



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Posgrado en Ciencias Químicas
Centro de Química-Instituto de Ciencias
Área fisicoquímica

**“Desarrollo de sustratos SERS a base de plantillas de aluminio
decoradas con nanotubos de carbono para la detección del
biomarcador cardiaco troponina I (TnIc)”**

Tesis presentada para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Químicas

Presenta

I.A. María Fernanda Saviñon Flores

Directora de Tesis

Dra. Erika Méndez Albores

Codirectora de Tesis

Dra. Alia Méndez Albores

Puebla, Pue.

Junio, 2022

Resumen

En este trabajo se muestran los resultados obtenidos de la modificación de electrodos de aluminio con nanotubos de carbono de pared múltiple y dendrímeros poli(amido)amina. La modificación de los electrodos de aluminio con nanotubos de carbono de pared múltiple se realizó mediante deposición electroforética. Es importante mencionar que el uso del aluminio como sustrato no se encuentra reportado en literatura. Por otro lado, la inmovilización de los dendrímeros se llevó a cabo mediante la oxidación electroquímica de los grupos amino superficiales de estas macromoléculas.

Este tipo de sustrato resulta ser excelente candidato para su uso en el área de inmunoensayos tipo sándwich basados en espectroscopia Raman de superficie aumentada para la detección de bioanalitos (proteínas, enzimas, ácidos nucleicos), en donde el anclaje ordenado y preferencial de anticuerpos es determinante para alcanzar una alta eficiencia, estabilidad, sensibilidad y reproducibilidad en la elaboración de dispositivos para su aplicación como pruebas en el punto de atención.

*Con el amor más puro, para mi Padre
del Cielo.*

*Con todo mi corazón, para mi esposo
Jesús Andrés Arzola Flores.*

*Con mucha alegría en el corazón,
para mi familia.*

Agradecimientos

A mi Padre del Cielo, a quien ofrezco con acción de gracias y con profundo amor todo el esfuerzo puesto en este trabajo, por haberme guiado y permitido concluir esta gran aventura llena de aprendizaje, siendo mejor que cuando inicié, por darme la inteligencia y la sabiduría necesarias, y por no dejarme sola nunca. Eres lo más genial del universo.

A mi compañero de aventuras, mi mejor amigo, mi otra mitad, mi esposo Jesús Andrés, por apoyarme incondicionalmente en esta etapa, por cada uno de sus consejos, por cada una de sus ideas para inspirarme, por motivarme a ser mejor cada día, por estar siempre para mí y por contagiarme siempre de su gran amor y su pasión por la ciencia. Te amo por siempre.

A mi madre María Eugenia, por su amor e inspiración, eres un gran motor para querer mejorar cada día. Te amo, mamita.

A mi hermana Anel, por mostrarme su apoyo y su amor, por darme ánimos siempre y echarme porras en la recta final. Te amo, manita.

A mi hermano Pablo Alfredo, por siempre creer en mí, por su amor y por echarme porras sin darse cuenta. Te amo, manito.

A la Dra. Erika, por su apoyo incondicional en este proyecto, por cada uno de sus consejos tan acertados, por sus recomendaciones y por enseñarme lo que todo buen científico debe tener. Gracias, Dra. Eri.

A la Dra. Alia, por su increíble manera de sacar lo mejor de mí, por guiarme con amor y determinación, por mostrarme que en la ciencia el límite es el cielo, por cada una de sus enseñanzas, por guiarme bajo la dirección de Dios. La quiero mucho, Ali.

Al Dr. Miguel, por su ayuda incondicional, por su guía, por cada recomendación y por cada enseñanza, por compartirme un poquito de su experiencia y por mostrarme la solidaridad que debe haber en un gran científico.

A el Dr. Adrián, la Dra. Alma, y el Dr. Alan, por ser parte de mi comisión revisora, por cada una de sus recomendaciones, por sus preguntas tan acertadas y por su gran apoyo. Gracias, Dres.

A mi familia espiritual, a César, Paty, Mishel y Paty (chica), por siempre estar pendientes de mí y de mi familia, por cada una de sus plegarias, por su guía, por sus consejos, por su consuelo, por sus porras y ánimos. Los amo.

A mis compañeras de laboratorio, Karen y Mónica, por su apoyo, por su disposición, por su tiempo y por compartir conmigo un poquito de su conocimiento y experiencia.

A mi compañera Sele, aunque fue poco el tiempo compartido, fue un honor trabajar juntas, gracias por tus consejos, por tu ayuda y por la alegría que siempre me contagiaste.

A cada uno de mis profesores, por inspirarme y motivarme a ser algún día grandes profesores, como ellos, gracias por sus consejos y por sus conocimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la financiación para poder realizar estos estudios de maestría.

Índice

Tabla de abreviaturas	9
1. Introducción.....	10
2. Hipótesis	13
3. Objetivos	15
3.1 Objetivo General	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4. Justificación	17
5. Marco teórico.....	20
5.1 Enfermedades cardiovasculares.....	21
5.1.1 Panorama de las enfermedades cardiovasculares	22
5.1.2 Importancia del diagnóstico de las enfermedades cardiovasculares	24
5.1.3 Técnicas rutinarias de diagnóstico para las enfermedades cardiovasculares	25
5.2 Inmunosensores	26
5.3 Biomarcadores cardiacos.....	27
5.3.1 Troponina I cardiaca.....	29
5.3.1.1 Estructura química.....	29
5.3.1.2 Capacidades analíticas	30
5.3.2 Técnicas de diagnóstico con troponina I cardiaca	33
5.4 Fundamentos de la espectroscopia Raman	36
5.4.1 Instrumentación.....	37
5.5 Fundamentos SERS.....	40
5.5.1 Determinación de analitos por SERS	41
5.5.2 SERS bajo la estrategia tipo sándwich	42
5.6 Nanotubos de carbono.....	48
5.7 Dendrimeros.....	49
5.8 Modificación electroquímica	50
5.8.1 Modificación electroquímica por la vía oxidativa	51
5.8.2 Modificación electroquímica por la vía reductiva	51
6. Metodología.....	53
6.1 Elaboración de electrodo Al-MWCNTs mediante el método electroforético	54
6.1.1 Funcionalización de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs).....	54
6.1.2 Elaboración de una suspensión acuosa de MWCNTs funcionalizados.....	55

6.1.3	Obtención de electrodo Al-MWCNTs mediante deposición electroforética	56
6.1.4	Caracterización electroquímica del electrodo Al-MWCNTs.....	56
6.2	Modificación electroquímica del electrodo Al-MWCNTs con dendrímeros PAMAM-NH ₂	57
6.3	Caracterización del sustrato Al-MWCNTs-PAMAM.....	57
6.3.1	Caracterización electroquímica del electrodo Al-MWCNTs-PAMAM.....	57
6.3.2	Caracterización por espectroscopia Raman de los sustratos Al-MWCNTs-PAMAM	57
6.3.3	Caracterización por SEM de los sustratos Al-MWCNTs-PAMAM	58
7.	Resultados y discusión	59
7.1	Obtención de los electrodos Al-MWCNTs	60
7.1.1	Caracterización electroquímica de los sustratos Al-MWCNTs.....	60
7.2	Modificación electroquímica de los electrodos Al-MWCNTs con dendrímeros PAMAM.	62
7.2.1	Modificación del electrodo Al-MWCNTs con dendrímeros PAMAM	62
7.3	Caracterización del sustrato Al-MWCNTs-PAMAM.....	63
7.3.1	Caracterización electroquímica del electrodo Al-MWCNTs-PAMAM con sonda redox	63
7.3.2	Caracterización por espectroscopia Raman de los sustratos Al-MWCNTs-PAMAM....	64
7.3.3	Caracterización por SEM de los sustratos Al-MWCNTs-PAMAM.....	65
8.	Conclusiones	67
	Referencias.....	69
	ANEXO 1	75
	ANEXO 2	76
	ANEXO 3	77

Índice de figuras

Figura 1. Enfermedades cardiovasculares [17].	24
Figura 2. Representación esquemática de los biosensores. Elaboración propia.	26
Figura 3. Estructura química de los residuos aminoácidos 104-115 de la troponina I cardiaca. Tomado de: [87].	30
Figura 4. A) Concentraciones persistentes de troponina I cardiaca después de un evento cardiaco. B) Valores de TnIc considerados para las enfermedades cardiovasculares [17-23].	32
Figura 5. Evolución de los ensayos de troponina I cardiaca y sus valores de diagnóstico. Los años corresponden a la disponibilidad de los respectivos ensayos en el mercado. Adaptado de: Mahajan et al. [24].	34
Figura 6. Dispersión Raman y dispersión de Rayleigh. Elaboración propia.	37
Figura 8. Esquema de la detección de analitos por SERS. A) Forma directa y B) Forma indirecta. Elaboración propia.	42
Figura 9. Representación del inmunoensayo SERS bajo la estrategia tipo sándwich. Elaboración propia.	43
Figura 10. Rangos dinámicos lineales reportados respecto a la concentración de TnIc [16,17].	47
Figura 11. Representación de A) nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) y B) nanotubos de carbono multicapa (MWCNT). Tomado de: [89].	49
Figura 12. Representación de un dendrímero y sus elementos. Tomado de: [98].	50
Figura 13. Diagrama general de la metodología.	54
Figura 14. Electrodo Al-MWCNTs.	60
Figura 16. Voltamperograma cíclico del electrodo Al-MWCNTs y el blanco a una velocidad de barrido 100 mV s^{-1} .	62
Figura 19. Espectro Raman de los sustratos analizados.	65

Índice de tablas

Tabla de abreviaturas	9
Tabla 1. Principales enfermedades cardiovasculares y porcentaje de morbilidad [29-36].....	21
Tabla 2. Biomarcadores cardiacos más importantes [57,75-79].	28
Tabla 3. Concentraciones de TnIc en diferentes tipos de pruebas para el diagnóstico del IAM	35
Tabla 4. Inmunoensayos basados en SERS para la cuantificación de TnIc.	44

Tabla de abreviaturas

<i>Término</i>	<i>Abreviatura</i>
<i>Creatina quinasa MB isoenzima</i>	CK-MB
<i>Enfermedad cardiovascular</i>	ECV
<i>Ensayo de Inmunosorción Enzimática</i>	ELISA
<i>Infarto Agudo de Miocardio</i>	IAM
<i>Troponina C</i>	TnC
<i>Troponina I</i>	TnI
<i>Troponina I cardiaca</i>	TnIc
<i>Troponina T</i>	TnT
<i>Mioglobina</i>	Myo
<i>Nanopartículas de oro</i>	AuNPs
<i>Organización Mundial de la Salud</i>	OMS
<i>Pruebas de laboratorio en el punto de atención</i>	POCT
<i>Resonancia de Plasmón Superficial</i>	SPR
<i>Surface-enhanced Raman spectroscopy (Espectroscopia Raman de Superficie Aumentada)</i>	SERS
<i>Multi-Walled Carbon Nanotubes (Nanotubos de carbono de pared múltiple)</i>	MWCNTs
<i>Poli(amido)amino</i>	PAMAM
<i>Limit of detection (Límite de detección)</i>	LOD
<i>Limit of quantification (Límite de cuantificación)</i>	LOQ

1. Introducción

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud la principal causa de defunción en el mundo incluye las enfermedades cardiovasculares (cardiopatías isquémicas: angina miocárdica, infarto agudo al miocardio (IAM), muerte súbita y accidentes cerebrovasculares) responsables del 27% del total de muertes anuales con más de 18 millones. En cuanto a México, recientemente se ha reportado que las enfermedades del corazón son también las principales causas de muerte con el 20.8% equivalente a 141,873 muertes por año. Debido a la situación actual, en el preocupante incremento de decesos derivados de la pandemia, declarada en marzo del 2020. La asociación ECV/enfermedad causada por coronavirus 2019 (COVID-19), datos clínicos indican que debido a la respuesta tromboinflamatoria provocada por COVID-19, puede conducir a trastornos cardiovasculares en pacientes [4-6].

Contar con un diagnóstico certero es el primer paso para una intervención adecuada de las enfermedades cardiovasculares. Entre los biomarcadores cardiacos más utilizados actualmente, se encuentra la troponina I cardiaca (TnIc), que representa un biomarcador cardiospecífico para la muerte y el daño de las células del miocardio [12-14]. En ese sentido, los últimos avances en las metodologías para la detección de TnIc han permitido tener mejores intervalos de medición para una correcta interpretación médica.

Las pruebas de diagnóstico empleando la TnIc se dividen en: a) inmunoensayos convencionales e inmunoensayos de alta sensibilidad, utilizados en laboratorios centralizados con un promedio de emisión de resultados de uno o más días y b) pruebas de diagnóstico en el punto de atención (POCT, por sus siglas en inglés), las cuales se realizan en centros de atención médica, y los resultados son obtenidos de 15 a 30 minutos después de la toma de muestra [15-17]. Adicionalmente, la mayoría de estas metodologías presentan protocolos complejos, los cuales generalmente requieren mucho tiempo, problemas de precisión y sensibilidad clínica baja, conllevan pretratamiento de muestras y se requiere de la calibración de los equipos y cada fabricante establece los límites de referencia basados en la capacidad de la metodología empleada (rango lineal) para medir cambios leves, aunque significativos de las concentraciones de TnIc en muestras de sangre [19-21]. Ante las limitaciones anteriormente descritas, se hace evidente la necesidad de generar métodos más sensibles, estables y precisos que puedan ser utilizados para el diagnóstico y pronóstico de ECVs. Dentro de las técnicas alternativas con más alto potencial para

la generación de dispositivos analíticos robustos, precisos, rápidos y eficientes se encuentra la espectroscopia Raman [22-25]. Con esta técnica, en su variante espectroscopia Raman de Superficie Aumentada (SERS, por sus siglas en inglés), la cual se basa en el uso de materiales nanoestructurados de metales nobles como el oro, cobre y la plata, ya se ha abordado la detección/cuantificación de algunos biomarcadores cardiacos incluyéndose la TnIc principalmente en metodologías basadas en inmunoensayos [24, 25].

Para la elaboración de inmunoensayos y su medición por esta técnica han empleado anticuerpos de captura libres o adheridos a una fase sólida (sustrato de captura) de donde se obtiene los complejos antígeno-anticuerpo. Por otra parte, están las sondas de detección en solución (nanoetiquetas-SERS), constituidas por segundos anticuerpos directamente contra el antígeno que se encuentran inmovilizados sobre nanoestructuras activas en SERS, generalmente, nanopartículas de oro.

En esta tesis, se presenta una propuesta de sustrato SERS para su empleo en la inmovilización de anticuerpos. Se inmovilizaron dendrímeros poli(amido)amina (PAMAM), sobre plantillas de aluminio (Al) con nanotubos de carbono multicapa (MWCNTs) depositados en su superficie, previamente desarrollados en nuestro grupo de trabajo. Los MWCNTs, por su naturaleza nanométrica, confieren un incremento substancial en el área superficial y en el área de contacto con los dendrímeros inmovilizados sobre su superficie. En cuanto a la incorporación de los dendrímeros sobre los electrodos Al-MWCNTs, la gran cantidad de grupos amina presentes en las ramificaciones de esta molécula globular permitió que el dendrímero se uniera a través de enlaces covalentes en a la superficie de los MWCNTs, generando un medio ambiente más ordenado con el objetivo de garantizar el anclaje, en este caso, de anticuerpos monoclonales anti-troponina I cardiaca (anti-TnIc). Mediante esta propuesta, se buscó beneficiar la inmovilización preferencial de una mayor cantidad de anticuerpos, lo cual se espera que se refleje en un incremento en la sensibilidad (límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)), una mejora en la precisión de la metodología y la repetibilidad de los ensayos.

2. Hipótesis

En la superficie de una placa de aluminio con nanotubos de carbono de pared múltiple depositados, es posible la inmovilización de dendrímeros poli(amido)amina de cuarta generación, esto, mediante la generación de enlaces covalentes entre el carbono de los grupos carboxilos de los nanotubos de carbono de pared múltiple y el nitrógeno de los grupos amino superficiales de los dendrímeros poli(amido)amina. La inmovilización de los dendrímeros en la superficie de los nanotubos de carbono permitirá el anclaje preferencial de anticuerpos monoclonales, lo que, a su vez hará posible la detección de la troponina I cardíaca. Como resultado, se obtendrá un sustrato de captura que permita ser caracterizado por espectroscopia Raman. En consecuencia, la reproducibilidad y sensibilidad del sustrato de captura presentarán una alta eficiencia debido al incremento en la carga de los anticuerpos al inmovilizarlos sobre los dendrímeros.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Inmovilizar dendrímeros PAMAM de cuarta generación sobre el electrodo de aluminio con nanotubos de carbono multicapa (Al-MWCNTs) enfocado a su uso como sustrato de captura para el anclaje de anticuerpos monoclonales troponina I cardiaca de manera preferencial y la detección de troponina I cardiaca para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares.

3.2 Objetivos específicos

1. Establecer los parámetros operacionales para la elaboración de los electrodos Al-MWCNTs a partir del método electroforético.
2. Diseñar y construir una celda electroquímica para la modificación y caracterización electroquímica.
3. Inmovilizar dendrímeros PAMAM de cuarta generación mediante modificación electroquímica de la superficie del electrodo Al-MWCNTs.
4. Caracterizar electroquímica y espectroscópicamente el sustrato de captura preparado, (sustrato Al-MWCNTs-PAMAM).

4. Justificación

El alarmante aumento en las defunciones causadas por las enfermedades cardiovasculares (ECVs), reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS); así como las proyecciones hechas respecto a la susceptibilidad de adquirir o desarrollar alguna ECV debido a factores de riesgo como: colesterol elevado, diabetes, tabaquismo, genética e inactividad física, ha evidenciado la importancia de atender y crear nuevas estrategias para su diagnóstico. Entre las ECVs, el infarto agudo de miocardio (IAM) es la causa número uno de muertes tanto en México como a nivel mundial. Así mismo, es importante destacar que las técnicas rutinarias que se utilizan para el diagnóstico de IAM incluyen estudios clínicos (pruebas de medición de biomarcadores cardiacos). No obstante, un incorrecto seguimiento de un biomarcador específico puede resultar en diagnósticos y tratamientos no adecuados. Además, en algunos casos, los estudios recomendados deben realizarse en laboratorios centralizados los cuales no se encuentran disponibles en cualquier lugar, suelen consumir mucho tiempo en su realización y en la espera de los resultados, siendo obstáculos para una intervención y tratamiento oportuno. Aunado a esta problemática, la actual pandemia provocada por COVID-19 y su relación con las ECVs, ha dificultado aún más esta situación, aumentando la incidencia de errores en el diagnóstico de ECVs. Esto, debido a la respuesta tromboinflamatoria que causa COVID-19 en los pacientes, teniendo como consecuencia daño cardiovascular subyacente evidenciado por la elevación de los niveles de biomarcadores cardíacos.

Respecto a los biomarcadores cardiacos, la troponina I cardíaca (TnIc) es considerada como el estándar de oro para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de ECVs, ya que representa un biomarcador muy sensible y específico para la muerte de las células del miocardio. Generalmente, la medición de TnIc para el diagnóstico de IAM se realiza empleando kits comerciales convencionales, pruebas de alta sensibilidad y/o pruebas de diagnóstico en el punto de atención (POCT), basados principalmente en el ensayo de inmunosorción enzimática (ELISA). Sin embargo, estos inmunoensayos presentan limitaciones relacionadas con la estabilidad de los anticuerpos, los protocolos complejos y baja precisión y sensibilidad. Además, cada fabricante establece sus límites de referencia basados en capacidad de medición de la metodología utilizada. En ese sentido, se hace necesario el desarrollo de alternativas analíticas rápidas, precisas y sensibles para la medición de cTnI, entre estas, se destaca el uso de sustratos de captura como pieza clave utilizando la espectroscopía Raman, que es una técnica analítica novedosa y con alto potencial para aprovechar todas las ventajas que ofrece la TnIc para lograr una detección rápida, sensible y

específica. Así, para poder hacer uso de esta técnica es imprescindible contar con superficies ópticas sencillas que sean capaces de tener la estabilidad necesaria para contener al biomarcador. Por esto, el desarrollo de la metodología de esta tesis permitirá sentar las bases para una alternativa tecnológica aplicada a un problema de salud pública mundial.

5. Marco teórico

5.1 Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son un grupo de enfermedades que involucran trastornos del corazón, e incluyen: hipertensión arterial, enfermedad vascular periférica, lesión cardíaca, miocarditis, insuficiencia cardíaca, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita, miocardiopatías e infarto agudo de miocardio [25-28]. Las más importantes de acuerdo con porcentaje de morbilidad de mayor a menor importancia, se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Principales enfermedades cardiovasculares y porcentaje de morbilidad [29-36]

Enfermedad	Descripción	Porcentaje de morbilidad
Infarto agudo de miocardio	Es la obstrucción de la irrigación sanguínea al miocardio. Los infartos suelen suceder cuando un coágulo de sangre obstruye la irrigación sanguínea hacia el corazón. Sin sangre, los tejidos no reciben oxígeno y mueren. Los síntomas incluyen rigidez o dolor en el pecho, el cuello, la espalda o los brazos, así como fatiga, mareos, y ritmo cardíaco anormal. La causa de un ataque cardíaco no siempre se conoce, sin embargo, existen factores de riesgo bien conocidos.	(60-65%)
Angina inestable	Es una afección en la cual el corazón no recibe suficiente flujo de sangre y oxígeno y puede desencadenar un infarto agudo de miocardio o ataque cardíaco. Es un tipo de molestia en el pecho causada por el flujo deficiente de sangre a través de los vasos sanguíneos (vasos coronarios) del músculo cardíaco (miocardio).	(52%)
Insuficiencia cardíaca aguda	Es la presencia de signos y síntomas como taquicardias, disnea, ortopnea o edema, los cuales producen hipertensión pulmonar severa, debido a elevación de la presión de llenado del ventrículo izquierdo con o sin gasto cardíaco bajo y que requieren terapia urgente.	(30-40%)

Miocarditis	Es la inflamación de la capa media de la pared del corazón. Puede presentarse debido a alguna infección viral. Cuando se presenta una etapa aguda, la afección puede producir insuficiencia cardíaca, e incluso muerte súbita. Algunos de los síntomas incluyen frecuencia cardíaca anormal y dificultad para respirar.	(4-12%)
Miocardiopatía	Es una enfermedad congénita o provocada que altera las funciones del corazón que puede evolucionar a insuficiencia cardíaca. Los síntomas incluyen hinchazón en las piernas y los pies, distensión abdominal y dificultad para respirar.	(7-8%)
Insuficiencia cardíaca crónica	Es un síndrome que implica disfunción cardíaca que produce mala perfusión de órganos periféricos en relación con su demanda metabólica, como consecuencia de procesos que afectan, de forma primaria o secundaria, la capacidad del corazón para llenarse o vaciarse adecuadamente. Los síntomas incluyen disnea, edema, fatiga o trastornos digestivos.	(6-7%)
Angina estable	Es una molestia o dolor torácico que en la mayoría de los casos ocurre por actividad o estrés. La angina se debe a la mala circulación a través de los vasos sanguíneos en el corazón. El miocardio necesita un suministro continuo de oxígeno.	(1-4%)

Los principales factores de riesgo para padecer ECVs son: obesidad, niveles fluctuantes de colesterol y/o triglicéridos, tabaquismo, sedentarismo, pacientes con diabetes mellitus tipo 2, defectos congénitos, longevidad, malos hábitos alimenticios e incluso el padecimiento de algún tipo de cáncer [37-40].

5.1.1 Panorama de las enfermedades cardiovasculares

Con 17.9 millones de defunciones por año, las ECVs son la principal causa de muerte en todo el mundo [42-44], más del 80% de las defunciones por esta causa se producen en países de ingresos

bajos y medios y afectan casi por igual a hombres y mujeres. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que para 2030, casi 23.6 millones de personas morirán por alguna enfermedad cardiovascular, principalmente por cardiopatías y accidentes cerebrovasculares [44-47]. No obstante, este valor se ha visto fuertemente afectado por la actual pandemia provocada por la enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2 (COVID-19), detectado por primera vez en 2019. Además, desde 2020 se considera que estas enfermedades estarán entre las principales causas de muerte a nivel mundial [4, 6, 48-51]. En este sentido, se ha reportado un número importante de pacientes con algún padecimiento cardíaco en personas que han cursado la COVID-19. Debido a que se ha evidenciado que pacientes infectados con esta enfermedad han presentado efectos de coagulación, lo que ha favorecido el padecimiento de afecciones cardíacas y/o ha agravado afecciones cardíacas preexistentes. Diversos estudios han mostrado que la replicación del virus dentro de la célula de un huésped, en algunos casos, puede persistir dentro del miocardio [5, 52]. El virus se une al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2) presente en la célula hospedera, este receptor se expresa también de forma amplia en los cardiomiocitos, los fibroblastos cardíacos y las células del endotelio coronario, pues constituye un regulador de la función cardíaca [53-55]. Además, han documentado que la interacción entre la proteína espiga (S) del virus y la ACE-2 ha ganado mucho interés en la investigación, dado que se sabe que la ACE-2 tiene funciones cruciales tanto en el sistema cardiovascular como en el sistema inmunológico [6, 55]. Existen reportes de casos de miocarditis con una variada presentación que incluye estadios leves a severos complicados [54,55]. En los casos más graves, la miocarditis se puede asociar a la insuficiencia cardíaca aguda. Por otra parte, existe un efecto adicional a la respuesta inmunitaria mediado por citoquinas y algunos biomarcadores cardíacos en pacientes con COVID-19 que además cursan alguna lesión miocárdica. Estos pacientes presentan niveles elevados de troponina I cardíaca de alta sensibilidad ($>0.12 \text{ ng mL}^{-1}$) y anomalías en ecocardiografía y/o electrocardiograma [6, 53-56].

En México, según el censo del INEGI del 2020, las ECVs ocupan el primer lugar de causa de muerte representando casi una cuarta parte (24%) del total de muertes registradas al año [7]. Adicionalmente, el 17% de la población es fumadora, 22.8% tienen hipertensión y más de 1 de cada 3 personas (32.1%) son obesos; lo que puede aumentar el riesgo de infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardíaca o derrame cerebral [2, 3, 50].

5.1.2 Importancia del diagnóstico de las enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son consideradas degenerativas, sino son atendidas oportunamente pueden llevar al paciente a presentar un infarto agudo de miocardio abruptamente teniendo como consecuencia que el paciente sea susceptible a un futuro evento cardiaco o que el infarto lo lleve a la muerte fulminante [48, 50]. En la figura 1 se presenta la clasificación y el avance de las enfermedades cardiovasculares hasta llegar al infarto agudo de miocardio.

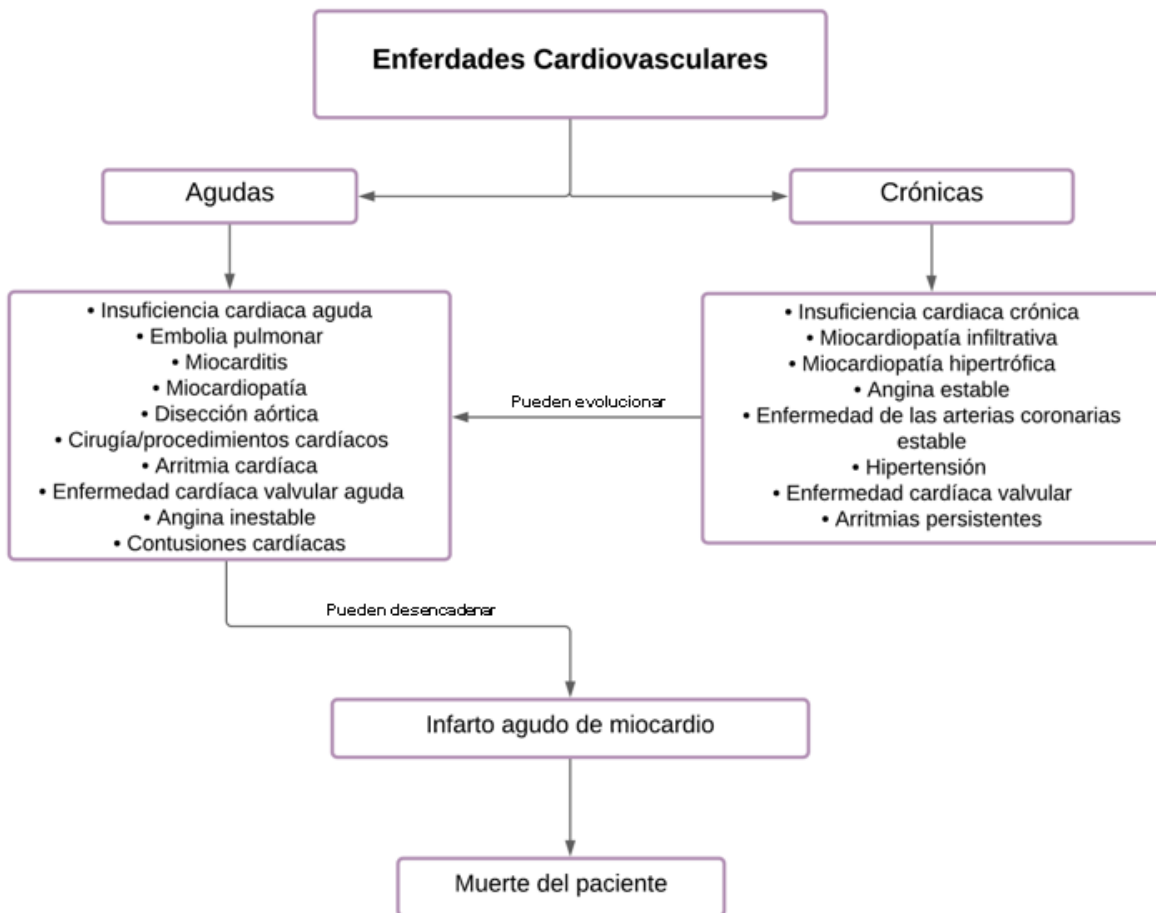


Figura 1. Enfermedades cardiovasculares [17].

Un factor crucial que es considerado por los especialistas al abordar enfermedades cardiovasculares en pacientes es el tiempo que toma realizar un diagnóstico certero y oportuno, así como llegar a buenos pronósticos durante chequeos médicos preventivos después de un evento cardiaco. Debido a esto y a los factores de riesgo que están fuertemente relacionados con estas

enfermedades, las metodologías rutinarias empleadas para la detección de ECVs se tornan altamente relevantes [50-52]. La importancia del diagnóstico de las ECVs radica en reducir el tiempo que toma llegar a éste, con el propósito de mejorar y aumentar la expectativa de vida de pacientes que padezcan este tipo de enfermedades [17, 50].

5.1.3 Técnicas rutinarias de diagnóstico para las enfermedades cardiovasculares

Las técnicas rutinarias o convencionales que generalmente emplean cardiólogos para diagnosticar enfermedades cardiovasculares en pacientes consisten en evaluar indicadores bioquímicos mediante estudios clínicos y/o en la interpretación de información proveniente de estudios de imagenología [20, 56-58]. Los estudios clínicos que comúnmente se solicitan son: el perfil cardiovascular, estudio de colesterol total, estudio de triglicéridos, estudio de proteína C reactiva, estudio de glucosa y estudio de troponinas. Los estudios de imagenología más utilizados son: el electrocardiograma (ECG), ecocardiograma, ultrasonido Doppler, tomografía de Tórax, radiografía, entre otros [22, 23, 59]. Además, la OMS establece como criterios de diagnóstico de IAM para pacientes: el ECG, niveles anormales de los biomarcadores cardiacos en muestras de sangre y dolor torácico [50]. Aunque el ECG es un parámetro importante para determinar el tratamiento, se considera una prueba de diagnóstico deficiente debido a que la mitad de los pacientes con ECV muestran un electrocardiograma normal [17, 60, 61]. Por lo tanto, estas metodologías no han mostrado ser 100% confiables, ya que el diagnóstico de este tipo de enfermedades se hace difícil, debido a que está relacionado con muchos factores de riesgo. No obstante, todos los estudios recomendados por especialistas deben realizarse en laboratorios especializados, no se encuentran en cualquier ciudad, son costosos, el paciente suele consumir mucho tiempo en la realización de estos y en la espera de los resultados, siendo obstáculos para la intervención y tratamiento oportuno.

5.2 Inmunosensores

Un inmunosensor es un tipo de biosensor. El cual es un dispositivo que usa reacciones bioquímicas específicas mediadas por elementos biológicos (enzimas, anticuerpos, organelos, tejidos o células completas) para detectar compuestos químicos mediante señales eléctricas, térmicas u ópticas [62-64]. Los elementos biológicos son los que permiten el reconocimiento del compuesto químico a detectar (analito). De la interacción entre el elemento biológico (elemento de reconocimiento) con el analito, se genera un cambio particular que otro componente del sensor, el transductor, convierte en una señal fácilmente medible. En algunas ocasiones, entre el elemento de reconocimiento y el transductor surge un cuarto componente: un amplificador, que genera una interfaz para aumentar la señal del dispositivo [65]. En la figura 2 se esquematiza un biosensor con los componentes básicos que lo integran.

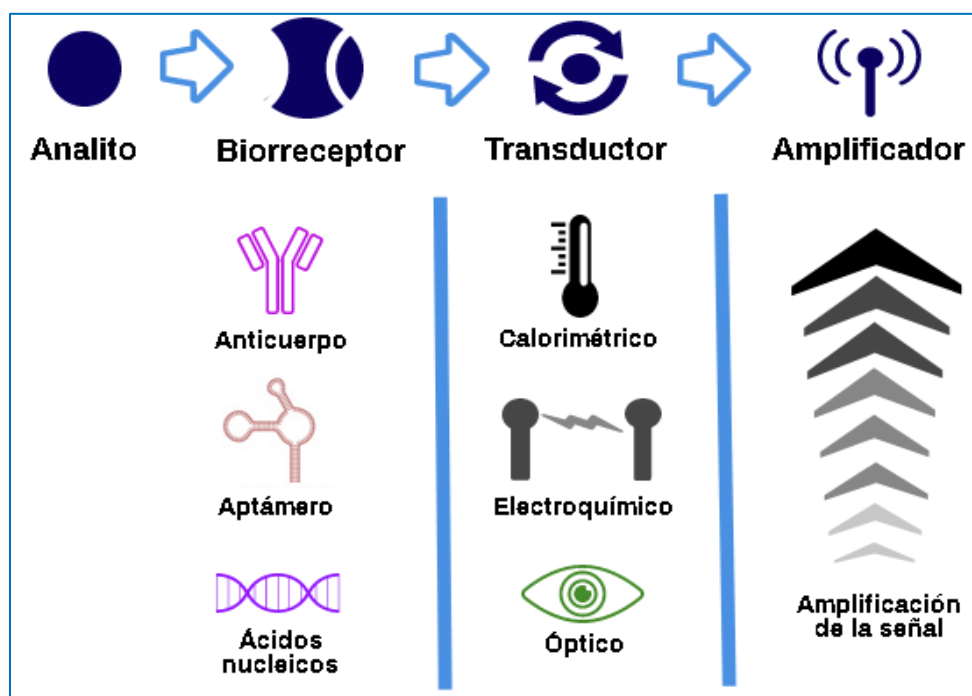


Figura 2. Representación esquemática de los biosensores. Elaboración propia.

Un biosensor puede ser clasificado en óptico, piezoeléctrico, térmico o electroquímico dependiendo del transductor utilizado para medir dichos cambios [64-66]. Así mismo, puede también ser clasificado dependiendo del elemento biológico usado. En el caso de los inmunosensores, el elemento de reconocimiento es un anticuerpo en los que se encuentran expuestos grupos químicos (por ejemplo, carboxilos y aminos), los cuales pueden ser empleados para unirse al transductor a través de enlaces químicos o por adsorción. El anclaje o unión del anticuerpo al transductor se produce mediante la interfaz que es orgánica [67, 68].

5.3 Biomarcadores cardiacos

Los biomarcadores cardiacos son considerados como moléculas, proteínas o enzimas medibles en plasma sanguíneo y fluidos corporales que proporcionan un valor diagnóstico y pronóstico independiente que refleja un estado de enfermedad o trastorno subyacente [69]. Son sustancias liberadas en el torrente sanguíneo como respuesta de un daño al corazón [70]. Hasta el momento se han utilizado moléculas indicadoras o biomarcadores que participan en diferentes procesos patológicos relacionados con las enfermedades cardiovasculares, por lo que pueden ser considerados como candidatos idóneos para la detección para establecer el riesgo de presentar una enfermedad cardiaca o para monitorear y controlar a personas con algún tipo de alteración cardíaca [71, 72]. Las características requeridas de un biomarcador para ser empleado son: poseer alta especificidad clínica y sensibilidad, liberar rápidamente la biomolécula en el torrente sanguíneo para la detección temprana, tener la capacidad de permanecer un tiempo considerable en la sangre y ser capaz de cuantificarse [73].

El biomarcador cardiaco ideal, debe liberarse rápidamente, debe ser específico, su proceso de medición debe ser exacto y su resultado ser fácil de interpretar. Los biomarcadores que son empleados para diagnóstico y pronóstico deben ser altamente sensibles y contar con baja variabilidad biológica [70,74]. A continuación, se muestra en la tabla 2, algunos de los biomarcadores con más evidencia científica actual en el contexto fisiopatológico, desde la lesión aterosclerótica hasta el infarto agudo de miocardio, su función y ubicación.

Tabla 2. Biomarcadores cardiacos más importantes [57, 75-79].

BIOMARCADOR	FUNCIÓN	UBICACIÓN
Troponina I cardiaca (TnIc)	Se libera al sistema circulatorio como respuesta la necrosis miocárdica	Miocardio
Troponina T cardiaca (TCNT)	Se libera al sistema circulatorio como respuesta la necrosis miocárdica	Miocardio
Proteína de unión a ácidos grasos de tipo corazón (H-FABP)	Es el marcador bioquímico de Albúmina Modificada por Isquemia (AMI) que aumenta más rápidamente	Músculo cardíaco
Proteína C Reactiva (PCR)	Se libera en forma inespecífica en la fase aguda de procesos inflamatorios	Hígado
Péptido Natriurético Cerebral (BNP)	Hormona liberada ante el estímulo del aumento de la tensión parietal por incremento de la presión y/o volúmenes intracavitarios	Ventrículos cardíacos
Mioglobina	Es un marcador poco cardiosselectivo es necesario usarlo junto con otros biomarcadores, 2-3 horas desde la aparición de los síntomas	Corazón
Creatinaquinasa isoenzima-MB (CK-MB)	La actividad de esta enzima aumenta cuando se produce una lesión muscular o cardíaca. Se eleva a las tres y las seis horas después del inicio de síntomas del evento coronario agudo	Cerebro, músculo esquelético y corazón
Glutámico oxalacético transaminasa	Este marcador se encuentra elevado en la sangre en patologías hepáticas, pancreatitis, muerte de tejido muscular y necrosis miocárdica	Hígado, páncreas y miocardio
Lactato deshidrogenasa	Este marcador se utilizaba inicialmente para ayudar al diagnóstico y la monitorización de los síndromes coronarios agudos	Corazón
Fibrinógeno	Es una molécula esencial para la formación del coágulo sanguíneo	Tejidos sanguíneos
Interleucina-6 humana (IL-6)	Es una citocina con actividad antiinflamatoria y proinflamatoria.	Torrente sanguíneo
Citocina TNF- α	Es una proteína liberada por las células del sistema inmunitario que interviene en la inflamación y la apoptosis	Torrente sanguíneo

5.3.1 Troponina I cardiaca

El complejo troponina se encuentra en el filamento delgado del músculo del corazón y está formado por tres subunidades de proteínas diferentes: troponina C (proteína de unión a calcio del complejo de troponina), troponina T (proteína que une el complejo de troponina a la tropomiosina) y troponina I (proteína que modula la interacción de actina y miosina). La troponina C actúa únicamente en el músculo esquelético, mientras que la troponina I y T además de actuar en el músculo esquelético, también actúan en los cardiomiocitos del músculo cardiaco [79,80]. Tanto la troponina I como la troponina T de músculo cardiaco y esquelético se liberan al sistema circulatorio en el momento de un evento cardiaco. Sin embargo, la troponina I cardiaca (TnIc) está más diferenciada de la troponina I esquelética (TnIe), lo que no sucede con la troponina T cardíaca (TCNT) respecto de la troponina T esquelética (TnTe). Esta diferencia es la que confiere una gran ventaja para la detección específica de la TnIc y hace que sea el biomarcador cardiaco por elección para el diagnóstico de infarto agudo de miocardio y otras enfermedades cardiovasculares [81, 82].

5.3.1.1 Estructura química

La TnIc es una proteína que posee una masa molecular de 23 kDa, y en condiciones fisiológicas un pH de 7.4, y un punto isoeléctrico (pI) de 9.87 [83]. Es una molécula hidrófoba con un diámetro aproximado de entre 15 a 20 nm [83,84]. Está compuesta por 210 aminoácidos con una extensión amino-terminal única. La región de la TnIc responsable de su actividad específica del músculo cardiaco corresponde a los residuos aminoacídicos 104-115, (ver figura 3) [61,85]. Análisis epitópicos basados en la estructura química de la TnIc han mostrado que estos pequeños fragmentos proteicos proporcionan lo necesario para poder utilizarse como epítomos (porción reconocida por una secuencia a la que se unen anticuerpos), permitiendo que una gran parte de la secuencia aminoacídica de esta molécula sea reconocida por anticuerpos específicos [85,86]. Como resultado, la TnIc tiene una especificidad de tejido miocárdico, casi absoluta lo que hace posible su detección y cuantificación [81, 82].

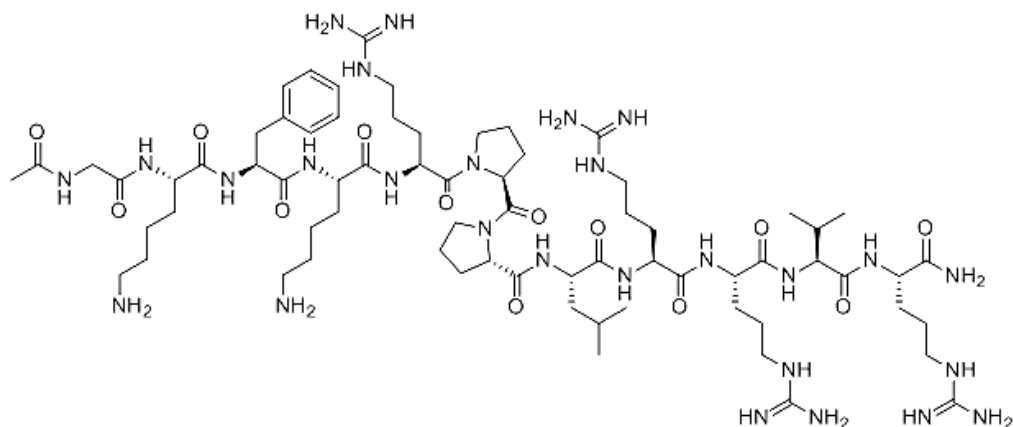


Figura 3. Estructura química de los residuos aminoácidos 104-115 de la troponina I cardíaca. Tomado de: [87].

5.3.1.2 Capacidades analíticas

Actualmente la TnIc es el biomarcador cardíaco por excelencia utilizado para el diagnóstico del infarto agudo de miocardio (IAM). La TnIc es liberada en el torrente sanguíneo como respuesta de una contracción anormal del músculo cardíaco durante episodios de isquemia y/o necrosis [84,87]. La TnIc es detectable en el suero sanguíneo después de un IAM dentro de las 3 a 12 h posteriores del inicio de la necrosis miocárdica, y dependiendo de la duración y el estado de la isquemia, los valores máximos ocurren de 12 a 48 h. Además, los niveles de la TnIc permanecen elevados en el suero hasta 14 días después de una lesión miocárdica (figura 4A), lo que ofrece una amplia ventana de diagnóstico permitiendo la confirmación de éste en etapas tempranas, o incluso para pacientes que retrasan su presentación a la atención médica después del inicio de los síntomas. Adicionalmente, debido a que los valores de TnIc permanecen elevados un tiempo considerable en sangre después de un evento cardíaco, puede emplearse para el pronóstico de la recurrencia de presentar un IAM [16,24,88].

De acuerdo con las guías clínicas internacionales, los patrones fluctuantes en las concentraciones de la TnIc son indicadores para el diagnóstico de otras enfermedades cardiovasculares además del IAM. El primer criterio que se debe considerar para el diagnóstico es que la concentración de TnIc esté por encima del valor del percentil 99 ($> 0.02 \text{ ng mL}^{-1}$) [16, 89, 90]. Las enfermedades cardiovasculares más importantes que pueden ser diagnosticadas cumpliendo dicho criterio y según las variaciones de concentración pueden ser: miocarditis,

miocardiopatía, embolia pulmonar, insuficiencia cardiaca crónica y aguda, infarto agudo de miocardio, entre otras, como se muestra en la figura 4B. Por otra parte, concentraciones de TnIc por debajo del percentil 99 ($< 0.02 \text{ ng mL}^{-1}$) son consideradas para afecciones que no representan una morbilidad alta, pero que pueden evolucionar a una afección aguda, lo que evidencia el valor predictivo de la TnIc. Adicionalmente, la alta sensibilidad lograda en los inmunoensayos de última generación ha permitido determinar un valor normal para pacientes sanos de 0.005 ng mL^{-1} [16-23].

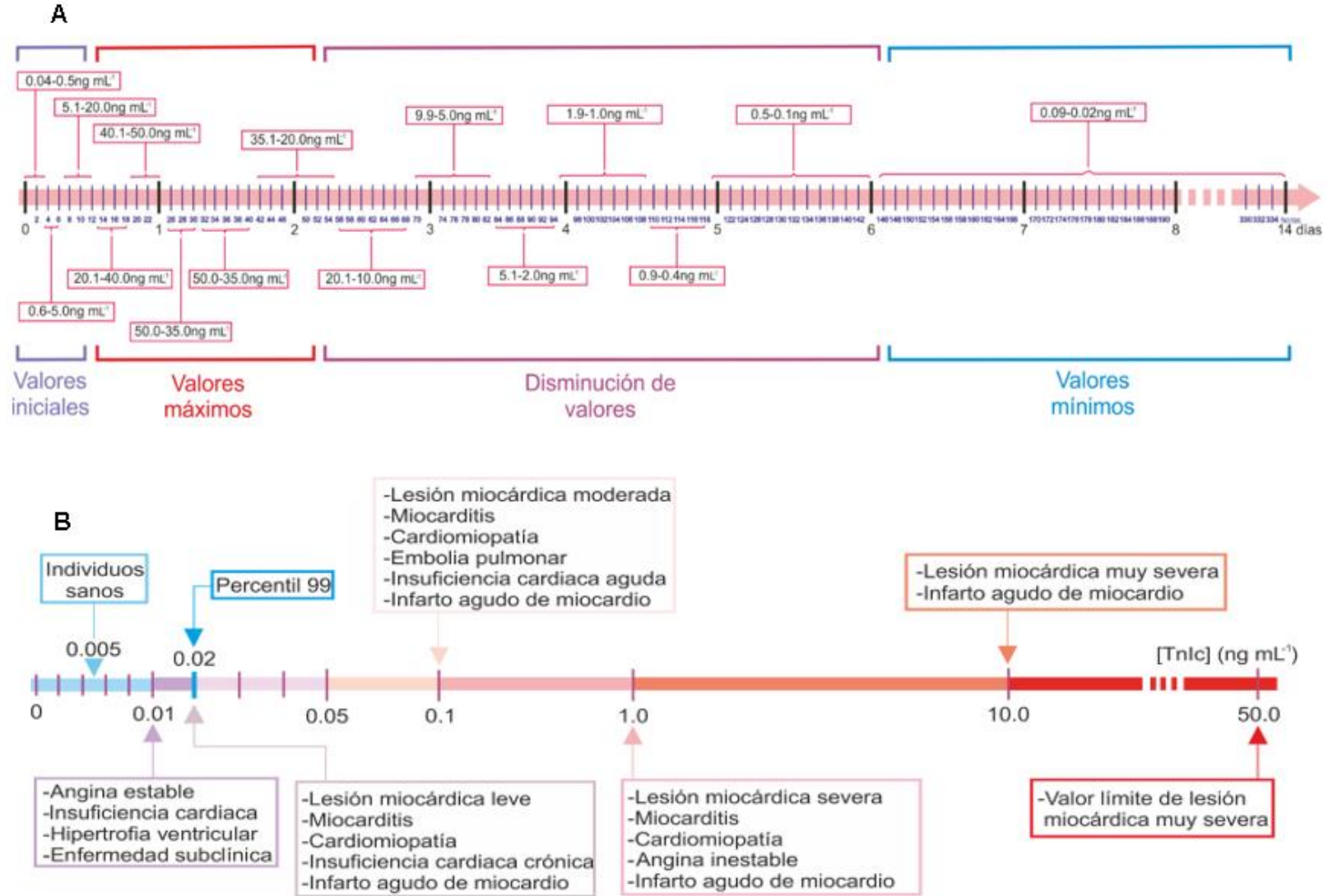


Figura 4. A) Concentraciones persistentes de troponina I cardíaca después de un evento cardíaco. B) Valores de TnIc considerados para las enfermedades cardiovasculares [17-23].

En general, los valores consultados en literatura no muestran diferencia en el tiempo y la concentración de TnIc con respecto a la edad de los pacientes. Sin embargo, los valores pueden llegar a variar si el paciente presenta alguna comorbilidad, alguna enfermedad infecciosa como influenza o COVID-19, o si padece algún tipo de cáncer [89]. Se recomienda de manera ideal que la evaluación inicial del paciente en el departamento de emergencias, incluida la medición de marcadores bioquímicos, se realice dentro de los primeros 30 minutos después de iniciarse el evento cardíaco, lo que conllevaría a un tratamiento oportuno dentro de los 60-90 minutos, y con ello incrementar de manera significativa la expectativa de vida del paciente [87-90].

5.3.2 Técnicas de diagnóstico con troponina I cardíaca

En 1987, Cummins et al. [75], describieron por primera vez, un radioinmunoanálisis para la medición de TnIc en suero humano, el cual requería dos días de trabajo para su realización y la concentración mínima detectable fue de 10 ng mL^{-1} . Estos factores hacían poco práctico su uso rutinario. Posteriormente, la primera prueba comercial de inmunoensayo para la TnIc fue lanzada en 1995 y fue capaz de detectar una concentración $\geq 1.5 \text{ ng mL}^{-1}$, estos niveles solían considerarse indicativos de necrosis miocárdica, es decir, eran considerados para diagnosticar IAM en pacientes declarados enfermos [24, 84, 88]. Estas pruebas son consideradas inmunoensayos convencionales o de primera generación, con capacidad de determinar únicamente altas concentraciones de TnIc. En 2003 fueron producidos los primeros inmunoensayos de alta sensibilidad para la TnIc (hs-cTnI, por sus siglas en inglés), llamados inmunoensayos de segunda generación. Estas pruebas siendo más sensibles que las convencionales, alcanzaron una detección $< 0.1 \text{ ng mL}^{-1}$, lo que permitió replantear la concentración de diagnóstico de IAM. En 2007 surgieron los inmunoensayos de tercera generación, aun conocidos como de alta sensibilidad y fueron capaces de detectar una concentración de 0.04 ng mL^{-1} , utilizada para mejorar el diagnóstico de IAM [24, 84]. La transición tiempo-concentración de los inmunoensayos convencionales y de alta sensibilidad se puede ver en la figura 5. Por otra parte, desde el 2000 y hasta la fecha se han desarrollado las llamadas pruebas de diagnóstico en el punto de atención (POCT), estos sistemas acercaron las pruebas de diagnóstico al paciente, permitieron que la medición de TnIc se realizara fuera de laboratorios centralizados y redujeron drásticamente el tiempo de respuesta de los resultados (20-30 min) por lo que estas

pruebas son muy utilizadas en las salas de emergencia de hospitales y centros de atención médica [99-101]. Aunque con estas pruebas se obtienen concentración de detección $< 0.04 \text{ ng mL}^{-1}$, no proporcionan valores específicos de diagnóstico para hombres y mujeres, ni valores normales para pacientes sanos [16,24,88]. Sin embargo, mientras mejora la sensibilidad clínica para el diagnóstico de infarto de miocardio, la negligencia obliga a muchos médicos a solicitar paneles completos de pruebas de laboratorio para pacientes con una probabilidad muy baja de presentar un evento cardiaco antes de la prueba, lo que afecta negativamente el diagnóstico. Antes de los inmunoensayos de TnIc de alta sensibilidad, se sostenía que las troponinas no aparecían en la circulación de individuos con un miocardio sano. Sin embargo, con ensayos de troponina de alta sensibilidad, se puede encontrar concentraciones de TCNT o TnIc circulante en el plasma como resultado de una lesión miocárdica isquémica o inflamatoria transitoria [24,89].

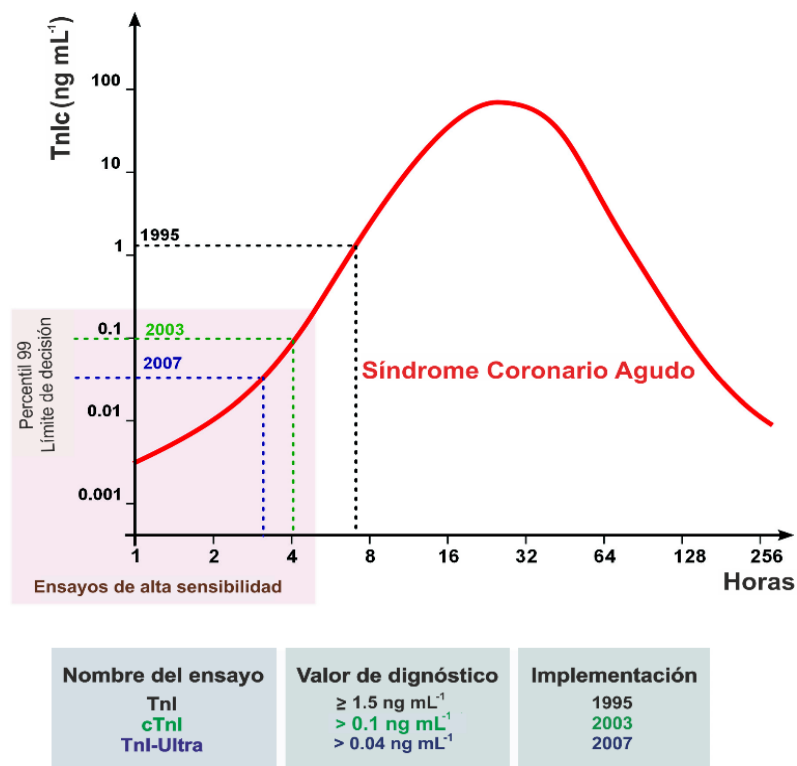


Figura 5. Evolución de los ensayos de troponina I cardiaca y sus valores de diagnóstico. Los años corresponden a la disponibilidad de los respectivos ensayos en el mercado. Adaptado de: Mahajan et al. [24].

Actualmente, los inmunoensayos disponibles son capaces de detectar concentraciones por debajo de los 0.01 ng mL⁻¹, lográndose determinar la concentración de este biomarcador inclusive para pacientes sanos. Las grandes mejoras en la sensibilidad de los ensayos disponibles, ha permitido no únicamente el diagnóstico de IAM, sino también de otras afecciones coronarias, además de establecer diferencias entre los valores presentados en hombres y mujeres (ver sección 2.4.3).

Los inmunoensayos comerciales para el diagnóstico de IAM que han sobresalido en el mercado a nivel mundial de acuerdo con la especificidad y sensibilidad que ofrecen se muestran en la tabla 3, y están basados principalmente en la detección por quimioluminiscencia, fluorescencia o matrices de proteínas colorimétricas.

Tabla 3. Concentraciones de TnIc en diferentes tipos de pruebas para el diagnóstico del IAM

Prueba	LOD ng mL⁻¹	LOQ ng mL⁻¹	Valor de diagnóstico ng mL⁻¹	Ref.
Ensayos convencionales				
Access	0.07	0.046	0.1	[83,84]
Cobas	0.09	-	0.2	[85]
Siemens Centaur Ultra	0.006	0.03	0.034	[82,86]
Abbott Architect	< 0.01	0.024	0.028	[82,87]
Ortho-Clinical Vitros	0.012	-	0.034	[82]
Access 2 Beckman	0.01	0.032	0.02	[82,87]
Siemens Vista	0.015	-	0.045	[82]
Ensayos de alta sensibilidad				
Access (Beckman Coulter)	0.0025	0.0014	0.0524 ^H /0.023 ^M	[88,89]
Ortho-Clinical Diagnostics	0.001	0.0012	0.019 ^H /0.016 ^M	[88,89]
Abbott Architect	0.0012	0.0035	0.034 ^H /0.016 ^M	[81,88]
Siemens Vista	0.0005	0.003	0.055 ^H /0.033 ^M	[82,88]

Ensayos en el punto de atención (POCT)				
Abbott i-STAT	0.02	-	0.08	[82,86]
bioMérieux Vidas	0.01	0.02	0.01	[86,88]
Radiometer AQT90 cTnI	0.0095	0.029	0.023	[84,88]
Siemens Stratus CS	0.03	0.05	0.07	[86,88]

^HValor para hombres, ^MValor para mujeres.

5.4 Fundamentos de la espectroscopia Raman

Desde hace mucho tiempo, las técnicas de espectroscopia convencional permiten han permitido identificar sustancias, determinar su estructura molecular y cuantificarlas, independientemente de su estado físico [89]. La espectroscopia Raman es una técnica espectroscópica la cual basa en la detección de la dispersión inelástica de la radiación electromagnética por átomos o moléculas (líquidos, gases o solidos), que se relaciona con las posiciones atómicas, las fuerzas intermoleculares y la distribución electrónica [56, 90]. La espectroscopia Raman utiliza un efecto cuyo nombre proviene del físico hindú Chandrasekhara Venkata Raman, quién fue el primero en 1928 en poner en evidencia este fenómeno, obteniendo en 1930 el premio nobel en física [91]. Se denomina efecto Raman al fenómeno generado cuando el campo electromagnético en una luz monocromática (láser), interactúa con la nube electrónica de los enlaces, lo cual permite acceder a los niveles vibracionales de las moléculas, ya sean inter o intramoleculares. El fotón incidente lleva los electrones a un estado excitado, la transición del electrón da lugar a la emisión de un fotón (dispersión) [56]. Una cantidad mayor de la dispersión mantiene la misma longitud de onda del láser, a cuál se le denomina dispersión Rayleigh, y una cantidad mucho menor será dispersión inelástica, es decir, una longitud de onda diferente a la longitud de onda inicial del láser, esto se conoce como dispersión Raman, como se observa en la figura 6. Esta dispersión se divide en dos tipos: Raman Stokes que se da cuando la energía del fotón dispersado es inferior (nivel vibracional fundamental), a la del fotón incidente. La dispersión Raman anti-Stokes se presenta cuando el fotón dispersado es superior (estado vibracional excitado), al fotón incidente (nivel vibracional fundamental) [90].

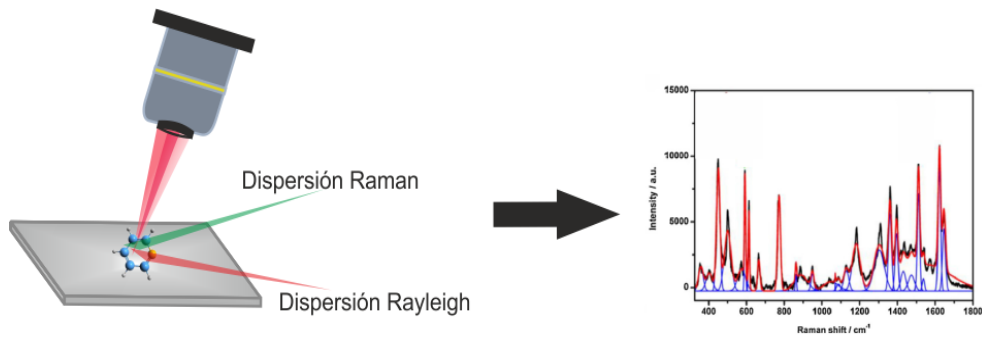


Figura 6. Dispersión Raman y dispersión de Rayleigh. Elaboración propia.

Entre las ventajas más importantes resaltan que es una con poca o nula preparación de muestra y las mediciones pueden llevarse a cabo en superficies de plástico, vasos, celdas, entre otras, para muestras biológicas [56]. Sin embargo, existen dos desventajas relevantes que limitan la aplicación de la espectroscopia Raman, las cuales son: la fluorescencia que presentan las moléculas (especialmente moléculas biológicas), la intensidad de fluorescencia que cubre el espectro Raman representativo de la molécula y la baja sección eficaz debido a que la fracción de los fotones Raman dispersados es del orden de 1 por cada 10^{11} fotones incidentes [76, 91]. Algunas de las aplicaciones la espectroscopia Raman ha sido ampliamente usada como herramienta para la detección de bioanalitos de ayuda complementaria para el diagnóstico de enfermedades crónicas (p.ej. cáncer o diabetes), enfermedades cardiovasculares, etc. [23, 85].

5.4.1 Instrumentación

El arreglo óptico del sistema microscópico Raman se muestra en la figura 7, el haz del láser pasa a través de un filtro para convertirlo en un solo haz de longitud de onda, el cual es enfocado en la superficie de la muestra por el microscopio. La dispersión de luz Raman reflejada desde un área microscópica de la muestra es recolectada por el microscopio y enviada al detector. La luz dispersada Raman, la cual resulta de la dispersión inelástica, es débil comparada con la luz del láser incidente. Por lo tanto, un filtro holográfico tiene que ser utilizado con el fin de bloquear la luz láser que entra al sistema detector. La longitud de onda de la luz dispersada Raman es seleccionada

por un sistema de rejilla de difracción antes de ser registrada por un detector. Los componentes en un sistema de microscopio Raman se detallan a continuación [92].

- **Fuente de láser**

Las fuentes de láser comúnmente usadas son gases de onda continua tales como Ar^+ , Kr^+ y He-Ne. Tales fuentes de láser a menudo son capaces de generar haces de múltiples longitudes de onda. Por ejemplo, Ar^+ genera un rango de longitudes de onda con diferentes intensidades. Las longitudes de onda más altas incluyen 515.4, 488.0 y 350.7 nm. Por lo tanto, es necesario filtrar las otras longitudes de onda diferentes a 515.4 nm cuando un láser Ar^+ es usado. El láser He-Ne, sin embargo, genera haces de una sola longitud de onda a 632.8 nm. La fuente láser de gas genera varias decenas de miliwatts (mW) de potencia de láser, pero la potencia del láser que alcanza el área microscópica de la muestra es de solo unos 5 mW [92].

- **Sistema de microscopio**

El microscopio en el sistema Raman es diferente a los microscopios convencionales usados para la observación de microestructuras en dos aspectos: el microscopio solo necesita iluminar un área microscópica, no todo el campo, y el microscopio debe tener una alta apertura numérica (NA) con el fin de recolectar la luz dispersada Raman sobre un gran ángulo sólido con eficacia. El haz de luz de la fuente de láser primero es filtrado para obtener una longitud de onda monocromática. Así, un filtro espacial estenopeico elimina la apariencia de los anillos de difracción y el ruido moteado alrededor del punto enfocado para obtener un haz de láser de punto limpio para iluminar la muestra. El haz de láser limpio es reflejado por un divisor de rayos y pasa a través de una lente objetiva para iluminar la muestra. La luz dispersada Raman es recolectada por un lente objetivo de gran apertura y enfocada en un primer filtro espacial estenopeico ajustable colocado en el plano de la imagen del microscopio y el segundo filtro espacial estenopeico alrededor del primero. Ambos filtros espaciales estenopeicos son llamados diafragmas cofocales debido a que están en posiciones de conjugación óptica exactas con respecto a la fuente puntual en el plano del objeto. Este arreglo cofocal asegura que no solo la luz originada del área microscópica de la muestra es transmitida al analizador espectral y al detector. Estos dos filtros espaciales estenopeicos son importantes para la iluminación y recolección de la luz Raman. Multiplican y aumentan la resolución espacial eliminando la luz perdida procedente de la región desenfocada de la muestra.

Ajustando el diafragma del primer filtro espacial estenoico, la resolución espacial de la muestra puede alcanzar $1\mu\text{m}$ cuando una lente objetivo de 100x es utilizada [92, 93].

- **Prefiltros**

La luz dispersada del microscopio debe pasar a través de filtros especiales antes de llegar al analizador espectral con el fin de remover la luz dispersada elásticamente. La luz Raman no puede ser vista sin los filtros debido a que la luz dispersada elásticamente tiene una intensidad más alta que la luz dispersada inelásticamente. El filtro debe tener idealmente una función de “muesca”. La muesca es transmisión cero en un rango estrecho de número de onda centrado en un número de onda excitado. Los dos filtros holográficos utilizados en el microscopio Raman sirven para tal propósito [92].

- **Rejilla de difracción**

El componente clave del analizador espectral en el microscopio Raman es la rejilla de difracción. La luz Raman se dispersa de acuerdo con sus longitudes de onda. La superficie de la rejilla de difracción contiene curvos finos paralelos que están equitativamente espaciados. Cuando la luz dispersada Raman incide en la rejilla de difracción, la rejilla dispersa la luz difractándola en una dirección discreta. La dispersión de la luz se basa en ley de Bragg de ángulo de difracción y longitud de onda incidente. La rejilla de difracción juega un rol similar al de los planos atómicos equidistantes en cristales. Las diferentes longitudes de onda se difractan en ángulos discretos. Una rejilla de difracción puede cubrir un rango de 1000 números de onda. Para un espectro Raman con un rango de 400 a 400 cm^{-1} , para registrar el espectro en el rango completo, la rejilla debe cambiar su ángulo con la luz Raman dispersada. Para un microscopio Raman moderno, la rejilla de difracción puede rotar continuamente con respecto a la luz Raman incidente dispersada y separar los números de onda de la dispersión Raman sin problema. La rejilla de difracción puede proporcionar una resolución espectral de 1 cm^{-1} [89, 90].

- **Detector**

La luz Raman dispersada separada conforme a la longitud de onda es registrada por un detector el cual está hecho de materiales fotoeléctricos. El detector convierte señales de fotones en señales

eléctricas. El dispositivo carga acoplada (charged-coupled device, CCD), es el detector comúnmente empleado. Un CCD es un semiconductor basado en silicio dispuesto como una matriz de elementos fotosensibles. Una matriz de una dimensión de un CCD puede detectar y registrar la intensidad de luz de longitudes de onda discretas separadas por la rejilla de difracción. El corrimiento Raman (principalmente la dispersión Stokes) es calculada y graficada contra el número de onda en el espectro Raman por procesamiento computacional [89, 91].

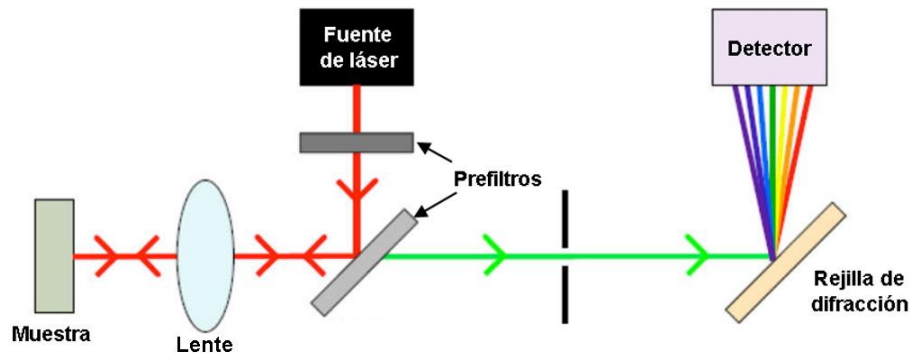


Figura 7. Instrumentación de un microscopio Raman [92].

5.5 Fundamentos SERS

Debido a las limitaciones de la espectroscopía Raman relacionadas con la intensidad obtenida con esta técnica, en consecuencia, en 1977 Jeanmaire y Van Duyne demostraron que la intensidad de los espectros Raman aumentaban cuando entraban en contacto con metálicos de rugosidad nanométrica (metales nobles) [56, 89]; descubriendo así el efecto SERS.

La Espectroscopia Raman de Superficie Aumentada (SERS, por sus siglas en inglés), es una técnica donde la dispersión Raman normal de los analitos amplificada por la presencia de metales nobles, principalmente nanopartículas de plata, oro o cobre [56, 89]. La amplificación se origina como resultado de la excitación del sustrato metálico con luz monocromática (láser), con lo cual se obtiene un campo resonante (oscilaciones de electrones), es decir, plasmones superficiales, consecuencia directa de la rugosidad a nivel nanométrico del sustrato y a su vez la magnitud del momento dipolar inducido también se incrementa [90-92]. Algunas ventajas de SERS son: una señal más intensa, el impedimento de la fluorescencia, y la identificación de moléculas in situ [56], con lo que no se cuenta en la espectroscopia Raman convencional [89-91]. Los valores

máximos de amplificación que se pueden obtener van de 10^{12} hasta 10^{14} veces de incremento. Sin embargo, una desventaja de la técnica SERS es la reproducibilidad de la elaboración de los sustratos, a causa del método de fabricación. SERS es dependiente del tamaño de las nanopartículas metálicas, forma geométrica, propiedades dielécticas del medio, la longitud de onda de excitación resonancia entre el metal, rugosidad, emparejamiento correcto del sustrato y de las nanopartículas menores a 50 nm las cuales absorben fuertemente la luz alrededor de la frecuencia plasmónica y son deficientes dispersores. Para partículas mayores de 50 nm la frecuencia plasmónica se corre en laser rojo, excitándose así los términos multipolares de mayor orden provocando un aumento en la dispersión óptica láser. Si la superficie nanoestructurada es demasiado lisa o plana no habrá una generación eficaz de plasmón superficial. [89, 91-96].

SERS ha sido usada como una técnica de detección y cuantificación debido a sus propiedades de identificación, preparación simple de muestras, análisis rápidos y no destructivos [87, 98]. No obstante, existe una desventaja para su uso como técnica rutinaria ya que la eficiencia de la técnica depende de la selección y repetibilidad de los sustratos empleados.

5.5.1 Determinación de analitos por SERS

La detección de analitos por SERS se puede realizar tanto en forma directa como indirecta. La medición directa comprende la recopilación directa de la señal Raman de analitos, adsorbidos o en estrecho contacto con la superficie SERS, o con la proximidad al sustrato inducida utilizando elementos de captura (anticuerpos, aptámeros o moléculas relacionadas) inmovilizados en superficies nanoestructuradas, ver figura 8A. Entre las ventajas de este método se encuentra un mayor control y precisión del proceso de cuantificación, además de la posibilidad de la identificación y caracterización química concomitantes a partir del análisis de las características vibracionales del analito. La detección indirecta correlaciona los cambios del espectro SERS de un metabolito, producto de una reacción química o de una molécula reportera Raman, como se observa en la figura 8B. El uso de moléculas reporteras es la forma más común de abordar la detección indirecta de muestras biológicas, y consiste en funcionalizar los sustratos de SERS con una o varias moléculas (detección monoplex o multiplexada respectivamente), que responden con un cambio en sus secciones transversales Raman, es decir, la interacción con el analito objetivo. Las moléculas

reporteras suelen ser de tamaño pequeño, presentan secciones transversales Raman altas, espectro Raman estrecho o con menos bandas superpuestas con la matriz u otros espectros de analitos, y son fotoquímicamente estables [33, 95]. Con esta metodología, se pueden detectar analitos con modos de vibración Raman bajos o nulos, y se han logrado detecciones multiplexadas controladas [35, 95].

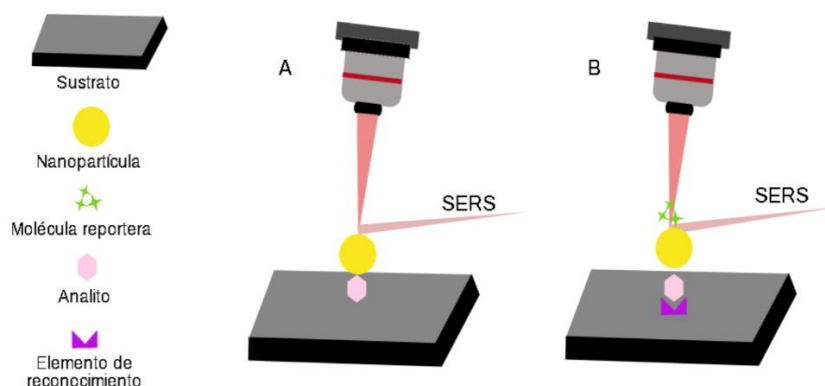


Figura 8. Esquema de la detección de analitos por SERS. A) Forma directa y B) Forma indirecta. Elaboración propia.

5.5.2 SERS bajo la estrategia tipo sándwich

El ensayo tipo sándwich consiste en la unión anticuerpo-antígeno-anticuerpo y es el más común en la aplicación de inmunoensayos SERS [35, 96]. Esta detección generalmente se basa en el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que es comúnmente empleado para la detección de biomoléculas debido a su bajo costo, simplicidad y especificidad. La detección indirecta de analitos se realiza mediante el uso de biomoléculas, en este caso, antígenos. Mediante la incorporación de etiquetas SERS las cuales se componen de: nanopartícula/molécula reportera/anticuerpo y utilizando como sustrato de captura: anticuerpo/superficie nanoestructurada, logrando mediante su unión la interacción etiqueta SERS/antígeno/sustrato de captura (anticuerpo-antígeno-anticuerpo), dando como resultado el inmunoensayo SERS, como se observa en la figura 9 [95-97].

Tras el rápido desarrollo de este tipo de metodologías, los biosensores basados en inmunoensayo SERS para la detección de proteínas han implicado desde el tipo sándwich clásico

hasta sistemas más complejos que integran tiras de inmunoensayo de flujo lateral, chips microfluídicos, etc. [95].

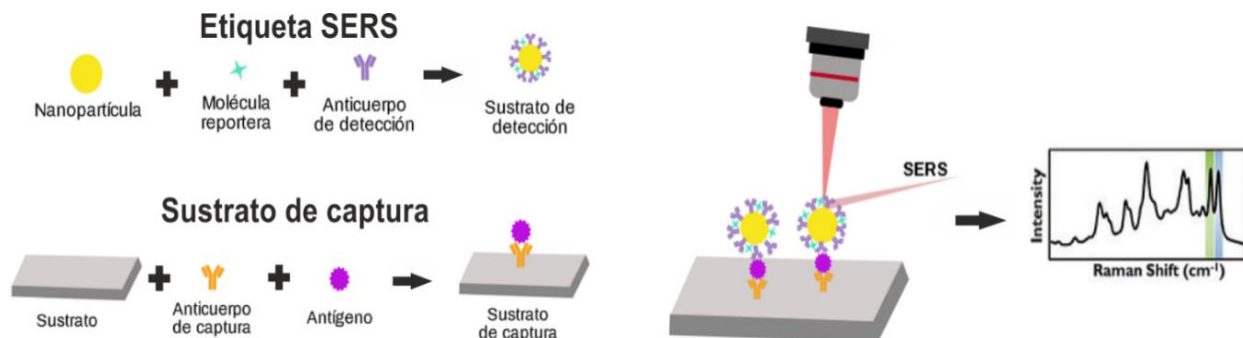


Figura 9. Representación del inmunoensayo SERS bajo la estrategia tipo sándwich. Elaboración propia.

5.5.3 Determinación de TnIc por SERS

La determinación de TnIc ha sido llevada a cabo comúnmente, empleando inmunoensayos convencionales, inmunoensayos de alta sensibilidad y pruebas de diagnóstico en el punto de atención (POCT) [24, 97].

No obstante, entre los nuevos métodos alternativos para la detección/cuantificación de TnIc se encuentran los inmunoensayos SERS bajo distintas estrategias. Los estudios realizados desde 2014 hasta la fecha se resumen en la tabla 4. Como sustratos de captura se han utilizado típicamente anticuerpos específicos (anti-TnIc) inmovilizados. Las estrategias de inmovilización de anti-TnIc sobre superficies incluyen: perlas magnéticas, sustratos de silicio acoplados con un imán de neodimio, o bien, membranas de nitrocelulosa empleadas en los inmunoensayos de flujo lateral.

Tabla 4. Inmunoensayos basados en SERS para la cuantificación de TnIc.

Límite de Detección (ng mL ⁻¹)	Rango Dinámico Lineal (ng mL ⁻¹)	Estrategia de Inmuno ensayo	Tipo de Muestra	Láser (nm)	Etiqueta SERS	Sustrato de Captura	Molécula Reportera	Banda de Seguimiento (cm ⁻¹)	Interferentes	Ref.
3.37x10 ⁻²	1x10 ⁻³ -1x10 ⁻²	Competitivo -Sándwich	Sintética	-	HGN-MGITC-AM	AM-Perlas magnéticas	MGITC	1619	CK-MB	[95]
4.4x10 ⁻⁴	1x10 ⁻² -50	LFIA	Real compleja	785	Ag-NBA@AuNps-AM	AM-LFIA tira de membrana de nitrocelulosa	NBA	592	CK-MB, Myo	[96]
8.9x10 ⁻⁴	1x10 ⁻² -50	LFIA de una sola línea de prueba	Real compleja	785	AuNps-Ag-NBA-AM	AM-LFIA tira de membrana de nitrocelulosa	NBA	592	CK-MB, Myo	[35]
9x10 ⁻²	9x10 ⁻² -50	LFIA de una sola línea de prueba	Sintética compleja	785	Au@Ag-AuNps-NBA-AM	AM-LFIA tira de membrana de nitrocelulosa	NBA	592	-	[97]
5x10 ⁻³	1x10 ⁻² -1000	Sándwich	Sintética	633	AuNps-OG-MGITC-AM	AM-Perlas magnéticas	MGITC	1613	-	[33]
1x10 ⁻¹	1x10 ⁻¹ -100	LFIA	Sintética	785	AuNRs-Au-NBT-AM	AM-LFIA tira de membrana de nitrocelulosa	NBT	1334	-	[98]
8.9x10 ⁻³	0-100	Sándwich	Real	632.8	AuNps-MGITC@Ag-MGITC-AM	AP-chip templete	MGITC	1615	CK-MB	[34]
4.4x10 ⁻³	0-1	Sándwich	Real	-	Au-4MP@Ag Nps-AM	AM-SA-Biotina-perlas magnéticas	4-MP	1073.5	H-FABP	[99]
10	-	Aptámero	Real	633	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @Ag-4ABT-DNAaptámero	Sustrato de Si-Magneto de Nd	4-ABT	514	-	[100]
9.8x10 ⁻³	-	Sándwich	Sintética	-	Au-4MBA@Ag-AM	AM-SA-perlas magnéticas	4-MBA	-	-	[101]

HGN: Nanoesferas de oro huecas, MGITC: Isocianato verde de malaquita, AM: Anticuerpo monoclonal, CK-BM: Creatinaquinasa isoenzima-MB, LFIA: Inmunoensayo de flujo lateral, NBA: Azul Nilo A, Myo: Mioglobina, OG: Óxido de grafeno, NBT: 1,4-nitrobencentiol, AP: Anticuerpo policlonal, SA: Esterptavidina, 4-MP: 4-mercaptobenzonitrile, H-FABP: Proteína de unión a ácidos grasos de tipo corazón, 4-ABT: 4-aminobencentiol, 4MBA: 4-mercaptobenzoico.

Respecto a las etiquetas SERS, las propuestas se centran en el diseño de las nanopartículas metálicas sobre las cuales se inmovilizan las moléculas reporteras y los anticuerpos específicos. La estrategia de identificación se basa en la obtención de un desplazamiento Raman proveniente de las interacciones entre el sustrato de captura/TnIc/etiquetas SERS [94-96].

Sin embargo, una limitante que presentan la mayoría de estas metodologías es la deficiente reproducibilidad experimental, relacionada con la limitada estabilidad de los anticuerpos inmovilizados, y la inmovilización no preferencial de los anticuerpos sobre las superficies [102-104]. Para subsanar lo anterior se propuso en este proyecto de tesis diseñar un sustrato de captura con anclaje preferencial utilizando una placa de aluminio con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs, por sus siglas en inglés) y dendrímeros del tipo poli(amido)amino (PAMAM) anclados a su superficie, lo que permitirá una inmovilización más eficiente para los anticuerpos monoclonales anti-TnIc. Lo que se traducirá directamente en una menor cantidad de muestra empleada para la detección de la TnIc.

Se han realizado estudios en donde se ha complementado el uso de los sustratos de captura con los elementos carbonáceos como grafeno o nanotubos de carbono para el anclaje de dendrímeros PAMAM que aporta una mayor superficie de inmovilización de anticuerpos, evitando el uso de proteínas séricas (albúmina, caseína o globulinas), comúnmente utilizadas para bloquear sitios de unión no específicos de los anticuerpos empleados en inmunoensayos [102]. Asimismo, debido a la estructura ramificada que presentan los dendrímeros, confieren una gran ventaja al brindar dirección específica y mayor espacio intersticial en el sustrato de captura. Adicionalmente, el uso de dendrímeros es una estrategia que aborda impedimento estérico provocado por la influencia del volumen de los grupos funcionales terminales y la posición de los anticuerpos inmovilizados en el sustrato [102, 103]. Lo anterior resulta en el aumento del área superficial disponible y en la cantidad de anticuerpos inmovilizados, lo que se ve directamente reflejado en una menor cantidad de muestra empleada, en la disminución del porcentaje de anticuerpos no inmovilizados y en la alta selectividad frente a interferentes (bilirrubina, hemoglobina, creatinaquinasa, mioglobina, etc.) [102-104]. De acuerdo con los distintos rangos dinámicos lineales consultados en literatura para el diagnóstico, pronóstico y predicción de IAM, no todos los autores reportan estos rangos. Es por esto y por lo mencionado anteriormente, que ha tomado relevancia el diseño de nuevos sustratos de captura que ofrezcan rangos dinámicos lineales

suficientemente precisos para considerar valores para diagnóstico por encima del percentil 99 ($> 0.02 \text{ ng mL}^{-1}$), para pronóstico debajo del percentil 99 (pacientes con evento de IAM previo), para predicción (pacientes sin evento de IAM previo) y valores normales para pacientes sanos ($\leq 0.005 \text{ ng mL}^{-1}$) [16,17].

Por otra parte, es importante señalar que los valores de los rangos dinámicos lineales mostrados en la tabla 4 no cubren eficientemente los intervalos establecidos por las guías clínicas internacionales para el diagnóstico de diversas enfermedades cardiovasculares [16, 94-97]. Debido a que estas metodologías solo abarcan una porción de valores o sus intervalos no se basan o sobrepasan los valores establecidos por las guías como se muestra en la figura 10 [95-101].

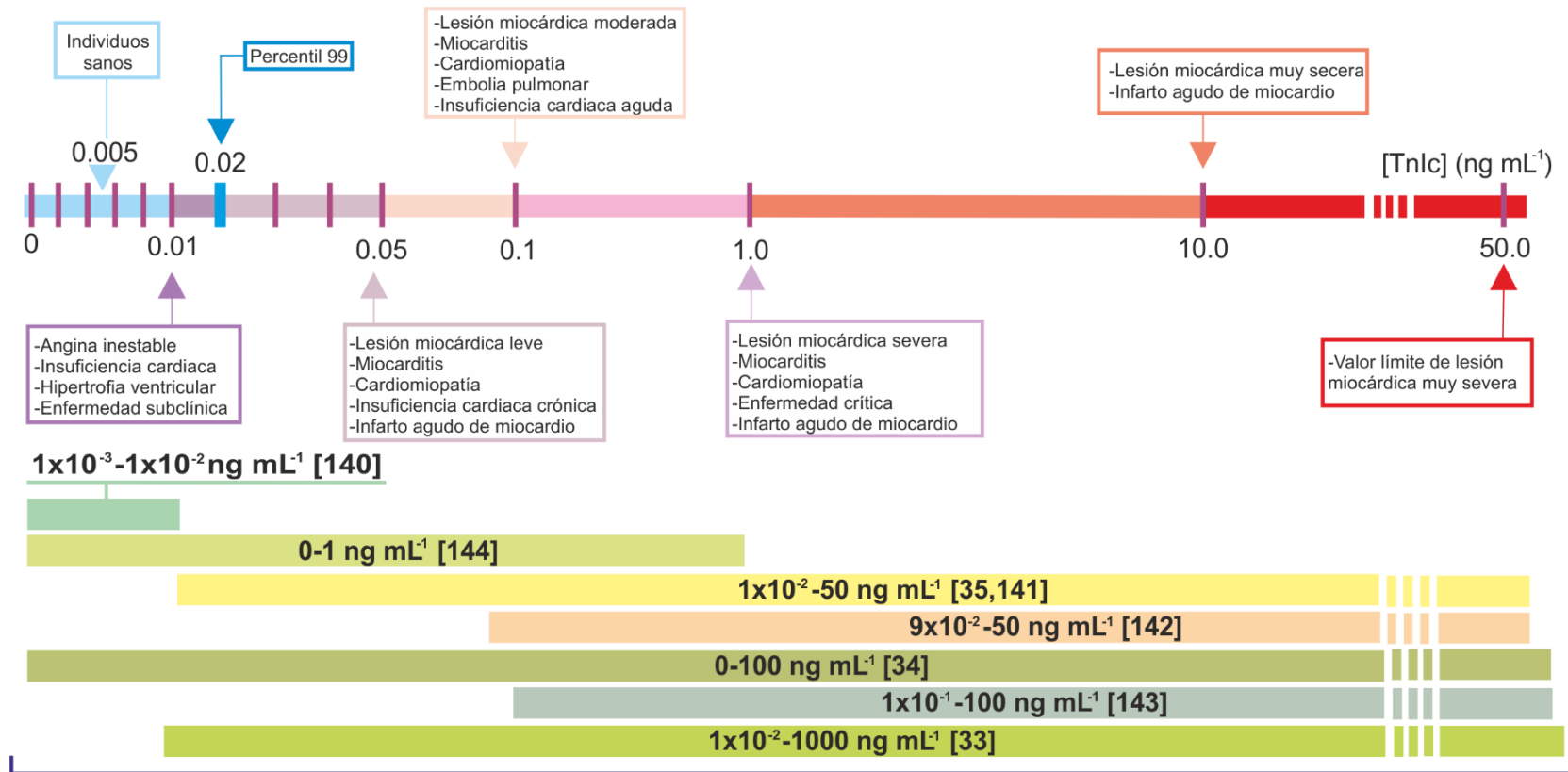


Figura 10. Rangos dinámicos lineales reportados respecto a la concentración de TnIc [16,17].

5.6 Nanotubos de carbono

Los biosensores e inmunosensores modificados con nanotubos de carbono han logrado una detección con alta sensibilidad y reproducibilidad [99, 101]; se han descrito como matrices novedosas y biocompatibles con biomoléculas como: polipéptidos, aptámeros, anticuerpos, etc. [105]. Por lo tanto, debido a que emplean interacciones de anticuerpos específicos para reconocer antígenos como la TnIc, necesitan superficies que permitan una inmovilización compatible. Los nanotubos de carbono (CNTs, por sus siglas en inglés), se han convertido en el foco de atención para su uso en electrodos y sensores debido a las propiedades físicas y químicas como la conductancia eléctrica, la alta rigidez mecánica y las posibilidades de funcionalizarlos para modificar sus propiedades [100-102]. La estructura de los CNTs se puede describir como una capa tubular enrollada de una hoja de grafito con los átomos de carbono unidos covalentemente a sus vecinos. Además, de aumentar el área electroactiva al formar una superficie nanoestructurada que promueve una mayor cantidad de biomoléculas inmovilizadas, disminuye el tiempo de respuesta en el electrodo o superficie empleada [105]. Existen diferentes tipos de CNTs en función de las capas de grafito que los forman, éstos pueden ser nanotubos de carbono de pared sencilla (SWCNT, por sus siglas en inglés), figura 11A y nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT, por sus siglas en inglés) que pueden considerarse como capas de láminas de grafito enrolladas concéntricamente donde cada átomo de carbono está unido con otros como se muestra en la figura 11B. Los CNTs debido a las propiedades eléctricas que presentan y a su tamaño nanométrico se consideran los biosensores ideales. Se ha reportado la inserción química de moléculas de ADN y proteínas con un reconocimiento específico de éstas. La detección de proteínas se puede llevar a cabo con un sistema semiconductor de CNTs con anticuerpos y antígenos específicos, es importante considerar que los CNTs poseen una afinidad natural por ciertas proteínas a través de interacciones hidrofóbicas o electrostáticas. [99-101].

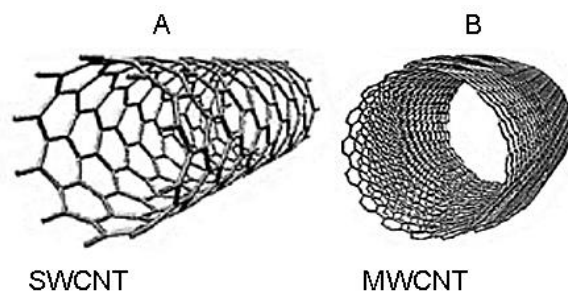


Figura 11. Representación de **A**) nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) y **B**) nanotubos de carbono multicapa (MWCNT). Tomado de: [89].

5.7 Dendrimeros

Una herramienta utilizada como complemento y/o estrategia para la detección y cuantificación exitosa son los dendrimeros de tipo poli(amido)amina (PAMAM). Los dendrimeros PAMAM son nanomateriales que poseen la gran ventaja de ser solubles en agua y en una gran variedad de disolventes orgánicos, además, son significativamente útiles en el ensamblaje de anticuerpos en biosensores ópticos y electroquímicos [102]. Se trata de macromoléculas sintéticas de disposición globular y arbórea regularmente ramificada como se observa en la figura 12. Contienen una gran cantidad de sitios de anclaje disponibles para la conjugación de anticuerpos que contribuyen significativamente a la sensibilidad del biosensor o inmunosensor [102, 103]. Uno de los métodos utilizados para la detección de anticuerpos es la voltamperometría cíclica (VC). Los grupos amino se acoplan con otros grupos funcionales. El dendrímero PAMAM puede anclarse a sustratos mediante acoplamiento de carbodiimida (vía química), modificación electroquímica, entre otros, para proporcionar un área de superficie alta para la inmovilización de anticuerpos. Por lo tanto, estas características pueden combinarse y explorarse más para desarrollar nuevos dispositivos para el diagnóstico de enfermedades [104].

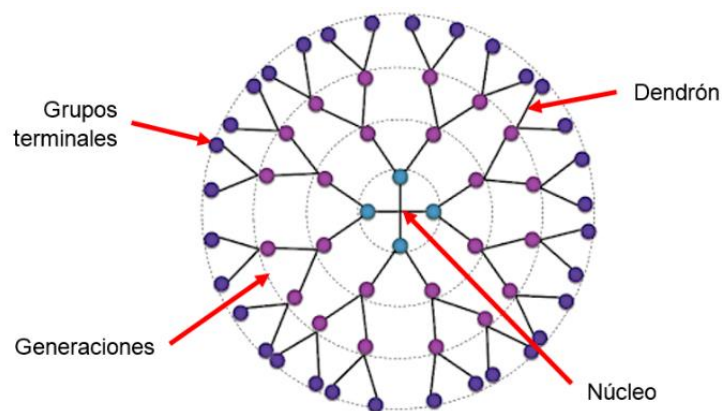


Figura 12. Representación de un dendrónimo y sus elementos. Tomado de: [98].

5.8 Modificación electroquímica

El objetivo principal de la modificación electroquímica de electrodos es conferir características químicas, electroquímicas, analíticas, etc., específicas a la especie a inmovilizar. Una de las características más importantes de la modificación electroquímica es que utiliza la energía eléctrica como fuerza motriz para generar las reacciones necesarias [107, 108]. Así es como las cualidades necesarias son exhibidas, según la aplicación para la que se desee emplear. Cabe señalar, que la modificación electroquímica proporciona un medio que facilita las reacciones químicas a realizar, incluso aquellas reacciones difíciles de lograr en ausencia de una especie modificadora [105, 106]. Algunas de las aplicaciones de las que se puede emplear la modificación electroquímica son:

1. Anclaje superficial de una especie química.
2. Incorporación de moléculas biológicas.
3. Detección electroquímica de especies no electroactivas.
4. Electrocatalisis

5.8.1 Modificación electroquímica por la vía oxidativa

Son aquellas reacciones anódicas (indirectas y/o directas) en las que una especie química es transferida desde el disolvente (agua) a los productos que deben oxidarse. Entre las especies químicas que pueden emplearse para la modificación por esta vía se encuentran [108, 109]:

- Alcoholes
- Aminas
- Fenoles, entre otras.

5.8.2 Modificación electroquímica por la vía reductiva

Se llama reductor a la especie que cede los electrones y oxidante a la que los capta [109]. La modificación de especies químicas por esta vía incluye [109-111]:

- Compuestos vinílicos
- Sales de diazonio
- Haluros de alquilo
- Sales de iodonio, sulfonio, entre otras

5.8.3 Modificación electroquímica con dendrímeros

Los dendrímeros han sido usados en aplicaciones biológicas para el anclaje preferencial de proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e incluso anticuerpos, con el fin de garantizar enlaces selectivos, comúnmente enlaces peptídicos. Estudios han mostrado que los grupos funcionales de las macromoléculas dendríticas del tipo poli(amido)amina (PAMAM) en un medio con pH básico se encuentran con una mayor densidad de carga positiva, lo que permite paso de aniones con facilidad, debido a los efectos de atracción entre cargas [102, 110].

Según los grupos funcionales superficiales en los dendrímeros, éstos pueden ser anclados en determinadas superficies. Vusa et al. [103], modificaron electrodos de carbón vítreo mediante oxidación anódica de las aminas periféricas de dendrímeros PAMAM con la formación de un enlace covalente carbono-nitrógeno (C-N) entre el carbón vítreo y el dendrímero, con el fin de lograr inmovilizar la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés). Kim et al. [104], estudiaron las interacciones entre dendrímeros PAMAM y electrodos de carbón vítreo también mediante oxidación electroquímica. El enfoque de inmovilización lo aplicaron para ensamblar nanopartículas de Au encapsuladas con dendrímeros en los electrodos. Como resultado, las películas obtenidas mostraron actividad electrocatalítica para la oxidación de hidrazina.

Las superficies metálicas decoradas con carbono, así como superficies de variantes de carbono han sido los sustratos que más se han empleado para la adsorción de estos polímeros hiperramificados mediante diferentes métodos. Sin embargo, el uso de superficies de fácil acceso y costos accesibles ha tomado importancia, tal es el caso del uso de aluminio que se aborda en este trabajo, como una alternativa que aún no ha sido reportada como sustrato para ser modificado electroquímicamente.

6. Metodología

La metodología de esta tesis de maestría se resume en el diagrama de la figura 13.

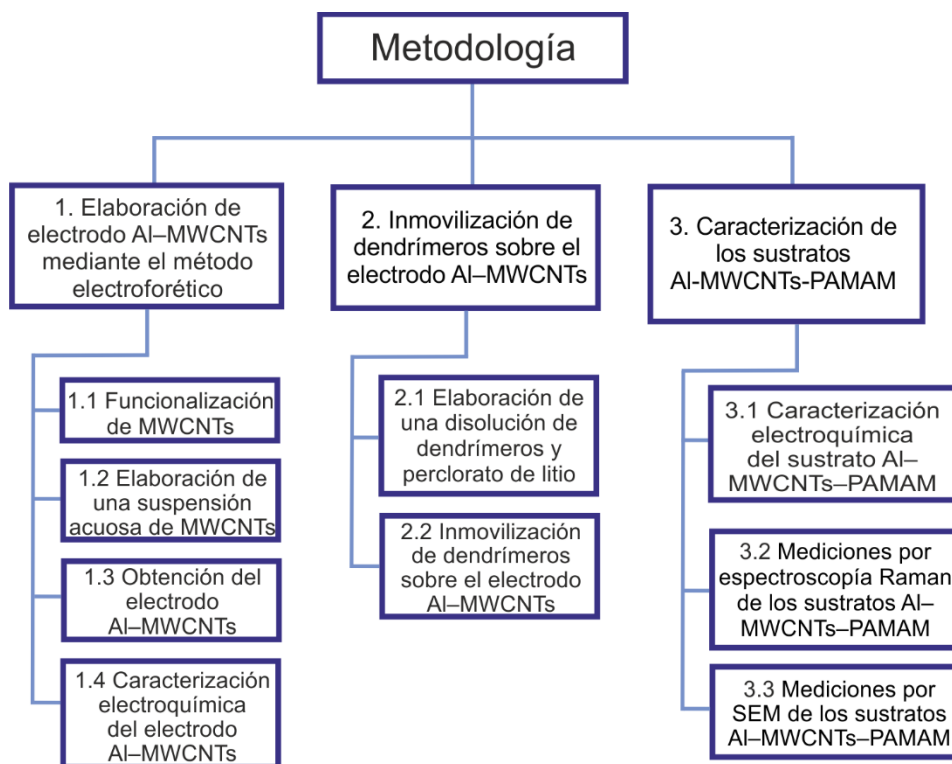


Figura 13. Diagrama general de la metodología a seguir en esta tesis.

Los reactivos empleados se indican en el anexo 1.

6.1 Elaboración de electrodo Al-MWCNTs mediante el método electroforético

6.1.1 Funcionalización de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs)

Para llevar a cabo la elaboración de los sustratos de aluminio modificados con nanotubos de carbono de pared múltiple (sustratos Al-MWCNTs) fue necesario un

pretratamiento debido a las propiedades que poseen los MWCNTs relacionadas con su estructura química. El pretratamiento, consistió en la modificación superficial de MWCNTs mediante la adsorción de grupos funcionales (-OH), dando como resultado una oxidación en la superficie de los MWCNTs, lo que le confiere una carga negativa. Para tal efecto, se empleó una disolución ácida de 15 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 98%, 5 mL de ácido nítrico (HNO₃) al 99% M y 0.02 g de MWCNTs. Se preparó la disolución mezclando los tres reactivos de forma directa en un vaso de precipitados. Posteriormente, se agitó la mezcla en una parrilla de agitación magnética hasta que se formó una mezcla homogénea, finalmente, se dejó reposar por 48 horas, para realizar la filtración al vacío.

Los MWCNTs se mantuvieron en disolución a pH neutro, para garantizar la correcta aplicación de los MWCNTs, por lo que fue necesario realizar varios lavados con agua desionizada empleando filtración al vacío. En seguida, se diluyó la mezcla de MWCNTs funcionalizados en 600 mL de agua destilada y se filtró cinco veces hasta que se alcanzó un pH de 7. Por último, se desmontó el equipo, se quitó cuidadosamente la membrana de nitrocelulosa con los MWCNTs y se secó a temperatura ambiente durante 24 horas. Los MWCNTs fueron almacenados en un recipiente ámbar.

6.1.2 Elaboración de una suspensión acuosa de MWCNTs funcionalizados

Para lograr el depósito de MWCNTs en las plantillas de aluminio y emplear exitosamente el método electroforético, fue necesario elaborar una suspensión acuosa para la dispersión homogénea y eficiente de los MWCNTs funcionalizados. La dispersión en la disolución se logró con el empleo del surfactante bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) [94]. De esta manera, se prepararon 25 mL de una disolución con 0.0026 g de MWCNTs funcionalizados y 0.015 g de CTAB a 1.6×10^{-3} M disueltos en agua desionizada. Los reactivos se agregaron en un frasco Schott y luego se sonicó la disolución empleando el equipo ultrasonic 200 marca Branson, a una frecuencia de 40 KHz durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. Finalmente, la mezcla se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta por 24 horas para su posterior uso.

6.1.3 Obtención de electrodo Al-MWCNTs mediante deposición electroforética

Antes de obtener los electrodos Al-MWCNTs mediante el método electroforético, las plantillas de aluminio (espesor de 1.0 mm, ancho de 0.5 cm y 4.0 cm de largo) fueron lijadas, pulidas y lavadas con acetona. De esta manera, se emplearon dos plantillas de aluminio (una plantilla como ánodo y la otra como cátodo) en una celda electroforética, donde la suspensión acuosa de MWCNTs/CTAB fue utilizada como el medio líquido de migración para el depósito del material carbonáceo. Primero, se colocaron en la celda electroforética ambas plantillas, cuidando que no tuvieran contacto entre sí, con una separación de 3 cm en 10 mL de suspensión. Después, se colocó en una parrilla de agitación la celda electroquímica y se conectaron las terminales de la fuente en ambas plantillas de aluminio, actuando una como ánodo y otra como cátodo. Enseguida se impuso 18 mA con la fuente de poder modelo power-pac 3000 marca Biorad, durante 15 minutos.

6.1.4 Caracterización electroquímica del electrodo Al-MWCNTs

La caracterización del electrodo Al-MWCNTs se llevó a cabo mediante voltamperometría cíclica en buffer de fosfatos a pH neutro. Para lograr la caracterización, primero, se prepararon 500 mL de una disolución buffer fosfatos con fosfato monopotásico (KH_2PO_4) a 0.22 M y fosfato dipotásico (K_2HPO_4) a 0.28 M, a un pH neutro. Enseguida, en una celda electroquímica diseñada y fabricada especialmente para el propósito de este trabajo (ver anexo 2), se colocaron los electrodos en la siguiente configuración: como electrodo de referencia un electrodo de calomel ($\text{Hg}/\text{HgCl}/\text{KCl}$ saturado), como contraelectrodo un alambre de platino y como electrodo de trabajo el electrodo Al-MWCNTs. Después se agregaron a la celda 10 mL de disolución de buffer fosfatos. Para las mediciones se empleó un potenciostato marca METROHM 302N con el software Nova 2.1. Cabe mencionar que la celda fue diseñada para delimitar un área circular de 1 mm de diámetro de exposición del electrodo a la disolución. Todos los experimentos se realizaron bajo una atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente.

6.2 Modificación electroquímica del electrodo Al-MWCNTs con dendrímeros PAMAM-NH₂

La modificación de los sustratos Al-MWCNTs con dendrímeros se llevó a cabo en una disolución con dendrímeros PAMAM 10 μ M y perclorato de litio (LiClO₄) 0.1 M, mediante voltamperometría cíclica en una ventana de potencial de -0.1 a 0.9 V, realizando 10 ciclos a una velocidad de barrido de 20 mV s⁻¹ para dar el tiempo suficiente a la aminación electroquímica.

6.3 Caracterización del sustrato Al-MWCNTs-PAMAM

6.3.1 Caracterización electroquímica del electrodo Al-MWCNTs-PAMAM

La caracterización del sustrato Al-MWCNTs-PAMAM se realizó mediante voltamperometría cíclica en 10 mL ferrocianuro de potasio K₄Fe(CN)₆ a 0.5 mM y buffer fosfatos con la misma configuración de electrodos empelada en la caracterización del electrodo Al-MWCNTs. Se empleó un potenciostato marca METROHM 302N con el software Nova 2.1 para las mediciones. Todos los experimentos se realizaron en la celda electroquímica, bajo una atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente.

6.3.2 Caracterización por espectroscopia Raman de los sustratos Al-MWCNTs-PAMAM

Para corroborar la presencia de los dendrímeros una vez realizado el procedimiento de modificación se realizó la caracterización de los sustratos mediante espectroscopia Raman. Para ello, se hicieron mediciones Raman por separado para la plantilla de Al, los electrodos Al-MWCNTs y los sustratos Al-MWCNTs-PAMAM con el equipo Xplora

(BX41TF, HORIBA), empleando el láser de excitación de 785 nm y un tiempo de adquisición de 10 s.

6.3.3 Caracterización por SEM de los sustratos Al-MWCNTs-PAMAM

Como caracterización complementaria con el fin de conocer la morfología y comprobar el anclaje de los dendrímeros PAMAM en los electrodos Al-MWCNTs se empleó microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), con el equipo marca Tescan Vega, modelo TS5136SB con un voltaje de aceleración de haz de 25 kV.

7. Resultados y discusión

7.1 Obtención de los electrodos Al-MWCNTs

Como resultado de la elaboración de la metodología propuesta, la plantilla de aluminio (Al) fue empleada como ánodo para realizar el depósito electroforético de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs). La obtención de los electrodos Al-MWCNTs mostró a simple vista un depósito uniforme y químicamente estable, de color negro, como se muestra en la figura 14.



Figura 14. Electrodo Al-MWCNTs.

7.1.1 Caracterización electroquímica de los sustratos Al-MWCNTs

Antes de realizar el depósito de MWCNTs sobre las plantillas de Al, una vez lijada, pulida y lavada, se llevó a cabo la caracterización electroquímica por voltamperometría cíclica empleando como electrolito soporte buffer de fosfatos a pH 7. La respuesta electroquímica se obtuvo a diferentes valores de velocidad de barrido: 10, 20, 40, 60, 80, 100 mV s^{-1} con una ventana de potencial de -0.1 a 0.9 V vs SCE (figura 15). El comportamiento electroquímico que presentó el Al es consistente con el trabajo reportado por Razmi y Azadbakht [112]. Por otra parte, la realización de voltamperometrías cíclicas a diferentes valores de velocidad de barrido permitió observar que a partir de velocidades de barrido mayores a 40 mV s^{-1} , presenta un aumento significativo en la corriente, que puede ser atribuido a un cambio en la

superficie del aluminio debido a la formación de óxidos. Lo cual, aportó información acerca del comportamiento del Al.

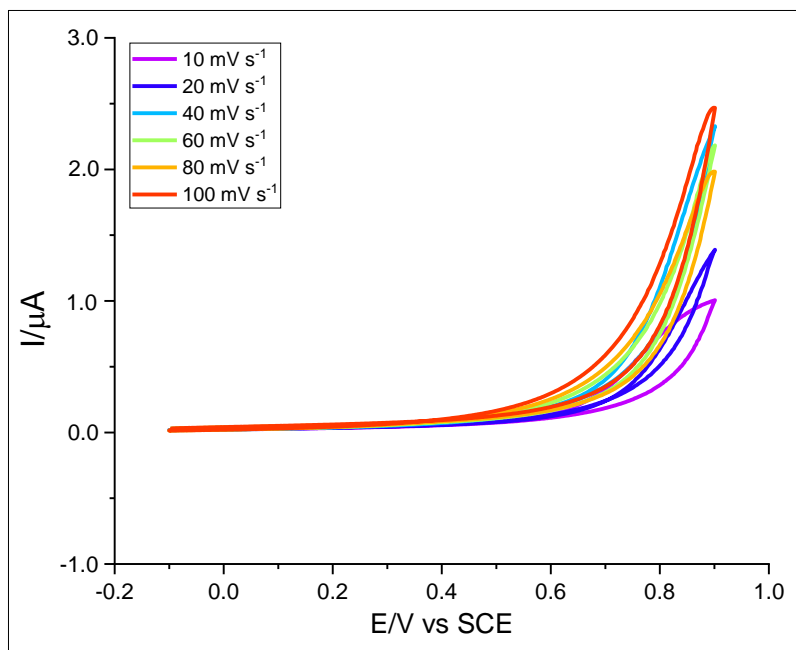


Figura 15. Voltamperograma cíclico de la placa de aluminio a diferentes velocidades de barrido, con una ventana de potencial de -0.1 a 0.9 V vs SCE y como electrolito soporte buffer de fosfatos.

Por otra parte, una vez obtenido el electrodo Al-MWCNTs, se realizó su caracterización electroquímica utilizando voltamperometría cíclica con las mismas condiciones usadas para la plantilla de Al.

En la figura 16 se muestra la comparación de los voltamperogramas cíclicos obtenidos para la plantilla de aluminio y para el electrodo Al-MWCNTs a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} , en donde se observa un comportamiento capacitivo significativamente mayor de la superficie modificada con respecto a la plantilla de Al. Este comportamiento se relaciona con los MWCNTs anclados a la superficie de la plantilla de aluminio, dado que le proporcionan una mayor área superficial al electrodo.

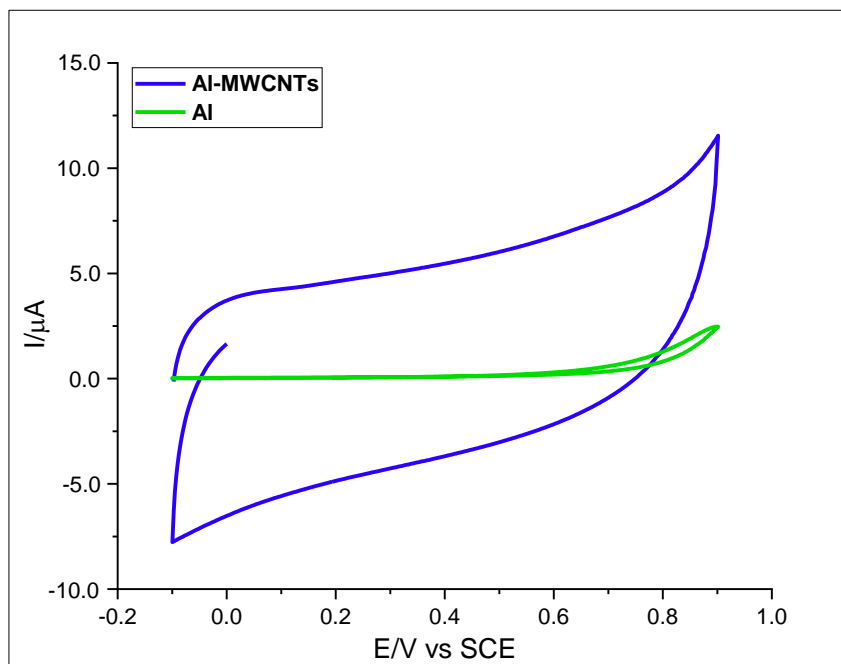


Figura 16. Voltamperograma cíclico del electrodo Al-MWCNTs y la placa de aluminio a una velocidad de barrido 100 mV s^{-1} , con una ventana de potencial de -0.1 a 0.9 V vs SCE y como electrolito soporte buffer de fosfatos.

7.2 Modificación electroquímica de los electrodos Al-MWCNTs con dendrímeros PAMAM

7.2.1 Modificación del electrodo Al-MWCNTs con dendrímeros PAMAM

La modificación electroquímica del electrodo Al-MWCNTs mediante la oxidación de dendrímeros PAMAM se pudo identificar a través de la presencia de la señal anódica en el primer ciclo alrededor de 0.7 V, se llevaron a cabo 9 ciclos adicionales a la misma velocidad de barrido hasta que la variación de corriente fue mínima (figura 17). Según lo reportado por Vusa et al. [103], este pico corresponde a la oxidación anódica de los grupos funcionales amino del dendrímero ($-\text{NH}_2$) para generar radicales catiónicos que a su vez reaccionan con los MWCNTs mediante la formación de enlaces C-N [103].

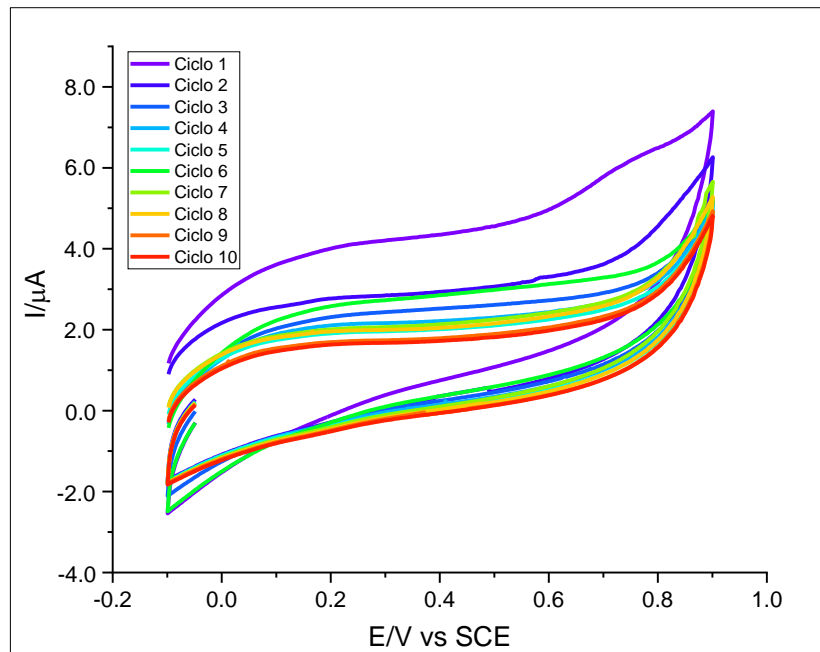


Figura 17. Voltamperogramas cíclicos realizados para la modificación electroquímica del electrodo Al-MWCNTs con dendrímeros PAMAM-NH₂ G-4.0 a una velocidad de barrido 20 mV s⁻¹, con una ventana de potencial de -0.1 a 0.9 V vs SCE y como electrolito soporte perclorato de litio.

7.3 Caracterización del sustrato Al-MWCNTs-PAMAM

7.3.1 Caracterización electroquímica del electrodo Al-MWCNTs-PAMAM con sonda redox

Como parte de la caracterización electroquímica, se realizaron experimentos de voltamperometría cíclica, el ion $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ como sonda redox con $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a 1 mM y buffer fosfatos como electrolito soporte. Esto con el fin de investigar el efecto de la modificación del electrodo Al-MWCNTs con dendrímeros sobre el comportamiento electroquímico de dicha sonda. Las respuestas se presentan en la figura 18 donde se observan unas pequeñas señales redox entre 0.0 y 0.2 V para ambos electrodos. Si se comparan estos gráficos con los obtenidos en ausencia de la sonda redox (ver figura 16, curva azul), dichas

señales no se observan, por lo que se puede concluir que corresponden a la respuesta electroquímica de la sonda redox. Es posible que no se observen picos bien definidos como se esperaría, debido a la alta capacitancia del electrodo. Así mismo, se observa una disminución en la corriente para el sustrato Al-MWCNTs-PAMAM (línea azul) en comparación con el electrodo Al-MWCNTs (línea verde). La disminución de la corriente entre el electrodo Al-MWCNTs y el sustrato Al-MWCNTs-PAMAM se debe a un impedimento estérico provocado por la presencia del dendrímero debido a la atracción de cargas con el ion $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

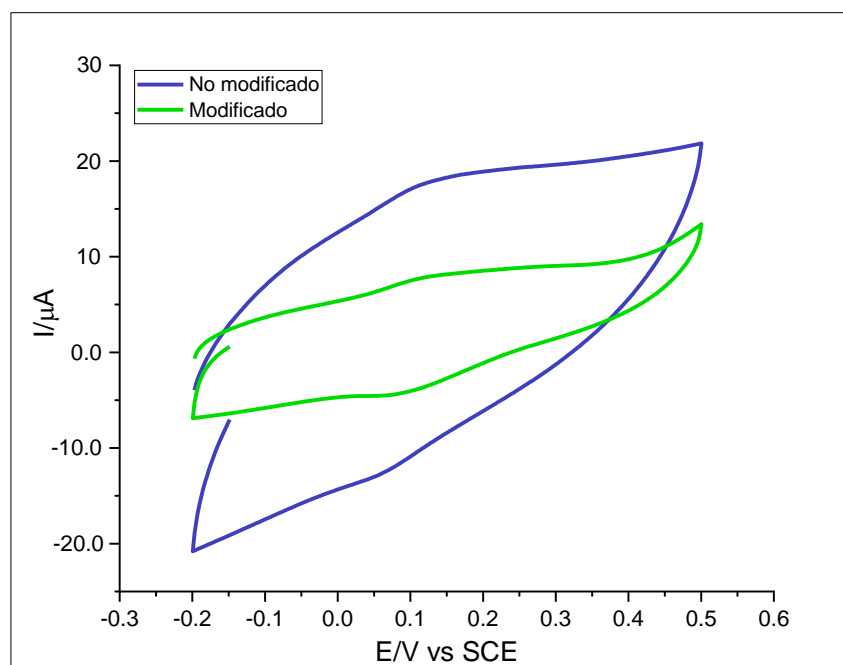


Figura 18. Voltamperogramas cíclicos del electrodo Al-MWCNTs en presencia de ferrocianuro de potasio antes y después de la modificación con dendrímeros PAMAM, a una velocidad de barrido 100 mV s^{-1} , con una ventana de potencial de -0.2 a 0.5 V vs SCE y como electrolito soporte buffer de fosfatos.

7.3.2 Caracterización por espectroscopia Raman de los sustratos Al-MWCNTs-PAMAM

Para identificar la presencia del dendrímero anclado al electrodo Al-MWCNTs se realizó la caracterización por espectroscopia Raman. En la figura 19 se presentan los espectros Raman obtenidos, donde se observa que las bandas 1302 cm^{-1} y 1568 cm^{-1} de la línea color gris que pertenece al electrodo Al-MWCNTs, aparecen en la región espectral de la banda D y la banda G, respectivamente, bandas características de materiales carbonáceos como los nanotubos de carbono. Las bandas a 1308 cm^{-1} y 1579 cm^{-1} de la línea en color rojo que pertenece al electrodo Al-MWCNTs-PAMAM (sustrato modificado), presentan un ligero corrimiento y un aumento en la intensidad de la señal, respecto a las bandas del sustrato sin modificar, lo que denota la presencia del dendrímero, según lo reportado por Pan et al. [113]. Además, también puede observarse que hay un cambio bien definido respecto a la placa de Al (blanco), la cual no presentó ninguna banda.

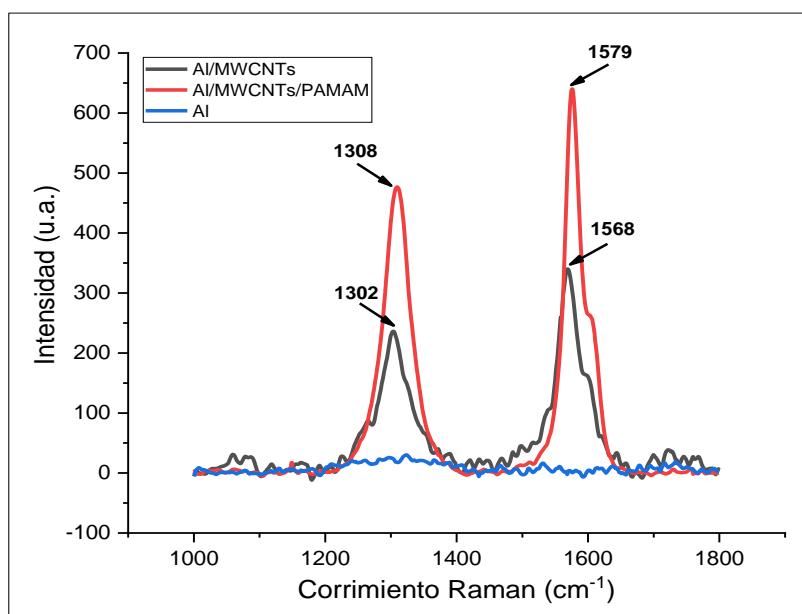


Figura 19. Espectro Raman de los sustratos analizados con láser 785 nm y un tiempo de adquisición de 10 s.

7.3.3 Caracterización por SEM de los sustratos Al-MWCNTs-PAMAM

Como técnica de caracterización complementaria, se realizaron mediciones mediante microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). La morfología superficial

del electrodo Al-MWCNTs y del sustrato Al-MWCNTs-PAMAM se analizó con las imágenes SEM obtenidas para comprobar la presencia de los dendrímeros PAMAM. En ausencia de dendrímeros, se observó la formación de redes de MWCNTs distribuidos cubriendo la zona evaluada (figura 20a). Sin embargo, el anclaje de los dendrímeros (figura 20b) cambió la morfología de la superficie del electrodo Al-MWCNTs. La superficie distintiva de los MWCNTs se ve recubierta con dendrímeros PAMAM lo que se identifica por agregados dendríticos en forma globular de algunas de las irregularidades superficiales (región rodeada en rojo figura 20b), aunque, la morfología del electrodo Al-MWCNTs permanecen en algunas regiones. Estos resultados son similares al estudio realizado por Zhang et al. [114], quienes demostraron mediante imágenes SEM, la presencia de los dendrímeros PAMAM G-4.0.

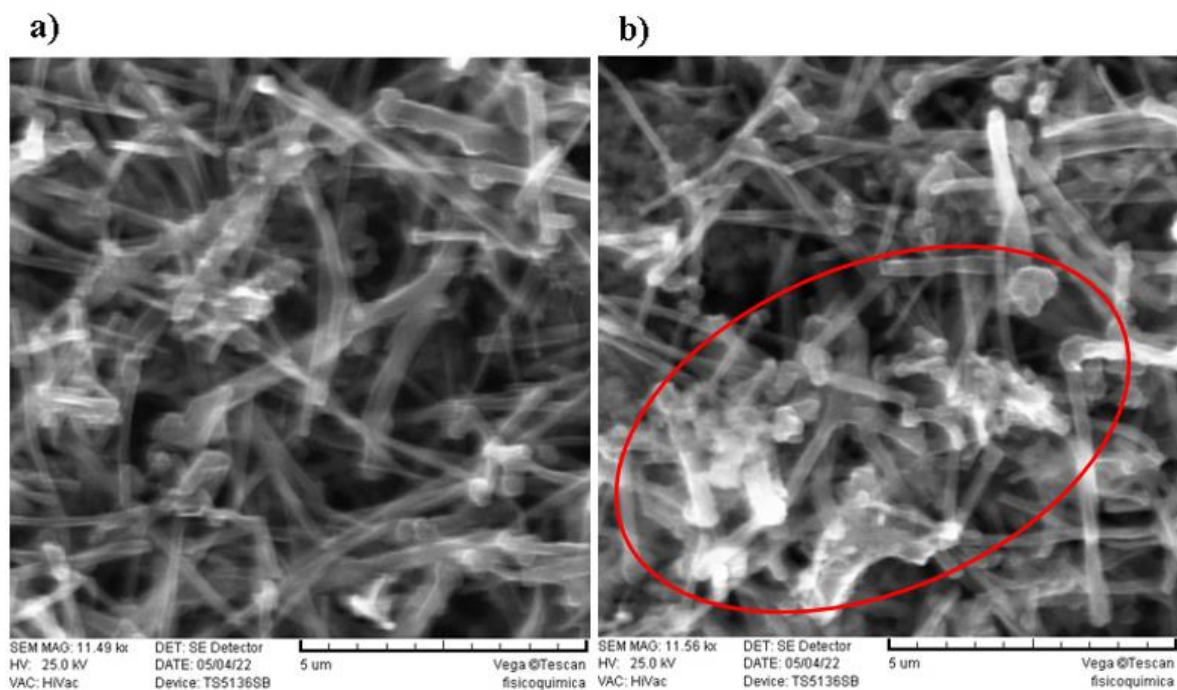


Figura 20. Imágenes SEM. a) electrodo Al-MWCNTs. b) sustrato Al-MWCNTs-PAMAM.

8. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir lo siguiente:

Es posible decorar superficies de aluminio con MWCNTs mediante depósito electroforético, lo cual hasta el momento no se encuentra reportado en la literatura. Al igual que con otros tipos de sustratos, la presencia de los MWCNTs sobre la superficie de aluminio le confiere una gran área superficial, disponible para el anclaje de otras especies de interés. Esto convierte al aluminio en un buen candidato para el desarrollo de sustratos de captura. Sin embargo, es necesaria una caracterización más detallada de los sustratos obtenidos.

La modificación electroquímica del electrodo Al-MWCNTs con dendrímeros PAMAM fue realizada exitosamente mediante la oxidación de los grupos amino periféricos de las macromoléculas. La caracterización electroquímica, por espectroscopia Raman y por SEM permitió identificar la presencia del dendrímero en dichos sustratos. Como una recomendación para trabajos posteriores, será de gran ayuda realizar una caracterización más detallada para demostrar la presencia del enlace covalente C-N entre los MWCNTs y los dendrímeros.

Desde una perspectiva a futuro, la modificación electroquímica de electrodos de aluminio con MWCNTs y dendrímeros PAMAM, podría ser empleada con éxito para anclar en ellos de forma controlada y ordenada especies de interés médico, como es el caso de anticuerpos para troponina I cardíaca que permita la detección de su antígeno, la troponina I cardíaca empleando espectroscopia Raman. Esto, con el fin de emplearlos como un sustrato de captura en el desarrollo de biosensores.

Referencias

- [1] Organización Mundial de la Salud. (2020). Las 10 principales causas de defunción. Sitio web: <http://www.who.int/es/newsroom/factsheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. (Diciembre, 2020).
- [2] Sánchez, A.; Bobadilla, S.; Dimas, A.; Gómez, O.; González, G. (2016). Enfermedad cardiovascular: primera causa de morbilidad en un hospital de tercer nivel. *Revista Mexicana de cardiología*, 27(S3), 98-102.
- [3] Gaceta UNAM. Enfermedades del corazón, primera causa de muerte. Sitio web: <https://www.gaceta.unam.mx/enfermedades-del-corazon-primera-causa-de-muerte/>. (Marzo 2021)
- [4] Hessami, A.; Shamshirian, A.; Heydari, K.; Pourali, F.; Alizadeh-Navaei, R.; Moosazadeh, M.; Rezaei, N. (2020). Cardiovascular diseases burden in COVID-19: Systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Emergency Medicine*.
- [5] Ferrari, R.; Di Pasquale, G.; Rapezzi, C. (2020). Commentary: What is the relationship between Covid-19 and cardiovascular disease?. *International Journal of Cardiology*, 310, 167.
- [6] Nishiga, M.; Wang, D. W.; Han, Y.; Lewis, D. B.; Wu, J. C. (2020). COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives. *Nature Reviews Cardiology*, 17(9), 543-558.
- [7] INEGI. (2021). Comunicado de prensa Núm. 24/21. Sitio web: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/ResultCenso2020_Nal.pdf. (Diciembre, 2020).
- [8] Cervantes, C. A. (2019). Tendencia e impacto de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares en México, 1990-2015. *Revista Cubana de Salud Pública*, 45(4), 1-18.
- [9] Bhatnagar, A. (2017). Environmental determinants of cardiovascular disease. *Circulation Research*, 121(2), 162-180.
- [10] Allam, H.; Thompson, C.; Wann, S.; Miyamoto, I.; Nur el-Din, H.; el-Maksoud, A.; Thomas, S. (2011). Atherosclerosis in ancient Egyptian mummies: the Horus study. *JACC: Cardiovascular Imaging*, 4(4), 315-327.
- [12] Bodor, G. S. (2016). Biochemical markers of myocardial damage. *EJIFCC*, 27(2), 95.
- [13] Zhan, S.; Lou, X.; Zhou, P.; Xia, F. (2018). Sandwich assays based on SPR, SERS, GMR, QCM, microcantilever, SAW, and RRS techniques for protein detection. *Biosensors Based on Sandwich Assays*, pp. 69-91.
- [15] De la Villa, B. G.; Díaz-Buschmann, I.; Jurado, J. A.; García, R.; Parra, F. J.; Medina, J.; Escribano, J. M. (1998). Valor de la troponina I cardíaca como prueba diagnóstica en el estudio del dolor torácico. *Revista Española de Cardiología*, 51(2), 122-128.
- [16] Januzzi, J. L.; Mahler, S. A.; Christenson, R. H.; Rymer, J.; Newby, L. K.; Body, R.; Jaffe, A. S.; et al. (2019). Recommendations for institutions transitioning to high-sensitivity troponin testing: JACC Scientific Expert Panel. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(9), 1059-1077.

- [17] McCarthy, C. P.; Raber, I.; Chapman, A. R.; Sandoval, Y.; Apple, F. S.; Mills, N. L.; Januzzi, J. L. (2019). Myocardial injury in the era of high-sensitivity cardiac troponin assays: a practical approach for clinicians. *Journal of the American Medical Association Cardiology*, 4(10), 1034-1042.
- [19] Mirzaii-Dizgah, I.; Riahi, E. (2013). Salivary troponin I as an indicator of myocardial infarction. *The Indian Journal of Medical Research*, 138(6), 861.
- [20] Tripoliti, E.; Ioannidou, P.; Toumpaniaris, P.; Rammos, A.; Pacitto, D.; Lourme, J.-C.; Fotiadis, D. et al. (2019). Point-of-care testing devices for heart failure analyzing blood and saliva samples. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 1-1.
- [23] Keller T, Zeller T, Ojeda F, et al. (2011). Serial changes in highly sensitive troponin I -assay and early diagnosis of myocardial infarction. *Journal of the American Medical Association*, 306(24), 2684-2693.
- [24] Mahajan, V.S.; Jarolim, P. (2011). How to interpret elevated cardiac troponin levels. *Circulation*, 124, 2350-2354.
- [25] Tang, L.; Casas, J.; Venkataramasubramani, M. (2013). Magnetic nanoparticle mediated enhancement of localized surface plasmon resonance for ultrasensitive bioanalytical assay in human blood plasma. *Analytical Chemistry*, 85(3), 1431-1439.
- [26] Mahato, K.; Kumar, S.; Srivastava, A.; Maurya, P. K.; Singh, R.; Chandra, P. (2018). Electrochemical immunosensors: fundamentals and applications in clinical diagnostics. *Handbook of immunoassay technologies*. Pp. 359-414.
- [27] Chikkaveeraiah, B. V.; Bhirde, A. A.; Morgan, N. Y.; Eden, H. S.; Chen, X. (2012). Electrochemical immunosensors for detection of cancer protein biomarkers. *ACS nano*, 6(8), 6546-6561.
- [29] Liu, R.; Ye, X.; Cui, T. (2020). Recent progress of biomarker detection sensors. *Research*, 2020, 794903.
- [30] Khlebtsov, B.; Panfilova, E.; Khanadeev, V.; Khlebtsov, N. (2014). Improved sisetunable synthesis and SERS properties of Au nanostars. *Journal Nanoparticle Research*, 16, 2623.
- [31] Wang, S. S.; Liu, Z. H.; Bartic, C.; Xu, H.; Ye J. (2016). Improving SERS uniformity by isolating hot spots in gold rod-in-shell nanoparticles. *Journal Nanoparticle Research*, 2016, 18, 246.
- [32] Xia, Y.; Si, J.; Li, Z. (2016). Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 774-789.
- [33] Fu, X.; Wang, Y.; Liu, Y.; Liu, H.; Fu, L.; Wen, J.; Chen, L. (2019). A graphene oxide/gold nanoparticle-based amplification method for SERS immunoassay of cardiac troponin I. *Analyst*, 144(5), 1582-1589.
- [34] Cheng, Z.; Wang, R.; Xing, Y.; Zhao, L.; Choo, J.; et al. (2019). SERS-based immunoassay using gold-patterned array chips for rapid and sensitive detection of dual cardiac biomarkers. *Analyst*, 144(22), 6533-6540.
- [35] Zhang, D.; Huang, L.; Liu, B.; Su, E.; Chen, H. Y.; Gu, Z.; Zhao, X. (2018). Quantitative detection of multiplex cardiac biomarkers with encoded SERS nanotags on a single T line in lateral flow assay. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 277, 502-509.
- [37] Narro, José Ramón. (2018). Enfermedades No Transmisibles Situación y Propuestas de Acción: Una Perspectiva desde la Experiencia de México. Primera edición. Secretaría de salud. Sitio web: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/416454/Enfermedades_No_Transmisibles_ebook.pdf. (Febrero, 2021).

- [38] Guadalajara, J. Fernando. (2012). *Cardiología*. 7a ed. Méndez Editores. México. (Febrero, 2021).
- [39] Mayo Clinic. Ataque cardiaco. Sitio web: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/heart-attack/symptoms-causes/syc-20373106>. (Febrero, 2021).
- [40] Medline plus. Angina inestable. Sitio web: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000201.htm>. (Febrero, 2021).
- [41] Mendoza, M. A. A.; Velasco, G. R.; Herrera, G. V.; Uriarte, O. A. L.; Herrera, Ú. J.; Sánchez, C. R. M. (2007). Acute heart failure and decompensated heart failure. *Archivos de Cardiología de México*, 77(S1), 27-33.
- [42] Mayo clinic. Miocarditis. Sitio web: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/myocarditis>. (Febrero, 2021).
- [43] Monroy, V.; Aldatz, B.; Guerra, A.; Verdejo, J.; Violante, R.; Esqueda, A. (2007). Morbilidad y mortalidad de la enfermedad isquémica del corazón y cerebrovascular en México. 2005. *Archivos de Cardiología de México*, 77(1), 31-39
- [44] Negrín Expósito, J. E.; Cordiés Jackson, L.; Roselló Silva, N.; Sánchez Ruiz, J.; Negrín Villavicencio, J. A. (2001). Insuficiencia cardíaca crónica. *Revista Cubana de Medicina*, 40(3), 195-211.
- [45] Medline plus. Angina estable. Sitio web: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000198.htm>. (Marzo, 2021).
- [46] Fundación Española del Corazón. Enfermedad cardiovascular. Sitio web: <https://g.co/kg/ouMaBD>. (Marzo, 2021).
- [47] González, D. M.; Gómez, L. S.; Torres, M. B. (2000). La troponina I cardíaca: marcador bioquímico de elección del daño miocárdico. *Biotecnol. Apl.* 17(2), 77-84.
- [48] Organización Mundial de la Salud. (2019). ¿Qué son las enfermedades cardiovasculares?. Sitio web: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/. (Marzo, 2021).
- [49] Universidad de Guadalajara. (2019). Mueren 200 personas cada día por infarto agudo al miocardio en México. Departamento de comunicación social HCG. Sitio web: <http://udg.mx/es/noticia/mueren-200-personas-cada-dia-por-infarto-agudo-al-miocardio-en-mexico#:~:text=A%20nivel%20mundial%20se%20estimade%20defunciones%20en%20un%20a%20C3%B1o>. (Marzo, 2021).
- [50] Organización mundial de la Salud. (2021). Enfermedades cardiovasculares. Sitio web: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/. (Marzo, 2021).
- [52] Cooper, L. T.; Knowlton, K. U. (2016). Miocarditis. *Tratado de Cardiología*. 10ma ed. España: Elsevier; p. 1589-601.
- [53] Guo J, Huang Z, Lin L, Lv J. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19) and cardiovascular disease: a viewpoint on the potential influence of angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin receptor blockers on onset and severity of severe acute syndrome coronavirus 2 infection. *Journal of American Heart Association*, 9(7), e016219.
- [55] Hernández, R. A.; Seriel, L. R.; Aportela, R. A.; Pérez, L. I.; Navas, M. H. (2020). COVID-19: en torno al sistema cardiovascular. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 10(2), 782.

- [56] Saviñon-Flores, F.; Méndez, E.; López-Castaños, M.; Carabarin-Lima, A.; López-Castaños, K. A.; González-Fuentes, M.A.; Méndez-Albores, A. (2021). A Review on SERS-Based Detection of Human Virus Infections: Influenza and Coronavirus. *Biosensors*. *11*(3), 66.
- [58] Apple, F. S. (2004). Analytical issues for cardiac troponin. *Prog. Cardiovasc. Dis.* *47*(3), 189.
- [59] Metkar, S. K.; Girigoswami, K. (2019). Diagnostic biosensors in medicine—a review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* *17*, 271-283.
- [60] Guest, T. M.; Ramanathan, A. V.; Tuteur, P. G.; Schechtman, K. B.; Ladenson, J. H.; Jaffe, A. S. (1995). Myocardial injury in critically ill patients: a frequently unrecognized complication. *Journal of the American Medical Association*, *273*(24), 1945-1949.
- [61] Kost, G. J.; Tran, N. K. (2005). Point-of-care testing and cardiac biomarkers: the standard of care and vision for chest pain centers. *Cardiol. Clin.* *23*(4), 467-490.
- [62] Nezami, A.; Nosrati, R.; Golichenari, B.; Rezaee, R.; Chatzidakis, G. I.; Tsatsakis, A. M.; arimi, G. (2017). Nanomaterial-based aptasensors and bioaffinity sensors for quantitative detection of 17 β -estradiol. *Trends Anal. Chem.* *94*, 95-105.
- [63] Mokhtarzadeh, A.; Dolatabadi, J. E. N.; Abnous, K.; de la Guardia, M.; Ramezani, M. (2015). Nanomaterial-based cocaine aptasensors. *Biosens. Bioelectron.* *68*, 95-106.
- [64] Florinel-Gabriel, Banica. (2012). Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications, First Edition. JohnWiley Sons.
- [65] Ramírez, E. T.; Méndez-Albores, A. (2014). Biosensores enzimáticos. *RDU-UNAM*. *15*(12), 1-8.
- [67] Dolatabadi, J. E.; de la Guardia, M. (2014). Nanomaterial-based electrochemical immunosensors as advanced diagnostic tools. *Anal. Methods*, *6*(12), 3891-3900.
- [68] Nezami, A.; Dehghani, S.; Nosrati, R.; Eskandari, N.; Taghdisi, S. M.; Karimi, G. (2018). Nanomaterial-based biosensors and immunosensors for quantitative determination of cardiac troponins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *159*, 425-436.
- [70] SEQC. (2019). Marcadores cardíacos. AACC. Sitio web: <https://www.labtestsonline.es/tests/marcadores-cardiacos>. (Marzo, 2021)
- [74] Doron R.; David. Muñoz C.; Marcelo. (2015). Marcadores Cardiacos y Riesgo Cardiovascular. *Revista Médica Clínica Las Condes*. Sitio web: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-marcadores-cardiacos-y-riesgocardiovas-ular-S0716864015000346>.
- [75] Cummins, B.; Auckland, M. L.; Cummins, P. (1987). Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *American heart J.*; *113*(6), 1333-1344.
- [76] McLean, A. S.; Huang, S. A. (2012). Biomarcadores cardíacos en la unidad de cuidados intensivos. *Annal Intensive Care*. Sitio web: <https://www.intramed.net/contenidoover.asp?contenido=75927>
- [77] Tobacman, L. S. (1996). Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annual Rev. Physiol.* *58*(1), 447-481.
- [81] Ebashi S, Wakabayashi T, Ebashi F. (1971). Troponin and its components. *J. Biochem.* *69*(2), 441-445.

- [82] Ingraham, R. H.; Swenson, C. A. (1984). Binary interactions of troponin subunits. *J. Biol. Chem.* **259**(15), 9544-9548.
- [84] de Lemos, J. A. (2013). Increasingly sensitive assays for cardiac troponins: a review. *Journal of the American Medical Association*, **309**(21), 2262-2269.
- [87] National Center for Biotechnology Information. Troponin I (104-115). (2021). Sitio web: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Troponin-I_104-115. (Abril, 2021).
- [88] Parmacek, M. S.; Solaro, R. J. (2004). Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **47**(3), 159-176.
- [89] Leng, Y. (2009). *Materials characterization: introduction to microscopic and spectroscopic methods*. John Wiley & Sons.
- [90] Ferraro, J. R. (2003). *Introductory raman spectroscopy*. Elsevier.
- [91] Turrell, G., Corset, J. (Eds.). (1996). *Raman microscopy: developments and applications*. Academic Press.
- [92] The Duffy Research Group. (2022). Raman Spectroscopy. Mayo 2022, de The High-Pressure Mineral Physics Laboratory At Princeton University. Sitio web: <https://duffy.princeton.edu/laboratory/raman-spectroscopy>
- [93] Slot, M. H. B.; van der Heijden, G. J.; Stelpstra, S. D.; Hoes, A. W.; Rutten, F. H. (2013). Point-of-care tests in suspected acute myocardial infarction: a systematic review. *Int. J. Cardiol.* **168**(6), 5355-5362.
- [94] Cahuantzi-Muñoz, Selene.; Méndez-Albores Alia. (2017). Detección electroquímica de glifosato en granos de maíz mediante la modificación de electrodos de grafito epoxi. Tesis de maestría. BUAP, Puebla, México.
- [95] Chon, H.; Lee, S.; Yoon, S. Y.; Lee, E. K.; Chang, S. I.; Choo, J. (2014). SERS-based competitive immunoassay of troponin I and CK-MB markers for early diagnosis of acute myocardial infarction. *Chemical Communications*, **50**(9), 1058-1060.
- [96] Zhang, D.; Huang, L.; Liu, B.; Ni, H.; Sun, L.; Su, E.; et al. (2018). Quantitative and ultrasensitive detection of multiplex cardiac biomarkers in lateral flow assay with core-shell SERS nanotags. *Biosensors and Bioelectronics*, **106**, 204-211.
- [97] Bai, T. T.; Wang, M.; Cao, M.; Zhang, J.; Zhang, K. Z.; Zhou, P.; Liu, Z. X.; Liu, Y.; Guo, Z. R.; Lu, X. Functionalized Au@Ag-Au nanoparticles as an optical and SERS dual probe for lateral flow sensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, **410**, 2291-2303.
- [98] Khlebtsov, B. N.; Bratashov, D. N.; Byzova, N. A.; Dzantiev, B. B.; Khlebtsov, N. G. (2019). SERS-based lateral flow immunoassay of troponin I by using gap-enhanced Raman tags. *Nano Research*, **12**(2), 413-420.
- [99] Hu, C.; Ma, L.; Guan, M.; Mi, F.; Peng, F.; Guo, C.; et al. (2020). SERS-based magnetic immunoassay for simultaneous detection of cTnI and H-FABP using core-shell nanotags. *Analytical Methods*, **12**(45), 5442-5449.
- [100] Alves, R. S.; Sigoli, F. A.; Mazali, I. O. (2020). Aptasensor based on a flower-shaped silver magnetic nanocomposite enables the sensitive and label-free detection of troponin I (cTnI) by SERS. *Nanotechnology*, **31**(50), 505505.

- [101] Hu, C.; Ma, L.; Mi, F.; Guan, M.; Guo, C.; Peng, F.; et al. (2021). SERS-based immunoassay using core-shell nanotags and magnetic separation for rapid and sensitive detection of cTnI. *New Journal of Chemistry*, 45(6), 3088-3094.
- [102] Sánchez, A., Villalonga, A., Martínez-García, G., Parrado, C., Villalonga, R. (2019). Dendrimers as soft nanomaterials for electrochemical immunosensors. *Nanomaterials*, 9(12), 1745.
- [103] Vusa, C. S. R., Manju, V., Berchmans, S., Arumugam, P. (2016). Electrochemical amination of graphene using nanosized PAMAM dendrimers for sensing applications. *RSC advances*, 6(40), 33409-33418.
- [104] Kim, T. H., Choi, H. S., Go, B. R., Kim, J. (2010). Modification of a glassy carbon surface with amine-terminated dendrimers and its application to electrocatalytic hydrazine oxidation. *Electrochemistry Communications*, 12(6), 788-791.
- [105] Sluyters-Rehbach, M., Sluyters, J. (1970). Electroanalytical chemistry. *Marcel Dekker, New York*, 4.
- [106] Herrero Ansorregui, Irene (2019) Modificación electroquímica de superconductores de alta temperatura. Tesis. *Universidad Complutense de Madrid*.
- [107] Hernández Rivera, A., Valencia Ochoa, D. P. (2017). Modificación de superficies electródicas con grafeno para determinación de Amoxicilina por métodos electroquímicos. *Informador Técnico*, 81(2), 79-83.
- [108] Matheus, P. R., Abad, J. M., Fernández, V. M. (2007). Modification of gold surfaces for the oriented immobilization of recombinant form of horseradish peroxidase. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 30(3), 225-235.
- [109] Hernández, R. (2017). Construcción, implementación y calibración de potenciostato dedicado a mediciones voltamétricas. *Links*.
- [110] Garcia, J. L. (2004). Preparación y caracterización de Membranas de Intercambio Iónico a Partir del Anclaje de Dendrímeros PAMAM en una Base Polimérica de Acetato de Celulosa. Tesis de Maestría, *CIDETEQ*.
- [111] González-Fuentes, M. A. (2005). Diseño de electrodos de Au modificados con dendrímeros PAMAM y moléculas electroactivas de Ni-ciclám, para la oxidación de alcoholes alifáticos en medio alcalino. Tesis de Maestría, *CIDETEQ*.
- [112] Razmi, H., and Azadbakht, A. (2005). Electrochemical characteristics of dopamine oxidation at palladium hexacyanoferrate film, electroless plated on aluminum electrode. *Electrochimica Acta*, 50(11), 2193-2201
- [113] Pan, B.; Cui, D.; Gao, F.; He, R. (2006). Growth of multi-amine terminated poly (amidoamine) dendrimers on the surface of carbon nanotubes. *Nanotechnology*, 17(10), 2483.
- [114] Zhang, Y., Liu, X., Li, L., Guo, Z., Xue, Z., Lu, X. (2016). An electrochemical paracetamol sensor based on layer-by-layer covalent attachment of MWCNTs and a G4. 0 PAMAM modified GCE. *Analytical Methods*, 8(10), 2218-2225.

ANEXO 1

Reactivos

Los reactivos empleados para los procedimientos que se describen se mencionan a continuación. Los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) fueron adquiridos de Fisher. El ácido sulfúrico (H_2SO_4) y el ácido nítrico (HNO_3) fueron adquiridos por FERMONT con una pureza de 99% utilizadas para la preparación de la disolución para la activación de los MWCNTs. Filtro de membrana de nitrocelulosa fue comprada Sigma-Aldrich para la filtración de MWCNTs. El bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) con una pureza de 99% fue adquirido de Sigma-Aldrich para estabilizar los MWCNTs. El etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) con una pureza de 99% fue comprado a Sigma-Aldrich para enjuagar los sustratos obtenidos. El fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y el fosfato dipotásico (K_2HPO_4) se adquirieron de FERMONT, ambos con una pureza de 99% para la preparación del buffer fosfatos. El ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$), para la caracterización del sustrato fue adquirido de FERMONT. Para la inmovilización, los dendrímeros tipo poli(amido)amino (PAMAM) de cuarta generación y el perclorato de litio (LiClO_4), se compraron de Sigma-Aldrich.

ANEXO 2

Diseño y construcción de la celda electroquímica

Para la caracterización electroquímica, se diseñó y se construyó una celda con las características necesarias para la configuración de tres electrodos (figura 2a), que contiene un orificio con un diámetro de 1 mm en la parte inferior, como se muestra en la figura 2b, para exponer a la disolución un área del electrodo de trabajo con esas dimensiones.

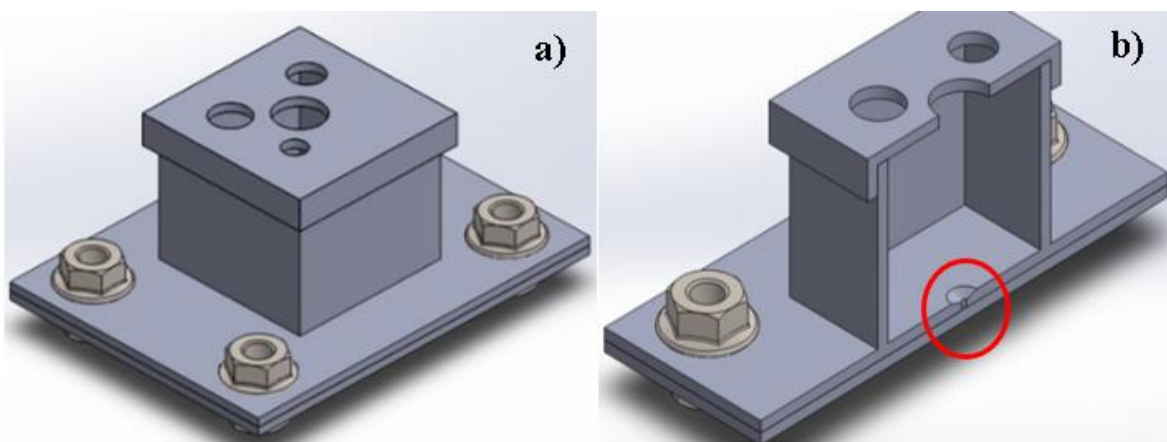


Figura 3. Esquema del diseño de la celda electroquímica. **a)** Vista superior. **b)** Vista inferior. Elaboración propia.

ANEXO 3

Esquemas de reacciones químicas

Para la funcionalización de los MWCNTs se empleó una disolución de ácido nítrico (HNO_3) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) para dejar disponibles grupos carboxilos en la superficie de los MWCNTs, como se esquematiza en la figura 3a.

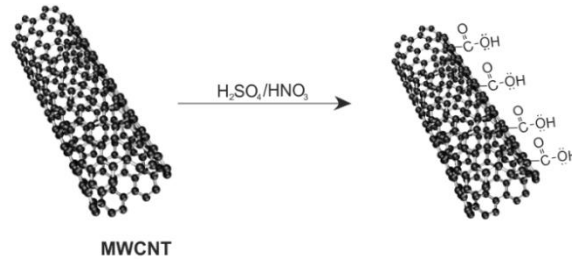


Figura 3a. Esquema de los grupos carboxilos en la superficie de los MWCNTs. Elaboración propia.

Asimismo, para la modificación del electrodo Al-MWCNTs con dendrímeros PAMAM, en la figura 3b se muestran las reacciones llevadas a cabo mediante voltamperometría cíclica.

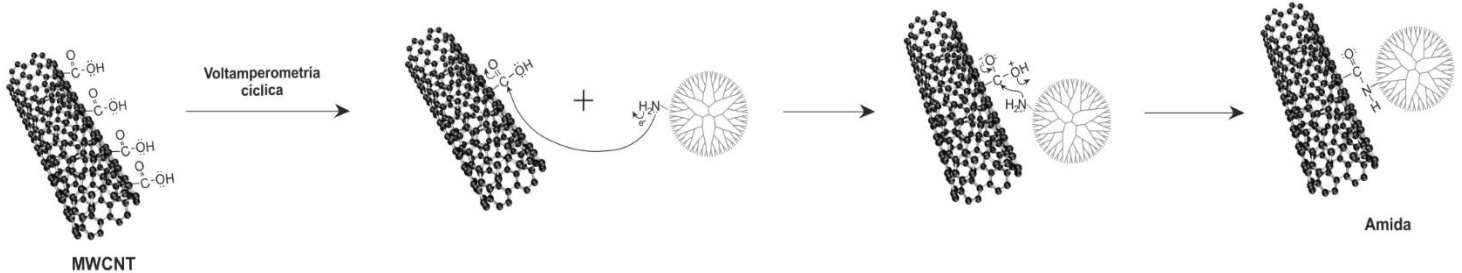


Figura 3b. Esquema de las reacciones durante la voltamperometría cíclica para la modificación del electrodo Al-MWCNTs con dendrímeros PAMAM. Elaboración propia.