



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

*“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”*



**DESARROLLO DE UN SUSTRATO ORGÁNICO A BASE DE CUTÍCULA DE AGAVE  
PARA LA DETECCIÓN DEL BIOMARCADOR CARDIACO TROPONINA I (TNIC)**

TESIS

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**Anel Irán Saviñón Flores**

Directora de tesis:

Dra. Alia Méndez Albores



Julio 2023



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



*"La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra"*

**DESARROLLO DE UN SUSTRATO ORGÁNICO A BASE DE CUTÍCULA DE AGAVE  
PARA LA DETECCIÓN DEL BIOMARCADOR CARDIACO TROPONINA I (TNIC)**

TESIS

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**Anel Irán Saviñón Flores**

Comité tutorial:

Directora	Dra. Alia Méndez Albores
Co-Director	Dr. Miguel Ángel González Fuentes
Tutor	Dr. J Santos Hernández Zepeda
Integrante Comité Tutorial	Dr. Jorge Antonio Yañez Santos
Integrante Comité Tutorial	Dr. Alejandro Carabarin Lima

Julio 2023

# *Resumen*

En el presente trabajo se realiza el desarrollo de un sustrato orgánico a base de cutícula de agave para la detección del biomarcador cardíaco troponina I (TnIc). La troponina I cardíaca es una proteína que se libera en la sangre en respuesta a daño o estrés en el músculo cardíaco, lo que la convierte en un biomarcador clave para el diagnóstico de enfermedades cardíacas, especialmente infarto agudo de miocardio (IAM).

En esta investigación, se propone utilizar la cutícula de agave, un material orgánico abundante y de bajo costo, como sustrato para la detección de TnIc. La cutícula de agave se procesa y se modifica químicamente para mejorar su capacidad de unión y sensibilidad hacia la TnIc. Se espera que este sustrato tenga propiedades específicas que permitan una interacción selectiva y eficiente con la proteína objetivo.

El objetivo principal de esta tesis es desarrollar un sustrato orgánico para la detección de TnIc utilizando la cutícula de agave modificada. Se llevará a cabo un enfoque multidisciplinario que involucra técnicas de química, bioquímica y análisis de materiales para optimizar las condiciones de detección y evaluar homogeneidad, estabilidad e inmovilización de anticuerpos sobre este sustrato.

Se espera que este sustrato orgánico ofrezca ventajas significativas en comparación con los sustratos convencionales utilizados en la detección de TnIc. Estas ventajas pueden incluir una mayor sensibilidad, selectividad y estabilidad, así como una reducción en los costos de producción. Además, el uso de un material orgánico renovable como la cutícula de agave también tiene beneficios ambientales al reducir la dependencia de materiales sintéticos y no biodegradables.

Este trabajo de tesis se encuentra estructurado de la siguiente manera:

*Introducción.* La motivación del trabajo, justificación, planteamiento del problema, objetivos generales y particulares e hipótesis, que en conjunto buscan dar pauta a la realización de este trabajo.

*Marco Teórico.* Se integran los antecedentes e información documentada y actualizada sobre el tema, los descubrimientos, avances y tecnologías aplicadas al estudio de esta línea de investigación. En esta sección se abordan temas relacionados con las enfermedades cardiovasculares y el desarrollo de pruebas rápidas de detección utilizando el Inmunoensayo de Flujo Lateral (IFL). Se destaca la complejidad de las enfermedades cardiovasculares y la necesidad de abordarlas como sistemas complejos. Se analiza el panorama global y en México de estas enfermedades, resaltando su alta incidencia y su impacto en la salud pública. Además, se realiza una revisión histórica de los inmunoensayos utilizados para detectar la troponina I cardíaca (TnIc), un biomarcador crucial en el diagnóstico de enfermedades cardíacas y la utilización de la cutícula de agave como material biodegradable para la construcción de dispositivos de detección.

*Marco conceptual:* Proporciona el contexto teórico y metodológico en el que se basa la investigación, incluyendo el tipo de investigación realizada, el paradigma de investigación adoptado y las teorías que fundamentan el estudio.

*Metodología.* Se describen las herramientas y procedimientos empleados para lograr los objetivos generales y específicos. Se describen los procesos de acondicionamiento de la membrana de cutícula de agave (CA), deposición de nanotubos de carbono (CTN) sobre CA, funcionalización aminada de los CTN, inmovilización de los anticuerpos y la técnica utilizada para la detección del anclaje de los anticuerpos sobre el sustrato.

*Resultados y Discusión.* En esta sección se integran evidencias de las actividades realizadas en el apartado de metodología. Se realizaron diversas caracterizaciones utilizando técnicas como SEM, FTIR, espectroscopia Raman e Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para analizar la morfología, composición química y presencia de los componentes en los sustratos desarrollados, así como la presencia de los anticuerpos anti-TnIc.

*Conclusiones.* Finamente se describen las conclusiones del estudio con la finalidad de demostrar la efectividad del tratamiento térmico-químico de la cutícula de agave para preparar adecuadamente el sustrato, facilitando la deposición electroforética de CTN sobre la CA y logrando un recubrimiento homogéneo. así como la inmovilización de los anticuerpos anti-TnIc. En cuanto a la inmovilización de los anticuerpos anti-TnIc sobre la CA-CNT, se ha observado una distribución más uniforme de la fluorescencia. Esto sugiere una mayor eficiencia en la inmovilización de los anticuerpos sobre el sustrato CA-CNT.

*A Ma. Eugenia*

*A Fernanda*

*A Pablo*

*A Jesús*

*Por su amor, paciencia y apoyo... mí familia.*

*Los Amo.*

# *Agradecimientos*

Gracias a Dios, por darme sabiduría, salud, fortaleza en todo este tiempo, por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad. Por permitirme llegar al término de la Maestría.

A mis hermanos, por su gran amor, apoyo y comprensión, por ser un ejemplo de valentía y por ser quienes me enseñaron a creer otra vez en mí y en mis capacidades. Por estar en los momentos más importantes de mi vida.

A Francisco, por ser parte de mi vida, por llenar mi vida de amor y alegrías cuando más lo he necesitado.

A mi mamá, por los valores que me ha inculcado, por enseñarme que solo a base de esfuerzo, responsabilidad y perseverancia se puede lograr una meta, por su amor y paciencia.

A mi directora Dra. Alia Méndez Albores por apoyar este proyecto, por ser paciente y alentarme, por la confianza depositada y por compartirme un poco de su experiencia y conocimiento.

A mi co-Asesor Dr. Miguel Angel González Fuentes, por ser mi guía, por compartirme su conocimiento, por ser parte fundamental y apoyarme incondicionalmente en este proyecto.

A mi casa de estudios, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, institución de enorme calidad, que me brindó todo el apoyo durante mi preparación en la maestría.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

A Selene, Miguel y Hugo con quién compartí tanto en el laboratorio, por su cariño, por los días en los que no podía más y me alentaban a seguir adelante, y llegar conmigo hasta el final.

## *Abreviaturas y Siglas*

**TncI:** troponina I cardiaca

**anti-TncI:** anticuerpo troponina I cardiaca

**IFL:** Inmunoensayo de Flujo Lateral

**SERS:** Espectroscopia Raman de superficie aumentada.

**SEM:** Microscopia electrónica de barrido.

**FT-IR:** Infrarrojo por transformada de Fourier.

**CTN:** Multi-Walled Carbon Nanotubes, Nanotubos de carbono de pared múltiple.

**DTNB:** (5,5'-dithiobis (2- nitrobenzoic acid)).

**EDC:** 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida hidrocioruro.

**NHS:** N-hidroxisucininimida.

**CTAB:** Hexadeciltrimetilamonio.

# Contenido

1.	Introducción .....	1
1.1	Planteamiento del Problema .....	2
2.	Justificación .....	5
3.	Pregunta de Investigación .....	7
4.	Hipótesis .....	8
5.	Objetivos .....	9
5.1	Objetivo General .....	9
5.2	Objetivos Particulares .....	9
6.	Marco Teórico .....	10
6.1	Enfermedades Cardiovasculares, un Sistema Complejo de Estudio .....	11
6.2	Panorama Mundial y en México de las Enfermedades Cardiovasculares .....	11
6.3	Breve historia de los Inmunoensayos para la detección de TnIc. ....	12
6.4	IFL como tendencia para desarrollo de pruebas rápidas .....	13
6.5	Inmunoensayo de Flujo Lateral (IFL) .....	14
6.5.1	IFL formato tipo “sándwich”. ....	15
6.6	Bioquímica de la Troponina I cardiaca (TnIc) .....	16
6.7	Anticuerpos para Troponina I cardiaca (anti-TnIc). ....	17
6.8	Materiales biodegradables para la construcción de los IFL: Cutícula de Agave ( <i>Agave spp.</i> ). 18	
7.	Marco Conceptual .....	20
7.1	Tipo de Investigación .....	21
7.2	Paradigma de la Investigación .....	21
7.3	Teorías que sustenta la investigación .....	21
8.	Metodología .....	22
8.1	Acondicionamiento membrana de cutícula de agave (CA). ....	24
8.2	Deposito electroforético de nanotubos de carbono de multicapa (CTN) sobre la CA. 24	
8.2.1	Funcionalización aminada de CNT .....	24
8.3	Inmovilización de anticuerpo policlonal (anti-TnIc) sobre cutículas de CA-CNT .....	26
8.3.1	Inmunofluorescia indirecta (IFI) .....	26

9. Resultados y Discusión .....	27
Actividad 1. Acondicionamiento membrana de cutícula de agave (CA).....	28
9.1 Caracterización por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	28
9.2 Caracterización por Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).....	29
Actividad 2. Deposito electroforético de nanotubos de carbono de multicapa (CTN) sobre CA. 31	
9.3 Caracterización de morfología por SEM. ....	31
9.4 Caracterización por espectroscopia Raman. ....	33
9.4.1 Evaluación de la homogeneidad y reproducibilidad de los sustratos CA-CNT.....	34
9.5 Caracterización por FT-IR. ....	38
Actividad 3. Inmovilización de anticuerpo policlonal (anti-TnIc) sobre la CA-CNT. ....	40
9.6 Caracterización por espectroscopia Raman .....	40
9.7 Caracterización por FT-IR. ....	42
9.8 Identificación de anticuerpos policlonales anti-TnIc anclados sobre el sustrato CA-CTN por Inmunofluorescencia indirecta (IFI). ....	46
10. Conclusiones .....	49
12. Literatura citada .....	52
Anexo 1 .....	60
Anexo 2 .....	61
Productos del Proyecto.....	64

## Índice de Figuras

<b>Figura 6.1</b> Factores de riesgo en las ECV (Elaboración propia).....	11
<b>Figura 6.4</b> Significado de las siglas REASSURED (Elaboración propia).....	14
<b>Figura 6.5</b> Partes de un Inmunoensayo de Flujo Lateral Koczula y Gallotta (2016).....	15
<b>Figura 6.6</b> Mapa epitópico de TnIc que contiene las secuencias de aminoácidos de los epítomos externos e internos más importantes adaptado de HyTest (2022) y Filatov et al. (1998).....	16
<b>Figura 6.8.</b> Representación de la cutícula de una planta incluyendo sus elementos genéricos...	19
<b>Figura 8.</b> Diagrama general de la metodología .....	23
<b>Figura 8.1</b> Proceso de acondicionamiento membrana de cutícula de agave .....	24
<b>Figura 8.2.1</b> Reacción de funcionalización de CTN-NH <sub>2</sub> .....	25
<b>Figura 8.2.2</b> Proceso de depósito electroforético de CTN sobre la CA .....	25
<b>Figura 9.1</b> Micrografía SEM 100 µm: a) CA-no tratada, b) CA-tratada y SEM 50 µm: c) CA-no tratada, d) CA-tratada.....	28
<b>Figura 9.2</b> Espectros FTIR de la muestra de: a) CA-no tratada y b) CA-tratada.....	29
<b>Figura 9.3</b> Colección de micrografías 100, 50 y 10 µm: cutícula de agave natural-tratada, 1V cutícula de agave-nanotubos de carbono y 3V cutícula de agave-nanotubos de carbono .....	32
<b>Figura 9.4</b> Espectro Raman de: a) cutícula de agave-tratada, b) 1V cutícula de agave con nanotubos de carbono y c) 3 V cutícula de agave con nanotubos de carbono.....	33
<b>Figura 9.4.1</b> Espectro Raman de 5 repeticiones de diferentes zonas del mismo sustrato 1V cutícula de agave con nanotubos de carbono <b>A</b> ). Gráfica de barras de error de 1V cutícula de agave con nanotubos de carbono indicando a) desviación estándar, b) Error estándar y c) Intervalo de confianza <b>B</b> ) .....	34
<b>Figura 9.4.2</b> Espectro Raman de 5 repeticiones en diferentes zonal del mismo sustrato de 3V cutícula de agave con nanotubos de carbono <b>C</b> ). Gráfica de barras de error de 3V cutícula de agave con nanotubos de carbono indicando a) desviación estándar, b) Error estándar y c) Intervalo de confianza <b>D</b> ) .....	35
<b>Figura 9.4.3</b> Espectro Raman de 5 repeticiones de diferentes sustratos a 1V cutícula de agave con nanotubos de carbono <b>A</b> ). Gráfica de barras de error de 1V cutícula de agave con nanotubos de carbono indicando a) desviación estándar, b) Error estándar y c) Intervalo de confianza <b>B</b> ).....	36

<b>Figura 9.4.4</b> Espectro Raman de 5 repeticiones de diferentes sustratos a 3V cutícula de agave con nanotubos de carbono C). Gráfica de barras de error de 3V cutícula de agave con nanotubos de carbono indicando a) desviación estándar, b) Error estándar y c) Intervalo de confianza D).....	37
<b>Figura 9.5</b> Espectros FTIR de: a) CA-blanco y b) 1V CA-CTN y c) 3V CA-CTN.....	38
<b>Figura 9.6.1</b> Espectros Raman de: a) 1 V cutícula de agave con nanotubos de carbono y b) 1 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc.....	40
<b>Figura 9.6.2</b> Espectros Raman de: a) 3 V cutícula de agave con nanotubos de carbono y b) 3 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc.....	41
<b>Figura 9.7.1</b> Espectros FTIR de: a) 1 V cutícula de agave con nanotubos de carbono y b) 1 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc.....	41
<b>Figura 9.7.2</b> Espectros FTIR de: a) 3 V cutícula de agave con nanotubos de carbono y b) 3 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc.....	
<b>Figura 9.8.1</b> Micrografía 100x de 1 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc, después de la aplicación de la t IFD.....	46
<b>Figura 9.8.2</b> Micrografía 100x de 3 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc, después de la aplicación de la técnica IFD.....	47

## Índice de Tablas

<b>Tabla 9.2</b> Números de onda característicos y asignación de grupos funcionales de: CA-no tratada y CA-tratada.....	29
<b>Tabla 9.5</b> Números de onda característicos y asignación de grupos funcionales de: cutícula de agave-tratada (CA_tratada) y 1 V y 3V cutícula de agave con nanotubos de carbono (CA-CTN).....	38
<b>Tabla 9.7.1</b> Números de onda característicos y asignación de grupos funcionales de: 1V cutícula de agave-nanotubos de carbono (CA-CTN) y 1 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc (CA-CTN_anti-TnIc).....	42
<b>Tabla 9.7.2</b> Números de onda característicos y asignación de grupos funcionales de: 3 V cutícula de agave-nanotubos de carbono (CA-CTN) y 3 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc (CA-CTN_anti-TnIc).....	44

# 1. Introducción

## 1.1 Planteamiento del Problema

Las Enfermedades Cardiovasculares (ECV) son un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan tanto al sistema circulatorio (venas, arterias y capilares) como al músculo cardíaco (Browne, 1984; WHF, 2021). Dentro de éstas, las más frecuentes incluyen infarto agudo al miocardio (IAM), cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca (IC), trombosis, angina de pecho inestable (AI), entre otras (WHF, 2021; OMS, 2021). Hoy en día, las ECV representan un grave problema de salud pública (WHF, 2022) y han sido incluidas en la meta 3.4 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 de Naciones Unidas en 2015, donde se estableció reducir la mortalidad prematura de las enfermedades no transmisibles en un 33%, incluidas las ECV (OMS, 2016).

Ahora se sabe que la contaminación contribuye al riesgo de enfermedades cardiovasculares y su mortalidad asociada, respaldado en evidencia sustantiva de múltiples mecanismos que pueden impulsar esta asociación. Un 31% de las enfermedades cardiovasculares podrían evitarse si se eliminan los contaminantes ambientales. Así lo indica la Organización mundial de la Salud (OMS, 2011a), posicionando el impacto ambiental como uno de los principales responsables de estas enfermedades a nivel mundial. En consecuencia, a esta problemática, la mayoría de las enfermedades cardiovasculares se pueden abordar integrando los factores de riesgo a la clínica del paciente. Actualmente, los factores de riesgo se dividen en cuatro categorías: factores biológicos modificables (obesidad, diabetes, hipertensión, etc.) y no modificables (edad, género, etnia y predisposición genética), factores conductuales (hábitos alimenticios, sedentarismo, estrés, etc.), factores ambientales (contaminación antropogénica, condiciones insalubres, entre otros) y factores de influencia global (urbanismo, migración, desarrollo socioeconómico, pandemias, etc.) (Ferrari, 2020; Hessami, *et al.*, 2020; Narro Robles, 2018).

Con respecto al impacto que ha producido la actual pandemia provocada por el virus SARS-CoV-2 (COVID-19), se ha reportado que la presencia de este virus facilita la progresión de las ECV, o bien permite su desarrollo debido a la respuesta tromboinflamatoria provocada por la infección viral, lo que desencadena un aumento en los niveles de ciertos biomarcadores cardíacos presentes en la sangre (Zheng, 2020; Dhakal, 2020; Cucinotta, 2020). La detección de biomarcadores cardíacos juega un papel fundamental para coadyuvar en un diagnóstico más certero y oportuno de las ECV (Aydin, 2019). Dentro de estos biomarcadores, se encuentra la troponina I cardíaca (TnIc),

una isoforma del complejo de troponina que se libera como consecuencia de procesos como isquemia coronaria, necrosis celular, apoptosis o autofagia de las células miocárdicas (células del corazón) (Januzzi, 2018). Actualmente este biomarcador es considerado el estándar de oro para la detección de IAM, pero no está limitado a esta enfermedad, ya que la elevación de troponina puede ocurrir en situaciones variadas, es decir, por causas cardiacas o no-cardiacas (Kelley, 2009).

Las pruebas de diagnóstico para la TnIc se dividen en pruebas centralizadas y en pruebas de diagnóstico en el punto de atención, ambas categorías incluyen inmunoensayos sensibles y ultrasensibles, siendo la diferencia principal el tiempo de la emisión de los resultados y el tipo de información obtenida. Las pruebas centralizadas proporcionan información cuantitativa, pero tienen un promedio de emisión de resultados de uno o más días. Las de diagnóstico en el punto de atención son pruebas rápidas cualitativas con resultados entre de 5 a 30 min después de la toma de muestra (Tripoliti, 2020).

Durante la última década se ha destacado el uso de la técnica de inmunoensayo de flujo lateral (IFL) en sus diferentes formatos (sándwich, indirecto y competitivo) en el área de las pruebas en el punto de atención (Koczula, 2016; O'Farrell, 2008). Lo anterior, debido a las bondades que presenta como la simplicidad del diseño, son compactos, fáciles de transportar y almacenar ya que no requieren cadena de frío. Por otro lado, sus protocolos de uso son más simples y no demandan personal altamente especializado y los resultados son rápidos y fáciles de interpretar (Andryukov, 2020). El desarrollo de los IFL ha demostrado tener una continua evolución incluso para competir con las pruebas centralizadas cuando se acoplan a técnicas (principalmente espectroscópicas) que permiten la obtención de información cuantitativa sin sacrificar el tiempo de respuesta.

Los IFL están basados en el uso de membranas de nitrocelulosa y comprende los siguientes componentes: almohadilla de muestra, almohadilla del conjugado, líneas de sensado y control y almohadilla absorbente. La sensibilidad, especificidad, rangos de cuantificación y precisión obtenidos con el uso de los IFL dependen directamente del desempeño de cada uno de sus componentes y de la técnica con la que se acople, por lo que las optimizaciones de estos sistemas de diagnóstico pueden ser abordados considerando estas rutas.

Para el caso de los IFL en formato tipo sándwich (el analito se une entre dos anticuerpos específicos) en las líneas de sensado y control se inmovilizan anticuerpos directamente sobre la membrana de nitrocelulosa. Sin embargo, esta metodología presenta ciertas limitaciones que derivan en una pobre sensibilidad, especificidad y repetibilidad del sistema debido a que su elevada porosidad amplía los efectos de interfaz y favorece la absorción y adsorción de biomoléculas no objetivo provenientes del fluido biológico y disminuye la eficiencia de unión del analito (De Puig *et al.*, 2017).

En este proyecto se plantea la inmovilización del anticuerpo anti-TnIc sobre cutícula de agave (CA) recubierta con nanotubos de carbono (CNT) como una alternativa para la formación de la línea de sensado en un IFL para la detección del biomarcador cardíaco TnIc. El sustrato propuesto tendrá un mejor desempeño comparado con las membranas de nitrocelulosa típicamente utilizadas, debido a que tendrá una menor porosidad y mayor control en la carga de anticuerpos inmovilizados sin comprometer la fuerza motriz para el flujo capilar indispensable en el desarrollo de los IFL. Los sustratos CA-CNT-anti-TnIc obtenidos serán caracterizados por microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía IR y Raman e inmunofluorescencia.

## 2. Justificación

En los últimos años, las enfermedades cardiovasculares han sido consideradas como la primera causa de muerte en México y en el mundo. El crecimiento económico y la globalización han originado evidentes beneficios al ser humano; sin embargo, también han comprometido de manera significativa su salud, incrementando la susceptibilidad de adquirir o desarrollar enfermedades. En este sentido, es importante abordar esta problemática desde diferentes áreas como tratamiento, diagnóstico y prevención considerando los aspectos ambientales, económicos y sociales involucrados.

Este trabajo aporta conocimiento básico al desarrollar una alternativa de soporte orgánico a base de cutícula de agave que pueda ser utilizado como parte de un IFL para la detección sensible del biomarcador cardíaco TnIc. Lo anterior enfocado al diagnóstico eficiente y temprano de las ECV que contribuya en un mejor manejo de pacientes y un incremento en la probabilidad de recuperación de estos.

# 3. Pregunta de Investigación

¿Qué efecto tiene las características morfológicas y de composición que presenta la cutícula de agave en la inmovilización de anticuerpos y materiales nanoestructurados como los nanotubos de carbono?

## 4. Hipótesis

La cutícula de agave (CA) es un buen soporte para la inmovilización de materiales nanoestructurados como los nanotubos de carbono y de biomoléculas como los anticuerpos, ya que está constituida de polímeros, cutina y ceras que pueden favorecer la retención de estos materiales por la ruta física o covalente. Así mismo, las cavidades de las estomas de la CA pueden fungir como puntos de concentración y anclaje de estos materiales.

# 5. Objetivos

## 5.1 Objetivo General

Elaboración de un sustrato orgánico y flexible que permita la inmovilización preferencial y controlada de anticuerpos basado en cutícula de agave.

## 5.2 Objetivos Particulares

1. Desarrollar un tratamiento que permita obtener una superficie homogénea y manipulable de la cutícula de agave.
2. Inmovilizar sobre la CA tratada nanotubos de carbono multicapa (CA-CNT).
3. Inmovilizar anticuerpos anti-TnIc sobre superficies CA-CNT.

## 6. Marco Teórico

## 6.1 Enfermedades Cardiovasculares, un Sistema Complejo de Estudio

La enfermedad cardiovascular (ECV) son un conjunto de enfermedades que afectan al corazón y/o los vasos sanguíneos (venas y arterias) (OMS, 2021; WHF, 2021). Pueden tener un origen genético, conductual, riesgo socioeconómico y ambientales (Thomas *et al.*, 2018).

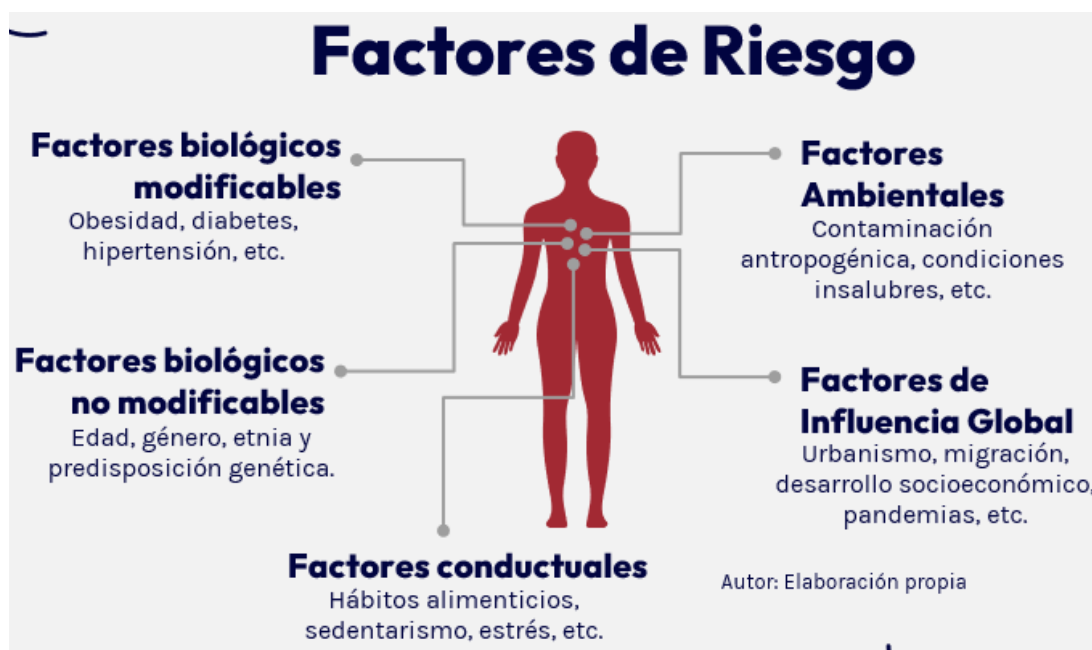


Figura 6.1 Factores de riesgo en las ECV (Elaboración propia).

Se ha demostrado que las ECV son de origen multifactorial y no deben ser estudiadas solamente como un aspecto médico, sino como un sistema complejo, donde interaccionan y convergen los múltiples factores que dan lugar a su vez a subsistemas complejos, y que ejercen una influencia importante en el riesgo, la progresión y la gravedad de la enfermedad. Es por ello por lo que deben ser abordadas de forma integral y holística.

## 6.2 Panorama Mundial y en México de las Enfermedades Cardiovasculares

Según la Federación Mundial del Corazón (WHF, por sus siglas en inglés), la enfermedad cardiovascular es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con una estimación de 18.6 millones de muertes al año, lo que representa aproximadamente el 33% de todos los fallecimientos. Se espera que esta cifra aumente a 23.6 millones para el año 2030, según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2021). Más de tres cuartas partes de las muertes por enfermedades cardiovasculares se producen en países de ingresos bajos, medianos o en vías de desarrollo (PAHO, 2020).

En México, durante el periodo enero-junio 2022, las defunciones por enfermedades del corazón fueron la primera causa de muerte a nivel nacional con 124, 496 y representan aproximadamente el 28% del total de muertes registradas al año junto con las enfermedades cerebrovasculares (INEGI, 2022). Por si fuera poco, la pandemia de COVID-19 también ha tenido repercusiones en los pacientes con enfermedad cardiovascular. El aumento de enfermedades por secuelas de COVID-19 también se ve cómo las ECV encabezan la lista (10.5%), superando a la diabetes (7.3%), seguido de la enfermedad crónica respiratoria (6.3%), hipertensión (6%) y cáncer (5.6%). (Ferrari *et al.*, 2020; Hessami *et al.*, 2020).

### 6.3 Breve historia de los Inmunoensayos para la detección de TnIc.

En la década de 1980s, varios grupos de investigación comenzaron a considerar las troponinas cardíacas como posibles biomarcadores cardíacos específicos. El interés en TnIc fue impulsado por el trabajo de Cummins, quien desarrolló el primer radioinmunoensayo (RIA) para la medición de TnIc en suero, tenía una concentración detectable de 10 µg / L y el tiempo de ejecución fue bastante largo (1-2 días) (Cummins, 1987).

Tres años después, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra TnIc fueron descritos por dos grupos independientes (Larue *et al.*, 1992; Bodor *et al.*, 1993) uno de los cuales implementó un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para la cuantificación de TnIc en suero. El ensayo desarrollado por Bodor y colaboradores tenía una concentración detectable de 1,9 µg / L y un rango de trabajo de hasta 100 µg / L. Requirió 3,5 horas para realizarse (Bodor *et al.*, 1993). Dicho ensayo de TnIc mostró una alta especificidad para la lesión cardíaca incluso en presencia de enfermedad muscular aguda, enfermedad muscular crónica, insuficiencia renal crónica y después de una maratón (Adams *et al.*, 1993). Durante los siguientes 20 años, el inmunoensayo para TnIc se ha optimizado considerablemente. La mayoría de los hospitales ahora han reemplazado las pruebas de troponinas convencionales con las nuevas pruebas de alta sensibilidad (hs-cTn T e I) de quinta generación que pueden detectar troponina en concentraciones de 10 a 100 veces más bajas que las pruebas convencionales (Lippi, *et. al.*, 2019). Básicamente, los ensayos de hs-cTn detectan la troponina con mayor sensibilidad y precisión en un momento anterior (Reichlin, *et. al.*, 2009) y permiten la detección y cuantificación en 50% a idealmente 95% de los individuos sanos (Apple, 2012).

#### 6.4 IFL como tendencia para desarrollo de pruebas rápidas.

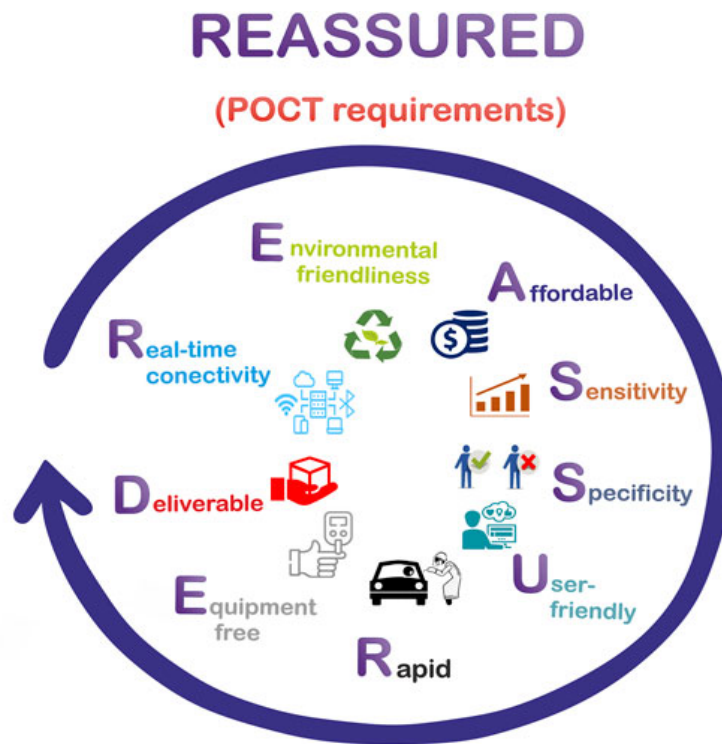
Los IFL se encuentran entre las plataformas de pruebas rápidas a lado del paciente más establecidas que se hayan aplicado con éxito en áreas de atención médica primaria o donde supone un desafío debido a los pocos recursos existentes (Tripoliti *et al.*, 2020). Las últimas tendencias apuntan hacia el desarrollo de dispositivos miniaturizados, más sensibles, de bajo coste, basados en nanotecnología y dirigidos a aplicaciones no invasivas (McCarthy *et al.*, 2019).

Este tipo de prueba cumple los requisitos propuestos en 2004 por la Organización Mundial de la Salud para desarrollar el dispositivo como prueba rápida a lado del paciente (Pont-of-Care Testing en inglés) “ideal” que puede resumirse con el acrónimo en inglés REASSURED (WHO, 2004):

1. Tiempo real (*Real-time connectivity*): los resultados se agregan a un registro médico electrónico.
2. Facilidad de recolección de muestras (*Ease of specimen collection*).
3. Asequible (*Affordable*): De fácil acceso para la población de riesgo.
4. Sensible (*Sensitive*): De alta capacidad para detectar muestras positivas.
5. Especifico (*Specific*): De alta capacidad para detectar muestras negativas.
6. De fácil uso (*User friendly*): Sin necesidad de conocimientos previos.
7. Rápido (*Rapid*): Para permitir tomar decisiones inmediatas, y Robusto (*Robust*): Para transportarlo y distribuirlo sin que se altere su funcionamiento.
8. Sin instrumentación (*Equipment-free*).
9. Distribuible a los que lo necesitan (*Delivered to-end-users*), incluso países en vías de desarrollo.

Desde 2018, ASSURED ha sido renombrado con el acrónimo REASSURED, donde las dos primeras letras añadidas se relacionan con la conectividad en tiempo real (Real-time) y la facilidad de recolección de muestras y el respeto al medio ambiente (Ease of specimen collection and Environmental friendliness) para el control de calidad en las pruebas, el tratamiento y la superación de las dificultades en recolección y procesamiento de muestras **Figura 6.4** (Land *et al.*, 2018). Debido a la pandemia de COVID-19, la necesidad emergente de pruebas rápidas a lado del paciente ha hecho que el usuario confíe en los resultados de las pruebas rápidas que se realizan en hospitales y clínicas e incluso en aquellas pruebas que se realizan en la modalidad drive-thru (autoservicio).

Estos hechos han creado una buena base para hacer que los dispositivos sean más seguros y confiables (Farrance, 2012).



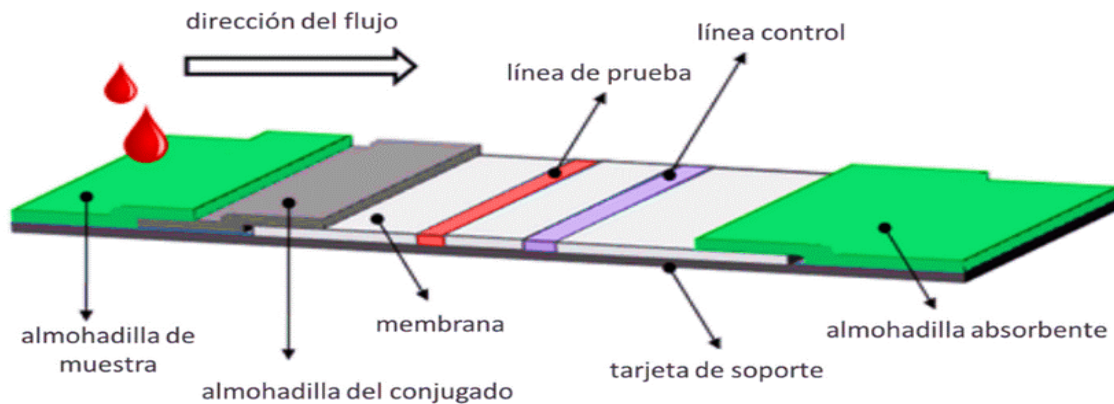
**Figura 6.4** Significado de las siglas REASSURED (Elaboración propia).

### 6.5 Inmunoensayo de Flujo Lateral (IFL)

Los IFL son las variantes de los dispositivos basados en papel más abordados por los científicos para el desarrollo de pruebas rápidas a lado del paciente. El fundamento de los IFL se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. El anticuerpo de captura o antígeno inmovilizado está unido a una membrana, generalmente de nitrocelulosa (Koczula y Gallotta, 2016). Se puede realizar en un solo paso y en unos pocos minutos (de 5 a 30 mín.). La tira inmunorreactiva (Ver figura 6.5) consta de cuatro elementos genéricos: 1) *almohadilla de muestra*: aquí ocurre la primera interacción IFL-muestra y en algunos casos el pretratamiento de la muestra. En esta zona se asegura el adecuado flujo por capilaridad y la integridad de la muestra a través del dispositivo. 2) *almohadilla conjugada*: dependiendo del formato de inmunoensayo utilizado en la IFL, las partículas (principalmente nanopartículas de oro o microesferas de látex) se colocan en la almohadilla del conjugado. Estas partículas se conjugan con: anticuerpo o antígeno (conocidos de referencia) según sea el formato. 3) *membrana de reacción*: compuesta por la línea de prueba (P) y la línea de control (C). En la línea C, anticuerpos complementarios, principalmente IgG (ratón,

cabra, o conejo) son generalmente inmovilizados, teniendo la función de indicar que los flujos laterales son efectivos, y que los anticuerpos están activos. 4) *almohadilla de absorción* (AA); este elemento recoge el exceso de muestra líquida y evita el reflujó (Koczula y Gallotta, 2016; Di Nardo *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021; Majdinasab *et al.*, 2022).

Esta evaluación visual permite el análisis cualitativo y semicuantitativo. La obtención de información cuantitativa puede mejorar sustancialmente la eficiencia de estos dispositivos y, en consecuencia, aumentar su uso práctico, lo anterior se puede lograr acoplando los dispositivos basados en papel con técnicas como SERS la cual se basa en la mejora del fenómeno de dispersión Raman de una molécula cuando se adsorbe típicamente en una nanoestructura plasmónica.



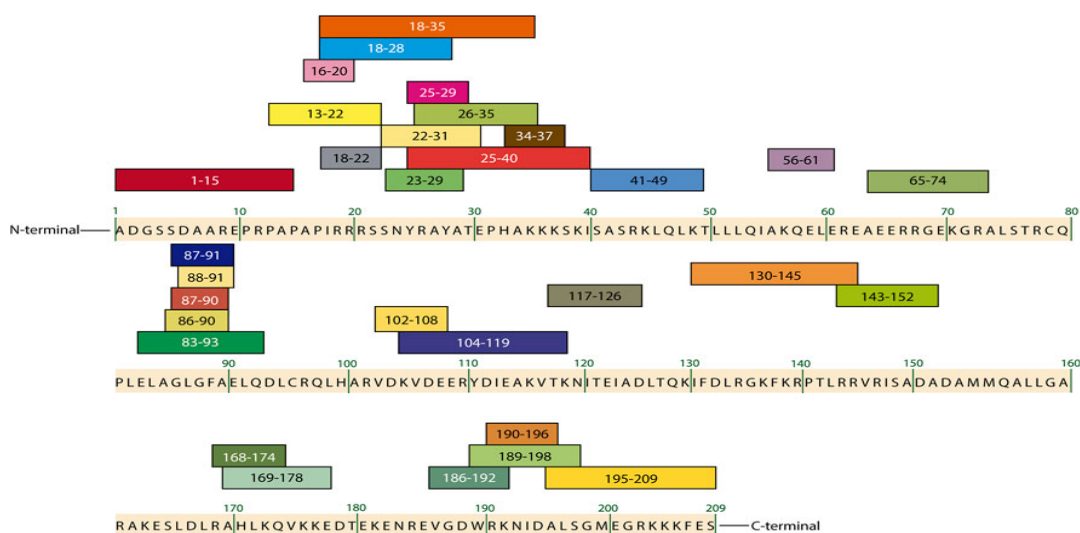
**Figura 6.5** Partes de un Inmunoensayo de Flujo Lateral (Koczula y Gallotta, 2016).

#### 6.5.1 IFL formato tipo “sándwich”.

El formato de ensayo de sándwich se usa típicamente para detectar analitos relativamente grandes. Si el analito tiene al menos dos sitios de unión distintos (es decir, epítopos), se puede desarrollar un inmunoensayo tipo "sándwich" en el que el epítotope de un anticuerpo (que se conjuga con la nanopartícula de oro, plata, etc.) se une con el epítotope del antígeno de la muestra y el epítotope de otro anticuerpo (inmovilizado en la línea de prueba) se une a otro epítotope de ese mismo antígeno. El formato sándwich da como resultado una respuesta inmediata cualitativa mediante la revelación de color y una respuesta cuantitativa midiendo la intensidad de señal (en el caso de ser un método óptico) que es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra (Oku and Kamiya, 2001).

## 6.6 Bioquímica de la Troponina I cardíaca (TnIc).

La troponina I cardíaca humana (TnIch) se considera un biomarcador cardíaco altamente específico, está presente en el tejido del músculo cardíaco como una isoforma de 209 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 24 kDa y un punto isoeléctrico experimental entre 6,8 y 8,5 (Filatov *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2002; Peronnet *et al.*, 2007; Apple y Collinson, 2011). Se pueden encontrar tres isoformas diferentes de troponina I (TnI) en humanos, la isoforma de troponina I cardiospecífica (TnIc) y dos isoformas que se expresan en el músculo esquelético, denominadas troponina I de contracción lenta (ssTnI) y troponina I de contracción rápida (fsTnI) (Hunkeler *et al.*, 1991; Gaze y Collinson, 2008; Sheng y Jin, 2016). Las tres isoformas son altamente homólogas: la identidad de secuencia de TnIc con ssTnI es de aproximadamente 52 % y con fsTnI es de 46 % (HyTest, 2017). A pesar de esto, la isoforma TnIc está bien diferenciada de las isoformas esqueléticas porque presenta una región N-terminal entre los residuos de aminoácidos 1-32, considerada la región cardiospecífica (Al-Hillawi *et al.*, 1995; Keane *et al.*, 1997; Larue *et al.*, 1998). Del mismo modo, la molécula de TnIc presenta regiones altamente antigénicas que corresponden a los extremos amino N-terminal y carboxilo C-terminal (Ferrieres *et al.*, 1998). TnIc también contiene secuencias antigénicas internas que comúnmente se consideran en el desarrollo de estrategias analíticas porque estas regiones son más estables (Collinson, *et al.*, 2001; Gaze y Collinson, 2008). La **Figura 6.6** muestra el mapa epitópico de TnIc que contiene los epítomos externos e internos informados hasta el momento (HyTest, 2022; Filatov *et al.*, 1998).



**Figura 6.6** Mapa epitópico de TnIc que contiene las secuencias de aminoácidos de los epítomos externos e internos más importantes adaptado de HyTest (2022) y Filatov *et al.* (1998).

Por otro lado, la gran mayoría (>95%) de la TnIc en sangre se ha encontrado en las formas dominantes detectables como el complejo cTnT-IC ternario no covalente (complejo TIC), el complejo TnIc -C binario (complejo IC), y el complejo binario TnIc -T (complejo IT). La forma libre está presente en una cantidad menor (~5%) (Katrukha *et al.*, 1997; Apple *et al.*, 2012).

#### 6.7 Anticuerpos para Troponina I cardiaca (anti-TnIc).

Aprovechando la misma interacción antígeno-anticuerpo, ha sido posible la producción a gran escala de una variedad de anticuerpos contra TnIc, anticuerpos policlonales (pAbs) y monoclonales (mAbs) producidos por tecnologías tradicionales basadas en hibridomas y recombinantes (rAbs) generados *in vitro* mediante el uso de genética (Hyytiä, 2015; O'Kennedy and Murphy, 2017; HyTest, 2022), que se han utilizado en el desarrollo de estrategias analíticas para detectar a la TnIc.

Por otro lado, es importante considerar las propiedades inmunogénicas como que los anticuerpos vayan dirigidos específicamente contra los diferentes epítomos de la TnIc, así se minimizaría el efecto de la interferencia negativa o positiva. La propia estructura del anticuerpo debe permanecer estructuralmente estable, lo que limita considerablemente la orientación y densidad vitales para una inmunosuperficie eficiente, interactuar mínimamente con la matriz de la muestra, esto proveerá una mayor biofuncionalización de la superficie sensora y tener un tamaño óptimo para maximizar los sitios de unión disponibles, lo que disminuye la señal de detección. Además, deben ser altamente específicos para la isoforma cardíaca de la troponina y no deben mostrar una reacción cruzada con las dos isoformas de troponina del músculo esquelético.

Debido a esto, se hace importante tomar en cuenta que estos factores interfieren en diversos grados a los diferentes anticuerpos monoclonales, policlonales, recombinantes y sus fragmentos afectando principalmente la especificidad, la sensibilidad y selectividad. Hasta ahora, los inmunoensayos utilizados para TnIc no están estandarizados; por lo tanto, puede haber una diferencia sustancial en los valores dependiendo del inmunoensayo utilizado (marca, formato, LOD, etc). Por lo tanto, se requiere más investigación en plataformas basadas en múltiples anticuerpos, orientación de múltiples epítomos y una validación rigurosa de los inmunoensayos estandarizados para garantizar mediciones precisas (Lee and Liu, 2015).

## 6.8 Materiales biodegradables para la construcción de los IFL: Cutícula de Agave (*Agave spp.*).

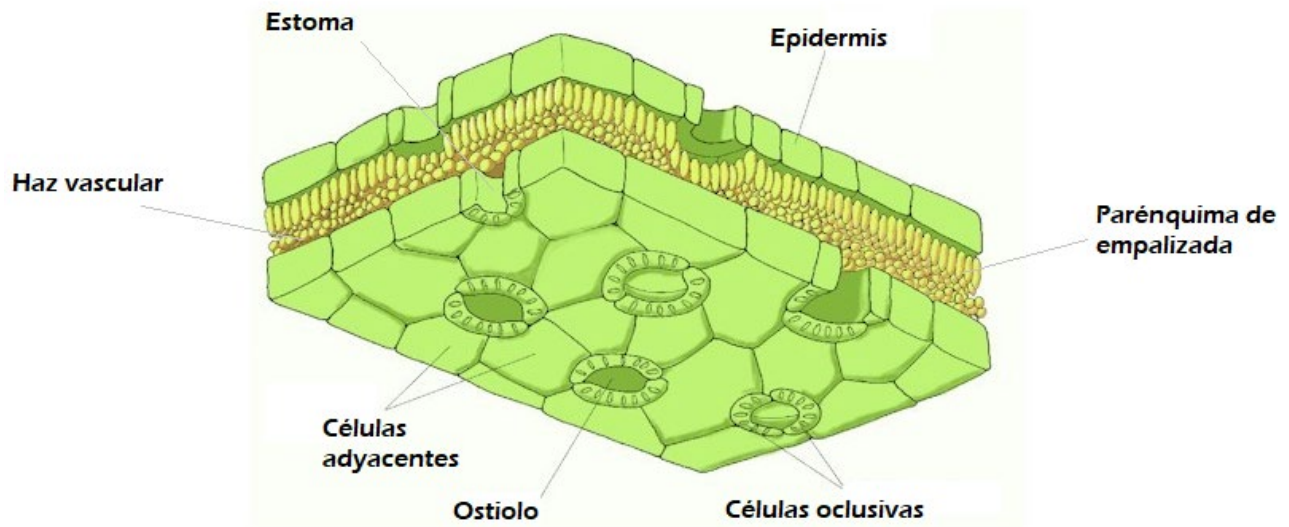
El uso generalizado de pruebas rápidas en el punto de atención médico, como el IFL, ha generado una gran cantidad de residuos plásticos y microplásticos desechables. Estos residuos son necesarios para evitar contaminaciones cruzadas y riesgos biológicos, pero su impacto ambiental es preocupante. Hoy en día, la membrana de nitrocelulosa es utilizada ampliamente en la construcción de pruebas de diagnóstico rápido. Esta membrana es reconocida por sus propiedades únicas, como su capacidad para retener y transportar moléculas objetivo. Sin embargo, es importante reconocer que la producción y el uso de la membrana de nitrocelulosa pueden tener un impacto negativo en el medio ambiente. La contaminación ambiental asociada con la membrana de nitrocelulosa se debe principalmente a dos factores: el uso de solventes orgánicos durante su fabricación y a su naturaleza no biodegradable.

Por otra parte, se presentan otras desventajas, como en la inmovilización de biomoléculas a la celulosa, debido a que, aunque el proceso de inmovilización sobre este tipo de superficies tan porosas es relativamente fácil, ya sea mediante interacciones hidrofóbicas u otras estrategias alternativas que incluyen la conjugación química con la nitrocelulosa o con la estreptavidina, el proceso de adsorción no es eficiente. Al ser la nitrocelulosa una superficie tan porosa, no es posible controlar la carga de biomoléculas inmovilizadas impactando en una poca reproducibilidad de los inmunoensayos amplificando los efectos de la interfaz. Y aunque estos efectos de adsorción se mitigan mediante el bloqueo de la membrana a través de la adsorción de otras proteínas, el papel de bloqueo puede tener el costo de reducir la señal del ensayo y, por lo tanto, derivar en una menor sensibilidad.

Para abordar este problema, es importante buscar alternativas que además de que resuelvan los problemas anteriormente descritos, sean sostenibles y biodegradables. En esta tesis, se propone el empleo de la cutícula de agave como una opción prometedora para reemplazar la membrana de nitrocelulosa, reduciendo el impacto ambiental asociado y optimizando la inmovilización de moléculas biológicas.

El *Agave spp.* es una planta común en México que sobrevive en condiciones extremas debido a su cutícula. La cutícula se basa de ceras cuticulares de un poliéster de cadena corta; este poliéster se encuentra en gran proporción en la cutícula, entre el 40 al 80 % de su composición total. Así mismo, sobre su superficie de la cutícula se hayan distribuidos las estomas, células oclusivas que forman

parte de la epidermis de la planta y que delimitan entre ellas un poro llamado ostiolo que actúan como interfaz entre las células y el entorno externo. Las estomas pueden cerrarse o abrirse en función de la urgencia de las células oclusivas que lo forman. Si estas células oclusivas reciben agua de las células adyacentes la estoma se abre, y si pierden agua las células adyacentes la estoma se cierra. La figura x representa la morfología característica de la cutícula de una hoja (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013).



**Figura 6.8.** Representación de la cutícula de una planta incluyendo sus elementos genéricos.

Hasta el momento, la cutícula de agave se ha utilizado para diversos propósitos, como la producción de bioetanol y la formación de compuestos biopoliméricos (García, 2014; Silva, 2020; Leide *et al.*, 2020). En esta tesis proponemos el empleo de cutícula de agave como templete para la inmovilización de biomoléculas, aprovechando propiedades como la homogeneidad estructural y composicional e hidrofobicidad de este material orgánico. De esta manera se contribuye al uso de materiales biodegradables en las pruebas de diagnóstico rápido, esencial para reducir el impacto ambiental.

# 7. Marco Conceptual

## 7.1 Tipo de Investigación

El tipo de investigación que se llevará a cabo en este trabajo es un enfoque experimental. En este tipo de investigación, se realizarán experimentos y manipulación de variables cuantitativas con el objetivo de probar hipótesis y obtener conclusiones sobre la construcción de un dispositivo, específicamente un inmunosensor óptico, para la cuantificación de TnIc (troponina I cardiaca).

El enfoque experimental implica la realización de pruebas y mediciones controladas en un entorno controlado, donde se manipularán y controlarán las variables relevantes para evaluar su efecto en el dispositivo propuesto. Los resultados obtenidos en los experimentos ayudarán a respaldar afirmaciones y postulados sobre la viabilidad y eficacia del IFL para medir TnIc.

## 7.2 Paradigma de la Investigación

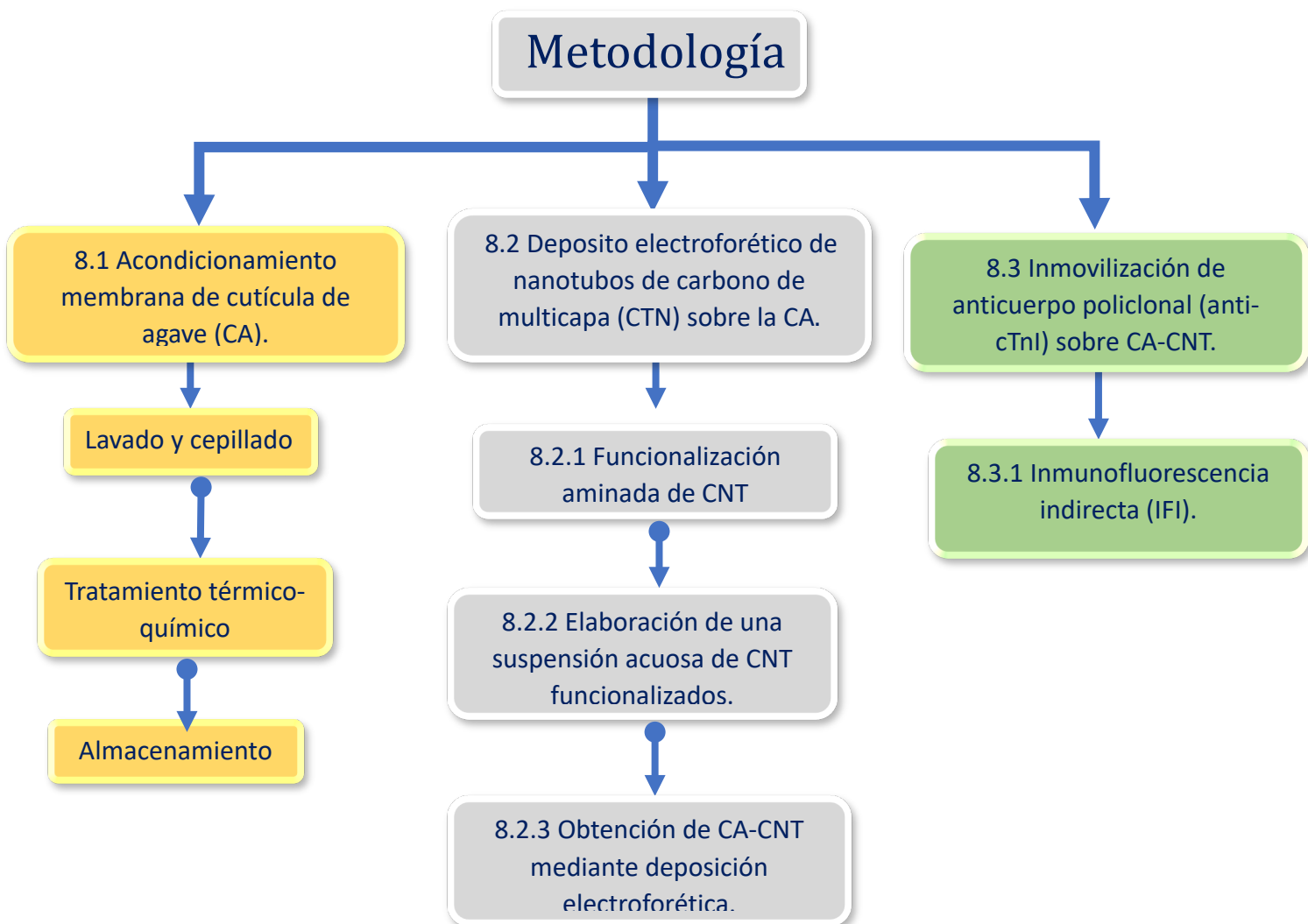
Esta investigación está regida por el paradigma de la complejidad que busca abordar la comprensión de los fenómenos naturales y sociales desde una visión integradora y multidisciplinaria. Se basa en la noción de que estos fenómenos son sistemas complejos adaptativos, es decir, sistemas compuestos por múltiples elementos interconectados que se adaptan y evolucionan en respuesta a su entorno.

Desde el punto de vista del pensamiento, el paradigma de la complejidad hace suyo el concepto de sistema complejo adaptativo (Gell-Man, 1995) como forma de comprender cómo son y cuál es la dinámica de los fenómenos naturales y sociales del mundo. Incorpora la necesidad de un diálogo continuado entre las distintas formas de conocer el mundo dada la existencia de incertidumbres en cada una de ellas.

## 7.3 Teorías que sustenta la investigación

La presente investigación se sustenta en la racionalidad de los sistemas complejos y en la teoría de sistemas, debido a que las ECV son un sistema complejo donde convergen múltiples factores (ambientales, sociales, económicos, políticos y biológicos) y cada uno de ellos influye en la dinámica de la enfermedad. El estudio de estos factores debe estar basado en un modelo interdisciplinario, donde cada subsistema debe aportar conocimiento para la construcción de soluciones sólidas a un problema de salud tan importante; al mismo tiempo, se generará tecnología mediante el desarrollo de un dispositivo que permita la detección en la prevención, diagnóstico y pronóstico de un IAM, lo que contribuirá a la disminución de la alta tasa de mortalidad.

# 8. Metodología



**Figura 8.** Diagrama general de la metodología.

## 8.1 Acondicionamiento membrana de cutícula de agave (CA).

La cutícula de agave de *agave spp*, proveniente de fuentes agroecológicas fue adquirida en línea (Walmart, 2022). Sin embargo, fue necesario realizar un tratamiento, el cual se propone en esta tesis a fin de remover de su superficie material orgánico excedente como ceras y otras impurezas, además de cerrar estomas. Lo anterior a fin de obtener una superficie más homogénea para el proceso de inmovilización de los nanotubos de carbono. El tratamiento propuesto consistió en lo siguiente: Se lava y cepilla meticulosamente las piezas de cutícula de agave utilizando agua potable, posteriormente se hierven durante 5 h/ 96 °C y se sumergen en NaOH al 2 % durante 30 mín. La cutícula de agave se mantiene en agua desionizada hasta su uso. En la figura siguiente se esquematiza el proceso de acondicionamiento de la cutícula de agave.



**Figura 8.1** Proceso de acondicionamiento membrana de cutícula de agave.

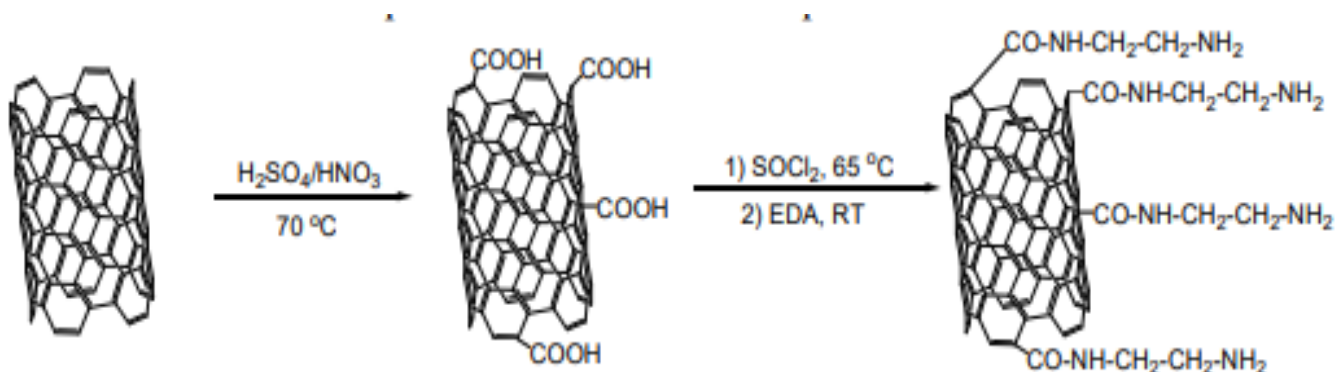
## 8.2 Deposito electroforético de nanotubos de carbono de multicapa (CTN) sobre la CA.

Sobre la CA tratada se depositaron nanotubos de carbono multicapa marca Sigma-Aldrich. El depósito se realizó mediante el método electroforético, y para esto los nanotubos de carbono deben estar en una suspensión estable la cual se elaboró a partir de los siguientes pasos.

### 8.2.1 Funcionalización aminada de CNT.

Se prepara una disolución acida con 0.02 g de CNT, 15 mL de  $H_2SO_4$  al 98% y 5 mL de  $HNO_3$  al 99%. Se deja reposar la disolución por 48 h y posteriormente se filtra al vacío con agua desionizada de 5-7 veces. Los CNT oxidados se dejan secar a temperatura ambiente por 48 h. Luego, los grupos carboxilo ( $-COOH$ ) de los CNT oxidados se convirtieron en grupos de cloruro de acilo ( $-COCl$ ) con cloruro de tionilo a 70 °C durante 24 h. El cloruro de tionilo sin reaccionar se eliminó calentando a 80 °C. Finalmente, 0,2 g de CNT funcionalizados con cloruro de acilo se sometieron

a reflujo a 90 °C durante 24 h con etilendiamina para preparar CNT anclados a amina. La vía de reacción se muestra en la Figura 8.2.1.



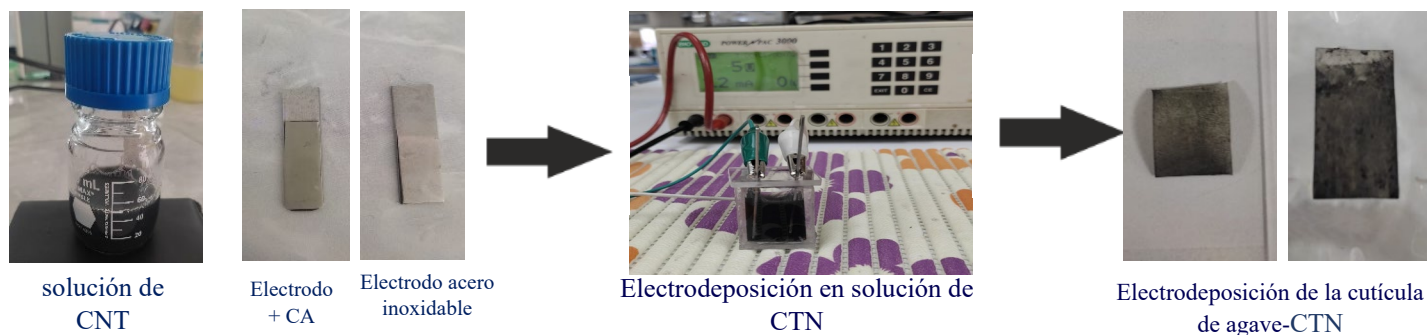
**Figura 8.2.1** Reacción de funcionalización de CTN-NH<sub>2</sub>.

### 8.2.2 Elaboración de una suspensión acuosa de CNT funcionalizados.

Se prepara 25 mL de una suspensión acuosa empleando agua desionizada con 0.0026 g de CNT-NH<sub>2</sub> funcionalizados y 0.015 g de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) a 1.6 mM, se sónica la suspensión durante 20 min y se almacena a 4°C.

### 8.2.3 Obtención de CA-CNT mediante deposición electroforética.

Se corta una tira de 0,5 cm x 1cm de cutícula de agave que se tenía en agua desionizada. Seguido de esto, se adhiere a la cutícula de agave en un electrodo de acero inoxidable. En una celda electroforética se agregan 5 mL de la suspensión acuosa de CNT y se coloca el electrodo con la cutícula de agave adherida (ánodo) y como contraelectrodo otra placa de acero inoxidable (cátodo) (previamente pulidos) para realizar el depósito electroforético, se aplicaron las siguientes condiciones: 1 V, 10 mA durante 15 min/ 3 V, 10 mA durante 15 min. El sustrato de CA-CNT se deja secar a temperatura ambiente durante 30 min y se almacena entre dos portaobjetos para generar presión a la cutícula y permanezca plana.



**Figura 8.2.2** Proceso de depósito electroforético de CTN sobre la CA.

### 8.3 Inmovilización de anticuerpo policlonal (anti-TnIc) sobre cutículas de CA-CNT.

Para la *línea de prueba* se utilizará anti-TnIc, que es conocida también como zona de captura. Es la zona donde se une el complejo analito-anticuerpo-conjugado a los anticuerpos inmovilizados sobre la tira de ensayo, dando lugar a una línea o punto visible. Para la *línea de control* se utilizará TnIc de referencia, el cual es compatible con el anticuerpo de detección que vamos a utilizar, también desarrollado en ratón.

Se corta una tira de 0,5 cm x 1cm CA-CTN, se lava con agua desionizada y se marcan las áreas de (líneas de (P) y (C), 5 mm x 3 mm cada una), después, se le agregan 10  $\mu$ L de 0,2 M EDC/ 0,05 M NHS; en la relación de volumen de 5:1 y se dejan reaccionar con 5  $\mu$ L de anti-TnIc ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) aproximadamente 2 h/ 37 °C. Una vez fijados los anticuerpos se deja secar la membrana de CA-CTN, consiguiendo de esta manera evaporar el disolvente en el cual se encontraban disueltos y fijarlos directamente sobre la membrana. Cuando la membrana se encuentre totalmente seca, la bloqueamos con una disolución de albumina de suero bovino (BSA) al 2%, sumergiéndola aproximadamente 15 minutos.

De esta manera se evita la adsorción inespecífica que dificulta la visualización del resultado del ensayo. Pasado el tiempo, lavamos la tira introduciéndola esta vez en una disolución reguladora de fosfatos (PBS 10 mM y pH = 7.4), durante 3 min y se deja secar 30 min / T.A. o hasta que esté totalmente seca y se mantiene a 4 °C para su uso posterior.

#### 8.3.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La técnica de inmunofluorescencia directa (IFI) se realizó de la siguiente manera: Se lava de manera suave tres veces con PBS 1M pH = 7.4 el sustrato de CA-CTN-anti-TnIc, seguido de esto, se prepara una solución 1:1000 de anticuerpos secundarios específicos para el anticuerpo primario (anti-TnIc) conjugados con un fluorocromo. Se agregan 10  $\mu$ L de la solución de anticuerpos secundarios a las muestras y se asegura cubrir completamente las áreas de interés, se dejan incubar 1 h/ T.A. Se lavan las muestras nuevamente con un PBS para eliminar el exceso de anticuerpos secundarios no unidos. Se procede a poner los sustratos en el portaobjetos, se cubren con un cubreobjetos y se fijan con esmalte de uñas u otro sellador adecuado. Y, por último, se examinan las muestras utilizando un microscopio de fluorescencia para detectar y analizar la fluorescencia producida por la unión de los anticuerpos a los antígenos de interés.

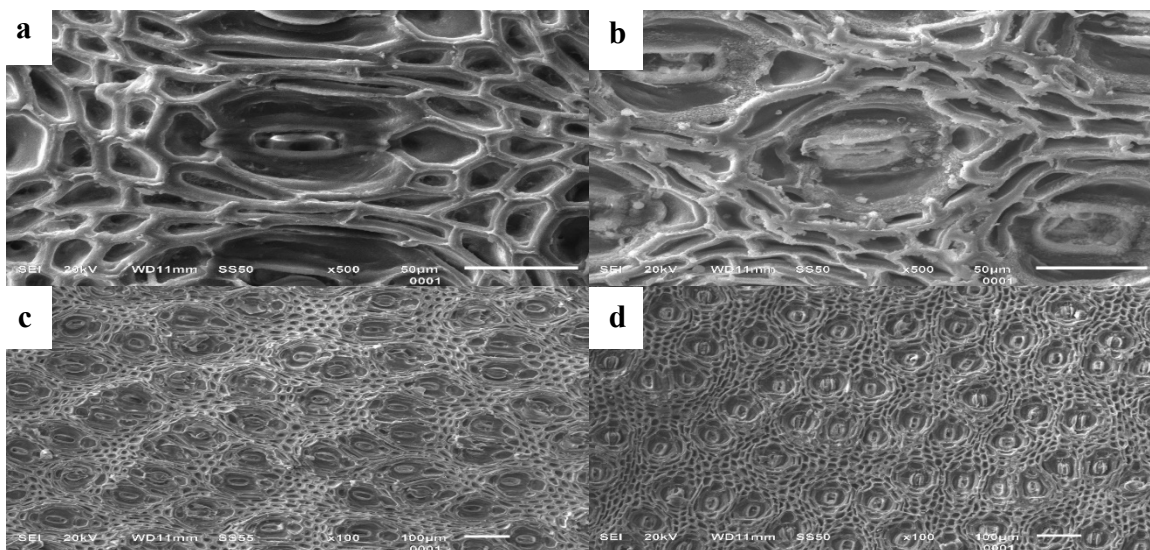
# 9. Resultados y Discusión

## Actividad 1. Acondicionamiento membrana de cutícula de agave (CA).

### 9.1 Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

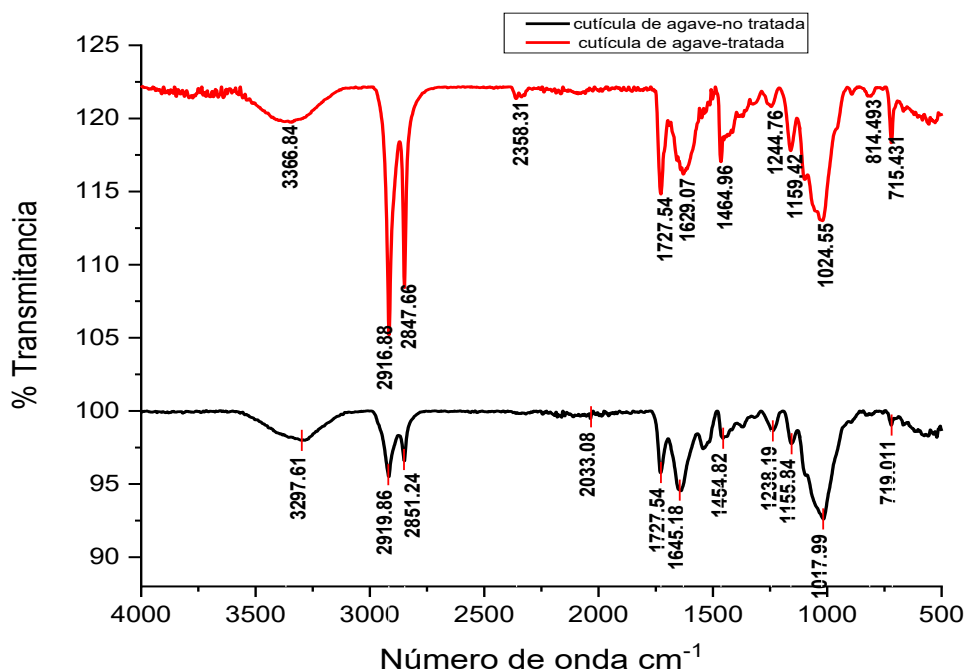
Antes de llevar a cabo la deposición electroforética de nanotubos de carbono sobre la superficie de la cutícula de agave, fue necesario acondicionar mediante un procedimiento mecánico-térmico este sustrato (ver metodología) para cerrar estomas y limpiar su superficie con el fin de obtener un recubrimiento homogéneo de nanotubos. La caracterización morfológica de la cutícula de agave no tratada y tratada fue realizada por SEM (figura 9.1) y las micrografías fueron tomadas del lado interno de la cutícula. En ausencia de tratamiento (Figura 9.1 a y c) la cutícula de agave presenta estomas tetracíticos abiertos de aspecto hundido con longitudes de 30 a 52  $\mu\text{m}$ . Se observa igualmente fragmentos de material orgánico y cristales discontinuos alrededor de las estomas de lo que pudiera corresponder a cera epicuticular (Domínguez *et al.*, 2011).

Por otra parte, y a partir del análisis de una micrografía independiente (ver anexo 1) fue posible determinar la densidad promedio de estomas por  $\text{mm}^2$ , siendo 69 estomas, congruente con lo reportado en literatura (Vargas-Rodríguez *et al.*, 2018). Una vez activada la cutícula de agave, presenta estomas cerrados y menor cantidad de cera epicuticular (figura 9.1 a y d). De esta forma, el tratamiento que se propone en esta tesis es eficiente para cerrar estomas, lo que permitirá la inmovilización de nanotubos de carbono incluso en las cavidades de los poros, así como permite la remoción del exceso de cera, homogenizando la superficie de la cutícula.



**Figura 9.1** Micrografía SEM 100  $\mu\text{m}$ : a) CA-no tratada, b) CA-tratada y SEM 50  $\mu\text{m}$ : c) CA-no tratada, d) CA-tratada.

## 9.2 Caracterización por Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).



**Figura 9.2** Espectros FTIR de la muestra de: a) CA-no tratada y b) CA-tratada.

La medición se realizó utilizando un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier en el rango de  $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$  para todas las muestras. Los números de onda correspondientes a los diferentes rangos en el espectro infrarrojo de la cutícula de agave proporcionan información valiosa sobre los grupos funcionales presentes en este material. Estos grupos funcionales son indicativos de la composición química y la estructura molecular de la cutícula, lo que nos ayuda a comprender sus propiedades físicas y químicas.

**Tabla 9.2** Números de onda característicos y asignación de grupos funcionales de: CA-no tratada y CA-tratada.

<i>Número de onda cm<sup>-1</sup></i>	<i>CA no tratada</i>	<i>CA tratada</i>	<i>Asignación posible</i>
3366-3297	x	x	(OH) alcoholes, fenoles o agua.
2919-2847	x	x	enlaces C-H alifáticos
2358		x	enlaces de triple (C≡N).
2033	x		(C=O) conjugados
1727	x	x	grupos carbonilo (C=O)
1645-1629	x	x	(C=C) conjugados.
1464-1155	x	x	doble enlace (C=C) conjugados
1024-1017	x	x	enlaces (C-N).
814-715	x	x	enlace carbono-carbono (C-C) fuera del plano.

La composición de la cutícula de agave fue analizada y se obtuvieron los espectros correspondientes para la muestra CA-no tratada y la CA-tratada.

En el rango de 3366-3297 cm<sup>-1</sup>, se observa una banda relacionada con la presencia de grupos de estiramiento de hidroxilo (-OH). Esto sugiere la presencia de grupos de hidroxilo, como alcoholes fenoles o agua, en la cutícula de agave.

En el rango de 2919-2847 cm<sup>-1</sup>, se observa una banda que indica la presencia de enlaces C-H alifáticos, como los presentes en grupos metilo (-CH<sub>3</sub>) o metileno (-CH<sub>2</sub>-). Estos grupos pueden contribuir a la estructura química de la cutícula y afectar sus propiedades físicas.

La banda en el número de onda 2358 cm<sup>-1</sup> es característica de los enlaces de triple enlace carbono-nitrógeno (C≡N). Esto sugiere la posible presencia de grupos funcionales con enlaces de triple enlace carbono-nitrógeno en la cutícula de agave.

En el número de onda 2033 cm<sup>-1</sup> se observa una banda relacionada con los enlaces carbono-oxígeno (C=O) presentes en los grupos carbonilo. Esto indica la presencia de grupos carbonilo en la

cutícula, lo cual puede tener implicaciones en sus propiedades químicas y de interacción con otras sustancias.

La banda en el número de onda  $1727\text{ cm}^{-1}$  también está asociada con los enlaces carbono-oxígeno (C=O), pero en esta región se observa una mayor intensidad y anchura en comparación con la banda anterior. Esto puede indicar la presencia de ésteres de ácidos grasos en la composición de la cutícula de maguey.

En el rango de  $1645\text{-}1629\text{ cm}^{-1}$ , se observa una banda relacionada con los enlaces de doble enlace carbono-carbono (C=C) conjugados. Esto sugiere la posible presencia de compuestos aromáticos o alquenos en la cutícula como el ácido cumárico o estíbenos, lo que puede contribuir a su estructura y propiedades químicas.

Las bandas en los números de onda  $1464\text{-}1155\text{ cm}^{-1}$  también están asociadas con los enlaces de doble enlace carbono-carbono (C=C) conjugados. Estas bandas confirman la presencia de oxalato de calcio en la cutícula de agave.

En el rango de  $1024\text{-}1017\text{ cm}^{-1}$ , se observa una banda relacionada con los enlaces carbono-nitrógeno (C-N). Esto sugiere la posible presencia de grupos funcionales con enlaces carbono-nitrógeno en la cutícula de agave.

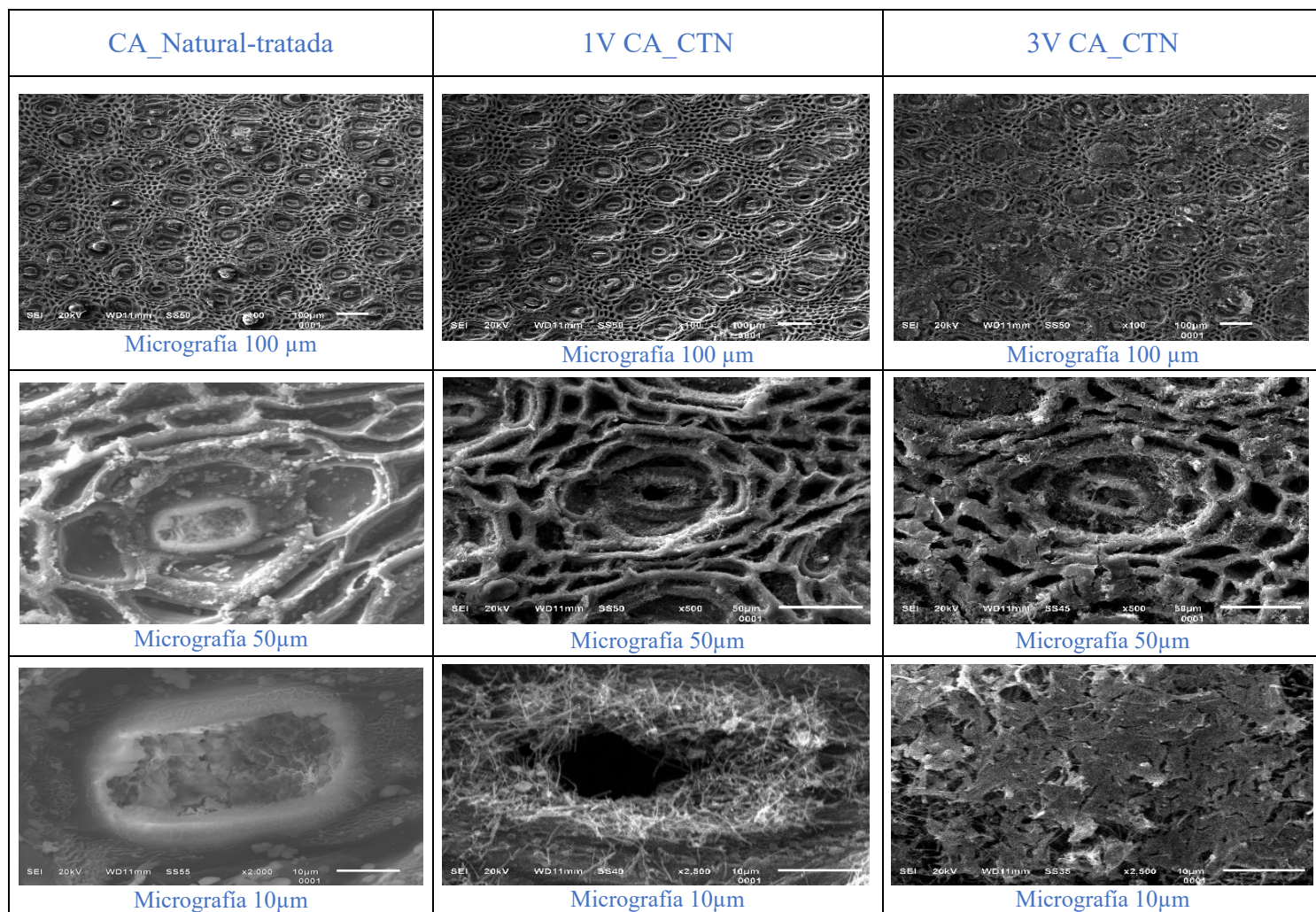
La banda en el número de onda  $814\text{-}715\text{ cm}^{-1}$  está asociada con los enlaces de doble enlace carbono-carbono (C=C) fuera del plano en compuestos alifáticos.

## Actividad 2. Deposito electroforético de nanotubos de carbono de multicapa (CTN) sobre CA.

### 9.3 Caracterización de morfología por SEM.

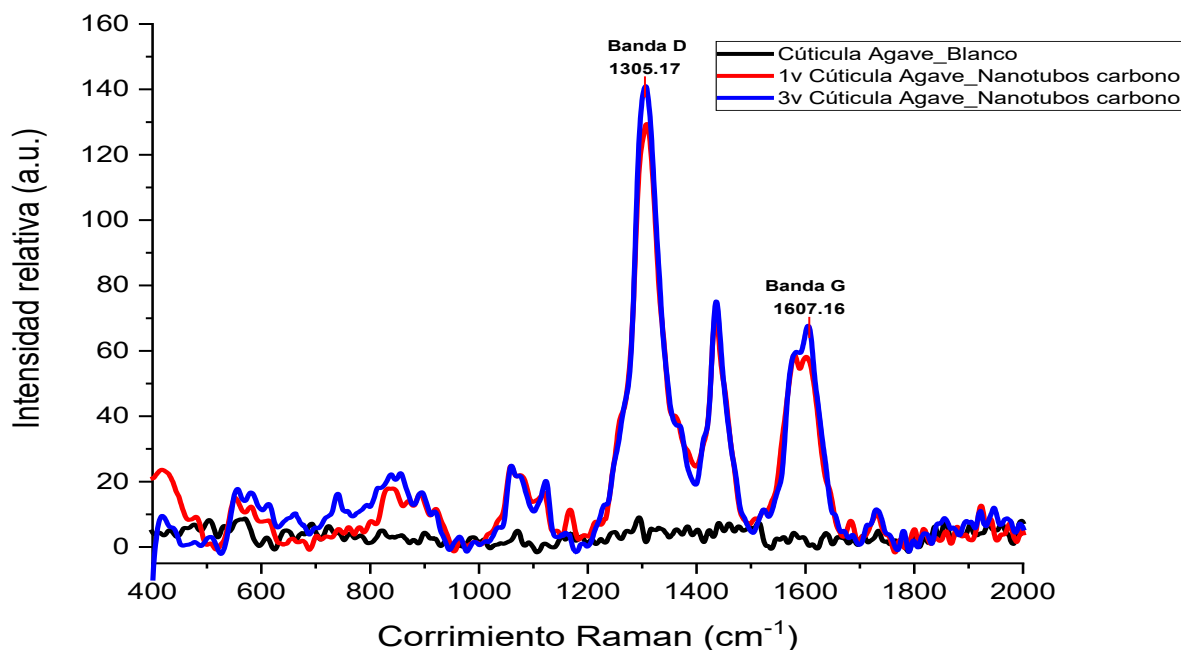
Los nanotubos de carbono fueron inmovilizados electroforéticamente a 1 y 3 V durante 15 minutos sobre la CA-tratada. En la figura 9.3 se puede observar una colección de micrografías obtenidas por SEM para los CA-CNT tomadas bajo estas condiciones a diferentes aumentos (100, 50 y  $10\text{ }\mu\text{m}$ ). En las micrografías correspondientes a 1 V durante 15 minutos, se observa un recubrimiento parcial pero homogéneo de nanotubos de carbono sobre toda la superficie de la cutícula de agave, tanto en las cavidades como en los bordes que presenta. A 3 V y 15 minutos,

se observa una superficie más recubierta por los nanotubos de carbono, observándose cúmulos en los bordes de la superficie del tejido vegetal.



**Figura 9.3** Colección de micrografías 100, 50 y 10 μm: cutícula de agave natural-tratada, 1V cutícula de agave con nanotubos de carbono y 3V cutícula de agave con nanotubos de carbono.

#### 9.4 Caracterización por espectroscopia Raman.

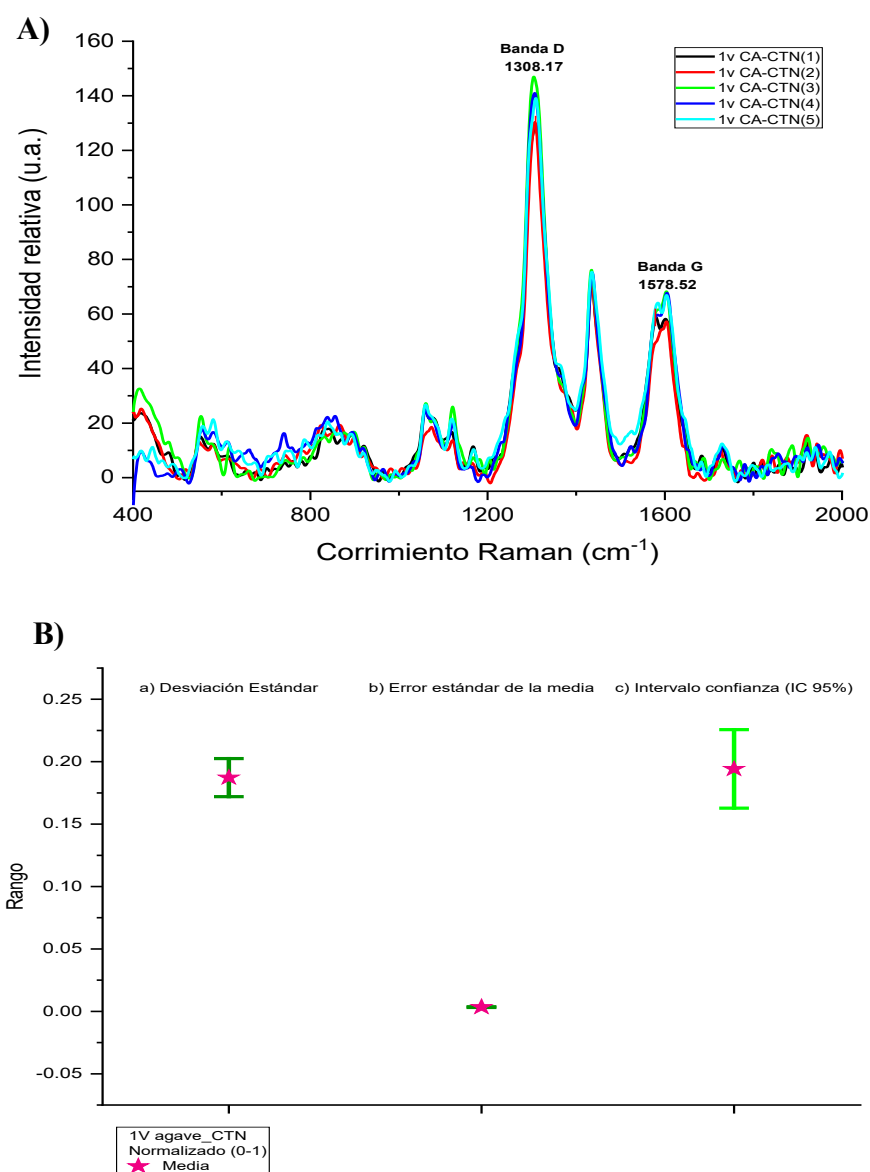


**Figura 9.4** Espectro Raman de: a) cutícula de agave-tratada, b) 1 V cutícula de agave con nanotubos de carbono y c) 3 V cutícula de agave con nanotubos de carbono.

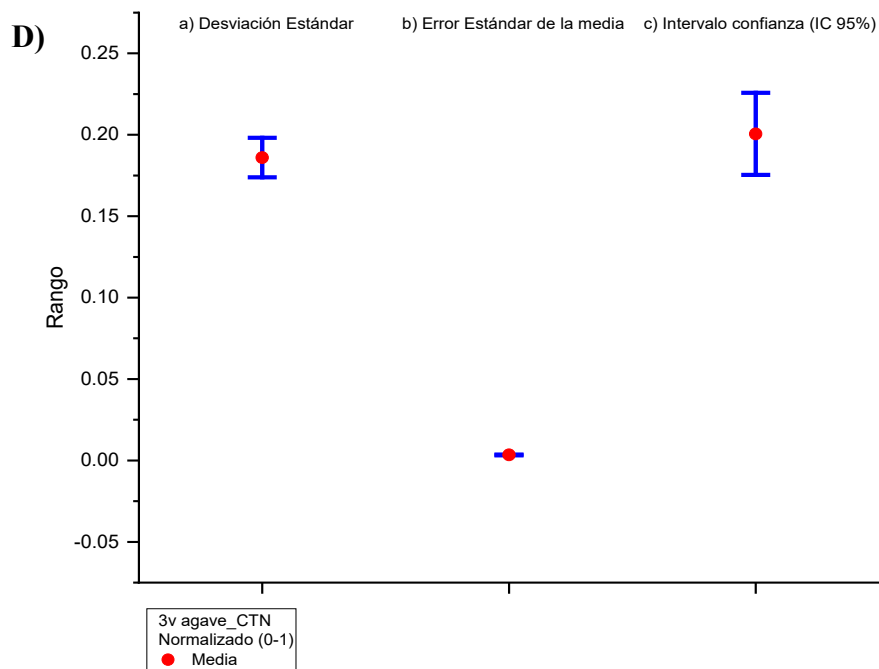
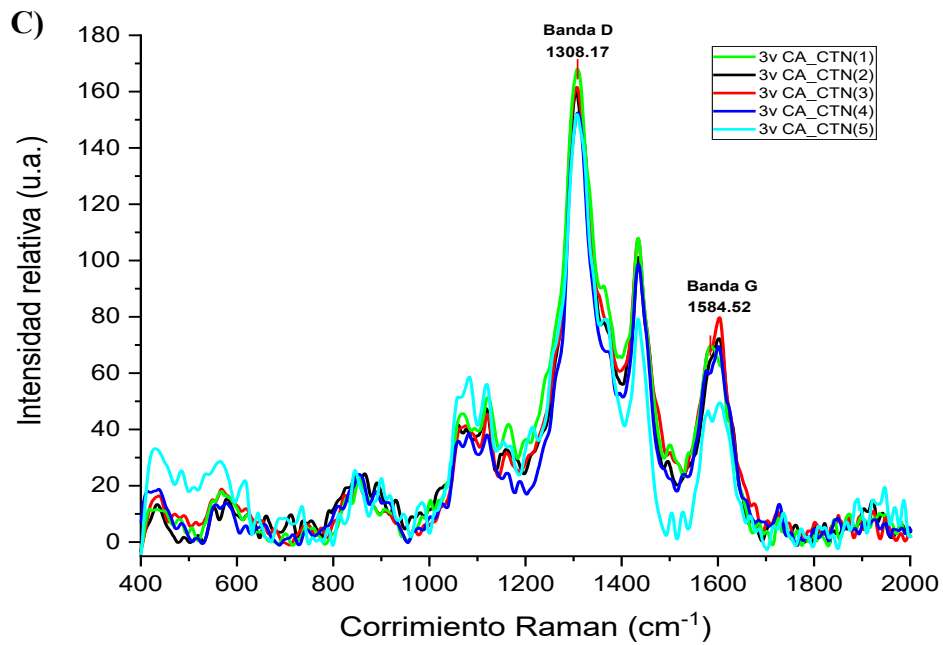
La banda D está adjudicada a un modo de respiración en anillo para el  $sp^2$  átomos de carbono hibridados y es característico de nanotubos de pared múltiple debido a la presencia de los múltiples defectos en sus paredes. La banda G representa el movimiento de flexión en el plano del grafeno del  $sp^2$  átomos de carbono hibridados. Esta banda está relacionada con la cristalinidad del material, y el hecho que presente una menor intensidad Raman respecto a la banda D indica los bajos niveles de cristalización congruente al acomodo asimétrico de las capas de grafeno en los nanotubos multicapa. Respecto al espectro en ausencia de nanotubos, no se identifica alguna señal Raman importante por lo que resulta conveniente como sustrato para la cuantificación de analitos.

### 9.4.1 Evaluación de la homogeneidad y reproducibilidad de los sustratos CA-CNT.

Mediante espectroscopia Raman fue evaluada la homogeneidad del recubrimiento de los nanotubos de carbono sobre la cutícula de agave. Para esto, se tomaron 5 mediciones en diferentes sitios de un mismo sustrato a 1 y 3 V y se realizaron gráficas de barras de error (Figura 9.4.1 a y b). Los valores de desviación estándar obtenidos fueron de 0.19 y 0.29 para 1 y 3 V respectivamente, lo que indica un tanto por ciento de confianza y representa un recubrimiento homogéneo, siendo el más homogéneo el de 1 V.

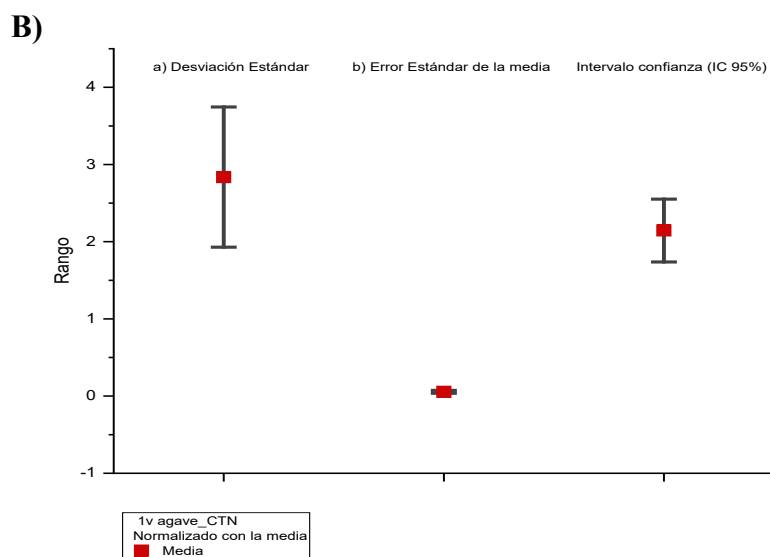
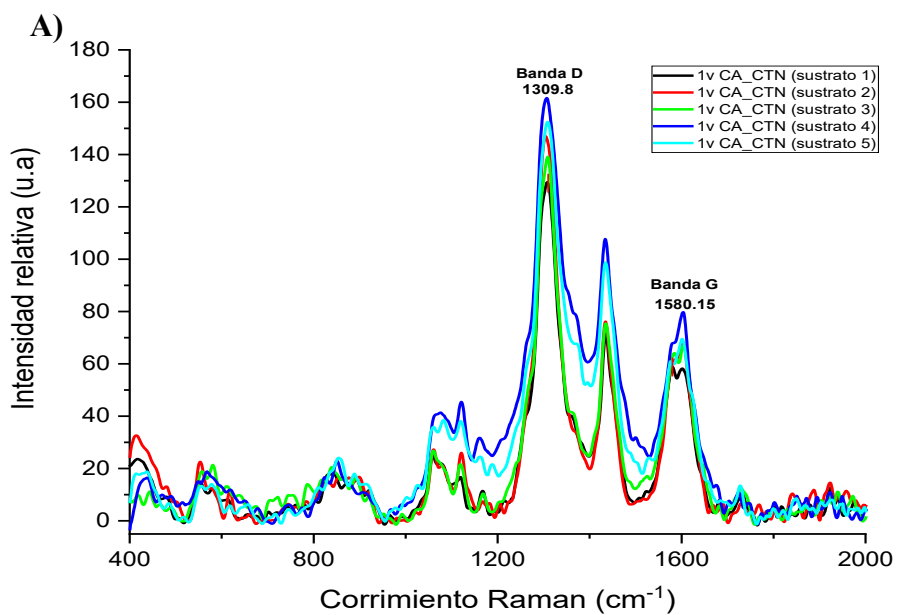


**Figura 9.4.1** Espectro Raman de 5 repeticiones de diferentes zonas del mismo sustrato 1V cutícula de agave con nanotubos de carbono **A)**. Gráfica de barras de error de 1V cutícula de agave con nanotubos de carbono indicando a) desviación estándar, b) Error estándar y c) Intervalo de confianza **B)**.

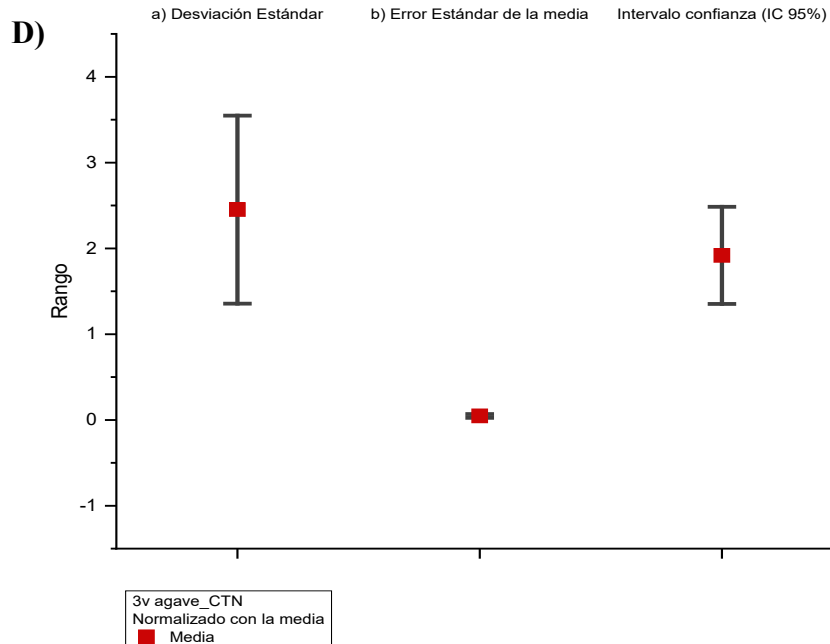
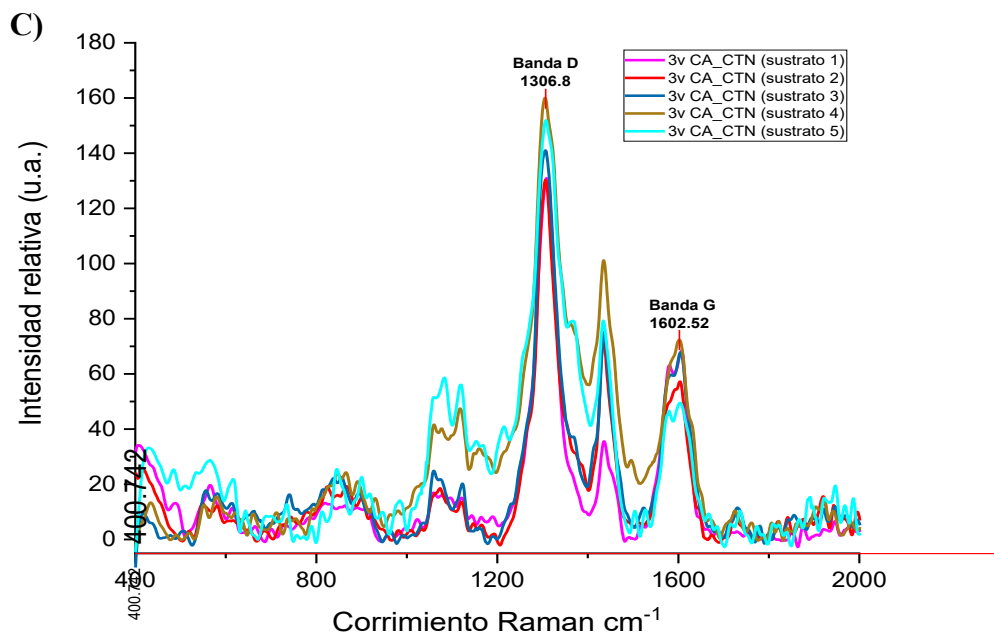


**Figura 9.4.2** Espectro Raman de 5 repeticiones en diferentes zonal del mismo sustrato de 3V cutícula de agave con nanotubos de carbono **C**). Gráfica de barras de error de 3V cutícula de agave con nanotubos de carbono indicando a) desviación estándar, b) Error estándar y c) Intervalo de confianza **D**).

Para evaluar la reproducibilidad del recubrimiento de los nanotubos de carbono sobre la cutícula de agave se tomaron 5 mediciones en diferentes sustratos obtenidos a las mismas condiciones (1 o 3 V) y se realizaron gráficas de barras de error (Figura 9.4.2 b y d). Los valores de desviación estándar obtenidos fueron de 2.45 y 2.84 para 1 y 3 V respectivamente, lo que indica un tanto por ciento de confianza y representa un recubrimiento reproducible, siendo el más reproducibles el de 1 V.

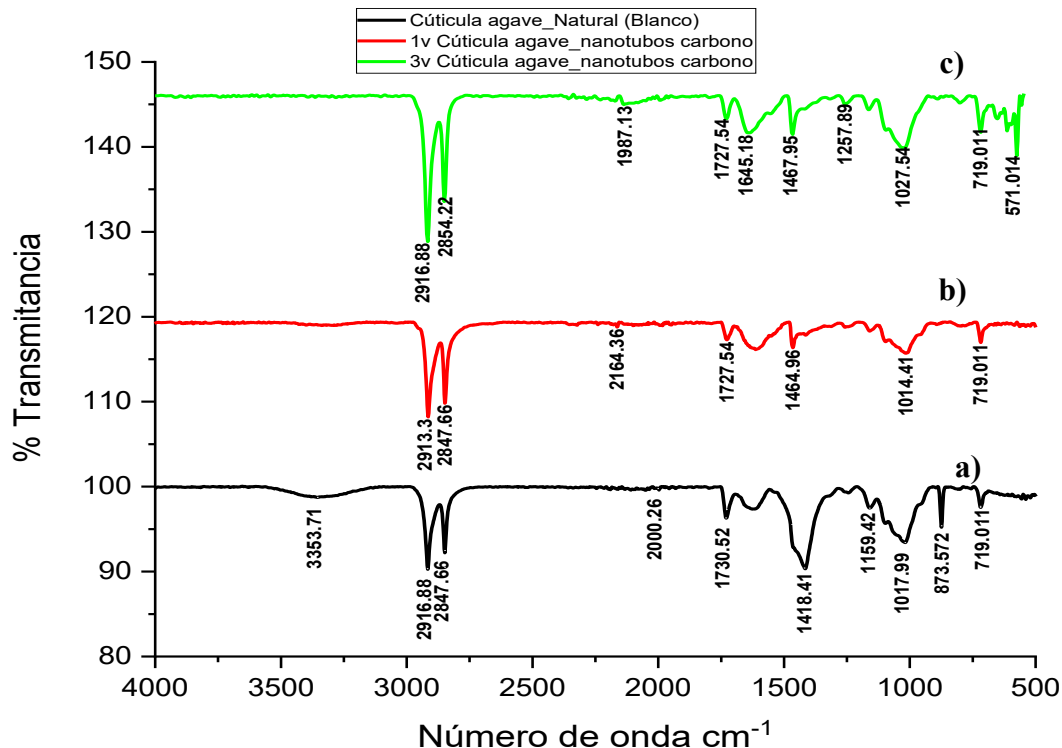


**Figura 9.4.3** Espectro Raman de 5 repeticiones de diferentes sustratos a 1V cutícula de agave con nanotubos de carbono A). Gráfica de barras de error de 1V cutícula de agave con nanotubos de carbono indicando a) desviación estándar, b) Error estándar y c) Intervalo de confianza B).



**Figura 9.4.4** Espectro Raman de 5 repeticiones de diferentes sustratos a 3V cutícula de agave con nanotubos de carbono C). Gráfica de barras de error de 3V cutícula de agave con nanotubos de carbono indicando a) desviación estándar, b) Error estándar y c) Intervalo de confianza D).

## 9.5 Caracterización por FT-IR.



**Figura 9.5** Espectros FTIR de la muestra de: a) CA-blanco y b) 1V CA-CTN y c) 3V CA-CTN.

Los números de onda del espectro infrarrojo de la cutícula de agave con nanotubos de carbono proporcionan información sobre las interacciones y modificaciones químicas que ocurren en la interfaz entre ambos materiales. Estos números de onda nos ayudan a comprender las propiedades y características de la cutícula de agave modificada con nanotubos de carbono.

**Tabla 9.5** Números de onda característicos y asignación de grupos funcionales de: cutícula de agave-tratada (CA\_tratada) y 1 V y 3V cutícula de agave con nanotubos de carbono (CA-CTN).

Número de onda $cm^{-1}$	CA_tratada	CA-CTN 1V	CA-CTN 3V	Asignación posible
3353	x			estiramiento de hidroxilo (OH).
2916-2847	x	x	x	enlaces C-H alifáticos o grupos metilo (CH <sub>3</sub> )
2164		x		enlaces de triple enlace (C≡N).

2000-1987	x	x	x	grupos carbonilos (C=O).
1727	x	x	x	grupos carbonilos (C=O).
1645			x	doble enlace (C=C).
1418-1159	x	x	x	enlaces de doble enlace (C=C).
1017-1027	x	x	x	enlaces (C-N).
873-719	x	x	x	enlaces C-H fuera del plano.
571			x	enlaces C-C.

En el número de onda  $3353\text{ cm}^{-1}$ , se observa una banda relacionada con los grupos de estiramiento de hidroxilo (-OH). Esto sugiere la presencia de grupos hidroxilo en la interfaz, lo cual puede ser el resultado de la interacción entre los nanotubos de carbono y los grupos funcionales de la cutícula de agave.

En el rango de  $2916\text{-}2847\text{ cm}^{-1}$ , se observa una banda asociada a los enlaces C-H alifáticos. Esto indica que tanto la cutícula de agave como los nanotubos de carbono pueden contener grupos metilo (-CH<sub>3</sub>) o metileno (-CH<sub>2</sub>-). La presencia de estos grupos puede afectar las propiedades físicas y químicas del recubrimiento.

El número de onda  $2164\text{ cm}^{-1}$  está relacionado con los enlaces de triple enlace carbono-nitrógeno (C≡N). Esto sugiere la presencia de grupos funcionales con enlaces de triple enlace carbono-nitrógeno en la interfaz entre la cutícula de agave y los nanotubos de carbono.

En el rango de  $2000\text{-}1987\text{ cm}^{-1}$ , se observa una banda que indica la presencia de grupos carbonilo (C=O). Esto sugiere la presencia de grupos carbonilo en la interfaz, lo cual puede tener implicaciones en las propiedades químicas y de unión entre los materiales.

La banda en el número de onda  $1727\text{ cm}^{-1}$  está asociada con los enlaces carbono-oxígeno (C=O). Esto indica la presencia de grupos carbonilo en la interfaz y puede influir en las propiedades químicas y de interacción entre la cutícula de agave y los nanotubos de carbono.

La banda en el número de onda  $1645\text{ cm}^{-1}$  está relacionada con los enlaces de doble enlace carbono-carbono (C=C). Esto sugiere la existencia de compuestos aromáticos o alquenos en la interfaz entre la cutícula de agave y los nanotubos de carbono.

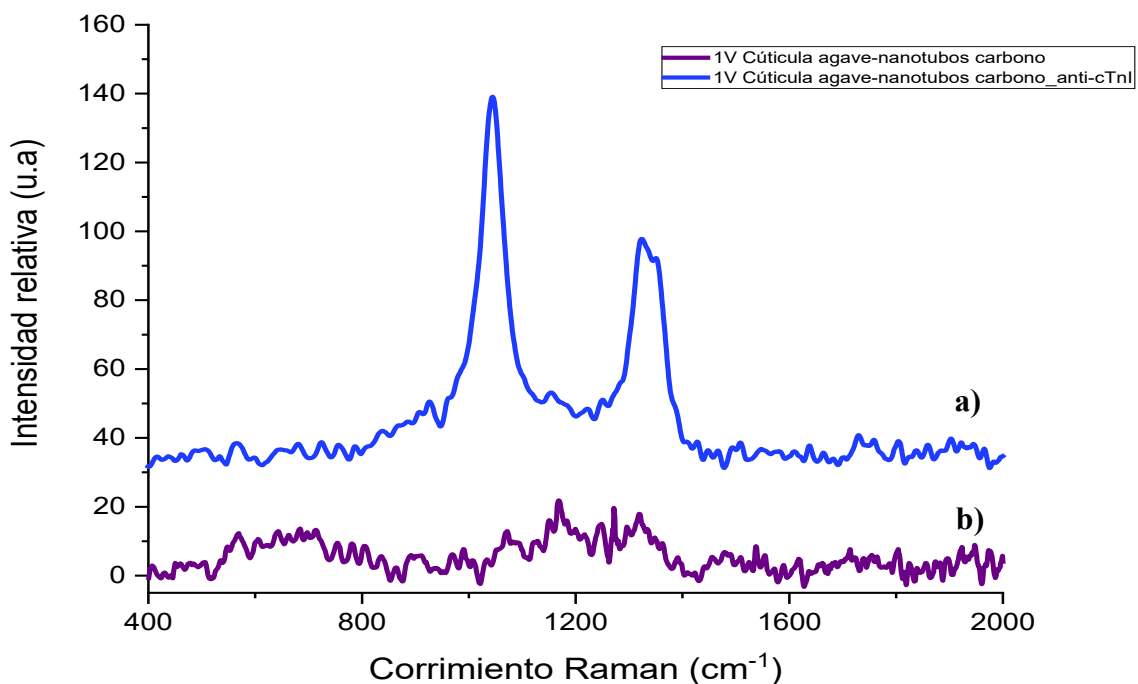
Las bandas en los números de onda 1418-1159  $\text{cm}^{-1}$  y 1017-1027  $\text{cm}^{-1}$  también están asociadas con los enlaces de doble enlace carbono-carbono (C=C). Esto indica la presencia de compuestos aromáticos o alquenos en la interfaz.

En el rango de 873-719  $\text{cm}^{-1}$ , se observan bandas relacionadas con los enlaces C-H fuera del plano en compuestos aromáticos. Esto sugiere la presencia de grupos aromáticos en la interfaz.

La banda en el número de onda 571  $\text{cm}^{-1}$  puede estar asociada con vibraciones de los nanotubos de carbono, ya que los nanotubos de carbono poseen modos vibracionales específicos en esta región del espectro infrarrojo.

### Actividad 3. Inmovilización de anticuerpo policlonal (anti-TnIc) sobre la CA-CNT.

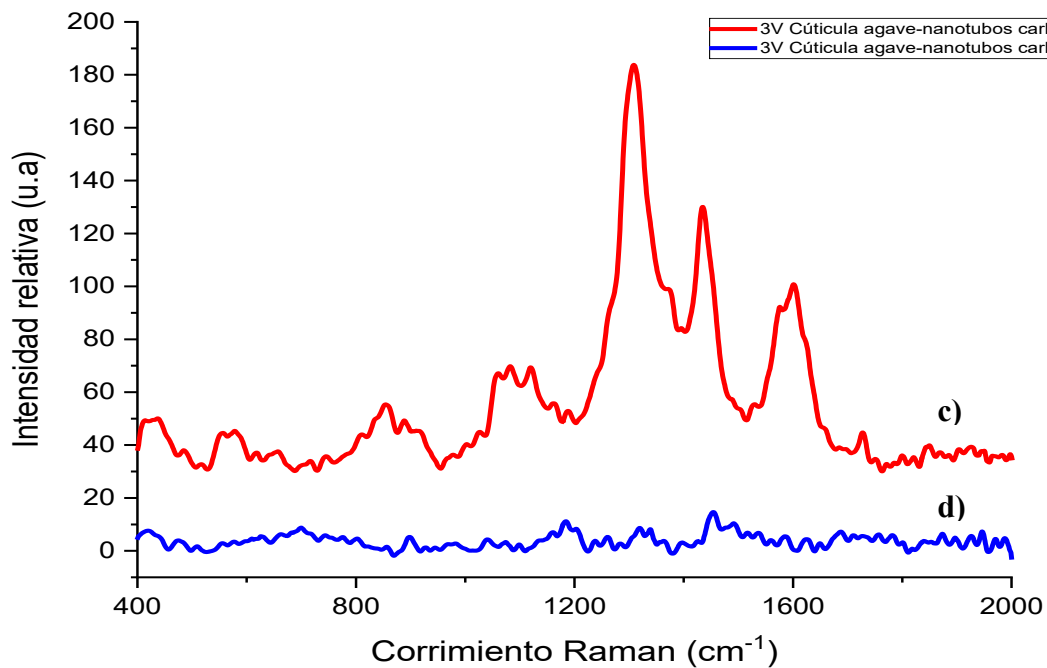
#### 9.6 Caracterización por espectroscopia Raman



**Figura 9.6.1** Espectros Raman de: a) 1V cutícula de agave con nanotubos de carbono y b) 1V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc.

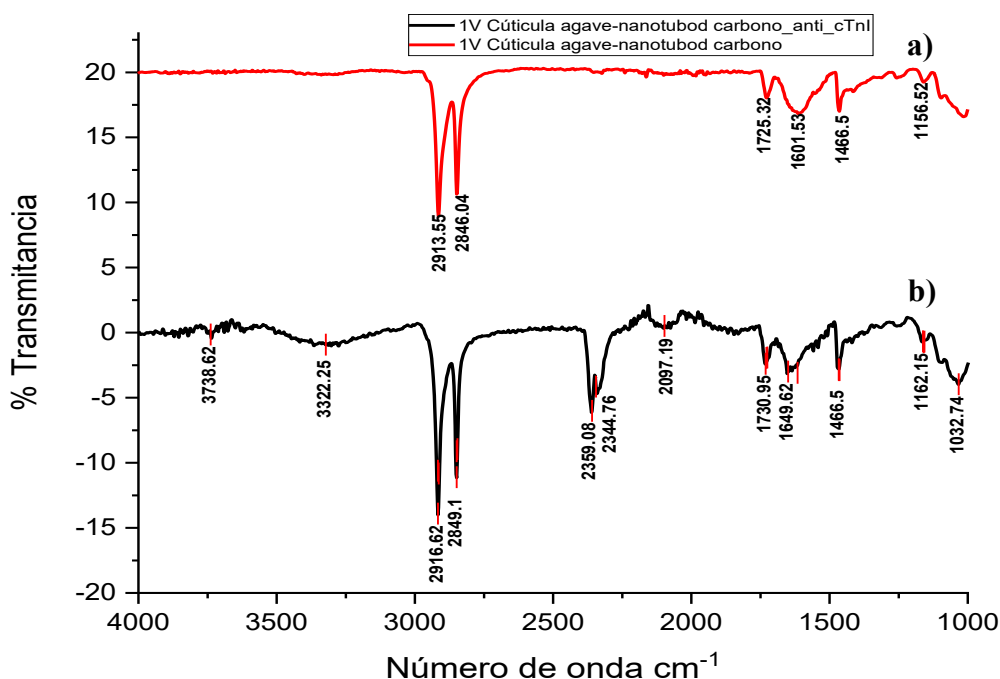
Los nanotubos de carbono tienen modos de vibración característicos en los espectros Raman, como la banda G (aproximadamente 1580  $\text{cm}^{-1}$ ) y la banda D (aproximadamente 1350  $\text{cm}^{-1}$ ). La inmovilización de anticuerpos anti-TnIc sobre la superficie de la cutícula de agave con los

nanotubos de carbono muestran las bandas características, pero dan lugar a un cambio significativo sobre la intensidad en los espectros Raman. Estos cambios están asociados con las interacciones y modificaciones químicas entre los anticuerpos y los nanotubos de carbono, así como con los cambios en la estructura y la conformación de los anticuerpos.



**Figura 9.6.2** Espectros Raman de: b) 3V cutícula de agave con nanotubos de carbono y d) 3V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc.

## 9.7 Caracterización por FT-IR.



**Figura 9.7.1** Espectros FTIR de: a) 1 V cutícula de agave con nanotubos de carbono y b) 1 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc.

Basándonos en los números de onda característicos proporcionados por los espectros en el rango infrarrojo, podemos realizar una discusión sobre los posibles grupos funcionales presentes en los espectros de la condición 1 V cutícula de agave-nanotubos de carbono (CA-CTN) y 1 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc (CA-CTN-anti-TnIc) en base a la siguiente tabla:

**Tabla 9.7.1** Números de onda característicos y asignación de grupos funcionales de: 1 V cutícula de agave-nanotubos de carbono (CA-CTN) y 1 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc (CA-CTN\_anti-TnIc).

Número de onda $cm^{-1}$	CA-CTN IV	CA-CTN_anti-TnIc IV_	Asignación posible
3738-3322		x	enlaces O-H y N-H.
2916-2849	x	x	enlaces C-H alifáticos o C-H aromáticos.
2359-2344		x	tripletes de (C≡N).

2097		x	enlaces (C-N).
1730-1725	x	x	grupos carbonilo (C=O).
1649-1601	x	x	enlaces (C=C) conjugados.
1466	x	x	enlaces C-H deformados.
1162-1156	x	x	grupos fosfato (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )
1032		x	enlace (C-P).

3738-3322 cm<sup>-1</sup>: Esta región puede estar asociada con los modos de vibración de los grupos hidroxilo O-H y N-H, lo que indica la posible presencia de grupos hidroxilo y amino por los anticuerpos.

2916-2849 cm<sup>-1</sup>: Esta banda puede estar relacionada con los modos de vibración de los grupos alifáticos de los enlaces C-H, lo que indica la presencia de cadenas de carbono en la cutícula de agave y en los nanotubos de carbono.

2359-2344 cm<sup>-1</sup>: Esta banda puede corresponder a los modos de vibración característicos de los nanotubos de carbono, como la banda G, que está relacionada con la vibración de los enlaces C≡C en la estructura de los nanotubos.

2097 cm<sup>-1</sup>: Esta región puede indicar la presencia de grupos funcionales como las aminas que pueden estar asociados a vibraciones características de los anticuerpos anti-TnIc.

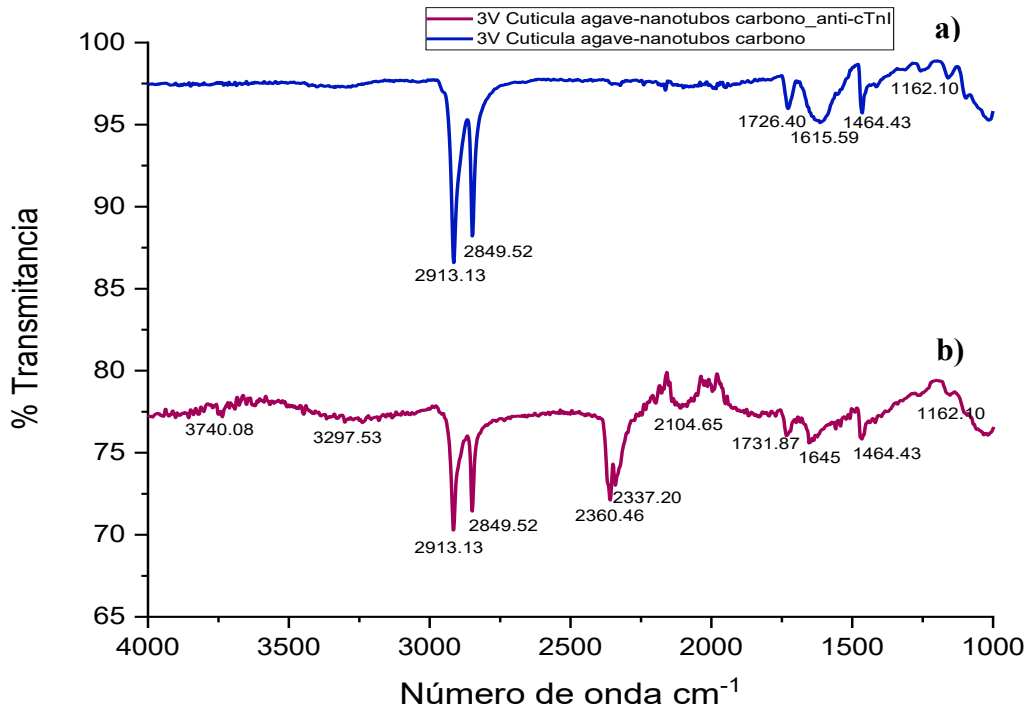
1730-1725 cm<sup>-1</sup>: Esta banda puede estar relacionada con los modos de vibración del grupo carbonilo (C=O), lo que sugiere la presencia de grupos carbonilo en la cutícula de agave o en los anticuerpos anti-TnIc inmovilizados.

1649-1601 cm<sup>-1</sup>: Esta región puede indicar la presencia de grupos amida (C=O y N-H), lo que sugiere la presencia de los anticuerpos anti-TnIc inmovilizados en la superficie de los nanotubos de carbono.

1466 cm<sup>-1</sup>: Esta banda puede corresponder a los modos de vibración de los nanotubos de carbono, como la banda D, que está asociada con la presencia de defectos en la estructura de los nanotubos.

1162-1156 cm<sup>-1</sup>: Esta banda puede estar relacionada con los modos de vibración de los grupos fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), lo que indica la presencia de los anticuerpos anti-TnIc inmovilizados.

1032  $\text{cm}^{-1}$ : Esta banda puede ser atribuida a las vibraciones del enlace carbono-fósforo (C-P), lo que respalda la presencia de los anticuerpos anti-TnIc inmobilizados.



**Figura 9.7.2** Espectros FTIR de: a) 3V cutícula de agave con nanotubos de carbono y b) 3V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc.

Para analizar los números de onda característicos y la asignación de grupos funcionales en la muestra de 3 V cutícula de agave-nanotubos de carbono (CA-CTN) y la muestra de 3 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc (CA-CTN-anti-TnIc), examinaremos los rangos de números de onda proporcionados y su posible correlación con las vibraciones moleculares características en la tabla siguiente:

**Tabla 9.7.2** Números de onda característicos y asignación de grupos funcionales de: 3 V cutícula de agave-nanotubos de carbono (CA-CTN) y 3 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc (CA-CTN\_anti-TnIc).

<i>Número de onda</i> <i>cm<sup>-1</sup></i>	<i>CA-CTN</i> <i>3V</i>	<i>CA-CTN_anti-TnIc</i> <i>3V</i>	<i>Asignación posible</i>
3740-3297		x	grupos hidroxilo (-OH).
2913-2849	x	x	enlaces C-H alifáticos o grupos metilo (-CH <sub>3</sub> ).
2360-2337		x	enlaces carbono-nitrógeno (C≡N).
2104		x	enlaces (C-N).
1731-1726	x	x	grupos carbonilo (C=O).
1645-1615	x	x	(C=C) conjugados.
1464	x	x	enlaces C-H deformados.
1162	x	x	grupos fosfato (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ).

Los posibles grupos funcionales presentes en los espectros de la cutícula de agave con nanotubos de carbono a 3V (3V-CA-CNT) y la cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc a 3V (3V-CA-CNT\_anti-TnIc).

3740-3297 cm<sup>-1</sup>: Esta región puede estar asociada con los modos de vibración de los grupos hidroxilo (-OH), indicando la presencia de enlaces de hidrógeno y posiblemente en la superficie de los nanotubos de carbono.

2913-2849 cm<sup>-1</sup>: Esta banda puede estar relacionada con los modos de vibración de los grupos alifáticos de los enlaces C-H, lo que indica la presencia de cadenas de carbono en la cutícula de agave y en los nanotubos de carbono.

2360-2337 cm<sup>-1</sup>: Esta banda puede corresponder a los modos de vibración característicos de los nanotubos de carbono, como la banda G, que está relacionada con la vibración de los enlaces carbono-carbono en la estructura de los nanotubos.

2104  $\text{cm}^{-1}$ : Esta región puede indicar la presencia de grupos funcionales relacionados con la cutícula de agave o con la inmovilización de los anticuerpos anti-TnIc, aunque se requiere un análisis más detallado para una asignación precisa.

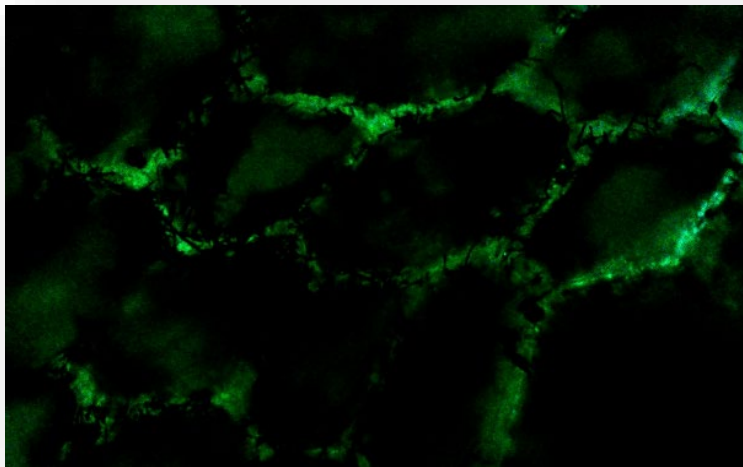
1731-1726  $\text{cm}^{-1}$ : Esta banda puede estar relacionada con los modos de vibración del grupo carbonilo (C=O), lo que sugiere la presencia de grupos carbonilo en la cutícula de agave.

1645-1615  $\text{cm}^{-1}$ : Esta región puede indicar la presencia de grupos amida (C=O y N-H), lo que sugiere la presencia de los anticuerpos anti-TnIc inmovilizados en la superficie de los nanotubos de carbono.

1464  $\text{cm}^{-1}$ : Esta banda puede corresponder a los modos de vibración de los nanotubos de carbono, como la banda D, que está asociada con la presencia de defectos en la estructura de los nanotubos.

1162  $\text{cm}^{-1}$ : Esta banda puede estar relacionada con los modos de vibración de los grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), lo que indica la presencia de los anticuerpos anti-TnIc inmovilizados.

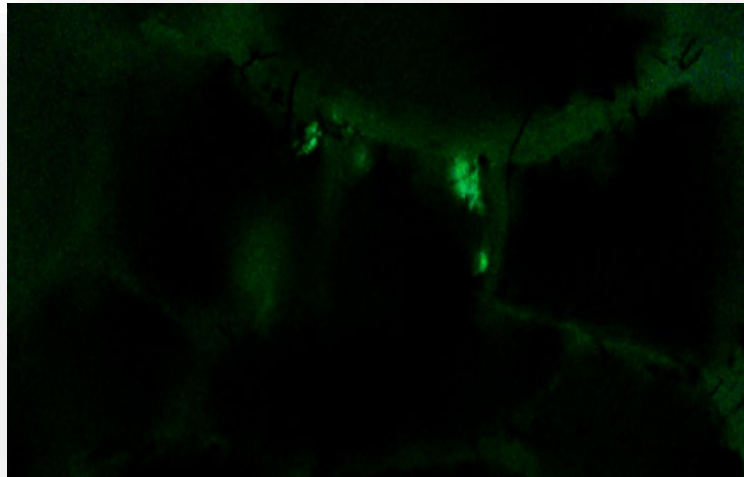
#### 9.8 Identificación de anticuerpos policlonales anti-TnIc anclados sobre el sustrato CA-CTN por Inmunofluorescencia indirecta (IFI).



**Figura 9.8.1** Micrografía 100x de 1 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc, después de la aplicación de IFI.

En la micrografía de alta resolución de 1 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc después de la aplicación de IFI (inmunofluorescencia indirecta), se observan puntos o áreas brillantes distribuidas sobre la superficie de la muestra. Estas áreas brillantes representarían la unión específica de los anticuerpos anti-TnIc a los nanotubos de carbono en la cutícula de agave.

La intensidad y distribución de las áreas brillantes dependen de factores, como la eficiencia de la inmovilización de los anticuerpos, la densidad de los nanotubos de carbono y la presencia de la proteína TnIc en la muestra. En general, se espera que las áreas brillantes sean más prominentes en las zonas donde hay una mayor inmovilización de anticuerpos TnIc y una mayor concentración de anticuerpo secundario unido a un fluoróforo.



**Figura 9.8.2** Micrografía 100x de 3 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc, después de la aplicación de la técnica IFI.

En la micrografía de la muestra de 3 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc de la técnica IFI, se observa patrones de fluorescencia distribuidos sobre la superficie de la muestra. La presencia de puntos o áreas brillantes en la micrografía indicaría la unión específica de los anticuerpos anti-TnIc a los nanotubos de carbono en la cutícula de agave.

Al comparar las micrografías de 100x de la muestra de 1 V cutícula de agave-nanotubos de carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc y la muestra de 3 V cutícula de agave-nanotubos de

carbono con la inmovilización de anticuerpos anti-TnIc después de la aplicación de la técnica IFI, se observa una diferencia en la uniformidad y homogeneidad de la fluorescencia.

En la micrografía de 1 V, es probable que se observe una distribución más uniforme y homogénea de la fluorescencia en toda la superficie de la muestra. Esto indica una mayor eficiencia en la inmovilización de los anticuerpos anti-TnIc en los nanotubos de carbono y una mayor presencia de la proteína TnIc en la muestra. La fluorescencia aparecerá de manera más consistente y extendida en comparación con la micrografía de 3 V.

Por otro lado, en la micrografía de 3 V, es posible que se observe una variabilidad en la intensidad y distribución de la fluorescencia. Esto puede deberse a una mayor concentración de nanotubos de carbono en ciertas áreas de la muestra, lo que resulta en la formación de agregados o cúmulos de anticuerpos y fluorescencia más intensa en esos puntos. Sin embargo, es importante mencionar que los cúmulos pueden indicar una menor uniformidad en la inmovilización de los anticuerpos y la presencia de zonas con una menor densidad de nanotubos de carbono.

# 10. Conclusiones

1. El tratamiento térmico-químico de la cutícula de agave logra el cierre de las estomas y la limpieza de la superficie, facilitando la deposición electroforética de nanotubos de carbono y obteniendo un recubrimiento homogéneo. Estos resultados son relevantes para la metodología propuesta, confirmando una preparación adecuada del sustrato para el recubrimiento de nanotubos de carbono.

2. La inmovilización electroforética de nanotubos de carbono en la cutícula de agave tratada ha resultado en un recubrimiento parcial pero uniforme en toda la superficie. El uso de diferentes voltajes ha demostrado que un voltaje de 1 V durante 15 minutos proporciona una distribución uniforme de nanotubos, mientras que un voltaje de 3 V aumenta el recubrimiento, pero con la formación de cúmulos en los bordes. Estos resultados respaldan la eficacia de la técnica de inmovilización electroforética y proporcionan información valiosa para optimizar las condiciones de recubrimiento en investigaciones futuras.

3. Los espectros Raman confirman la presencia de nanotubos de carbono en los sustratos CA-CNT, evidenciados por las bandas D y G características. Estos resultados respaldan la inmovilización exitosa de los nanotubos de carbono en la cutícula de agave tratada. Además, la ausencia de señales Raman significativas en la cutícula de agave sin nanotubos la convierte en un sustrato prometedor para aplicaciones de cuantificación de analitos.

4. Los resultados indican que tanto el recubrimiento a 1 V como a 3 V sobre la cutícula de agave son homogéneos en términos de la inmovilización de nanotubos de carbono. Sin embargo, el recubrimiento a 1 V muestra una mayor uniformidad y menor variabilidad, lo que lo convierte en la opción preferida. Estos hallazgos respaldan la efectividad de la inmovilización electroforética a 1 V para lograr un recubrimiento homogéneo de nanotubos de carbono sobre la cutícula de agave.

5. La muestra de 1 V presenta una distribución más uniforme y homogénea de la fluorescencia en comparación con la muestra de 3 V. Esto sugiere una mayor eficiencia en la inmovilización de los anticuerpos anti-TnIc. Por lo tanto, la condición de 1 V podría ser más adecuada para obtener una mayor uniformidad en la inmovilización de los anticuerpos y una mejor detección de la proteína de interés sobre la cutícula de agave-nanotubos de carbono.

Los resultados y discusiones presentados respaldan la viabilidad y efectividad de la metodología propuesta, brindando información valiosa para la optimización de las condiciones de preparación y recubrimiento de los sustratos CA-CNT. Estos hallazgos son relevantes para el desarrollo de pruebas rápidas basados en la cutícula de agave y nanotubos de carbono, con aplicaciones potenciales en la detección de biomarcadores y el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares.

## 12. Literatura citada

- Adams, H. P., Jr, Bendixen, B. H., Kappelle, L. J., Biller, J., Love, B. B., Gordon, D. L., & Marsh, E. E., 3rd (1993). Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*, 24(1), 35–41. <https://doi.org/10.1161/01.str.24.1.35>
- Al-Hillawi, E., Bhandari, D. G., Trayer, H. R., Trayer, I. P. et al. (1995). The Effects of Phosphorylation of Cardiac Troponin-I on Its Interactions with Actin and Cardiac Troponin-C. *European Journal of Biochemistry*, 228(3), pp. 962–970. doi:10.1111/J.1432-1033.1995.0962M.X
- Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., Torres-Morán, M. I., Herrera-Corral, J., Ávila-Reyes, J. A., Naranjo-Jiménez, N., & Uribe-Soto, J. N. (2013). Genetic variability in natural populations of *Agave durangensis* (Agavaceae) revealed by morphological and molecular traits. *The Southwestern Naturalist*, 58(3), 314-324.
- Andryukov BG, Lyapun IN, Bynina MP, Matosova EV. (2020) Simplified formats of modern biosensors: 60 years of using immunochromatographic test systems in laboratory diagnostics. *Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika*. 65(10), 611-618. <https://10.18821/0869-2084-2020-65-10-611-618>
- Apple, F. S., Collinson, P. O., and IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers (2012). Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clinical chemistry*, 58(1), 54–61. doi:10.1373/clinchem.2011.165795
- Aydin, S., Ugur, K., Aydin, S., Sahin, İ., & Yardim, M. (2019). Biomarkers in acute myocardial infarction: current perspectives. *Vascular health and risk management*, 15, 1–10. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S166157>
- Bhatnagar A. (2017). Environmental Determinants of Cardiovascular Disease. *Circulation research*, 121(2), 162–180. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.306458>
- Bodor, G. S., Survant, L., Voss, E. M., Smith, S., Porterfield, D., and Apple, F. S. (1997). Cardiac troponin T composition in normal and regenerating human skeletal muscle. *Clinical Chemistry*, 43(3), pp. 476–484. doi:10.1093/CLINCHEM/43.3.476
- Chen, L. C., Wang, E., Tai, C. S., Chiu, Y. C., Li, C. W., Lin, Y. R., Chen, W. L. (2020). Improving the reproducibility, accuracy, and stability of an electrochemical biosensor platform for point-of-care use. *Biosensors and Bioelectronics*, 155, 112-111. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112111>
- Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., & Gilliland, G. L. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 8(4), 55. <https://doi.org/10.3390/antib8040055>
- Collet, J. P., Thiele, H., Barbato, E., Barthélémy, O., Bauersachs, J., Bhatt, D. L., Dendale, P., Dorobantu, M., Edvardsen, T., Folliguet, T., Gale, C. P., Gilard, M., Jobs, A., Jüni, P., Lambrinou, E., Lewis, B. S., Mehilli, J., Meliga, E., Merkely, B., Mueller, C., ESC

- Scientific Document Group. (2021). 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *European heart journal*, 42(14), 1289–1367. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa575>
- Collet, Jean-Philippe, Holger Thiele, Emanuele Barbato, Olivier Barthélémy, Johann Bauersachs, et. al. (2021). Comments on the 2020 ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 7, Abril; 74, (6),482-487. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126188>
- Collinson, P.O., Boa, F.G., and Gaze, D.C. (2001). Measurement of cardiac troponins. *Annals of Clinical Biochemistry*, 38(5), pp. 423–449. doi:10.1258/0004563011901109
- Cosselman, K. E., Navas-Acien, A., & Kaufman, J. D. (2015). Environmental factors in cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, 12(11), 627-642. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.152>
- Cucinotta, D., & Vanelli, M. (2020). WHO Declares COVID-19 a Pandemic? *Acta biomédica: Atenei Parmensis World Health Organization (WHO)*., 91(1), 157–160. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i1.9397>
- Cummins, B., Auckland, M. L., and Cummins, P. (1987). Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 113 (6), 1333–1344. doi:10.1016/0002-8703(87)90645-4
- De Puig, H., Bosch, I., Gehrke, L., & Hamad-Schifferli, K. (2017). Challenges of the nano–bio interface in lateral flow and dipstick immunoassays. *Trends in biotechnology*, 35(12), 1169-1180. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.09.001>
- Dhakal, B. P., Sweitzer, N. K., Indik, J. H., Acharya, D., & William, P. (2020). SARS-CoV-2 Infection and Cardiovascular Disease: COVID-19 Heart. *Heart, lung & circulation*, 29(7), 973–987. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2020.05.101>
- Di Nardo, F., Chiarello, M., Cavallera, S., Baggiani, C., and Anfossi, L. (2021). Ten years of lateral flow immunoassay technique applications: Trends, challenges and future perspectives. *Sensors* 21 (15), 5185. doi:10.3390/S21155185
- Dimeski G. (2008). Interference testing. *The Clinical biochemist. Reviews*, 29 (Suppl 1), S43–S48.
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J. A., & Heredia, A. (2011). The biophysical design of plant cuticles: an overview. *The New phytologist*, 189(4), 938–949. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03553.x>
- Farrance, I. (2012). *Definitions - Point-of-care testing. Review: Policies, procedures and guidelines for point-of-care testing. Australian Government Department of Health and Ageing.* Recuperado el 25 de septiembre de 2021 de <https://www1.health.gov.au/internet/publications/publishing.nsf/Content/qupp-review~qupp-definitions>

- Ferrari, R., Di Pasquale, G., & Rapezzi, C. (2020). Commentary: What is the relationship between Covid-19 and cardiovascular disease. *International journal of cardiology*, 310, 167. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.03.074>.
- Ferrieres, G., Calzolari, C., Mani, J. C., Laune, D., Trinquier, S., Laprade, M. et al. (1998). Human cardiac troponin I: precise identification of antigenic epitopes and prediction of secondary structure. *Clinical Chemistry*, 44(3), pp. 487–493. doi:10.1093/CLINCHEM/44.3.487
- Filatov, V. L., Katrukha, A. G., Bereznikova, A. V., Esakova, T. V., Bulargina, T. V., Kolosova, O. V., et al. (1998). Epitope mapping of anti-troponin I monoclonal antibodies. *IUBMB Life* 45 (6), 1179–1187. doi:10.1080/15216549800203412
- Filatov, V. L., Katrukha, A. G., Bulargina, T. V., and Gusev, N. B. (1999) ‘Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. *Biochemistry. Biokhimiia*, 64(9), pp. 969–985. <https://europepmc.org/article/med/10521712>
- García, García, B. A. (2014). Análisis de factibilidad de producción de bioetanol a partir de agave tequilero.
- Gaze, D.C., and Collinson, P.O. (2008). Multiple molecular forms of circulating cardiac troponin: Analytical and clinical significance. *Annals of Clinical Biochemistry*, 45(4), pp. 349–355. doi:10.1258/acb.2007.007229
- Gell-Mann, M., & Hartle, J. B. (1995). Strong decoherence. arXiv preprint gr-qc/9509054.
- Gomes, A. V., Potter, J.D. and Szczesna-Cordary, D. (2002). The role of troponins in muscle contraction. *IUBMB life*, 54(6), pp. 323–333. doi:10.1080/15216540216037
- Heredia-Guerrero, J. A., Benítez, J. J., Domínguez, E., Bayer, I. S., Cingolani, R., Athanassiou, A., and Heredia, A. (2014). Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. *Frontiers in plant science*, 5, 305. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00305>
- Hessami, A., Shamshirian, A., Heydari, K., Pourali, F., Alizadeh-Navaei, R., Moosazadeh, M., & Rezaei, N. (2020). Cardiovascular diseases burden in COVID-19: Systematic review and meta-analysis. *The American journal of emergency medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2020.10.022>.
- Huang, B., Wu, J., Chen, H., Zhang, L., Zhou, X., and Wu, Q. (2021). Establishment and application of a dual-labeling time-resolved fluorescence immunoassay method for simultaneous detection of the troponin IC complex and full-size-troponin I. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7, p. 398. doi:10.3389/FCVM.2020.596051
- Hunkeler, N.M., Kullman, J., and Murphy, A.M. (1991). Troponin I isoform expression in human heart. *Circulation research*, 69(5), pp. 1409–1414. doi:10.1161/01.RES.69.5.1409
- HyTest. (2022). Cardiac troponins. Recuperado el 22 de Julio de 2021 de [https://hytest.fi/sites/5cd13840ff4f702c0cbc4c8d/content\\_entry5cd13897ff4f702c0cbc4cb2/5cd16678a3dd0d112c360e7d/files/Troponins\\_Booklet.pdf?1571052334](https://hytest.fi/sites/5cd13840ff4f702c0cbc4c8d/content_entry5cd13897ff4f702c0cbc4cb2/5cd16678a3dd0d112c360e7d/files/Troponins_Booklet.pdf?1571052334)

- INEGI (2022). Características de las defunciones registradas en México durante enero a agosto de 2020. México. Obtenido de sitio web:[https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020\\_Pnles.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020_Pnles.pdf)
- Januzzi, J. L., Jr, Mahler, S. A., Christenson, R. H., Rymer, J., Newby, L. K., Body, R., Morrow, D. A., & Jaffe, A. S. (2019). Recommendations for Institutions Transitioning to High-Sensitivity Troponin Testing: JACC Scientific Expert Panel. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(9), 1059–1077. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.12.046>.
- Katrakha, A. G., Bereznikova, A. V., Esakova, T. V., Pettersson, K., Lovgren, T., Severina, M. E. et al. (1997). *Clinical Chemistry*, 43(8), pp. 1379–1385.
- Katrakha, A. G., Bereznikova, A. V., Esakova, T. V., Pettersson, K., Lovgren, T., Severina, M. E., et al. (1997). Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex. *Clin. Chem.* 43 (8), 1379–1385. doi:10.1093/CLINCHEM/43.8.1379
- Katrakha, A. G., Bereznikova, A. V., Filatov, V. L., Esakova, T. V., Kolosova, O. V., Pettersson, K. et al. (1998). Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. *Clinical Chemistry*, 44(12), pp. 2433–2440. doi:10.1093/CLINCHEM/44.12.2433
- Katrakha, A., Bereznikova, A., Filatov, V., and Esakova, T. (1999). Biochemical factors influencing measurement of cardiac troponin I in serum. 1091–1095. doi:10.1515/CCLM.1999.159
- Keane, N. E., Quirk, P. G., Gao, Y., Patchell, V. B., Perry, S. V., and Levine, B. A. (1997). The ordered phosphorylation of cardiac troponin I by the cAMP-dependent protein kinase--structural consequences and functional implications. *European journal of biochemistry*, 248(2), pp. 329–337. doi:10.1111/J.1432-1033.1997.00329.X
- Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in biochemistry*, 60(1), 111–120. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>
- Land, K. J., Boeras, D. I., Chen, X. S., Ramsay, A. R., and Peeling, R. W. (2018). REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. *Nature Microbiology* 2018 4:1, 4(1), pp. 46–54. doi:10.1038/s41564-018-0295-3
- Larue, C., Ferrieres, G., Laprade, M., Calzolari, C., and Granier, C. (1998). Antigenic definition of cardiac troponin I. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 36(6), pp. 361–365. doi:10.1515/CCLM.1998.061
- Lee, G., and Liu, S. (2015). Monoclonal Antibodies Against Human Cardiac Troponin I for Immunoassays I. *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy*, 34(3), pp. 169–173. doi:10.1089/MAB.2014.0088

- Leide, J., Nierop, K. G., Deininger, A. C., Staiger, S., Riederer, M., & de Leeuw, J. W. (2020). Leaf cuticle analyses: Implications for the existence of cutan/non-ester cutin and its biosynthetic origin. *Annals of Botany*, 126(1), 141-162.
- Lippi, G., Favalaro, E. J., and Kavsak, P. (2019). Measurement of high-sensitivity cardiac troponin in pulmonary embolism: Useful test or a clinical distraction. *Semin. Thromb. Hemost.* 45 (8), 784–792. doi:10.1055/S-0039-1698762
- Liu, Y., Zhan, L., Qin, Z., Sackrison, J., and Bischof, J. C. (2021). Ultrasensitive and highly specific lateral flow assays for point-of-care diagnosis. *ACS Nano* 15 (3), 3593–3611. doi:10.1021/acsnano.0c10035
- Majdinasab, M., Badea, M., and Marty, J. L. (2022). Aptamer-based lateral flow assays: Current trends in clinical diagnostic rapid tests. *Pharmaceuticals* 15 (1), 90. doi:10.3390/PH15010090
- McCarthy, C. P.; Raber, I.; Chapman, A. R.; Sandoval, Y.; Apple, F. S.; Mills, N. L.; Januzzi, J. L. Jr. (2019). Myocardial Injury in the Era of High-Sensitivity Cardiac Troponin Assays: A Practical Approach for Clinicians. *JAMA cardiology*, 4(10), 1034–1042. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2019.2724>
- Naciones Unidas (UN). (2021). *Sustainable Development Goals*. Recuperado el 30 de agosto del 2021 de <https://www.un.org>
- Nakazawa, M., Mukumoto, M., & Miyatake, K. (2010). Production and purification of polyclonal antibodies. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 657, 63–74. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-783-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-783-9_5)
- Narro Robles, José R., (2018). Enfermedades No Transmisibles Situación y Propuestas de Acción: Una Perspectiva desde la Experiencia de México / José Ramón Narro Robles, coordinador, *México: Secretaría de Salud*. 232 pág.23-54. ISBN: 978-607-460-577-8 Sitio web:[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/416454/Enfermedades\\_No\\_Transmisibles\\_ebook.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/416454/Enfermedades_No_Transmisibles_ebook.pdf)
- O’Farrell B. (2008). Evolution in Lateral Flow–Based Immunoassay Systems. *Lateral Flow Immunoassay*, 1–33. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-240-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-240-3_1)
- O’Kennedy, R., and Murphy, C. (2017). *Immunoassays: development, applications and future trends*. CRC Press.
- Oku, Y., Kamiya, K., Kamiya, H., Shibahara, Y., Ii, T., & Uesaka, Y. (2001). Development of oligonucleotide lateral-flow immunoassay for multi-parameter detection. *Journal of immunological methods*, 258(1-2), 73–84. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(01\)00470-7](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(01)00470-7)
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2021). *Sustainable-development-goals*. Recuperado el 30 de agosto del 2021 de <https://www.who.int/>.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2021). *Definition of cardiovascular diseases*. Recuperado el 20 de agosto de 2021 de <https://www.euro.who.int>.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2019). *Cardiovascular diseases*. Recuperado el 20 de agosto de 2021 de [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020). *La OMS revela las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo: 2000-2019*. Recuperado el 26 de agosto del 2021 de <https://www.who.int/es/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2021). *Cardiovascular Diseases*. Recuperado el 7 de septiembre del 2021 de <https://www.who.int/health-topics/hypertension/cardiovascular-diseases>.

Organización Mundial de la Salud. (2011c). Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2010. RESUMEN DE ORIENTACIÓN. (Ginebra, suiza).

Ouyang, M., Tu, D., Tong, L., Sarwar, M., Bhimaraj, A., Li, C., Coté, G. L., and Di Carlo, D. (2021). A review of biosensor technologies for blood biomarkers toward monitoring cardiovascular diseases at the point-of-care. *Biosensors & bioelectronics*, 171, 112621. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112621>

Pan American Health Organization (PAHO). (2020) *Strategic Plan of the Pan American Health Organization (2020-2025): Equity at the Heart of Health. (Official Document, 359)*. Washington, D.C. Recuperado el 24 de agosto de 2021 de <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52473>

Sheng, J. J., and Jin, J. P. (2016). TNNI1, TNNI2 and TNNI3: Evolution, regulation, and protein structure-function relationships. *Gene* 576 (1), 385–394. doi:10.1016/J.GENE.2015.10.052

Silva Espino, E. (2020). Obtención de un biopolímero absorbente a partir de bagazo residual de agave mezcalero.

Thomas, H., Diamond, J., Vieco, A., Chaudhuri, S., Shinnar, E., Cromer, S., Perel, P., Mensah, G. A., Narula, J., Johnson, C. O., Roth, G. A., & Moran, A. E. (2018). *Global heart*, 13(3), 143–163. <https://doi.org/10.1016/j.gheart.2018.09.511>

Tripoliti, E. E., Ioannidou, P., Toumpaniaris, P., Rammos, A., Pacitto, D., Lourme, J. C., Goletsis, Y., Naka, K. K., Errachid, A., & Fotiadis, D. I. (2020). Point-of-Care Testing Devices for Heart Failure Analyzing Blood and Saliva Samples. *IEEE reviews in biomedical engineering*, 13, 17–31. <https://doi.org/10.1109/RBME.2019.2905730>.

Vargas-Rodríguez L., García-Vieyra M. I., León-Bata B. I., & Lozano-Sotomayor P. (2018). Propiedades físicas y estructura microscópica de la cutícula de Agave salmiana (mixiote). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 17(2), 1-9. <https://doi.org/10.5154/r.rchsza.2017.12.017>

Walmart. (2022). Recuperado el 7 de septiembre del 2022 de

<https://super.walmart.com.mx/ip/hoja-de-mixiote-por-pieza/00000000004503>

- World Heart Federation (WHF). (2021). *Page Home Statistics*. Recuperado el 26 de agosto de 2021 de <https://world-heart-federation.org>.
- World Heart Federation (WHF). (2021). *what-is-cvd/ what is a cardiovascular disease?* Recuperado el 26 de agosto de 2021 de <https://world-heart-federation.org>.
- World Heart Federation. (WHF). (2021). *About-WHF*. Recuperado el 26 de agosto de 2021 de <https://world-heart-federation.org>.
- World Heart Federation. (WHF). (2021). *How is cardiovascular disease diagnosed?* Recuperado el 26 de agosto de 2021 de <https://world-heart-federation.org/what-is-cvd/>.
- World Heart Federation. (WHF). (2021). *What is CVD?* Recuperado el 26 de agosto de 2021 de <https://world-heart-federation.org/what-is-cvd/>.
- Zhang, J., Lakshmipriya, T., & Gopinath, S. (2020). Electroanalysis on an Interdigitated Electrode for High-Affinity Cardiac Troponin I Biomarker Detection by Aptamer-Gold Conjugates. *ACS omega*, 5(40), 25899–25905. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03260>.
- Zhang, X., Luo, M., Tan, P., Zheng, L., & Shu, C. (2020). Magnetic nanoparticle drug targeting to patient-specific atherosclerosis: effects of magnetic field intensity and configuration. *Applied Mathematics and Mechanics*, 41(2), 349-360. <https://doi.org/10.1007/s10483-020-2566-9>.
- Zheng, Y. Y., Ma, Y. T., Zhang, J. Y., & Xie, X. (2020). COVID-19 and the cardiovascular system. *Nature reviews. Cardiology*, 17(5), 259–260. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0360-5>

## Anexo 1

Para el conteo de estomas se consideró el número de estomas cuando las dos células oclusivas estaban presentes y las células epidérmicas.

El índice estomático (IE) se calculó utilizando la fórmula siguiente:

$$IE = \frac{NE}{CE + NE} \times 100$$

dónde:

NE: número de estomas.

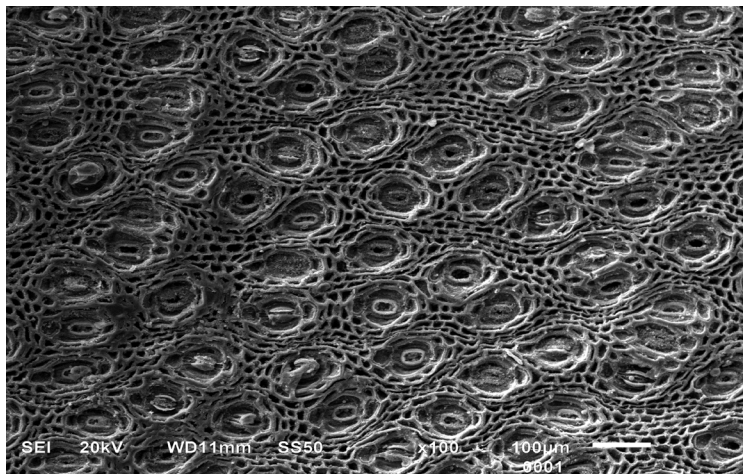
CE: número de células epidérmicas.

$$IE = \frac{95}{158 + 95} \times 100 = 33.92 \%$$

La densidad estomática (DE) se calculó utilizando la fórmula siguiente:

7 estomas ----- 100098 mm<sup>2</sup> tamaño de la lente

69.93 estomas ----- 1 mm<sup>2</sup>



## Anexo 2

### Reactivos y Equipos

#### ▪ Reactivos

Los reactivos empleados para los procedimientos que se describen se mencionan a continuación. Los nanotubos de carbono de pared múltiple (CNT) fueron adquiridos de Fisher. El ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y el ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) fueron adquiridos por FERMONT con una pureza de 99% utilizadas para la preparación de la disolución para la activación de los CNT. El cloruro de acilo y el clorhidrato de cisteamina se compraron en Acros organics y Sigma-Aldrich respectivamente. Filtro de membrana de nitrocelulosa fue comprada Sigma-Aldrich para la filtración de CNT. El bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) con una pureza de 99% fue adquirido de Sigma-Aldrich para estabilizar los CNT. El hidróxido de sodio (NaOH) con una pureza de 99% fueron comprados a Sigma-Aldrich para enjuagar la CA. El fosfato monopotásico ( $KH_2PO_4$ ) y el fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ) se adquirieron de FERMONT, ambos con una pureza de 99% para la preparación con agua desionizada para el buffer fosfatos (PBS). Para la inmovilización, los anticuerpos policlonales anti\_TnIc en dilución 1:1000 (código 4002) se obtuvieron de Cell Signaling y finalmente para realizar la química 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/N-hidroxisulfosucinimida (NHS) se adquirieron de Sigma-Aldrich.

#### ▪ Equipos

1. El equipo utilizado para la electrodeposición fue una fuente de poder **BioRad, modelo Power 3000** que consiste en un sistema de electrotransferencia que contiene geles y las membranas, electrodos (generalmente de grafito o acero inoxidable), una fuente de alimentación eléctrica para suministrar la corriente necesaria, y un controlador o software para ajustar los parámetros de electrodeposición, como el voltaje y la duración

2. En la dispersión de oro sobre las muestras para SEM, se utilizó el **equipo Denton Vacuum Desk V**. Este equipo es un evaporador térmico que se utiliza para la deposición de películas delgadas de materiales, como en este caso, oro. Las principales características y especificaciones del equipo Denton Vacuum Desk V son:

- Tipo de deposición: Evaporación térmica
- Fuente de evaporación: Fuente de filamento de tungsteno
- Control de temperatura: Permite calentar el material a evaporar
- Sistema de bombeo: Utiliza bombas de vacío para crear y mantener el vacío en la cámara de deposición.
- Control de deposición: Permite controlar el espesor y la velocidad de deposición del material.
- Sistema de vacío: Crea un ambiente de alto vacío dentro de la cámara de deposición para evitar la presencia de gases y contaminantes durante la evaporación.

3. En la caracterización morfológica de las muestras, se utilizó un microscopio electrónico de barrido (**SEM**) **Jeol JSM-6610LV**. Este equipo cuenta con las siguientes especificaciones:

- ✓ Resolución: 3.0 nm a 30 kV
- ✓ Modos de operación: SE (electrones secundarios) y BSE (electrones retrodispersados).
- ✓ Aceleración de voltaje: 0.5 a 30 kV
- ✓ Amplificación de imagen: 30x a 300,000x
- ✓ Detector de electrones secundarios: Everhart-Thornley
- ✓ Detector de electrones retrodispersados: de tipo anular
- ✓ Sistema de alto vacío

4. Para la adquisición de los espectros por espectroscopía Raman, se utilizó el **equipo marca Xplora, modelo BX41TF**. Este equipo se usaron las siguientes especificaciones:

- Tiempo de adquisición: 5 segundos.
- Fuente de láser: Láser de 785 nm.
- Rango espectral: 200-2000  $\text{cm}^{-1}$ .
- Modos de medición: Modo confocal.
- Detector: Detector de alta sensibilidad, como un detector CCD o un detector PMT.
- Microscopio óptico: permite la localización precisa de la región de interés para la medición Raman en se usó el 100x con un filtro del 10%.
- Software de análisis: dedicado para el análisis y procesamiento de los espectros Raman adquiridos.

5. Para la obtención de los espectros de infrarrojo utilizando Reflectancia Total Atenuada (ATR), se utilizó el **espectrómetro modelo ALPHA II Platinum, de la marca Bruker**. Este equipo cuenta con las siguientes características:

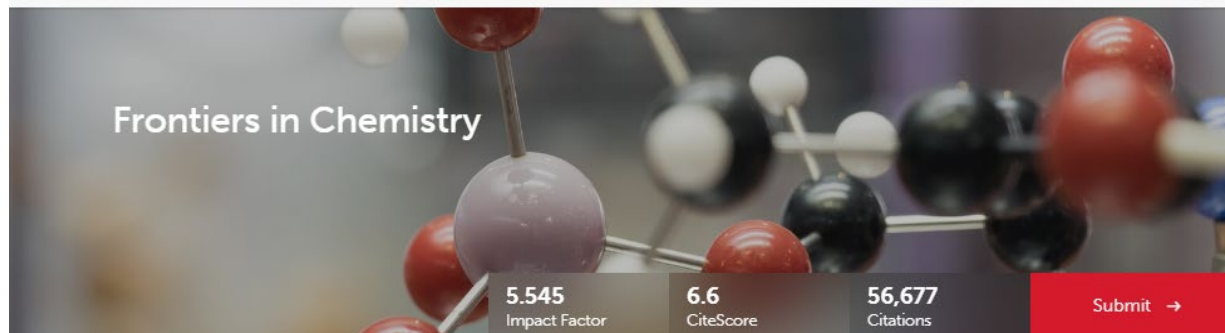
- ❖ Modelo: ALPHA II Platinum
- ❖ Marca: Bruker
- ❖ Técnica de medición: Reflectancia Total Atenuada (ATR)
- ❖ Rango espectral: 4000-400  $\text{cm}^{-1}$
- ❖ Resolución: 4  $\text{cm}^{-1}$
- ❖ Número de escaneos por muestra: 32
- ❖ Software de adquisición y análisis

6. El **Microscopio Trinocular de Contraste de Fase/Fluorescencia marca Optika** fue utilizado para las muestras con las siguientes especificaciones:

- ✓ Objetivos: 100x.
- ✓ Condensador: Condensador de contraste de fase integrado, que permite generar un contraste óptico mejorado en las muestras transparentes.
- ✓ Filtro: 50% para la observación de la fluorescencia.
- ✓ Fuente de luz: Sistema de iluminación halógena o LED, que proporciona una iluminación brillante y controlable para la observación de la muestra.

# Productos del Proyecto

## Artículo de Revisión



frontiers About us ▾ All journals All articles Submit your research Search Login

Frontiers in Chemistry Sections ▾ Articles Research Topics Editorial Board About journal ▾

5.545 Impact Factor 6.6 CiteScore 56,677 Citations Submit →

REVIEW article

Front. Chem., 13 October 2022  
Sec. Analytical Chemistry  
Volume 10 - 2022 |  
<https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1017305>

This article is part of the Research Topic  
Novel Raman-based Spectroscopic Techniques  
for the Detection of Pollutants and Biomarkers  
and Their Impact in Health  
[View all Articles >](#)

Download Article ▾

**2,099** <sup>1</sup> **2**  
Total Views and Downloads

View Article Impact

SHARE ON

Edited by  
Elba Mauriz  
Universidad de León, Spain

Reviewed by  
Lin Huang  
Shanghai Jiao Tong University, China

**A review of cardiac troponin I detection by surface enhanced Raman spectroscopy: Under the spotlight of point-of-care testing**

Anel I. Saviñon-Flores<sup>1</sup>, Fernanda Saviñon-Flores<sup>2</sup>, G. Trejo<sup>3</sup>, Erika Méndez<sup>2</sup>, Ștefan Țălu<sup>4</sup>, Miguel A. González-Fuentes<sup>2\*</sup> and Alia Méndez-Albores<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Química-ICUAP- Posgrado en Ciencias Ambientales, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico  
<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico  
<sup>3</sup> Laboratory of Composite Materials and Functional Coatings, Center for Research and Technological Development in Electrochemistry (CIDETEQ), Querétaro, Mexico  
<sup>4</sup> Technical University of Cluj-Napoca, The Directorate of Research, Development and Innovation Management (DMCDI), Cluj-Napoca, Romania

**Citation**



Sociedad Mexicana  
de Electroquímica

**BUAP**



## La Sociedad Mexicana de Electroquímica

Otorga la presente

# CONSTANCIA

A: **Anel Irán Saviñon Flores, Miguel A. González Fuentes y  
Alia Méndez Albores**

Por su destacada participación en la modalidad Póster, con  
el trabajo titulado:

**Desarrollo de un biosensor electroquímico para la cuantificación del  
biomarcador cardiaco Troponina I**

Dentro del XXXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica y 15th  
Meeting of the Mexican Section of the Electrochemical Society, **en modalidad híbrida**,  
celebrado del 10 al 14 de octubre de 2022 en la Facultad de Ciencias Químicas y  
Facultad de Ingeniería de la BUAP. Puebla, Pue., México.

**Dr. José A. Cabral Miramontes**  
Presidente del Comité Ejecutivo  
SMEQ 2021 - 2023

**Dra. Erika Méndez Albores**  
Presidenta del Comité Organizador  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



**BUAP**



## La Sociedad Mexicana de Electroquímica

Otorga la presente

# CONSTANCIA

A: **Anel Irán Saviñon Flores**

Por su destacada participación como parte del **Staff** del XXXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica y 15th Meeting of the Mexican Section of the Electrochemical Society, **en modalidad híbrida**, celebrado del 10 al 14 de octubre de 2022 en la Facultad de Ciencias Químicas y Facultad de Ingeniería de la BUAP. Puebla, Pue., México.

**Dr. José A. Cabral Miramontes**  
Presidente del Comité Ejecutivo  
SMEQ 2021 - 2023

**Dra. Erika Méndez Albores**  
Presidenta del Comité Organizador  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

### Participaciones

## La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

A través del Instituto de Ciencias  
otorga la presente

# CONSTANCIA

A: **Anel Irán Saviñon Flores**

Por haber impartido el Tema:

*"Desarrollo de un Inmunoensayo Basado en SERS  
para la cuantificación/confirmación de Troponina I cardiaca (cTnI)"*

En el marco del Coloquio **Tópicos de Química-Biofísica**

Realizado en línea del 04 de febrero al 10 de junio de 2022

Duración del Tema: 2 horas



**BUAP**

Registro:  
DGEC - BUAP - CQ - ICUAP - L / Coloq. - 001 / 22  
Foliot: 29, Foja 305  
Del libro de Registros 01/22

"Pensar bien, para vivir mejor"  
H. Puebla de Z., a 06 de julio de 2022

**Dr. Carlos Contreras Cruz**  
Director General de Educación Continua





**BUAP**

Registro:  
DGEC - BUAP - CQ - ICUAP - L / Coloq. - 001 / 22  
Folio: 4, Faja 305  
Del libro de Registros 01/22

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla  
A través del Instituto de Ciencias  
otorga la presente

## CONSTANCIA

A: **Anel Irán Saviñon Flores**

Por haber asistido al Coloquio

**Tópicos de Química-Biofísica**

Realizado en línea del 04 de febrero al 10 de junio de 2022

Con una duración de 48 horas

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a 06 de julio de 2022



Dr. Carlos Contreras Cruz  
Director General de Educación Continua



La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

A través del  
**Instituto de Ciencias**  
otorga la presente

## Constancia

A: **Saviñon Flores Anel Irán**

Por haber presentado cartel en el **XXIX Coloquio de Investigación del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales** con el trabajo **"Evaluación de la viabilidad tecnológica y ambiental de un biosensor para la cuantificación del biomarcador cardiaco Troponina I"** celebrado el 28 y 29 de abril de 2022.

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a 17 de mayo de 2022



Dra. Carolina Morán Raya  
Directora



**BUAP**

**ICUAP**  
INSTITUTO DE CIENCIAS BUAP

# Retribución Social



Escaneado con CamScanner



Escaneado con CamScanner