



FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

DEPARTAMENTO DE INORGÁNICA

**“DESARROLLO DE UN INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA
LA DETECCIÓN DE BIOMARCADOR ESPECÍFICO DE CANCER”**

FRANCISCO JAVIER MARTÍNEZ ROJAS

Tesis para optar al Grado
Académico de Doctor en Química.

Director de Tesis : **Dr. Juan Francisco Armijo**

Santiago de Chile, Septiembre de 2020

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

**“DESARROLLO DE UN INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA LA
DETECCIÓN DE BIOMARCADOR ESPECÍFICO DE CANCER”**

Tesis presentada por:

FRANCISCO JAVIER MARTÍNEZ ROJAS

Para optar al Grado Académico de Doctor en
Química.

APROBADA POR:

Dra. SOLEDAD BOLLO DRAGNIC
Prof. Examinador

.....

Dr. CARLOS PEÑA FARFAL
Prof. Examinador

.....

Dr. GALO RAMIREZ JOFRÉ
Prof. Examinador

.....

Dr. JAVIER RECIO CORTES
Prof. Examinador

.....

Dr. JUAN FRANCISCO ARMIJO
Prof. Director de Tesis

.....

SEPTIEMBRE – 2020

Dedicatoria

A mi familia y amigos, gracias por el eterno e incondicional apoyo y paciencia.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer los financiamientos recibidos que permitieron realizar esta tesis doctoral:

Beca de doctorado Nacional CONICYT 21161601

Proyectos FONDECYT 1150228

Proyectos FONDECYT 1190206

También me gustaría agradecer al Dr. Juan Francisco Armijo por todos estos años como tutor, sus enseñanzas, consejos y ayudas desde pregrado han sido esenciales en mi formación.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Bioelectroquímica y del Departamento de Electroquímica de la Facultad de Química y de Farmacia de la Pontificia Universidad Católica de Chile, por el apoyo, las risas y el café.

Al Dr. Victor Diculescu y al *National Institute of Physical Materials*, Rumania, por recibirme en su laboratorio y permitirme realizar mi pasantía doctoral.

Y a todos los que de una manera u otra aportaron en el desarrollo de este trabajo, durante todo este tiempo y en mi formación académica y personal.

Lista de Abreviaciones

Abreviación	Significado
3-HPA	Ácido 3-hidroxifenilacético
4-HPA	Ácido 4-hidroxifenilacético
5-ICA	Ácido 5-indolcarboxílico
5-PICA	Ácido poli-5-indolcarboxílico
6-ICA	Ácido 6-indolcarboxílico
6-PICA	Ácido poli-6-indolcarboxílico
Ab-IgG	Anticuerpo para IgG
Anti	Anticuerpo monoclonal Anti-KLK3
APBA	Ácido aminofenilborónico
ATR-IR	Espectroscopía infrarroja reflectancia total atenuada
BM	Biomarcador
CV	Voltamperometría cíclica
EDC	(1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida)
EIS	Espectroscopía de Impedancia Electroquímica
IgG	Inmunoglobulina G
IRE	Elemento de reflexión interna
ITO	Óxido de estaño dopado con indio
mAb	Proteasome 20S α subunit (human) monoclonal antibody
NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
P20S	Proteasoma 20S
PANI	Polianilina
PEDOT	poli(3,4-etilendioxitiofeno)
PPy	Polipirrol
PSA	Antígeno Prostático específico
PTh	Politiofeno
QLA	Quimioluminiscencia
RIA	Radioinmunoensayo
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SWV	Voltamperometría de onda cuadrada

Índice General

Capítulo I. Introducción	1
1. Biomarcadores	1
1.1 Antígeno Prostático Específico PSA	2
1.2 Proteasoma 20S	3
2. Biosensores	4
3. Polímeros Conductores	7
4. Técnicas de caracterización morfológicas y electroquímicas	12
4.1 SEM	12
4.2 Espectroscopía RAMAN	13
4.3 Espectroscopía infrarroja reflectancia total atenuada ATR-IR	14
4.4 Voltamperometría cíclica	15
4.5 Voltamperometría de onda cuadrada	16
4.6 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica	16
2. Hipótesis de trabajo	18
3. Objetivos	19
3.1 Objetivo general	19
3.2 Objetivos específicos	19
Capítulo II. Parte Experimental	20
2.1 Reactivos	20
2.2 Mediciones electroquímicas	21
2.3 Electro-obtención de polímero conductor	21
2.4 Caracterizaciones morfológicas	22
2.5 Inmovilización APBA	22

2.6 Inmunosensor para la detección de IgG	22
2.7 Inmunosensor para la detección de P20S	23
2.8 Análisis de P20S en muestras de suero	23
2.9 Optimización de la incubación de ácido aminofenilborónico	24
2.10 Optimización de la incubación de Anti-KLK3	24
2.11 Optimización de la incubación de Antígeno prostático específico.	24
2.12 Inmunosensor para la detección de PSA.	25
Capítulo III. Resultados y Discusión	26
3.1 Obtención electroquímica de polímeros conductores.	26
3.2 Obtención de poliindoles	28
3.3 Caracterización morfológica de las superficies electródicas.	29
3.4 Obtención del inmunosensor basado en 6-PICA en presencia del par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$	37
3.3 Estudio de pH para 6-PICA	44
3.4 Estudio de velocidad de barrido de potencial de 6-PICA	46
3.5 Obtención de un inmunosensor para la detección de P20S	49
3.6 Detección cuantitativa de P20S.	57
3.7 Análisis de P20S en muestras reales	59
3.8 Detección y cuantificación de PSA	62
3.9 Optimización en la detección de PSA	63
3.10 Cuantificación de PSA	70
3.11 Determinación de Constantes de afinidad (K_a) para P20S y PSA	74
Capítulo IV. Conclusiones	76

Índice de Tablas

Tabla 1. Resumen de asignación de las vibraciones reportadas por ATR-IR. (ν en cm^{-1}).....	36
Tabla 2. Valores obtenidos para los parámetros de resistencia R_s y R_{ct} del inmunosensor electroquímico basado en 6-PICA para P20S.	40
Tabla 3. Valores obtenidos para los parámetros de resistencia R_s y R_{ct} del inmunosensor electroquímico basado en 6-PICA para P20S.	43
Tabla 4. Ajuste de datos obtenidos por EIS utilizando un circuito equivalente de Randles modificado (Circuito equivalente 1).....	53
Tabla 5. Ajuste de datos obtenidos por EIS utilizando un circuito equivalente Randles modificado (Circuito equivalente 2).....	53
Tabla 6. Parámetros analíticos de rango lineal, LD y LQ para la determinación de P20S con el inmunosensor basado en 6-PICA.	59
Tabla 7. Cuantificación de P20S en muestras de suero humano medidas electroquímicamente por SWV.	60
Tabla 8. Comparación de parámetros analíticos de rango lineal, LD, tiempo y temperatura de incubación, para la determinación de PSA.	73

Índice de Figuras

Figura 1. Proteasoma 20S. Muestra una vista lateral del proteasoma 20S, el cual posee dos anillos externos α y dos anillos internos β , cada uno conformado por siete subunidades [31].	4
Figura 2. Representación esquemática de un biosensor. Diferentes alternativas de elementos de bioconocimiento y transductores. (Imagen modificada desde la referencia) [13].	6
Figura 3. Estructura de los monómeros ácido indol carboxílico: 5-ICA y 6-ICA, y de ácido hidróxifenil acético: 3-HPA y 4-HPA.	10
Figura 4. Esquema general del proceso de modificación de la superficie conductora y generación del biosensor electroquímico.	11
Figura 5. Variación de potencial aplicado en el tiempo en voltamperometría cíclica.	15
Figura 6. Perfiles voltamperométricos por CV de 3-HPA en disolución: A) HClO_4 0,5M, B) $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ 0,1 M, frente a C) Referencia bibliográfica [47].	27
Figura 7. Electropolimerización de $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de 6-ICA (A) y 5-ICA (B) en $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ sobre GC entre 0 y +1,1 V y por voltamperometría cíclica, 30 ciclos a $80 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ de barrido de potencial.	29
Figura 8. Imágenes SEM a una magnificación de 120.000, para 6-PICA/FTO, obtenido a diferentes velocidades de barrido de potencial, durante 30 ciclos por VC en $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ 0,1M. A) 20, B) 40, C) 80 y D) $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$	30
Figura 9. Imágenes SEM a una magnificación de 4.000, para 6-PICA/FTO, a diferentes velocidades de barrido de potencial de obtención de polímero, durante 30 ciclos por VC en $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ 0,1M. A) 20, B) 40, C) 80, D) $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$	31

Figura 10. Imágenes SEM laterales de 6-PICA sobre FTO por VC, obtenidos durante: A) 30 y B) 50 ciclos a $80 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ de barrido de potencial, respectivamente, en $\text{LiClO}_4/\text{ACN } 0.1\text{M}$	32
Figura 11. Imagen SEM de 5-PICA sobre FTO por CV 30 ciclos a $80 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, obtenidos en $\text{LiClO}_4/\text{ACN } 0.1\text{M}$	33
Figura 12. Espectroscopía ATR-IR para: A) 6-ICA (azul) frente a 6-PICA/FTO (negro). B) 6-PICA/FTO (negro) frente a APBA/6-PICA/FTO (rojo), respectivamente.....	35
Figura 13. Espectroscopía RAMAN para 6-PICA/FTO y APBA/6-PICA/FTO.	36
Figura 14. Diagrama de Nyquist en presencia del par redox $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en $\text{KCl } 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, entre $1\cdot 10^5 - 1\cdot 10^{-2} \text{ Hz}$ para: a) GC, b) 6-PICA/GC, c) APBA/6-PICA/GC.....	38
Figura 15. Diagrama de Nyquist en presencia del par redox $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en $\text{KCl } 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, entre $1\cdot 10^5 - 1\cdot 10^{-2} \text{ Hz}$ para: a) GC, b) 6-PICA/GC, c) APBA/6-PICA/GC, d) Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC, e) IgG(50)/Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC, f) IgG(100)/Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC. Incubado en 50 y $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de IgG, respectivamente.....	39
Figura 16. Perfil voltamperométricos por SWV en presencia del par redox $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en $\text{KCl } 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, para: Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC, IgG(50)/Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC, IgG(100)/Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC, entre -1.0 y 1.0 V	41
Figura 17. Diagrama de Nyquist en presencia del par redox $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en $\text{KCl } 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, entre $1\cdot 10^5 - 1\cdot 10^{-2} \text{ Hz}$ para: a) 6-PICA/GC, b) APBA/6-PICA/GC, c) mAb/APBA/6-PICA/GC, d) 100/mAb/APBA/6-PICA/GC, e) 200/mAb/APBA/6-PICA/GC, f) 300/mAb/APBA/6-PICA/GC. Incubado en 100, 200 y $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de P20S, respectivamente.	42

Figura 18. A) Perfiles voltamperométricos a pH entre 2,0 y 6,0 de 6-PICA en disolución B-R 0,1 mol·L ⁻¹ a 0,1 V·s ⁻¹ . B) Gráfico de potencial formal <i>E</i> ₁₀ , <i>E</i> ₂₀ y <i>E</i> ₃₀ , en función del pH.....	46
Figura 19. Perfil voltamperométrico por VC de 6-PICA (línea negra) frente a GC (inserto en línea roja), en disolución tampón 1 mol·L ⁻¹ HAc/Ac ⁻ pH 5,5, a 100 mV·s ⁻¹ , entre -0,8 y 0,8 V.....	47
Figura 20. (A) Perfiles voltamperométricos por VC del polímero 6-PICA en disolución HAc–Ac ⁻ 1 mol·L ⁻¹ (pH 5,5) a diferentes velocidades de barrido de potencial: (a) 0,2, (b) 0,18, (c) 0,16, (d) 0,14, (e) 0,12, (f) 0,1, (g) 0,08, (h) 0,06, (i) 0,04 y (j) 0,02. (B) Relación lineal del pico de corriente anódico (<i>I</i> _{pa}) y catódico (<i>I</i> _{pc}) frente a las distintas velocidades de barrido.....	48
Figura 21. Perfil voltamperométrico por VC para: (a) 6-PICA/GC (línea negra), (b) APBA/6-PICA/GC (línea roja), (c) mAb/APBA/6-PICA/GC (línea azul) y (d) P20S/APBA/6-PICA/GC (línea verde), frente a GC (línea gris). La concentración de P20S es de 100 ng·mL ⁻¹ en disolución tampón HAc/Ac ⁻ pH 5,5.....	50
Figura 22. Perfil voltamperométrico por SWV para: (a) 6-PICA/GC (línea negra), (b) APBA/6-PICA/GC (línea roja), (c) mAb/APBA/6-PICA/GC (línea azul) y (d) P20S/APBA/6-PICA/GC (línea verde). La concentración de P20S es de 100 ng·mL ⁻¹ en disolución tampón HAc/Ac ⁻ pH 5,5.....	51
Figura 23. A) Diagramas de Nyquist y B) Diagrama de Bode, entre 1·10 ⁵ Hz - 1·10 ⁻² Hz para: (a) 6-PICA/GC (línea negra), (b) APBA/6-PICA/GC (línea roja), (c) mAb/APBA/6-PICA/GC (línea azul) y (d) P20S/APBA/6-PICA/GC (línea verde). La concentración de P20S es de 100 ng·mL ⁻¹ en disolución tampón HAc/Ac ⁻ pH 5,5.....	53
Figura 24. A) Perfil voltamperométrico por SWV y B) Diagrama de Bode para: (a) 6-PICA/GC (línea negra), (b) APBA/6-PICA/GC (línea roja), (c) mAb/APBA/6-PICA/GC (línea azul), (d) P20S/APBA/6-PICA/GC (línea verde)	

y mAb/6-PICA/GC (línea magenta). La concentración de P20S es de 100 ng·mL ⁻¹ en disolución tampón Hac/Ac ⁻ pH 5,5.	55
Figura 25. Perfil voltamperométrico por SWV, para GC (línea negra), APBA/6-PICA/GC (línea roja) y P20S/APBA/6-PICA/GC (línea celeste). Gráfico inserto, Diagrama de Nyquist entre 1·10 ⁵ - 1·10 ⁻² Hz. La concentración de P20S es de 50 ng·mL ⁻¹ en disolución tampón Hac/Ac ⁻ pH 5,5 en ausencia de anticuerpo mAb.	56
Figura 26. A) Perfiles voltamperométricos por SWV para: a) 20,0; b) 40,0; c) 60,0; d) 80,0; e) 100,0; f) 120,0; g) 140,0; h)160,0; i) 180,0 y j) 200,0 ng·mL ⁻¹ de P20S. B) Curva de calibrado, corriente normalizada frente a la concentración de P20S entre 20,0 – 200,0 ng·mL ⁻¹ , en disolución tampón Hac/Ac ⁻ pH 5,5.	58
Figura 27. Reproducibilidad de la detección de P20S en muestra de suero humano utilizando el inmunosensor basado en 6-PICA.	61
Figura 28. Ensayo de interferentes en la detección de P20S. Interferentes utilizados: BSA y PSA, 120 ng·mL ⁻¹ cada uno, en buffer HAC/Ac ⁻ pH 5,5.....	62
Figura 29. Optimización de tiempo de incubación de 50·10 ⁻³ mol·L ⁻¹ de APBA, en buffer HAC/Ac ⁻ pH 5,5.....	65
Figura 30. Optimización de tiempo de incubación de 50 µg·mL ⁻¹ de Anti-KLK3, en buffer HAC/Ac ⁻ pH 5,5.....	66
Figura 31. Optimización de temperatura de incubación de 50 µg·mL ⁻¹ de Anti-KLK3, en buffer HAC/Ac ⁻ pH 5,5.....	67
Figura 32. Optimización de tiempo de incubación de 100 ng·mL ⁻¹ de PSA, en buffer HAC/Ac ⁻ pH 5,5.	68
Figura 33. Perfiles voltamperométricos por (A) VC y (B) SWV para 6-PICA/GC (línea roja), APBA/6-PICA/GC (línea verde), Anti-KLK3/APBA/6-PICA/GC (línea azul) y PSA/Anti-KLK3/APBA/6-PICA/GC (línea magenta). La concentración de PSA es 10 ng·mL ⁻¹ en disolución HAC-Ac ⁻ 1,0 mol·L ⁻¹ (pH	

5,5). (C) Reproducibilidad en las etapas de obtención del inmunosensor electroquímico..... 69

Figura 34. A) Perfiles voltamperométricos por SWV para PSA a concentraciones de: 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 y 100,0 ng·mL⁻¹. B) Curva de calibrado, ($I_0 - I/I_0$) frente al logaritmo de la concentración de PSA entre 0,5 – 100,0 ng·mL⁻¹, en disolución tampón Hac/Ac⁻ pH 5,5..... 71

Figura 35. Constante de afinidad K_a para (A) P20S-mAb y (B) PSA-Anti-KLK3. Curva de calibrado ($I_0 - I/I_0$) frente a la concentración (mol·L⁻¹) en disolución tampón Hac/Ac⁻ pH 5,5..... 75

Resumen

Una posible solución para el diagnóstico de cáncer son los estudios de seguimiento de biomarcadores tumorales. Si son detectados a tiempo y controlados durante un tratamiento adecuado, existe una excelente posibilidad de recuperación de muchos tipos de cáncer. Muchos tumores producen cantidades anormales de una molécula biológica conocida como biomarcador, la cual se encuentra en distintos fluidos corporales o tejidos indicando la presencia de cáncer.

Los polímeros conductores (CPs) presentan características únicas como buena conductividad, estabilidad, reproducibilidad, biocompatibilidad y se producen a bajo costo. Además, cuando presentan estructuras nanométricas muestran buenas respuestas electroquímicas debido a un aumento del área activa, lo que demuestra su potencial uso como plataforma para la inmovilización orientada de la unidad de bioreconocimiento, correspondiente al anticuerpo específico al analito a detectar.

En este trabajo, se desarrolló un inmunosensor electroquímico sin etiqueta basado en la inmovilización de anticuerpos específicos unido a un electrodo modificado con ácido aminofenilborónico/ácido poli-6-indolcarboxílico (APBA/6-PICA/GC) para la detección del antígeno prostático específico (PSA) y Proteasoma 20S (P20S). Las condiciones óptimas de cada paso en la obtención de la bioplataforma se enfocaron en el tiempo y la temperatura de incubación, logrando gran reproducibilidad y excelente estabilidad. La inmovilización orientada de cada anticuerpo se llevó a cabo utilizando APBA, favoreciendo la formación del inmunocomplejo. La respuesta redox intrínseca de 6-PICA, fue escogida como señal electroanalítica. Mediante voltametría de onda cuadrada se detectó P20S y PSA, con límites de detección y cuantificación de 11 y 37 ng·mL⁻¹ para P20S y de 0,11 y 0,37 ng·mL⁻¹ para PSA, respectivamente. Se determinaron altas constantes de afinidad para P20S-mAb y PSA-Anti-KLK3, mostrando valores de 7,63x10⁹ M⁻¹ y 2,32x10⁹

M⁻¹, respectivamente, indicando una gran selectividad frente a interferentes. Todas estas características proponen que la bioplataforma se pueda utilizar para detectar concentraciones de P20S y PSA dentro de niveles clínicamente relevantes.

Abstract

One possible solution for the diagnosis of cancer is follow-up studies on tumor biomarkers. If they are early detected and monitored during proper treatment, there is an excellent possibility of recovery from many types of cancer. Many tumors produce abnormal amounts of a biological molecule known as a biomarker, which is found in different body fluids or tissues indicating the presence of cancer.

Conductive polymers (CPs) have unique characteristics such as good conductivity, stability, reproducibility, biocompatibility, and are easily acquired at a low cost. In addition, when they present nanometric structures, they show good electrochemical responses due to an increase of active area, demonstrating their potential use as a platform for the targeted immobilization of the biorecognition unit, corresponding to the specific antibody to the analyte to be detected.

In this work, a label-free electrochemical immunosensor based on the immobilization of specific antibodies attached to an electrode modified with aminophenylboronic acid/poly-6-indolecarboxylic acid (APBA/6-PICA/GC) was developed for the detection of prostate specific antigen (PSA) and Proteasome 20S (P20S). The optimal conditions of each step in obtaining the bioplatfrom focused on the incubation time and temperature, achieving great reproducibility and excellent stability. The orientated immobilization of each antibody was carried out using APBA, favoring the formation of the immune complex. The intrinsic redox response of 6-PICA was chosen as the electroanalytical signal.

P20S and PSA were detected by square wave voltammetry, with detection and quantification limits of 11 and 37 ng·mL⁻¹ for P20S and 0.11 and 0.37 ng·mL⁻¹ for PSA, respectively. High affinity constants were determined for P20S-mAb and PSA-Anti-KLK3, showing values of 7.63x10⁹ M⁻¹ and 2.32x10⁹ M⁻¹, respectively, indicating a great selectivity against interferers. All these characteristics propose that the bioplatfrom can be used to detect P20S and PSA concentrations within clinically relevant levels.

Capítulo I. Introducción

La mayoría de los diagnósticos de cáncer, aproximadamente el 60% de los casos, son realizados de manera tardía, cuando ya está avanzado o hay presencia de metástasis, lo cual los hace difícil de tratar, y por lo tanto, presentan una mayor tasa de mortalidad. Por otro lado, muchos tumores tienen la capacidad de producir de forma anormal determinadas sustancias de distintas estructuras, la mayoría de ellas son liberadas al torrente sanguíneo y pueden ser detectadas y cuantificadas mediante métodos de diagnóstico inmunológico [1]. Estas sustancias son llamadas biomarcadores y en el caso del cáncer, son un importante indicador de crecimiento tumoral [2]. Es de conocimiento que los tratamientos para combatir enfermedades oncológicas son altamente invasivos, es por esto que cuando se elige un procedimiento para diagnosticar, monitorear y tratar enfermedades, se suele escoger fluidos del cuerpo humano por sobre los tejidos, principalmente por ser más accesibles y menos invasivos [3].

1. Biomarcadores

Un biomarcador (BM) es definido por el *National Cancer Institute* (NCI) como: “una molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros fluidos corporales, o tejidos que son signo de una actividad normal o anormal, o de una condición de enfermedad”. Un BM también puede ser utilizado para observar como el organismo responde a un tratamiento para una determinada enfermedad [4,5]. Por lo tanto, los biomarcadores de cáncer, juegan un rol fundamental en la atención temprana, ya que son producidos en la etapa preclínica, antes de presentar síntomas físicos y del posterior diagnóstico, pero estos se encuentran en niveles de concentración muy bajos y es por esto el gran interés de generar dispositivos altamente sensibles, capaces de detectar y cuantificar estas mínimas cantidades, con el fin de dar información confiable

en etapa temprana, lo que se podrá traducir en una mejora en los tratamientos y mejoría de los pacientes [1,6].

1.1 Antígeno Prostático Específico PSA

El PSA (*Prostate Specific Antigen*), es una serina proteasa de la familia calicreína [7]. Está compuesta por una glucoproteína monocatenaria secretada por la glándula prostática, con un peso estimado de 33 kDa [7-9] y ha sido identificado como un BM para la detección de cáncer de próstata en varones [10,11], el cual es el tercer tipo de cáncer más común, tanto en etapa temprana, como para monitorear su recurrencia luego del tratamiento [12]. Su detección es posible encontrarlo en suero, de forma libre y formando un complejo de diversos inhibidores de enzimas proteasas. Cuando el PSA está a un nivel igual o mayor a $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, es un indicador de alta probabilidad de que un paciente pueda estar afectado por un cáncer de próstata. Sin embargo, un valor de PSA por sobre $4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ se considera generalmente positivo e indicaría la necesidad de realizar una biopsia [13], ya que un 30% de los hombres con un nivel de PSA entre $4,1$ y $9,9 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ han sido diagnosticado con esta patología [2,14].

En los últimos años se han reportado diversos tipos de transductores para la detección de PSA, entre ellos se encuentran transductores electroquímicos [15,16], piezoeléctricos [17,18] y ópticos [19,20]. Estos métodos son basados en inmunoensayos con respuestas de quimiluminiscencia, fluorescencia o colorimétricos [21,22]. Además, para la determinación de PSA se han reportado bajos límites de detección correspondientes a biosensores a base de nanotubos de carbono [23,24] y nanopartículas de oro [25,26], como amplificadores de la señal analítica.

Es por esto que el desarrollo de biosensores altamente sensibles, capaces de detectar y cuantificar de manera confiable biomarcadores como el PSA son de gran relevancia, ya que permitirán una disminución de diagnósticos errados, aumentando la probabilidad de un diagnóstico en etapa temprana. **Bajo estos antecedentes, el desarrollo de plataformas electroquímicas modificadas con moléculas que presenten grupos funcionales tales como ácidos carboxílicos disponibles en su estructura, permitirá inmovilizar de manera más afín una biomolécula que cumplirá el rol de detección del biomarcador, en este caso un anticuerpo específico para PSA.**

1.2 Proteasoma 20S

El Proteasoma es un complejo enzimático multicatalítico responsable de regular la degradación de proteínas intracelulares, también llamado Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS)[27]. En este proceso, las proteínas celulares destinadas para la degradación son marcadas por multímeros de ubiquitina y reconocidos y degradados por el Proteasoma 26S. Este complejo Proteasoma 26S, está formado por un núcleo catalítico, el Proteasoma 20S (P20S), sitio donde ocurre la degradación [28,29]. El Proteasoma 20S, es una proteasa de aproximadamente 700 kDa, con estructura en forma de barril, como se observa en la figura 1, dispuesta en 4 anillos apilados, en donde los anillos externos α , interactúan con las partículas reguladoras implicadas en el reconocimiento de distintos sustratos, mientras que los dos anillos internos β , son los responsables de la actividad catalítica en la hidrólisis de proteínas [30,31]. El sistema de proteasomas controla la degradación de proteínas intracelulares. Además, es una importante máquina molecular ya que juega un rol crítico en la regulación del ciclo celular y en la respuesta inmune produciendo péptidos antigénicos [32]. Ha sido detectado en suero y plasma. Concentraciones elevadas de P20S han sido asociadas a pacientes con un amplio rango de enfermedades como neoplasias o enfermedades autoinmunes [33,34]. Es por

esto que ha surgido como un importante objetivo de estudio farmacológico en la lucha contra ciertos tipos de cáncer [35], además del envejecimiento celular, ya que tiene una actividad esencial en la proliferación de células tumorales y el desarrollo de resistencia a fármacos tumorales [31]. Actualmente, han sido reportadas diferentes técnicas para determinar P20S usando anticuerpos, como resonancia de plasmón superficial (SPRI) y ensayos de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) [33-39].

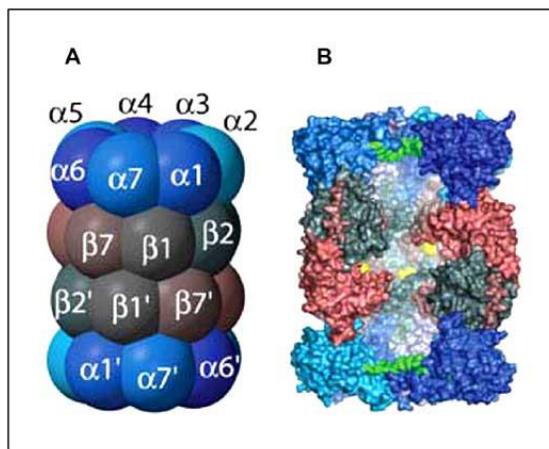


Figura 1. Proteasoma 20S. Muestra una vista lateral del proteasoma 20S, el cual posee dos anillos externos α y dos anillos internos β , cada uno conformado por siete subunidades [31].

2. Biosensores

Los biosensores y dispositivos bioelectrónicos, han sido satisfactoriamente utilizados en numerosos campos como diagnóstico clínico, detección de drogas, monitoreo ambiental y control de calidad de los alimentos [40,41]. En el desarrollo de su manufactura están involucradas dos partes: una unidad de bioreconocimiento y un transductor, como se muestra en la figura 2. La unidad de bioreconocimiento determinará el grado de selectividad o especificidad del biosensor, mientras que el transductor entregará la capacidad de obtener

bajos límites de detección, transformando la respuesta biológica o bioquímica en una señal cuantificable [3].

La naturaleza de esta señal puede corresponder a cambios de calor absorbido o emitido por la reacción, (biosensor calorimétrico), o referirse a la distribución de cargas que llevan a un potencial electroquímico (biosensor potenciométrico). También, puede representar una transferencia de electrones producidos en una reacción redox (biosensor amperométrico) o incluso la diferencia en absorción de luz entre reactantes y productos (biosensor óptico), o si la relación corresponde a una diferencia de masas entre reactantes y productos es clasificado como un biosensor piezo-eléctrico.

Además, otra de las clasificaciones de estos dispositivos depende de la naturaleza del reconocimiento entre el analito y el transductor, ya sea por bioafinidad (anticuerpos, oligonucleótidos, DNA, etc.) o biocatalítico (principalmente enzimas) [2,42]. Actualmente, muchos trabajos se han enfocado en la miniaturización de los biosensores y dispositivos bioelectrónicos, fabricando micro-transductores o incorporando nanomateriales, tales como: nanopartículas y/o materiales a base de carbono (nanotubos de pared simple y múltiple, grafeno, entre otros) [41], con el fin de obtener dispositivos compactos y fáciles de utilizar para la posible interacción entre distintas superficies, y así lograr la detección de analitos en tiempo real, especialmente para muestras clínicas y ambientales [40,43-45], enfocándose principalmente en aumentar y mejorar su especificidad y selectividad.

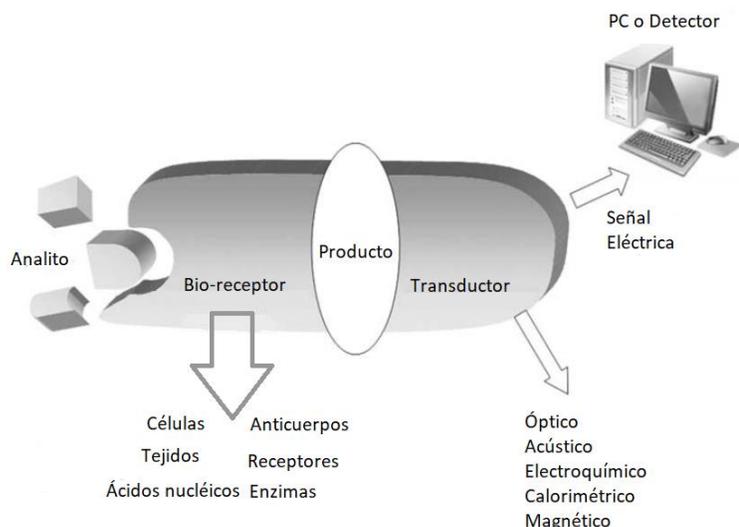


Figura 2. Representación esquemática de un biosensor. Diferentes alternativas de elementos de bioconocimiento y transductores. (Imagen modificada desde la referencia) [13].

Por otro lado, la industria biotecnológica utiliza la presencia de estos BM para el desarrollo de kits de detección, con el fin de apoyar la labor clínica en el diagnóstico y tratamiento de las distintas neoplasias. El eje fundamental en el cual se basa el método inmunológico es la alta especificidad de la formación del complejo antígeno-anticuerpo, de modo que, si tenemos un anticuerpo frente a un determinado antígeno, interaccionarán, formando un inmunocomplejo, que puede ser detectado.

Las técnicas que actualmente se utilizan en los laboratorios de análisis clínicos en la determinación de estas sustancias, son los siguientes: radioinmunoensayo (RIA), quimioluminiscencia (QLA) y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Estos métodos presentan algunas desventajas como lo son su complejidad y tiempo empleado, además de costosos equipamientos, además de personal altamente capacitado [6]. No obstante, los ensayos inmunológicos siguen otorgando una gran especificidad

entre el transductor y un BM determinado, dependiendo de la unidad de reconocimiento a la cual sean afín, principalmente anticuerpos específicos.

Estos anticuerpos pueden ser adsorbidos sobre una superficie, por ejemplo, la superficie de un electrodo modificado, de manera no covalente por fisisorción (interacciones de Van der Waals e hidrofóbicas, principalmente), o por quimisorción (interacciones electrostáticas, iónicas). Sin embargo, son las uniones de tipo covalente entre el anticuerpo y la superficie electródica, las que facilitan prolongados tiempos de almacenamiento del dispositivo, además de su reutilización como inmunosensor. Este tipo de interacción covalente, se ve favorecida cuando la superficie del transductor presenta grupos funcionales del tipo -hidroxi, -tiol, -carboxi y/o -amino [40]. Además, una de las principales características o beneficios de la especificidad de la formación del inmunocomplejo es que el BM objetivo en la muestra real (sangre, orina, suero) no necesita de procedimientos de purificación para su reconocimiento [2].

Por lo tanto, en la búsqueda por diseñar biosensores que puedan satisfacer estas necesidades y ofrecer mejores parámetros analíticos como sensibilidad, selectividad, confiabilidad, reproducibilidad, estabilidad, biocompatibilidad y además de una fácil producción de bajo costo, se proponen a los polímeros conductores como una prometedora herramienta de transducción, a los procedimientos de detección utilizados en las últimas décadas [3,41,47].

3. Polímeros Conductores

Los polímeros conductores han sido estudiados ampliamente para su uso como supercapacitores, baterías, celdas solares, celdas de combustibles y también para detectar moléculas biológicas de interés, debido a su estabilidad electroquímica, alta conductividad, alta transferencia de carga, baja toxicidad, flexibilidad mecánica y bajo costo [48,49], además de su selectividad y

biocompatibilidad cuando interactúan con otras biomoléculas orgánicas [5,50,51], siendo los más ampliamente estudiados la polianilina (PANI), polipirrol (PPy), politiofeno (PTh) [21,52,53], y sus derivados con diferentes grupos funcionales, tal como el poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) [54-56]. Las anteriores características y la posibilidad de presentar grupos funcionales en su estructura los convierten en una gran alternativa para la modificación de superficies electrónicas y la construcción de biosensores.

Un método utilizado para generar polímeros conductores es la electropolimerización, la obtención por esta vía depende de diversos factores como por ejemplo la naturaleza del disolvente, tipo y cantidad de electrólito soporte, concentración de monómero, entre otros [56-59]. Además, la presencia de grupos funcionales en la estructura del monómero, considerando que no participen en el mecanismo de electropolimerización, permitirá que estos queden disponibles para facilitar la inmovilización o captura de biomoléculas por medio de enlaces covalentes, favoreciendo el desarrollo de dispositivos reutilizables que puedan trabajar como transductores en sensores biológicos [3,57].

Es por esto, que se plantea la búsqueda de una superficie electrónica modificada que presente grupos funcionales disponibles, principalmente grupos carboxílicos (-COOH), para una posterior inmovilización de un anticuerpo específico y luego este interactúe con el biomarcador deseado, el cual generará un nuevo biosensor electroquímico como alternativa en el campo de los inmunoensayos.

En este proyecto, se propone estudiar los siguientes polímeros conductores: poliindoles y polihidroxifenilos, los cuales han recibido gran atención para diversos propósitos, siendo ampliamente estudiados en diferentes áreas tales

como dispositivos electrocrómicos, electro-catalizadores, baterías de ion-litio, supercapacitores, corrosión y sensores [53,58,61-73]. Estos polímeros conductores han sido obtenidos sobre distintas superficies como, por ejemplo; grafito [47], oro [57], acero [58,66], óxido de estaño dopado con indio (ITO) [62] y carbón vítreo [53,63,64,68-73]. Además, en su obtención muestran diferentes morfologías tales como como agregados globulares y granulares, microbarras o nanohilos. Por lo tanto, la morfología de los recubrimientos poliméricos nanoestructurados, presentarán una mayor área superficial disponible, cubierta de grupos funcionales carboxílicos que favorecerán la inmovilización del anticuerpo.

La figura 3, muestra los monómeros elegidos para este estudio, los derivados indólicos: ácido 5-indolacético (5-ICA) y ácido 6-indolacético (6-ICA), y los derivados hidroxifenílicos: ácidos 3-hidroxifenilacético (3-HPA) y ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA). Estos presentan en su estructura base un biciclo, uno de seis miembros y un heterociclo de cinco miembros, en el caso de los poliindoles, mientras que la estructura de los polihidroxifenilos está constituida solo por un ciclo de seis miembros. Ha sido reportado que la electropolimerización de los monómeros 5-ICA y 6-ICA, ocurre entre los carbonos C2 y C3 del anillo pirrólico [53], mientras que la electropolimerización de los monómeros 3-HPA y 4-HPA, ocurriría por la formación de monómeros radicales que interaccionan entre sí, por medio del grupo -OH y el anillo bencénico [60]. Por lo cual, las estructuras poliméricas generadas sobre la superficie electródica a partir de ellos, presentarán grupos carboxílicos libres disponibles, ya que estos no son parte de los distintos mecanismos de polimerización.

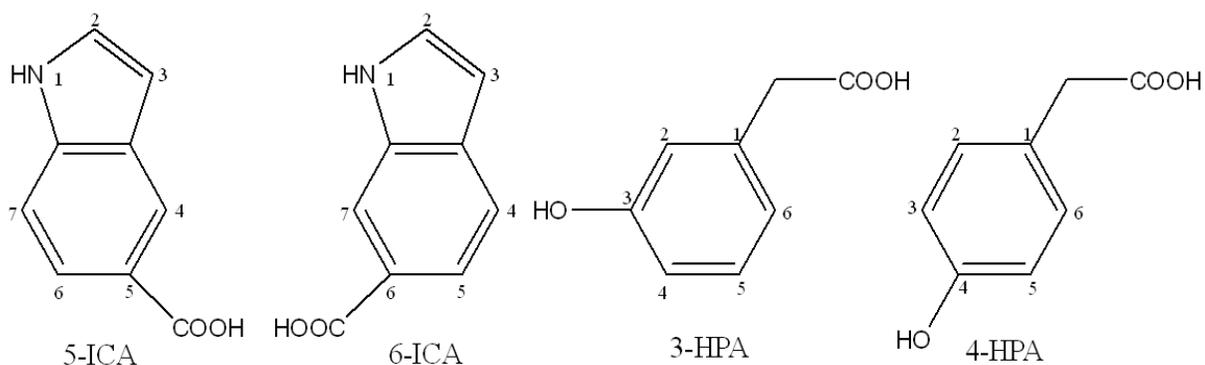


Figura 3. Estructura de los monómeros ácido indol carboxílico: 5-ICA y 6-ICA, y de ácido hidróxifenil acético: 3-HPA y 4-HPA.

Estos grupos carboxílicos presentes en los oligómeros poliméricos del transductor electroquímico, es importante que sean activados, para facilitar la formación de una unión covalente, entre el grupo amino que contenga el compuesto a inmovilizar, utilizando como reactivos EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), además de NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) por lo tanto, se pretende activar los grupos carboxílicos libres disponibles del polímero y luego se podrían hacer reaccionar con los grupos amino libres del anticuerpo, con lo cual se formará una interacción covalente del tipo amida [74,75].

Sin embargo, cuando los anticuerpos son adsorbidos sobre las superficies de los dispositivos, generalmente adoptan una orientación aleatoria, lo cual se traduce a menudo en una falla o disminución en su inmunofinidad, ya que los sitios de unión específica podrían quedar bloqueados o impedidos. Por lo tanto, la estrategia utilizada para lograr una unión de estos sobre las superficies orientados de manera específica, con el fin de favorecer la formación del complejo antígeno-anticuerpo es primordial [46,76-79]. Muchos sensores de azúcar y glicoproteínas, han sido preparados basados en la interacción de estos azúcares con ácidos borónicos, ya que ha sido reportado que los ácidos borónicos pueden unirse con residuos 1,2- ó 1,3-cis-diol y

forman esteres borónicos cíclicos de cinco o seis miembros [74], generando una interacción entre el ácido borónico-sacárido estable [70]. Considerando que todas las inmunoglobulinas son glicoproteínas, y que presentan residuos oligosacáridos en la región Fc y para preservar la actividad biológica del anticuerpo, se presenta el ácido 4-aminofenilborónico como un gran candidato para lograr la inmovilización orientada de la unidad de bioconocimiento sobre las superficies transductoras [81,82].

La figura 4, muestra un esquema del inmunosensor electroquímico que se propone obtener, capaz de entregar especificidad y selectividad al utilizar como bioreceptor un anticuerpo específico al analito a detectar. La superficie transductora obtenida corresponde a un polímero conductor nanoestructurado, con grupos carboxílicos expuestos y activados, que favorecerán la unión covalente y orientada, entre bioreceptor y transductor, aumentando los límites de detección y cuantificación del biomarcador, además de entregar la simplicidad de detección de los sensores electroquímicos [83], permitiendo tener un dispositivo estable debido a esta interacción covalente.

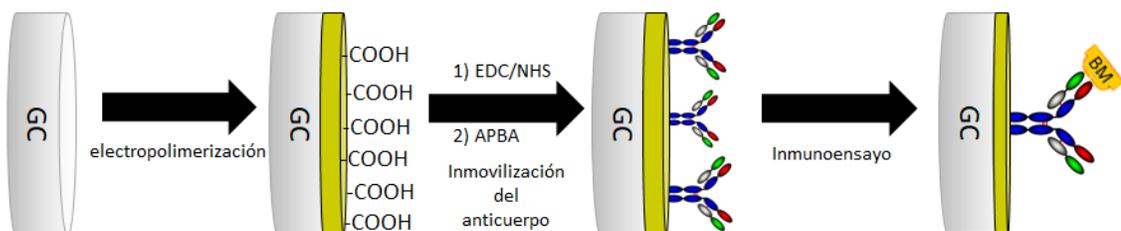


Figura 4. Esquema general del proceso de modificación de la superficie conductora y generación del biosensor electroquímico.

4. Técnicas de caracterización morfológicas y electroquímicas

4.1 SEM

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es uno de los instrumentos más versátiles para el análisis de muestras o materiales, esta técnica permite obtener información e imágenes topográficas y morfológicas de materiales y superficies que sean conductoras, además de información sobre su composición química, utilizando un haz enfocado de electrones de alta energía.

La generación de imágenes vía SEM es dependiente de la adquisición de señales producidas por el haz de electrones y por las interacciones que este tiene con la muestra. Las interacciones pueden dividirse principalmente en dos categorías: interacciones elásticas e interacciones inelásticas. Las dispersiones elásticas corresponden a las producidas por el núcleo atómico de la muestra o por los electrones de la capa externa de energía similar, dispersando el haz incidente en un ángulo superior a los 90° , denominados electrones retrodispersados. Por otro lado, las dispersiones inelásticas corresponden a interacciones entre los electrones incidentes con los electrones y átomos de la muestra, generando una pérdida o transferencia de energía desde el haz incidente a la muestra produciendo como consecuencia la dispersión de electrones secundarios, cuya energía es menor a los 50 eV. Finalmente, también se produce señales producto del impacto de los electrones al golpear la muestra, correspondientes a electrones Auger y también la emisión de rayos X [84].

Los modos más comunes para obtener imágenes de superficies usan las señales de los electrones retrodispersados y electrones secundarios. A medida que el haz de electrones barre la superficie linealmente, los detectores realizan la colección de electrones secundarios y retrodispersados, generando una imagen de la topografía similar a una fotografía en blanco y negro, en la

cual, mientras más electrones sean detectados, más brillante será ese punto en la imagen [85].

4.2 Espectroscopía RAMAN

La espectroscopía RAMAN se ha vuelto una herramienta muy utilizada para la caracterización de materiales. Esta técnica se enfoca en la dispersión de luz luego de interactuar con la materia. La luz dispersada está conformada por dos tipos: dispersión de Rayleigh, que es una dispersión fuerte y tiene la misma frecuencia del haz incidente, y la dispersión RAMAN que es una dispersión débil y se subdivide a su vez, en líneas de *Stokes* y *Anti-Stokes* [86].

El proceso básico de dispersión se basa en la absorción y reemisión de radiación electromagnética por las moléculas. La luz incidente puede dispersarse luego de interactuar con la materia, de manera elástica, es decir, a la misma frecuencia óptica o longitud de onda que la radiación incidente, denominada dispersión de Rayleigh. Por otra parte, la luz incidente también puede dispersarse a una frecuencia diferente a la emitida por la fuente de radiación, dispersión inelástica o dispersión RAMAN, este proceso implica una transferencia de energía entre los fotones incidentes y el material de la muestra [87]. Generalmente, se utilizan láseres unidireccionales de una longitud de onda como fuente de emisión, ya que se puede regular o aumentar su intensidad, además, de poder enfocar fácilmente en escalas de micrómetros.

La fuerza del efecto RAMAN está determinada por la derivada de la polarizabilidad molecular de la muestra, a diferencia de la espectroscopía IR, que está determinada por la derivada del momento dipolar. Esto implica que las vibraciones observadas por espectroscopía RAMAN no sean apreciables a través de IR. Moléculas con un gran momento dipolar, emiten señales IR muy fuertes, pero son dispersores RAMAN débiles [88]. Mientras que, por otra

parte, la dispersión RAMAN y la fluorescencia son fenómenos competitivos al tener un origen similar, el efecto RAMAN corresponde a una absorción y posterior emisión de un fotón, las moléculas son excitadas a un nivel energético virtual por microsegundos a diferencia de la fluorescencia, donde la emisión ocurre en el orden de los nanosegundos [87].

4.3 Espectroscopía infrarroja reflectancia total atenuada ATR-IR

La espectroscopía infrarroja es una técnica usada para estudiar y obtener información sobre la composición molecular de una muestra [89].

La reflexión total atenuada (ATR), es una herramienta útil para las mediciones de espectros infrarrojos de líquidos y sólidos. En esta técnica, la muestra debe estar colocada en contacto con el elemento de reflexión interna (IRE) [90], el cual debe tener un alto índice de refracción. Luego, es irradiada con el haz IR en un ángulo θ , mayor al ángulo crítico θ_c , de lo contrario el espectro resultante será una combinación de ATR y refracción externa [89]. En cada punto de reflexión interna, se produce una onda evanescente de radiación que puede ser absorbida por la muestra. La radiación infrarroja tiene una penetración limitada del orden de $1 \mu\text{m}$. La absorbancia es proporcional a la longitud del camino recorrido, similar a la espectroscopía de transmisión infrarroja. Sin embargo, en la espectroscopía ATR-IR, el camino recorrido efectivo, b' , es equivalente al número de reflexiones del haz IR (N), por la profundidad de penetración, d_p . La pequeña profundidad de penetración y la corta longitud del recorrido, permiten la medición infrarroja de soluciones acuosas o polímeros, ya que corresponden a medios fuertemente absorbentes [91].

Algunas de las principales ventajas del uso de la reflexión total atenuada son: un área de muestreo mayor, preparación simple de muestras, reproducibilidad espectral, una relación señal-ruido mayor, aplicabilidad en muestras acuosas y de dispersión reducida. Además, la capacidad para identificar los tipos de

grupos funcionales presentes en una muestra de manera no destructiva, ha contribuido en la aplicación de esta técnica de caracterización en áreas como la química y biología. El interés creciente sobre la funcionalización de superficies con moléculas o biomoléculas que le entreguen selectividad, han permitido que la espectroscopía infrarroja sea utilizada en aplicaciones como biosensores, por ejemplo, en la determinación de respuestas inflamatorias en implantes biomédicos [92].

4.4 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (VC) es una técnica electroquímica que permite estudiar el comportamiento de algún analito de interés si este presenta algún proceso de óxido-reducción. Consiste en la aplicación de un barrido de potencial durante un tiempo determinado t , desde un potencial inicial (E_i), hasta un potencial máximo (E_{max}), para luego realizar una inversión en el sentido de barrido de potencial hasta un potencial mínimo (E_{min}), repitiendo el proceso hasta alcanzar el potencial final (E_f), como se observa en la figura 5 [93].

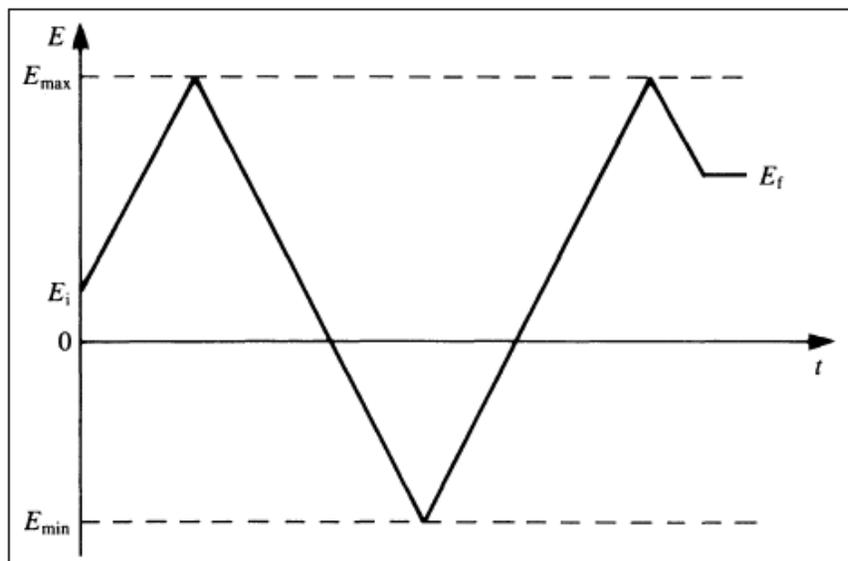


Figura 5. Variación de potencial aplicado en el tiempo en voltamperometría cíclica.

Las corrientes observadas, son el resultado de la contribución de una corriente faradaica, debida a la reacción ocurrida sobre el electrodo, y una contribución capacitiva, producida por los cambios de carga en la doble capa, generados por el barrido de potencial, esta contribución incrementa con el aumento de la velocidad de barrido de potencial.

Las mediciones de corrientes de pico por VC, son imprecisas, aún más en la inversión en el sentido de barrido de potencial, porque no se puede definir fácilmente la respuesta faradaica del proceso. Por esta razón no es un método para evaluaciones cuantitativas [94].

4.5 Voltamperometría de onda cuadrada

La voltamperometría de onda cuadrada (SWV), es una técnica diferencial de gran amplitud en la que una forma de onda compuesta de una onda cuadrada simétrica superpuesta a un potencial de escalera es aplicada al electrodo de trabajo. La corriente es medida dos veces durante cada ciclo de onda cuadrada, una vez en el final del pulso en el sentido de avance de potencial, y otra vez en el final del pulso en sentido inverso de potencial. La diferencia de corriente entre estas dos mediciones es graficada frente al potencial de escalera aplicado. La mayor ventaja de esta técnica electroquímica es la velocidad, ya que la velocidad de barrido efectiva está dada en frecuencia ΔE_s , además de su excelente sensibilidad, permite obtener muy bajos límites de detección [95].

4.6 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica

La Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS), es una técnica electroquímica que se fundamenta en el barrido de un intervalo de frecuencias, en donde se aplica una señal sinusoidal de un potencial o corriente a una

determinada frecuencia y este valor medido en ese punto es traducido en impedancia (Z_ω), luego, el proceso se repite para cada frecuencia del intervalo de barrido, obteniendo un espectro de impedancias.

$$Z_\omega = E_\omega / I_\omega$$

La impedancia está definida como el cociente entre el potencial (E_ω) y la corriente (I_ω), ambos dependientes de la frecuencia. Según la ley de Ohm, este cociente en un circuito eléctrico se relaciona directamente con la resistencia (R) del sistema, por lo tanto, la resistencia es equivalente a la impedancia a un límite de frecuencia cero [96].

Los espectros de impedancia electroquímica presentan diferentes contribuciones como la resistencia de la disolución (R_s), la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}), capacitancia (C) e inductancias (L) principalmente, estos parámetros son utilizados para el análisis y ajuste de datos mediante la modelación de circuitos equivalentes, utilizando los diagramas de Bode y de Nyquist, respectivamente.

2. Hipótesis de trabajo

Los antecedentes presentados indican que la generación de un inmunosensor electroquímico altamente sensibles, capaz de cuantificar de manera confiable biomarcadores de cáncer es de gran relevancia, ya que permitirán una disminución de diagnósticos errados y en etapa temprana. Además, la presencia de grupos funcionales disponibles en la estructura del transductor generará más afinidad con el bioreceptor específico (anticuerpo) al biomarcador de cáncer. En base a lo anterior se proponen las siguientes hipótesis:

La modificación electroquímica de superficies electródicas con polímeros conductores, poliindoles y polihidroxifenilos, nanoestructurados proporcionará una nueva plataforma para obtener un biosensor electroquímico.

La presencia de grupos funcionales carboxílicos libres en la estructura de estos polímeros conductores permitirá una interacción directa con biomoléculas de interés.

El electrodo modificado con polímeros conductores se unirá de manera covalente a la biomolécula, en este caso un anticuerpo, dándole gran estabilidad, lo cual permitirá obtener un buen transductor electroquímico para aplicaciones de inmunoensayos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Desarrollar un inmunosensor electroquímico, basado en polímeros conductores nanoestructurados, que presentarán grupos carboxílicos disponibles que favorezcan la bioconjugación con los anticuerpos, obteniendo un sistema ordenado que permita y favorezca la detección y cuantificación de un biomarcador específico de cáncer.

3.2 Objetivos específicos

Modificar y optimizar condiciones de electropolimerización de polímeros conductores sobre superficies electródicas.

Caracterizar morfológica y electroquímicamente las superficies electródicas modificadas.

Determinar las condiciones y parámetros experimentales para inmovilizar sobre los electrodos modificados un anticuerpo específico.

Optimizar parámetros analíticos utilizando diferentes técnicas electroquímicas como voltamperometría de onda cuadrada y espectroscopía de impedancia electroquímica.

Capítulo II. Parte Experimental

2.1 Reactivos

Los reactivos fueron utilizados sin ningún tratamiento previo. Todos de grado analítico. Ácido 3-hidroxifeliacético (3-HPA), ácido 3-hidroxifeliacético (4-HPA), ácido 6-indolcarboxílico (6-ICA), ácido 5-indolcarboxílico (5-ICA), ácido 4-aminofenilborónico (APBA), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxisulfosuccinimida de sodio (NHS), perclorato de litio (LiClO_4), albumina de suero bovino (BSA), suero humano y otros reactivos fueron proporcionados por Sigma-Aldrich. Disolución tampón Britton-Robinson (B-R) se obtuvo mezclando ácido acético (HAc) $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido fosfórico (Merck) $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y ácido bórico (Merck) $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Disolución tampón de ácido acético-acetato de sodio ($\text{HAc}\text{-Ac}^-$) pH 5,5 con acetato de sodio (NaAc, Sigma-Aldrich) $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, y HAc (Merck) $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Disolución PBS (*phosphate buffer saline*) pH 7,4, fue preparada con cloruro de sodio (NaCl, Merck) $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, cloruro de potasio (KCl, Merck) $2,6\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, fosfato de hidrógeno de potasio (K_2HPO_4 , Merck) $0,04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y fosfato de dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4 , Merck) $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Acetonitrilo (ACN) grado HPLC fue proporcionado por PanReac & Applichem.

Proteasome 20S α (human) monoclonal antibody (HP103) (mAb) y *Proteasome 20S (Human) purified* (P20S) fueron proporcionados por ENZO life sciences. Ambas disoluciones stock de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de mAb y $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de P20S fueron preparadas en PBS 7,4 y almacenados a -20°C .

Monoclonal Anti-KLK3 antibody produce in mouse y el *Prostate Specific Antigen from human semen* (PSA), fueron proporcionados por Sigma-Aldrich. La disolución stock de Anti-KLK3 fue preparada en PBS 7,4 y la disolución stock de PSA fue preparada en buffer HAc-Ac⁻ a pH 5,5, ambas disoluciones fueron almacenadas a -20°C .

Todas las disoluciones fueron preparadas con agua grado Milli-Q ($18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

2.2 Mediciones electroquímicas

Las caracterizaciones electroquímicas de cada una de las etapas de las modificaciones del inmunosensor, fueron realizadas por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de onda cuadrada (SWV), utilizando un potenciostato BioLogic VSP-300, en una celda convencional de un compartimiento y tres electrodos, carbón vítreo (GC) o electrodo de óxido de estaño dopado con flúor (FTO), como electrodos de trabajo, además de Ag/AgCl ($1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$) y un alambre de Pt, como referencia y contraelectrodo, respectivamente.

Las técnicas voltamperométricas CV y SWV, fueron realizadas en disolución buffer HAc-Ac⁻ $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, entre $-0,6$ and $+0,8 \text{ V}$ a una velocidad de barrido de $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, para CV. Mientras que las condiciones utilizadas para SWV fueron: *potential step* 5 mV , amplitud 25 mV y frecuencia 10 Hz , en un intervalo de potencial entre $-0,4 \text{ V}$ and $+0,8 \text{ V}$, inicial and final potencial, respectivamente. Las mediciones EIS, fueron llevadas a cabo realizando un barrido de frecuencias desde 100 kHz a 10 mHz y una amplitud de 10 mV , utilizando el potencial medio del par redox, E^0 , determinado como el promedio entre el potencial de pico anódico y catódico.

2.3 Electro-obtención de polímero conductor

El electrodo de carbón vítreo (GC), fue pulido con pasta de diamante de $0,5 \mu\text{m}$, enjuagado con agua Milli-Q y secado con N_2 . Luego, el electrodo fue ciclado por CV en una disolución $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de 6-ICA en disolución de $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ entre $0,0$ and $+1,1 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl ($1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$) a una velocidad

de $80 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ durante 30 ciclos de barrido de potencial. Finalmente, se obtuvo una respuesta voltamperométrica estable del electrodo 6-PICA/GCE en disolución buffer HAc-Ac⁻ $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 5,5).

2.4 Caracterizaciones morfológicas

Las caracterizaciones morfológicas, fueron realizada por microscopía SEM, utilizando un microscopio *Quanta Feg250 scanning electron microscope* (SEM), perteneciente al Centro de Investigación en Nanotecnología y Materiales Avanzados, CIEN-UC. Mientras que los análisis por espectroscopia ATR-IR fueron realizados utilizando un Espectrómetro FT-IR-ATR *Thermo Nicolet iS10*.

2.5 Inmovilización APBA

Para la inmovilización del ácido 4-aminofenilborónico (APBA), sobre las superficies modificadas de los electrodos con polímeros conductores nanoestructurados, 6-PICA/GC, el procedimiento fue el siguiente. En primer lugar, se realizó la activación de los grupos carboxílicos, -COOH, de 6-PICA, usando una disolución de EDC/NHS $20\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Luego, las superficies de 6-PICA/GC fueron funcionalizadas con APBA, sumergiéndolos en una disolución $50\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en buffer HAc-Ac⁻ pH 5,5 a temperatura ambiente, con agitación constante.

2.6 Inmunosensor para la detección de IgG

Para la inmovilización de inmunoglobulina G (IgG), se preparó la disolución de anticuerpo *Anti-Human IgG* (Ab-IgG), cuya concentración comercial es de $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, de los cuales se tomaron $50 \mu\text{L}$ y se llevó a 1 mL en KCl $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, obteniendo una concentración final de incubación de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ del

anticuerpo Ab-IgG, se incubó a 4°C de temperatura durante 10 horas. Posteriormente, se realizaron incubaciones consecutivas de 50 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ del antígeno IgG, incubados durante 2 horas cada una, a 20°C en agitación constante. Finalmente se realizaron las caracterizaciones electroquímicas correspondientes.

2.7 Inmunosensor para la detección de P20S

Para la detección de P20S, en primer lugar, se inmovilizó el anticuerpo correspondiente. El electrodo APBA/6-PICA/GC, fue incubado en 50 μL de una disolución de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *Proteasome 20S α subunit (human) monoclonal antibody (HP103)*, mAb, a 20°C de temperatura, con agitación constante durante 20 horas.

Posteriormente, a partir de la disolución stock, se preparó una disolución de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, en HAc-Ac⁻ pH 5,5. Esta disolución fue utilizada para preparar distintas concentraciones de P20S. El electrodo mAb/APBA/6-PICA/GC, fue incubado en 50 μL de las disoluciones a concentración deseada de P20S durante 2 horas a 20°C, bajo agitación constante. Posteriormente, los electrodos modificados fueron enjuagados y caracterizados electroquímicamente.

2.8 Análisis de P20S en muestras de suero

Las muestras preparadas en suero humano fueron almacenadas a -20°C. Se prepararon muestras de 120 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentración de P20S en suero reconstituido en buffer HAc-Ac⁻ pH 5,5, agitando hasta disolución total. Las determinaciones electroquímicas fueron realizadas utilizando SWV por método de curva de calibración. En el caso de la adición de estándar, a las

muestras de $120 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de P20S en suero humano, se le adicionó 5 adiciones de estándar de $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ cada una, sobre el mismo electrodo.

2.9 Optimización de la incubación de ácido aminofenilborónico

La optimización de APBA, fue enfocada en el tiempo de incubación. El electrodo 6-PICA/GC fue incubado en $50,0 \mu\text{L}$ de disolución de APBA $50\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en buffer HAc-Ac⁻ pH 5,5 durante 2, 4, 6, 8 y 20 horas de inmersión. Luego, fue caracterizado electroquímicamente por CV y SWV.

2.10 Optimización de la incubación de Anti-KLK3

Para la detección de PSA, se inmovilizó el anticuerpo correspondiente sobre el electrodo APBA/6-PICA/GC. Se incubó en $50 \mu\text{L}$ de una disolución de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *Monoclonal Anti-KLK3 antibody produce in mouse*, Anti-KLK3.

La optimización de Anti-KLK3, fue enfocada en dos parámetros, tiempo y temperatura de incubación. En primer lugar, el electrodo APBA/6-PICA/GC fue incubado en $50,0 \mu\text{L}$ de disolución de Anti-KLK3 a una concentración de $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ en buffer HAc-Ac⁻ pH 5,5 durante 2, 4, 6, 8 y 20 horas de inmersión. Luego, en condiciones óptimas, el electrodo APBA/6-PICA/GC fue incubado en la misma concentración de disolución de Anti-KLK3, a 4, 20 y 36°C . Las caracterizaciones electroquímicas fueron realizadas por CV y SWV.

2.11 Optimización de la incubación de Antígeno prostático específico.

La optimización de PSA, fue enfocada en el tiempo de incubación. El electrodo Anti-KLK3/APBA/6-PICA/GC fue incubado en $50,0 \mu\text{L}$ de disolución de PSA $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ en buffer HAc-Ac⁻ pH 5,5 durante 1, 2, 3 y 48 horas de inmersión. Las caracterizaciones electroquímicas fueron realizadas por CV y SWV.

2.12 Inmunosensor para la detección de PSA.

La disolución stock de PSA fue diluida 50 veces y se preparó una disolución de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, en HAc-Ac⁻ pH 5,5. Esta disolución fue utilizada para preparar distintas concentraciones de PSA.

El electrodo Anti-KLK3/APBA/6-PICA/GC, obtenido en condiciones óptimas de tiempo y temperatura, fue incubado en 50 μL de las disoluciones a concentración deseada de PSA durante 1 hora a 20°C, bajo agitación constante. Posteriormente, los electrodos modificados fueron enjuagados y caracterizados electroquímicamente.

Capítulo III. Resultados y Discusión

3.1 Obtención electroquímica de polímeros conductores.

La obtención electroquímica de los distintos polímeros conductores fue realizada tanto de manera potenciodinámica, utilizando voltamperometría cíclica (VC), como potenciostática, utilizando técnicas de potencial fijo y aplicación de pulso diferencial, como se puede apreciar en las figuras a continuación. Estos procedimientos se realizaron en diferentes superficies electródicas: carbón vítreo (GC), vidrio conductor modificado con óxido de estaño dopado con Flúor (FTO) y un electrodo de sílice recubierto de oro (Au-Si).

En la figura 6, se muestran los perfiles voltamperométricos por CV, de 3-HPA en (A) HClO_4 y (B) ACN. Se puede observar un proceso anódico, el cual decrece conforme aumentan los ciclos de barrido de potencial ambos medios. Sin embargo, este comportamiento no se condice con lo descrito sobre la obtención de polímero conductor. Los polímeros basados en ácido hidroxifenilacéticos, no pudieron ser obtenidos en disolución de ácido perclórico 0,5 M, siguiendo la metodología reportada [47,97]. Con el fin de lograr los perfiles esperados respecto de la obtención de estos polímeros, se modificaron variables para la electro-obtención.

Además de intentar diferentes solventes y electrodos, también se amplió la ventana de potencial, hacia valores más positivos, con el fin de lograr la oxidación del monómero, pero no se observaron cambios en su comportamiento. Por otra parte, al comparar los perfiles voltamperométricos obtenido tanto en HClO_4 como en ACN, no es posible observar la aparición del segundo proceso redox, una oxido-reducción cuasi-reversible, a potenciales entre 0,35 y 0,55 V, reportado en literatura [47], como se muestra en la figura 6C, en donde la respuesta electroquímica muestra en el primer barrido de potencial, la oxidación del monómero dando origen aun pico de corriente

anódico completamente irreversible a un potencial de 1,03 V, y que posteriormente decrece de forma continua en función del paso de los ciclos de barrido de potencial, y que da paso a la formación de un segundo proceso redox, el cual aumenta su magnitud en corriente, tanto del proceso anódico como catódico conforme al avance en los ciclos de barrido de potencial.

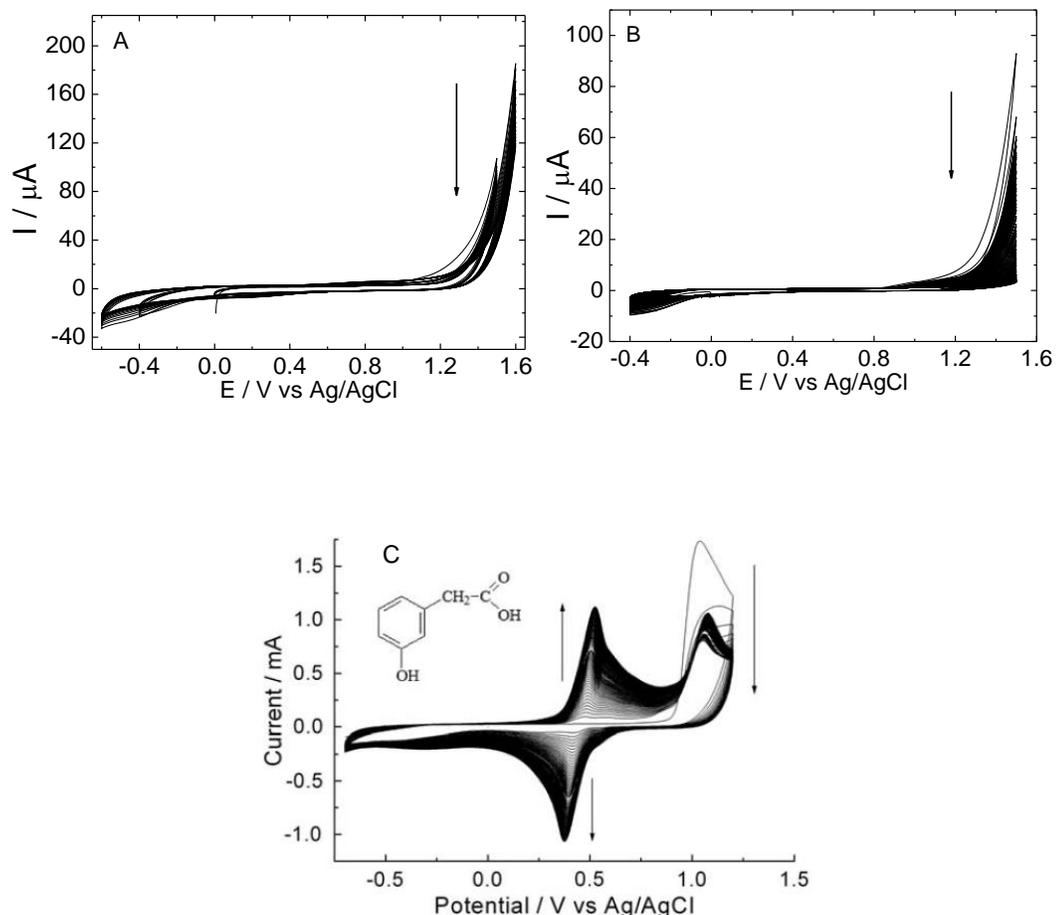


Figura 6. Perfiles voltamperométricos por CV de 3-HPA en disolución: A) HClO_4 0,5M, B) $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ 0,1 M, frente a C) Referencia bibliográfica [47].

Un comportamiento análogo al observado se obtuvo para la obtención electroquímica del polímero a base del monómero 4-HPA. Por esta razón, se decidió descartar a ambos y dar paso a la obtención de los polímeros conductores a partir de los monómeros de ácido indolacético.

3.2 Obtención de poliindoles

En la figura 7, se puede observar la obtención electroquímica por VC de dos polímeros conductores, 6-PICA y 5-PICA, sobre electrodo de carbón vítreo, GC, en una ventana de potencial entre 0 y +1,1 V y 30 ciclos de barrido de potencial.

La figura 7A muestra los perfiles voltamperométricos durante la obtención electroquímica de 6-PICA, a partir de una disolución $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de 6-ICA en $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$. Durante el primer ciclo de barrido de potencial, en línea roja, ocurre la oxidación irreversible del monómero 6-ICA, comenzando en 1,0 V, dando paso a la formación de un *loop*, o cruzamiento cuando se invierte el sentido del barrido de potencial hacia potenciales negativos, esta corriente es característica de un proceso de nucleación 2D, seguido de un crecimiento 3D [98,99]. Luego, en los ciclos posteriores se observa un aumento constante de la respuesta en corriente en cada ciclo voltamperométrico, tanto en el proceso anódico como en el proceso catódico a medida que avanzan los ciclos de barrido de potencial, lo cual puede correlacionarse con el proceso *doping-undoping* del polímero. Este comportamiento indica la formación de una película conductora de color amarillo, sobre la superficie electrodica [52,54,56].

La figura 7B, muestra la electro-obtención de 5-PICA sobre GC en las mismas condiciones descritas para 6-PICA. Se puede apreciar que los perfiles voltamperométricos son similares, en este caso la oxidación del monómero 5-ICA comienza en un potencial cercano a los 0,95 V, presentando el mismo comportamiento de electropolimerización descrito para 6-PICA. Además, se aprecia el aumento de corrientes en los procesos anódicos y catódicos antes señalados, correspondientes al proceso *doping-undoping* del polímero. Finalmente, para el polímero 5-PICA el recubrimiento polimérico obtenido presenta una coloración verdosa.

El mismo comportamiento, se observa al polimerizar electroquímicamente estos monómeros sobre otras superficies como Au-Si y FTO, con la excepción que el sobrepotencial aplicado aumenta en la ventana de potencial para el electrodo FTO hasta 1.3 V. (Anexos 1 y 2).

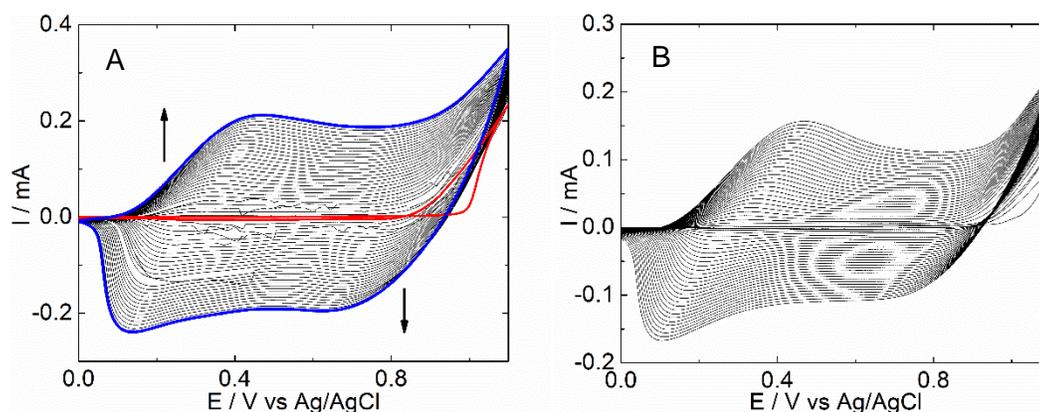


Figura 7. Electropolimerización de $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de 6-ICA (A) y 5-ICA (B) en $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ sobre GC entre 0 y +1,1 V y por voltamperometría cíclica, 30 ciclos a $80 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ de barrido de potencial.

3.3 Caracterización morfológica de las superficies electródicas.

Se realizó la caracterización morfológica mediante SEM para determinar si las morfologías del polímero 6-PICA son o no dependiente de la velocidad de barrido de potencial en la cual son obtenidos por VC. La figura 8, muestra las imágenes SEM de 6-PICA obtenido por VC durante 30 ciclos de barrido de potencial, sobre FTO a cuatro diferentes velocidades de barrido: 20 (Fig.A), 40 (Fig.B), 80 (Fig.C) y 100 (Fig.D) $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Se observa que independiente de la velocidad de barrido de potencial utilizada en la obtención electroquímica, se forman nanohilos que presentan diámetros entre los 40 y 90 nm.

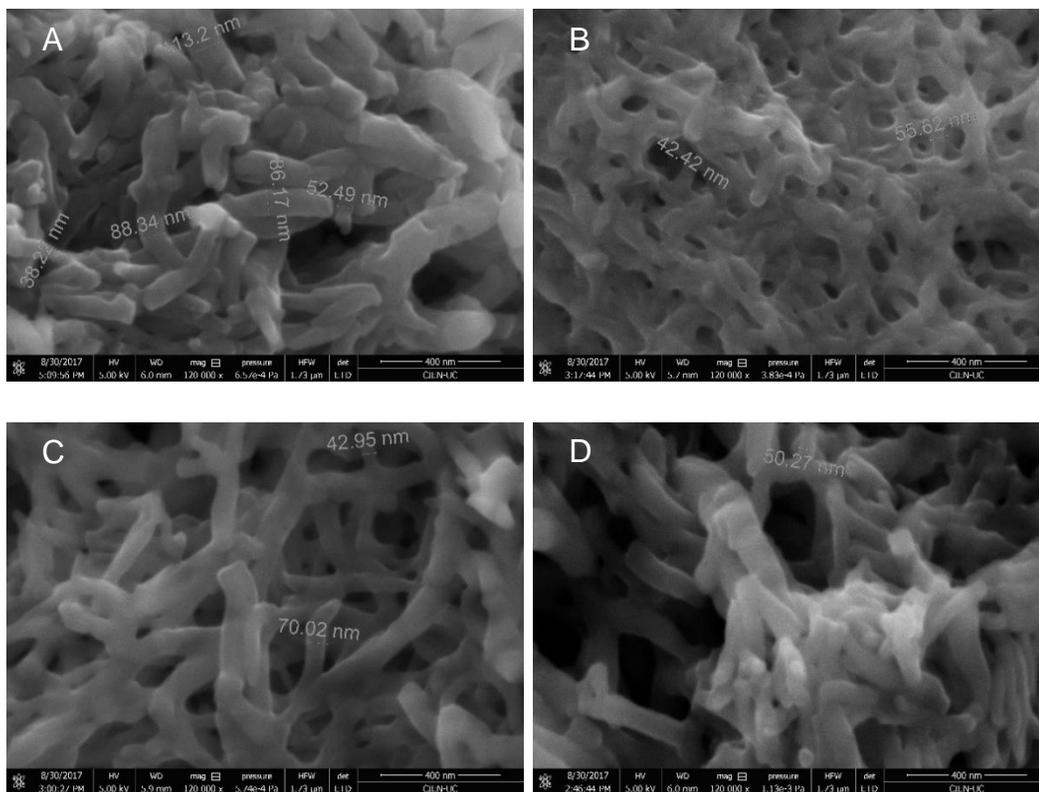


Figura 8. Imágenes SEM a una magnificación de 120.000, para 6-PICA/FTO, obtenido a diferentes velocidades de barrido de potencial, durante 30 ciclos por VC en $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ 0,1M. A) 20, B) 40, C) 80 y D) $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Sin embargo, la organización de las nanoestructuras en la superficie del FTO, se distribuye de manera diferente al variar la velocidad de barrido de potencial. La figura 9 (A;B;C;D) muestra las imágenes SEM para las cuatro velocidades de barrido de potencial de obtención de 6-PICA mostradas anteriormente, pero a una magnificación menor, mostrando una distribución del recubrimiento polimérico generado, en donde se observa que a $80 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, se logra una mayor homogeneidad de polímero sobre la superficie, por lo tanto, esta velocidad fue escogida como óptima para la obtención utilizando VC.

También se caracterizó por SEM la morfología del polímero 6-PICA obtenido por VC, en las condiciones ya especificadas, sobre otras superficies

electrónicas, como lo son GC, Au-Si y PEDOT/FTO. Se obtuvieron el mismo tipo de nanoestructuras que fueron observadas sobre FTO. Las figuras se adjuntan en el anexo 3.

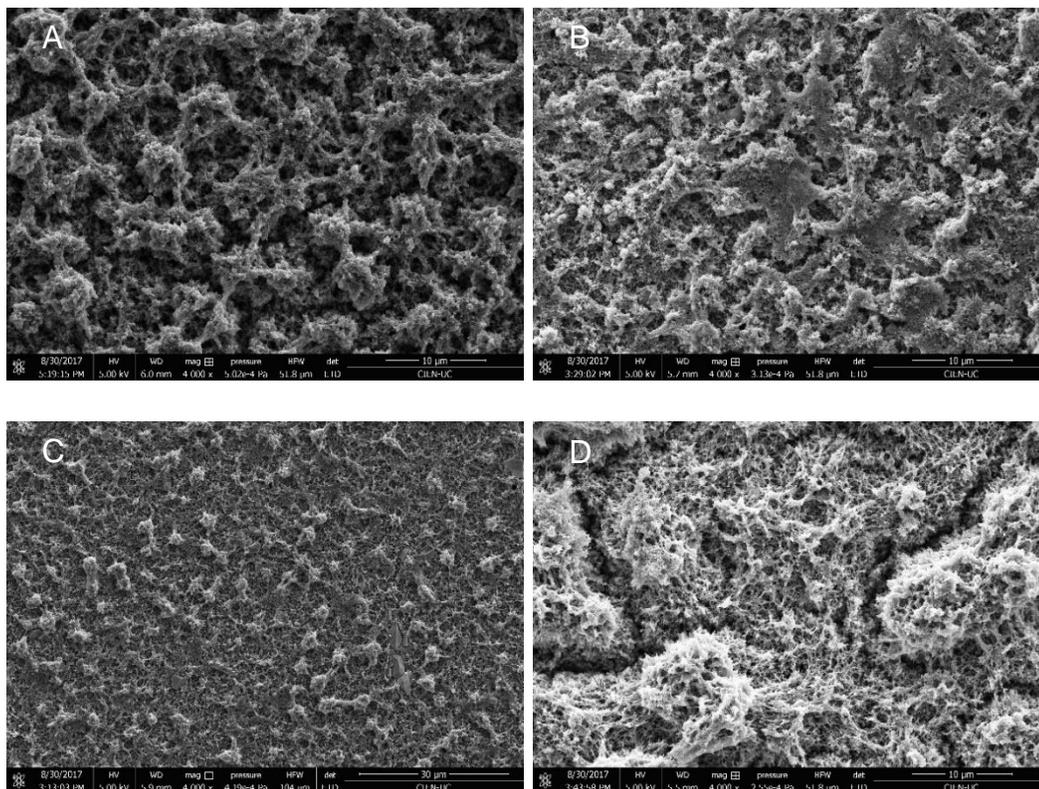


Figura 9. Imágenes SEM a una magnificación de 4.000, para 6-PICA/FTO, a diferentes velocidades de barrido de potencial de obtención de polímero, durante 30 ciclos por VC en $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ 0,1M. A) 20, B) 40, C) 80, D) 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Además del uso de VC para la obtención electroquímica de 6-PICA, también se utilizaron técnicas potencioestáticas, primero aplicando distintos valores de potencial fijo: 0,9, 0,95 y 1,0 V, durante 10 minutos; y segundo, el uso de dos pulsos de potencial aplicados durante 500 ciclos con diferentes tiempos, uno correspondiente a un potencial donde el monómero es oxidado (1,2 V) y un pulso a un potencial donde no ocurre ningún proceso de oxidación o reducción (0,2 V), durante 4 y 1 segundos, respectivamente. En el anexo 4 se muestra

las imágenes SEM para 6-PICA obtenido por técnicas potenciostáticas sobre FTO.

De estas imágenes se puede concluir que utilizar la técnica de potencial fijo permite controlar de mejor manera el tamaño de las nanoestructuras obtenidas. El tamaño de estas dependerá del control del potencial aplicado, sin embargo, respecto a la aplicación de dos pulsos diferenciados, muestra que la nanoestructuras presentan tamaños aleatorios, obteniendo diámetros ya sea por debajo de los 100 nm, como también por sobre este valor. Finalmente, es a través de métodos potenciodinámicos, donde se obtienen recubrimientos superficiales homogéneos con estructuras en dimensiones nanométricas.

Adicionalmente, se realizaron análisis laterales de los electrodos modificados con 6-PICA sobre FTO por microscopía SEM, estos polímeros fueron obtenidos por VC durante 30 y 50 ciclos de barrido de potencial. Estas imágenes permitieron determinar el grosor del depósito generado, siendo estos 4,54 μm (Fig.10A) y 7,89 μm (Fig.10B), respectivamente.

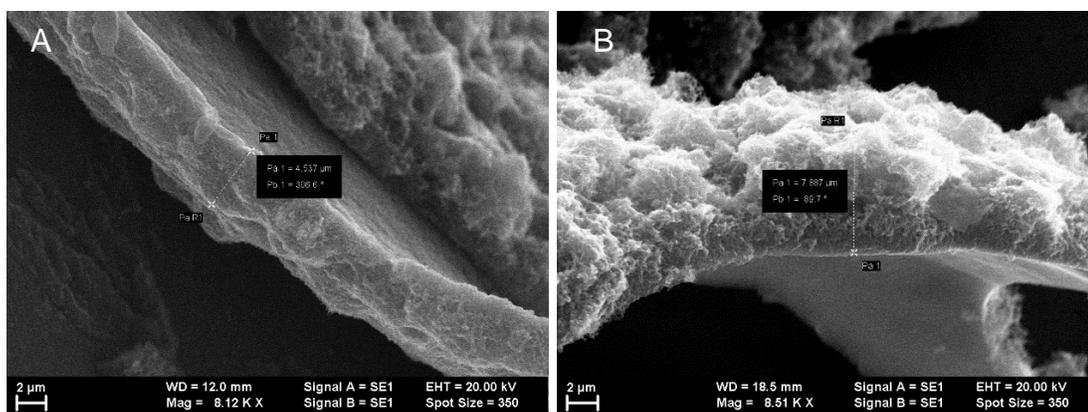


Figura 10. Imágenes SEM laterales de 6-PICA sobre FTO por VC, obtenidos durante: A) 30 y B) 50 ciclos a $80 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ de barrido de potencial, respectivamente, en $\text{LiClO}_4/\text{ACN } 0.1\text{M}$.

De manera análoga, se realizó la caracterización morfológica para la electro-obtención de 5-PICA por VC, en las mismas condiciones de obtención de 6-PICA, las cuales fueron 30 ciclos de barrido de potencial, a una velocidad de $80 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, sobre FTO y presentaron nanoestructuras con buen recubrimiento superficial (Fig.11). También se realizó la obtención por métodos potencioestáticos: aplicando un potencial fijo de 1,050 V y de 1,1 V; y por otra parte, con la aplicación de dos pulsos uno a potencial de oxidación del monómero a 1,3 V y otro a un potencial de 0,2 V, a dos diferentes tiempos de perturbación: 2 y 1 segundos; 4 y 1 segundos, respectivamente. Las imágenes SEM correspondientes a estas figuras se presentan en el anexo 5.

Nuevamente, a través de métodos potencioestáticos, se observa que, a un potencial fijo, los tamaños de las estructuras obtenidas son dependientes del potencial aplicado. Mientras que la perturbación realizada a dos potenciales por periodos variables de tiempo genera estructuras de dimensiones aleatorias, al igual que para 6-PICA. Los tamaños de las estructuras obtenidas, al exponer los pulsos por periodos más prologados de tiempo, son mayores, sin embargo, ambas técnicas muestran tendencia a la obtención de estructuras con tamaños superiores a los 100 nm.

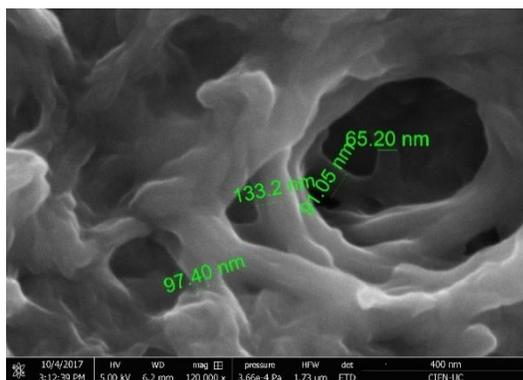


Figura 11. Imagen SEM de 5-PICA sobre FTO por CV 30 ciclos a $80 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, obtenidos en $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ 0.1M.

Luego de realizar las caracterizaciones morfológicas de los poliindoles, utilizando microscopía SEM, se procedió a la siguiente etapa en la construcción del dispositivo, correspondiente a la inmovilización de APBA sobre la superficie electródica modificada con 6-PICA. Esta etapa del desarrollo del inmunosensor, será una pieza fundamental para lograr una posterior inmovilización de los anticuerpos de manera orientada, favoreciendo la interacción antígeno-anticuerpo. Se realizó la caracterización de 6-PICA y APBA/6-PICA, ambos sobre FTO, a través de espectroscopia ATR-IR y espectroscopía RAMAN.

Utilizando ATR-IR, se obtuvieron los siguientes espectros del monomero 6-ICA y su correspondiente polímero conductor (6-PICA). La figura 12A, muestra los espectros del monómero 6-ICA (en azul) frente al polímero 6-PICA, luego de un tratamiento de secado de las muestras. La figura 12B, muestra los espectros obtenidos para 6-PICA y APBA/6-PICA sin ser sometidos al tratamiento de secado. Fue posible observar algunas diferencias entre los espectros obtenidos del monómero y el polímero y sus correspondientes desplazamientos. La banda intensa de 6-ICA a 1660 cm^{-1} relacionada con la vibración *stretching* del grupo C=O, se desplazó a 1717 cm^{-1} en el polímero. La banda a 1302 cm^{-1} en 6-ICA corresponde a la vibración del enlace C-O, el cual se desplazó a 1220 cm^{-1} en el espectro de 6-PICA. La banda a 1103 cm^{-1} para 6-PICA se le atribuye al modo vibracional del dopante ClO_4 en el polímero. La banda intensa a 3367 cm^{-1} en 6-ICA y la banda ancha entre 3473 y 3315 cm^{-1} con la banda cerca de 1513 cm^{-1} , se le atribuyen a la elongación y deformación vibracional del enlace N-H, respectivamente.

Las mismas bandas fueron posibles de asignar posteriormente para la inmovilización de APBA sobre 6-PICA. Junto a cada espectro se muestra la estructura química del compuesto analizado y la estructura polimérica sugerida para 6-PICA [94], además de su posterior interacción con APBA.

La tabla 1, resume las vibraciones asignadas y sus correspondientes desplazamientos, para cada sistema. Estas medidas fueron llevadas a cabo utilizando un Espectrómetro FT-IR-ATR *Thermo Nicolet iS10*.

Además, cabe destacar ha sido reportado en estudios previos que la electro-polimerización de distintos indoles, procede entre el carbono C2 y el carbono C3 del anillo pirrólico [53,98,101-103]. Adicionalmente, Nie et al. [72] estudiaron la estructura de 6-PICA a través de $^1\text{H-RMN}$, indicando que el grupo $-\text{COOH}$ está presente en la estructura del polímero y no se ve afectado durante la electro-polimerización.

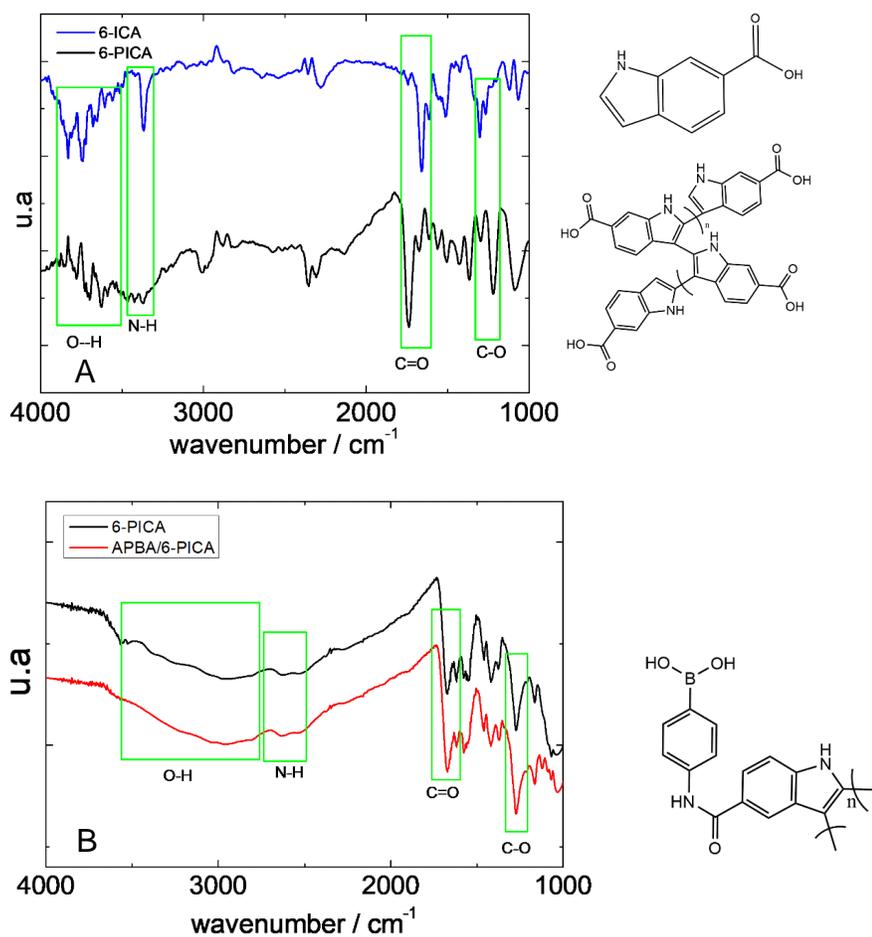


Figura 12. Espectroscopía ATR-IR para: A) 6-ICA (azul) frente a 6-PICA/FTO (negro). B) 6-PICA/FTO (negro) frente a APBA/6-PICA/FTO (rojo), respectivamente.

Tabla 1. Resumen de asignación de las vibraciones reportadas por ATR-IR. (ν en cm^{-1})

Vibración	6-ICA	6-PICA/FTO	6-PICA/FTO (seco)	APBA/6-PICA/FTO
C-O	1302	1220	1275	1273
C=O	1660	1737	1676	1671
N-H	3371	3384	2617	2623
O-H	3700	3707	2974	2962

Finalmente, por medio de espectroscopía RAMAN, se obtuvo los siguientes espectros para 6-PICA/FTO y APBA/6-PICA/FTO. En la figura 13, es posible observar en el espectro la banda correspondiente a C=O, además de una zona de anillos aromáticos, y otra correspondiente al anillo aromático que presenta heteroátomos, como lo es el caso del polímero 6-PICA. Estos resultados fueron obtenidos utilizando un espectrómetro RAMAN Witec Alpha 300RA, excitando las muestras con un láser de 785 nm.

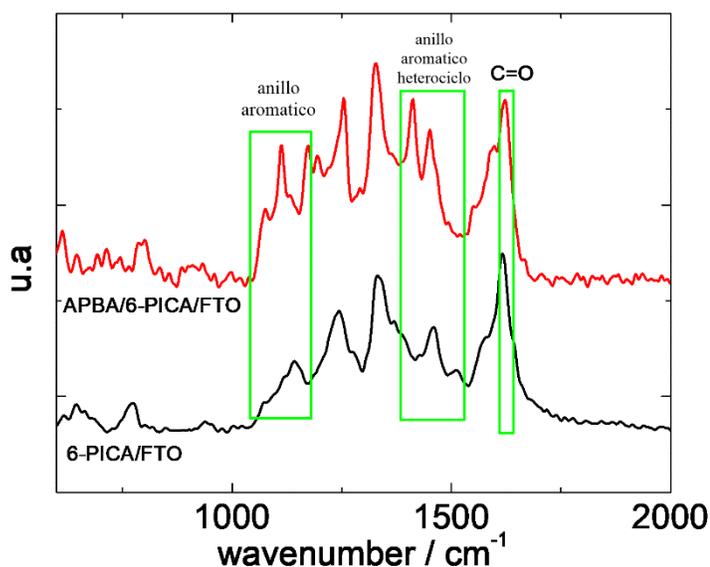


Figura 13. Espectroscopía RAMAN para 6-PICA/FTO y APBA/6-PICA/FTO.

3.4 Obtención del inmunosensor basado en 6-PICA en presencia del par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$

Se realizó una caracterización electroquímica de las etapas de modificación para la obtención de un inmunosensor basado en el polímero conductor 6-PICA. Para llevar a cabo esta caracterización se utilizó como electrodo de trabajo un electrodo de carbón vítreo (GC) modificado con 6-PICA, mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Este procedimiento se llevó a cabo en presencia del par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en una disolución de KCl 1M, realizando un seguimiento a la señal correspondiente al potencial medio de la respuesta del par redox, $E_{p/2}$ cercano a los 250 mV.

La figura 14, muestra a través de un diagrama de Nyquist que la magnitud de la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}), disminuye de manera considerable al modificar el electrodo GC con 6-PICA, lo cual concuerda con el comportamiento esperado al obtener un recubrimiento conductor sobre la superficie electródica. Mientras que una vez inmovilizado el APBA sobre el polímero, se aprecia un aumento en los valores de R_{ct} , comportamiento atribuido a la naturaleza no conductora del compuesto inmovilizado.

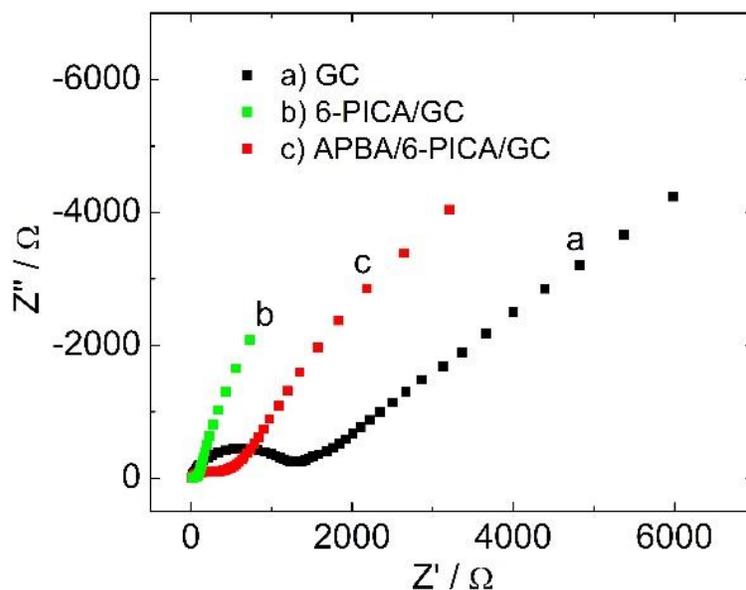


Figura 14. Diagrama de Nyquist en presencia del par redox $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en $\text{KCl } 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, entre $1 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^{-2} \text{ Hz}$ para: a) GC, b) 6-PICA/GC, c) APBA/6-PICA/GC.

Posteriormente, para dar paso a la obtención del inmunosensor, es necesario realizar la incubación de un anticuerpo que cumpla el rol de unidad de bioreconocimiento en el dispositivo, siendo este quien finalmente interactuará con el biomarcador y permitirá su detección.

Para este propósito, se utilizó anticuerpo de Inmunoglobulina G (Ab-IgG) con el fin de detectar inmunoglobulina G, (IgG), ya que es un anticuerpo comercial relativamente económico, Para realizar estos ensayos, se incubó el electrodo modificado APBA/6-PICA/GC, en una disolución de $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de anticuerpo, Ab-IgG, a 4°C durante 10 horas. Posteriormente, se realizaron incubaciones consecutivas del electrodo Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC en disoluciones de 50 y $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ del antígeno IgG, durante 2 horas cada una a 20°C . Las caracterizaciones electroquímicas de cada una de las etapas de las modificaciones del inmunosensor, fueron realizadas por espectroscopía de

impedancia electroquímica (EIS) en presencia del par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, al potencial medio del par redox, $E_{p/2} = 250 \text{ mV}$.

La figura 15, muestra la respuesta impedimétrica, por medio de diagramas de Nyquist en presencia de $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ del par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en $\text{KCl } 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Se observa claramente un aumento en la magnitud de la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) respecto al electrodo GC, 6-PICA/GC y APBA/6-PICA/GC (mostrados previamente en la figura 14). Estos incrementos en los valores de R_{ct} , se relacionan con la naturaleza no conductora del ácido 4-aminofenilborónico (APBA), del anticuerpo y del antígeno. Estos valores fueron obtenidos, mediante la modelación de un circuito equivalente de Randles, y se muestran en la tabla 2.

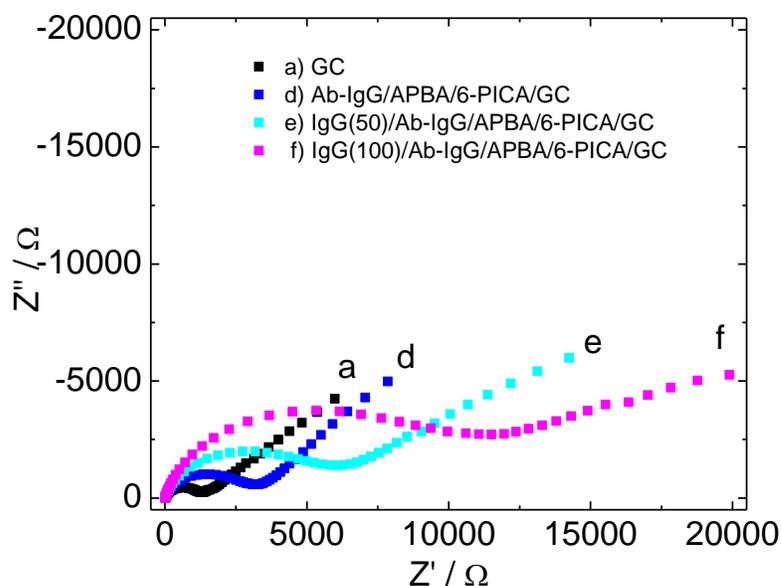


Figura 15. Diagrama de Nyquist en presencia del par redox $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en $\text{KCl } 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, entre $1 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^{-2} \text{ Hz}$ para: a) GC, b) 6-PICA/GC, c) APBA/6-PICA/GC, d) Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC, e) IgG(50)/Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC, f) IgG(100)/Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC. Incubado en 50 y $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de IgG, respectivamente.

Tabla 2. Valores obtenidos para los parámetros de resistencia R_s y R_{ct} del inmunosensor electroquímico basado en 6-PICA para P20S.

	R_s / Ω	R_{ct} / Ω
GC	10,07	1137
6-PICA/GC	19,58	57,85
APBA/6-PICA/GC	13,57	383,87
Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC	13,01	2705
IgG(50)/Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC	9,89	4214
IgG(100)/Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC	12,11	7014

De manera complementaria, se realizó la caracterización electroquímica utilizando SWV en presencia de $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ del par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en KCl $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. La figura 16 muestra la respuesta del inmunosensor en ausencia y presencia de antígeno. Se observa una disminución de la corriente de pico anódica cuando se incubó a una concentración de $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ del IgG. Con esto se puede corroborar que se logró detectar el aumento de concentración de antígeno IgG incubado, entre 50 y $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente, utilizando la plataforma basada en el polímero conductor 6-PICA, ya sea por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) o por voltamperometría de onda cuadrada (SWV). Sin embargo, no se logró realizar una curva de calibrado por estos métodos, debido posiblemente a la saturación de los sitios de unión específicos en el inmunosensor, al aumentar la concentración de incubación de antígeno.

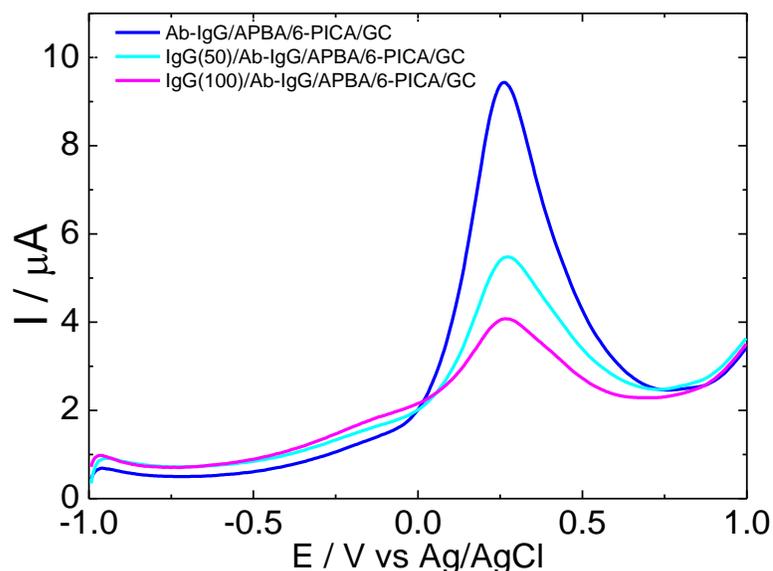


Figura 16. Perfil voltamperométricos por SWV en presencia del par redox $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en $\text{KCl } 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, para: Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC, IgG(50)/Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC, IgG(100)/Ab-IgG/APBA/6-PICA/GC, entre -1.0 y 1.0 V.

Se realizó la detección del Proteasoma 20S, P20S, utilizando el inmunosensor basado en 6-PICA, bajo las mismas condiciones que se realizó para IgG. En primer lugar, se inmovilizó ácido 4-aminofenilborónico (APBA) sobre el electrodo previamente modificado con polímero conductor 6-PICA, a temperatura ambiente durante una hora. Luego, se incubó $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ el anticuerpo *Proteasoma 20S α subunit (mAb)*, durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, las adiciones realizadas para la detección de P20S fueron de $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, de manera consecutivas sobre el mismo electrodo, realizando un total de 3 incubaciones de concentraciones: 100, 200 y $300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente, durante una hora y a temperatura ambiente. Las caracterizaciones electroquímicas fueron realizadas a través de espectroscopía de impedancia electroquímica en presencia de $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ del par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, en $\text{KCl } 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

En la figura 17, se observa el diagrama de Nyquist en el cual se muestran las respuestas impedimétricas del inmunosensor, en donde se repite el comportamiento antes observado en la detección de IgG. Los valores de R_{ct} , aumentan luego de la inmovilización de APBA y de mAb. Posteriormente, presentan un incremento continuo conforme aumenta las concentraciones de incubación de P20S.

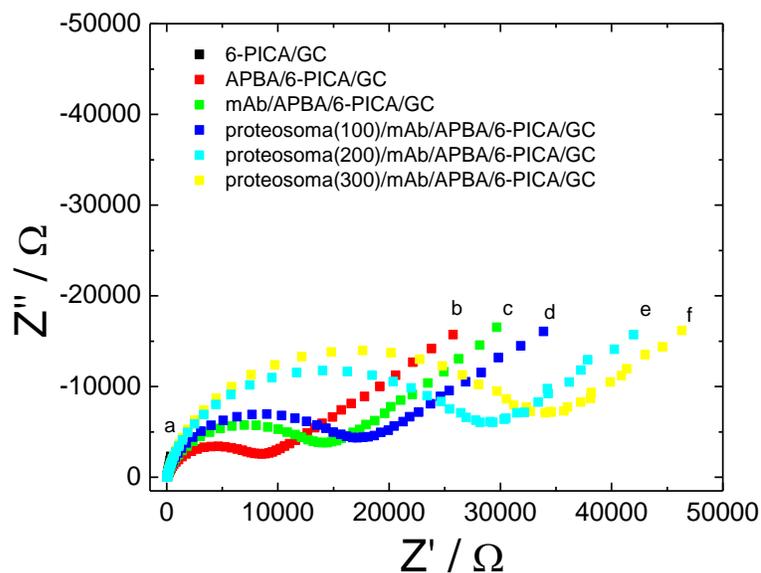
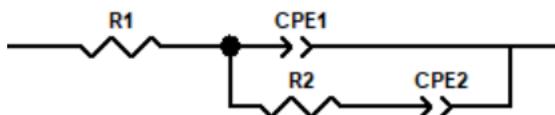


Figura 17. Diagrama de Nyquist en presencia del par redox $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ en $KCl 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, entre $1 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^{-2} \text{ Hz}$ para: a) 6-PICA/GC, b) APBA/6-PICA/GC, c) mAb/APBA/6-PICA/GC, d) 100/mAb/APBA/6-PICA/GC, e) 200/mAb/APBA/6-PICA/GC, f) 300/mAb/APBA/6-PICA/GC. Incubado en 100, 200 y 300 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ de P20S, respectivamente.

Los resultados de las impedancias fueron modelados utilizando el circuito equivalente de Randles para realizar el ajuste de datos, con el fin de obtener los valores de resistencia a la transferencia de carga de las distintas etapas del inmunosensor.



La tabla 3, muestra un resumen de los parámetros obtenidos del circuito equivalente con el ajuste de datos. Se puede observar un aumento del valor de la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}), consistente con la naturaleza no conductora de las inmovilizaciones realizadas sobre la superficie electródica, mientras que la resistencia de la disolución (R_s) no presenta cambios significativos.

Tabla 3. Valores obtenidos para los parámetros de resistencia R_s y R_{ct} del inmunosensor electroquímico basado en 6-PICA para P20S.

	R_s / Ω	R_{ct} / Ω
<i>mAb</i>	47,38	13132
$100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	46,21	15447
$200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	51,39	26764
$300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	54,05	31759

Sin embargo, al realizar un barrido de potencial luego de las inmovilizaciones, incubaciones y posteriores caracterizaciones electroquímicas, ocurrió un desprendimiento del material depositado sobre los electrodos, demostrando su poca estabilidad en el tiempo, en la disolución de KCl.

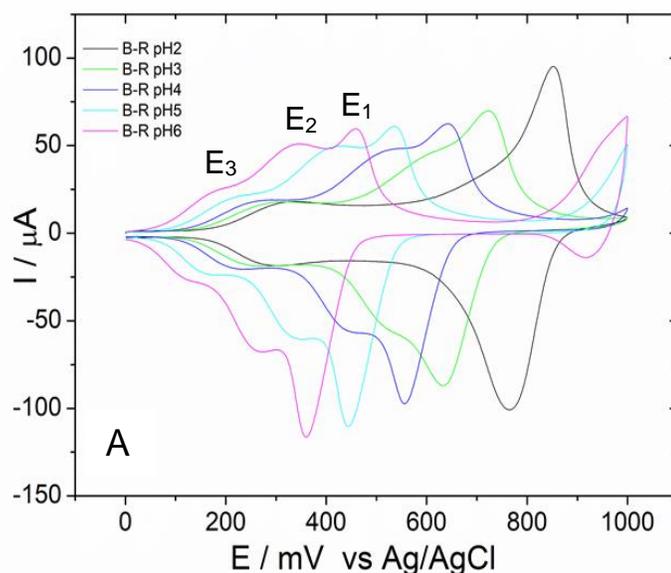
Por lo tanto, se procedió a realizar un tratamiento previo a las superficies electródicas con el fin de generar un “anclaje” entre el polímero 6-PICA y el sustrato, ya sea este GC o FTO, por ejemplo, utilizando películas de polietilendioxifenol (PEDOT) obtenidas de manera electroquímica por VC durante 5 y 10 ciclos de barrido de potencial [56]. Si bien el polímero 6-PICA crece sobre una superficie modificada con PEDOT, esto no evitó que ocurriese el desprendimiento de la película polimérica al realizar un barrido de potencial. También se intentó mejorar esta adherencia depositando una disolución de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *mussel adhesive protein*, inclusive se sometió a los electrodos

de FTO a un tratamiento de 1 hora de resonancia de plasmón superficial en presencia de 50% de oxígeno, con el fin de funcionalizar las superficies electrónicas activándolas de forma previa a la polimerización de 6-PICA, todas estas pruebas fueron realizadas sin éxito.

3.3 Estudio de pH para 6-PICA

Se realizó un estudio del efecto del pH en el proceso redox que presenta el polímero conductor. Fue llevado a cabo en una disolución tampón Britton-Robinson, (B-R), en un intervalo de pH entre 2,0 y 10,0. La figura 18A, muestra los perfiles voltamperométricos estables entre pH 2,0 y 6,0. Mientras que a pH superiores a 6,0, ocurre desprendimiento parcial o total del recubrimiento de 6-PICA. Por otra parte, a pH 2,0, se observan dos procesos redox (E_1^0 y E_3^0) y entre pH 3,0 y 6,0, se observa otro proceso redox bien definido (E_2^0). Este proceso redox, se desplaza a valores de potenciales más negativos a medida que se aumenta el pH. El potencial redox E_0 , es determinado como el promedio de los potenciales de pico anódico y catódico. La figura 18B, muestra un gráfico de los potenciales redox E_1^0 , E_2^0 y E_3^0 , frente al pH, obteniéndose pendientes de -0,098, -0,085 y -0,041 V·pH⁻¹, respectivamente. Los valores de pendientes y su valor son difíciles de explicar y no pueden ser descritos con una ecuación simple de Nerst. [98][99]. Un estudio basado en las propiedades electroquímicas del poli-indol-5-carboxílico (5-PICA) fue reportado por Bieguñki et al [106], en el cual describen que dos procesos redox ocurren en disolución ácida y a pH > 4 solo un proceso redox es observado. También obtienen a partir de los gráficos de potencial de pico E_p^0 , frente a la variación de pH pendientes de -0,115 y -0,111 V·pH⁻¹, respectivamente. De acuerdo con estos valores reportados concluyen que posiblemente el proceso de óxido-reducción del polímero involucra la transferencia de dos protones y un electrón [106].

Esto corrobora que el pH y electrolito soporte pueden tener un impacto en la respuesta estable de los poliindoles, lo cual podría afectar su respuesta electroactiva. Con este fin, se decidió trabajar a un valor de pH en el cuál se obtenga la respuesta redox más estable y con mayor intensidad de corriente, E_1^0 , y con menor sobrepotencial aplicado para evitar reacciones competitivas de oxidación de moléculas presentes en matrices biológicas, tales como ácido ascórbico, ácido úrico, tioles, neurotransmisores, etc. Por lo tanto, luego de ser obtenido el polímero 6-PICA, todos los estudios posteriores fueron realizados en una disolución amortiguadora ácido acético – acetato de sodio (HAc/Ac⁻) a pH 5,5. Logrando en esta disolución estabilizar los polímeros por CV, de manera tal que no se generara un desprendimiento del material depositado.



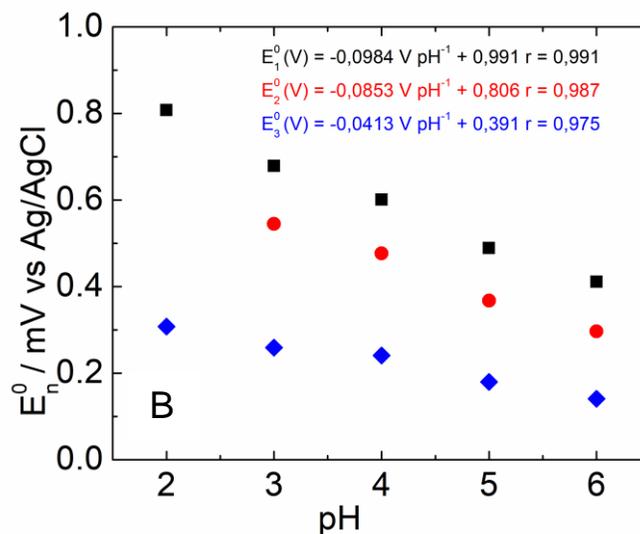


Figura 18. A) Perfiles voltamperométricos a pH entre 2,0 y 6,0 de 6-PICA en disolución B-R $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. B) Gráfico de potencial formal E_1^0 , E_2^0 y E_3^0 , en función del pH.

3.4 Estudio de velocidad de barrido de potencial de 6-PICA

El polímero conductor 6-PICA obtenido electroquímicamente sobre el electrodo GC, presenta en disolución $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de tampón acético-acetato pH 5,5, un par de procesos redox cuasi-reversibles bien definidos a 0,29 V y 0,46 V en su perfil voltamétrico en una ventana de potencial entre -0,8 y 0,8 V, como se puede observar en la figura 19. El gráfico inserto, muestra en línea roja la respuesta del electrodo de GC sin modificar, el cual solo muestra una respuesta capacitiva.

Estas respuestas faradaicas son asignadas a procesos redox intrínsecos del polímero conductor 6-PICA. En general, el uso de sondas redox presentes en disolución permiten caracterizar cambios superficiales por espectroscopía de impedancia electroquímica, pero pueden ser interferentes en el proceso de detección de algún analito, por lo tanto, evitar el uso de una sonda redox es una ventaja. En este estudio se propone utilizar la respuesta redox del 6-PICA

por presentar una respuesta electroquímica estable y para evitar usar la cupla $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como una sonda redox.

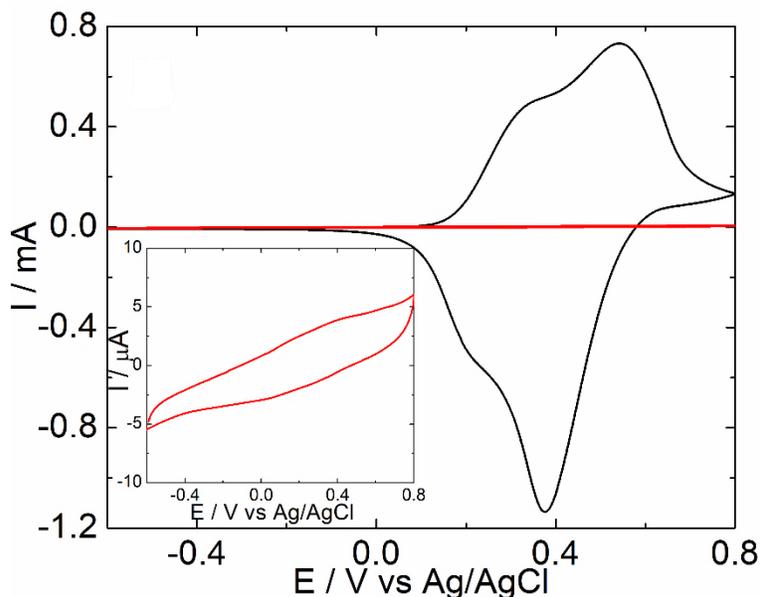


Figura 19. Perfil voltamperométrico por VC de 6-PICA (línea negra) frente a GC (inserto en línea roja), en disolución tampón $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ HAc}/\text{Ac}^-$ pH 5,5, a $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, entre -0,8 y 0,8 V.

Posteriormente, se realizó un estudio de velocidad de barrido de potencial en disolución tampón HAc/Ac^- a pH 5,5, entre $0,02$ y $0,2 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, como se puede apreciar en la figura 20A. Ambos procesos, anódico y catódico, tienen un comportamiento directamente proporcional a la velocidad de barrido, como lo muestra el gráfico de la figura 20B. Se puede observar que los perfiles obtenidos por VC, muestran un incremento en el pico de corriente cuando aumenta la velocidad de barrido de potencial, lo cual sugiere que este proceso está controlado por fenómenos de superficie.

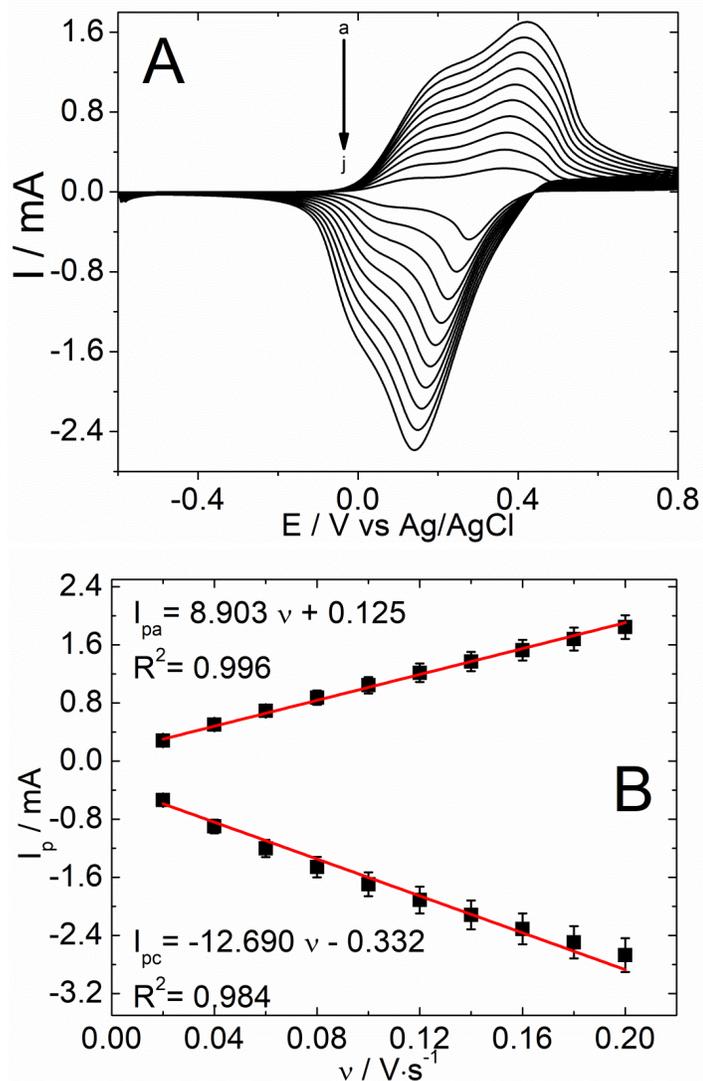


Figura 20. (A) Perfiles voltamperométricos por VC del polímero 6-PICA en disolución HAc–Ac⁻ 1 mol·L⁻¹ (pH 5,5) a diferentes velocidades de barrido de potencial: (a) 0,2, (b) 0,18, (c) 0,16, (d) 0,14, (e) 0,12, (f) 0,1, (g) 0,08, (h) 0,06, (i) 0,04 y (j) 0,02. (B) Relación lineal del pico de corriente anódico (I_{pa}) y catódico (I_{pc}) frente a las distintas velocidades de barrido.

El recubrimiento superficial aparente fue estimado usando la siguiente ecuación [104,107]:

$$I_p = n^2 F^2 \nu A \Gamma / 4RT$$

Donde, I_p corresponde a la corriente de pico del 6-PICA; n es el número de electrones transferidos; F la constante de Faraday ($96485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$); v es la velocidad de barrido ($\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$); A el área geométrica del electrodo GC ($0,0125 \text{ cm}^2$); R es la constante de los gases ($8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) y T es la temperatura ($298,15 \text{ K}$). Asumiendo un proceso electrónico de 1 electrón en este caso, se calculó el recubrimiento Γ obteniéndose un valor de $7,59\cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ para 6-PICA.

3.5 Obtención de un inmunosensor para la detección de P20S

Para la detección de P20S, se utilizó el electrodo modificado con polímero conductor 6-PICA/GC. Posteriormente, se realizó la activación de los grupos carboxílicos, utilizando una disolución $20\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de EDC/NHS en tampón HAc/Ac⁻ pH 5,5, para asegurar la inmovilización de APBA a través de la formación de un enlace tipo amida. Dicha inmovilización también fue realizada mediante incubación, esta vez en una disolución de APBA a una concentración de $50\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, en la misma disolución tampón.

Luego, la disolución comercial ($100 \mu\text{g}$) del anticuerpo Proteasoma 20s subunidad α (mAb), fue llevada a un volumen de 1 mL en tampón fosfato (PBS) pH 7,4 obteniendo una concentración final de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. De esta disolución se tomaron $300 \mu\text{L}$ y se aforaron a $600 \mu\text{L}$ en disolución amortiguadora HAc/Ac⁻ pH 5,5, cuya concentración final de incubación fue de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los electrodos modificados fueron incubados en $50 \mu\text{L}$ de la disolución mAb a 20°C de temperatura, con agitación constante durante 20 horas.

Finalmente, para la detección de P20S, se prepararon a partir de la disolución stock de concentración $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, diferentes concentraciones de P20S, las cuales se incubaron durante 20 horas, siempre en agitación constante.

Las caracterizaciones electroquímicas VC, EIS y SWV fueron realizadas en ausencia de la sonda redox, utilizando como señal analítica el proceso redox que presenta el polímero conductor 6-PICA.

La figura 21, muestra los perfiles voltamperométricos obtenidos por VC, para las distintas etapas de obtención del inmunosensor, los cuales corresponden (a) 6-PICA/GC, (b) APBA/6-PICA/GC, (c) mAb/ APBA/6-PICA/GC y (d) P20S/APBA/6-PICA/GC. Se observa que luego de cada modificación sobre el electrodo la respuesta electroquímica del par redox del polímero 6-PICA comienza a decrecer. Los voltamogramas cíclicos presentados muestran claramente que el proceso de transferencia de carga entre el polímero conductor y la disolución cambia luego de cada paso de modificación y especialmente durante la etapa de detección, proporcionando la señal analítica necesaria para la determinación de P20S.

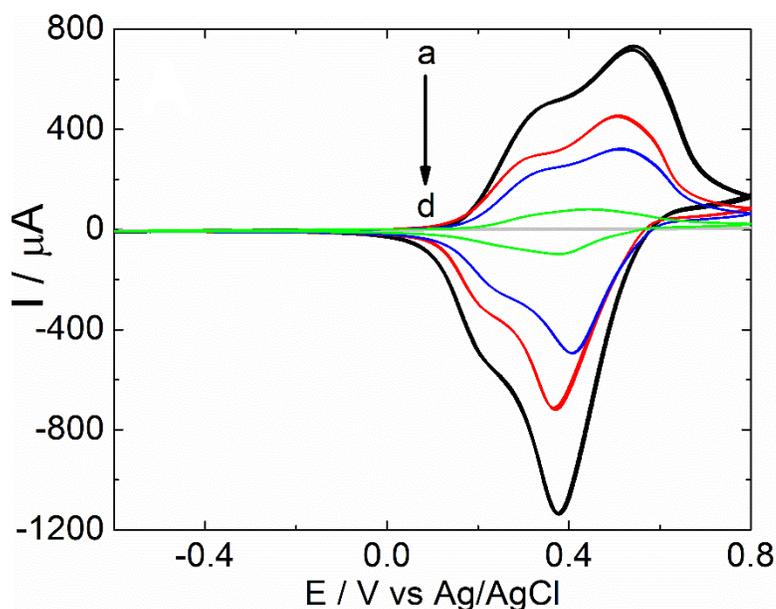


Figura 21. Perfil voltamperométrico por VC para: (a) 6-PICA/GC (línea negra), (b) APBA/6-PICA/GC (línea roja), (c) mAb/APBA/6-PICA/GC (línea azul) y (d) P20S/APBA/6-PICA/GC (línea verde), frente a GC (línea gris). La concentración de P20S es de $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ en disolución tampón Hac/Ac- pH 5,5.

Por otra parte, la figura 22, muestra un proceso anódico correspondiente a la respuesta electroquímica por SWV del polímero 6-PICA. Esta respuesta presenta el mismo comportamiento que se pudo apreciar por VC, en donde ocurre un decrecimiento del valor de corriente de pico anódica al incubarse el anticuerpo, mAb, comportamiento que se repite posteriormente al incubarse el electrodo modificado mAb/APBA/6-PICA/GC en una disolución de P20S.

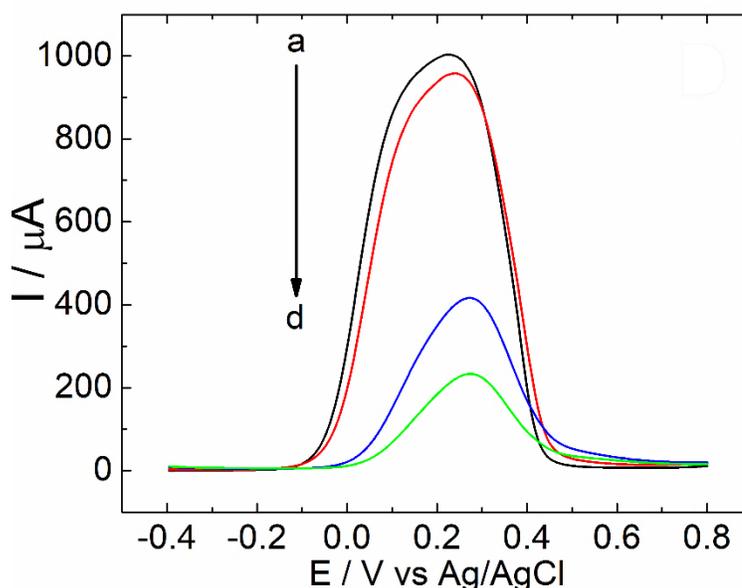


Figura 22. Perfil voltamperométrico por SWV para: (a) 6-PICA/GC (línea negra), (b) APBA/6-PICA/GC (línea roja), (c) mAb/APBA/6-PICA/GC (línea azul) y (d) P20S/APBA/6-PICA/GC (línea verde). La concentración de P20S es de $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ en disolución tampón Hac/Ac- pH 5,5.

En la figura 23, muestra los diagramas de Nyquist y Bode obtenidos por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), luego de cada etapa de la obtención del inmunosensor. Para la modificación de 6-PICA/GC los datos fueron ajustados con un circuito de Randles modificado (Circuito equivalente 1), utilizando dos elementos de fase constante, CPEs, como se muestra en la tabla 4, los cuales reemplazan el C_{dl} y W , en el circuito de Randles estándar. CPE1, considera las irregularidades morfológicas encontradas en la superficie electródica y CPE2, es usado para ajustar la separación de carga producto de

los procesos faradaicos que no son controlados por difusión. Mientras que para los pasos siguientes, los datos de impedancia fueron ajustados a un circuito equivalente que incorpora una constante de tiempo de relajación (τ_0) [108], adicionado en paralelo entre la resistencia de la disolución (R_s), representado con R_1 , y el circuito de Randles modificado, anteriormente mencionado para el ajuste de datos para 6-PICA/GC, una combinación de resistencia R_3 con un CPE3, (Circuito equivalente 2), como se muestra en la tabla 5.

La figura 23A, muestra un aumento en los valores de las resistencias, R_2 y R_3 , cuando se inmoviliza APBA, mAb y P20S, como se aprecia en la tabla 4. Mientras que el diagrama de Bode, figura 23B, muestra la formación de este tiempo de relajación (τ_0), obtenido en un ángulo de fase cercano a los 45° , en la zona de altas frecuencias. Los valores de τ_0 fueron calculados como el inverso de la frecuencia, $\tau_0 = 1/f_0$, obteniéndose valores de 63, 158 y 316 μs , para (b) APBA/6-PICA/GC (círculos rojos), (c) mAb/APBA/6-PICA/GC (triángulos azules) y (d) P20S/mAb/APBA/6-PICA/GC (rombos verdes), respectivamente. Esto indica que hay un sitio activo diferente al generado por el polímero conductor, demostrando que el ácido borónico, anticuerpo y el antígeno, fueron inmovilizados sobre la superficie de 6-PICA, formando una modificación capa a capa, aislante capaz de impedir la transferencia de carga entre las interfaces. Por otra parte, los valores de la resistencia de la disolución (R_1), permanecen prácticamente constantes, como se aprecia en la tabla 4, mostrando que no hay cambio en la fuerza iónica del medio.

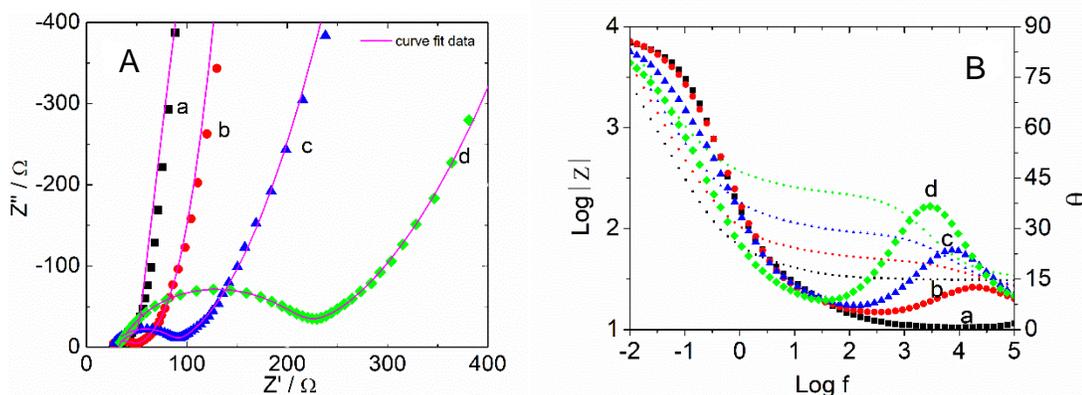
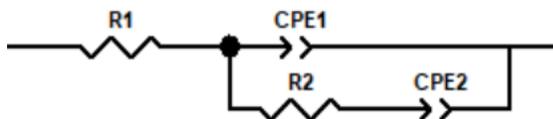


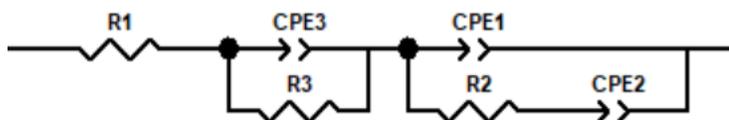
Figura 23. A) Diagramas de Nyquist y B) Diagrama de Bode, entre $1 \cdot 10^5$ Hz - $1 \cdot 10^{-2}$ Hz para: (a) 6-PICA/GC (línea negra), (b) APBA/6-PICA/GC (línea roja), (c) mAb/APBA/6-PICA/GC (línea azul) y (d) P20S/APBA/6-PICA/GC (línea verde). La concentración de P20S es de $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ en disolución tampón Hac/Ac- pH 5,5.

Tabla 4. Ajuste de datos obtenidos por EIS utilizando un circuito equivalente de Randles modificado (Circuito equivalente 1).



Electrodo	R_1 (Ω)	CPE_{1-T} (mF)	CPE_{1-P}	R_2 (Ω)	CPE_{2-T} (mF)	CPE_{2-P}	χ^2
6-PICA/GCE	32	1,46	0,88	35	3,45	0,96	$9,45 \cdot 10^{-3}$

Tabla 5. Ajuste de datos obtenidos por EIS utilizando un circuito equivalente Randles modificado (Circuito equivalente 2).



<i>Electrodo</i>	<i>APBA-6- PICA/GCE</i>	<i>mAb-APBA-6- PICA/GCE</i>	<i>P20S-mAb-APBA-6- PICA/GCE</i>
R_1 (Ω)	23	25	31
CPE_3-T (mF)	10,42	5,45	3,18
CPE_3-P	0,38	0,41	0,37
R_3 (Ω)	225	$1,61 \cdot 10^{12}$	$1,0 \cdot 10^{20}$
CPE_1-T (μF)	19,1	7,51	4,14
CPE_1-P	0,69	0,77	0,84
R_2 (Ω)	23,23	59,17	166,8
CPE_2-T (mF)	3,54	3,02	2,26
CPE_2-P	0,98	0,98	0,96
χ^2	$0,43 \cdot 10^{-3}$	$0,29 \cdot 10^{-3}$	$7,32 \cdot 10^{-5}$

Se realizaron experimentos control, con el fin de evaluar electroquímicamente el efecto de utilizar APBA para la inmovilización de la unidad de bioreconocimiento, mAb. Para esto se llevó a cabo la incubación de un electrodo 6-PICA/GC frente a un electrodo APBA/6-PICA/GC en una disolución de mAb. La figura 24 muestra que por SWV, en ausencia de APBA (línea magenta), al incubar directamente el anticuerpo sobre el electrodo modificado con polímero conductor, ocurre un decrecimiento de corriente, menos significativo que al compararlo con la inmovilización del anticuerpo sobre APBA (línea azul). Por otra parte, el diagrama de Bode, muestra que en ausencia de APBA, al inmovilizar el anticuerpo directamente sobre el polímero conductor, no se formaría el tiempo de relajación (τ_0), antes descrito.

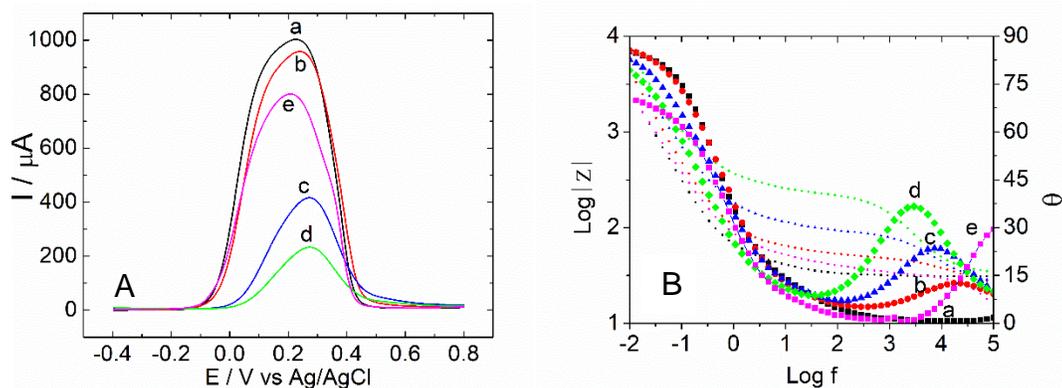


Figura 24. A) Perfil voltamperométrico por SWV y B) Diagrama de Bode para: (a) 6-PICA/GC (línea negra), (b) APBA/6-PICA/GC (línea roja), (c) mAb/APBA/6-PICA/GC (línea azul), (d) P20S/APBA/6-PICA/GC (línea verde) y mAb/6-PICA/GC (línea magenta). La concentración de P20S es de $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ en disolución tampón Hac/Ac⁻ pH 5,5.

Luego, con el fin de determinar que la afinidad específica del P20S es directamente con el anticuerpo Proteasoma 20S subunidad α , mAb, y no en otro lugar del electrodo modificado. Se realizaron experimentos control, con el fin de evaluar la presencia de interacciones no específicas entre P20S y la superficie eléctrica APBA/6-PICA/GC, en presencia y ausencia del anticuerpo monoclonal, mAb. Estas caracterizaciones fueron realizadas por SWV y por EIS como se muestra a continuación.

La figura 25, muestra que en ausencia del anticuerpo mAb. Se puede observar que tanto por SWV como por EIS, las respuestas, tanto amperométrica como impedimétrica permanecen constantes, es decir, en ausencia del anticuerpo específico para la detección de P20S, no ocurre la formación del complejo antígeno-anticuerpo que permite la detección de este.

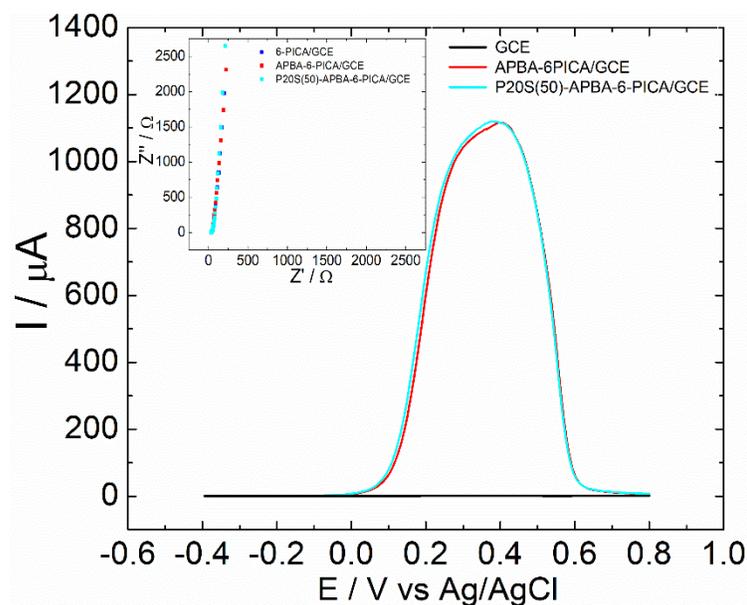


Figura 25. Perfil voltamperométrico por SWV, para GC (línea negra), APBA/6-PICA/GC (línea roja) y P20S/APBA/6-PICA/GC (línea celeste). Gráfico inserto, Diagrama de Nyquist entre $1 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^{-2}$ Hz. La concentración de P20S es de $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ en disolución tampón Hac/ Ac^- pH 5,5 en ausencia de anticuerpo mAb.

De esta manera se corrobora electroquímicamente que la interacción específica antígeno-anticuerpo, es la que permite detectar y cuantificar P20S utilizando el inmunosensor basado en 6-PICA e inmovilizando APBA, a través de las técnicas SWV y EIS. Al no estar presente el anticuerpo en el inmunosensor, no se cumple la función de bioreconocimiento, por lo tanto, no hay interacción antígeno-anticuerpo y no es posible detectar el P20S. Esto se traduce gráficamente, en que no se aprecian los comportamientos antes descritos, en donde, la corriente de pico del proceso anódico observado decrece posterior a cada incubación de P20S, en el caso de la SWV, mientras que la resistencia a la transferencia de carga aumentaba por EIS, y en este caso estos parámetros permanecen prácticamente constantes por ambas técnicas.

3.6 Detección cuantitativa de P20S.

Para determinar los parámetros analíticos tales como rango lineal, límites de detección y cuantificación, utilizando el inmunosensor basado en 6-PICA previamente caracterizado en la detección de P20S, se realizó una curva de calibración.

La figura 26A, muestra los perfiles voltamperométricos obtenidos por SWV entre 20,0 y 200,0 ng·mL⁻¹ de P20S, en donde se observa el decrecimiento de la respuesta en corriente en función del aumento de la concentración de P20S. Mientras que el gráfico de la figura 26B, muestra la curva de calibración en donde se relaciona la corriente normalizada con la concentración de P20S. La corriente normalizada se determina usando la siguiente relación, $(I_0 - I)/I_0$, donde I_0 , corresponde al valor de la corriente de pico de mAb/APBA/6-PICA/GC y el valor de corriente I , corresponde a la medición luego de la incubación en distintas concentraciones de P20S. Se pueden observar dos rangos lineales en este intervalo de concentraciones; el primero entre 20,0 – 80,0 ng·mL⁻¹, con límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) de 11 y 37 ng·mL⁻¹, respectivamente; y el segundo rango lineal entre 80,0 – 200,0 ng·mL⁻¹, con límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) de 25 y 83 ng·mL⁻¹, con pendientes de que difieren en un orden de magnitud, es decir, a bajas concentraciones, menores a 80,0 ng·mL⁻¹, el inmunosensor presenta una mayor sensibilidad a la variación de concentraciones de P20S, en comparación al segundo intervalo de linealidad.

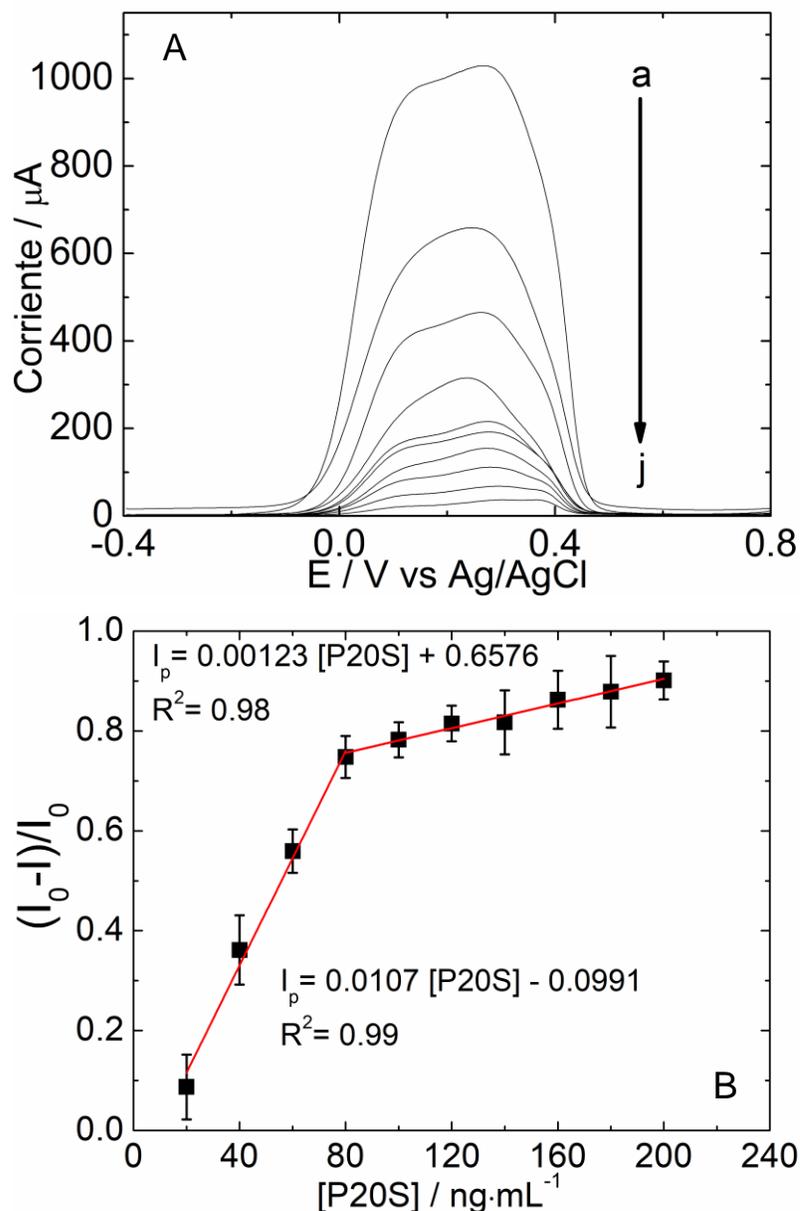


Figura 26. A) Perfiles voltamperométricos por SWV para: a) 20,0; b) 40,0; c) 60,0; d) 80,0; e) 100,0; f) 120,0; g) 140,0; h) 160,0; i) 180,0 y j) 200,0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de P20S. B) Curva de calibrado, corriente normalizada frente a la concentración de P20S entre 20,0 – 200,0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, en disolución tampón Hac/Ac⁻ pH 5,5.

La tabla 6, muestra de manera comparativa los resultados obtenidos de límites de detección y cuantificación, para ambos rangos lineales de la curva

calibrado, frente a algunos de los reportados en literatura, por técnicas como *western blot*, resonancia de plasmón superficial y test de ELISA. Cabe destacar que, en una gran cantidad de artículos, algunos de estos valores de estos parámetros no han sido reportados.

Tabla 6. Parámetros analíticos de rango lineal, LD y LQ para la determinación de P20S con el inmunosensor basado en 6-PICA.

Método	Rango lineal (ng·mL ⁻¹)	LD (ng·mL ⁻¹)	LQ (ng·mL ⁻¹)	Muestra	Referencia
SPRI	1400 - 7000	112	No reportado	Plasma sanguíneo	[103]
SPRI	1400 - 7000	189	No reportado	Plasma sanguíneo	[103]
ELISA	No reportado	No reportado	No reportado	Sangre	[104]
Western Blot	No reportado	No reportado	No reportado	Sangre	[104]
ELISA	540 - 6700	No reportado	No reportado	Sangre	[105]
ELISA	460 - 20900	No reportado	No reportado	Sangre	[105]
SPRI	0.1 - 2.5	0.06	0.19	Plasma y fluido cerebroespinal	[106]
SPRI	1000 -15000	No reportado	No reportado	Plasma sanguíneo	[107]
SWV	20 - 80	11	37	Suero humano	En este trabajo
SWV	80 - 200	25	83	Suero humano	En este trabajo

3.7 Análisis de P20S en muestras reales

La aplicabilidad real del inmunosensor mAb/APBA/6-PICA/GE, fue probada en muestras de suero humano. La determinación de P20S fue llevada a cabo usando la curva de calibrado normal reportada, y también, por método de adición de estándar.

Se preparó muestras de $120 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de P20S en suero humano, fueron incubadas en las mismas condiciones de tiempo y temperatura descritas. Posteriormente, fueron medidas a través de SWV. El porcentaje de recuperación en la matriz de suero da cuenta de la selectividad del dispositivo frente a P20S, a pesar de la existencia de posibles interferentes.

La tabla 7, demuestra con los resultados obtenidos, que no hay una interacción significativa entre los componentes del suero humano y el inmunosensor, obteniéndose valores de recuperación del orden de 92% y 95%, utilizando curva de calibrado y métodos de adición de estándar, respectivamente.

Tabla 7. Cuantificación de P20S en muestras de suero humano medidas electroquímicamente por SWV.

Método	Adicionado ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	n	Medido ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Recuperación %
<i>Curva de calibrado</i>	120	8	110	$92 \pm 0,95$
<i>Adición de estándar</i>	120	10	114	$95 \pm 0,69$

Por otra parte, la figura 27, muestra la reproducibilidad del inmunosensor, para un número de repeticiones, $n = 8$, con una respuesta en corriente estable y baja dispersión entre mediciones del mismo electrodo, es decir, el sistema inmunosensor basado en 6-PICA, para la detección de P20S en muestras de suero presenta una buena reproducibilidad y repetibilidad.

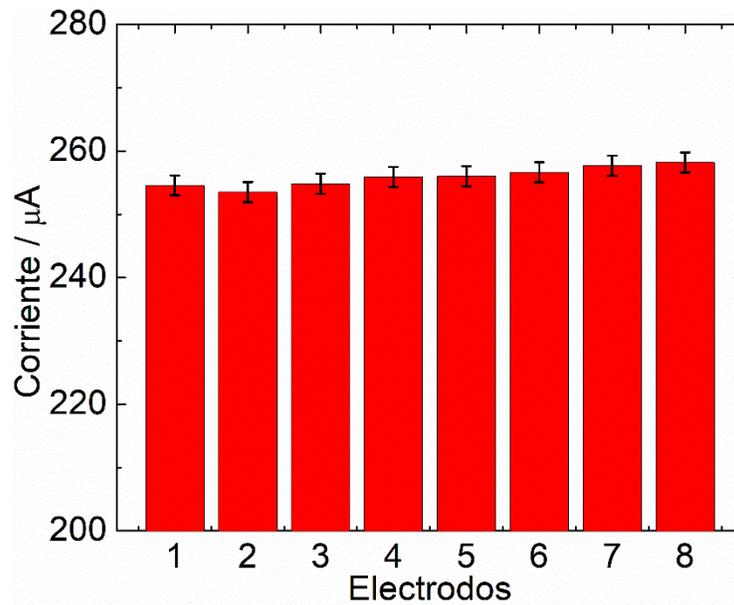


Figura 27. Reproducibilidad de la detección de P20S en muestra de suero humano utilizando el inmunosensor basado en 6-PICA.

La especificidad juega un rol fundamental en el desarrollo y eficacia de un inmunosensor en diagnósticos clínicos [112]. Por este motivo, se realizó un estudio de interferentes, con el fin de comprobar la selectividad del inmunosensor frente a otras moléculas como lo son albumina de suero bovino, BSA, y el antígeno prostático específico, PSA.

Se prepararon muestras de igual concentración de P20S, BSA y PSA, cada una de $120 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, en buffer acético-acetato pH 5,5, incubadas bajo las mismas condiciones experimentales antes mencionadas.

La figura 28, muestra el decrecimiento en corriente ($-\Delta I_p$), entre la respuesta del inmunosensor previamente incubado con anticuerpo mAb, y su posterior incubación frente a las 3 moléculas objetivos, estas determinaciones fueron llevadas a cabo mediante SWV. La disminución en corriente observada luego de incubar los interferentes BSA y PSA, no es significativa, ya que presentan un decrecimiento en corriente, menor a los $50 \mu\text{A}$, mientras que para P20S, molécula objetivo para la cual fue diseñado el dispositivo, el decrecimiento es

al menos 4 veces mayor, con un $-\Delta I_p$, de aproximadamente 170 μA . Esto demuestra que el dispositivo presenta una alta selectividad a P20S.

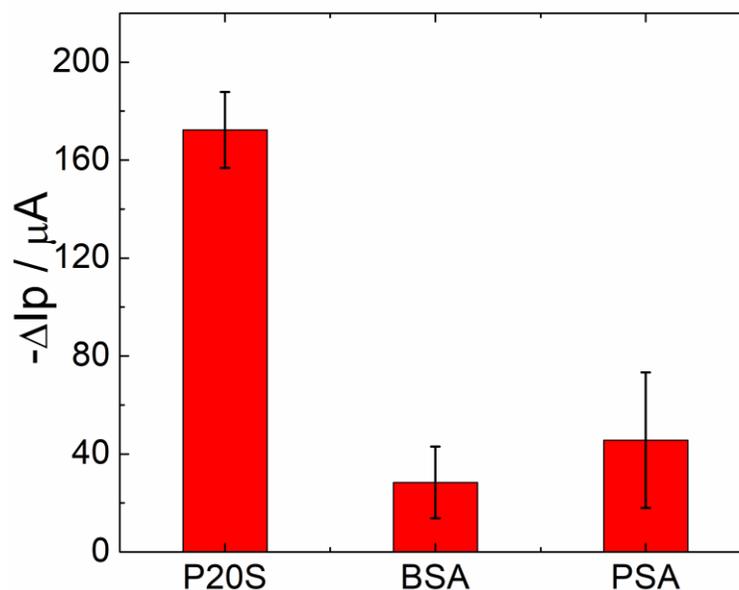


Figura 28. Ensayo de interferentes en la detección de P20S. Interferentes utilizados: BSA y PSA, $120 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ cada uno, en buffer HAc/Ac⁻ pH 5,5.

3.8 Detección y cuantificación de PSA

Para la detección del antígeno prostático específico PSA, se realizó el mismo procedimiento que para la cuantificación de P20S, es decir, se modificó del electrodo GC con el polímero conductor nanoestructurado 6-PICA, por voltamperometría cíclica, posteriormente, se procedió a la activación de los grupos carboxílicos del polímero conductor con EDC/NHS, luego se realizó la inmovilización de APBA por inmersión y finalmente, la incubación del anticuerpo específico para PSA, Anti-KLK3, provisto por Sigma-Aldrich.

Para llevar a cabo la detección de PSA, se tomó el producto desde su forma comercial, PSA *from human semen*, también procedente de Sigma-Aldrich, y fue llevado en su totalidad a un volumen de 500 μL en buffer HAc-Ac⁻ a pH 5,5, obteniéndose una concentración final de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A partir de esta disolución stock, se realizaron diluciones para obtener las diferentes concentraciones de incubación de PSA.

El seguimiento de la respuesta electroquímica se realizó por CV y SWV, utilizando el par redox presente en el polímero conductor 6-PICA, en buffer acético-acetato a pH 5,5. Con la finalidad de mejorar tanto los parámetros analíticos como el desarrollo y comportamiento del inmunosensor, se realizaron optimizaciones principalmente de los tiempos de incubación de cada una de las etapas de obtención de este, y además, la temperatura incubación para el anticuerpo Anti-KLK3.

3.9 Optimización en la detección de PSA

La optimización para la detección de PSA fue realizada en los diferentes pasos de la obtención del inmunosensor basado en 6-PICA. En primer lugar, la optimización del tiempo para la inmovilización de 50 mM de APBA, luego la optimización de tiempo y temperatura de incubación de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ del anticuerpo Anti-KLK3, y finalmente el tiempo de incubación de PSA.

Estas mediciones fueron realizadas tanto por VC como por SWV y se consideró como parámetro óptimo en cada una de las etapas, aquella variable que presentara una variación de corriente tal que permita diferenciarla del paso inmediatamente anterior, teniendo en consideración buscar altas intensidades de corrientes. Esto permite una mayor cantidad de mediciones al aprovechar las altas corrientes que el polímero conductor 6-PICA ofrece y que permitan

diferenciar los decrecimientos tanto en las etapas de obtención del inmunosensor, como en la detección del analito.

La figura 29, muestra la optimización de tiempo para la inmovilización de APBA sobre el electrodo modificado con 6-PICA, luego de la activación de los grupos carboxílicos con EDC/NHS.

Se puede observar en el gráfico de barras de corriente normalizada promedio (I_0-I/I_0) con su respectiva desviación estándar, frente a los distintos tiempos de incubación, los cuales fueron de 2, 4, 6, 8 y 20 horas, en disolución del buffer HAc-Ac⁻ a pH 5,5. Los promedios de corriente normalizada presenta un aumento en función del paso de las horas. Luego de 2 horas de incubación de APBA, el gráfico de barras muestra la menor dispersión de datos, es decir, durante el primer intervalo de tiempo, el dispositivo presenta una mejor reproducibilidad entre los electrodos medidos. Sin embargo, entre los dos primeros intervalos de tiempo de incubación, 2 y 4 horas, la diferencia de media no es estadísticamente significativa ($p>0,05$) (Tabla S1, Anexo 6). Por otra parte, luego de 6 horas, se reduce aproximadamente en un tercio la magnitud de corriente del proceso redox del polímero, y las medias de estos intervalos de tiempo de incubación: 6, 8 y 20 horas, tampoco presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Se determinó 2 horas de inmersión como el tiempo óptimo para la inmovilización de APBA.

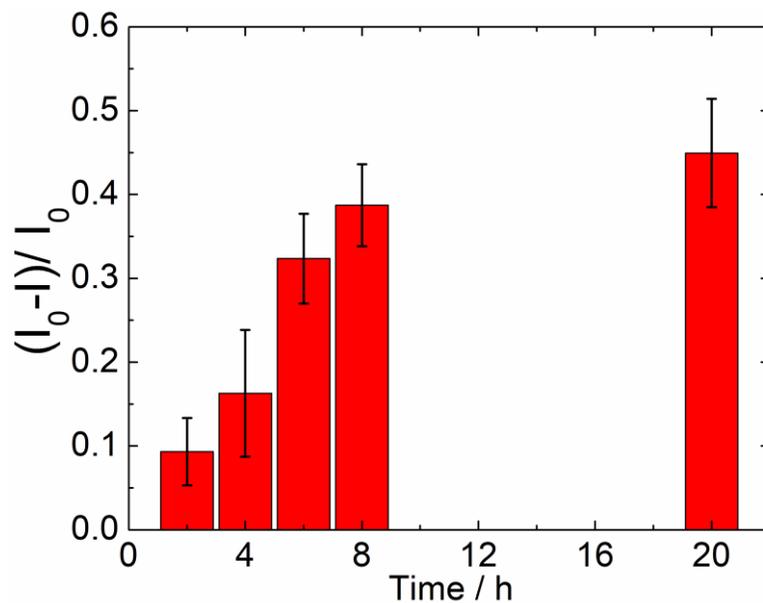


Figura 29. Optimización de tiempo de incubación de $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de APBA, en buffer HAc/Ac⁻ pH 5,5.

En segundo lugar, la optimización para la incubación del anticuerpo específico para PSA, Anti-KLK3, fue realizada en función de dos variables: el tiempo y la temperatura. El gráfico de la figura 30, muestra que la respuesta en corriente normalizada promedio, $(I_0 - I) / I_0$, permanece prácticamente invariable luego de ser incubado con Anti-KLK3 durante: 2, 4, 6, 8 y 20 horas, respectivamente. Se puede observar que la magnitud de corriente normalizada obtenida en función del tiempo de incubación es prácticamente constante. Sin embargo, a tiempos prolongados de incubación, se observa una mayor dispersión de datos, volviendo menos reproducible la respuesta de los electrodos medidos luego de la incubación con el anticuerpo. Nuevamente, estos valores no serían estadísticamente significativos, $p > 0,05$, (Tabla S2, Anexo 6) para diferenciar un tiempo de incubación del otro. Por esta razón, se elige tiempo óptimo de incubación de Anti-KLK3 sobre el electrodo modificado con APBA/6-PICA/GC, el menor tiempo de incubación, 2 horas.

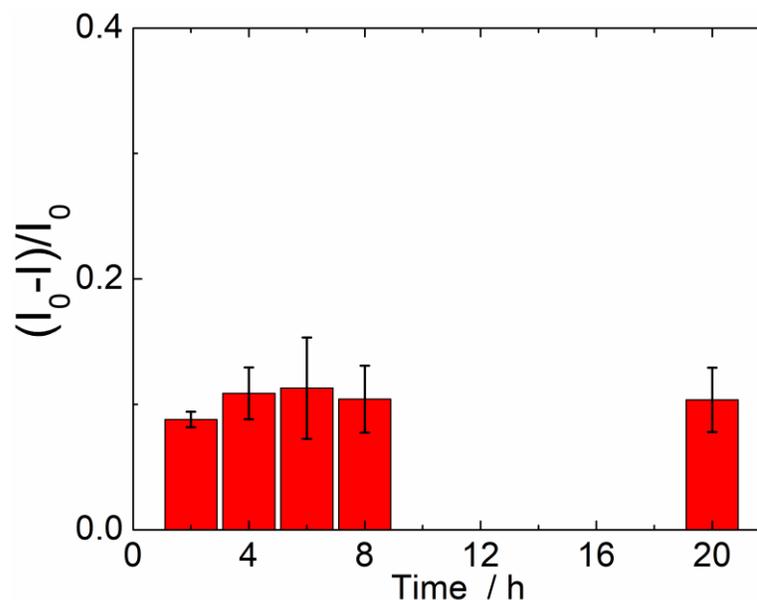


Figura 30. Optimización de tiempo de incubación de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Anti-KLK3, en buffer HAc/Ac⁻ pH 5,5.

Luego, para el anticuerpo Anti-KLK3, también se realizó la optimización de la temperatura de incubación, utilizando 3 temperaturas 4, 20 y 36°C [69]. La figura 31, muestra el gráfico de barras para la incubación a las 3 temperaturas seleccionadas. Se puede observar un aumento de la corriente normalizada en función del aumento de temperatura de incubación. Pero también se puede apreciar, que al aumentar la temperatura de incubación de Anti-KLK3, se incrementa la dispersión de los datos medidos, presentando menos reproducibilidad el sistema a mayores temperaturas. Además, fue posible diferenciar estadísticamente la primera temperatura de incubación de las otras dos, $p < 0,05$, (Tabla S3, Anexo 6), hay evidencia suficiente que permite establecer que hay diferencias estadísticas significativas entre las medias de las temperaturas medidas. Por esta razón, se escogió como temperatura óptima de incubación para el anticuerpo Anti-KLK3, 4°C.

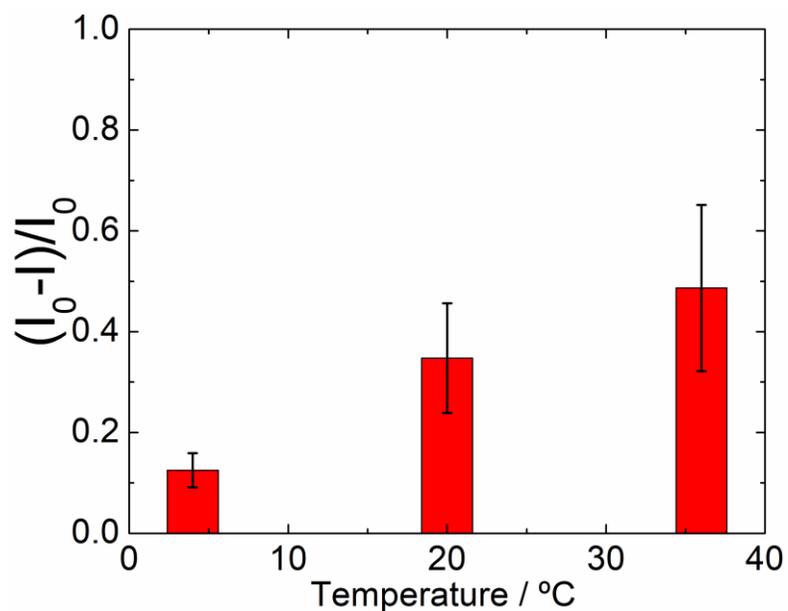


Figura 31. Optimización de temperatura de incubación de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Anti-KLK3, en buffer HAc/Ac⁻ pH 5,5.

Finalmente, se realizó la optimización del tiempo de incubación de PSA, bajo las condiciones óptimas previamente establecidas. Se incubó una concentración de $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, durante 1, 2, 4 y 48 horas, en buffer HAc-Ac⁻ a pH 5,5, con el fin de obtener el tiempo óptimo de incubación en donde se obtuviese la mayor respuesta en corriente y una menor dispersión de datos entre los electrodos, asegurando la reproducibilidad de los experimentos y mediciones.

La figura 32, muestra el gráfico de barra de la respuesta en corriente normalizada, de las mediciones realizadas por SWV frente al tiempo de incubación. Se puede observar que la corriente normalizada aumenta en función del paso del tiempo, siendo más notorio luego de dos horas de incubación. La diferencia de magnitud de corriente normalizada promedio entre una y dos horas, es muy baja, no así la dispersión de datos de los electrodos medidos, que incrementa de manera considerable desde las dos

horas de incubación de PSA. Sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas que permita diferenciar los diferentes intervalos de temperatura de incubación, $p > 0,05$, (Tabla S4, Anexo6).

En consecuencia, se determinó como tiempo óptimo para la detección de PSA, una hora de incubación del antígeno.

Como consecuencia de estas optimizaciones, los tiempos para la obtención tanto del inmunosensor electroquímico, como de la de curva de calibrado, se ven reducidos.

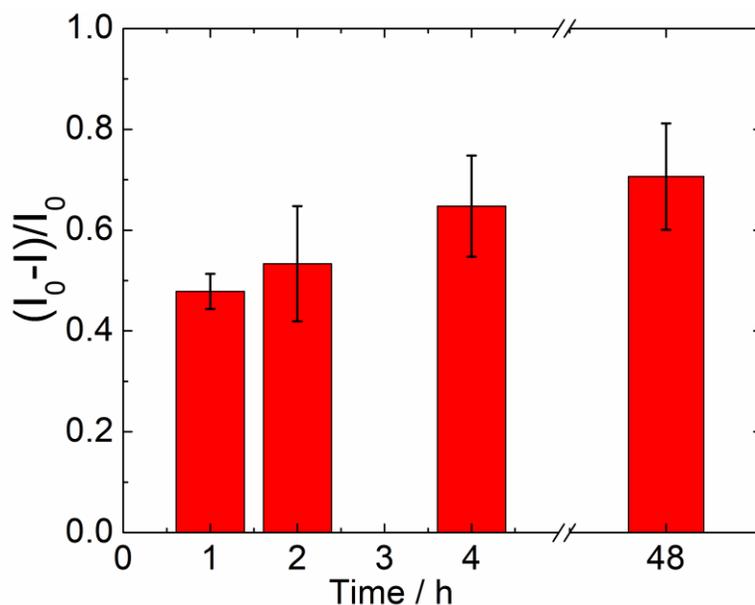


Figura 32. Optimización de tiempo de incubación de $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ de PSA, en buffer HAc/Ac⁻ pH 5,5.

La figura 33, muestra los perfiles voltamperométricos estables obtenidos por VC (A) y SWV (B), en condiciones óptimas para 6-PICA/GC (línea roja), APBA/6-PICA/GC (línea verde), Anti-KLK3/APBA/6-PICA/GC (línea azul) y PSA/Anti-KLK3/APBA/6-PICA/GC (línea magenta). Se observa el comportamiento característico ya descrito, hay un decrecimiento de corriente

por ambas técnicas al modificar el electrodo en cada etapa de construcción del inmunosensor. Además, la figura 31C, muestra la alta reproducibilidad que se obtiene en cada etapa de obtención, entre 15 electrodos, con valores de desviación estándar relativa (RSD) de 3,3%, 3,5% y 4,2% para 6-PICA/GC, APBA/6-PICA/GC y Anti-KLK3/APBA/6-PICA/GC, respectivamente, representados con los mismos colores descritos.

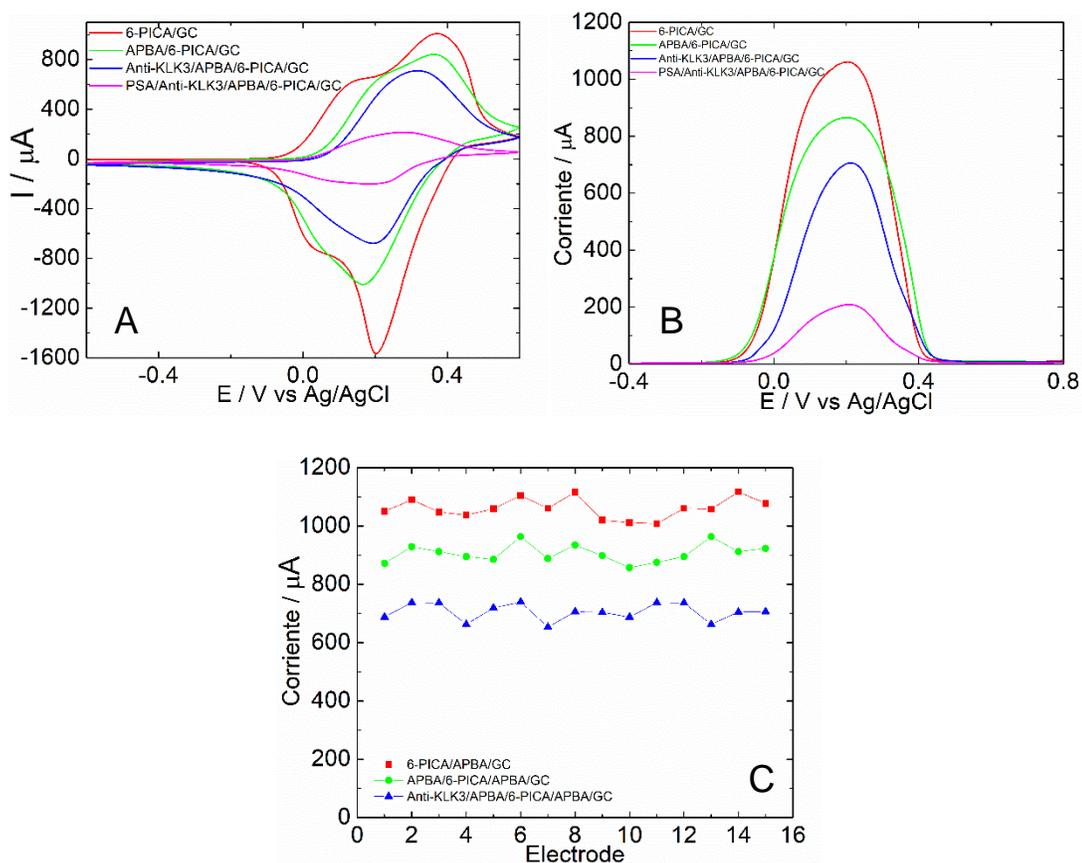


Figura 33. Perfiles voltamperométricos por (A) VC y (B) SWV para 6-PICA/GC (línea roja), APBA/6-PICA/GC (línea verde), Anti-KLK3/APBA/6-PICA/GC (línea azul) y PSA/Anti-KLK3/APBA/6-PICA/GC (línea magenta). La concentración de PSA es $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ en disolución HAc-Ac⁻ $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 5,5). (C) Reproducibilidad en las etapas de obtención del inmunosensor electroquímico.

3.10 Cuantificación de PSA

La cuantificación de PSA fue llevada a cabo por voltamperometría de onda cuadrada, siguiendo el proceso redox del polímero conductor 6-PICA, a través de una curva de calibración en un intervalo de concentraciones entre 0,50 y 100,0 ng·mL⁻¹.

Se observa en los perfiles de SWV, de la figura 34A, una disminución de corriente de pico, que se correlaciona con el aumento de concentración de incubación de PSA, debido a la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Además, la figura 34B, muestra la curva de calibrado obtenida a partir de la relación lineal entre la corriente normalizada y el logaritmo de la concentración de PSA, con rango lineal de concentración entre 0,50 y 100,0 ng·mL⁻¹ ($r^2 = 0,995$), y límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) de 0,11 y 0,38 ng·mL⁻¹, respectivamente.

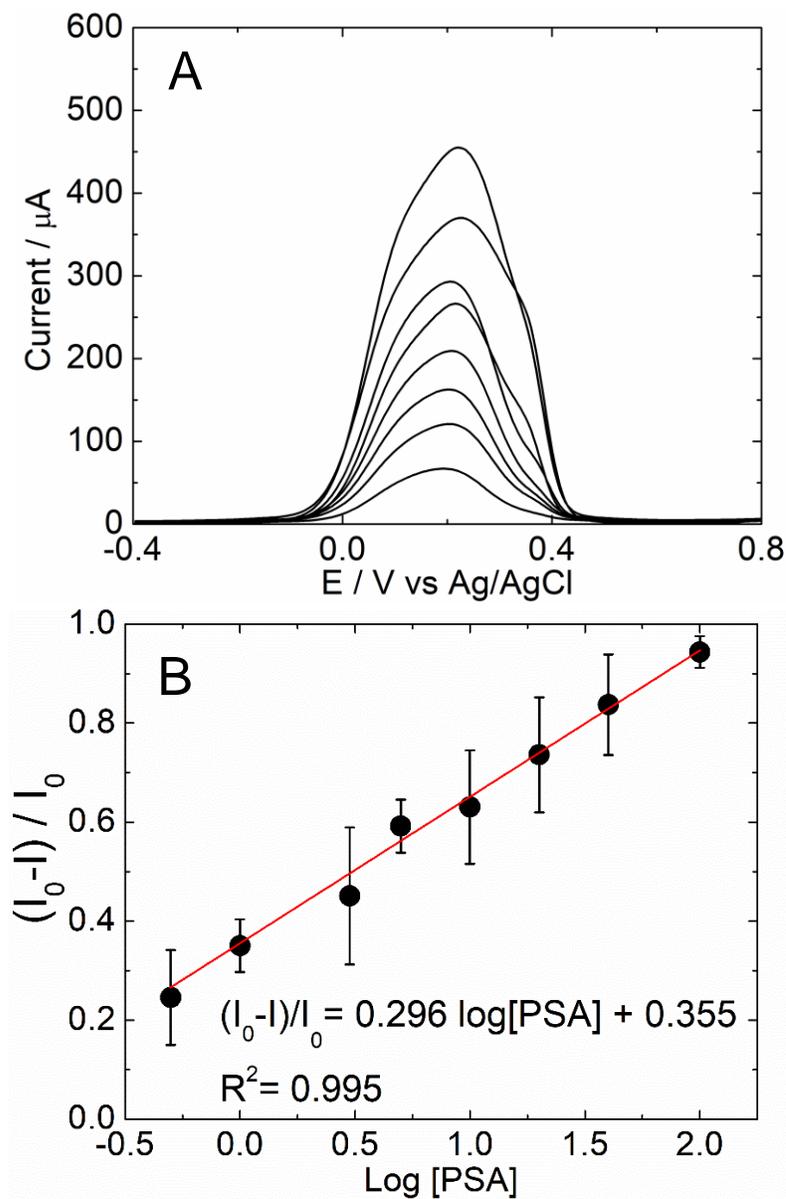


Figura 34. A) Perfiles voltamperométricos por SWV para PSA a concentraciones de: 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 y 100,0 ng·mL⁻¹. B) Curva de calibrado, $(I_0 - I) / I_0$ frente al logaritmo de la concentración de PSA entre 0,5 – 100,0 ng·mL⁻¹, en disolución tampón Hac/Ac⁻ pH 5,5.

La tabla 8, muestra los parámetros analíticos obtenidos a partir de la curva de calibración para la detección y cuantificación de PSA, frente a otras investigaciones basadas principalmente en polímeros conductores, reportadas en literatura.

Se puede observar que las técnicas que han reportado menores límites de detección corresponden a métodos de electroquimiluminiscencia o fotoelectroquímica, ya que la sensibilidad asociada a la técnica permite cuantificar en un rango lineal menor en al menos dos órdenes de magnitud. Sin embargo, estas técnicas requieren de costosos equipamientos para llevar a cabo estas mediciones, además de sistemas complejos de obtención del electrodo o superficie utilizada como plataforma inmunosensora. Luego, los sistemas electroquímicos basados en la inmovilización de nanopartículas, *quantum dots*, y/o composites de estas nanoestructuras, han logrado acercarse considerablemente a los valores de límites de detección antes reportados, utilizando como señal analítica sondas redox o complejos enzimáticos asociados a la detección de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, podrían llegar a interferir o degradar parcialmente la superficie electroda, ya que puede ser adsorbida o reaccionar con la superficie del electrodo modificado, esta interacción no específica a menudo produce envenenamiento de la superficie o produce una señal complicada de diferenciar de la señal generada cuando es formado el inmuno-complejo. En busca de solucionar este inconveniente se propone evaluar el uso de la respuesta faradaica del electrodo modificado [113-115].

Cabe destacar que el sistema utilizado en este trabajo, basado en polímero conductor 6-PICA, además de ser rápido y fácil de obtener de manera reproducible, permite cuantificar utilizando la respuesta redox intrínseca del polímero, sin necesidad de mediadores redox u otros agentes en disolución, permitiendo la detección y cuantificación del biomarcador para cáncer de próstata PSA con límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) de 0,11 y 0,33 ng·mL⁻¹, respectivamente, en un rango lineal entre 0,5 – 100,0 ng·mL⁻¹.

Tabla 8. Comparación de parámetros analíticos de rango lineal, LD, tiempo y temperatura de incubación, para la determinación de PSA.

<i>Método</i>	<i>Rango lineal</i> (ng·mL ⁻¹)	<i>LD</i> (ng·mL ⁻¹)	<i>Tiempo</i> <i>Incubación</i> (h)	<i>Temperatura</i> <i>Incubación</i> (°C)	<i>Ref.</i>
<i>ECL</i>	0,00001 – 40	4,2x10 ⁻⁶	20*	RT	[116]
<i>ECL</i>	0,0001 – 20	3,5x10 ⁻⁵	3	-	[117]
<i>ECL</i>	0,001 – 100	0,00044	1	37	[118]
<i>PEC</i>	0,02-200	6,8x10 ⁻⁶	-	-	[119]
<i>PEC</i>	0,01 - 100	0,0027	50*	37	[120]
<i>Chr.</i>	1 – 100	0,00068	1	RT	[121]
<i>Chr.</i>	0,0001 – 25	3,0x10 ⁻⁵	-	RT	[122]
<i>CV</i>	0,00016-38	0,00195	20*	25	[123]
<i>DPV</i>	0,01 - 25	0,0034	1	37	[114]
<i>DPV</i>	0,0001 - 20	4,0x10 ⁻⁵	2	37	[124]
<i>DPV</i>	0,0001 - 50	3,0x10 ⁻⁵	1	37	[125]
<i>DPV</i>	0,001 – 100	0,0006	0,5	-	[115]
<i>DPV</i>	0,5 – 15 and 15 – 100	0,093	40*	RT	[126]
<i>SWV</i>	0.01 – 25	0,0067	20*	4	[127]
<i>SWV</i>	0,001– 0.5	0,001	35*	4	[128]
<i>SWV</i>	0,01-100	0,0022	0,5	37	[129]
<i>SWV</i>	0,5-100	0,11	1	20	Este trabajo

ECL=Electroquimiluminiscencia

PEC= Fotoelectroquímica

Chr.= Cronoamperometría

CdSQDs= quantum dots de sulfuro de Cadmio

CdSeQDs= quantum dots de seleniuro de cadmio

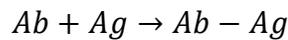
HQ= Hidroquinona

GQD= quantum dots de grafeno

*tiempo en minutos

3.11 Determinación de Constantes de afinidad (K_a) para P20S y PSA

Finalmente, se realizó la determinación de la constante de afinidad (K_a), la cual entrega información respecto de la formación del complejo Antígeno-Anticuerpo. De acuerdo con la teoría de isotermas de adsorción de Langmuir, se han derivado modelos que permiten realizar la relación de equilibrio, en base a la concentración molar de antígeno, anticuerpo y del complejo Antígeno-Anticuerpo, utilizando una relación de normalización ya sea en función de la resistencia a la transferencia de carga ($(R_{ct(i)} - R_{ct(0)})/R_{ct(0)}$) [130], o de corrientes $((I_0 - I)/I_0)$ [131] y la concentración molar del antígeno. En esta relación, $R_{ct(0)}$ e I_0 , corresponden al valor de la medición del anticuerpo, mAb en el caso de P20S y Anti-KLK3 para PSA, luego de su inmovilización sobre el electrodo modificado, mientras que $R_{ct(i)}$ e I , corresponden al valor de la medición posterior a la interacción del antígeno con el anticuerpo, P20S-mAb y PSA-Anti-KLK3, respectivamente.



$$K_a = \frac{[Ab - Ag]}{[Ab][Ag]}$$

$$K_a[Ag] = \frac{(I_0 - I)}{(I_0)}$$

La figura 35, muestra el gráfico de corriente normalizada frente a la concentración molar tanto de P20S como de PSA. A partir de la linealización de este gráfico se puede obtener desde la pendiente, el valor de la constante de afinidad, para ambos casos. Se obtuvo altos valores de constante de afinidad: $7,63 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y $2,32 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, para P20S-mAb y PSA-Anti-KLK3, respectivamente.

Estos valores de constantes de afinidad aseguran la gran selectividad de los analitos medidos utilizando la plataforma inmunosensora basada en el polímero conductor 6-PICA y utilizando APBA como mediador en el proceso

de inmovilización orientada del respectivo anticuerpo, sin que pierda su actividad y favoreciendo la formación de este complejo.

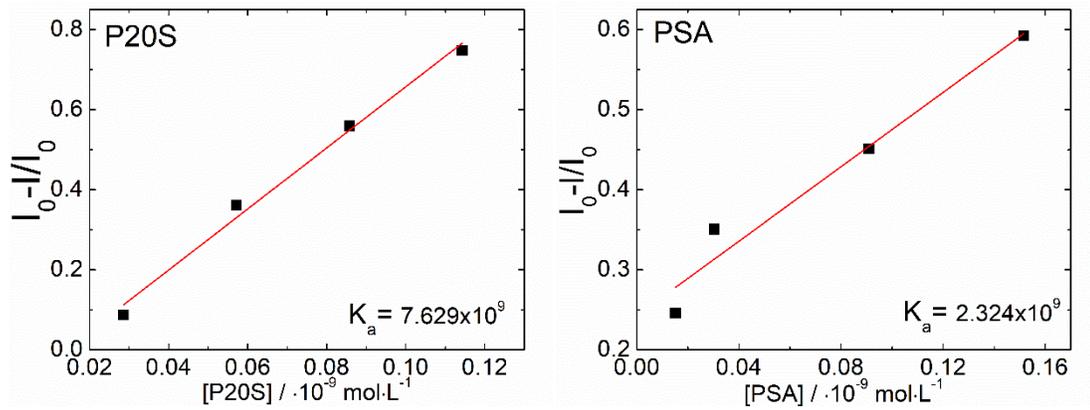


Figura 35. Constante de afinidad K_a para (A) P20S-mAb y (B) PSA-Anti-KLK3. Curva de calibrado ($I_0 - I / I_0$) frente a la concentración ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) en disolución tampón Hac/Ac- pH 5,5.

Capítulo IV. Conclusiones

Se logró obtener por técnicas electroquímicas polímeros conductores nanoestructurados a base de ácido indolcarboxílico, 5-PICA y 6-PICA, caracterizadas mediante microscopía SEM.

Se logró obtener una plataforma inmunosensora versátil basada en ácido aminofenilborónico/ácido poli-6-indolcarboxílico, la cual permite la inmovilización orientada de diferentes anticuerpos.

Fue posible realizar la detección de diferentes concentraciones de IgG, luego de incubar Ab-IgG, sobre el inmunosensor basado en 6-PICA, en presencia de la sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, a través de espectroscopía de impedancia electroquímica.

Se confirmó la inmovilización del anticuerpo sobre la plataforma electroquímica, al determinar que la interacción específica antígeno-anticuerpo es la que nos permite detectar y cuantificar al P20S y PSA, tanto por EIS como por SWV, ya que, en su ausencia del anticuerpo, no se aprecian los comportamientos electroquímicos esperados.

Se logró detectar y cuantificar P20S y PSA en ausencia de una sonda redox externa, utilizando el proceso redox del polímero conductor.

Por SWV se determinaron dos rangos lineales de concentración para P20S; el primero entre 20,0 y 80,0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, con límites de detección y cuantificación de 11 y 37 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente; y el segundo entre 80,0 y 200,0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, con límites de detección y cuantificación de 25 y 83 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

Se demostró la selectividad del inmunosensor basado en mAb/APBA/6-PICA/GC para P20S frente a interferentes como BSA y PSA.

Por SWV se determinó un rango lineal de concentración para la detección de PSA entre 0,50 y 100,0 ng·mL⁻¹, con límites de detección y cuantificación de 0,11 y 0,37 ng·mL⁻¹, respectivamente.

Se determinó la constante de afinidad (K_a) de la formación del complejo antígeno-anticuerpo, para P20S-mAb y PSA-Anti-KLK3, obtenido un valor de $7,63 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y $2,32 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, respectivamente.

Bibliografía

- [1] K. Strimbu and J. a Tavel, "What are Biomarkers?," *Curr Opin HIV AIDS*, vol. 5, no. 6, pp. 463–466, 2011.
- [2] B. Bohunicky and S. A. Mousa, "Biosensors: The new wave in cancer diagnosis," *Nanotechnol. Sci. Appl.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–10, 2011.
- [3] J. Reis-Filho, *Molecular Diagnostics*, vol. 11, no. 10. 2010.
- [4] The National Cancer Institute (NCI), "Biomarkers." [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=45618>. [Accessed: 10-May-2017]
- [5] B. Rezaei, M. Ghani, A. M. Shoushtari, and M. Rabiee, "Electrochemical biosensors based on nanofibres for cardiac biomarker detection: A comprehensive review," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 78, pp. 513–523, 2016.
- [6] R. Laocharoensuk, "Development of Electrochemical Immunosensors towards Point-of-care Cancer Diagnostics: Clinically Relevant Studies," *Electroanalysis*, vol. 28, no. 8, pp. 1716–1729, 2016.
- [7] C. Ibau, M. K. Md Arshad, and G. Subash C.B., "Current advances and future visions on bioelectronic immunosensing for prostate-specific antigen," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 98, no. June, pp. 267–284, 2017.
- [8] P. Jolly, V. Tamboli, R. L. Harniman, P. Estrela, C. J. Allender, and J. L. Bowen, "Aptamer-MIP hybrid receptor for highly sensitive electrochemical detection of prostate specific antigen," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 75, pp. 188–195, 2016.
- [9] B. Liu, L. Lu, E. Hua, S. Jiang, and G. Xie, "Detection of the human prostate-specific antigen using an aptasensor with gold nanoparticles encapsulated by graphitized mesoporous carbon," *Microchim. Acta*, vol. 178, no. 1–2, pp. 163–170, 2012.
- [10] A. Nevo, A. Navaratnam, and P. Andrews, "Prostate cancer and the role of biomarkers," *Abdom. Radiol.*, vol. 45, no. 7, pp. 2120–2132, 2020.
- [11] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2019," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 69, no. 1, pp. 7–34, 2019.
- [12] R. Seenivasan, C. K. Singh, J. W. Warrick, N. Ahmad, and S. Gunasekaran, "Microfluidic-Integrated Patterned ITO Immunosensor for Rapid Detection of Prostate-Specific Membrane Antigen Biomarker in Prostate Cancer," *Biosens. Bioelectron.*, 2017.
- [13] M. Mascini and S. Tombelli, "Biosensors for biomarkers in medical diagnostics," *Biomarkers*, vol. 13, no. 7–8, pp. 637–657, 2008.

- [14] S. K. Arya and S. Bhansali, "Anti-Prostate Specific Antigen (Anti-PSA) Modified Interdigitated Microelectrode-Based Impedimetric Biosensor for PSA Detection," *Biosens. J.*, vol. 1, pp. 1–7, 2012.
- [15] C. Fernández-Sánchez, C. J. McNeil, K. Rawson, and O. Nilsson, "Disposable noncompetitive immunosensor for free and total prostate-specific antigen based on capacitance measurement," *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 19, pp. 5649–5656, 2004.
- [16] P. Sarkar, P. S. Pal, D. Ghosh, S. J. Setford, and I. E. Tothill, "Amperometric biosensors for detection of the prostate cancer marker (PSA)," *Int. J. Pharm.*, vol. 238, no. 1–2, pp. 1–9, 2002.
- [17] G. Wu, R. H. Datar, K. M. Hansen, T. Thundart, R. J. Cote, and A. Majumdar, "Bioassay of prostate-specific antigen(PSA) using microcantilevers," *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, no. 9, pp. 856–860, 2001.
- [18] A. M. Armani, "Hybrid integrated label-free chemical and biological sensors," *Sensors (Basel)*, vol. 14, no. 4, pp. 5890–5928, 2014.
- [19] G. A. J. Besselink, R. P. H. Kooyman, P. J. H. J. Van Os, G. H. M. Engbers, and R. B. M. Schasfoort, "Signal amplification on planar and gel-type sensor surfaces in surface plasmon resonance-based detection of prostate-specific antigen," *Anal. Biochem.*, vol. 333, no. 1, pp. 165–173, 2004.
- [20] L. Huang *et al.*, "Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 3, pp. 483–490, 2005.
- [21] K. Yang, L. Qi, Z. Gao, X. Zu, and M. Chen, "A Novel Electrochemical Immunosensor for Prostate-Specific Antigen Based on Noncovalent Nanocomposite of Ferrocene Monocarboxylic Acid with Graphene Oxide," *Anal. Lett.*, vol. 47, no. 13, pp. 2266–2280, 2014.
- [22] J. Yang, W. Wen, X. Zhang, and S. Wang, "Electrochemical immunosensor for the prostate specific antigen detection based on carbon nanotube and gold nanoparticle amplification strategy," *Microchim. Acta*, vol. 182, no. 9–10, pp. 1855–1861, 2015.
- [23] X. Yu *et al.*, "Carbon nanotube amplification strategies for highly sensitive immunodetection of cancer biomarkers," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 34, pp. 11199–11205, 2006.
- [24] J. Okuno, K. Maehashi, K. Kerman, Y. Takamura, K. Matsumoto, and E. Tamiya, "Label-free immunosensor for prostate-specific antigen based on single-walled carbon nanotube array-modified microelectrodes," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 9–10, pp. 2377–2381, 2007.

- [25] Y. Y. Lin, J. Wang, G. Liu, H. Wu, C. M. Wai, and Y. Lin, "A nanoparticle label/immunochemical electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of prostate-specific antigen," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, no. 11, pp. 1659–1665, 2008.
- [26] J.-W. Choi, D.-Y. Kang, Y.-H. Jang, H.-H. Kim, J. Min, and B.-K. Oh, "Ultra-sensitive surface plasmon resonance based immunosensor for prostate-specific antigen using gold nanoparticle–antibody complex," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 313–314, pp. 655–659, 2008.
- [27] S. K. Shukla and K. Rafiq, "Proteasome biology and therapeutics in cardiac diseases," *Transl. Res.*, vol. 205, pp. 64–76, 2019.
- [28] L. Borissenko and M. Groll, "20S Proteasome and Its Inhibitors: Crystallographic Knowledge for Drug Development," *Chem. Rev.*, vol. 107, no. 3, pp. 687–717, Feb. 2007.
- [29] C. S. Henriques de Jesus, A. M. Chiorcea-Paquim, M. M. Barsan, and V. C. Diculescu, "Electrochemical assay for 20S proteasome activity and inhibition with anti-cancer drugs," *Talanta*, vol. 199, no. December 2018, pp. 32–39, 2019.
- [30] M. Groll, C. R. Berkers, H. L. Ploegh, and H. Ovaa, "Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome," *Structure*, vol. 14, no. 3, pp. 451–456, 2006.
- [31] D. Chen and Q. Ping Dou, "The Ubiquitin-Proteasome System as a Prospective Molecular Target for Cancer Treatment and Prevention," *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 11, no. 6, pp. 459–470, 2010.
- [32] R. A. Coleman and D. J. Trader, "Development and Application of a Sensitive Peptide Reporter to Discover 20S Proteasome Stimulators," *ACS Comb. Sci.*, vol. 20, no. 5, pp. 269–276, 2018.
- [33] E. Matuszczak, M. Tylicka, A. Hermanowicz, W. Debek, A. Sankiewicz, and E. Gorodkiewicz, "Application of SPR imaging biosensor for the measurement of 20S proteasomes in blood plasma of children with thermal injury," *Ann. Clin. Lab. Sci.*, vol. 46, no. 4, pp. 407–411, 2016.
- [34] D. Dutaud *et al.*, "Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma," *J. Immunol. Methods*, vol. 260, no. 1–2, pp. 183–193, 2002.
- [35] M. P. Latham, A. Sekhar, and L. E. Kay, "Understanding the mechanism of proteasome 20S core particle gating," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 15, pp. 5532–5537, 2014.
- [36] E. Gorodkiewicz, H. Ostrowska, and A. Sankiewicz, "SPR imaging

biosensor for the 20S proteasome: Sensor development and application to measurement of proteasomes in human blood plasma," *Microchim. Acta*, vol. 175, no. 1–2, pp. 177–184, 2011.

- [37] A. Oldziej *et al.*, "Assessment of proteasome concentration and chymotrypsin-like activity in plasma of patients with newly diagnosed multiple myeloma," *Leuk. Res.*, vol. 38, no. 8, pp. 925–930, 2014.
- [38] H. Fukasawa *et al.*, "Circulating 20S proteasome is independently associated with abdominal muscle mass in hemodialysis patients," *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. 1–11, 2015.
- [39] A. Sankiewicz *et al.*, "Development of surface plasmon resonance imaging biosensors for detection of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1," *Anal. Biochem.*, vol. 469, pp. 4–11, 2015.
- [40] D. Zhang and Q. Liu, "Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 75, pp. 273–284, 2016.
- [41] S. Vigneshvar, C. C. Sudhakumari, B. Senthilkumaran, and H. Prakash, "Recent Advances in Biosensor Technology for Potential Applications – An Overview," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 4, no. February, pp. 1–9, 2016.
- [42] R. Ramasamy, N. Gopal, V. Kuzhandaivelu, and S. Murugaiyan, "Biosensors in clinical chemistry: An overview," *Adv. Biomed. Res.*, vol. 3, no. 1, p. 67, 2014.
- [43] O. Tokel, F. Inci, and U. Demirci, "Advances in plasmonic technologies for point of care applications," *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 11, pp. 5728–5752, 2014.
- [44] J. Hu *et al.*, "Advances in paper-based point-of-care diagnostics," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 54, pp. 585–597, 2014.
- [45] S. Sang, Y. Wang, Q. Feng, Y. Wei, J. Ji, and W. Zhang, "Progress of new label-free techniques for biosensors: a review," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 8551, no. May, pp. 1–17, 2015.
- [46] S. Sharma, H. Byrne, and R. J. O’Kennedy, "Antibodies and antibody-derived analytical biosensors.," *Essays Biochem.*, vol. 60, no. 1, pp. 9–18, 2016.
- [47] R. M. L. Oliveira *et al.*, "Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: A new matrix for oligonucleotide hybridization," *J. Mater. Sci.*, vol. 45, no. 2, pp. 475–482, 2010.
- [48] L. A. Hernández, M. A. del Valle, and F. Armijo, "Electrosynthesis and

characterization of nanostructured polyquinone for use in detection and quantification of naturally occurring dsDNA," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 79, pp. 280–287, 2016.

- [49] M. A. Del Valle, M. Gacitua, F. R. Diaz, F. Armijo, and J. P. Soto, "Electro-synthesis and characterization of polythiophene nano-wires/platinum nano-particles composite electrodes. Study of formic acid electro-catalytic oxidation," *Electrochim. Acta*, vol. 71, pp. 277–282, 2012.
- [50] L. Li, Y. Shi, L. Pan, Y. Shi, and G. Yu, "Rational design and applications of conducting polymer hydrogels as electrochemical biosensors," *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 15, pp. 2920–2930, 2015.
- [51] L. Xia, Z. Wei, and M. Wan, "Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 341, no. 1, pp. 1–11, 2010.
- [52] G. C. Arteaga, M. A. Valle, M. Antilén, M. Romero, A. Ramos, and L. Hernández, "Nucleation and Growth Mechanism of Electro-synthesized Poly (pyrrole) on Steel," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 8, pp. 4120–4130, 2013.
- [53] X. Ma, W. Zhou, D. Mo, J. Hou, and J. Xu, "Effect of substituent position on electrodeposition, morphology, and capacitance performance of polyindole bearing a carboxylic group," *Electrochim. Acta*, vol. 176, pp. 1302–1312, 2015.
- [54] R. Salgado, R. Del Rio, M. A. Del Valle, and F. Armijo, "Selective electrochemical determination of dopamine, using a poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/polydopamine hybrid film modified electrode," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 704, pp. 130–136, 2013.
- [55] M. R. A. Ramírez, M. A. del Valle, F. Armijo, F. R. Díaz, M. Angélica Pardo, and E. Ortega, "Enhancement of electrodes modified by electrodeposited PEDOT-nanowires with dispersed Pt nanoparticles for formic acid electro-oxidation," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 134, no. 16, pp. 1–7, 2017.
- [56] M. A. del Valle, A. M. Ramírez, L. A. Hernández, F. Armijo, F. R. Díaz, and G. C. Arteaga, "Influence of the supporting electrolyte on the electrochemical polymerization of 3,4-ethylenedioxythiophene. effect on p- and n-Doping/Undoping, Conductivity And Morphology," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 11, no. 8, pp. 7048–7065, 2016.
- [57] J. V. da Silva, A. G. B. Madurro, and J. M. Madurro, "Modified electrode with reduced graphene oxide/poly(3-hydroxyphenylacetic acid): a new platform for oligonucleotide hybridization," *J. Solid State Electrochem.*, 2017.

- [58] H. . Mudila, S. . Rana, M. G. H. . Zaidi, and S. . Alam, "Polyindole/graphene oxide nanocomposites: The novel material for electrochemical energy storage," *Fullerenes Nanotub. Carbon Nanostructures*, vol. 23, no. 1, pp. 20–26, 2015.
- [59] V. Ruiz, Á. Colina, A. Heras, and J. López-Palacios, "Electropolymerization under potentiodynamic and potentiostatic conditions Spectroelectrochemical study on electrosynthesis of poly[4,4'-bis(2-methylbutylthio)-2,2'-bithiophene]," *Electrochim. Acta*, vol. 50, no. 1, pp. 59–67, 2004.
- [60] L. P. Rodrigues, D. C. Ferreira, M. T. Sonoda, A. G. B. Madurro, O. Abrahão, and J. M. Madurro, "Electropolymerization mechanisms of hydroxyphenylacetic acid isomers," *J. Mol. Struct.*, vol. 1072, no. 1, pp. 298–306, 2014.
- [61] Z. Cai, M. Geng, and Z. Tang, "Novel battery using conducting polymers: Polyindole and polyaniline as active materials," *J. Mater. Sci.*, vol. 39, no. 12, pp. 4001–4003, 2004.
- [62] W. Yu, J. Chen, Y. Fu, J. Xu, and G. Nie, "Electrochromic property of a copolymer based on 5-cyanoindole and 3,4-ethylenedioxythiophene and its application in electrochromic devices," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 700, pp. 17–23, 2013.
- [63] X. Ma, W. Zhou, D. Mo, B. Lu, F. Jiang, and J. Xu, "One-step template-free electrodeposition of novel poly(indole-7-carboxylic acid) nanowires and their high capacitance properties," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 5, pp. 3215–3223, 2015.
- [64] X. Ma, W. Zhou, D. Mo, Z. Wang, and J. Xu, "Capacitance comparison of poly(indole-5-carboxylic acid) in different electrolytes and its symmetrical supercapacitor in HClO₄ aqueous electrolyte," *Synth. Met.*, vol. 203, pp. 98–106, 2015.
- [65] G. Quartarone, A. Zingales, T. Bellomi, D. Bortolato, and G. Capobianco, "Study of inhibition mechanism and efficiency of indole-5-carboxylic acid on corrosion of copper in aerated 0.5 M H₂SO₄," *Br. Corros. J.*, vol. 35, no. 4, pp. 304–310, 2000.
- [66] G. Quartarone, L. Bonaldo, and C. Tortato, "Inhibitive action of indole-5-carboxylic acid towards corrosion of mild steel in deaerated 0.5 M sulfuric acid solutions," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 252, no. 23, pp. 8251–8257, 2006.
- [67] G. Quartarone, M. Battilana, L. Bonaldo, and T. Tortato, "Investigation of the inhibition effect of indole-3-carboxylic acid on the copper corrosion in 0.5 M H₂SO₄," *Corros. Sci.*, vol. 50, no. 12, pp. 3467–3474, 2008.
- [68] N. Chauhan, J. Narang, and U. Jain, "Amperometric acetylcholinesterase

- biosensor for pesticides monitoring utilising iron oxide nanoparticles and poly(indole-5-carboxylic acid),” *J. Exp. Nanosci.*, vol. 11, no. 2, pp. 111–122, 2016.
- [69] J. Narang, N. Chauhan, P. Rani, and C. S. Pundir, “Construction of an amperometric TG biosensor based on AuPPy nanocomposite and poly(indole-5-carboxylic acid) modified Au electrode,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 36, no. 4, pp. 425–432, 2013.
- [70] D. Pan *et al.*, “Electrochemical immunoassay for the biomarker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine using a glassy carbon electrode modified with chitosan and poly(indole-5-carboxylic acid),” *Microchim. Acta*, vol. 183, no. 1, pp. 361–368, Jan. 2016.
- [71] X. Li, J. Xia, and S. Zhang, “Label-free detection of DNA hybridization based on poly(indole-5-carboxylic acid) conducting polymer,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 622, no. 1–2, pp. 104–110, 2008.
- [72] G. Nie, Y. Zhang, Q. Guo, and S. Zhang, “Label-free DNA detection based on a novel nanostructured conducting poly(indole-6-carboxylic acid) films,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 139, no. 2, pp. 592–597, 2009.
- [73] G. Nie, Z. Bai, J. Chen, and W. Yu, “Simple label-free femtomolar DNA detection based on a nanostructure composite material: MWNT-doped poly(indole-6-carboxylic acid),” *ACS Macro Lett.*, vol. 1, no. 11, pp. 1304–1307, 2012.
- [74] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Third. 2013.
- [75] A. Iordănescu, M. Tertis, A. Cernat, M. Suci, R. Săndulescu, and C. Cristea, “Poly-(pyrrole-3-carboxylic acid) Based Nanostructured Platform for the Detection of Carcinoembryonic Antigen,” *Electroanalysis*, vol. 30, no. 6, pp. 1100–1106, 2018.
- [76] J. an A. Ho *et al.*, “Ultrasensitive electrochemical detection of biotin using electrically addressable site-oriented antibody immobilization approach via aminophenyl boronic acid,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 3, pp. 1021–1027, 2010.
- [77] R. Raghav and S. Srivastava, “Immobilization strategy for enhancing sensitivity of immunosensors: L-Asparagine-AuNPs as a promising alternative of EDC-NHS activated citrate-AuNPs for antibody immobilization,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 78, pp. 396–403, 2016.
- [78] M. Shen, J. F. Rusling, and C. K. Dixit, “Site-selective orientated immobilization of antibodies and conjugates for immunodiagnosics development,” *Methods*, vol. 116, pp. 95–111, 2017.

- [79] I. H. Cho *et al.*, “Current technologies of electrochemical immunosensors: Perspective on signal amplification,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 18, no. 1, pp. 1–18, 2018.
- [80] J. A. Peters, “Interactions between boric acid derivatives and saccharides in aqueous media: Structures and stabilities of resulting esters,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 268, pp. 1–22, 2014.
- [81] A. Makaraviciute and A. Ramanaviciene, “Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 50, pp. 460–471, 2013.
- [82] E. N. Primo, M. J. Kogan, H. E. Verdejo, S. Bollo, M. D. Rubianes, and G. A. Rivas, “Label-Free Graphene Oxide-Based Surface Plasmon Resonance Immunosensor for the Quantification of Galectin-3, a Novel Cardiac Biomarker,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 28, pp. 23501–23508, 2018.
- [83] S. Alegret, M. Del Valle, and A. Merkoçi, *Sensores Electroquímicos: Introducción a los quimiosensores y biosensores*. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona, 2004.
- [84] W. Zhou, R. Apkarian, Z. L. Wang, and D. Joy, “Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM),” *Scanning Microsc. Nanotechnol. Tech. Appl.*, pp. 1–40, 2007.
- [85] R. Schmitt, *CIRP Encyclopedia of Production Engineering*. 2017.
- [86] H. Background, R. Spectroscopy, S. Chandrasekhra, V. Raman, S. Raman, and H. Co, *Introductory Raman Spectroscopy*. 1948.
- [87] M. Brusatori, G. Auner, T. Noh, L. Scarpace, B. Broadbent, and S. N. Kalkanis, “Intraoperative Raman Spectroscopy,” *Neurosurg. Clin. N. Am.*, vol. 28, no. 4, pp. 633–652, 2017.
- [88] E. J. Samuelsen, “23 Raman spectroscopy,” pp. 2–4, 1960.
- [89] C. S. S. R. Kumar, *Nanotechnology characterization tools for biosensing and medical diagnosis*. 2018.
- [90] C. M. Pradier, M. Salmain, and S. Boujday, *IR spectroscopy for biorecognition and molecular sensing*, First Edit. Elsevier B.V., 2011.
- [91] J. D. Schuttlefield and V. H. Grassian, “ATR-FTIR spectroscopy in the undergraduate chemistry laboratory part I: Fundamentals and examples,” *J. Chem. Educ.*, vol. 85, no. 2, pp. 279–281, 2008.
- [92] R. J. Hamers, X. Wang, R. Franking, R. Ruther, and C. Stavis, *Infrared spectroscopy for characterization of biomolecular interfaces*, First Edit. Elsevier B.V., 2011.

- [93] C. Brett and A. Brett, "Electrochemistry: principles, methods, and applications," *Springer*, p. 427, 1993.
- [94] A. J. Bard, L. R. Faulkner, N. York, C. @bullet, W. Brisbane, and S. E. Toronto, *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*. 1944.
- [95] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*. 2000.
- [96] A. Lasia, *Electrochemical Impedance Spectroscopy and Corrosion.pdf* .
- [97] T. A. R. Silva, L. F. Ferreira, L. M. Souza, L. R. Goulart, J. M. Madurro, and A. G. Brito-Madurro, "New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid)," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 2, pp. 539–545, 2009.
- [98] F. Armijo, M. C. Goya, Y. Gimeno, M. C. Arévalo, M. J. Aguirre, and A. H. Creus, "Study of the electropolymerization of tetrakis (3-aminophenyl) porphyrin Fe(III) chloride on Au electrodes by cyclic voltammetry and STM," *Electrochem. commun.*, vol. 8, no. 5, pp. 779–784, 2006.
- [99] J. Aguirre *et al.*, "Study of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) as a coating for mitigation of biocorrosion of AISI 304 stainless steel in natural seawater," *Prog. Org. Coatings*, vol. 113, no. August, pp. 175–184, 2017.
- [100] M. Düdükçü and G. Avci, "Electrochemical synthesis and corrosion inhibition performance of poly-5-aminoindole on stainless steel," *Prog. Org. Coatings*, vol. 97, pp. 110–114, 2016.
- [101] D. Deletioğlu, E. Hasdemir, A. O. Solak, Z. Üstündağ, and R. Güzel, "Preparation and characterization of poly(indole-3-carboxaldehyde) film at the glassy carbon surface," *Thin Solid Films*, vol. 519, no. 2, pp. 784–789, 2010.
- [102] R. Mishra, S. Gupta, A. Kumar, and R. Prakash, "Morphology-controlled approach for bulk synthesis of conducting poly (5-aminoindole)," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 183, pp. 606–614, 2016.
- [103] K. Phasuksom and A. Sirivat, "Synthesis of nano-sized polyindole via emulsion polymerization and doping," *Synth. Met.*, vol. 219, pp. 142–153, 2016.
- [104] C. E. Compton, R. G. Banks, *Understanding Voltammetry, 2nd ed.*, 2nd ed. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2010.
- [105] D. R. Weinberg *et al.*, "Proton-coupled electron transfer," *Chemical Reviews*, vol. 112, no. 7. pp. 4016–4093, 2012.
- [106] A. Bieguński, A. Frydrychewicz, M. Osial, and K. Jackowska,

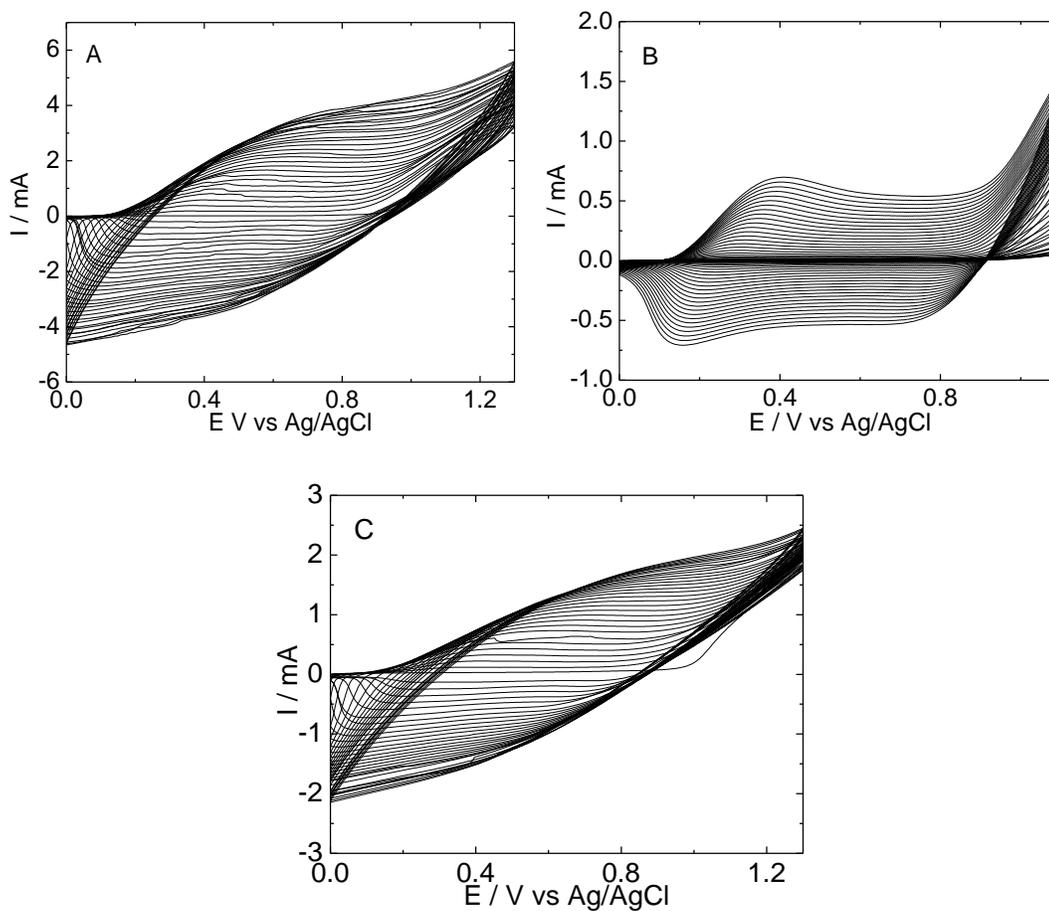
- “Electrochemical oxidation of catechol at poly(indole-5-carboxylic acid) electrode,” *Russ. J. Electrochem.*, vol. 46, no. 11, pp. 1297–1305, 2010.
- [107] E. Laviron, “Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 52, no. 3, pp. 355–393, 1974.
- [108] R. Saxena and S. Srivastava, “An insight into impedimetric immunosensor and its electrical equivalent circuit,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 297, no. January, p. 126780, 2019.
- [109] A. Oldziej *et al.*, “Assessment of proteasome concentration and chymotrypsin-like activity in plasma of patients with newly diagnosed multiple myeloma,” *Leuk. Res.*, vol. 38, no. 8, pp. 925–930, 2014.
- [110] A. Sankiewicz *et al.*, “Development of surface plasmon resonance imaging biosensors for detection of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1,” *Anal. Biochem.*, vol. 469, pp. 4–11, 2015.
- [111] S. Anna, M. Agnieszka, L. Zenon, P. Beata, and G. Ewa, “Methods for 20S Immunoproteasome and 20S Constitutive Proteasome Determination Based on SPRI Biosensors,” *Cell. Mol. Bioeng.*, vol. 10, no. 2, pp. 174–185, 2017.
- [112] A. Salek Maghsoudi *et al.*, “An Electrochemical Aptasensor Platform Based on Flower-Like Gold Microstructure-Modified Screen-Printed Carbon Electrode for Detection of Serpin A12 as a Type 2 Diabetes Biomarker,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. Volume 15, pp. 2219–2230, 2020.
- [113] P. Assari, A. A. Rafati, A. Feizollahi, and R. A. Joghani, “Fabrication of a sensitive label free electrochemical immunosensor for detection of prostate specific antigen using functionalized multi-walled carbon nanotubes/polyaniline/AuNPs,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 115, no. May, p. 111066, 2020.
- [114] H. Jia *et al.*, “Facile construction of poly (indole-5-carboxylic acid) @ poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) label-free immunosensing platform for sensitive detection of prostate specific antigen,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 839, no. March, pp. 202–209, 2019.
- [115] A. Dey, A. Kaushik, S. K. Arya, and S. Bhansali, “Mediator free highly sensitive polyaniline-gold hybrid nanocomposite based immunosensor for prostate-specific antigen (PSA) detection,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 29, pp. 14763–14772, 2012.
- [116] Y. He, Y. Chai, R. Yuan, H. Wang, L. Bai, and N. Liao, “A supersandwich electrochemiluminescence immunosensor based on mimic-intramolecular interaction for sensitive detection of proteins,” *Analyst*, vol. 139, no. 20, pp. 5209–5214, 2014.

- [117] Y. Liu, Y. Zhao, Z. Zhu, Z. Xing, H. Ma, and Q. Wei, "Ultrasensitive immunosensor for prostate specific antigen using biomimetic polydopamine nanospheres as an electrochemiluminescence superquencher and antibody carriers," *Anal. Chim. Acta*, vol. 963, pp. 17–23, 2017.
- [118] C. Yang, Q. Guo, Y. Lu, B. Zhang, and G. Nie, "Ultrasensitive 'signal-on' electrochemiluminescence immunosensor for prostate-specific antigen detection based on novel nanoprobe and poly(indole-6-carboxylic acid)/flower-like Au nanocomposite," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 303, no. September 2019, p. 127246, 2020.
- [119] K. Deng, H. Wang, J. Xiao, C. Li, S. Zhang, and H. Huang, "Polydopamine nanospheres loaded with L-cysteine-coated cadmium sulfide quantum dots as photoelectrochemical signal amplifier for PSA detection," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1090, pp. 143–150, 2019.
- [120] Y. X. Dong, J. T. Cao, Y. M. Liu, and S. H. Ma, "A novel immunosensing platform for highly sensitive prostate specific antigen detection based on dual-quenching of photocurrent from CdSe sensitized TiO₂ electrode by gold nanoparticles decorated polydopamine nanospheres," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 91, no. October 2016, pp. 246–252, 2017.
- [121] T. Vural, Y. T. Yaman, S. Ozturk, S. Abaci, and E. B. Denkbas, "Electrochemical immunoassay for detection of prostate specific antigen based on peptide nanotube-gold nanoparticle-polyaniline immobilized pencil graphite electrode," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 510, pp. 318–326, 2018.
- [122] Y. Li *et al.*, "An ultrasensitive electrochemical immunosensor for the detection of prostate-specific antigen based on conductivity nanocomposite with halloysite nanotubes," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, no. 12, pp. 3245–3251, 2017.
- [123] L. Suresh, J. S. Bondili, and P. K. Brahman, "Fabrication of Immunosensor Based on Polyaniline, Fullerene-C60 and Palladium Nanoparticles Nanocomposite: An Electrochemical Detection Tool for Prostate Cancer," *Electroanalysis*, pp. 1–11, 2020.
- [124] Q. Xu *et al.*, "Hierarchical Ti₃C₂ MXene-derived sodium titanate nanoribbons/PEDOT for signal amplified electrochemical immunoassay of prostate specific antigen," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 860, p. 113869, 2020.
- [125] H. Jia *et al.*, "Three-dimensional Au nanoparticles/nano-poly(3,4-ethylene dioxothiophene)- graphene aerogel nanocomposite: A high-performance electrochemical immunosensing platform for prostate specific antigen detection," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 260, pp.

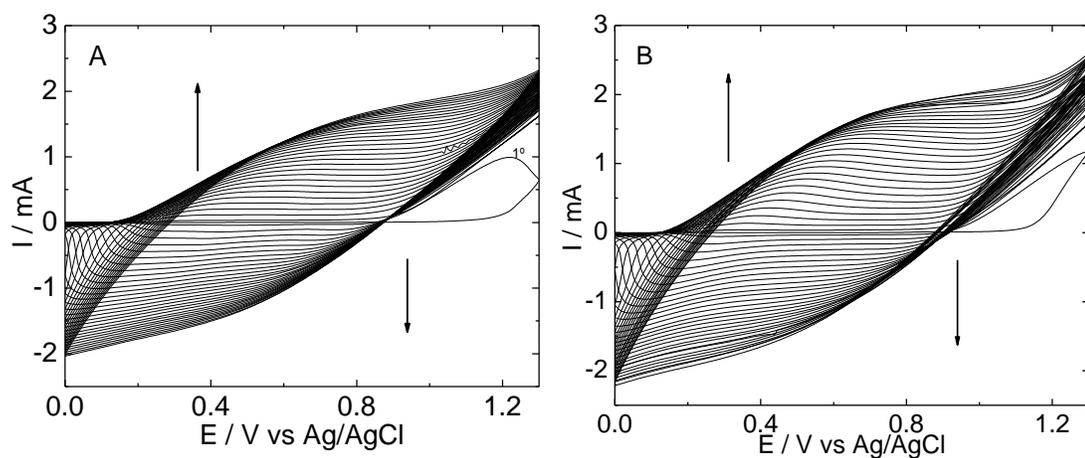
990–997, 2018.

- [126] M. Fallah, M. Rahimnejad, M. Asghary, and M. Mashkour, “An electrochemical sensor based on a carbon paste electrode for the determination of buserelin,” *Anal. Methods*, vol. 12, no. 1, pp. 33–38, 2019.
- [127] M. F. Mousavi, M. Amiri, A. Noori, and S. M. Khoshfetrat, “A Prostate Specific Antigen Immunosensor Based on Biotinylated-Antibody/Cyclodextrin Inclusion Complex: Fabrication and Electrochemical Studies,” *Electroanalysis*, vol. 29, no. 12, pp. 2818–2831, 2017.
- [128] M. Shaban, M. Hasanzadeh, and E. Solhi, “An Fe₃O₄/PEDOT:PSS nanocomposite as an advanced electroconductive material for the biosensing of the prostate-specific antigen in unprocessed human plasma samples,” *Anal. Methods*, vol. 11, no. 44, pp. 5661–5672, 2019.
- [129] J. Wang, Y. Wang, H. Chen, H. Xu, W. Wang, and L. Bai, “Sensitive and simultaneous detection of tumor markers assisted by novel functional polymer brush/Au nanoparticles composite,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 258, pp. 998–1007, 2018.
- [130] B. G. Duran, E. Castañeda, and F. Armijo, “Development of an electrochemical impedimetric immunosensor for Corticotropin Releasing Hormone (CRH) using half-antibody fragments as elements of biorecognition,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 131, no. February, pp. 171–177, 2019.
- [131] R. Ziółkowski, M. Jarczewska, M. Drozd, A. A. Zasada, and E. Malinowska, “Studies on the Development of Electrochemical Immunosensor for Detection of Diphtheria Toxoid,” *J. Electrochem. Soc.*, vol. 166, no. 6, pp. B472–B481, 2019.

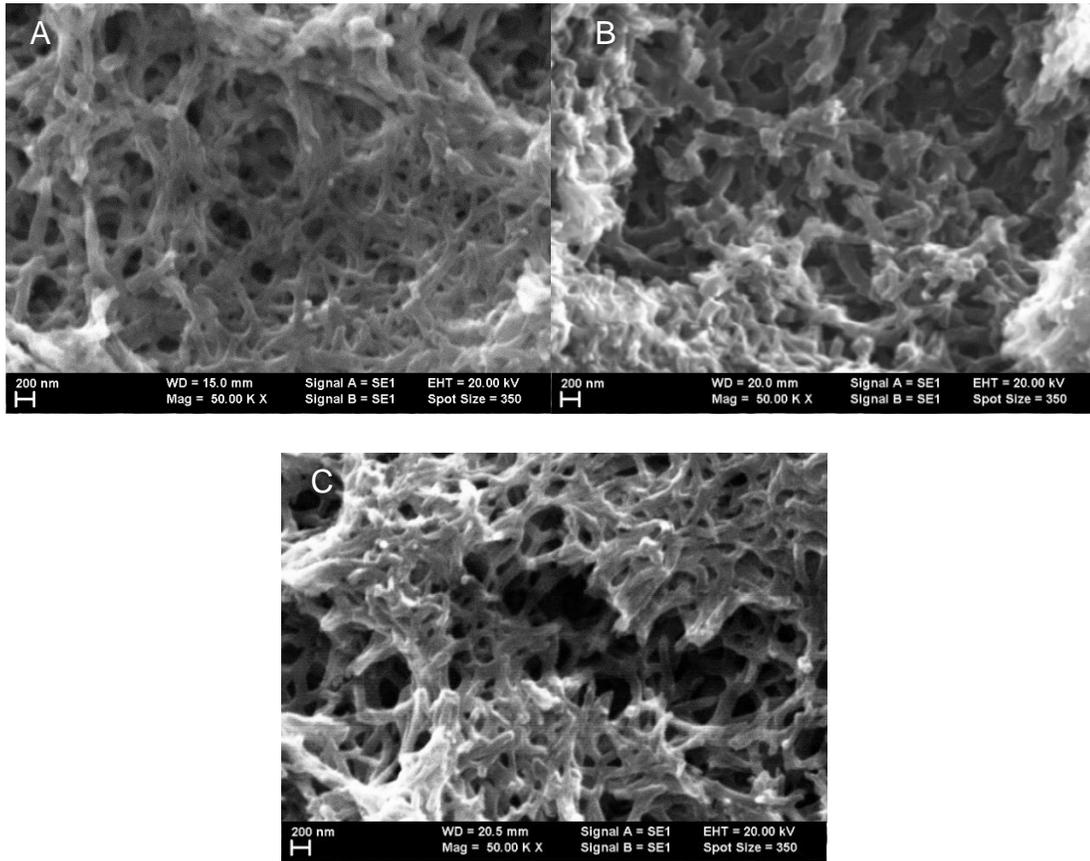
Anexos



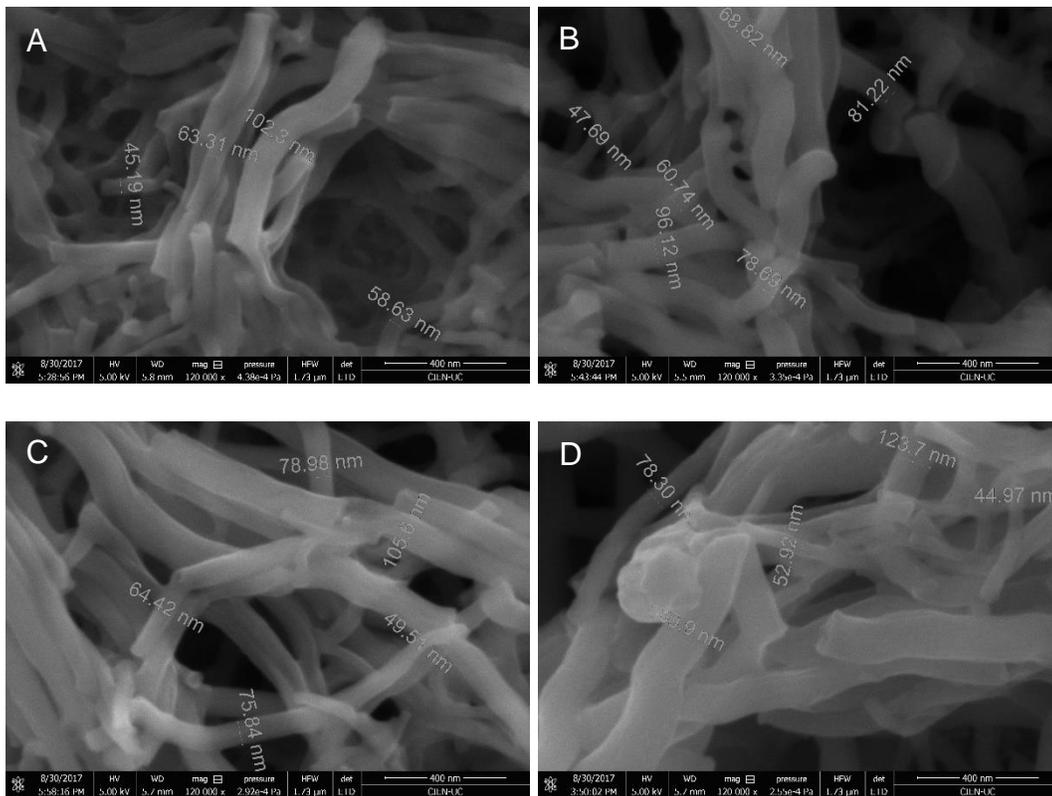
Anexo 1. Electropolimerización de 10 mM de 6-ICA (A) y 5-ICA (B) en 0.1 M de $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ sobre Au-Si y (C) 6-ICA sobre PEDOT/FTO, (5 ciclos de PEDOT entre -0.6 y 1.5 V a 100 mVs^{-1}), por voltamperometría cíclica, 30 ciclos a una velocidad de $80 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ de barrido de potencial.



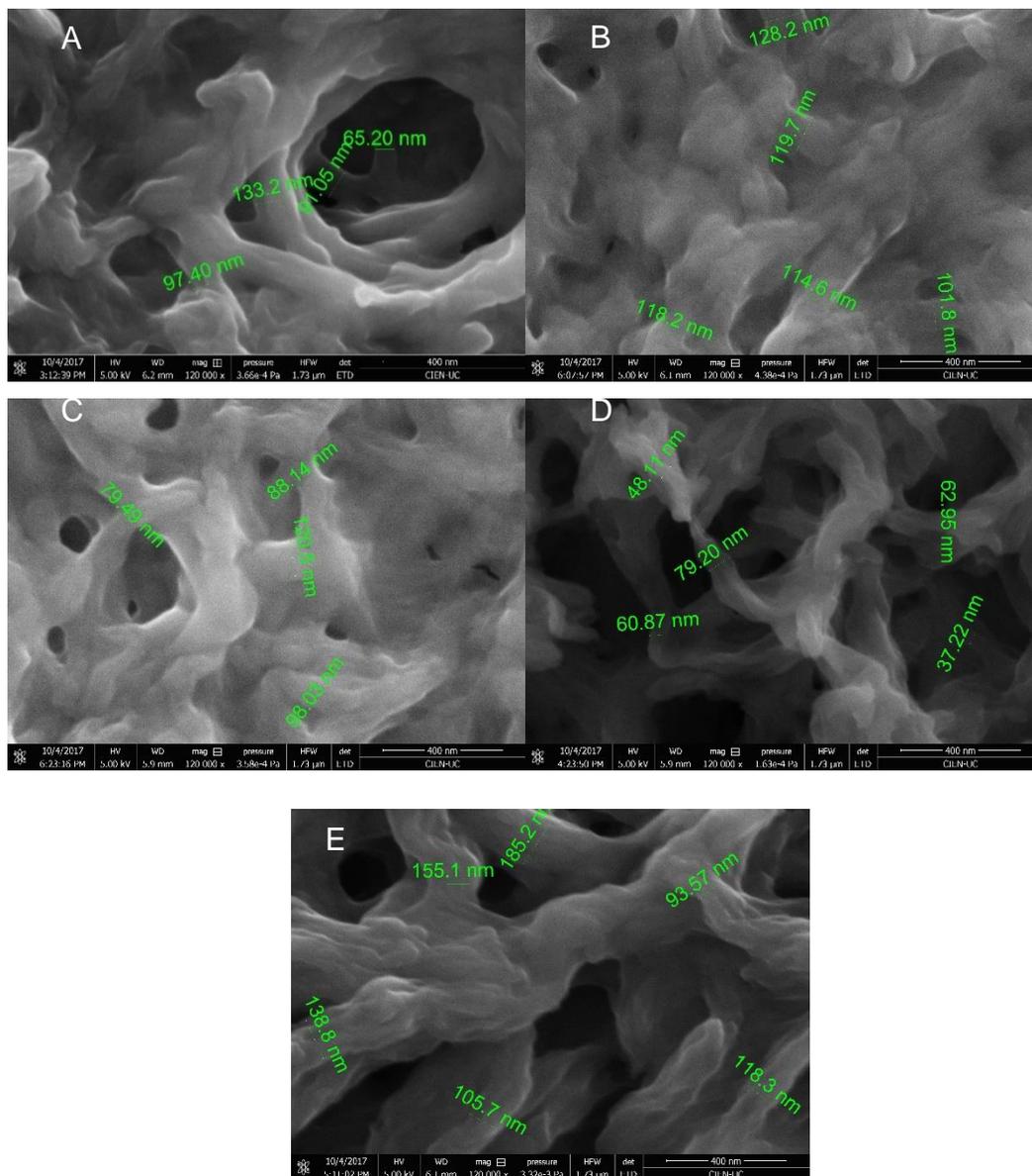
Anexo 2. Electropolimerización de 10 mM de 6-ICA (A) y 5-ICA (B) en 0.1 M de $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ sobre FTO entre 0 y 1,3 V, por voltamperometría cíclica, 30 ciclos a 80 mVs^{-1} de barrido de potencial.



Anexo 3. Imágenes SEM de 6-PICA sobre A) GC, B) Au-Si y C) PEDOT/FTO por CV, durante 30 ciclos a $80 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ de barrido de potencial, en $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ 0.1M.



Anexo 4. Imagen SEM de 6-PICA obtenidos sobre FTO por potencial fijo de 900, 950 y 1000 mV y aplicando dos pulsos de 1200 y 200 mV durante 4 y 1 segundos, respectivamente, en $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ 0.1M.



Anexo 5. Imagen SEM de 5-PICA sobre FTO por A) CV 30 ciclos a 80 mV·s⁻¹; potencial fijo a: B) 1050 mV y C) 1100 mV; aplicación de dos pulsos a 1300 y 200 mV durante: D) 2 y 1 segundos y E) 4 y 1 segundos, respectivamente, por 500 ciclos, todos obtenidos en LiClO₄/ACN 0.1M.

Anexo 6

Pruebas t de Student para determinar si hay diferencia estadísticamente significativa entre la media de dos grupos. Aplicado para las optimizaciones de tiempo y temperatura, donde el grupo uno será el menor tiempo o temperatura de incubación, según corresponda, frente al grupo dos, que corresponderá a cada una de las otras variables, evaluadas uno a uno, los ensayos fueron realizados con un 95% de confianza. A modo de ejemplo:

H_0 = Hipótesis nula: No existen diferencias estadísticamente significativas entre la media del grupo 1 (tiempo incubación de 2 horas para el anticuerpo Anti-KLK3) y la del grupo 2 (tiempo de incubación de 4 horas para el anticuerpo Anti-KLK3).

$$H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$$

H_1 = Hipótesis alternativa: Existen diferencias estadísticamente significativas entre la media del grupo 1 (tiempo incubación de 2 horas para el anticuerpo Anti-KLK3) y la del grupo 2 (tiempo de incubación de 4 horas para el anticuerpo Anti-KLK3).

$$H_1 : \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$$

$p > 0,05 \rightarrow$ No existen diferencias significativas entre las medias, por lo tanto, hay suficientes evidencias para Aceptar la hipótesis nula en contra de la hipótesis alternativa.

$p < 0,05 \rightarrow$ Hay diferencias significativas entre las medias, por lo tanto, hay suficientes evidencias para rechazar la hipótesis nula a favor de la hipótesis alternativa.

Los datos fueron obtenidos utilizando el programa estadístico Minitab.

Tabla S1. Valor p, por t-Student, en la optimización del tiempo de incubación de APBA. (Nivel de significancia de 0,05).

	valor p	H ₀ valor p
2 - 4 horas	0,254	Aceptada
2 - 6 horas	0,009	Rechazada
2 - 8 horas	0,004	Rechazada
2 - 20 horas	0,004	Rechazada

Tabla S2. Valor p, por t-Student, en la optimización del tiempo de incubación de Anti-KLK3. (Nivel de significancia de 0,05).

	valor p	H ₀ valor p
2 - 4 horas	0,91	Aceptada
2 - 6 horas	0,312	Aceptada
2 - 8 horas	0,243	Aceptada
2 - 20 horas	0,241	Aceptada

Tabla S3. Valor p, por t-Student, en la optimización de la temperatura de incubación de Anti-KLK3. (Nivel de significancia de 0,05).

	valor p	H ₀ valor p
4 – 20°C	0,029	Rechazada
4 – 36°C	0,064	Rechazada

Tabla S4. Valor p, por t-Student, en la optimización tiempo de incubación de PSA. (Nivel de significancia de 0,05).

	valor p	H ₀ valor p
1 - 2 horas	0,427	Aceptada
1 - 4 horas	0,009	Rechazada
1 - 48 horas	0,069	Aceptada