watson, J. D., Crick, F. H. C. 1953. "Molecular structure of nucleic acids". *Nature*, vol. 171, p. 737-738.

White, R. J., Rowe, A. A., Plaxco, K. W. 2010. "Re-engineering aptamers to support reagentless, self-reporting electrochemical sensors". *Analyst*, vol. 135, p. 589-594.

Whitesides, G. 2006. "The origins and the future of microfluidics". *Nature*, vol. 442, p.368-373.

Yakovchuk, P., Protozanova, E., Frank-Kamenetskii, M. D. 2006. "Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix". *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, p. 564-574.

Zemel, J. 1990. "Microfabricated nonoptical chemical sensors". *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 61, p. 1579-1606.

Zimmermann, G. R., Jenison, R. D., Wick, C. L., Simorre, J. P., Pardi, A. 1997. "Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA". *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 4, p. 644-649.

Zhou, Z., Du, Y., Dong, S. 2011. "DNA-Ag nanoclusters as fluorescence probe for turn-on aptamer sensor of small molecules". *Biosens. Bioelectron.*, vol. 28, p. 33-37.

Capítulo 2

Bard, A. J. y Faulkner, L. R. 2000. "*Electrochemical methods. Fundamentals and applications*". Ed. Willey, 2^{da} edición.

Baker, B. R., Lai, R. Y., Wood McCall, S., Doctor, E. H., Heeger, A. J., Plaxco, K. W. 2006. "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.*, vol. 128, p. 3138-3139.

Getz, E. B, Xiao, M, Chakrabarty, T., Cooke, R. y Selvin, P. R. 1999. "A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry". *Anal. Biochem.* vol. 273, p. 73-80.

Kissinger, P. T., Heineman, W. R. 1996. "*Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*", Marcel Dekker, New York, 2^{da} ed.

Nicholson, R.S., Shain, I. 1964. "Theory of stationary electrode polarography single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems." *Anal. Chem.*, vol. 36, p. 706-723.

Pletcher, R., Greef, R., Peat, R., Peter, L. M. 2001. "Instrumental methods in electrochemistry". Chemical Science Series, ed. Southampton Electrochemistry Group. Horwood Publishing: England.

Sawyer, D. T., Sobkowiak, A., Roberts Jr, J. L. 1995. "*Electrochemistry for chemists*". Wiley, New York, 2^{da} ed.

Capítulo 3

Angnes, L, Richter, E., Augelli, M.A., Kume, G.H. 2000. "Gold electrodes from recordables CD's". *Anal. Chem.*, vol. 72, p. 5503-5506.

Anne A., Bouchardon, A., Moiroux, J. 2003. "3'-Ferrocene-labeled oligonucleotide chains end-tethered to gold electrode surfaces: novel model systems for exploring flexibility of short DNA using cyclic voltammetry". *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, p. 1112-1113.

Batterjee, S., Marzouk, M. I., Aazab, M. E., El-Hashash, M. A. 2003. "The electrochemistry of some ferrocene derivatives: redox potencial and substituent effects". *Appl. Organometal. Chem.*, vol. 17, p. 291-297.

Bergstrom, J., Lofas, S., Johnsson, B. 1993. "Method and biosensor for detecting antigen". USP 5242828.

Carvalho, R., Freire R., Kubota, L. 2005. "Polycrystalline gold electrodes: a comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation". *Electroanalysis*, vol. 17, p. 1251- 1259.

Ceretti, H., Ponce, B., Ramirez, S., Montserrat, J. M. 2010. "Adenosine reagentless electrochemical aptasensor using a phosphorothioate immobilization strategy". *Electroanalysis*. vol. 22, p.147-150.

Eckstein, F. 1991. "Oligonucleotides and Analogs. A Practical Approach." Oxford University Press, Oxford, New York.

Heller, A., Feldman, B. 2009. "Electrochemistry in diabetes management". *Account of Chem. Res.* vol. 43, p. 963-973.

Herne, T. M., Tarlov, M. J. 1997. "Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces". *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, p. 8916-8920.

Iyer, R., Egan, W., Regan, J., Beaucage, S. 1990. "3H-1,2-benzodithiole-3-one 1,1-dioxide as an improved sulfurizing reagent in the solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleoside phosphorotioates". *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 112, p. 1253-1254.

Kawaguchi, T., Yasuda, H., Shimazu, K. 2000. "Electrochemical quartz crystal microbalance investigation of the reductive desorption of self-assembled monolayers of alkanethiols and mercaptoalkanoic acids on Au". *Langmuir*, vol. 16, p. 9830-9840.

Laforge, F., Kakiuchi, T., Shigematsu, F., Mirkin, M. V. 2004. "Comparative study of electron transfer reactions at the ionic liquid/water" and organic/water interfaces". *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, p. 15380-15381.

Lee, C-Y., Gong, P., Harbers, G., Grainger, D., Castner, D., Gamble, L. 2006. "Surface coverage and structure of mixed DNA/alkylthiol monolayers on gold: characterization by XPS, NEXAFS, and fluorescence intensity measurements". *Anal. Chem.*, vol. 78, p. 3316-3325.

Lowinsohn, D., Richter, E.M., Angeles, L., Bertotti, M. 2006. "Disposable gold electrodes with reproducible area using recordable CDs and toner mask". *Electroanalysis*, vol. 18, p. 89-94.

Niu, L., Knoll, W. 2007. "Electrochemically addressable functionalization and parallel readout of a DNA biosensor array". *Anal. Chem.*, vol. 79, p. 2695-2702.

Priano, G., González, G., Günther, M. Battaglini, F. (2008). "Disposable gold electrode array for simultaneous electrochemical studies". *Electroanalysis*, vol. 20, p.91-97.

Radi, A., Acero Sánchez, J.L., Baldrich, E., O'Sullivan, C.K. 2005. "Reusable impedimetric aptasensor". *Anal. Chem.*, vol. 77, p. 6320-6323.

Steel, A. B., Herne, T. M., Tarlov, M. J. 1998. "Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold". *Anal. Chem.*, vol. 70, p. 4670-4677.

Walczak, M.M., Pnpenoe, D.D., Deinhammer, R.S., Lamp, B.D., Chung, C., Porter, M.D. 1991. "Reductive desorption of alkanethiolate monolayers at gold: a measure of surface coverage". *Langmuir*, vol. 7, p. 2687-2693.

Capítulo 4

Cortez, M. L. 2011. "Materiales compuestos para la construcción de sensores", tesis doctoral. Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, www.digital.bl.fcen.uba.ar (acceso agosto 2015).

Daniels, J. S., Pourmand, N. 2007. "Label free impedance biosensors: opportunities and challenges". *Electroanalysis*, vol. 12, p. 1239-1257.

Danilowicz, C., Corton, E., Battaglini, F., Calvo, E. J. 1998. "An os(byp)(2)clpych(2)nhpoly(allylamine) hydrogel mediator for enzyme wiring at electrodes." *Electrochim. Acta*, vol. 10, p. 3525-3531.

Eissa, S., Ng, A., Siaj, M., Tavares, A. C., Zourob, M. 2013. "Selection and identification of DNA aptamers against okadaic acid for biosensing application." *Anal. Chem.* vol. 85, p. 11794-11801.

Fan, L., Zhao, G., Shi, H., Liu, M., Li, Z. 2013. “ A highly selective electrochemical impedance spectroscopy-based aptasensor for sensitive detection of acetamiprid”. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 43, p. 12-18.

Heller, A. 1990. “Electrical wiring of redox enzymes”. *Acc. Chem. Res.* vol. 23, p. 128-134.

Katz, E., Willner, I. 2003. “Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors”. *Electroan.*, vol. 15, p. 913-947.

Ding, S. J., Chang, B. W., Wu, C. C., Lai, M. R., Chang, H. C. 2005. “Electrochemical evaluation of avidin-biotin interaction on self assembled gold electrodes”. *Electrochim. Acta*, vol. 50, p. 3660-3666.

Long, Y-T., Li, C-Z., Sutherland, T. , Kraatz, H-B., Lee, J. 2004. “Electrochemical detection of single-nucleotide mismatches: application of M-DNA”. *Anal. Chem.*, vol. 76, p. 4059-4065.

Ravan, H., Kashanian, S., Sanadgol, N., Badoei-Dalfard, A., Karami, Z. 2014. “Strategies for optimizing DNA hybridization on surfaces”. *Anal. Biochem.*, vol. 444, p. 41-46.

Rodriguez, M. C., Kawde, A-N., Wang, J. 2005. “Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of proteins based on recognition-induced switching of the surface charge”. *Chem. Com.*, vol. 34, p. 4267-4269.

Wang, Y., Feng, J., Tan, Z., Wang, H. 2014. “Electrochemical impedance spectroscopy aptasensor for ultrasensitive detection of adenosine with dual backfillers”. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 60, p. 218-223.

Willner, I., Zayat, M. 2007. “Electronic aptamer-based sensors”. *Angew. Chem.* vol. 46, p. 6408-6418.

Capítulo 5

Belegrinou, S., Mannelli, I., Lisboa, P., Bretagnol, F., Valsesia, A., Ceccone, G., Colpo, P., Rauscher, H., Rossi, F. 2008. "pH-Dependent Immobilization of Proteins on Surfaces Functionalized by Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition of Poly(acrylic acid)- and Poly(ethylene oxide)-like Films". *Langmuir*, vol. 14, p. 7251–7261.

Becker, B., Cooper, M. 2011. "A survey of the 2006-2009 quartz crystal microbalance biosensor literature". *J. Molec. Recog.*, vol. 24, p. 754-787.

Buttry, D.A., Ward, M.D. 1992. "Measurement of interfacial processes at electrode surfaces with the electrochemical quartz crystal microbalance". *Chem. Rev.*, vol. 92, p. 1355-1379.

Cooper, M., Singleton, V. 2007. "A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions". *J. Molec. Recog.*, vol. 20, p. 154-184.

Egli, M., Saenger, W. 1984. "*Principles of Nucleic Acid Structure*". Springer-Verlag.

Höök, F., Kasemo, B., Nylander, T., Fant, C., Sott, K., Elwing, H. 2001. "Variation in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study". *Anal. Chem.*, vol. 73, p. 5796-5804.

Mannelli, I., Minunni, M., Tombelli, S., Wang, R., Spiriti, M. M., Mascini, M. 2005. "Direct immobilisation of DNA probes for the development of affinity biosensors". *Bioelectrochem.*, vol. 66 p. 129-138.

Nuzzo, R. G., Fusco, F. A., Allara, D. L. 1987. "Spontaneously Organized Molecular Assemblies. 3. Preparation and Properties of Solution Adsorbed Monolayers of Organic Disulfides on Gold Surfaces". *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 109, p. 2348-2358.

Okahata, Y., Niikura, K., Furusawa, H., Matsuno, H. 2000. "A highly sensitive 27 MHz quartz-crystal microbalance as a device for kinetic measurements of molecular recognition on DNA strands". *Anal. Sci.*, vol. 16, p. 1113-1119.

Ospova, A., Thakar, D., Dejeu, J., Bonnet, H., Van der Heyde, A., Dubacheva, G., Richter, R., Defrancq, E., Spinelli, N. Coche-Guérente, L., Labbé, P. 2015. "Sensor based on aptamer folding to detect low-molecular weight analytes". *Anal. Chem.*, vol. 87, p. 7566-774.

Papadakis, G., Tsortos, A., Bender, F., Ferapontova, E., Gizeli, E. 2012. "Direct detection of DNA conformation in hybridization processes". *Anal. Chem.*, vol. 84, p. 1854-1861.

Peh, W., Reimhult, E., Teh, H. F., Thomsen, J., Su, X. 2007. "Understanding ligand binding effects on the conformation of estrogen receptor α -DNA complexes: a combinational quartz crystal microbalance with dissipation and surface plasmon resonance study". *Biophys. J.*, vol. 92, p. 4415-4423.

Sauerbrey, G. Z. 1959. "Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung". *Z. Phys.*, vol. 33, p. 206-222.

Sines, C., McFail-Isom, L., Howerton, S., VanDerveer, D., Williams, L. 2000. "Cations mediate B-DNA conformational heterogeneity". *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 122, p. 11048-11056.

Strong, L., Whitesides, G. 1988. "Structures of self-assembled monolayer films of organosulfur compounds adsorbed on gold single crystals: electron diffraction studies". *Langmuir*, vol. 4, p. 546-558.

Tsortos, A., Papadakis, G., Gizeli, E. 2008. "Shear acoustic wave biosensor for detecting DNA intrinsic viscosity and conformation: A study with QCM-D". *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, p. 836-841.

Zhang, X., Yadavalli, V. K. 2011. "Surface immobilization of DNA aptamers for biosensing and protein interaction analysis". *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, p. 3142-3147.

Zheng, B., Cheng, S, Liu, W., Lam M., Liang, H. 2013. "Small organic molecules detection based on aptamer-modified gold nanoparticles-enhanced quartz crystal microbalance with dissipation biosensor". *Anal. Biochem.*, vol. 438, p. 144-149.

Capítulo 6

Huizenga, D., Szostak, J.W. 1995. "A DNA aptamer that binds adenosine and ATP" *Biochem.*, vol. 34, p. 656-665.

Lantiat, D., Vivier, V., Laberty-Robert, Ch., Grosso, D., Sanchez, C. 2010. "Gold nanoelectrode arrays and their evaluation by impedance sprectroscopy and cyclic voltammetry". 2010. *ChemPhysChem.*, vol. 11, p. 1971-1977.

Peinetti, A. S., Ceretti, H., Mizrahi, M., González, G. A., Ramírez, S. A., Requejo, F. G., Montserrat, J. M., Battaglini, F. 2015. "Confined gold nanoparticles enhance the detection of small molecules in label-free impedance aptasensors". *Nanoscale*, vol. 7, p. 7763-7769.

Peinetti, A. S, Herrera, S., González, G. A., Battaglini, F. 2013. "Synthesis of atomic metal clusters on nanoporous alumina". *Chem. Com.*, vol. 49, p. 11317-11319.

Protein Data Bank (acceso abril 2015):

<http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1AW4&bionumber=1>

Ramallo-López, J. M., Giovanetti, L. J., Requejo, F. G., Isaacs, S. R., Shon, Y. S., Salieron, M. 2006. "Molecular conformation changes in alkylthiol ligands as a function of size in gold nanoparticles: X-ray absorption studies". *Phys. Rev. B*, vol. 74, p. 073410-4.