

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Desarrollo de un biosensor para detección y cuantificación de metilxantinas en plantas

Brigitte Alexandra León Intriago

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 21 de diciembre de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Desarrollo de un biosensor para detección y cuantificación de metilxantinas
en plantas**

Brigitte Alexandra León Intriago

Nombre del profesor, Título académico

Andrea Montero Oleas, MSc.

Quito, 21 de diciembre de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Briggitte Alexandra León Intriago

Código: 00137362

Cédula de identidad: 1721079745

Lugar y fecha: Quito, 21 de diciembre de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

RESUMEN

Los biosensores constituyen herramientas analíticas importantes para detectar y cuantificar moléculas con gran afinidad, fiabilidad y de forma sencilla. En plantas, los biosensores pueden ser de gran utilidad en la detección y cuantificación *in situ* de metabolitos secundarios, los cuales son compuestos orgánicos sintetizados como una respuesta fisiológica frente a condiciones de estrés biótico o abiótico. Las metilxantinas son metabolitos secundarios cuyos representantes más importantes son la cafeína y la teofilina. *Ilex guayusa* es una planta nativa de la Amazonía ecuatoriana, con alto contenido de cafeína. El rol de la cafeína en esta planta no ha sido descrito en detalle, pero se ha sugerido que la concentración de este metabolito secundario podría ser un indicador del estado fisiológico de esta planta. El presente estudio plantea desarrollar un biosensor óptico con aptámeros de ADN para detectar y cuantificar metilxantinas en plantas, particularmente, se trabajó con hojas de *I. guayusa*. El biosensor integra un complejo de ADN y una porfirina (NMM IX) que interactúan al estar en un medio que tenga metilxantinas. Al ocurrir esta interacción, se observa una señal de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de metilxantina presente en el medio. Para validar el biosensor y encontrar las condiciones óptimas para su funcionamiento, se realizó un ensayo de cuantificación de metilxantinas en solución. Posteriormente, se realizaron ensayos sobre hojas de guayusa para la cuantificación de cafeína. Los límites de detección obtenidos en los ensayos en solución y en hoja de guayusa fueron: 248.17 μM para teofilina en solución; 90.01 μM para cafeína en solución; y 130 mM para cafeína en hoja de guayusa. Estos resultados confirman la posibilidad del usar un biosensor basado en aptámeros para detectar y cuantificar metabolitos secundarios directamente de tejidos vegetales.

Palabras clave: biosensor, metilxantina, aptámero, ADN, NMM IX, cafeína, teofilina, guayusa.

ABSTRACT

Biosensors are important analytical tools to detect and quantify molecules with high affinity, reliability, and ease of use. In plants, biosensors can be very useful in the *in situ* detection and quantification of secondary metabolites, which are organic compounds that are synthesized as a physiological response to biotic or abiotic stress conditions. Methylxanthines are secondary metabolites whose most important representatives are caffeine and theophylline. *Ilex guayusa* is a native plant of the Ecuadorian Amazon, with a high caffeine content. The role of caffeine in this plant has not been described in detail, but it has been suggested that the concentration of this secondary metabolite could be an indicator of the physiological state of this plant. The present study proposes to develop an optical biosensor with DNA aptamers to detect and quantify methylxanthines in plants, particularly, in leaves of *I. guayusa*. The biosensor integrates a complex of DNA and a porphyrin (NMM IX) that interact in a medium containing methylxanthines. When this interaction occurs, a fluorescence signal is observed and is proportional to the amount of methylxanthines present in the medium. To validate the biosensor and find the optimal conditions for its performance, some methylxanthine quantification tests in solution were carried out. Later, tests on guayusa leaves were performed for the quantification of caffeine. The detection limits obtained from the tests in solution and in guayusa leaf were: 248.17 μM for theophylline in solution; 90.01 μM for caffeine in solution; and 130 mM for caffeine in guayusa leaf. These results confirm the possibility of using an aptamer-based biosensor to detect and quantify secondary metabolites directly from plant tissues.

Key words: biosensor, methylxanthine, aptamer, DNA, NMM IX, caffeine, theophylline, guayusa.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	10
MÉTODOS.....	14
1. Preparación de soluciones.....	14
1.1 Ensamblaje del complejo de ADN.	14
1.2 Preparación y cuantificación de las soluciones madre de metilxantinas.	14
2. Ensayos del biosensor en solución	15
2.1 Preparación de tratamientos para ensayo de validación del biosensor.	15
2.3 Preparación de tratamientos para ensayos de cuantificación de cafeína y teofilina en solución.	16
2.4 Revelación de ensayos en solución.	16
3. Ensayos de infiltración del biosensor en hojas de guayusa	17
3.1 Selección de hojas.....	17
3.2 Ensayo de infiltración de diferentes concentraciones de ADN y NMM IX en hoja de guayusa.....	17
3.3 Preparación de tratamientos e infiltración con jeringa para ensayo de validación en hoja.....	17
4. Procesamiento y análisis de imagen	18
5. Determinación del límite de detección.....	18
RESULTADOS.....	19
1. Validación del sistema de detección del biosensor	19
2. Optimización de concentraciones de los componentes del biosensor.....	19
3. Cuantificación de teofilina en solución.....	19
4. Cuantificación de cafeína en solución	20
5. Validación del biosensor en hoja de guayusa	20
5.1 Infiltración de diferentes concentraciones de ADN y NMM IX en hoja de guayusa.	20
5.2 Infiltración de tratamientos con cafeína y sin cafeína.....	21
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	27
TABLAS.....	28
FIGURAS	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	42
Anexo A. Esquema de ensayos en solución.	42
Anexo B. Esquema de ensayo de infiltración en hoja.	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos en ensayo de optimización en solución	28
Tabla 2. Ensayos de infiltración con distintas concentraciones de ADN.....	29
Tabla 3. Límites de detección para ensayos en solución y en hoja de guayusa	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del funcionamiento del biosensor propuesto	31
Figura 2. Resultados validación inicial del biosensor	31
Figura 3. Resultados de ensayo de optimización en solución	32
Figura 4. Visualización de fluorescencia en ensayo de optimización.....	32
Figura 5. Resultados de ensayo de cuantificación de teofilina en solución.....	33
Figura 6. Resultados de ensayo de cuantificación de cafeína en solución	34
Figura 7. Resultados de infiltración en hoja con diferente concentración de ADN.....	35
Figura 8. Resultados de infiltración de soluciones en hoja de guayusa	36

INTRODUCCIÓN

La detección y cuantificación *in situ* de sustancias y partículas requieren el uso de técnicas analíticas fiables, estables y de aplicación sencilla (Sandness & Washburn, 1976). En respuesta a esta necesidad, se han desarrollado diversas herramientas capaces de detectar un sin número de moléculas de interés de forma rápida, con alta especificidad y sin utilizar equipos sofisticados (Worsfold, Poole, Townshend & Miró, 2012). Una de estas herramientas son los denominados biosensores, que son dispositivos analíticos en los que está presente un componente biológico asociado a un transductor (Tothill & Turner, 2003). El componente biológico, que puede ser una enzima, ácidos nucleicos, entre otras moléculas, reconoce la sustancia de interés, mientras que el transductor, que es un elemento físico-químico, genera una señal medible tras detectarse molécula objetivo (Reyes, 2017).

Según el mecanismo de detección, existen diferentes tipos de biosensores como: ópticos, electroquímicos, piezoeléctricos, térmicos, celulares e inmunosensores (Carrión, Ródenas & Sánchez, 2007). De todos, los biosensores ópticos constituyen el grupo de mayor uso dadas las ventajas que ofrecen frente a técnicas analíticas convencionales, incluyendo: la posibilidad de detectar directamente y en tiempo real; ser altamente sensibles y de tamaño pequeño (Damborsky, Svitel & Katrlík, 2016). Este tipo de biosensor se fundamenta en la integración de un sistema biológico de detección a un transductor que genera una señal óptica como lo es la fluorescencia, y que es proporcional a la concentración de la sustancia de interés (Damborsky, Svitel & Katrlík, 2016).

Entre los componentes biológicos de detección que pueden emplear los biosensores ópticos, se encuentran los aptámeros, que son cadenas sencillas de ADN o ARN con estructura tridimensional, capaces de reconocer moléculas específicas al unirse con estas (IBIAN, 2020). Existen varias ventajas del uso de aptámeros como su alta afinidad y

especificidad dado que pueden ser sintetizados de forma personalizada (IBIAN, 2020); por otro lado, está su estabilidad térmica y química, su bajo costo y, en general, sus numerosas aplicaciones (Song, Lee & Ban, 2012).

En plantas, los biosensores ópticos han sido utilizados para detectar patógenos de importancia agrícola o epidemiológica, así como también para detectar la presencia de sustancias de interés, incluyendo alérgenos, toxinas y metales pesados (Sadanandom, 2010). Particularmente, los biosensores basados en aptámeros prometen ser una técnica ideal para la detección de metabolitos de importancia comercial, desplazando métodos tradicionales de detección que pueden tomar mucho tiempo y recursos para realizarlo (Amini & Saify, 2017).

Una importante aplicación de los biosensores ópticos en la biología vegetal es la evaluación del estado fisiológico de una planta según el contenido de metabolitos secundarios presente en un determinado tejido (Coppedè et al., 2017). Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos que desempeñan un rol importante en la interacción de las plantas con el medio ambiente, ya que su síntesis constituye una respuesta fisiológica de defensa frente a condiciones de estrés biótico (ataques de insectos, infecciones, etc.) o abiótico (sequías, temperaturas extremas, etc.) (Pagare et al., 2015; Kuma & Kumar, 2018).

Un grupo importante de metabolitos secundarios son las metilxantinas, que son compuestos nitrogenados, derivados de las purinas, sintetizados por algunas plantas (Andreeva, Dmitrienko & Zolotov, 2012). Las metilxantinas más representativas son: la cafeína, la teofilina y la teobromina, que se diferencian entre sí por la cantidad de grupos metilos presentes en su estructura molecular (Monteiro, et al., 2016). De todas, la cafeína es la metilxantina más estudiada y empleada a nivel mundial dado su efecto estimulante de los sistemas nervioso central, respiratorio y circulatorio (Evans, Richards & Battisti, 2020). La teofilina, por su parte, es un alcaloide que ha sido utilizada para tratar ciertas afecciones

pulmonares como el asma (Bucklin & Groth, 2014). Por último, la teobromina es un isómero de teofilina, que ha sido empleado como vasodilatador (Izawa et al., 2010). El rol que desempeñan las metilxantinas en algunas plantas ha sido descrito como protección contra patógenos y herbívoros (Ashirara, Kato & Crozier, 2011). Otras fuentes sugieren que las metilxantinas acumuladas en semillas u hojas maduras que se liberan en el suelo pueden desempeñar un rol de alelopatía, es decir, que inhiben el crecimiento de otras plantas a su alrededor (Anaya et al., 2006). Independientemente de la función, la cantidad de metilxantinas presentes en un tejido vegetal proporcionan una idea del estado fisiológico de la planta dado que su producción es una respuesta a diferentes estímulos como se lo mencionó previamente (Isah, 2019).

Ilex guayusa (guayusa) es una planta nativa de la Amazonía del Ecuador, Colombia y Perú (Lodoño et al., 2018). Dado el efecto estimulante de sus hojas, *I. guayusa* ha sido empleada por varias comunidades indígenas para preparar bebidas medicinales (Shemluck, 1979). Aún es limitado el conocimiento fitoquímico de esta planta, sin embargo, varias fuentes han reportado sobre su contenido de cafeína y teobromina (Radice & Vidari, 2007). Entre ambas metilxantinas, destaca el contenido de cafeína, del que se ha descrito hasta 16.64 miligramos por gramo de hoja seca (Melo, 2014). Por esta razón, la guayusa ha sido catalogada como una de las plantas con mayor contenido de cafeína a nivel mundial (Radice & Vidari, 2007). En esta planta, el rol de la cafeína no ha sido descrito en detalle, pero contar con un sistema que detecte y cuantifique este metabolito directamente de sus hojas sería crucial para conducir estudios fisiológicos.

El presente estudio tiene como objetivo desarrollar un sistema de detección y cuantificación de metilxantinas que pueda ser aplicado en plantas. El sistema consiste en un biosensor óptico con aptámeros, cuyo diseño se basa en un sistema de fluorescencia indirecta (Rankin et al., 2006; Rivera, 2016). El biosensor de este proyecto integra un aptámero de

ADN de unión específica a metilxantinas, unido por complementariedad de bases al oligonucleótido denominado C-myc (complejo aptámero-C-myc). En este sistema, el pigmento N-metilmesoporfirina IX (NMM IX) actúa como transductor de la señal que indica la presencia de la metilxantina en estudio. La NMM IX presenta propiedades ópticas selectivas por estructuras de ADN tipo G-cuádruplex (Yett et al., 2019). En presencia de una metilxantina, el aptámero interactúa con esta y se genera un cambio conformacional que produce que el complejo aptámero-C-myc se desensamble. Como resultado el oligo C-myc se separa del complejo y queda libre para ensamblarse en su estructura G-cuádruplex, lo que posibilita que la porfirina (NMM IX) se intercale en él y fluoreszca con gran intensidad (Figura 1).

En este proyecto, se usó la guayusa como modelo para validar el funcionamiento del biosensor propuesto. Adicionalmente, se plantea el desarrollo de un modelo de cuantificación de cafeína en hoja. Este biosensor constituye una prueba de concepto que, más adelante, puede ser extrapolada a la detección y cuantificación *in situ* de otras sustancias o partículas de interés.

MÉTODOS

1. Preparación de soluciones

1.1 Ensamblaje del complejo de ADN.

En un microtubo de 200 μ l, previamente rotulado, se colocó 50 μ l de una solución de 200 μ M del aptámero de ADN (THPYDNA), 50 μ l de una solución de 200 μ M C-myc y 100 μ l de buffer HEPES (50 mM) (esto se realizó en una cámara de flujo laminar). Para homogeneizar el contenido, se colocó el microtubo en una minicentrífuga durante 5 segundos aproximadamente. Posteriormente, el microtubo fue colocado en un termociclador, en el que corrió el programa de ensamblaje del complejo de ADN. Este programa consta de los siguientes cambios de temperatura: 95°C durante 5 minutos; 80°C por 1 minuto; 60°C por 1 minuto; 40°C por 1 minuto; 30°C por 5 minutos; 4°C por 10 minutos. Finalizado el programa, se almacenó el microtubo a -20°C.

1.2 Preparación y cuantificación de las soluciones madre de metilxantinas.

Para preparar la solución madre de teofilina (7000 μ M), se trituró 1 pastilla de liberación prolongada de Genfar (300 mg) en un mortero. El polvo resultante se colocó en un tubo Falcon con 50 ml de buffer fosfato (60 mM). Se homogeneizó manualmente y se colocó el tubo en una incubadora a 37°C con agitación continua durante más de 12 horas.

Para preparar la solución madre de cafeína (300 mM), se trituró 3 pastillas de Despertol en un mortero. El polvo resultante fue colocado en un vaso de precipitación con 5 ml de agua destilada. La mezcla se colocó sobre un agitador a alta temperatura hasta lograr homogenizarla. De inmediato, la solución fue almacenada en refrigeración.

La cuantificación de teofilina y cafeína se realizó a partir de espectrofotometría UV-visible. Para la solución de teofilina, se realizó una sola dilución 10^{-1} , mientras que para la solución de cafeína, se realizaron las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} . Se tomó 3 μ l de cada dilución y se

colocó en un pocillo de la placa del espectrofotómetro Multiskan (51119700DP). Adicionalmente, se colocó 3 μl de la solución blanco, para la teofilina, el blanco fue el buffer fosfato, ara la cafeína, el blanco fue el agua destilada. Se realizó la lectura de absorbancia UV-visible de cada muestra por duplicado. Se obtuvo un promedio de la absorbancia de las muestras y se restó la absorbancia del blanco. El valor resultante fue utilizado para calcular la concentración final de cafeína o teofilina a través de la Ley de Lambert Beer-Bouguer (Ecuación 1)

$$C = \frac{A}{E \cdot I} \quad (1)$$

Donde, C es la concentración de una molécula (M), A es la medida de absorbancia, E es el coeficiente de extinción molar ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$) e I es la longitud que recorre la luz por el medio absorbente (cm).

El coeficiente de extinción molar utilizado para la teofilina fue de $10200 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ a 271 nm (Pérez et al., 1987). El coeficiente de extinción molar para la cafeína fue de $9900 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ a 272 nm (Banerjee, 2012). Una vez calculada la concentración, se la multiplicó por el factor de dilución para determinar la concentración real de la solución madre.

2. Ensayos del biosensor en solución

2.1 Preparación de tratamientos para ensayo de validación del biosensor.

En un microtubo de 200 μl , se colocó un volumen del complejo de ADN (50 μM), NMM IX (50 μM) y agua de PCR hasta aforar a 20 μl . En otro microtubo de 200 μl , se colocó el complejo de ADN (50 μM), NMM IX (50 μM) y una solución de teofilina (7000 μM) hasta aforar a 20 μl . Estos procedimientos se realizaron en condiciones de oscuridad.

2.2 Preparación de tratamientos para ensayo de optimización de concentración ADN: NMM IX.

En microtubos de 200 μl , se prepararon 10 tratamientos en solución, en los que se colocó un volumen de: el complejo de ADN (4 μM), la porfirina NMM IX en una concentración específica (2 μM , 1 μM , 0.4 μM , 0.2 μM , 0.1 μM) y una solución de teofilina (7000 μM) (Tabla 1). Adicionalmente, se prepararon tratamientos con el complejo de ADN (4 μM), la porfirina NMM IX en una concentración específica (2 μM , 1 μM , 0.4 μM , 0.2 μM , 0.1 μM) y agua de PCR hasta aforar a 20 μl . Cada tratamiento fue preparado por duplicado.

2.3 Preparación de tratamientos para ensayos de cuantificación de cafeína y teofilina en solución.

En microtubos de 200 μl , correctamente rotulados, se colocó un volumen específico del complejo de ADN (5 μM), la porfirina NMM IX (0.5 μM), una solución madre de cafeína o teofilina, y agua de PCR para aforar a 20 μl . Este procedimiento se lo realizó en un área con poca luz y a temperatura ambiente. Una vez añadidas las soluciones, estos fueron cerrados y colocados en un minicentrífuga durante 5 segundos. Se colocó los microtubos en una gradilla y se los dejó incubar en total oscuridad durante 20 minutos aproximadamente.

2.4 Revelación de ensayos en solución.

Luego de incubar, se colocaron los microtubos en una lámpara de luz azul, ordenados vertical y ascendentemente según la concentración de cafeína o teofilina añadida en cada tubo (este procedimiento se lo realizó en un área oscura). Tras esto, se encendió la luz de la lámpara para observar la fluorescencia y, de inmediato, se tomó una fotografía de los microtubos con un teléfono celular.

3. Ensayos de infiltración del biosensor en hojas de guayusa

3.1 Selección de hojas.

Las hojas utilizadas en los ensayos de infiltración fueron colectadas de uno de los invernaderos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal USFQ. En la mayoría de ensayos, se seleccionó hojas maduras de tamaños similares.

3.2 Ensayo de infiltración de diferentes concentraciones de ADN y NMM IX en hoja de guayusa.

En tubos Eppendorf de 1.5 ml, se prepararon los tratamientos en solución especificados en la Tabla 2. El volumen final de cada tratamiento fue de 1 ml. Se homogenizó el contenido de cada tubo en una minicentrífuga durante al menos 8 segundos. Los tubos fueron almacenados a -20°C por 30 minutos. Previo a infiltrar los tratamientos, se roció cada hoja de guayusa con una solución de AGREX al 0.1%; esta solución permaneció en la hoja durante 10 minutos y luego se retiró el exceso con una toalla de papel. Se colocaron los tratamientos previamente preparados en una jeringa. Se infiltró cada tratamiento con la jeringa en una zona específica de la hoja y, de inmediato, esta fue colocada en una caja en oscuridad durante 15 minutos (incubación) (Anexo B).

3.3 Preparación de tratamientos e infiltración con jeringa para ensayo de validación en hoja.

En tubos Eppendorf de 1.5 ml, se prepararon tratamientos en solución con el complejo de ADN ($5\ \mu\text{M}$), la porfirina NMM IX ($0.5\ \mu\text{M}$) y, dependiendo del tratamiento, una solución de cafeína o agua destilada hasta un volumen final de 1ml. Se homogenizó el contenido de cada tubo en una minicentrífuga durante al menos 8 segundos. Los tubos fueron almacenados a -20°C por 30 minutos. Previo a infiltrar los tratamientos, se roció cada hoja de guayusa con una solución de AGREX al 0.1%; esta solución permaneció en la hoja durante 10 minutos y

luego se retiró el exceso con una toalla de papel. Se colocaron los tratamientos previamente preparados en una jeringa. Se infiltró cada tratamiento con la jeringa en una zona específica de la hoja y, de inmediato, esta fue colocada en una caja en oscuridad durante 15 minutos (incubación) (Anexo B).

3.4 Revelación en ensayos de infiltración.

Tras haber incubado, se colocó cada hoja sobre una lámpara de luz azul en oscuridad. Una vez posicionada la hoja, se encendió la luz azul para ver la fluorescencia en la zona infiltrada y, de inmediato, se tomó una fotografía con un teléfono celular (Anexo B).

4. Procesamiento y análisis de imagen

La imagen fue analizada con el software Image J. Primero, se dividió la imagen por colores y sobre el canal rojo se analizó la intensidad de fluorescencia. Para medir la fluorescencia, se seleccionó la parte fluorescente de la hoja y se midió la densidad integrada de esa zona. La densidad integrada hace referencia a la suma de las intensidades de píxeles en la zona analizada (McMillan, s.f.). De cada tratamiento, se tomó 4 medidas de fluorescencia y estas fueron procesadas en Excel para calcular el promedio y representarlos en histogramas.

5. Determinación del límite de detección

Para calcular el límite de detección, se tomó una medida de fluorescencia base (blanco) correspondiente a la intensidad del control negativo que contenía solo la porfirina (NMM IX) + agua destilada. A esta medida se adicionó 3 veces la desviación estándar del blanco (Quino, Ramos & Guisbert, 2007), como se muestra a continuación:

$$\text{LOD} = \text{Blanco} + (3 \delta \text{ blanco}) \quad (2)$$

RESULTADOS

1. Validación del sistema de detección del biosensor

La validación inicial del biosensor fue uno de los primeros procedimientos realizados en este proyecto. Tras colocar el tratamiento sin teofilina y el tratamiento con teofilina en luz azul (**Figura 2a**), se percibió una diferencia en sus fluorescencias a simple vista. Más adelante, se analizó la fotografía de estos tratamientos en Image J para obtener una relación cuantitativa de sus fluorescencias en términos de densidad integrada. Se determinó que el tratamiento con solución de teofilina tuvo una intensidad de fluorescencia de casi 20 unidades superior al tratamiento sin teofilina (**Figura 2b**).

2. Optimización de concentraciones de los componentes del biosensor

Una vez validado el biosensor en solución, se procedió con el establecimiento de una concentración óptima del complejo de ADN y la porfirina (NMM IX). La **Figura 3** muestra las relaciones de concentración de ADN:NMM IX que se evaluaron en solución. Se determinó que la mínima relación en la que visualmente hay una diferencia entre un tratamiento con solución de teofilina y un tratamiento sin esta sustancia es de 10:1, es decir, el complejo de ADN en una concentración 10 veces mayor a la porfirina (NMM IX). La **Figura 4** muestra una fotografía en la que se evidencia la diferencia de fluorescencia entre un tratamiento con solución teofilina y un tratamiento sin esta sustancia, estando el complejo de ADN en una concentración 10 veces mayor a la porfirina NMM IX.

3. Cuantificación de teofilina en solución

Una vez optimizadas las concentraciones del biosensor, se procedió a realizar ensayos en solución variando la concentración de las metilxantinas. Un primer experimento involucró el uso de teofilina. La **Figura 5** muestra los resultados de este ensayo, en el que se determinó una relación lineal entre la fluorescencia y la concentración de teofilina presente en el

tratamiento ($R^2 = 0.96$). Por otra parte, se calculó el límite de detección de teofilina en solución, el cual fue de 248,17 μM (**Tabla 3**).

4. Cuantificación de cafeína en solución

El siguiente experimento involucró el uso de diferentes concentraciones de cafeína en solución. La **Figura 6** muestra los resultados de este ensayo, donde se determinó la misma relación lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de esta metilxantina (R^2 de 0.96). Adicionalmente, se calculó el límite de detección de este ensayo, el cual fue 90.01 μM (**Tabla 3**).

5. Validación del biosensor en hoja de guayusa

5.1 Infiltración de diferentes concentraciones de ADN y NMM IX en hoja de guayusa.

Uno de los primeros pasos en la validación del biosensor en hoja fue la realización de tres ensayos en los que se infiltró varios tratamientos en hojas de guayusa (**Tabla 2**), y que diferirían entre sí en la concentración del complejo de ADN y la porfirina NMM IX. Dado que en los ensayos en solución se determinó que la mejor relación del ADN:NMM IX es 10:1, se empleó esa misma relación para estos ensayos en hoja. La **Figura 7** muestra los resultados de los tres ensayos de infiltración, donde se evaluó la diferencia de intensidad de fluorescencia entre todos los tratamientos. Se determinó que, con las concentraciones de 4 μM y 6 μM del complejo de ADN, se aprecia un mejor contraste entre los tratamientos con concentraciones conocidas de cafeína, los tratamientos sin cafeína y los tratamientos en los que únicamente se infiltró el biosensor (ADN + NMM IX). Sin embargo, en todos los casos, se observó un mayor nivel de fluorescencia en los tratamientos con concentraciones conocidas de cafeína en comparación a los tratamientos sin cafeína alguna. El mejor contraste entre ambos tratamientos con concentración conocida de cafeína se obtuvo con 4 μM de

ADN. Por último, los tratamientos infiltrados, que contenían solo la solución del biosensor (ADN + NMM), mostraron intensidades variables respecto a los tratamientos con cafeína; en su mayoría, la intensidad fue menor que el control de 0.17 M de cafeína.

5.2 Infiltración de tratamientos con cafeína y sin cafeína.

Del ensayo anterior, se determinó que con una concentración de ADN entre 4-6 μM , se visualiza mejor la diferencia de fluorescencia entre los distintos tratamientos; por lo que en este ensayo se empleó una concentración de 5 μM de ADN, manteniendo la relación 10:1 respecto a la porfirina NMM IX. La **Figura 8** muestra los resultados de otro de los ensayos de infiltración en hoja de guayusa, del que se evidenció una relación de proporcionalidad entre el nivel de fluorescencia y la concentración de cafeína que fue infiltrada en la hoja junto con el biosensor; la variación de la fluorescencia respecto a la concentración de cafeína estuvo correlacionada con un R^2 de 0.99. Además, se calculó el límite de detección de este ensayo, el cual resultó ser 130 mM (**Tabla 3**).

DISCUSIÓN

Previo a validar un sistema de detección, es crucial comprender su estructura y modo de acción. El biosensor del presente estudio incorpora las modificaciones realizadas por Rivera (2016) sobre el sistema de fluorescencia indirecta desarrollado por Rankin et al (2006) para detectar teofilina. El sistema de Rankin et al. (2006) focaliza el uso de un aptámero de ARN unido a una molécula de ADN marcada con fluorocromos, y su método de reporte se basa en el efecto *quenching*; este efecto alude a un decremento en la intensidad de fluorescencia de una muestra cuando la sustancia de interés está presente (Lakowicz, 2006). En contraste, el sistema de detección planteado por Rivera (2016) incorpora un aptámero híbrido de ADN/ARN unido a un oligonucleótido (C-myc) en el que, a diferencia de Rankin et al. (2006), se visualiza un incremento en la intensidad de fluorescencia cuando la teofilina está presente. Este efecto es posible gracias a la incorporación de la porfirina NMM IX, que emite fluorescencia al unirse con el oligo C-myc (Rivera, 2016). La separación del complejo aptámero:C-myc, sucede debido a que el aptámero reconoce a la teofilina y se une a ella por la gran afinidad que presentan (Rivera, 2016). Ese mismo mecanismo de reporte es empleado en el biosensor propuesto en este estudio, el cual integra un aptámero de ADN unido, por complementariedad de bases, al oligonucleótido C-myc (complejo de ADN) y, por otra parte, está la porfirina NMM IX que actúa como transductor.

Cuando una metilxantina está presente, el complejo de ADN se desensambla ya que el aptámero reconoce la molécula de interés, cambia su estructura y se rompen los puentes de hidrogeno que lo unían al oligo C-myc. El cambio estructural que experimenta el aptámero de ADN al reconocer la metilxantina es una propiedad que ha sido ampliamente reportada en sistemas de detección con ácidos nucleicos, especialmente aptámeros, los cuales cambian su conformación una vez que se unen a su molécula objetivo (Elskens, Elskens & Madder, 2020). Por otra parte, una vez que el oligo C-myc se ha separado del aptámero, se ensambla

en su estructura G-cuádruplex (GC), lo que permite que la porfirina NMM IX se intercale en él y fluoreszca con mayor intensidad. La unión de NMM IX con ADN GC es el resultado de interacciones electrostáticas y apilamiento químico como lo reporta Yett et al. (2019). El efecto de incremento de la fluorescencia de NMM IX en presencia de estructuras GC, ha sido ampliamente estudiado y aplicado en diferentes sistemas (Umar et al., 2019). Un ejemplo es la detección *in vitro* de ADN-GC proveniente de muestras biológicas para el diagnóstico de enfermedades asociadas con la presencia o ausencia de estructuras GC (Kreig et al., 2015). Otro ejemplo es el uso de sistemas reporteros NMM-GC para monitoreo ambiental donde, por ejemplo, se detecte la presencia de iones metálicos en muestras acuosas como lo reporta Zhang et al. (2017).

En la validación inicial del biosensor, el nivel mayor de fluorescencia en el tratamiento con teofilina comparado al tratamiento sin teofilina sugirió que el sistema de detección funciona en solución (Figura 2a). Sin embargo, la fluorescencia en el tratamiento sin teofilina se debió a una saturación del sistema con NMM IX, ya que las moléculas libres de esta porfirina estuvieron muy concentradas. Shi et al. (2020) confirma este hecho al mencionar que NMM IX sí genera cierta fluorescencia al estar libre, sin embargo, su intensidad es muy débil al compararla cuando interactúa con estructuras de ADN G-cuádruplex. Otro hecho que pudo haber influido para que se visualice fluorescencia en el tratamiento sin teofilina es que NMM IX se encontró en una relación de concentración 1:1 respecto al complejo de ADN, lo que podría sugerir la ocurrencia de algún tipo de interacción entre estas moléculas. En un estudio de Sabharwal et al. (2014), se reportó que la fluorescencia de NMM IX es sensible a la presencia de ADN y se evidenció ligeros cambios en la intensidad de fluorescencia de esta molécula al interactuar con ADN que no están en conformación GC; sin embargo, esta fluorescencia puede ser hasta 40 veces más baja que en

presencia de ADN GC. En este sentido, la interacción de NMM IX con el complejo de ADN pudo haber generado cierta fluorescencia en el tratamiento sin teofilina (Figura 2a).

Con este antecedente, fue fundamental estandarizar la relación de concentración de NMM IX y el complejo de ADN (Figura 3). La relación óptima determinada 10:1 de ADN:NMM IX concuerda con el estudio de Sabharwal et al (2014), en el que también se empleó un exceso molar de 10 estructuras de ADN por cada molécula de NMM. Con esta relación 10:1, se evidenció que la fluorescencia de NMM IX es hasta 50 veces más potente en comparación a otras relaciones de concentración (Sabharwal et al., 2014). Además, al haber 10 veces más ADN que NMM IX, se garantiza que no habrá fluorescencia alguna en un tratamiento sin la molécula de interés (Figura 4). A partir de estos resultados, se definió la relación 10:1 (ADN:NMM IX) para todos los demás experimentos.

En los ensayos de cuantificación de teofilina y cafeína en solución, la relación observada entre el nivel de fluorescencia y la concentración de estas metilxantinas (Figuras 5 y 6) concuerda con lo descrito por Yett et al. (2019) de que la fluorescencia emitida por complejos NMM-GC es proporcional a la concentración del analito. Existen varios estudios que describen esta misma relación en la detección de otras sustancias; un ejemplo es el estudio de Yuan et al. (2019), en el que se evidencia un incremento de la señal de fluorescencia de un complejo ADN GC-NMM IX con el aumento de la cantidad de un pesticida de interés. Esta relación resalta la utilidad del biosensor propuesto en este proyecto para detectar y estimar el contenido de metilxantinas en una solución.

Parte esencial de los ensayos de cuantificación de teofilina y cafeína en solución fue la determinación del límite de detección (LD), el cual corresponde a la mínima concentración de una sustancia cuya señal de detección es significativamente distinta a la señal del blanco (fondo) (Rebolo, 2007). Para la teofilina, el LD fue de 248.17 μM (Tabla 3), un valor que si

bien está dentro del rango descrito para biosensores basados en aptámeros (50nM-600µM) (McKeague & DeRosa, 2012), resulta mucho mayor al que Rankin et al. (2006) reportó en su sistema con aptámeros de ARN. Para el caso de la cafeína, el LD fue de 90.01 µM (Tabla 3), un valor más bajo que el teofilina, pero que sigue siendo más alto que el LD reportado por McKeague & DeRosa (2012) para xantinas (<10µM). Cabe destacar que estos límites no constituyen medidas universales puesto que están sujetas a variaciones según la forma que se lleve a cabo el procedimiento, la naturaleza de las muestras y/o reactivos, entre otros factores (UNODC, 2010). El hecho de considerar la desviación estándar entre las mediciones del blanco (Ec. 2), que en este caso fueron los tratamientos sin metilxantinas, implica la probabilidad de determinar límites de detección erróneos si esta medida es considerablemente grande (Morrow, 1995).

La validación del biosensor en la hoja de guayusa implicó evaluar la relación de la fluorescencia respecto al contenido de cafeína. Al igual que en los ensayos en solución, se observó una relación proporcional en el nivel de fluorescencia y la concentración de cafeína infiltrada (Figuras 7 y 8), sugiriendo que el sistema de detección propuesto funciona adecuadamente en hoja. Romero et al. (2015) también reportó que la señal fluorescente emitida por un biosensor óptico, diseñado para reconocer nitratos en plantas, es proporcional al contenido extracelular detectado de estas moléculas. Por otra parte, al explorar 3 concentraciones distintas del complejo de ADN en la hoja de guayusa (Figura 7), se determinó que una concentración entre 4µM y 6µM es adecuada para contrastar la intensidad de fluorescencia entre los distintos tratamientos. En los estudios revisados sobre biosensores ópticos en plantas, no se describe en detalle las concentraciones empleadas de sus componentes biológicos de reconocimiento, sin embargo, se mantuvo la relación 10:1 (ADN:NMM IX) sugerida por Sabharwal et al. (2014), y que ya fue establecida como óptima en los ensayos en solución.

Por último, el límite de detección calculado para los ensayos en hoja fue 130 mM (Tabla 3), un valor 3 magnitudes superior a los límites de los ensayos en solución. Esta diferencia podría estar asociada al contraste de ruido de fondo entre ambos ensayos (Mongay, 2005). En la hoja de guayusa hay más moléculas que influyen en la intensidad de la fluorescencia que se detecta. Una de estas moléculas podría ser la clorofila, de la que se ha reportado una máxima absorbancia en la región azul a 372 nm para la clorofila a, y para la clorofila b a 392 nm (Max-Planck-Gesellschaft, 2015). La lámpara empleada para visualizar la fluorescencia en las hojas infiltradas emite luz azul en un espectro entre 370 y 400 nm lo que, sin lugar a duda, pudo haber influido para que moléculas excitadas en ese espectro emitan fluorescencia además de la observada luego de que el biosensor detectó la cafeína en la hoja.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la funcionalidad de un biosensor basado en aptámeros de ADN para detectar metilxantinas tanto en solución como en hojas de guayusa. la relación proporcional del nivel de fluorescencia respecto a la concentración de metilxantinas constituye una propiedad clave para poder cuantificar estas sustancias

Los límites de detección determinados para teofilina y cafeína en solución están dentro del rango esperado para biosensores basados en aptámeros de ADN. En los ensayos en solución estos límites fueron 248.17 μM y 90.01 μM para teofilina y cafeína respectivamente. En los ensayos en hoja de guayusa, se determinó un límite de detección de 130 mM. No obstante, se precisa explorar un rango más amplio de concentraciones para determinar un límite de detección con mayor certeza.

La posibilidad de detectar y cuantificar moléculas directamente en el tejido vegetal, convierte a este biosensor en una herramienta clave para analizar metabolitos *in situ*, sin requerir equipos sofisticados y con igual o mayor sensibilidad que las técnicas convencionales. En el caso de *I. guayusa*, la cuantificación del contenido de cafeína podría ser de gran utilidad para conducir estudios sobre el rol fisiológico de este metabolito secundario en la planta o para otras aplicaciones en las que se precise una cantidad específica de cafeína según el interés.

Por último, dada la gran versatilidad de este biosensor, este podría ser destinado a la detección de otras sustancias de interés. Para esto, se debería adaptar el complejo aptamero-Cmyc a la molécula de interés.

TABLAS

Tabla 1. Composición de tratamientos preparados en ensayo para optimizar la relación de concentración de ADN:NMM IX

Tratamiento	ADN (μM)	NMM IX (μM)	Sustancia utilizada
1	4	2	Solución de teofilina (7000 μM)
2		1	
3		0.4	
4		0.2	
5		0.1	
6		2	Agua de PCR
7		1	
8		0.4	
9		0.2	
10		0.1	

La tabla muestra la composición molar de 10 tratamientos preparados, por duplicado, como parte del ensayo de optimización de concentración del complejo de ADN y la porfirina NMM IX. Se muestra la concentración de ADN utilizado (4 μM), las diferentes concentraciones de NMM IX aplicadas por tratamiento (2 μM , 1 μM , 0.4 μM , 0.2 μM , 0.1 μM) y la solución que se empleó para aforar el tratamiento a 20 μl (con teofilina o con agua de PCR).

Tabla 2. Composición de 5 tratamientos preparados en 3 ensayos de infiltración en hoja de guayusa, que difieren en su concentración de ADN y NMM IX.

Ensayos	Componentes	Tratamientos				
		T1	T2	T3	T4	T5
Ensayo 1	ADN	4 μ M	4 μ M	4 μ M	x	x
	NMM IX	0.4 μ M	0.4 μ M	0.4 μ M	0.4 μ M	x
	Cafeína	340 mM	170 mM	x	x	x
	Agua	x	x	x	√	√
Ensayo 2	ADN	6 μ M	6 μ M	6 μ M	x	x
	NMM IX	0.6 μ M	0.6 μ M	0.6 μ M	0.6 μ M	√
	Cafeína	340 mM	170 mM	x	x	x
	Agua	x	x	x	√	√
Ensayo 3	ADN	10 μ M	10 μ M	10 μ M	x	x
	NMM IX	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	√
	Cafeína	340 mM	170 mM	x	x	x
	Agua	x	x	x	√	√

La tabla muestra la composición molar de todos los tratamientos preparados en 3 ensayos de infiltración en hoja de guayusa; los 3 ensayos difieren en la concentración del complejo de ADN y NMM IX. La x denota ausencia de un componente y el símbolo √ denota presencia del componente, sin especificar una concentración.

Tabla 3. Límites de detección calculados en los ensayos en solución y en hoja de guayusa.

Ensayos realizados	Límite de detección
En solución de teofilina	248.17 μM
En solución de cafeína	90.01 μM
Infiltración con cafeína	130 mM

Se muestra el límite de detección calculado en 3 ensayos realizados: uno en solución de teofilina, otro en solución de cafeína y una infiltración de cafeína en hoja de guayusa.

FIGURAS

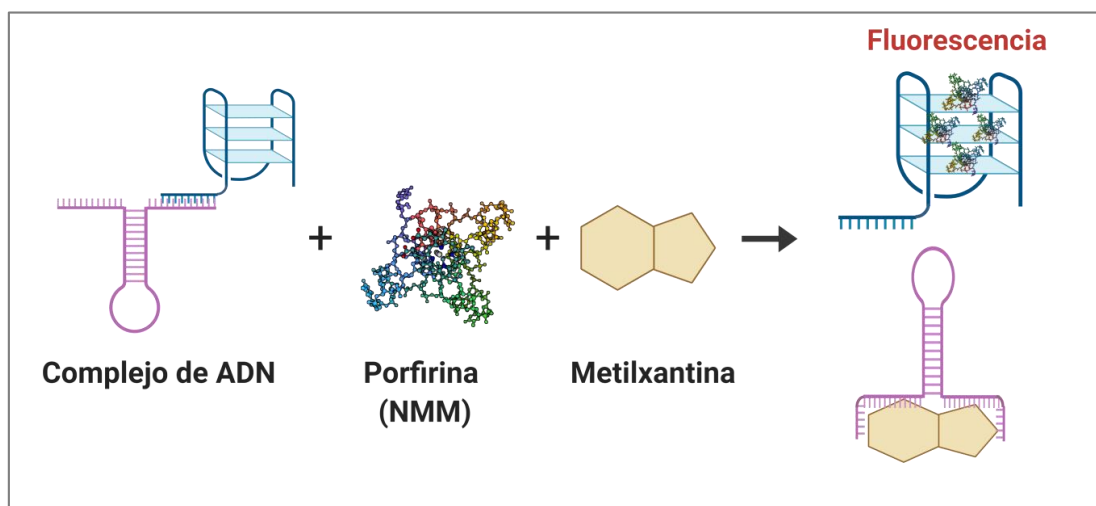


Figura 1. Esquema del funcionamiento del biosensor propuesto.

Se muestra que en presencia de una metilxantina, el complejo de ADN se desensambla; la porfirina se intercala en el oligo C-myc, el cual se ensambla en su estructura G-cuádruplex, lo que permite a la porfirina florecer con mayor intensidad.

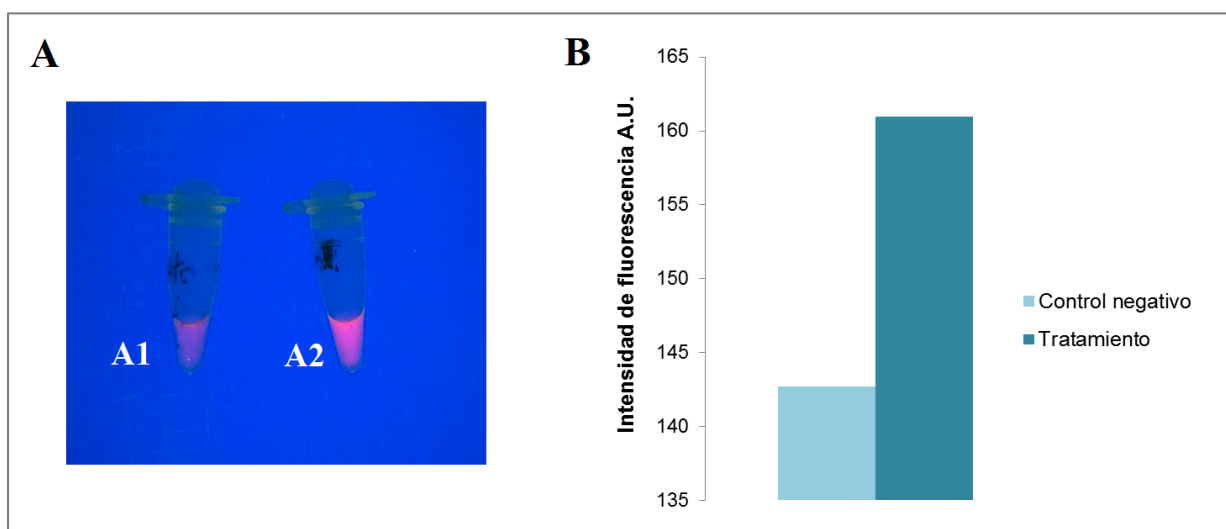


Figura 2. Resultados validación inicial del biosensor con teofilina. A) Fotografías del ensayo en solución para la validación del biosensor. A1: Tratamiento sin teofilina: 50 μ M ADN + 50 μ M NMM IX. A2: Tratamiento con teofilina: 50 μ M ADN + 50 μ M NMM + solución de 7000 μ M de teofilina. B) Resultados de la intensidad de fluorescencia según el tratamiento en ensayo de validación inicial del biosensor obtenidos con el software Image J.

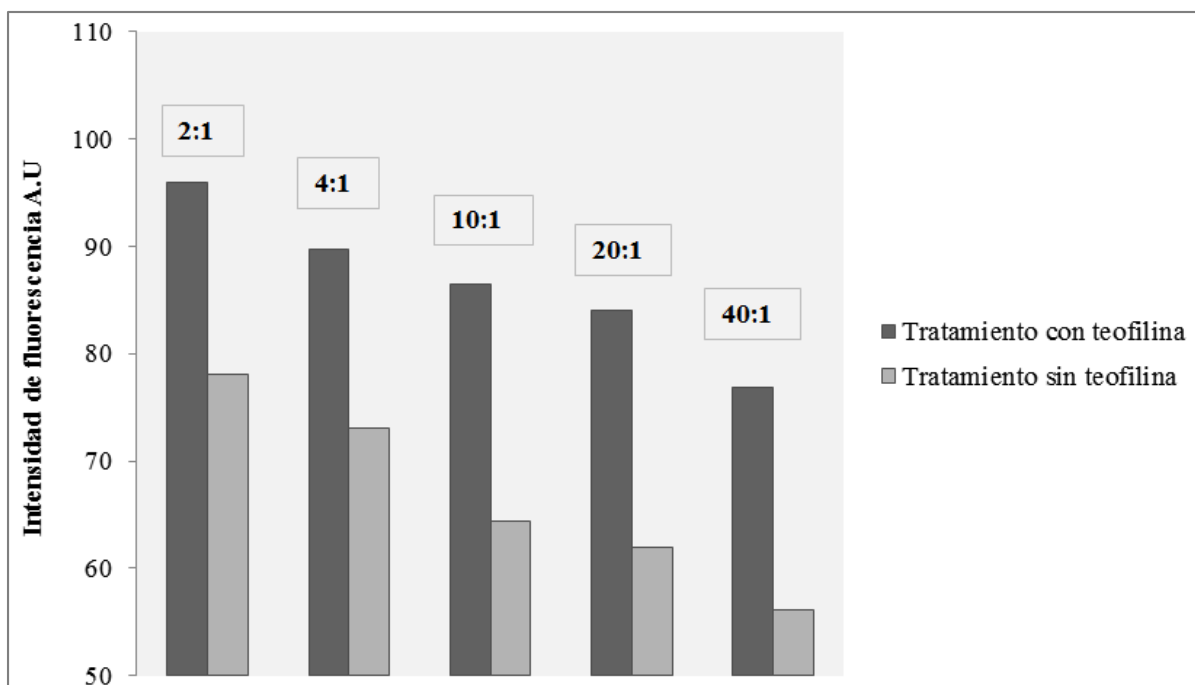


Figura 3. Resultados ensayo de optimización de concentraciones ADN: NMM IX en solución. Se muestra la diferencia en la intensidad de fluorescencia de tratamientos con teofilina y sin teofilina, con el complejo de ADN y la porfirina (NMM IX) en varias relaciones de concentración. Cada cuadro localizado en la parte superior de las barras corresponden a una relación evaluada del complejo de ADN y la porfirina (NMM IX).

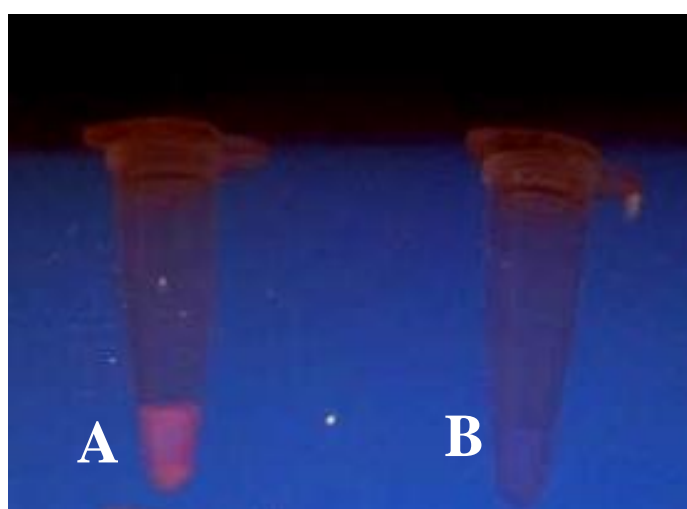


Figura 4. Visualización de fluorescencia de tratamientos en ensayo de optimización de concentración NMM IX:ADN. A) Tratamiento con el biosensor y una solución de teofilina. B) Tratamiento con el biosensor y sin teofilina. En ambos tratamientos, la relación de concentración del complejo de ADN y la porfirina (NMM IX) es 10:1 respectivamente.

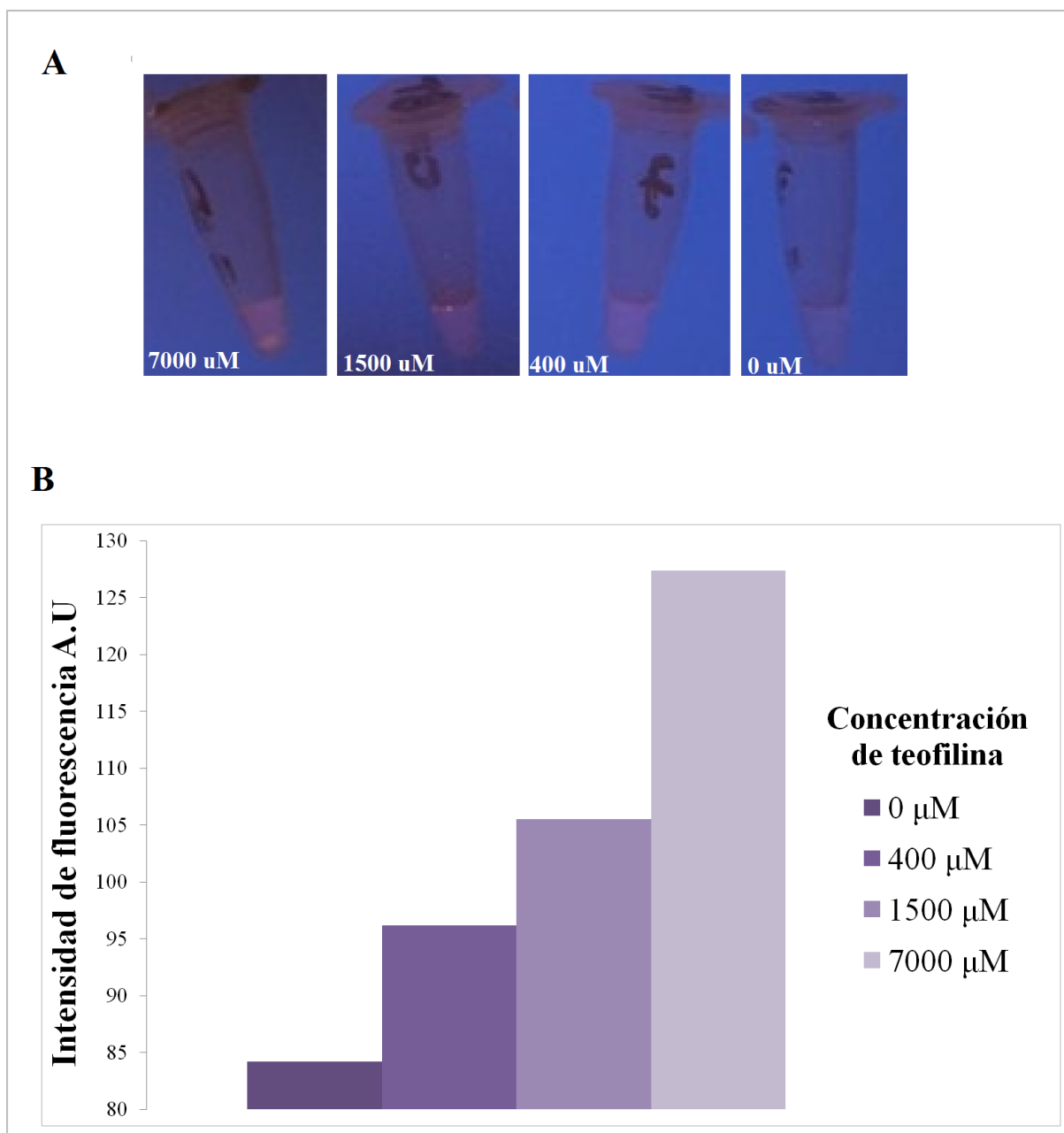


Figura 5. Resultados de ensayo en solución con distintas concentraciones de teofilina. A) Fluorescencia observada en tubos con los tratamientos. B) Intensidad de fluorescencia detectada con Image J en función de la concentración de teofilina.

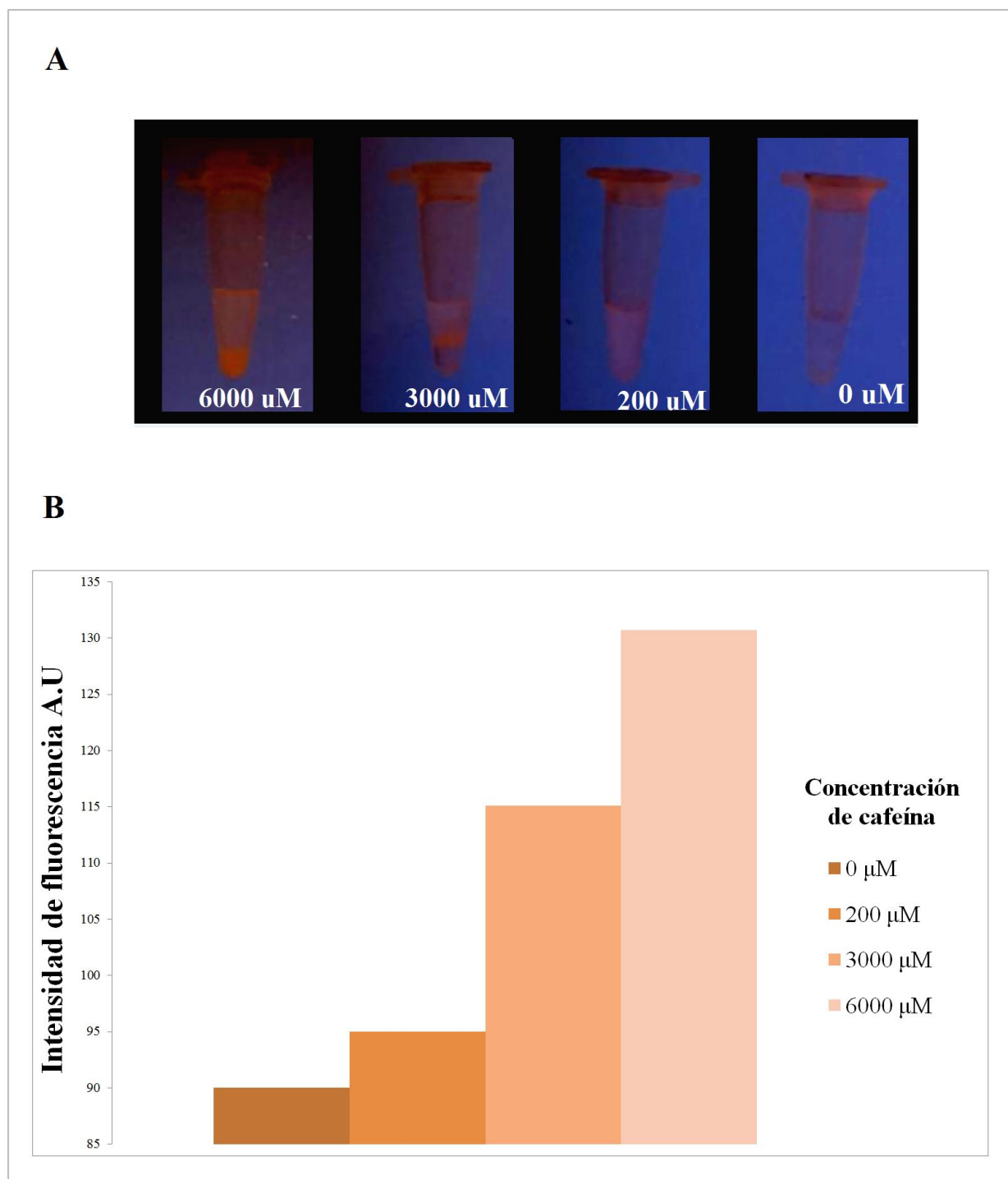


Figura 6. Resultados de ensayo en solución con distintas concentraciones de teofilina. A) Fluorescencia observada en tubos con tratamientos. B) Intensidad de fluorescencia según contenido de cafeína en solución, determinada con Image J.

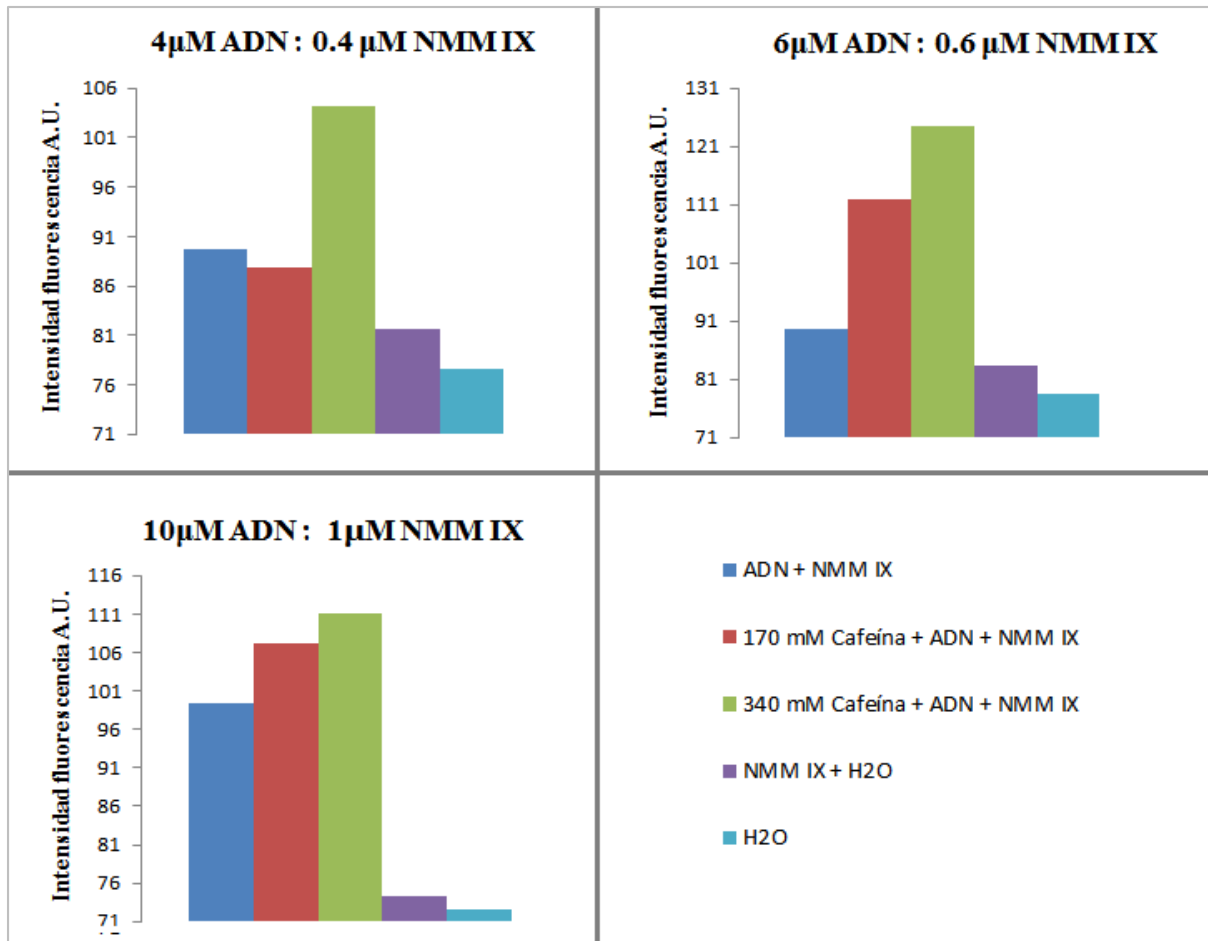


Figura 7. Resultados de ensayo de infiltración en hoja de guayusa con diferentes concentraciones del complejo de ADN + la porfirina (NMM IX).

Se muestra las medidas de la intensidad de fluorescencia de diferentes tratamientos y controles que fueron infiltrados en la hoja de guayusa. Se empleó 3 concentraciones del complejo de ADN y la porfirina (NMM IX).

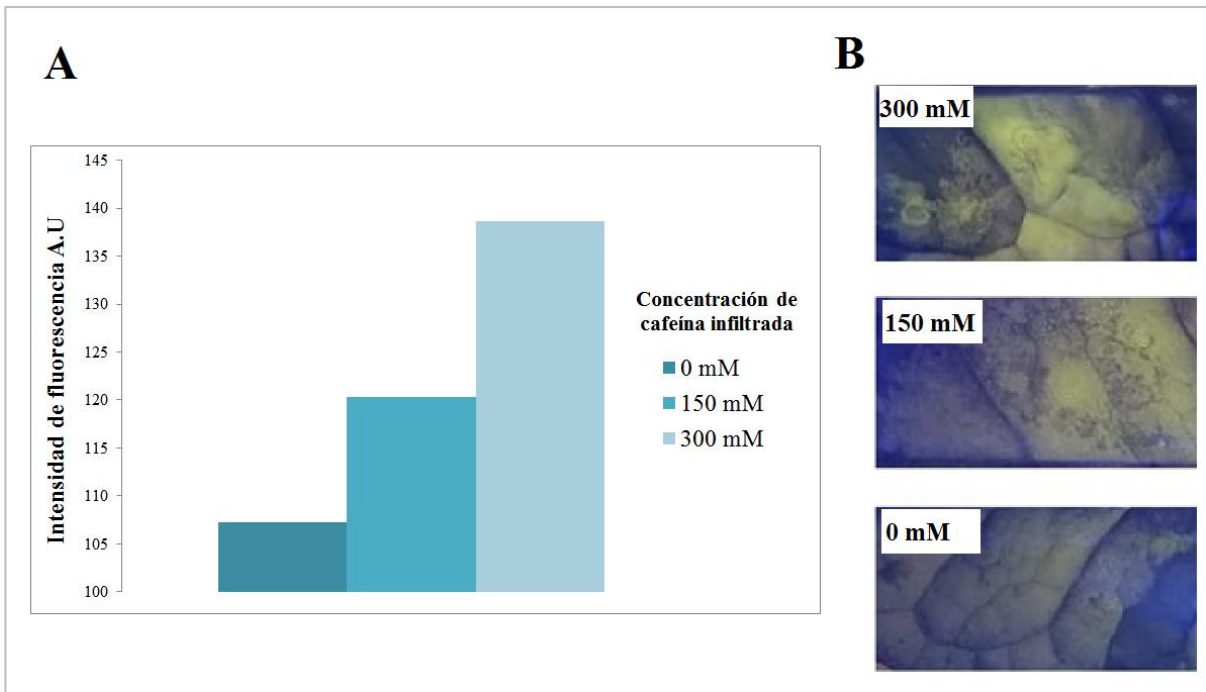


Figura 8. Resultados de infiltración de controles en hoja de guayusa. A) Intensidad de fluorescencia según el tratamiento infiltrado, determinado con Image J. B) Captura de fluorescencia en zona infiltrada de la hoja de guayusa tras visualizarla con luz azul.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amini, M. & Saify, H. (2017). Application of aptamers in medicinal plants. *MedCrave*. Recuperado de <https://medcraveonline.com/MOJBM/application-of-aptamers-in-medicinal-plants.html>
- Andreeva, E., Dmitrienko, S.G. & Zolotov, Y. A. (2012). Methylxanthines: properties and determination in various objects. *Russian Chemical Reviews*, 81(5), pp. 397-414.
- Ashihara, H., Kato, M. & Crozier, A. (2011). Distribution, biosynthesis and catabolism of methylxanthines in plants. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/227259336_Distribution_Biosynthesis_and_Catabolism_of_Methylxanthines_in_Plants
- Banerjee, S. et al. (2012). Probing the Interior of Self-Assembled Caffeine Dimer at Various Temperatures. *J Fluoresc.*, 22:753–769. DOI 10.1007/s10895-011-1011-3
- Bucklin, M. H. & Groth, C. M. (2014). Theophylline. *Encyclopedia of Toxicology*. (3era ed.).
- Carrión, P., Ródenas, J. & Sánchez, C. (2007). *Aplicaciones de la ingeniería electrónica e informática en medicina*. Ediciones de la Universidad de Castilla – La Mancha.
- Coppedè, N., Janni, M., Bettelli, M. et al. (2017). An in vivo biosensing, biomimetic electrochemical transistor with applications in plant science and precision farming. *Sci Rep* 7, 16195. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16217-4>
- Damborsky, P., Svitel, J. & Katrlík, J. (2016). Optical Biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60, 91-100. DOI: 10.1042/EBC20150010
- Elskens, J., Elskens, J. & Madder, A. (2020). Chemical Modification of Aptamers for Increased Binding Affinity in Diagnostic Applications: Current Status and Future Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 4522; doi:10.3390/ijms21124522
- Evans, J., Richards, J. & Battisti, A. (2020). Caffeine. *Stat Pearls*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519490/>

- Hu, D. et al. (2010). A Quadruplex-Based, Label-Free, and Real-Time Fluorescence Assay for RNase H Activity and Inhibition. *Chemistry an European Journal*, 16, 2605 – 2610
- IBIAN. (2020). Aptámeros. IBIAN Technologies. Recuperado de <https://www.ibiantech.com/aptameros/>
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52(39). DOI: 10.1186/s40659-019-0246-3
- Jiménez, C. & León, D. (2008). BIOSENSORES: APLICACIONES Y PERSPECTIVAS EN EL CONTROL Y CALIDAD DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTICIOS. Scielo. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n1/v16n1a17.pdf>
- Kalaji, H. et al. (2017). Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Springer*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5357263/>
- Kreig, A., Calvert, J., Sanoica, J., Cullum, E., Tipanna, R., & Myong, S. (2015). G-quadruplex formation in double strand DNA probed by NMM and CV fluorescence. *Nucleic acids research*, 43(16), 7961–7970. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv749>
- Kumar, I. & Kumar, R. (2018). Production of Secondary Metabolites in Plants under Abiotic Stress: An Overview. *Significances of Bioengineering & Biosciences*, ISSN 2637-8078. Recuperado de <https://crimsonpublishers.com/sbb/pdf/SBB.000545.pdf>
- Lakowicz, J. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3era ed. Springer Science + Business Media, LLC. New York, USA.
- Lodoño, P. et al. (2018). Preliminary study of caffeine extraction from *Ilex guayusa* L. leaves using supercritical carbon dioxide, *MDPI*, 4. DOI10.3390/mol2net-04-05297
- Max-Planck-Gesellschaft. (2015). The light harvesters in plant photosynthesis are bluer than we think. Recuperado de <https://www.mpsd.mpg.de/17628/2015-04-chlorophyll-rubio#:~:text=In%20the%20case%20of%20chlorophyll,nm%20and%20392%20nm%2C%20respectively.>
- McKeague M., Derosa M. C. (2012). Challenges and opportunities for small molecule aptamer development. *J. Nucleic Acids* 748913. 10.1155/2012/748913

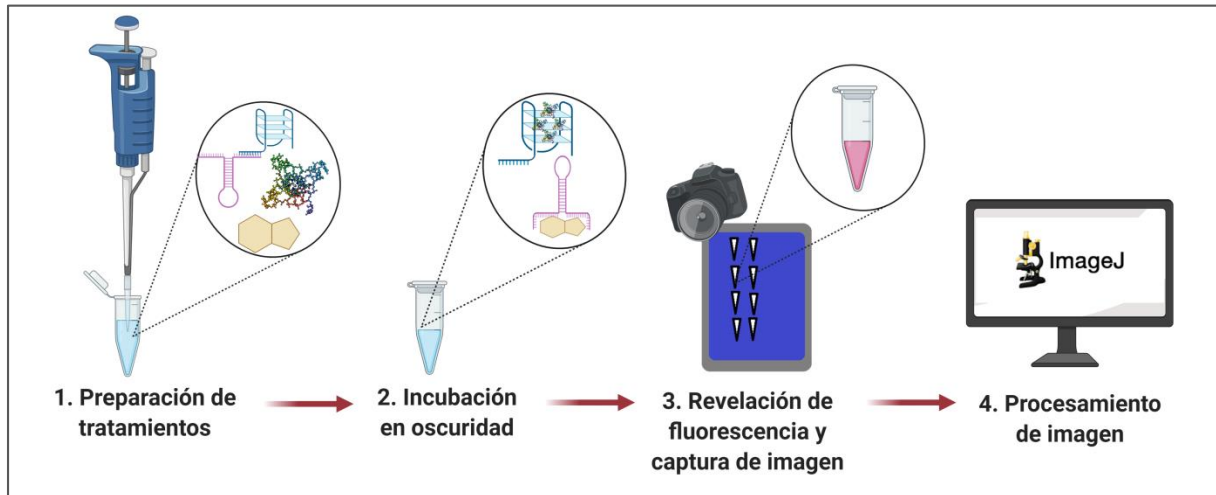
- McMillan, P. (s.f.). Fundamentals of Image Quantification. *The University of Melbourne*. Recuperado de https://microscopy.unimelb.edu.au/__data/assets/pdf_file/0007/2010022/Fundamentals-of-image-quantification-sml.pdf
- Melo, V. (2014). *Composición y análisis químico de la especie Ilex guayusa Loes*. Tesis de pregrado. Universidad San Francisco de Quito. Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/3269?mode=full>
- Mongay, C. (2005). *Quimiometría*. Editorial de la Universidad de Valencia.
- Monteiro, J. et al. (2016). Structure-Bioactivity relationships of methylxanthines: trying to make sense of all the promises and the drawbacks.
- Morrow, R. (1995). *Applications of Inductively Coupled Plasma-mass Spectrometry to Radionuclide Determinations*. ASTM International.
- Nicoludis, J. M., Barrett, S. P., Mergny, J.-L., & Yatsunyk, L. A. (2012). Interaction of human telomeric DNA with N-methyl mesoporphyrin IX. *Nucleic Acids Research*, 40(12), 5432–5447. <http://doi.org/10.1093/nar/gks152>
- Pagare, S. et al. (2015). Secondary Metabolites of Plantas and their Role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3), pp. 293-304.
- Pérez, P. et al. (1987). Setschenow Coefficients for Caffeine, Theophylline and Theobromine in Aqueous Electrolyte Solutions. *J. Chem. SOC., Faraday Trans.*, 83, 1029-1039.
- Pfeiffer, F. & Mayer, G. (2016). Selection and Biosensor Application of Aptamers for Small Molecules. *Frontiers in chemistry*, 4(25), doi: 10.3389/fchem.2016.00025
- Quino, I., Ramos, O. & Guisbert, E. (2007). Determinación del límite de detección instrumental (ldi) y límite de cuantificación instrumental (lci) en elementos traza de agua subterránea. *Rev. Bol. Quim*, 24(1).
- Radice, M. & Vidari, G. (2007). Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes. Y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. *La Granja*, 6(2):3. DOI: 10.17163/lgr.n6.2007.01
- Ranking, C. et al. (2006). A Simple Fluorescent Biosensor For Theophylline Based On Its RNA Aptamer. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids* Vol 25:1407–1424

- Rebolo, S. (2007). Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O. (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela. Recuperado de https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2353/9788497509435_content.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Reyes, M. Biosensores. UMH. Recuperado de http://biotecnologia.edu.umh.es/wp-content/uploads/sites/319/2017/06/Presentacion_biosensores_2017_20182.pdf
- Rietdorf, J. (2005). *Microscopy Techniques*. Springer Science & Business Media
- Romero, R. et al. (2015). Biosensors Used for Quantification of Nitrates in Plants. *Journal of Sensors*. Recuperado de <https://www.hindawi.com/journals/js/2016/1630695/>
- Sabharwal, N. C., Savikhin, V., Turek-Herman, J. R., Nicoludis, J. M., Szalai, V. A., & Yatsunyk, L. A. (2014). N-methylmesoporphyrin IX fluorescence as a reporter of strand orientation in guanine quadruplexes. *FEBS Journal*, 281(7), 1726–1737. <http://doi.org/10.1111/febs.12734>
- Sadanandom, A. (2010). Biosensors in plants. *Elsevier*. 13(6), pp. 736-743
- Sandness, G. A. & Washburn, J. F. (1976). *Study of Detection, Identification, and Quantification Techniques for Spills of Hazardous Chemicals*. Pacific Northwest Laboratory, S. B. Ailes.
- Shemluck, M. (1979). The flowers of *Ilex guayusa*. Botanical Museum Leaflets, Harvard University (USA).
- Shi, H. et al. (2020). A novel aptasensor strategy for protein detection based on G-quadruplex and exonuclease III-aided recycling amplification. *Chinese Chemical Letters*, 31, 155–158
- Song, K., Lee, S. & Ban, C. (2012). Aptamers and Their Biological Applications. *Sensors* (Basel), 12(1): 612–631.
- Talukder G. Business Communications Company, Inc; Norwalk, Connecticut, USA: September, 2002. <http://www.buscom/biotech/B159.html> (Biosensors & Bioelectronics).

- Tothill I. & Turner, A. (2003). Biosensors. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/topics/nursing-and-health-professions/biosensor>
- Umar, M. I., Ji, D., Chan, C. Y., & Kwok, C. K. (2019). G-Quadruplex-Based Fluorescent Turn-On Ligands and Aptamers: From Development to Applications. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(13), 2416. <https://doi.org/10.3390/molecules24132416>
- UNODC. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. *Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito*. Recuperado de https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf
- Wang, T. et al. (2018). A reusable ratiometric fluorescent biosensor with simple operation for cysteine detection in biological sample. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 277, 20, pp. 415-422.
- Worsfold, P., Poole, C., Townshend, A. & Miró, M. (2012). *Encyclopedia of Analytical Science*. Vol 1. Elsevier.
- Yett, A. et al. (2019). N-methyl mesoporphyrin IX as a highly selective light-up probe for G-quadruplex DNA. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 23: 1195–1215. DOI: 10.1142/S1088424619300179
- Yuan, X. et al. (2019). Enzymatic reaction modulation of G-quadruplex formation for the sensitive homogeneous fluorescence sensing of cholinesterase and organophosphate pesticides. *Analytical Methods*, 7.

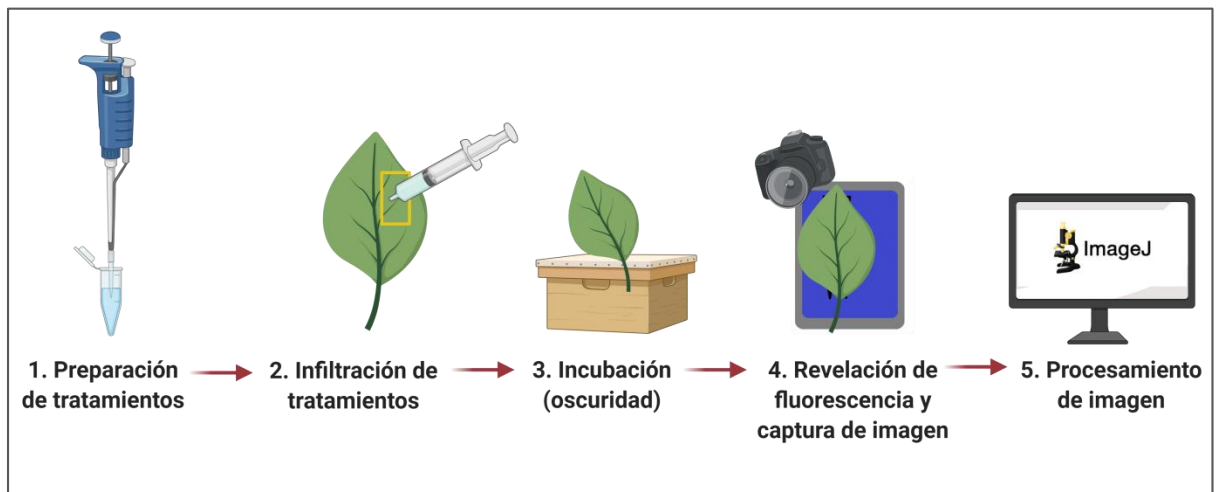
ANEXOS

Anexo A. Esquema de ensayos en solución. 1) Preparación de tratamientos con el biosensor y la metilxantina. 2) Incubación del tubo en oscuridad. 3) Visualización de fluorescencia con luz azul y toma de fotografía. 4) Análisis de imagen.



Fuente: Biorender

Anexo B. Esquema de ensayo de infiltración en hoja. 1) Preparación de tratamientos con el biosensor y la metilxantina. 2) Infiltración de tratamientos en la hoja 3) Incubación de hoja en oscuridad. 4) Visualización de fluorescencia con luz azul y toma de fotografía 5) Análisis de imagen.



Fuente: Biorender