

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN INGENIERIA Y CIENCIAS  
APLICADAS

Desarrollo de un inmunosensor óptico basado en silicio poroso  
funcionalizado para la detección de biomarcadores de COVID-19

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN INGENIERIA Y CIENCIAS APLICADAS

PRESENTA: JUAN PABLO CASTREJON MARTINEZ

DIRECTOR: DRA. VIVECHANA AGARWAL  
COORDIRECTOR: DR. MOHAN KUMAR KESARLA

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO DE 2024



Instituto de  
Investigación en  
Ciencias  
Básicas y  
Aplicadas

## Resumen

La reciente pandemia de la enfermedad COVID-19 causada por el virus SARS-CoV-2 se convirtió en un problema sanitario mundial que causó 6,8 millones de muertes e infectó a más de 650 millones de personas, lo que provocó el colapso del sistema sanitario en varios países. En consecuencia, existe una necesidad acuciante de desarrollar dispositivos novedosos en el punto de atención que ofrezcan un diagnóstico rápido y fiable para evitar la escalada a pandemias. En este trabajo, proponemos un inmunosensor basado en silicio poroso (SiP) para la detección de anticuerpos producidos durante el inicio de la enfermedad COVID-19. La plataforma se compone de una matriz porosa con características morfológicas en la escala nanométrica que ofrece una gran área superficial para acomodar macromoléculas. Se empleó una ruta distintiva de funcionalización superficial por quelación NTA/Ni (ácido nitrilotriacético/níquel) para inmovilizar covalentemente el antígeno SARS-CoV-2 (es decir, la proteína RBD Spike 1) en la superficie interna de la matriz porosa. El sencillo principio de funcionamiento es: El espectro de reflectancia intrínseco de los interferómetros de pSi experimentará un desplazamiento espectral (hacia longitudes de onda menos energéticas) después de la inmunocaptura de los anticuerpos específicos de la enfermedad (es decir, inmunoglobulina G, IgG) por los bioreceptores de antígeno previamente inmovilizados en el interior del poro. De esta forma, se llena una fracción del volumen interno de los poros, lo que a su vez inducirá un cambio en el espesor óptico efectivo (EOE) del material transductor (es decir, un aumento del índice de refracción del nanomaterial). En consecuencia, los cambios en el valor EOE antes y después de un evento de detección pueden correlacionarse cuantitativamente con la concentración del anticuerpo capturado. El rendimiento analítico de nuestro inmunosensor nos permitió detectar, utilizando un formato sin etiquetas en tiempo real, concentraciones de

anticuerpos que oscilaban entre 0.1 y 1.28 mg/mL en muestras acondicionadas. La sencilla configuración de la plataforma propuesta podría encontrar su aplicabilidad en escenarios clínicos que requieran pruebas rápidas de diagnóstico masivo. Además, la versatilidad de nuestro sistema puede adaptarse para el diagnóstico y seguimiento de otras enfermedades mediante la selección juiciosa del par bioreceptor/biomarcador, respectivamente.

## **Abstract**

The recent pandemic of COVID-19 caused by the SARS-CoV-2 virus became a global health issue, causing 6.8 million deaths and infecting more than 650 million people leading to the collapse of the sanitary system in several countries. Consequently, there is a pressing need for developing novel point-of-care devices featuring rapid and reliable diagnosis to avoid escalation to pandemics. In this work, we propose an immunosensor based on porous silicon (pSi) for the detection of antibodies produced during the onset of the COVID-19 disease. The platform comprises a porous matrix displaying morphological features in the nanoscale regime rendering a large surface area to accommodate macromolecules. A distinctive NTA/Ni chelation surface functionalization route was employed to covalently immobilize the SARS-CoV-2 antigen (i.e., the RBD Spike 1 protein) into the internal surface of the porous scaffold. The operational principle: the intrinsic reflectance spectrum of the pSi interferometers will undergo a spectral shift toward longer wavelengths upon the immuno-capturing of the disease-specific antibodies (i.e., immunoglobulin G, IgG) by the already immobilized antigen bioreceptors. Thus, filling a fraction of the internal volume of the pores, which in turn will induce a change in the effective optical thickness (EOT) of the transducing material (i.e., an increase in refractive index). Consequently, changes in the EOT value before and after a detection event can be quantitatively correlated to the concentration of the captured antibody. The analytical performance of our immunosensor allowed us to detect, using a label-free format in real-time, antibody concentrations ranging from 0.1 to 1.28 mg/mL in conditioned samples. The simple setup of the proposed platform could find its applicability in clinical scenarios requiring rapid massive diagnosis tests. Furthermore, the versatility of our system can be adapted for the diagnosis and monitoring of other diseases by the judicious selection of the bioreceptor/biomarker pair, respectively.

## **Agradecimientos**

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mi querida madre, a toda mi familia y a mi pareja Alicia por su apoyo, ánimo y comprensión constantes durante todo el camino que he recorrido para obtener un título de Maestría. Su amor constante y su creencia en mí han sido mis focos de guía, impulsándome a seguir adelante incluso ante los retos.

También estoy inmensamente agradecido al CONAHCYT por proporcionarme apoyo financiero para mis estudios, sin el cual este esfuerzo no habría sido posible. Su inversión en mi educación ha enriquecido mi experiencia académica y ha contribuido significativamente a mi crecimiento personal y profesional.

Un agradecimiento especial a la Dra. Vivechana Agarwal, al Dr. Eduard Antúnez Cerón y al Dr. Mohan Kumar Kesarla por su inestimable orientación, tutoría y experiencia a lo largo del proceso de dirección de esta tesis. Su perspicaz retroalimentación, estímulo y dedicación a la excelencia académica han sido fundamentales para dar forma a mi investigación y desarrollo académico.

También me gustaría extender mi gratitud a mis colegas, Dra. Ariana, Brayan, Jesús, Diego, Alan y Eduardo "Pipo", por su apoyo, camaradería y entusiasmo intelectual compartido. Su colaboración y amistad han enriquecido mi trayectoria académica y han contribuido al éxito de esta tesis.

A todos aquellos que han contribuido, directa o indirectamente, a la realización de esta tesis, mi más sincero agradecimiento. Su apoyo ha sido decisivo para este logro, y estoy verdaderamente agradecido por su presencia en mi trayectoria académica.

# Índice

**Resumen 1**

**Abstract 3**

**Agradecimientos..... 4**

**Indice de tablas ..... 8**

**Indice de figuras ..... 9**

**Capitulo 1 Antecedentes..... 1**

1.1 Pandemia por SARS-CoV-2 .....1

1.2 Biosensores de SARS-CoV-2.....1

1.3 Silicio poroso.....2

1.4 Modificación superficial de silicio poroso.....4

1.4.1 Carbonización térmica .....4

1.4.2 Oxidación química y térmica.....5

1.4.3 Hidrosililación.....6

1.5 Biosensores de silicio poroso .....7

1.6 Biosensores de SARS-CoV-2 basados en silicio poroso.....8

1.7 Hipótesis .....10

1.8 Objetivos .....11

1.8.1 Objetivo general.....11

1.8.2 Objetivos Específicos.....11

**Capitulo 2 Marco Teórico..... 14**

2.1 SARS-CoV-2 .....14

2.2 Silicio poroso .....15

2.2.1	Fabricación de silicio poroso por anodización .....	16
2.2.2	Mecanismo de formación del silicio poroso .....	17
2.3	Propiedades del silicio poroso .....	20
2.3.1	Propiedades ópticas del silicio poroso.....	22
2.3.2	Espectroscopia de reflectancia interferometrica.....	23
2.4	Modificación superficial de Silicio poroso .....	24
2.4.1	Oxidación térmica del silicio poroso .....	24
2.4.2	Decoración de poros con TiO <sub>2</sub> .....	26
2.4.3	Silanización.....	26
2.4.4	Biofuncionalizacion.....	28
2.5	Biosensores .....	31
2.6	Silicio poroso como biosensor .....	33
2.7	Silicio poroso como sensor óptico de SARS-CoV-2 .....	34
<b>Capitulo 3 Desarrollo experimental.....</b>		<b>36</b>
3.1	Materiales.....	36
3.2	Fabricación de Silicio Poroso (SP).....	37
3.3	Pasivación superficial de silicio poroso .....	38
3.4	Inmovilización de RBD en silicio poroso .....	39
3.5	Metodología de adquisición de señales ópticas y procesamiento de datos	41
<b>Capitulo 4 Resultados y Discusión .....</b>		<b>45</b>
4.1	Caracterización de Silicio Poroso.....	45
4.1.1	Caracterización morfológica de la superficie porosa.....	45
4.1.2	Pruebas de estabilidad de silicio poroso modificado .....	46
4.2	Caracterización del silicio poroso bio-funcionalizado .....	48

4.2.1	FTIR.....	48
4.2.2	Cambios en el espesor óptico en función de los pasos de inmovilización .....	49
4.3	Respuesta óptica del biosensor.....	50
<b>Capitulo 5 Conclusiones.....</b>		<b>53</b>
<b>Referencias.....</b>		<b>55</b>

## Indice de tablas

<b>Tabla 1.1:</b> Nano-biosensores para detección de SARS-CoV-2. ....	2
<b>Tabla 1.2:</b> Nomenclatura de tamaños de poro (Canham L. , 2018). ....	3
<b>Tabla 1.3:</b> Biosensores fabricados a partir de silicio poroso. ....	8
<b>Tabla 1.4</b> Biosensores de SARS-CoV-2 basados en silicio poroso.....	9
<b>Tabla 3.1:</b> Materiales y reactivos utilizados durante el proyecto.....	36
<b>Tabla 3.2:</b> Parámetros de spin coating para depósito de TiOx sobre superficies de silicio poroso. ....	39

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1</b> Superficie de silicio poroso terminada en hidruro, en presencia del ácido de Lewis $\text{EtAlCl}_2$ , se produce la inserción de un alquilo o un alquenilo, dando lugar a superficies terminadas en alquilo o alquenilo, respectivamente.....	7
<b>Figura 2.1:</b> Esquema de una celda electroquímica de dos electrodos con silicio como electrodo de trabajo (ánodo) y platino como contraelectrodo (cátodo). Se ilustran también las reacciones que ocurren en ambos electrodos durante la formación de silicio poroso. ....	20
<b>Figura 2.2:</b> Arreglo de detección óptica y esquema de reflexión.....	24
<b>Figura 2.3</b> Esquema del proceso de oxidación del silicio poroso .....	25
<b>Figura 2.4</b> Proceso común de silanización adaptada de: (Hermanson, 2013). ....	27
<b>Figura 2.5</b> Complejo NTA-Ni con proteína inmovilizada por el tag de histidinas.....	31
<b>Figura 3.1:</b> Inmovilización de RBD mediante salinización con APTMS, a partir del SP recién fabricado 1), tras oxidación térmica 2), incorporación de APTMS 3), adición de glutaraldehído 4), inclusión de BCM-Lys 5), quelación con agente complejante $\text{Ni}^{2+}$ 6), e inmovilización de proteína marcada con His 7) (el esquema no está dibujado a escala). ....	41
<b>Figura 3.2:</b> Esquema de pasos en el procesamiento de datos.....	43
<b>Figura 4.1</b> Micrografía SEM correspondiente a la sección transversal del interferómetro SP (A) antes, y (B) después de la deposición de la capa de $\text{TiO}_2$ sobre la superficie interna de la matriz porosa. ....	46
<b>Figura 4.2</b> Espectro de reflectancia A) y análisis FFT B) ilustrando los cambios ópticos del proceso de pasivación superficial realizado a los interferómetros de SP. ....	47
<b>Figura 4.3</b> Pruebas de estabilidad 1) SP Oxidado, 2) SP con recubrimiento de $\text{TiO}_2$ , 3) SP recién fabricado .....	47
<b>Figura 4.4</b> Espectro de FTIR de una muestra de silicio poroso funcionalizado con APTMS, glutaraldehído, $\alpha$ , $\alpha$ -bis(carboximetil)-L-lisina hydrate, $\text{NiCl}_2$ y RBD de SARS-CoV-2.....	48

**Figura 4.5** Espectro de reflectancia A) y análisis FFT B) correspondientes a los pasos de funcionalización críticos para el proceso de inmovilización de proteína RBD.....49

**Figura 4.6** Ejemplos de sensogramas de ambas variantes y comparación en términos de EOE después de pruebas triplicadas.....51

# Capítulo 1 Antecedentes

## 1.1 Pandemia por SARS-CoV-2

La epidemia conocida como "COVID-19" causada por el virus SARS-CoV-2 se extendió por todo el mundo en 2019-2023 (WHO, 2023) causando alrededor de 6,9 millones de muertes e infectando a 700 millones de personas (octubre de 2023) (Worldometer, 2023). La enfermedad provocó el colapso del sistema sanitario de varios países en dos años debido a la alta transmisión y a la grave enfermedad causada por el virus, convirtiéndose en una amenaza para la salud pública que parecía ganar fuerza cada cierto tiempo (WHO, UNICEF, 2021). El virus SARS-CoV-2 causa una infección respiratoria aguda que presenta una amplia gama de síntomas como fiebre, escalofríos, mialgia, dificultad respiratoria, tos, taquipnea o pleuresía, y en algunos casos, varios síntomas neurológicos (Larsen, 2021), (Harapan, 2021). Por lo tanto, el diagnóstico ágil de la enfermedad atribuible al virus del SRAS-CoV-2 resulta crítico para preservar el bienestar de las personas y evitar la propagación del virus (Marco Ciotti, 2021).

## 1.2 Biosensores de SARS-CoV-2

La nanotecnología y la biotecnología han asumido el reto de la detección de infecciones virales, especialmente importante durante pandemias como la de COVID-19. Estos enfoques innovadores prometen una detección rápida, sensible y fiable en comparación con métodos actuales como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR por sus siglas

en inglés), que pueden ser lentos y poco prácticos en entornos con recursos limitados. Las herramientas ideales, los nanosensores y los biosensores, deben ser fáciles de usar, portátiles y muy precisos, minimizando los falsos positivos/negativos al tiempo que ofrecen resultados sólidos y rápidos. Este enfoque en la detección avanzada podría mejorar nuestra comprensión de la propagación viral y, en última instancia, ayudar a controlar y prevenir nuevos brotes de infecciones virales. En la Tabla 1.1 se muestran algunos nano-biosensores para detección de biomoléculas que se relacionan con la enfermedad provocada por el virus del SARS-CoV-2.

**Tabla 1.1:** Nano-biosensores para detección de SARS-CoV-2.

<b><i>Dispositivo</i></b>	<b><i>Molécula detectada</i></b>	<b><i>Mecanismo de transducción</i></b>	<b><i>Referencia</i></b>
<i>Electrodo funcionalizado</i>	Proteína spike SARS-CoV-2	Electroquímico	(Xian, et al., 2020)
<i>Transductor de grafeno con efecto campo</i>	Proteína spike SARS-CoV-2	Espectroscopia Raman	(Seo, et al., 2020)
<i>Grafeno con nanopartículas de oro</i>	Oligonucleótidos (ssADN)	Electroquímico	(Alafeef, Dighe, Moitra, & Pan, 2020)

### 1.3 Silicio poroso

Alrededor del 27% en masa de la corteza terrestre es silicio, aunque nunca se encuentra en la naturaleza como elemento libre, sino solo en compuestos que contienen enlaces oxígeno-silicio. Esto convierte al silicio en un material de interés por su fácil obtención y relativo bajo costo, además de ser un material

ya aplicado en la industria y altamente estudiado en el área de la investigación (Rayner-Canham, 2000).

El silicio poroso (SiP) es un material que se obtiene tratando una oblea de silicio con ácido fluorhídrico, los mecanismos de formación de silicio poroso abarcan desde técnicas electroquímicas hasta técnicas mecánicas, a su vez, cada una de las técnicas presenta variables que influyen en la morfología final del silicio poroso, esto convierte al silicio poroso un material altamente modificable del que se pueden obtener diferentes propiedades morfológicas como tamaño de poro (Tabla 1.2), densidad de poros, forma de poros, también se pueden obtener nuevas propiedades como su biocompatibilidad y biodegradabilidad, propiedades que no posee el material en su forma amorfa. La gran variedad de propiedades que puede adquirir el silicio poroso se debe en parte a la cantidad de métodos de formación. Los métodos de formación de silicio poroso más comunes son:

- Formación de silicio poroso por anodización.
- Formación de silicio poroso por grabado galvánico.
- Formación de silicio poroso por grabado asistido por nanopartículas metálicas.
- Formación de silicio poroso por grabado de vapor de ácido nítrico/ ácido fluorhídrico (HNO<sub>3</sub>/HF) (Canham L. , 2018).

La porosidad se clasifica con relación al tamaño de poro y atiende los siguientes términos:

**Tabla 1.2:** Nomenclatura de tamaños de poro (Canham L. , 2018).

<b>TERMINO</b>	<b>TAMAÑO PROMEDIO DE PORO (NM)</b>
----------------	-------------------------------------

<b>NANOPOROSO</b>	Hasta 100 nm
<b>MACROPOROSO</b>	Mas de 50 nm
<b>MESOPOROSO</b>	Entre 2 y 50 nm
<b>MICROPOROSO</b>	<2 nm

## **1.4 Modificación superficial de silicio poroso**

El silicio poroso además puede tener modificaciones superficiales, es decir, se puede funcionalizar la superficie para que el material adquiera propiedades específicas. El silicio poroso sin superficie modificada es altamente reactivo y susceptible a oxidación, por esa razón, la modificación superficial se usa para estabilizar las propiedades estructurales de la matriz porosa, consecuentemente, se obtienen superficies con propiedades convenientes que resultan de gran interés para la biomedicina, pues, son capaces de superar los desafíos actuales en las áreas de liberación controlada de fármacos y biosensores (Karyn L. Jarvis, 2012).

Las técnicas de modificación superficial son diversas y se debe hacer un estudio de las propiedades deseadas para elegir el método de modificación superficial que será utilizado. Las técnicas más convencionales de modificación superficial de silicio poroso son:

### **1.4.1 Carbonización térmica**

El silicio poroso carbonizado térmicamente (SPCT) ha sido objeto de una amplia investigación por parte de Salonen y sus colegas, (J. Salonen, 2018) que ha dado lugar a varias publicaciones centradas en la carga y administración de fármacos. A diferencia del material obtenido mediante

hidrosililación, el silicio poroso "hidrocarbonizado" (SPCT) es conocido por su estabilidad medioambiental, además, presenta notables capacidades de detección química. La película "hidrocarbonizada" resultante suele conservar su estructura porosa y está compuesta químicamente por una mezcla de especies C-H, C=C aromáticas y C-OH. En particular, la temperatura durante la reacción de pirólisis es un factor crítico que influye en el grado de hidrofobicidad o hidrofiliidad de la película resultante. La reacción del acetileno con el silicio poroso a temperaturas superiores a 500 °C puede provocar una carbonización significativa, y los tiempos de reacción prolongados o las temperaturas más altas pueden producir películas negras con aspecto de hollín (Canham L. , 2018)

#### **1.4.2 Oxidación química y térmica.**

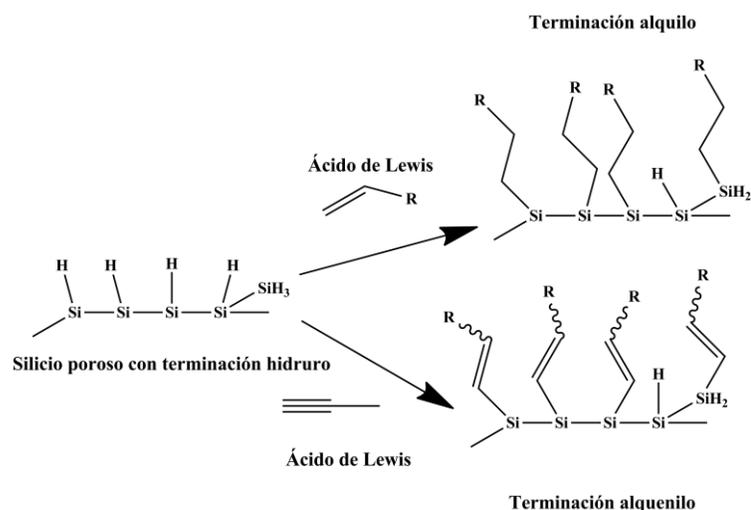
El silicio poroso, que se distingue por su superficie expansiva y sus grupos reactivos Si-H y Si-Si, es muy susceptible a la oxidación cuando se expone al aire o al agua. El proceso de oxidación da lugar a la formación de mano fases de SiO<sub>2</sub>, que se disuelven fácilmente en medios acuosos. Esta disolución se acelera aún más por la presencia de tensioactivos o nucleófilos. Para la oxidación del silicio poroso pueden emplearse diversos oxidantes químicos o electroquímicos, siendo el aire el oxidante más sencillo.

La oxidación del silicio poroso por exposición al aire produce diversas especies superficiales, y los tipos específicos formados dependen de la temperatura de reacción y de la humedad del aire. En particular, el enlace Si-Si presenta una estabilidad más débil que el enlace Si-H. En consecuencia, durante los procesos de oxidación suave, existe una predilección por el ataque preferencial a los enlaces Si-Si. (Sailor M. J., 2012)

La oxidación térmica, una técnica muy utilizada en la industria microelectrónica para producir óxidos de silicio de alta calidad, también es eficaz para el silicio poroso. El método convencional consiste en calentar el silicio poroso en un horno tubular o en un horno de caja en aire ambiente durante periodos variables, que van de minutos a horas. El horno tubular permite flexibilidad al ser alimentado con oxígeno puro o humidificado, mejorando la reproducibilidad del proceso. Sin embargo, hay que tener cuidado para evitar las tensiones térmicas que pueden provocar el agrietamiento de las muestras al insertarlas o extraerlas de un horno caliente. (Canham L. , 2018)

### **1.4.3 Hidrosililación**

La hidrosililación de enlaces carbono-carbono insaturados en el silicio poroso terminado en hidruro (Si-H) se puede iniciar utilizando el ácido de Lewis  $\text{EtAlCl}_2$  a temperatura ambiente en cuestión de minutos u horas, dependiendo del fragmento orgánico, como se describe en la Figura 1.1. La inserción de alquenos o alquinos en los grupos Si-H superficiales da lugar a la terminación alquílica o alquenílica, respectivamente. Ambas químicas aportan tolerancia a una amplia gama de funcionalidades químicas y son complementarias, lo que proporciona flexibilidad a la hora de elegir propiedades superficiales específicas. (Buriak, 1999)



**Figura 1.1** Superficie de silicio poroso terminada en hidruro, en presencia del ácido de Lewis  $\text{EtAlCl}_2$ , se produce la inserción de un alquilo o un alqueno, dando lugar a superficies terminadas en alquilo o alqueno, respectivamente.

## 1.5 Biosensores de silicio poroso

Las superficies hidrófobas, recubiertas con una monocapa de largas cadenas alquílicas, presentan una estabilización significativa en condiciones básicas químicamente exigentes, en comparación con el silicio poroso no funcionalizado. Esta mayor estabilidad hace que estas superficies sean apropiadas para aplicaciones en entornos químicos exigentes. Este enfoque versátil de la modificación de superficies ofrece una valiosa herramienta para adaptar las propiedades del silicio poroso, abriendo oportunidades para diversas aplicaciones en áreas como la catálisis, la detección y los dispositivos biomédicos (Jillian M. Buriak, 1999).

Derivado de la abundancia, fácil fabricación, área superficial grande, química de superficie modificable, tamaño de poro modificable y propiedades fotónicas, el silicio poroso también es un material idóneo para su uso en biosensores como elemento transductor. Los biosensores de silicio poroso se pueden usar para detectar una amplia variedad de biomoléculas (véase tabla 1.3).

**Tabla 1.3:** Biosensores fabricados a partir de silicio poroso.

<b>Estructura de silicio poroso</b>	<b>Mecanismo de transducción</b>	<b>Tipo de bioprobeta</b>	<b>Probeta de captura</b>	<b>Analito</b>	<b>Referencia</b>
<i>Silicio nanoporoso</i>	Reflectividad	Anticuerpo	Anticuerpo o <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	(Yanyan Tang, 2016)
<i>Nano cables de silicio</i>	Fotoluminiscencia	Anticuerpo	Anti-CRPs	proteína reactiva al C	(Alessia Irrera, 2018)
<i>SiO<sub>2</sub> micro poroso</i>	Reflectividad	ADN	ADN		(Rita Vilensky, 2015)
<i>SP con capa delgada de Au</i>	Reflectancia	Anticuerpo	Anti-AFB1	Aflatoxina B1	(Alerii Myndrul, 2017)

## 1.6 Biosensores de SARS-CoV-2 basados en silicio poroso

Los biosensores de SARS-CoV-2 basados en silicio poroso representan una innovación de vanguardia en el campo de la tecnología de diagnóstico, ya que ofrecen un método de detección altamente sensible y rápido del virus responsable de la pandemia mundial de COVID-19. Las propiedades únicas del silicio poroso, caracterizado por su elevada área superficial y tamaño de poro modificable, lo convierten en una plataforma ideal para el desarrollo de biosensores. La integración de bioreceptores o anticuerpos específicos en la

superficie de silicio poroso permite la unión selectiva con biomoléculas afines, facilitando la detección del SARS-CoV-2 con notable precisión. Estos biosensores aprovechan la interacción entre el virus y los elementos de reconocimiento biológico inmovilizados, dando lugar a señales medibles que pueden traducirse en diagnósticos rápidos. La morfología y propiedades modificables del silicio poroso aumentan la capacidad de respuesta del sensor, lo que permite detectar concentraciones bajas del virus en muestras clínicas. En la tabla 1.4 se evidencia la plasticidad en usos y mecanismo de traducción para detección de SARS-CoV-2 usando silicio poroso como plataforma.

**Tabla 1.4** Biosensores de SARS-CoV-2 basados en silicio poroso.

<b>Plataforma</b>	<b>Transducción</b>	<b>Interacción biológica</b>	<b>Portabilidad de la prueba</b>	<b>Aplicabilidad a más enfermedades</b>	<b>Referencia</b>
<i>Micro cavidad de SP con capa nanoporosa de Au SP reflector de Bragg Distribuido con nano capa Ti-Au</i>	Resonancia de plasmón superficial localizada (Óptica)	Anticuerpo -Proteína S	x	✓	(Zheng, et al., 2022)
	Polarización plasmónica de Tamm (Óptica)	Anticuerpo -Proteína N	x	✓	(Rong & Sawan, 2023)
<i>Silica mesoporo sa con azul de metileno encapsulado</i>	Electroquímica	Azul de metileno-Dominio de unión al receptor (RBD) SARS-CoV-2	✓	x	(Amouza deh Tabrizi M, 2022)

<i>Microcavidad de SP con película delgada de Au</i>	Resonancia de plasmón superficial localizada (Óptica)	Anticuerpo -Virus SARS-CoV-2	x	✓	(Rong G, 2023)
<i>Nanopartículas de Ag/Nanocables de Si</i>	Espectroscopia Raman de superficie mejorada	Proteína spike-Matriz porosa	x	x	(Daoudi, 2021)
<i>Monocapa de silicio poroso/Au</i>	Espectroscopia de impedancia electroquímica	Hibridación ADN-ARN	x	x	(Huang, 2023)
<i>Monocapa de silicio poroso/Au</i>	Fotoluminiscencia	(3-Glicicloxipil) trimetoxisilano-Genoma SARS-CoV-2	x	x	(Leonardi A. A., 2022)

## 1.7 Hipótesis

El desarrollo de un nuevo inmunosensor basado en silicio poroso (SP) puede proporcionar una solución diagnóstica rápida y fiable para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2. Las propiedades únicas del SP junto con una ruta distintiva de funcionalización de la superficie por quelación NTA/Ni para la inmovilización del antígeno, permitirán la detección sensible y en tiempo real de anticuerpos específicos de la enfermedad. Postulamos que la simplicidad y versatilidad de esta plataforma ampliará su aplicabilidad a diversos escenarios

clínicos, posicionándola como una herramienta adaptable para el diagnóstico y seguimiento de diferentes enfermedades más allá de la COVID-19.

## **1.8 Objetivos**

### **1.8.1 Objetivo general**

Desarrollar y evaluar un inmunosensor de silicio poroso (SP) como herramienta de diagnóstico en el punto de atención versátil y eficaz para la detección rápida y fiable de anticuerpos contra COVID-19.

### **1.8.2 Objetivos Específicos**

- Desarrollar una metodología robusta para fabricar y funcionalizar una matriz porosa de silicio con características morfológicas a nanoescala, optimizando sus propiedades estructurales para mejorar la detección de anticuerpos.
- Emplear una ruta de funcionalización superficial por quelación NTA/Ni para inmovilizar covalentemente el antígeno SARS-CoV-2 (proteína RBD Spike 1) en la superficie interna de la matriz porosa.
- Evaluar el rendimiento analítico del inmunosensor realizando experimentos de detección en tiempo real sin etiqueta en muestras de laboratorio con proteínas provenientes de diferentes variantes del virus SARS-Cov-2, determinando la sensibilidad y especificidad dentro de un rango de concentración clínicamente relevante.

## 1.9 Justificación

La reciente pandemia mundial de COVID-19, causada por el virus SARS-CoV-2, ha planteado retos sin precedentes a la salud pública en todo el mundo. Con 6.8 millones de muertes y más de 650 millones de infecciones, la pandemia no sólo ha desbordado los sistemas sanitarios, sino que también ha subrayado la importancia crítica de contar con herramientas de diagnóstico rápidas y fiables para gestionar y mitigar eficazmente el impacto de las enfermedades infecciosas. En respuesta a esta necesidad urgente, nuestra investigación se esfuerza por contribuir al desarrollo de dispositivos innovadores para el punto de atención capaces de proporcionar un diagnóstico rápido y preciso, evitando así la escalada de futuras pandemias.

En este trabajo, se propone un inmunosensor que utiliza silicio poroso (SP) como plataforma para la detección de anticuerpos producidos durante la aparición de COVID-19. La matriz porosa, con características morfológicas a nanoescala, ofrece una gran área superficial adecuada para alojar algunas biomoléculas. Este inmunosensor incorpora una ruta única de funcionalización superficial por quelación NTA/Ni, facilitando la inmovilización covalente del antígeno SARS-CoV-2 (proteína RBD Spike 1) en la superficie interna de la matriz porosa.

El principio de funcionamiento se basa en el espectro de reflectancia intrínseco de los interferómetros SP. Tras la inmunocaptura de anticuerpos específicos de la enfermedad (es decir, inmunoglobulina G, IgG) por los bioreceptores de antígenos inmovilizados, el espectro de reflectancia experimenta un desplazamiento espectral hacia longitudes de onda más largas. Este desplazamiento se atribuye al llenado de una fracción del volumen interno de los poros, lo que induce un cambio en el espesor óptico efectivo (EOE) del

material transductor, que se interpreta como un cambio del índice de refracción. Por consiguiente, los cambios en el valor del EOE antes y después de un evento de detección pueden correlacionarse cualitativamente con la presencia del anticuerpo capturado.

Nuestro inmunosensor demuestra un rendimiento analítico que permite la detección sin etiqueta y en tiempo real de concentraciones de anticuerpos que oscilan entre 0.12 y 1.28 mg/mL usando muestras de laboratorio. La sencillez de la configuración lo hace especialmente adecuado para pruebas rápidas de diagnóstico masivo en escenarios clínicos. Más allá de su aplicación en el diagnóstico del SARS-CoV-2, la versatilidad del sistema destaca por su adaptabilidad para el diagnóstico de otras enfermedades. Seleccionando juiciosamente el par bioreceptor/biomarcador, nuestra plataforma puede adaptarse a diversas aplicaciones clínicas, ampliando así su impacto potencial en la atención sanitaria.

## Capítulo 2 Marco Teórico.

### 2.1 SARS-CoV-2

Los virus SARS-CoV y MERS-CoV tienen su origen en murciélagos, y parece que lo mismo ocurre en el caso del SARS-CoV-2. Ya se ha evidenciado que un hospedador intermediario puede facilitar la transmisión del virus a los humanos, como en el caso de las civetas, que actúan como intermediarios para el SARS-CoV, y los dromedarios, en el caso del MERS-CoV.

La transmisión entre humanos ocurre principalmente a través del contacto cercano con gotas respiratorias, el contacto directo con personas infectadas o mediante objetos y superficies contaminadas. El genoma del coronavirus consta de cuatro proteínas estructurales clave: espiga (S), membrana (M), envoltura (E) y proteína de la nucleocápside (N), todas codificadas en el extremo 3' del genoma. La proteína S facilita la adhesión del virus a los receptores en la superficie de la célula huésped, lo que lleva a la fusión y posterior entrada del virus. La proteína M, la más abundante, define la forma de la envoltura viral. La proteína E, la más pequeña de las estructurales principales, participa en el ensamblaje y la gemación viral. Por último, la proteína N se une al genoma ARN y también contribuye al ensamblaje y la gemación virales (Lamers, 2022).

El proceso de replicación de los coronavirus se inicia con la adhesión y la entrada del virus en la célula huésped. La adhesión del virus a la célula huésped comienza mediante interacciones entre la proteína S y su receptor específico. Después de la unión al receptor, el virus ingresa al citosol de la célula huésped mediante la escisión de la proteína S por una enzima proteasa,

seguida de la fusión de las membranas viral y celular. El siguiente paso implica la traducción del gen de la replicasa a partir del ARN genómico del virión, seguido por la traducción y el ensamblaje de los complejos de la replicasa viral.

Tras la replicación y la síntesis del ARN subgenómico, se lleva a cabo la encapsidación, dando lugar a la formación del virus maduro. Después del ensamblaje, los viriones son transportados a la superficie celular en vesículas y liberados mediante exocitosis (Jones, 2021). El virus SARS-CoV-2 causa una infección respiratoria aguda que presenta una amplia gama de síntomas como fiebre, escalofríos, mialgia, dificultad respiratoria, tos, taquipnea o pleuresía, y en algunos casos, varios síntomas neurológicos (Larsen, 2021), (Harapan, 2021). Por lo tanto, el diagnóstico ágil de la enfermedad atribuible al virus del SRAS-CoV-2 resulta crítico para preservar el bienestar de las personas y evitar la propagación del virus (Marco Ciotti, 2021).

## **2.2 Silicio poroso**

El silicio poroso, un material formado por el grabado electroquímico de obleas de silicio, que ha llamado la atención en los últimos años debido a sus propiedades únicas y aplicaciones potenciales en diversos campos. La fabricación controlada de poros a nanoescala en el silicio da lugar a una elevada área superficial, lo que convierte al silicio poroso en un material atractivo para una amplia gama de aplicaciones, como la liberación controlada de fármacos, sensado óptico entre otras (Canham L. , 2018), (Cullis, 1997), (Sailor M. J., 2012).

El silicio poroso tiene propiedades físicas y químicas únicas que pueden ajustarse controlando el tamaño, la forma y la distribución de los poros. La gran área superficial y la naturaleza porosa de este material proporcionan una plataforma ideal para la funcionalización, lo que permite la introducción de funcionalidades específicas adaptadas para satisfacer los requisitos de diferentes aplicaciones (Li, 2019). La funcionalización del silicio poroso puede implicar pasivación superficial, injerto de moléculas orgánicas, deposición de materiales inorgánicos e inmovilización de biomoléculas, entre otros (Canham L. T., 1990) (Pavesi.L., 2000).

### **2.2.1 Fabricación de silicio poroso por anodización**

El proceso de porosificación de una oblea de silicio, comúnmente conocido como "anodización", tiene lugar cuando la oblea se somete a una polarización anódica en una solución electrolítica a base de fluoruro. El ácido fluorhídrico (HF) es el principal componente del electrolito y determina el grado de anodización a través de factores como la velocidad de formación de capas, la porosidad y la morfología de los poros. En el resultado influyen diversos parámetros, como el tipo de oblea, la resistividad, la densidad de corriente y el tiempo aplicados, y la composición del electrolito (concentración de HF, con o sin aditivos). También hay que tener en cuenta la temperatura del electrolito, el pH y la limpieza inherente de la superficie de la oblea.

Una vez recibida del fabricante, la oblea de silicio está recubierta de una película de óxido nativo, que se elimina por inmersión en HF antes de la anodización. La limpieza de la superficie subyacente puede influir en el proceso de anodización, por lo que es necesaria una limpieza previa para determinadas aplicaciones. Las propiedades físicas de las muestras de silicio

poroso pueden variar debido a factores como la variación lateral del grosor de la capa, la porosidad, la rugosidad de la interfaz y la gradación vertical de la porosidad. El diseño cuidadoso del equipo de anodización es crucial para minimizar las fuentes de falta de homogeneidad.

Garantizar una corriente uniforme en toda la superficie expuesta de la oblea es vital, lo que requiere la incorporación de un contraelectrodo de tamaño y forma similares a los de la oblea. El contacto eléctrico uniforme con la oblea, especialmente en el caso de obleas de baja conductividad, es crucial. La adición de un tensioactivo (agente humectante) al electrolito es beneficiosa para evitar que las burbujas de hidrógeno se adhieran a la superficie porosa de silicio. Comúnmente, se utiliza alcohol (por ejemplo, metanol, etanol) como tensioactivo, aunque también pueden emplearse ácido fórmico y otros. Es importante señalar que el uso de tensioactivos a base de alcohol puede dar lugar a la lixiviación química de la capa de silicio poroso durante la anodización, especialmente con tiempos de anodización prolongados y alto contenido de alcohol, lo que resulta en un gradiente de porosidad dentro de la capa. Por el contrario, sin tensioactivos, una capa anodizada puede presentar un grosor no uniforme y una rugosidad significativa de la interfaz. (Canham L. , 2018)

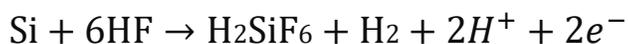
### **2.2.2 Mecanismo de formación del silicio poroso**

En una reacción electroquímica, un par de electrodos es esencial. Un electrodo, llamado cátodo, suministra electrones a la solución, mientras que el otro, llamado ánodo, extrae electrones de la solución. La presencia de ambos electrodos es crucial para mantener la neutralidad de la carga y completar el circuito eléctrico. Es imprescindible comprender que la electroquímica se basa en completar el circuito, lo que requiere dos reacciones simultáneas dentro de

la celda electroquímica: **la reacción anódica (oxidación)** y la **reacción catódica (reducción)**. Los electroquímicos suelen referirse a estas reacciones como "medias reacciones". Independientemente de si las reacciones de oxidación o reducción tienen lugar en los electrodos, los procesos electroquímicos no pueden producirse sin que se complete el circuito. La figura 2.1 muestra un esquema de una celda de dos electrodos utilizada para grabar silicio, que a su vez ilustra las medias reacciones (Sailor M. J., 2012).

Para formar silicio poroso, la corriente en el lado del silicio de la interfaz silicio/electrolito debe ser transportada por agujeros, inyectados desde la masa hacia la interfaz. La corriente debe mantenerse entre cero y en el umbral de electro pulido. Para generar una corriente de agujeros significativa en el silicio de *tipo-n*, es esencial la iluminación externa de la muestra, que depende del nivel de dopaje. Si la corriente supera el umbral de electro pulido, el proceso de anodización provoca la eliminación gradual y completa del silicio, confiriendo a la oblea un aspecto de espejo.

Se han propuesto varios mecanismos para la química de disolución del silicio, pero el consenso es que los agujeros desempeñan un papel crucial tanto en el electro pulido como en la formación de poros. La semirreacción anódica global durante la formación de poros se expresa como:



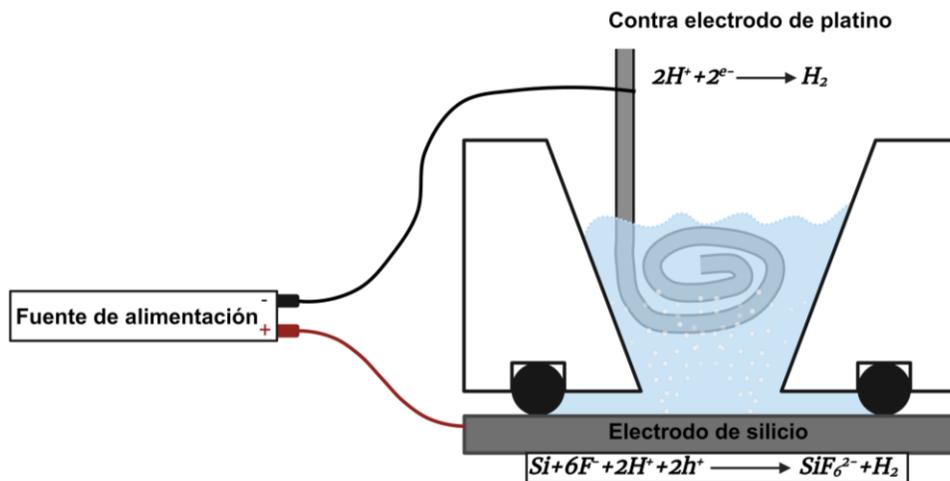
El producto estable para el silicio en HF es  $\text{H}_2\text{SiF}_6$ , lo que indica que sólo dos de los cuatro electrones de silicio disponibles participan en una transferencia de carga de interfase durante la formación de poros, mientras que los dos restantes sufren una formación corrosiva de hidrógeno. El mecanismo presentado por (Lehmann & Gösele, 1991) es ampliamente aceptado en la comunidad del silicio poroso entre los diversos modelos propuestos para la reacción de disolución del silicio (Canham L. , 2018).

Al igual que ocurre en la mayoría de las uniones semiconductoras, se forma una zona de agotamiento en la interfaz silicio/electrolito. La anchura de esta zona de agotamiento depende del dopaje y puede dilucidar los diferentes tamaños de poro en el silicio dopado de tipo p<sup>-</sup> y p<sup>+</sup>. Además, la curvatura de la superficie influye en la anchura de la capa de agotamiento, y la anodización se produce preferentemente en las puntas de los poros, donde la curvatura es más prominente. Cuando las zonas de agotamiento de los poros adyacentes se encuentran, el flujo de corriente se interrumpe bruscamente, impidiendo que el silicio se siga grabando y que los poros se colapsen. En consecuencia, la reacción se autolimita en los regímenes de anodización coloreada, dando lugar a una estructura porosa en lugar de silicio electro pulido.

En condiciones estacionarias, la porosidad permanece relativamente constante, mientras que el espesor total de la capa porosa de silicio crece linealmente con el tiempo. La disolución posterior se produce únicamente en las puntas de los poros, donde existe un número suficiente de agujeros. Este grabado direccional del silicio poroso sigue las trayectorias de la corriente anódica en el interior del silicio. Una vez que se forma una capa de silicio poroso, cesa el grabado electroquímico y comienza el grabado químico lento debido a la permanencia en HF (Xifré Pérez, 2007).

- **Reacción de oxidación inicial:** En el ánodo (superficie del silicio), el silicio sufre una reacción de oxidación, que conduce a la formación de dióxido de silicio (SiO<sub>2</sub>):  $Si + O_2 \rightarrow SiO_2 + 4e^-$ . Esta reacción da lugar a la creación de una fina capa de dióxido de silicio sobre la superficie del silicio.

- **Disolución del dióxido de silicio:** La capa de dióxido de silicio formada en la superficie del silicio es porosa y puede disolverse fácilmente en el electrolito. El electrolito suele contener una solución ácida, y el proceso de disolución puede representarse como:  $SiO_2 + 2H_2O \rightarrow Si(OH)_4$ .
- **Eliminación del ácido silícico:** El ácido silícico formado es soluble en el electrolito y se elimina de la superficie, dejando poros en la estructura de silicio. El dióxido de silicio se disuelve en ácido silícico en presencia de agua. El proceso global puede resumirse como la disolución electroquímica del silicio, que conduce a la formación de una estructura porosa de silicio.



**Figura 2.1:** Esquema de una celda electroquímica de dos electrodos con silicio como electrodo de trabajo (ánodo) y platino como contraelectrodo (cátodo). Se ilustran también las reacciones que ocurren en ambos electrodos durante la formación de silicio poroso.

### 2.3 Propiedades del silicio poroso

La bibliografía y los datos recopilados evidencian la notable ductilidad de las propiedades del silicio poroso, destacando la versatilidad alcanzable mediante la manipulación de los parámetros estructurales, la química interna de la superficie y la modificación con otros materiales. El silicio poroso posee propiedades únicas comparado con las del silicio no poroso. Esto revela una amplia gama de sintonizabilidad en características clave como la absorción de luz visible, la fotoluminiscencia, la rigidez mecánica, la conductividad térmica, el índice de refracción óptica, la resistividad eléctrica, la cinética de biodegradabilidad, la reflectividad óptica, la velocidad de propagación de la combustión y la humectabilidad de la superficie. (Sailor M. J., 2012).

La porosidad, aunque es un factor importante, no es el único determinante, ya que las propiedades varían en función de la superficie interna, la distribución del tamaño del esqueleto y la distribución del diámetro de los poros. En particular, la difusión de gases y líquidos, así como la fotoluminiscencia, dependen de características morfológicas específicas. (Canham L. , 2018)

Los efectos cuánticos del tamaño de poro destacan en el silicio micro poroso y mesoporoso, mientras que el silicio macro poroso se comporta como el silicio a granel con huecos. Ciertas propiedades pueden ajustarse con precisión sólo mediante parámetros estructurales y que, en el caso de materiales con un área de superficie elevada, la manipulación de la química superficial dentro de una morfología fija produce efectos espectaculares. La interacción entre los parámetros estructurales y los químicos superficiales se ejemplifica en el logro de la "super hidrofobicidad" en el silicio mesoporoso y macro poroso mediante la optimización de ambos factores. La importancia de la química superficial se acentúa con el aumento de la porosidad, la densidad de poros y la disminución del tamaño medio de los poros. Entre los ejemplos de propiedades que se modifican significativamente mediante la manipulación química de la superficie

se incluyen aspectos fisicoquímicos como la potencial zeta y el punto isoeléctrico. (Canham L. , 2018)

A pesar de su prometedor potencial, la funcionalización del silicio poroso sigue siendo una tarea difícil debido a su superficie altamente reactiva y a la necesidad de un control preciso sobre el proceso de modificación sin comprometer las propiedades únicas del silicio poroso. Por lo tanto, el desarrollo de métodos fiables y eficaces para la funcionalización es crucial para explotar plenamente el potencial del silicio poroso en diversas aplicaciones (Liu, 2017) (Scarpa, 2015).

### **2.3.1 Propiedades ópticas del silicio poroso**

Los materiales de silicio poroso presentan una composición que comprende aire, silicio y, en algunos casos, dióxido de silicio. Las características ópticas de una capa de silicio poroso están íntimamente ligadas a parámetros como el grosor, la porosidad, el índice de refracción, así como la morfología y las dimensiones de sus poros. Estos atributos se deducen mediante una combinación de métodos experimentales y enfoques basados en modelos. La versatilidad del silicio poroso lo convierte en un material excepcionalmente atractivo para la manipulación del índice de refracción, debido a su fácil ajustabilidad (Sailor J. , 2011).

El índice de refracción depende de la interacción de la luz y abarca los aspectos de propagación, reflexión y transmisión de las ondas incidentes en las interfaces. Los coeficientes de Fresnel que rigen la reflexión y la transmisión dependen de los índices de refracción de los dos materiales

adyacentes. Comprender y manipular estas propiedades en el silicio poroso sienta las bases para avanzar en diversas aplicaciones, aprovechando sus características ópticas únicas para crear estructuras con índices de refracción a medida. (Canham L. , 2018)

### **2.3.2 Espectroscopia de reflectancia interferométrica**

Aprovechamos el hecho de que el espectro de reflectancia de tales de estas películas de silicio poroso (o  $\text{SiO}_2$  poroso) mostrarán un patrón de interferencia óptica (franja de Fabry-Pérot) derivado de la interferencia constructiva y destructiva provocadas por la luz procedente de la parte superior e inferior de la capa porosa. Esto ocurre cuando la capa es plana y lisa, sin poros u otras características mayores de  $\sim 500$  nm. Las dimensiones de los poros de la capa deben ser significativamente menores que la longitud de onda de la luz, o de lo contrario la dispersión de la luz dominará el espectro y las franjas Fabry-Pérot no serán discernibles. El grosor de la película puede oscilar entre unos cientos de nm y  $> 50 \mu\text{m}$  (Sailor M. J., 2012)

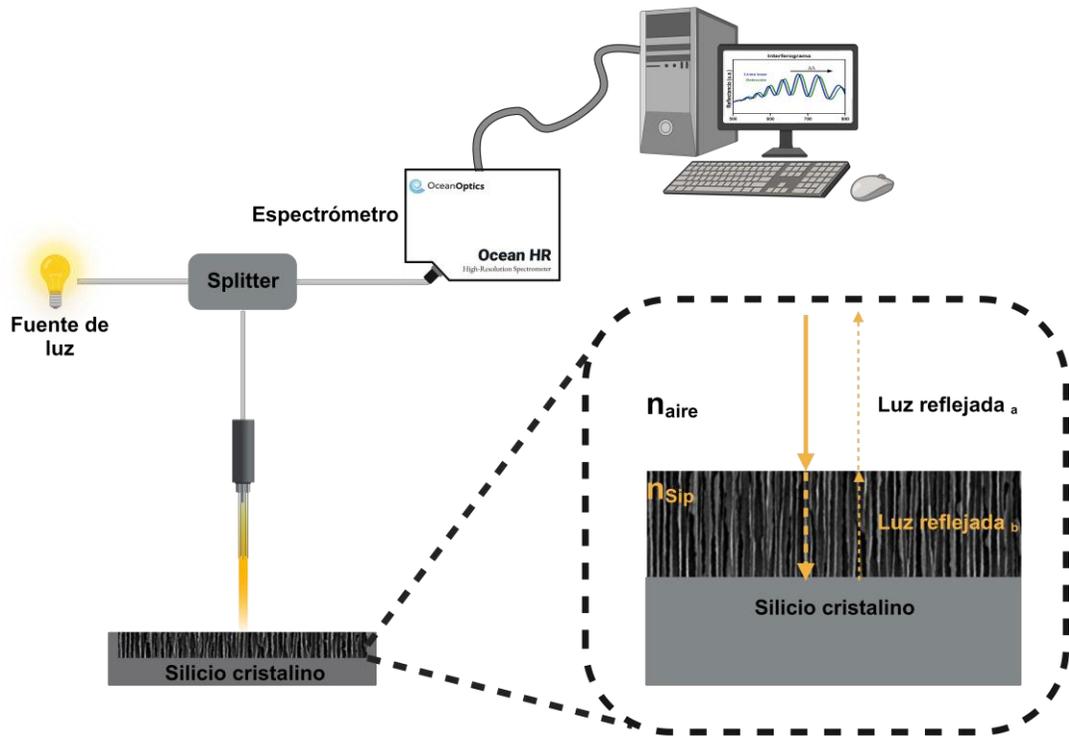


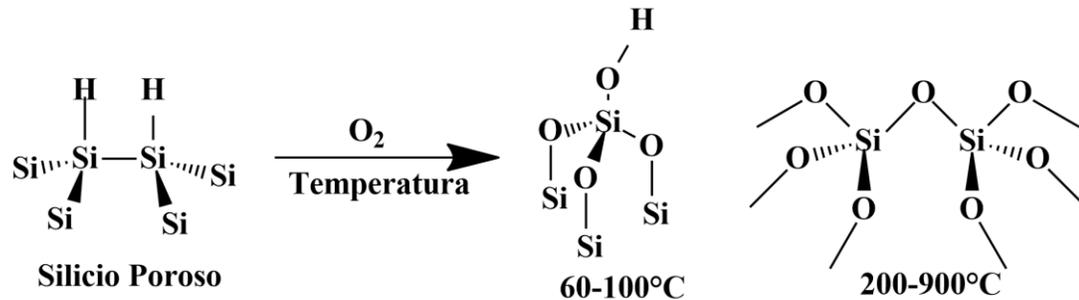
Figura 2.2: Arreglo de detección óptica y esquema de reflexión

## 2.4 Modificación superficial de Silicio poroso

### 2.4.1 Oxidación térmica del silicio poroso

La naturaleza frágil del silicio poroso está directamente relacionada con la presión que se ejerce sobre el material durante la preparación electroquímica. Derivado de la amplia área superficial y reactividad del Silicio poroso y de los enlaces Si-H y Si-Si, el silicio poroso es particularmente susceptible a oxidación por agua o por aire. Una vez oxidado, la fase  $\text{SiO}_2$  no se puede disolver en medios acuosos, y el proceso puede ser acelerado por surfactantes o nucleófilos. Existe una amplia gama de técnicas con las que se puede oxidar la superficie del silicio poroso. La más simple es la oxidación con aire, esta

técnica produce diferentes especies Si-O en la superficie porosa, dependiendo de la temperatura a la que se lleve a cabo la reacción (Sailor J. , 2011).



**Figura 2.3** Esquema del proceso de oxidación del silicio poroso

### Efectos de la oxidación térmica en el silicio poroso

La oxidación térmica del SP es una técnica frecuente para manipular la forma de los macroporos en la estructura porosa. Este proceso induce tensiones y deformaciones que afectan a la cinética y la anisotropía del crecimiento del óxido. Mediante la oxidación térmica se han conseguido matrices uniformes de microestructuras de silicio y sílice, como agujas y túbulos. Empleado con frecuencia como procedimiento de postratamiento, el silicio macro poroso se somete a oxidación térmica a altas temperaturas ( $T = 500-1,200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en oxígeno o vapor de agua, lo que se conoce como oxidación seca o húmeda, respectivamente. La formación de  $\text{SiO}_2$  resultante implica un aumento de volumen, lo que provoca tensiones de compresión en la película de dióxido de silicio y tensiones de tracción en el propio silicio. Estas tensiones se relajan por el flujo viscoso del óxido a temperaturas superiores a  $960\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las diferencias en los coeficientes de dilatación térmica entre el silicio y el  $\text{SiO}_2$  desempeñan un papel crucial en la aparición de tensiones en el silicio oxidado.

El proceso de oxidación térmica también impacta en las superficies planas y no planas del silicio, incluida la reducción de las tasas de oxidación en las superficies convexas y cóncavas. Se analiza la aplicación del SiO<sub>2</sub> como capa de sacrificio en macroporos o pilares de Si, en particular para ampliar el diámetro de los poros o suavizar las irregularidades de la superficie. Además, el apartado destaca el uso de la oxidación térmica para obtener capas gruesas de óxido con fines de aislamiento térmico y determinar la superficie interior de los macroporos mediante pesaje. La eficacia de la oxidación térmica para dar forma y modificar las estructuras de silicio macro poroso se demuestra mediante diversos ejemplos y aplicaciones (Canham L. , 2018).

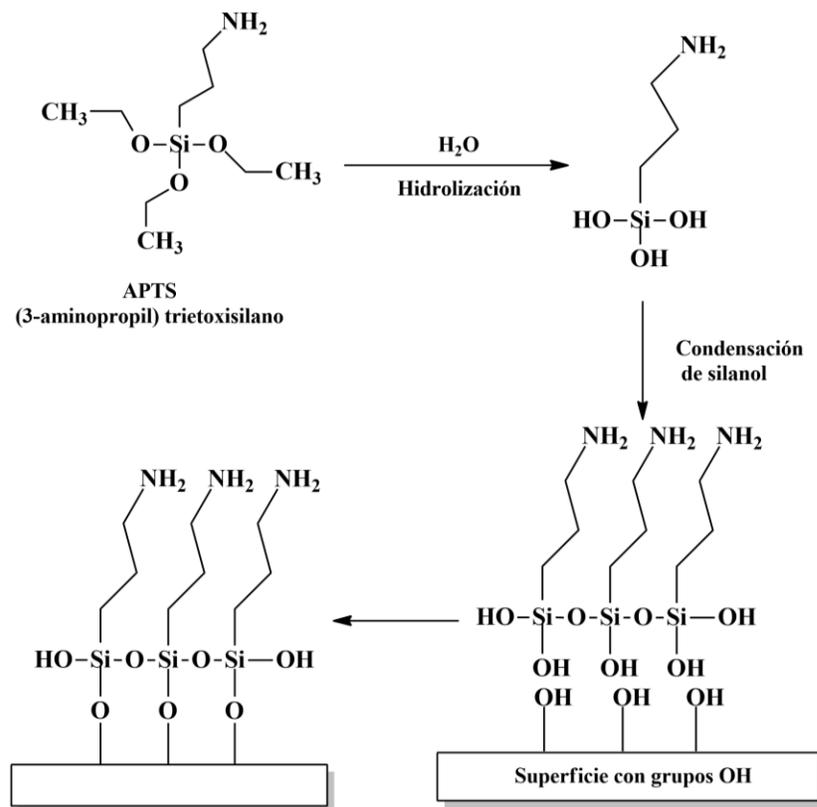
#### **2.4.2 Decoración de poros con TiO<sub>2</sub>**

Los sistemas de silicio poroso permiten control sobre la nanoestructura, incluyendo la construcción de cristales fotónicos complejos y tamaños de poro. Sin embargo, un desafío en el campo del silicio poroso es mejorar su estabilidad, en especial para trabajar con sistemas biológicos, el TiO<sub>2</sub> tiene la capacidad de otorgar esas propiedades estables en un amplio rango de pH, manteniendo su morfología y sus propiedades ópticas, lo que resulta útil para generación de biosensores y adsorción de proteínas (Jianlin, 2014).

#### **2.4.3 Silanización**

Un silano es un compuesto monomérico basado en silicio que contiene 4 constituyentes. Derivado de que el silicio y el carbono se encuentran en la misma familia de la tabla periódica el silicio también puede formar enlaces

covalentes con 4 átomos aledaños. Sin embargo, es menos electronegativo y esto lo vuelve un elemento que genera enlaces únicos. Los silanos que contienen al menos un enlace con un carbono son llamados organosilanos. Los organosilanos también contienen átomos de hidrogeno, oxigeno o halógenos directamente adheridos al átomo central de silicio. Algunos de estos derivados son altamente reactivos y pueden ser usados para formar enlaces covalentes con otras moléculas o con superficies. El proceso de añadir cubrir una superficie o una partícula con un silano se llama silanización.



**Figura 2.4** Proceso común de silanización adaptada de: (Hermanson, 2013).

Las técnicas de reacción que pueden ser usadas con silanos son variadas, pueden ser realizadas en solución acuosa, solventes orgánicos, soluciones

que contienen pequeñas cantidades de agua, incluso pueden llevarse a cabo en vapor. También se pueden llevar a cabo a temperatura ambiente o con temperatura elevada. La elección de la estrategia depende del tipo de acoplamiento molecular que se desea llevar a cabo (Hermanson, 2013).

#### **2.4.4 Biofuncionalizacion**

La bioconjugación o biofuncionalizacion es una herramienta versátil y poderosa en el campo de la bioquímica y la biotecnología, que implica la unión covalente de dos o más biomoléculas para crear una nueva entidad híbrida con propiedades y funcionalidades mejoradas. Este proceso ha revolucionado el campo de la biotecnología al permitir la conjugación de biomoléculas como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos, con una amplia gama de moléculas sintéticas o naturales, incluidas moléculas pequeñas, nanopartículas, polímeros y otras biomoléculas. Estos bioconjugados han encontrado numerosas aplicaciones en el descubrimiento de fármacos, el diagnóstico, la terapéutica, la obtención de imágenes y otras áreas de investigación biomédica. (Reyna K. V. Lim, 2016)

La bioconjugación ha revolucionado muchas áreas de la investigación biomédica y se ha utilizado ampliamente en el descubrimiento y desarrollo de fármacos. Por ejemplo, la bioconjugación ha permitido conjugar fármacos o moléculas similares a fármacos con ligandos diana, lo que puede mejorar la especificidad, estabilidad y farmacocinética del fármaco, con la consiguiente mejora de los resultados terapéuticos. Los bioconjugados también se han utilizado ampliamente en diagnósticos, como el desarrollo de ensayos de

diagnóstico y agentes de imagen para la detección y el seguimiento de enfermedades. Además, la bioconjugación ha facilitado la creación de nanopartículas multifuncionales y otros sistemas avanzados de administración de fármacos, lo que permite la administración dirigida y controlada de fármacos a células o tejidos específicos. (Agarwal P, 2015)

### **Quelado con NTA-Ni**

La cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) se ha convertido en una técnica fundamental y ampliamente adoptada para la purificación de proteínas en un solo paso desde su creación en 1975. La versatilidad y eficacia de la IMAC, junto con sus diversas adaptaciones y mejoras, la han convertido en un método dominante en este campo.

En su aplicación más frecuente, el IMAC implica la interacción entre un ion de metal de transición fijado a una matriz mediante un ligando y los anillos de imidazol de una etiqueta de polihistidina. Esta etiqueta, que suele constar de una cadena de 3 a 10 histidinas, se fusiona con el extremo C o N de un péptido. La interacción "adhiera" la proteína de la solución. A continuación, la proteína unida puede disociarse del ion metálico mediante métodos de elución como un gradiente de imidazol, cambios en el pH o quelación de metales (Porath, 1975).

La amplia utilidad del IMAC va más allá de la purificación tradicional de proteínas. Por ejemplo, en las herramientas de diagnóstico basadas en ELISA, la inmovilización de antígenos marcados con His en superficies aumenta la sensibilidad. Además, el IMAC facilita los estudios de interacción proteína-proteína en superficies funcionalizadas. En los estudios proteómicos, el IMAC desempeña un papel crucial en los pasos previos a la separación, reduciendo la complejidad de las muestras de estudio.

Una aplicación notable del IMAC se encuentra en el método Chelex, en el que las muestras se incuban con una matriz acoplada a un ligando quelante sin carga. Este ligando elimina eficazmente los inhibidores de iones metálicos de la PCR, generando así rápidamente una muestra lista para la amplificación.

En resumen, la importancia perdurable del IMAC en la purificación de proteínas y sus diversas aplicaciones, que van desde la mejora de las herramientas de diagnóstico hasta la agilización de los estudios proteómicos, subrayan su condición de tecnología versátil e indispensable en la comunidad científica y de investigación (Block, 2009).

El proceso de quelado se produce en dos pasos principales:

- I. **Formación de un complejo de níquel-BCM:** En este paso, el níquel se une a las dos moléculas de BCM a través de enlaces covalentes coordinados. Las moléculas de BCM tienen dos anillos de ciclopentadienilo que tienen una carga negativa parcial. Esta carga negativa atrae al níquel, que tiene una carga positiva. El níquel también puede formar un enlace covalente coordinado con el grupo amino (-NH<sub>2</sub>) del grupo carboximetil (-COOH) de una de las moléculas de BCM.
- II. **Formación de un complejo de níquel-BCM-Lys:** En este paso, la BCM-Lys se une al complejo de níquel-BCM. La BCM-Lys tiene un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) y un grupo carboxílico (-COOH) que pueden interactuar con el níquel a través de enlaces covalentes coordinados y enlaces de hidrógeno. El grupo amino de la BCM-Lys también puede formar un enlace covalente coordinado con el níquel.

El resultado de este proceso es un complejo estable de níquel-BCM-Lys. Este complejo es estable porque los enlaces covalentes coordinados son fuertes y porque los enlaces de hidrógeno también contribuyen a la estabilidad del



sustancias químicas, biomoléculas, microorganismos e incluso células enteras, lo que ofrece una gran variedad de aplicaciones. Han demostrado un inmenso potencial en áreas como el diagnóstico en el punto de atención, la medicina personalizada y la monitorización en tiempo real de parámetros fisiológicos. (J., 2006)

La clave del éxito de los biosensores reside en la integración de elementos de reconocimiento biológico con transductores, que convierten la señal biológica en una salida medible. Los transductores pueden ser ópticos, electroquímicos, piezoeléctricos, térmicos o magnéticos, entre otros, y desempeñan un papel crucial en la sensibilidad, selectividad y fiabilidad del biosensor. La elección del elemento de reconocimiento y del transductor depende del analito objetivo, de la sensibilidad deseada y de la aplicación prevista. (Fracchiolla NS, 2013)

Los biosensores ofrecen varias ventajas, como la detección en tiempo real y sin etiquetas, la alta especificidad y el potencial de miniaturización e integración en dispositivos portátiles. También pueden diseñarse para mejorar su estabilidad, reproducibilidad y rendimiento a largo plazo. Los biosensores han encontrado aplicaciones en diversos campos, como el diagnóstico clínico, la vigilancia medioambiental, la seguridad alimentaria, la agricultura y el bio procesamiento, entre otros (Wang j., 2006).

Debido a la investigación y el desarrollo continuos, los biosensores siguen evolucionando y son muy prometedores para futuras aplicaciones. Se espera que los nuevos avances en nanotecnología, ciencia de los materiales y biotecnología conduzcan al desarrollo de biosensores más sensibles, selectivos y fiables. Estos avances pueden brindar nuevas oportunidades a los biosensores en ámbitos como la medicina de precisión, la vigilancia medioambiental y los dispositivos portátiles, entre otros (Xin Wang, 2022).

## 2.6 Silicio poroso como biosensor

El silicio poroso (SP) es un material único y versátil que en los últimos años ha recibido una gran atención como sensor óptico debido a sus notables propiedades ópticas y su facilidad de funcionalización. El SP es una forma de silicio que se ha grabado electroquímicamente para crear una estructura muy porosa con poros a escala nanométrica, lo que da como resultado una gran superficie y una alta sensibilidad óptica. Esto hace del SP un material ideal para aplicaciones de detección óptica, ya que permite la detección selectiva y la cuantificación de una amplia gama de analitos, incluidos gases, líquidos, iones, biomoléculas y nanopartículas. (Santos HA, 2018).

Las propiedades ópticas del SP son altamente modificables y pueden modificarse fácilmente controlando la porosidad, el tamaño de los poros y la química superficial del material. El SP presenta fuertes interacciones luz-materia, como fotoluminiscencia, reflectancia e interferencia, que pueden aprovecharse con fines de detección. Las señales ópticas del SP pueden modularse mediante cambios en el índice de refracción o en la química de la superficie del entorno, lo que permite la detección sensible y selectiva de analitos. (Pacholski C, 2021).

Una de las principales ventajas del SP como sensor óptico es su capacidad para ser funcionalizado con una amplia variedad de elementos de reconocimiento, como anticuerpos, enzimas, aptámeros y otros ligandos, en su superficie porosa. Esto permite la captura específica y selectiva de analitos, dando lugar a plataformas de detección altamente sensibles y selectivas. Además, el SP puede integrarse fácilmente en distintas configuraciones de

dispositivos, como guías de ondas, micropartículas y nanoestructuras, lo que permite diseñar sensores versátiles y miniaturizados. (Riikonen J, 2021)

El uso del SP como sensor óptico ha encontrado aplicaciones en diversos campos, como la monitorización medioambiental, el diagnóstico biomédico, la seguridad alimentaria y el control de procesos industriales. Por ejemplo, se han desarrollado sensores ópticos basados en SP para la detección de gases como el hidrógeno, el amoníaco y el dióxido de carbono, así como para la monitorización del pH, la temperatura y la humedad. Los sensores basados en SP también se han utilizado para la detección sin etiquetas de biomoléculas, como proteínas, ADN y virus, lo que ofrece posibilidades de diagnóstico rápido y sensible (Rushikesh Fopase, 2020).

## **2.7 Silicio poroso como sensor óptico de SARS-CoV-2**

En respuesta a los retos que plantea el SARS-CoV-2, se han presentado varios biosensores basados en silicio poroso que utilizan diferentes mecanismos de transducción como espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS) que utiliza un sustrato de nano cables de silicio (SiNWs) adornado con nanopartículas de plata plasmónicas (AgNPs). Fabricado mediante un sencillo método de procesamiento químico húmedo, el sensor optimiza las condiciones para mejorar la detección de la proteína de la espiga, logrando la detección a concentraciones tan bajas como  $9.3 \times 10^{-12}$  M (Daoudi, 2021).

Simultáneamente, se ha trabajado con variantes específicas del virus como la variante ómicron. En este caso la plataforma, se basa en nano cables de silicio

(NW), y exhibe una alta sensibilidad, selectividad y respuesta rápida con un límite de detección de cuatro copias efectivas (cps) y resulta prometedora para un rastreo generalizado y eficiente. Las técnicas industrialmente compatibles de este sensor sugieren un potencial de industrialización fácil y rentable, ofreciendo una valiosa herramienta en la batalla contra la pandemia (Leonardi A. A., 2022).

## Capítulo 3 Desarrollo experimental

### 3.1 Materiales

Los siguientes reactivos y productos químicos fueron utilizados durante todo el proyecto, desde la síntesis del silicio poroso hasta la detección de anticuerpos de SARS-CoV-2.

**Tabla 3.1:** Materiales y reactivos utilizados durante el proyecto.

<b>Reactivo</b>	<b>Proveedor</b>
<i>(3-Aminopropil) trimetoxisilano (APTMS)</i>	Sigma-Aldrich
<i>glutaraldehído grado II 25% en H<sub>2</sub>O (GA)</i>	Sigma-Aldrich
<i>solución salina tamponada con fosfato (PBS buffer)</i>	Sigma-Aldrich
<i>HEPES Buffer &gt; 99. 5%</i>	Sigma-Aldrich
<i>Ciano borohidruro sódico grado reactivo 95%</i>	Sigma-Aldrich
<i>butoxido de titanio</i>	Sigma-Aldrich
<i>Ácido fluorhídrico (HF 48%)</i>	Fermont
<i>Trietanolamina (TEA)</i>	Fermont
<i>tolueno</i>	Fermont
<i>NCW-1001</i>	Wako Pure Chemical Industries
<i>Proteína RBD variantes Wuhan y Delta</i>	IBT-UNAM
<i>Anticuerpos SARS-CoV-2</i>	IBT-UNAM

### 3.2 Fabricación de Silicio Poroso (SP)

El proceso de fabricación de silicio poroso implicó el uso de obleas de silicio de tipo n dopado con arsénico con un rango de resistividad de 0.003 a 0.05  $\Omega\text{cm}$ . El proceso requirió el uso de una célula electroquímica de teflón, que tenía un diámetro de 1.12 cm en la zona de grabado electroquímico. Como ánodo se utilizó una placa de aluminio recubierta de cobre, mientras que como cátodo se empleó un electrodo de platino, que tenía forma de espiral. El electrolito utilizado en el proceso estaba compuesto por 12.5 ml de HF al 48%, 100 ml de agua desionizada y 0.5 ml de tensioactivo nw-1002.

El proceso de fabricación constó de dos pasos: En primer lugar, se creó una capa de sacrificio aplicando una alta densidad de corriente. El objetivo de este paso era eliminar la capa superficial de  $\text{SiO}_2$ , lo que garantizaba la obtención de una superficie estable y homogénea para la fabricación de la capa porosa. La capa de sacrificio se creó utilizando una densidad de corriente de 89  $\text{mA}/\text{cm}^2$  (100 mA) durante 100 segundos.

En segundo lugar, la capa porosa se creó sometiendo las obleas de silicio a una densidad de corriente de 58  $\text{mA}/\text{cm}^2$  (65 mA) durante 100 segundos. Este paso dio como resultado la creación de la capa porosa deseada. El proceso de creación de una capa porosa en obleas de silicio es un paso crítico en la fabricación de dispositivos basados en silicio, y es necesaria una ejecución cuidadosa y precisa del proceso para lograr el resultado deseado.

### 3.3 Pasivación superficial de silicio poroso

Para garantizar que las superficies porosas pudieran soportar los procesos químicos posteriores, se llevó a cabo meticulosamente un proceso de pasivación de la superficie en tres pasos. En primer lugar, se llevó a cabo una oxidación térmica a 500°C durante una hora, aumentando gradualmente la temperatura con una rampa de 10°C/min y enfriando a temperatura ambiente. Este paso formó especies químicas esenciales, aumentando la estabilidad de la capa porosa.

En segundo lugar, la superficie de los poros se recubrió con  $\text{TiO}_x$  utilizando un precursor a base de butóxido de titanio mediante recubrimiento por centrifugación. Las condiciones para este proceso se controlaron cuidadosamente y pueden consultarse en la tabla 3.1. El precursor de Ti se aplicó tres veces, colocando el SP en una parrilla a 100°C entre cada capa para evaporar el etanol. Esto garantizó una distribución uniforme del recubrimiento de  $\text{TiO}_x$ .

Por último, los interferómetros se sometieron a un segundo tratamiento térmico a 500°C durante una hora con una rampa de 10°C/min para formar la especie final de  $\text{TiO}_x$ , que confería estabilidad química a las superficies porosas. Una vez más, la fase de enfriamiento a temperatura ambiente garantizó la formación uniforme de las especies de  $\text{TiO}_x$  en toda la superficie de los poros.

**Tabla 3.2:** Parámetros de “spin coating” para depósito de TiO<sub>x</sub> sobre superficies de silicio poroso.

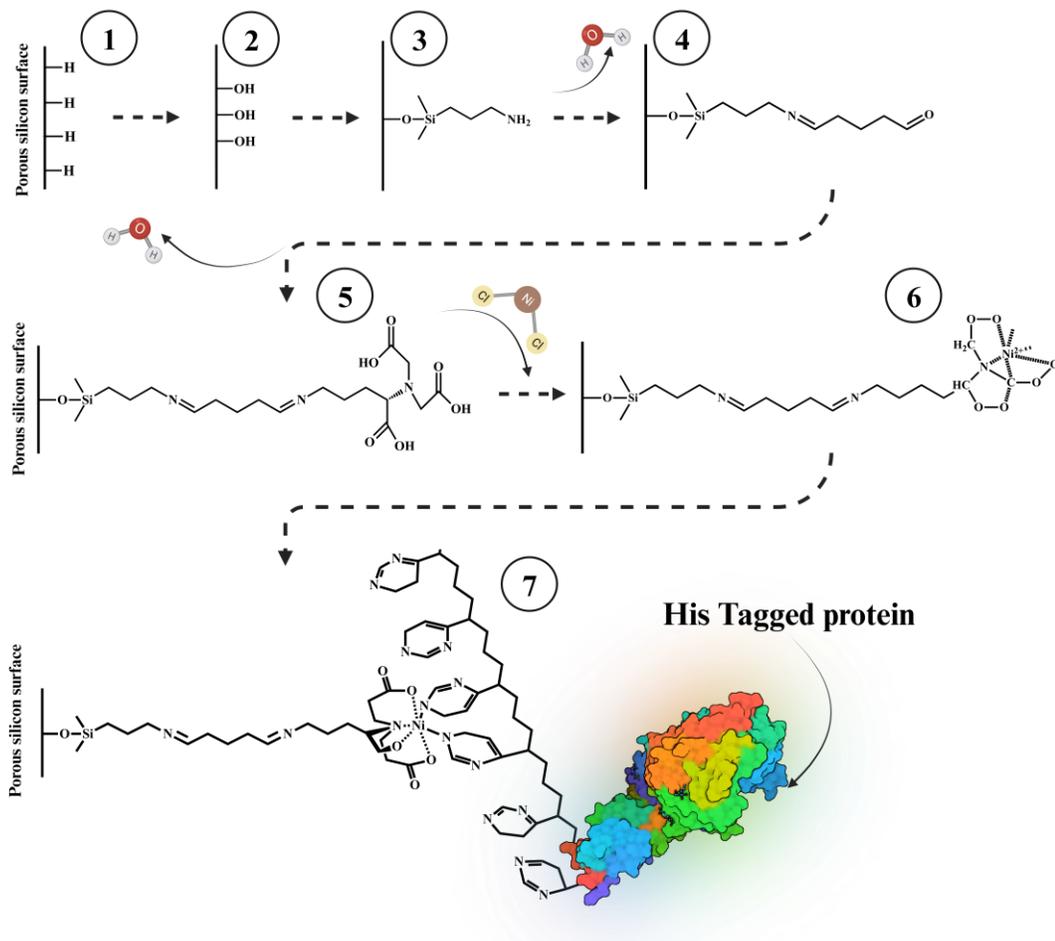
<b>Atmosfera</b>	N <sub>2</sub>
<b>RPM</b>	3000
<b>Tiempo</b>	20 s
<b>Volumen de precursor</b>	50µl/interferómetro x 3

### 3.4 Inmovilización de RBD en silicio poroso

- I. **Oxidación química:** Las superficies porosas fueron tratadas con una solución de piraña (mezcla de 3 partes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 1 parte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 12 horas con el objetivo de generar suficientes grupos OH en la superficie del SP que faciliten la adhesión de silanos.
- II. **Silanización:** Se aminosilanizó la superficie porosa con una solución al 5% v/v de APTMS (500 µL de APTMS en 9,500 µL de tolueno anhidro) durante 15 minutos con agitación suave. se realizaron tres lavados con tolueno, etanol y agua, seguidos de un secado con nitrógeno. Las muestras se colocaron en una placa caliente precalentada a 110°C para fijar la capa de silano. Obteniendo una terminación amina compatible con los grupos carboxilo del glutaraldehído.
- III. **“Cross linking” para unir el agente quelante BCM-Lys usando (glutaraldehído):** El silicio poroso se expuso a 100 µL de una solución acuosa al 2.5% de glutaraldehído durante 30 minutos para adherir el BCM-Lys (Agente quelante) al silano.
- IV. **Primera estabilización de enlace amida con Ciano borohidruro de sodio:** Las superficies se incubaron luego con una solución de Ciano borohidruro de sodio al 50 mM en buffer HEPES durante 30 minutos.

Para estabilizar el enlace amida entre el APTMS y el glutaraldehído. Finalmente se lavaron con buffer HEPES.

- V. **Incorporación de agente quelante:** La superficie porosa se hizo reaccionar con una solución de N-(5-amino-1-carboxipentil hidrato de ácido iminodiacético al 0.05 M (BCM-Lys, 26 mg/ mL) en una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> durante 1 hora. De esa forma se obtuvo en la superficie una terminación que permite un quelado con ion metálico, lo que permite inmovilizar proteínas con tag de histidina.
- VI. **Segunda estabilización de enlace amida entre glutaraldehído y BCM-Lys con Ciano borohidruro de sodio:** Después de una hora, la reacción se estabilizó con Ciano borohidruro sódico en HEPES durante 30 minutos. Para estabilizar el enlace amida entre el glutaraldehído y la BCM-Lys.
- VII. **Quelado de BCM-Lys con ion de Ni:** Al SP se les colocó una solución de NiCl<sub>2</sub> al 13 mg/mL durante 30 minutos para unir el ion Ni<sup>+2</sup> a través de la amina terciaria de BCM-Lys. Las superficies porosas se lavaron con agua y se secaron. El resultado de este proceso es un complejo estable de níquel-BCM-Lys. Este complejo es estable porque los enlaces covalentes coordinados son fuertes y porque los enlaces de hidrógeno también contribuyen a la estabilidad del complejo.
- VIII. **Incubación de silicio poroso con RBD de proteína spike SARS-CoV-2:** Las superficies porosas se incubaron con 50 µL de proteína spike de SARS-CoV-2 diluida en buffer PBS al 1.28 mg/ml en una cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron lavados con buffer PBS, seguidos de un secado con nitrógeno. La metodología aquí descrita se ilustra en la figura 3.1.



**Figura 3.1:** Inmovilización de RBD mediante salinización con APTMS, a partir del SP recién fabricado 1), tras oxidación térmica 2), incorporación de APTMS 3), adición de glutaraldehído 4), inclusión de BCM-Lys 5), quelación con agente complejante Ni<sup>2+</sup> 6), e inmovilización de proteína marcada con His 7) (el esquema no está dibujado a escala).

### 3.5 Metodología de adquisición de señales ópticas y procesamiento de datos

Para iniciar el proceso, una lámpara de tungsteno halógeno (Ocean Optics modelo LS-1) emitía luz blanca que se dirigía a través de una sonda de fibra óptica reflectante. A continuación, la luz se enfocó con precisión sobre la

superficie del interferómetro SP con una lente colimadora, asegurándose de que incidía perpendicularmente a la superficie e iluminaba una zona específica de la muestra.

Posteriormente, el área iluminada se enfocó sobre un punto específico de la superficie de la muestra, confinado dentro de uno de los canales de un chip microfluídico fijado firmemente a la superficie del SP. El chip microfluídico actuaba como una célula de flujo de bajo volumen, lo que permitía al SP funcionar como un biosensor interferométrico en tiempo real capaz de detectar cambios en la muestra en tiempo real.

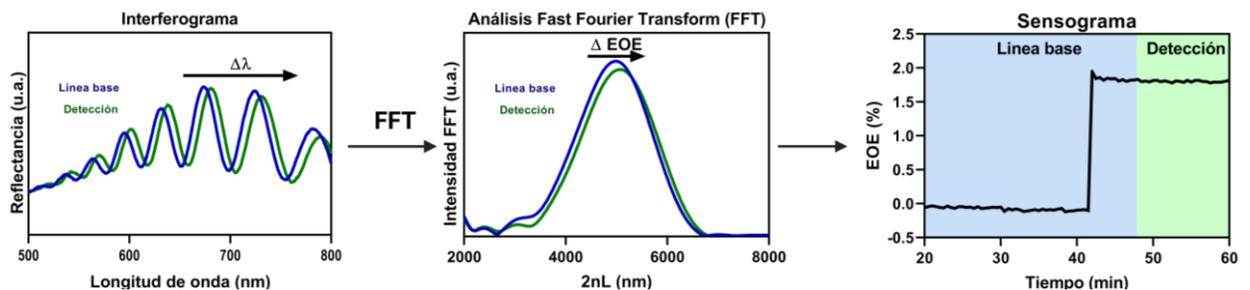
Para observar los cambios en el espectro de reflectividad, se recogió la luz reflejada por la superficie de la SP a través del mismo sistema óptico, y el extremo remoto de la sonda de reflexión óptica bifurcada se conectó a un espectrofotómetro (Ocean Optics modelo HR4000). Se observaron franjas de interferencia en el espectro de reflectividad, que eran el resultado de la interferencia Fabry-Pérot en los límites superior e inferior de la capa SP (véase la figura 3.2). La posición de los picos de las franjas se determinó mediante la siguiente ecuación, que ayudó a determinar las características de la muestra analizada.

$$m\lambda = 2nL,$$

donde " $\lambda$ " representa la longitud de onda de la luz incidente, " $n$ " es el índice de refracción medio de la película, " $L$ " es el espesor físico de la capa y " $m$ " es el orden espectral. El factor 2 se deriva de la configuración de retrodispersión a  $90^\circ$  de la fuente de iluminación y el detector. En este contexto, el término " $2nL$ " se denomina espesor óptico efectivo (EOE o EOT por sus siglas en inglés "*Effective Optical Thickness*"). Cualquier cambio en el índice de refracción o en el grosor físico de la película provoca un desplazamiento en el espectro de

reflectividad, lo que se traduce en un cambio correspondiente en la magnitud de la EOE. La magnitud de la EOE se obtiene a partir del espectro de reflectividad mediante el análisis de la transformada rápida de Fourier (FFT), que genera un único pico. La posición y la intensidad de este pico a lo largo del eje X están relacionadas con el índice de refracción y el espesor físico de la capa SP.

Los espectros de reflectividad se registraron dentro de una gama de longitudes de onda de 400 a 850 nm. El tiempo de adquisición de los espectros fue de 100 ms y se realizaron diez barridos espectrales, cada uno de ellos con un tiempo de integración de 5 segundos. Para mejorar la precisión de las mediciones, los diez barridos se combinaron utilizando el software SpectraView de Ocean Optics. A continuación, se procesaron los espectros de reflectividad registrados utilizando IGOR PRO de Wavemetrics Inc. para obtener los valores de EOE. Los valores EOE se obtuvieron en función del tiempo a partir de los valores FFT de los espectros de reflectividad.



**Figura 3.2:** Esquema de pasos en el procesamiento de datos.

## Parámetros experimentales de recolección de datos de bioensayo

Durante los experimentos de biosensado, se registraron mediciones de referencia con una solución amortiguadora (PBS, pH 7.4) antes de introducir anticuerpos afines al RBD de la proteína spike de SARS-CoV-2. Los experimentos se realizaron utilizando una bomba de micro fluidos (MHS-6). Se mantuvo un flujo constante de  $1 \mu\text{L min}^{-1}$  durante 30 minutos, correspondientes a la medición de referencia o línea base. Posteriormente se colocaron los anticuerpos en el canal de micro fluidos y se realizó la adquisición de señal durante 60 minutos sin flujo. Los espectros de reflectividad se recogieron y analizaron utilizando FFT como se ha descrito previamente. Los datos se presentan como EOT (%) y se calculan mediante la fórmula:

$$EOE (\%) = \left( \frac{EOE - EOE_0}{EOE_0} \right) * 100,$$

donde "EOE" se refiere a su magnitud promediada obtenida de la lectura del biosensor durante la fase de detección, y "EOE<sub>0</sub>" es el valor EOE promediado obtenido durante el establecimiento de la línea de base inicial al comienzo del experimento, véase figura 3.2.

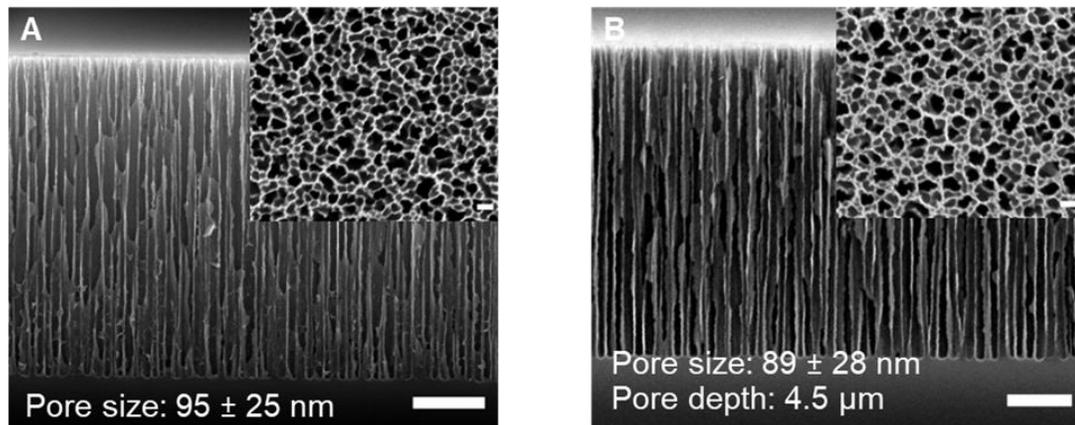
## Capítulo 4 Resultados y Discusión

### 4.1 Caracterización de Silicio Poroso

Las caracterizaciones de los interferómetros basados en SP se realizaron con el fin de conocer la morfología (SEM), información sobre las moléculas inmovilizadas en la superficie porosa (FTIR) y la razón de cambio en el espesor de los poros (Reflectancia y FFT). Inicialmente se caracterizó el SP recién fabricado y posteriormente se realizó una caracterización de las superficies pasivadas y finalmente después de realizar la inmovilización de la proteína spike del virus SARS-CoV-2.

#### 4.1.1 Caracterización morfológica de la superficie porosa

Las imágenes SEM (**Figura 4.1**) muestran la superficie del interferómetro de SP, ilustrando un tamaño medio de poro de  $89 \pm 28$  nm, como se observa en la Figura 4.1 A). Este poro posee las dimensiones adecuadas para alojar todas las moléculas necesarias para inmovilizar la RBD del virus SARS-CoV-2, junto con los anticuerpos correspondientes. El grosor del interferómetro de SP, se presenta en la sección B de la **Figura 4.1**, también es suficiente para generar una señal de reflectancia adecuada para la detección. La elección de las obleas de tipo-*n* se debió a su enfoque relativamente más sencillo para lograr el tamaño de poro deseado en comparación con la estructura alcanzable mediante grabado electroquímico con obleas de silicio tipo p.



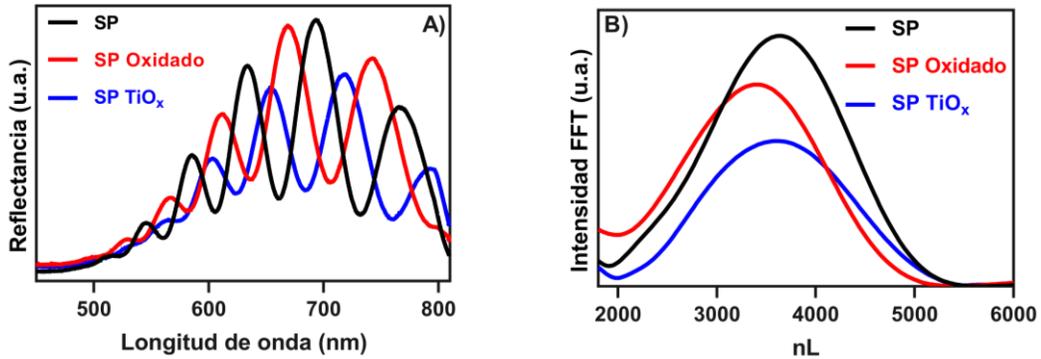
**Figura 4.1** Micrografía SEM correspondiente a la sección transversal del interferómetro SP (A) antes, y (B) después de la deposición de la capa de  $\text{TiO}_2$  sobre la superficie interna de la matriz porosa.

#### 4.1.2 Pruebas de estabilidad de silicio poroso modificado

##### Caracterización óptica de silicio poroso modificado

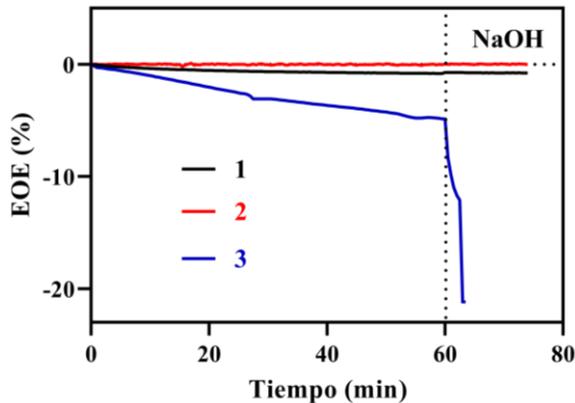
Para verificar la adecuada realización del proceso de pasivación superficial, se realizaron mediciones en el mismo punto en tres momentos clave: (a) durante la fabricación inicial del SP, (b) después de la primera oxidación térmica y (c) al finalizar el proceso completo de deposición de  $\text{TiO}_x$ . Los espectros ópticos presentados en la Figura 4.3 describen las variaciones tanto en el espectro óptico de reflectancia (Fig. 4.3 A) como en la señal procesada mediante el método FFT (Fig. 4.3 B). Las alteraciones en la señal óptica entre el SP recién fabricado y el SP oxidado se atribuyen a cambios en el índice de refracción. La diferencia entre el SP oxidado y el SP recubierto con  $\text{TiO}_x$  se debe parcialmente a una modificación en el índice de refracción de la superficie porosa y a un ensanchamiento de las paredes de los poros. Por lo tanto, se

produce un cambio en el espesor físico y, en consecuencia, el espesor óptico exhibe una variación.



**Figura 4.2** Espectro de reflectancia A) y análisis FFT B) ilustrando los cambios ópticos del proceso de pasivación superficial realizado a los interferómetros de SP.

Para comprobar la efectividad del proceso de pasivación superficial se realizó una prueba de estabilidad usando el mismo arreglo y métodos de cálculo de EOE (Espesor Óptico Específico) utilizados durante los ensayos del inmunosensor con proteína-anticuerpo agua durante 60 minutos seguido de Hidroxido de sodio durante 15 minutos (figura 4.2), observando la disminución en el porcentaje del espesor optico especifico.

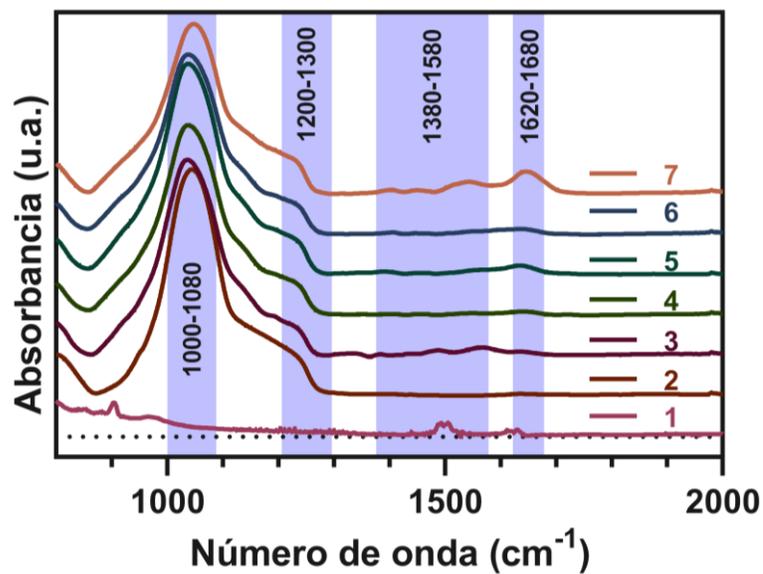


**Figura 4.3** Pruebas de estabilidad 1) SP Oxidado, 2) SP con recubrimiento de TiO<sub>2</sub>, 3) SP recién fabricado

Posterior a las pruebas de pasivación superficial, se observa que tanto el proceso de oxidación como la decoración con  $\text{TiO}_2$  reducen significativamente los decrementos en el espesor óptico, es decir, evitan la degradación de la capa porosa en presencia de agua y sales (Figura 4.2), por lo tanto, el proceso de pasivación superficial resulta adecuado para posteriores modificaciones superficiales.

## 4.2 Caracterización del silicio poroso bio-funcionalizado

### 4.2.1 FTIR

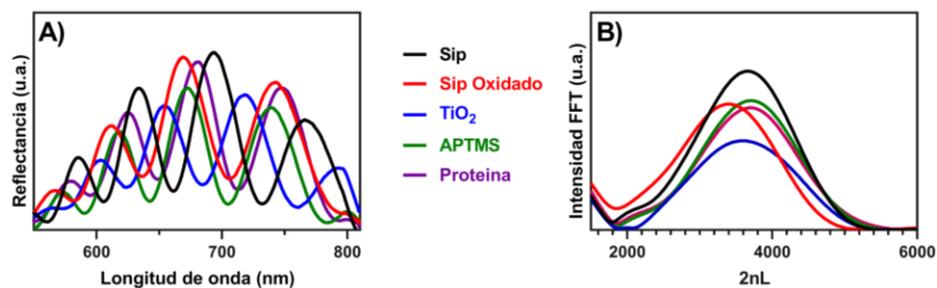


**Figura 4.4** Espectro de FTIR de una muestra de silicio poroso funcionalizado con APTMS, glutaraldehído,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -bis(carboximetil)-L-lisina hidrato,  $\text{NiCl}_2$  y RBD de SARS-CoV-2.

El espectro de FTIR (Figura 4.4) revela las características distintivas de los diversos componentes presentes en la muestra. La banda ubicada a  $1240\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento del Si-O en las trazas 2-7 (Douglas B. Mawhinney, 1997); en el silicio poroso oxidado, la banda a  $1120\text{ cm}^{-1}$  se asocia con la vibración de estiramiento del Si-O-Si en las trazas 2-7 (M.J. Palimi, 2014), específicamente en el APTMS.

La vibración de flexión N-H de las aminas primarias se evidencia en la región de  $1650\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$  (Smith, 2019), principalmente en las trazas 3 y 7, que corresponden al proceso con APTMS y la proteína RBD. Asimismo, la vibración de estiramiento C-N de las aminas alifáticas se manifiesta como bandas de intensidad media o baja en la región de  $1250\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ . La presencia de estas bandas confirma de manera concluyente que la muestra ha sido funcionalizada con éxito con los componentes deseados. Este detalle resulta crucial para el desarrollo de biosensores destinados a la detección del SARS-CoV-2, dado que la RBD constituye el objetivo primordial de los anticuerpos neutralizantes.

#### 4.2.2 Cambios en el espesor óptico en función de diferentes etapas de inmovilización

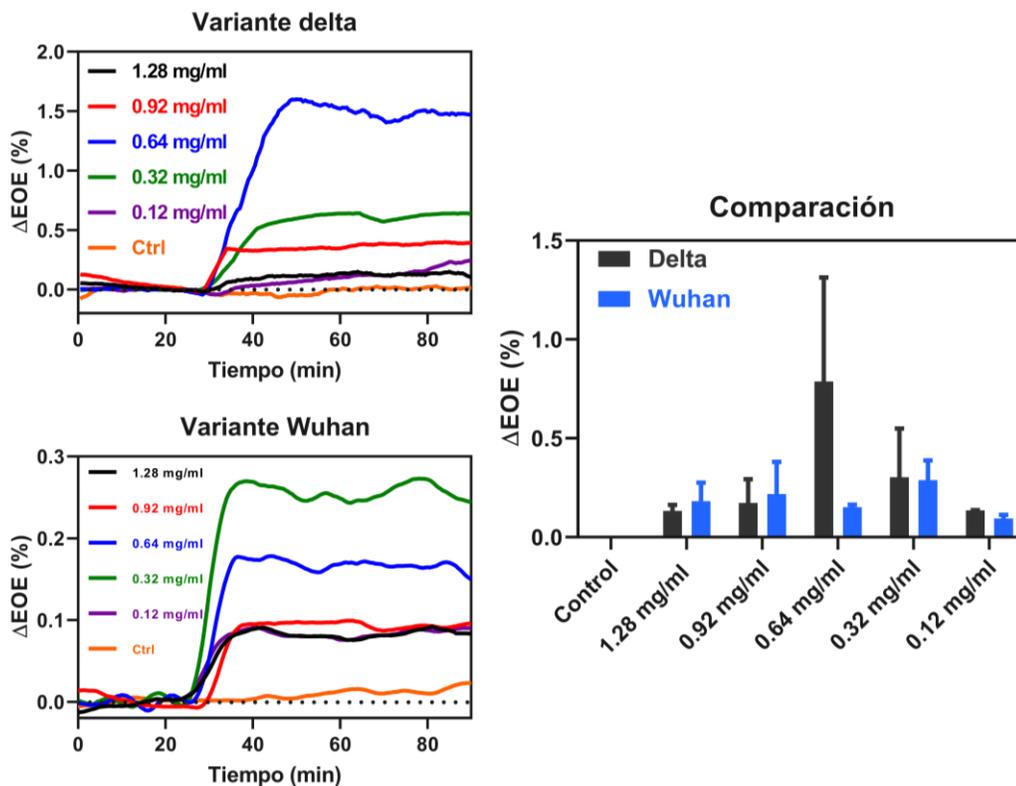


**Figura 4.5** Espectro de reflectancia A) y análisis FFT B) correspondientes a los pasos de funcionalización críticos para el proceso de inmovilización de proteína RBD.

La Figura 4.5 ilustra los espectros de reflectancia (4.5A) y sus correspondientes transformadas de Fourier de frecuencia rápida (FFT) (4.5B) para los pasos críticos del proceso de pasivación de la estructura porosa y la inmovilización de la proteína RBD respectivamente. Los espectros de reflectancia exhiben un incremento gradual en la reflectancia con cada paso, sugiriendo un aumento en la densidad del material dentro de los poros. El análisis FFT revela un corrimiento significativo del pico principal hacia frecuencias más bajas al pasar del paso inicial (APTMS) al paso final (inmovilización RBD). Este corrimiento se traduce en un cambio en el espesor físico de los poros, lo que respalda la hipótesis de la inmovilización exitosa de RBD en la superficie porosa.

El corrimiento observado en la señal FFT es indicativo de modificaciones en la estructura interna de los poros, probablemente atribuibles a la presencia de RBD en la superficie porosa. Aumenta la densidad del material y altera la respuesta óptica del sistema, provocando el corrimiento del pico. Este desplazamiento, junto con su correlación con el cambio de espesor, proporciona evidencia sólida de la inmovilización correcta de RBD.

### **4.3 Respuesta óptica del biosensor**



**Figura 4.6** Sensogramas típicos (promediados) de ambas variantes y su comparación en términos de EOE después de pruebas triplicadas.

El ensayo de detección de anticuerpos para el SARS-CoV-2 desarrollado en este estudio demostró una alta sensibilidad y especificidad para las variantes Delta y Wuhan del virus. La Figura 4.6 ilustra la capacidad del ensayo para detectar anticuerpos en un rango de concentraciones relevantes (1.28 a 0.12 mg/ml). La concentración detectable más baja (0.12 mg/ml) indica la sensibilidad del ensayo para identificar incluso niveles bajos de anticuerpos, lo que es crucial para el diagnóstico temprano de la COVID-19. La especificidad del ensayo se corroboró mediante la muestra de control con Zika, la cual no generó ninguna señal significativa. Esto confirma que el ensayo no reacciona con otros tipos de anticuerpos y es específico para el SARS-CoV-2.

En general, este método de detección de anticuerpos se presenta como una herramienta valiosa para la detección de anticuerpos contra el SARS-CoV-2, tanto para la variante Delta como para la Wuhan, en una variedad de concentraciones. Su potencial para el diagnóstico, la evaluación de la respuesta inmune a la vacunación y el seguimiento de la enfermedad es considerable.

Es importante destacar que el ensayo no es una prueba diagnóstica definitiva para la COVID-19. Se deben considerar otros factores clínicos y epidemiológicos para confirmar el diagnóstico. El desarrollo de este ensayo representa un avance importante en la lucha contra la COVID-19. Su sensibilidad, especificidad y facilidad de uso lo convierten en una herramienta valiosa para el diagnóstico, la investigación y el seguimiento de la enfermedad. Se necesitan estudios adicionales para evaluar la eficacia del ensayo en diferentes poblaciones y para determinar su utilidad para el diagnóstico de la COVID-19 en diferentes etapas de la enfermedad.

## Capítulo 5 Conclusiones

Dado el impacto mundial de la reciente pandemia, con millones de muertes e infecciones, existe una necesidad urgente de dispositivos de punto de atención que ofrezcan diagnósticos rápidos y fiables para prevenir la escalada de tales crisis sanitarias. Este estudio introduce un novedoso inmunosensor basado en silicio poroso (SP) nanoestructurado con una gran área superficial para el alojamiento eficaz de macromoléculas a detectar, en este caso anticuerpos asociados a COVID-19.

Se logró lo siguiente:

1. Se logró inmovilizar covalentemente el antígeno del SARS-CoV-2, en concreto la proteína RBD Spike 1, dentro de la matriz porosa, a través de funcionalización de la superficie que emplea quelación NTA/Ni.
2. El inmunosensor propuesto demostró un rendimiento analítico que permite la detección en tiempo real y sin etiquetas de concentraciones de anticuerpos que oscilan entre 0.1 y 1.28 mg/mL con ambas variantes del virus SARS-CoV-2.
3. El inmunosensor funcionó como se propuso. El inmunosensor se basa en un simple cambio espectral en el espectro de reflectancia intrínseca de los interferómetros SP cuando los anticuerpos específicos de la enfermedad (IgG) son capturados por la proteína inmovilizada. Este desplazamiento, indicativo de cambios en el espesor óptico efectivo (EOE) y el índice de refracción dentro de los poros, permite la correlación cuantitativa con la concentración de anticuerpos capturados.

La sencillez de la configuración de la plataforma sugiere su potencial aplicabilidad en escenarios clínicos que requieran pruebas diagnósticas rápidas y exhaustivas. Además, la versatilidad del sistema permite su adaptación para el diagnóstico y seguimiento de diversas enfermedades mediante la selección de pares bioreceptores/biomarcadores adecuados. Esta innovación representa un paso prometedor para abordar la necesidad crítica de herramientas de diagnóstico eficientes y adaptables ante los retos sanitarios mundiales.

## Referencias

- A. E. Pap, K. K. (2005). Thermal oxidation of porous silicon: Study on structure. *Appl. Phys. Lett*, 86, 041501.
- Agarwal P, B. C. (2015). Site-specific antibody-drug conjugates: the nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development. *Bioconjug Chem.*, 176-92.
- Alafeef, M., Dighe, K., Moitra, P., & Pan, D. (2020). Pan, D. Rapid, Ultrasensitive, and Quantitative Detection of SARS-CoV-2 Using Antisense Oligonucleotides Directed Electrochemical Biosensor Chip. *ACS Nano*, 17028-17045.
- Alerii Myndrul, R. V. (2017). Gold coated porous silicon nanocomposite as a substrate for photoluminescence-based immunosensor suitable for the determination of Aflatoxin B1. *Talanta*, 175, 297-304.
- Alessia Irrera, A. A. (2018). New Generation of Ultrasensitive Label-Free Optical Si Nanowire-Based Biosensors. *ACS Photonics*, 5(2), 471-479.
- Amouzadeh Tabrizi M, A. P. (2022). Highly sensitive aptasensor for the detection of SARS-CoV-2-RBD using aptamer-gated methylene blue@mesoporous silica film/laser engraved graphene electrode. *Biosens Bioelectron*.
- Block, H. M. (2009). Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. . *Methods in enzymology*, 439-473.
- Buriak, J. M. (1999). Lewis Acid Mediated Hydrosilylation on Porous Silicon Surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 11491-11502.
- Canham, L. (2018). *Handbook of Porous Silicon Second edition*. Birmingham: Springer.
- Canham, L. T. (1990). Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers . *Applied Physics Letters* , 1046-1048.
- Cullis, A. G. (1997). The structural and luminescence properties of porous silicon . *Journal of Applied Physics* , 909-965.

- Daoudi K., R. K. (2021). Ultra-sensitive and fast optical detection of the spike protein of the SARS-CoV-2 using AgNPs/SiNWs nanohybrid based sensors. *Surfaces and Interfaces*, 101454.
- Daoudi, K. R. (2021). Ultra-sensitive and fast optical detection of the spike protein of the SARS-CoV-2 using AgNPs/SiNWs nanohybrid based sensors. *Surfaces and interfaces*, 27.
- Douglas B. Mawhinney, J. A. (1997). FTIR Study of the Oxidation of Porous Silicon. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1202-1206.
- Feng Kong, X. Z. (2015). Inhibition of Multidrug Resistance of Cancer Cells by Co-Delivery of DNA Nanostructures and Drugs Using Porous Silicon Nanoparticles@Giant Liposomes. *Advanced functional materials* , 25(22), 3330-3340.
- Fracchiolla NS, A. S. (2013). Biosensors in clinical practice: focus on oncohematology. . *Sensors (Basel)*., 6423-47.
- Harapan, B. Y. (2021). Neurological symptoms, manifestations, and complications associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease 19 (COVID-19). *Journal of Neurology*, 1432-1459.
- Hermanson, G. T. (2013). *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*. Rockford: Elsevier.
- Higuera-Ciapara I, F.-V. L. (2006). Astaxanthin: A review of its. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 185–196.
- Hu, B. G. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* , 141-154.
- Huang, Z. W. (2023). Electrochemical detection of viral nucleic acids by DNA Nanolock-Based porous electrode device. *Analytical Chemistry*, 16668-16676.
- J. Salonen, E. M. (2018). Thermally Carbonized Porous Silicon and Its Recent Applications. *Advanced Materials*, 24-30.
- J., W. (2006). Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosens Bioelectron.*, 1887-92.

- Jianlin, L. J. (2014). Synthesis and characterization of a stable, label-free optical biosensor from TiO<sub>2</sub>-coated porous silicon. *Biosensors and Bioelectronics*, 372-378.
- Jillian M. Buriak, M. P. (1999). Lewis Acid Mediated Hydrosilylation on Porous Silicon Surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 11491-11502.
- Jonathan M. Zuidema, C. M.-S. (2020). Porous Silicon Nanoparticles Embedded in Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanofiber Scaffolds Deliver Neurotrophic Payloads to Enhance Neuronal Growth. *Advanced Functional Materials*, 30(25).
- Jones, T. B.-S. (2021). Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course. *Science*, 6551.
- Karyn L. Jarvis, T. J. (2012). Surface chemistry of porous silicon and implications for drug encapsulation and delivery applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 175, 25-38.
- Lamers, M. M. (2022). SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 270–284.
- Larsen, J. R. (2021). Modeling the onset of symptoms of COVID-19: Effects of SARS-CoV-2 variant. *PLOS Computational Biology*, 1-28.
- Lehmann, V., & Gösele, U. (1991). Porous silicon formation: A quantum wire effect. *Applied Physics Letters*, 856-858.
- Leonardi, A. A. (2022). SARS-COV-2 and Omicron variant detection with a high selectivity, sensitivity, and low-cost Silicon bio-Nanosensor. *Nano select*, 160-169.
- Leonardi, A. A. (2022). SARS-CoV-2 and omicron variant detection with a high selectivity, sensitivity, and low-cost silicon bio-nanosensor. *Nano select*.
- Li, Y. Z. (2019). Recent advances in porous silicon-based drug delivery systems . *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* , 106-118.
- Liu, X. W. (2017). Funcionalized porous silicon nanoparticles for drug delivery and theranostatic applications. . *Acta Biomaterialia* , 270-291.

- Luis M. Bimbo, E. M.-P. (2011). Drug permeation across intestinal epithelial cells using porous silicon nanoparticles. *Biomaterials* , 32(10), 2625-2633.
- M.J. Palimi, M. R. (2014). Surface modification of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles with 3-amino propyl trimethoxy silane (APTMS). Part 1: Studying the mechanical properties of polyurethane/Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposites. *Progress in Organic Coatings*, 1663-1673.
- Marco Ciotti, F. B. (2021). SARS-CoV-2 Infection and the COVID-19 Pandemic Emergency: The Importance of Diagnostic Methods. *Chemotherapy*, 17–23.
- Merck. (11 de November de 2023). *Merck Tabla y gráfico de espectros infrarrojos*. Obtenido de Merck: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table>
- Pacholski C, S. M. (2021). Sensing with Porous silicon . *Chemical Reviews* , 5288-5354.
- Pashkow FJ, W. D. (2008). Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am J Cardiol.*, 58D-68D.
- Pavesi.L., & F. (2000). Silicon photonics: present and future . *Photonics and Nanostructures Fundamentals and Applications* , 1-12.
- Porath, J. C. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*.
- Rayner-Canham, G. (2000). *Química inorgánica descriptiva 2nda edición*. New York: Pearson.
- Reyna K. V. Lim, Q. L. (2016). Bioorthogonal chemistry: recent progress and future directions . *Chemical Communications* , 6491-6515.
- Riikonen J, S. J. (2021). Porous Silicon based Optical Sensors: Towards Multimodal Sensing Platforms . *Advanced Materials*.
- Rita Vilensky, M. B. (2015). Oxidized Porous Silicon Nanostructures Enabling Electrokinetic Transport for Enhanced DNA Detection. *Advanced Functional Materials*, 25(43), 6725-6732.

- Rong G, Z. Y. (2023). A high-throughput fully automatic biosensing platform for efficient COVID-19 detection. *Biosens Bioelectron.*
- Rong, G., & Sawan, M. (2023). Tamm Plasmon Polariton Biosensors Based on Porous Silicon: Design, Validation and Analysis. *Biosensors*, 1026.
- Rushikesh Fopase, S. P. (2020). Strategies, challenges and opportunities of enzyme immobilization on porous silicon for biosensing applications. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2213-3437.
- Sailor, J. (2011). *Porous Silicon in Practice*. California: 978-3-527-31378-5.
- Sailor, M. J. (2012). *Porous silicon in practice: preparation, characterization and applications*. San Francisco: John Wiley & Sons .
- Salonen J, L. L. (2005). Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: loading and release of five model drugs. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.*, 108(2-3), 362–374.
- Santos HA, C. L. (2018). Nanostructured Porous Silicon for Optical Bio-Sensing . *Mater Today* , 479-764.
- Scarpa, E. R. (2015). Advances in porous silicon-based photonics for biosensing applications . *Journal of Luminescence* , 126-132.
- Seo, G., Lee, G., Kim, M. J., Baek, S. H., Choi, M., Ku, K. B., . . . al, e. (2020). Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. *ACS Nano*, 5135-5142.
- Smith, B. (2019). Spectroscopy.
- Turner, A. K. (1987). *Biosensors : Fundamentals and Applications (1st ed.)*. Oxford : Oxford university press.
- Wang j. (2006). Electrochemical Biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 1887-1892.

WHO. (9 de October de 2023). *Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic*. Obtenido de Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic?adgroupsurvey={adgroupsurvey}&gclid=CjwKCAjwyY6pBhA9EiwAMz](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic?adgroupsurvey={adgroupsurvey}&gclid=CjwKCAjwyY6pBhA9EiwAMz)

WHO, UNICEF. (1 de Marzo de 2021). *Publicaciones: OMS*. Obtenido de WHO INTERNATIONAL: [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/water-and-sanitation-for-health-facility-improvement-tool/en/](https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/water-and-sanitation-for-health-facility-improvement-tool/en/)

Worldometer. (10 de October de 2023). *COVID Coronavirus statistics worldometer*. Obtenido de Worldometer: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>

Xian, M., Carey, P. H., Fares, C., Ren, F., Shan, S. S., Liao, Y. T., . . . Pearton, S. J. (2020). Rapid Electrochemical Detection for SARS-CoV-2 and Cardiac Troponin I Using Low-Cost, Disposable and Modular Biosensor System. *IEEE Research and Applications of Photonics in Defense Conference (RAPID)*, 1-2.

Xifré Pérez, E. (5 de Diciembre de 2007). *Universitat Rovira i Virgili*. Obtenido de Catalan Open Research Area. Tesis Doctorals en Xarxa: <https://www.tdx.cat/handle/10803/8458#page=1>

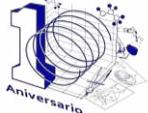
Xin Wang, Y. L. (2022). Biosensor for agriculture and food safety: Recent advances and future perspectives. *Advanced Agrochem*, 3-6.

Yanyan Tang, Z. L. (2016). Bacteria detection based on its blockage effect on silicon nanopore array. *Biosensors and Bioelectronics*, 79, 715-720.

Zheng, Y., Bian, S., Sun, J., Wen, L., Rong, G., & Sawan, M. (2022). Label-Free LSPR-Vertical Microcavity Biosensor for On-Site SARS-CoV-2 Detection. *Biosensors*, 151.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Instituto de  
Investigación en  
Ciencias  
Básicas y  
Aplicadas

## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

JEFATURA DE POSGRADO EN INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Cuernavaca, Morelos, 27 de febrero de 2024.

**DR. JUAN CARLOS GARCÍA CASTREJÓN**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO**  
**EN INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS**  
**P R E S E N T E**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: Desarrollo de un inmunosensor óptico basado en silicio poroso funcionalizado para la detección de biomarcadores de COVID-19, que presenta el alumno **Juan Pablo Castrejón Martínez**, para obtener el título de **Maestría en Ingeniería y Ciencias Aplicadas**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es **APROBATORIO**.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. DARWIN MAYORGA CRUZ**

**DR. EDGAR EDUARDO ANTÚNEZ CERÓN**

**DRA. MICHELLE GUTIÉRREZ MAYRET**

**DR. MOHAN KUMAR KESARLA**

**DRA. VIVECHANA AGARWAL**

Se adiciona efirma UAEM





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MICHELLE GUTIERREZ MAYRET | Fecha:2024-02-29 08:26:18 | Firmante**

QfpfKfK+ZPZcjGpffB6SQ3wZM3q0p5fGbZ0LC6SNQOEfzZZx5F1FXK7HplXck2p95SsSzmcT97zTDjnCcSWRTpMzqr97Gh5MVFBtTcZHSn5cvY1a3bWGrPBpeJl7d90AygoXAU2CwGGJugOR2On4/HzTLWDXlaPpLQRRemCeKk7UhnDpmhPW00IBeK4XR3wZh6QUAQi5N6DWSZJuM6YYVuYoA2ulsKAmRemeKLDSNcxD4IUeBrCxAPPeCBI6rMaJ4CSF+k147BozvPsK8ypFWAhjTXmxM4w92h5MC+1qX+fJlo709GRbenYZZRvAom/CAe1dEiCiZ33BcZa42w26UhmG==

**EDGAR EDUARDO ANTUNEZ CERON | Fecha:2024-03-01 15:40:41 | Firmante**

ltwtyGAMHt8qUtrijCwnQF9l6jUejd0l4Uqyt/F84pkc5EUzVqyZPS5M0Gc6R84cN7hivH/7w1SPKK0K0007d0zDGqBspFUUSTWBNFMTxR2s4OVbsxZdfQeJ8uoi1jl4QDPoSGLszdmlQ72hhqAwdaAaiDf26WMSHlnuQ/GB3RSx8LbtSyuCEAbK0kA+EchrvzwqXcWKbxyQe+KDJiEm5jiCPr5UpaKtztktAdR.JQwFqf29cTA5f3iU4YsCZqzCn4N+OEmAgHyiPku69wN Gknlv66Y6lftnBafikmWttD87k09HAnTHyJorLI0xkTyTaakun44Djsjj3DSsB/vy7sGg==

**MOHAN KUMAR KESARLA | Fecha:2024-03-10 22:00:01 | Firmante**

gl1hJ4PIYXBch+SHgZk30sJyXKRutgsBxUBPNwH3i74yFIQIJqgrgAL3NtD7YrVoRM6YmuHz8wJ0AkD93Y7jdGB9lhK93FjatgpxPNWnZDNJwUoBjWrYsLYG69FSkrGzzxvBu3j3qWkgIPkr/rh9sCb0jqZjoqGAgYPG/xWtRRv5OxzGxfVY9eap+vpLrk6CrFkzMXMP7h8qkDeZJo77118KiWmkdIEZ/x92OSJ4dX7x980B5TBX/VSW830jb08cF9G5GpUp4WVVeCHdslxWIW+8n7JfbRMrqZsZBED5lbcXogYkU340QrMx7fgQ1DZ7g4Wt02d8mfz3vG51ikRSA==

**VIVECHANA AGARWAL | Fecha:2024-03-13 12:56:20 | Firmante**

DWpI68XEeqjLfvVPzqWaiWh/9rEuRbRxcqRN+RCzAYCcyFLLaHiXO5cVT8skHdhRRW+0BrlezB1f06s1h5t9y8Znd6EuJnOWU92nxPHEsOF826CtXxMJXjt7eQ+RgNC9HC6EqzK46ThzBCn5Wsk8lBKcEmrSImC0Xg7jGpe93cKwNO9a1dCb/bBjQSPduwspbdVnFk05JJ+mstuFX/UQwZ+p/uULb3/HTIOhy1jrabHDbkS+bV1/Es/DfvwXc23jXLMov41q9SbZSWhM9qb0GIC12+QGNRkyemgc3JXgx2/jUGrllgwJAQ4nQ7MFQUmijK6SEtc09nEID1zNPImlw==

**DARWIN MAYORGA CRUZ | Fecha:2024-04-09 15:23:51 | Firmante**

gzArlDmpjllV0riMJJ/inQ3r5Wtk4weYtyuS8du8mw6/OeOoVJnf5Km2/ucamS13iZGeRHtlQCF1cufUlfjxpi3f3JYbu5TTselkP92kZNd/dZoJP/ZQ7pNYPtPheTfID3A7e54mAcR+6FJS+maOcZSlh0Me6TozK45QVshiFGA9LylNjrAxi0WqrPNLPK5uKbx/GYY5RCjaZTcoPpMGUGofFo8FkDUQUWdlWzLvzrAxxZWD/SHSsSRs6u5OZKcYm+1hDe5nocZ1K3qlSxv6z2qPlofv5wO/Hk0Aax/bMUv+pihZCBc/WgrYD+V6n3Y8AnfwYfH45duSyeR/QcQ3qA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[uHen43rzm](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Q6SUb4CZbE0sbHfqedSm2wKyobnEJ4y>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029