

INMOVILIZACIÓN DE SONDAS DE ADN COMO BIORECEPTOR DE UN GENOSENSOR PIEZOELÉCTRICO Y SU EVALUACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN PARA SUPERFICIES

SARA MARÍA GALVIS ESCOBAR

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Biomédica

**Directora:
Marisol Jaramillo Grajales
PhD en Biotecnología de la Universidad Nacional de
Colombia**

**Asesores:
Ing. Kaory Barrientos Urdinola
Ing. Camilo Ortiz Monsalve**



**UNIVERSIDAD EIA
INGENIERÍA BIOMÉDICA
ENVIGADO
2017**

A mis padres, porque todo lo que hago es por y para ustedes.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Marisol Jaramillo por el apoyo y consejos dados, por la confianza que deposito en mi durante el desarrollo de este trabajo.

A mis asesores Kaory Barrientos y Camilo Ortiz por la paciencia, dedicación y tiempo que me entregaron para que fuera posible realizar este proyecto.

A Laura Buitrago por acompañarme todo este tiempo en el laboratorio y apoyarme.

CONTENIDO

Introducción	9
1. Preliminares	10
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
1.2 OBJETIVOS DEL PROYECTO	11
1.2.1 Objetivo General.....	11
1.2.2 Objetivos Específicos.....	11
1.3 MARCO DE REFERENCIA	12
1.3.1 Biosensores.....	12
1.3.2 Monocapas autoensambladas (SAM)	13
1.3.3 Caracterización de monocapas autoensambladas.....	14
2. Metodología.....	32
2.1 MATERIALES Y EQUIPOS.....	32
2.1.1 Identificación de técnicas de caracterización de superficies metálicas.	32
2.1.2 Inmovilización de ADN sobre electrodos de oro.....	32
2.1.3 Caracterización de superficies inmovilizadas sobre electrodos de oro	33
2.2 PROCEDIMIENTO.....	33
2.2.1 Identificación de técnicas de caracterización de superficies metálicas.	33
2.2.2 Inmovilización de ADN sobre electrodos de oro.....	34
2.2.3 Caracterización de superficies inmovilizadas sobre cristales de oro	36
3. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	37
3.1 IDENTIFICACIÓN DE TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES METÁLICAS.....	37
3.2 INMOVILIZACIÓN DE ADN SOBRE SUPERFICIES DE ORO.....	40
3.2.1 Lavado de los cristales de cuarzo con electrodo de oro	40
3.2.2 Caracterización de superficies inmovilizadas sobre cristales de oro	41
4. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES	50
REFERENCIAS.....	52

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1 Datos de muestras de ADN.....	35
Tabla 2. Datos de técnicas de caracterización.....	39
Tabla 3. Tabla 3. Datos Cristal A.....	47
Tabla 4. Datos Cristal B	48
Tabla 5. Datos promedios de áreas.....	48
Tabla 6. Tabla 6. Datos concentración 7.5 μ M.....	49

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Diagrama esquemático de una SAM (Barrientos, 2015).....	14
Figura 2. Diagrama esquemático de un Microscopio de Fuerza Atómica (Mai, s.f.)	15
Figura 3. Diagrama esquemático del sistema elemento piezoeléctrico, transductor de fuerza y control de retroalimentación del AFM. (Eaton & West, 2010)	16
Figura 4. Diagrama esquemático de la detección de la desviación del cantiléver por medio del foto-detector. (Eaton & West, 2010)	17
Figura 5. Diagrama esquemático del modo de pulso (tapping) de AFM. (Eaton & West, 2010)	17
Figura 6. Curva de fuerza. (Eaton & West, 2010).....	18
Figura 7. Imágenes de altura. (Eaton & West, 2010)	19
Figura 8. Izquierda: imagen de altura de un copolímero tribloque. Derecha: imagen de fase de un copolímero tribloque. (Eaton & West, 2010).....	20
Figura 9. Diagrama esquemático de un microscopio electrónico de barrido o SEM. (Purdue University, s.f.).....	21
Figura 10. Diagrama esquemático las interacciones haz-muestra. (Materials Evaluation and Engineering, INC. , s.f.).....	22
Ilustración 11. Diagrama esquemático de un detector Everhart-Thornley (Scharf, 1998) .	23
Figura 12. Imagen de un alambre soldado a laser proveniente de un detector de electrones secundarios. (nanoScience Instruments, s.f.)	24
Figura 13. Imagen de una superficie de fractura de metal en polvo con partículas esféricas de sílice, proveniente de un detector de electrones retrodispersados. (nanoScience Instruments, s.f.).....	25
Figura 14. Diagrama esquemático de un FTIR. (Nancy Birkner, s.f.)	26
Figura 15. Izquierda: Interferograma de una luz monocromática. Derecha: Espectro de la imagen a la izquierda. (Nancy Birkner, s.f.).....	27
Figura 16. Formación del espectro. (Bradley, s.f.).....	28
Figura 17. Forma de la señal característica en voltametría. (Flores, 1995)	30
Figura 18. Voltamograma cíclico. (Flores, 1995).....	31
Figura 19. Cristal de cuarzo de 10 MHz (QuartzPRO, s.f.).....	33
Figura 20. Espectros de un cristal de cuarzo con electrodo de oro (blancos) después de haber sido lavado.	41
Figura 21. Espectros de un cristal de cuarzo con electrodo de oro inmovilizado con una concentración de ADN de 2.5 μ M y diferentes números de scans..	42
Figura 22. Espectro de un cristal de cuarzo con electrodo de oro inmovilizado con una concentración de ADN de 40 μ M.	42
Figura 23. Espectro de un cristal de cuarzo con electrodo de oro inmovilizado con una concentración de ADN de 2.5 μ M.	43
Figura 24. Espectro de un cristal de cuarzo con electrodo de oro inmovilizado con una concentración de ADN de 0.3125 μ M.	43
Figura 25. Curva de calibración.	48

RESUMEN

La detección de ADN como metodología de diagnóstico en pacientes y de evaluación de indicadores de calidad de productos o condiciones ambientales, ha surgido como una alternativa de interés en los últimos años, esto por sus muchas ventajas como rapidez, múltiples aplicaciones y sencillez de los ensayos. Los biosensores son un ejemplo de tecnología novedosa para detección de ADN, una tecnología rápida, sencilla y precisa que permiten la detección de diferentes moléculas y por diferentes sistemas de transducción, variables que los distribuyen en diferentes categorías. Por esto, un biosensor que detecte la hibridación de cadenas complementarias de ADN, se llama un genosensor y si este utiliza los cambios de frecuencia por alteraciones másicas en cristales piezoeléctricos o micro balanzas de cuarzo como sistema de transducción, entonces se clasifica como un genosensor piezoeléctrico. Una de las partes más importantes de estos genosensores es la superficie, dado que allí es donde se encontrarán las moléculas inmovilizadas, entre ellas el bioreceptor, de las cuales dependerán las señales producidas y que podrán ser analizadas. La caracterización de estas superficies por medio de diferentes metodologías, posee entonces una importancia alta para el mejor entendimiento, optimización y resultados de estas tecnologías.

En el presente trabajo se realizó una revisión bibliográfica de las diferentes metodologías de caracterización de superficies metálicas y que estuvieran disponibles, para el conocimiento de su funcionamiento y potencial aplicación para caracterización de superficies inmovilizadas con ADN. También se inmovilizaron sondas de ADN de cadena sencilla sobre electrodos de oro de cristales de cuarzo de 10 MHz. Para este proceso se comenzó con la conjugación química del ADN y su posterior separación por precipitación, etapa necesaria para formar un enlace fosforamídita que permita la inmovilización de la sonda. La metodología aplicada en el proceso de inmovilización de sondas de ADN fue la formación de monocapas autoensambladas mixtas (MSAM), inmovilizando diferentes concentraciones de ADN en solución: 40, 20, 10, 7.5, 5, 2.5, 1.2, 0.625, 0.3125, 0.15625 y 0.02604 μM . Estas superficies funcionalizadas fueron caracterizadas por medio de Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), se analizaron las bandas de interés (SAM, activación y ADN) y se realizó una curva de calibración, la cual tuvo un coeficiente de correlación $R^2=0,98989$ y presentó límites inferiores y superiores de 40 y 0.02604 μM respectivamente.

Palabras clave: Genosensor, piezoeléctrico, caracterización, ADN, FTIR, curva de calibración, SAM.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

ABSTRACT

DNA detection as a methodology of diagnosis for patients and as an evaluation of quality indicators or environmental conditions, has emerged as an interesting solution in recent years, given its many advantages like speed, multiple applications and the experiments' simplicity. Biosensors are a great innovative technology example for DNA detection, a fast, simple and precise technology that allows the detection of different molecules by different transduction systems, variables that distribute them in different categories. Therefore, a biosensor that detects the hybridization of complementary DNA strands, is called a biosensor and if it uses frequency changes due to mass alterations on piezoelectric crystals or quartz microbalances as a transduction system, it is classified as a piezoelectric genosensor. One of the most important parts of these genosensors is the surface, given that the immobilized molecules will be there, among them the bioreceptor, and the resulting signals that are going to be analyzed, depend heavily on these molecules. The characterization of these surfaces has a great importance for a better understanding, optimization and results of these technologies.

In the present study, a literature review of different characterization methodologies for metallic surfaces was done, taken in to account which ones were available, with the purpose of understanding its functioning principles and potential application for the characterization of surfaces immobilized with DNA. Also, single stranded DNA probes were immobilized on gold electrodes of 10 MHz quartz crystals. First, DNA chemical conjugation and its subsequent separation by precipitation was done, process needed to form a phosphoramidite bond that allows the immobilization of the probe. The applied methodology for the immobilization process of DNA probes was the formation of mixed self-assembled monolayers (MSAM), the DNA was immobilized in different solution concentrations: : 40, 20, 10, 7.5, 5, 2.5, 1.2, 0.625, 0.3125, 0.15625 y 0.02604 μM . This surfaces were characterized with Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), the qualitative analysis of the bands of interest (SAM, activation and DNA) was made, as well as a calibration curve with a coefficient of determination $R^2=0,98989$ and lower and upper limits of 40 μM and 0.02604 μM respectively.

Keywords: Genosensor, piezoelectric, DNA, FTIR, calibration curve, SAM.

INTRODUCCIÓN

La detección temprana y el diagnóstico acertado para cualquier tipo de enfermedad, se han convertido en necesidades apremiantes que el campo de biosensores podría solucionar de manera adecuada. Los genosensores, un tipo de biosensor, ha surgido recientemente como una gran alternativa para el diagnóstico rápido y representan un campo emergente con múltiples aplicaciones, entre ellas aplicaciones médicas, debido a su bajo costo, simplicidad y sensibilidad (Wu, Wu, Wang, Shen & Yu, 2006). Los genosensores se pueden clasificar de acuerdo al sistema de detección de la señal de interés, entre estos se encuentran los piezoeléctricos. Estos detectan cambios másicos por medio de la variación en la frecuencia de un cristal bajo la influencia de un campo eléctrico, cambios que se dan en la superficie donde se encuentra inmovilizado el bioreceptor (Tombelli, 2012), por lo tanto, la caracterización de la superficie inmovilizada es de gran importancia porque permite conocer las variables importantes y como estas pueden ser optimizadas.

En el presente estudio, se realizó una revisión de diferentes metodologías de caracterización para superficies metálicas inmovilizadas, para conocer su funcionamiento y potencial aplicación para caracterización de superficies inmovilizadas con ADN. Seguidamente, se realizó la inmovilización de una sonda bioreceptora de ADN sobre la superficie del electrodo de oro de un cristal de cuarzo de 10 MHz. Para esto, se realizó primero la conjugación química de esta sonda de ADN mediante la formación del enlace fosforamidita en el extremo 5'. La inmovilización comienza por la formación de monocapas autoensambladas mixtas o MSAM, utilizando los alcanotioles 11-mercapto-1-undecanol ($\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{OH}$) o MUA, y ácido-16-mercaptohexadecanoico ($\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{COOH}$) o MHDA, en proporción 25:1, después se realizó una activación por medio de (1-etil- 3-(3-diaminopropil) carbodiimida) (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) y, por último, se realizó la inmovilización del bioreceptor que son sondas de ADN. Se prepararon diferentes concentraciones en solución de ADN de 40, 20, 10, 7.5, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 y 0.02604 μM . Las superficies inmovilizadas fueron caracterizadas por medio de la técnica Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), con estudios cualitativos y cuantitativos. Las concentraciones fueron seleccionadas de manera previa para obtener un rango de trabajo amplio, así como los límites inferiores y superiores.

Con la caracterización, se realizó una curva de calibración la cual arrojó un coeficiente de determinación $R^2=0,98989$, la comprobación de la formación y activación de las MSAM y la inmovilización de sondas de ADN, se realizó por medio del análisis cualitativo de las bandas características. Los resultados obtenidos sugieren que la técnica de caracterización FTIR es un método adecuado para caracterización de superficies inmovilizadas con ADN y se pueden realizar análisis cualitativo y cuantitativo.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1. PRELIMINARES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la medicina moderna, el diagnóstico temprano y acertado de las diferentes enfermedades se ha convertido en una necesidad apremiante. Para muchas enfermedades, los métodos actuales para el diagnóstico, como ELISA, PCR, cultivo *in vitro*, entre otros, demandan mucho tiempo y en ocasiones no arrojan los resultados esperados, además de necesitar del uso de maquinaria y personal capacitado, lo que aumenta el riesgo de la transmisión en determinadas enfermedades, o el riesgo del deterioro de la condición del paciente (Malecka, K. et Al., 2016). Por lo anterior, el diagnóstico médico basado en resultados de test bioquímicos y el uso de biosensores, ha tomado fuerza en los últimos años, surgiendo, así como un área de investigación emergente (Rasheed, A. & Sandhyarani, N., 2016). El término biosensor es utilizado para referirse a dispositivos analíticos encargados de convertir un evento biológico en una señal eléctricamente medible (Mehrotra, P., 2016).

Los biosensores, se componen de una interfase biológica, en la cual se inmovilizan los bioreceptores con el fin de capturar el analito, o biomarcador, constituyendo así el evento biológico y un sistema de transducción acoplado, el cual se encargará de transformar dicho evento biológico en una señal cuantificable (Shen, Lu & Cai, 2011). De acuerdo al sistema de detección de la señal, los biosensores se clasifican en: ópticos, nanomecánicos, potenciómetros de luz direccionada LAPS, electroquímicos, termométricos y piezoeléctricos. Estos últimos detectan cambios másicos por medio de la variación en la frecuencia del cristal bajo la influencia de un campo eléctrico (Tombelli, 2012), y han sido aplicados en el campo de la medicina para la detección de diferentes biomarcadores, debido a su bajo costo, simplicidad y sensibilidad (Wu, Wu, Wang, Shen & Yu, 2006).

De igual manera, los biosensores son clasificados según el biomarcador a detectar, entre ellos, los genosensores, han emergido como una nueva técnica para detectar la hibridación de cadenas de ADN complementarias, debido a su simplicidad, bajo costo y buenas propiedades analíticas (Manzanares-Palenzuela, Martín-Fernández, López & López-Ruiz, 2015). Por lo anterior, los genosensores se han posicionado como una estrategia para el diagnóstico de diversos virus y enfermedades, entre los cuales se destaca el HPV, HIV, la hepatitis C, el dengue, entre otros (Honorato, A. C. et Al., 2014), además de ser utilizados para el monitoreo y control ambiental, y las mediciones químicas en las industrias de la agricultura, los alimentos y los medicamentos. (Erdem, A., 2007)

En las etapas del diseño de un biosensor, se encuentra la construcción de la interfase biológica, la cual contempla la funcionalización del transductor, para el acople del bioreceptor por medio de procesos químicos y físicos (Barrientos, 2015). Sobre la superficie de oro de los cristales piezoeléctricos de cuarzo, suelen utilizarse las monocapas autoensambladas (SAM), las cuales son un conjunto de moléculas que se adsorben sobre la superficie del transductor formando estructuras semicristalinas, para la funcionalización del transductor, debido a que es contemplado como uno de los métodos más simples para

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

el acople del bioreceptor, entregando monocapas ordenadas, las cuales ayudan a mejorar la sensibilidad, rapidez y reproducibilidad del ensayo (Shen, Lu & Cai, 2011).

Al momento de funcionalizar el transductor, se encuentran diferentes variables como: temperatura, concentración del tiol, longitud de la cadena hidrocarbonada, tiempo de inmersión, concentración del bioreceptor, limpieza del sustrato, concentración de oxígeno y naturaleza de la superficie. Dichas variables, suelen afectar características del biosensor como su sensibilidad, reusabilidad y respuesta, las cuales tienen gran importancia para su aplicación clínica (Batalla, 2009). En la actualidad se cuenta con diferentes métodos para la caracterización de la superficie, tanto química como estructuralmente, las cuales permiten evaluar, entre otras variables, la topografía y la composición química de la muestra. De la variabilidad de los parámetros que afectan la formación de monocapas autoensambladas, además de la importancia de caracterizarlas es que surge el desafío de encontrar y evaluar los ambientes adecuados que permitan que la superficie sea lo suficientemente sensible y eficaz para permitir el enlace entre el biosensor y la molécula que se quiere detectar, especialmente por la poca documentación que se encuentra disponible de los genesensores piezoeléctricos.

Es entonces cuando surge la necesidad de caracterizar la superficie funcionalizada del genesensor piezoresistivo con diferentes métodos, en la búsqueda de la identificación de las variables que pueden ser optimizadas en el proceso de funcionalización del transductor.

1.2 OBJETIVOS DEL PROYECTO

1.2.1 Objetivo General

Evaluar mediante técnicas de caracterización topográfica o química la superficie del electrodo de oro de un cristal de cuarzo biofuncionalizado con sondas de ADN.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar técnicas de caracterización de superficies metálicas con el fin de aplicarlas en la caracterización del electrodo de oro de un cristal de cuarzo biofuncionalizado con sondas de ADN.
- Inmovilizar la sonda bioreceptora de ADN sobre la superficie del electrodo de oro de un cristal de cuarzo.
- Caracterizar la superficie biofuncionalizada con la sonda de interés por medio de técnicas de caracterización topográfica o química.

1.3 MARCO DE REFERENCIA

1.3.1 Biosensores

Una de las nuevas tecnologías que se puede usar para mejorar el diagnóstico de diferentes enfermedades o condiciones del ambiente, son los biosensores, los cuales son dispositivos analíticos que al incorporar un material biológico, la parte a estudiar, un transductor para cuantificar la señal y un lector de esta (Turner, n.d.), hacen más fácil la identificación y/o seguimiento de un factor de la enfermedad a estudiar, haciendo así más fácil su diagnóstico. Los biosensores, se componen de una interfase biológica, en la cual se inmovilizan los bioreceptores con el fin de capturar el analito, o biomarcador, constituyendo así el evento biológico y un sistema de transducción acoplado, el cual se encargará de transformar dicho evento biológico en una señal cuantificable (Shen, Lu & Cai, 2011). De acuerdo al sistema de detección de la señal, los biosensores se clasifican en: ópticos, nanomecánicos, potenciómetros de luz direccionada (LAPS por sus siglas en inglés), electroquímicos, termométricos y piezoeléctricos.

Esta tecnología está sujeta a diferentes variables, que son de gran importancia en su diseño porque afectan la respuesta del biosensor y, por ende, su desempeño en la aplicación que se desee (Mutharasan & Lee, 2005). Algunas de estas variables y las que se consideran más importantes para este proyecto son:

- **Sensibilidad:** Se define como el mínimo parámetro que debe ingresar al sistema para poder obtener una señal de salida (Joseph J. Carr, 2013). Es la razón entre los cambios de la muestra y los cambios en la lectura obtenida. Se considera de gran importancia porque el propósito de esta tecnología es la creación de sistemas robustos que permitan mediciones precisas, trabajando en muchas ocasiones con muestras pequeña, por lo tanto, entre más sensible sea el biosensor diseñado, mejor será su respuesta.
- **Especificidad:** Capacidad del biosensor para responder exclusivamente a la molécula de interés, esto debido a la propiedad de complementariedad entre el biomarcador de interés y el bioreceptor inmovilizado en la superficie, permitiendo así, que no haya una reacción con otras moléculas que se puedan encontrar en la muestra estudiada. Es una variable muy importante para el desarrollo de biosensores porque dependiendo de esta se puede concluir si el sistema si puede detectar únicamente la molécula de interés y no tener resultados erróneos por otras sustancias en la muestra.
- **Reproducibilidad:** Se determina como la capacidad de un sistema o protocolo de ser repetido en otro momento o por otras personas, bajo las mismas condiciones y obtener resultados similares. Dado que se requiere poder hacer muchas pruebas para tener resultados confiables, y uno de los objetivos a largo plazo en esta tecnología es crear pruebas que puedan ser realizadas en cualquier momento y lugar, es necesario que el sistema diseñado tenga esta capacidad para aumentar su aplicabilidad y confianza.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Los biosensores se pueden clasificar según su transductor y según su bioreceptor. Para la clasificación según el transductor, se necesita analizar que mecanismo se está utilizando para transformar el evento biológico en una señal que se pueda analizar. Este mecanismo puede ser electroquímico, el cual detecta una interacción entre un analito y un bioreceptor y la convierte en una señal eléctrica (Reviejo & Pingarrón, 2000). También existen sensores que utilizan mecanismos ópticos, los cuales tienen en cuenta los cambios en diferentes propiedades de la luz, como longitud de onda e intensidad, que se producen al interactuar con el analito de interés. También existen los biosensores nanomecánicos, termométricos, potenciométricos de luz direccionada (LAPS) y los biosensores piezoeléctricos que son los de interés en este trabajo. Los sensores piezoeléctricos se basan en el efecto que lleva su mismo nombre. Este efecto consiste en el cambio de la polarización eléctrica de ciertos materiales cuando son expuestos a tensiones mecánicas. Cuando el cambio se manifiesta como una diferencia de potencial en el material, se considera un efecto directo, pero este cambio puede ser reversible o ser inverso, es decir, los materiales pueden sufrir deformaciones cuando son expuestos a campos eléctricos, lo que conlleva a tensiones mecánicas (COMSOL, s.f.). Este último tipo de efecto piezoeléctrico, es el que se ha desarrollado en la línea de investigación de Biosensores de la Universidad EIA y con el cual se estará trabajando en este proyecto. El sistema utilizado consiste en un cristal de cuarzo recubierto en oro, que funciona como electrodo y se biofuncionaliza con la modificación de su superficie. El cuarzo se hace vibrar a cierta frecuencia conocida, y cuando un agente entra en contacto con el receptor de la superficie biofuncionalizada, se registra un cambio en la frecuencia proporcional a la masa de este agente. Los sensores piezoeléctricos se han usado en diferentes estudios con aplicaciones genómicas, es decir, como genosensores. Estos estudios han tenido excelentes conclusiones frente al uso de genosensores piezoeléctricos como alternativa a la metodología tradicional de genosensores electroquímicos, siendo los primeros muy específicos y sensibles. Además, como ventaja se observa la facilidad del método al no necesitar etiquetación o amplificación de las muestras de ADN (Magdalena Stobiecka, 2007) (Tombelli S, 2000).

Por otro lado, este tipo de tecnologías también se pueden clasificar de acuerdo al tipo de bioreceptor que se utilice en ellas. Existen dos categorías, sensores biocatalíticos y sensores de bioafinidad, los primeros utilizan un bioreceptor que cataliza un evento y los de bioafinidad se basan en la reacción producida por la interacción del bioreceptor con el analito de interés. Entre estos últimos se encuentran los genosensores, llamados así porque su receptor biológico es material genético. Es un tipo de biosensor que detecta la hibridación de cadenas complementarias de ADN (García, 2008).

1.3.2 Monocapas autoensambladas (SAM)

Una importante etapa de los biosensores es la modificación de sus superficies para mejorar su actividad de detección, por lo cual una de las metodologías más utilizadas y la cual se usará en este trabajo investigativo, son las monocapas autoensambladas. Como su nombre lo indica, se forman como conjuntos monomoleculares de forma independiente, formando estructuras cristalinas o semicristalinas. Para la unión con la superficie, hacen uso de mecanismos de adsorción a partir de una solución acuosa o gaseosa, siendo este

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

mecanismo el más utilizado por su facilidad y resultados óptimos (Barrientos, 2015) (Daza, 2006).

El tipo de monocapas más utilizado son los tioles que se dividen en tres partes fundamentales. El grupo cabeza que se adsorberá a la superficie por afinidad, el grupo esqueleto que proporciona fuerzas entre las cadenas hidrocarbonadas que lo conforman y un grupo cola que permite al sensor unirse a la molécula que se desea estudiar (Barrientos, 2015). En la Figura 1 se presenta un diagrama esquemático de una SAM, con todos sus grupos.

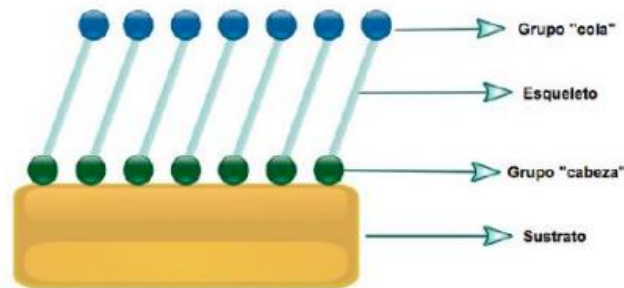


Figura 1. Diagrama esquemático de una SAM (Barrientos, 2015).

La propiedad que las hace tan usadas en este campo, es su capacidad de conectar la superficie del sensor con el medio externo y, por tanto, con la muestra a ser estudiada. Permiten una interacción más directa, rápida y específica, propiedades que son necesarias para crear sistemas robustos de biosensores.

1.3.3 Caracterización de monocapas autoensambladas

Como se ha hablado anteriormente, para que sea posible el desarrollo de un sistema de detección robusto, es necesario conocer las características de este para tener así la posibilidad de optimización e identificación de errores. Existen diferentes técnicas de caracterización que pueden ser utilizadas en superficies metálicas, como Microscopía de fuerza atómica (AFM), Microscopio electrónico de barrido (SEM), Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia RAMAN, Voltametría y sus diferentes tipos como Voltametría cíclica y Voltametría de pulso diferencial, Espectroscopia de Fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS), La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), Espectroscopia Electrónica Auger, Espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), Fluorescencia de Rayos X por energía dispersiva (EDXRF), entre otras.

A continuación, se describen algunas de estas técnicas de caracterización que se han utilizado en trabajos similares y, por ende, representan una base teórica para escoger la que será utilizada en este. Las demás, aunque interesantes, no se describen teniendo en cuenta diferentes variables como el tiempo disponible para realizar este trabajo, disponibilidad en el área, resultados esperados y daño en la muestra al utilizar la técnica.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

a) Microscopía de fuerza atómica o AFM

Esta técnica permite un análisis superficial de la muestra a estudiar, siendo bastante útil y versátil en su manejo para muestras a escala nanométrica. Hace parte de los microscopios de sonda de barrido, utilizados para medir propiedades locales mientras se escanea la muestra.

Basada en las interacciones de fuerza entre la sonda y la muestra, esta técnica de caracterización consta de una sonda en forma de pirámide, usualmente fabricada de Silicio (Si) o Nitruro de Silicio (Si_3N_4), unida al final de un cantiléver flexible fabricado del mismo material. A medida que la sonda recorre la muestra, un haz de laser es reflejado del extremo del cantiléver a un foto-detector sensible a la posición, que lee los pequeños cambios de altura o de fuerza en el cantiléver, producidos por las interacciones de fuerza entre este y la muestra. (nanoScience Instruments, s.f.). En la Figura 2 se presenta un diagrama esquemático de un Microscopio de Fuerza Atómica.

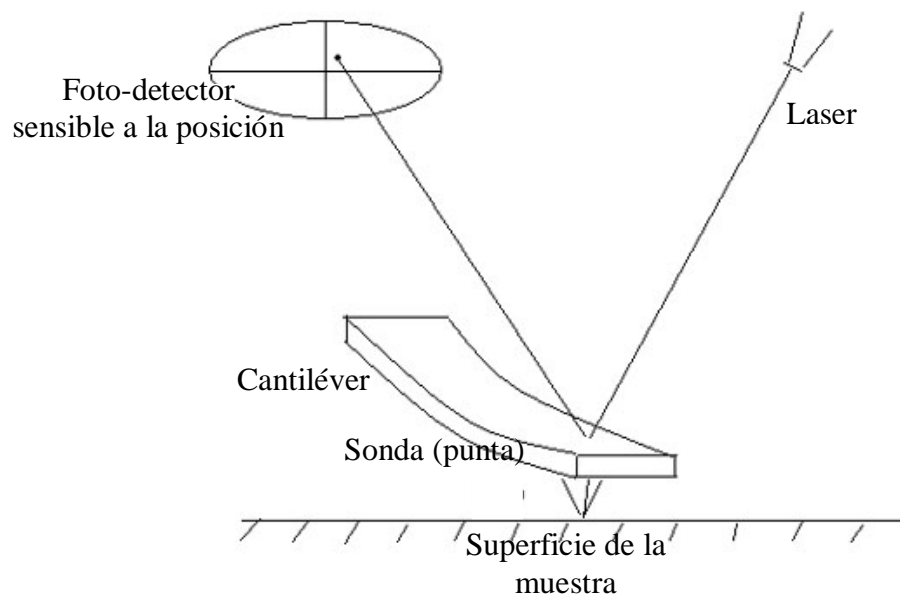


Figura 2. Diagrama esquemático de un Microscopio de Fuerza Atómica (Mai, s.f.)

Para entender cómo se mueve la sonda a medida que escanea la muestra, es necesario repasar el concepto de material piezoeléctrico. Estos materiales son transductores electromecánicos que convierten potencial eléctrico en movimiento mecánico o viceversa. Son de especial utilidad en AFM porque el coeficiente entre voltaje aplicado y expansión del material está típicamente en el orden de 0.1 nm por voltio aplicado, siendo un control muy preciso para pequeños movimientos, necesarios en esta aplicación. Además, el

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

sistema cuenta con un transductor de fuerza y un control de retroalimentación. El transductor mide la fuerza entre la sonda y la superficie de la muestra, aumentando el voltaje de su salida al entrar en contacto con algo en la superficie. Cuando esto pasa, el control de retroalimentación mueve el piezoeléctrico para alejarlo de la superficie y así mantener una fuerza estable, o lo acerca cuando se detecta una disminución en la muestra. En la Figura 3, se muestra este proceso. (Eaton & West, 2010)

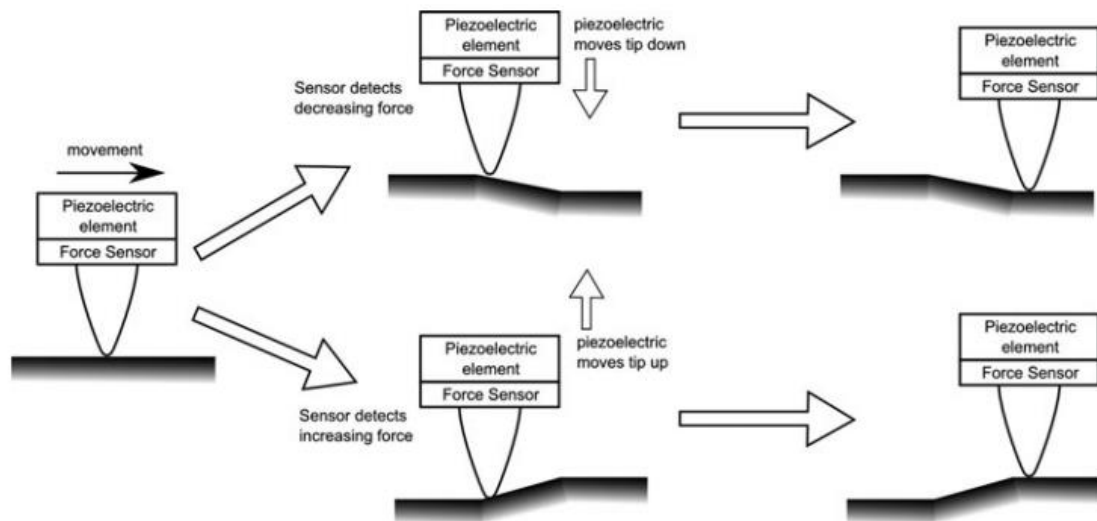


Figura 3. Diagrama esquemático del sistema elemento piezoeléctrico, transductor de fuerza y control de retroalimentación del AFM. (Eaton & West, 2010)

AFM cuenta con la gran ventaja de no necesitar tratamientos previos a las muestras que se deseen escanear, además, dependiendo de cómo este compuesto el microscopio, se pueden escanear muestras grandes o pequeñas. Para las muestras grandes es mejor utilizar un microscopio sonda-escaneo, en la cual la muestra permanece fijada y la sonda se mueve a través de ella. Mientras que, para muestras pequeñas, es mejor utilizar un microscopio muestra-escaneo, donde la sonda está fijada y la muestra se mueve. Esta técnica de caracterización se puede utilizar en medio vacío, gaseoso y líquido, siendo esta última la más común. (Eaton & West, 2010)

Existen diferentes tipos de AFM, pero los más usados son AFM de contacto, AFM de no contacto y AFM de pulso (tapping). En AFM de contacto, la punta de la sonda está siempre tocando la muestra. La punta tiene una fuerza repulsiva y a medida que va recorriendo la muestra, la curvatura o desviación del cantiléver es medida, comparada por medio del control de retroalimentación y si el valor medido no concuerda con el establecido, se aplica un voltaje al piezoeléctrico para subir o bajar la punta. Este voltaje es una medida de las alturas presentes en la muestra. Para detectar estas medidas, se cuenta con el foto-detector mencionado anteriormente, el cual cuenta con 4 segmentos A, B, C y D. La diferencia $(A+B) - (C+D)$ da como resultado la desviación vertical, mientras que la diferencia $(B+D) -$

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

(A+D), la desviación lateral. (Eaton & West, 2010) (Li, 1997). El esquema del foto-detector y su rol en el movimiento del cantilever, se muestra en la Figura 4.

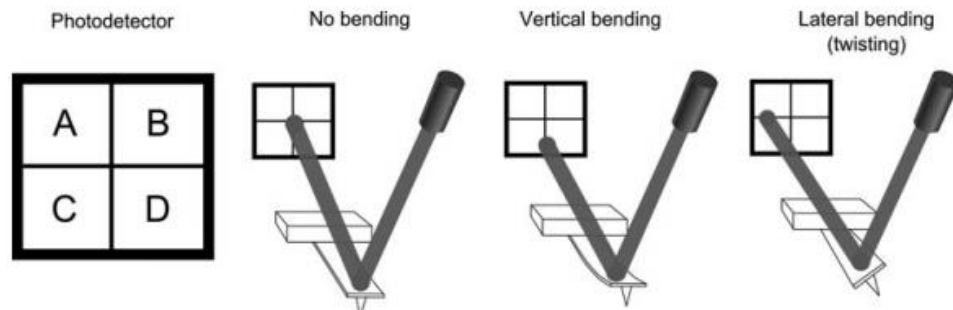


Figura 4. Diagrama esquemático de la detección de la desviación del cantiláver por medio del foto-detector. (Eaton & West, 2010)

Por otro lado, en la AFM de no contacto la sonda se mantiene a una distancia entre 50 y 150 Angstrom por encima de la superficie de la muestra. Las fuerzas de Van der Waals existentes entre la punta de la sonda y la muestra, son detectadas y a partir de ellas, se pueden construir imágenes de topografía.

Por último, AFM de pulso (tapping) permite la caracterización de muestras que se pueden dañar fácilmente con otros modos de AFM. Este modo funciona generando una señal de oscilación cercana a la frecuencia de resonancia del cantiláver y aplicándola a este. Mientras la sonda se acerca o se aleja de la superficie, los cambios en la frecuencia de oscilación producidos por las fuerzas de interacción entre la sonda y la muestra, son medidos y esta señal de salida es comparada con la señal de entrada y así conocer las características de la superficie, proceso ilustrado en la Figura 5. (Eaton & West, 2010) (Li, 1997).

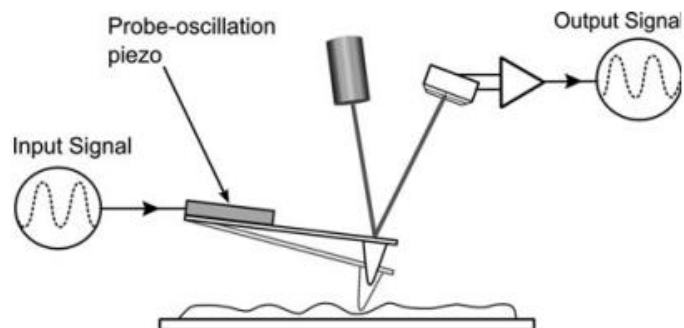


Figura 5. Diagrama esquemático del modo de pulso (tapping) de AFM. (Eaton & West, 2010)

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

De esta técnica de caracterización se pueden obtener diferentes resultados, uno de estos es la Curva de Fuerza, mostrada en la Figura 6. Esta gráfica se obtiene en el modo de contacto, monitoreando la desviación del cantiléver y es útil para determinar las interacciones punta-muestra. La información que se obtiene es un gráfico de distancia vs desviación, que luego es convertido a distancia vs fuerza. La fuerza aplicada a la superficie por la punta está dada por la ley de Hooke:

$$F = -k * D$$

Donde F es la fuerza en N, k es la constante de la sonda (N/m) y D la distancia (m). (Eaton & West, 2010)

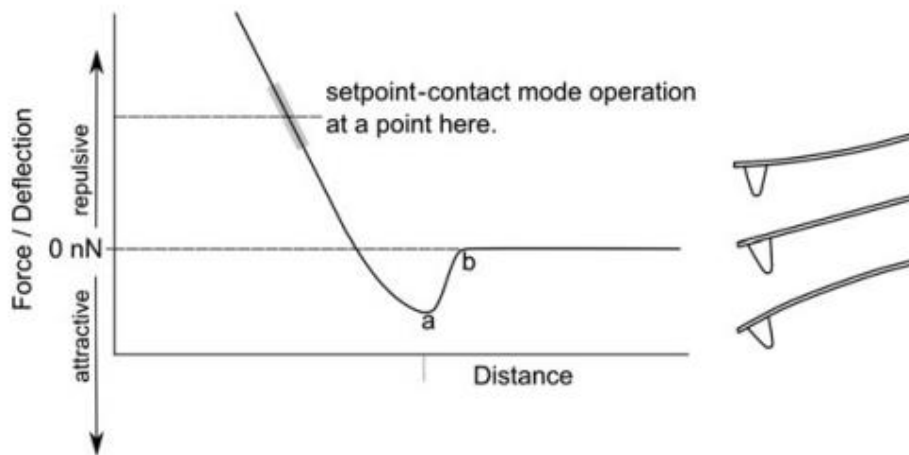


Figura 6. Curva de fuerza. (Eaton & West, 2010)

Otro de los resultados que se puede obtener de esta técnica, son las imágenes de altura. Estas imágenes se pueden obtener en los tres modos descritos anteriormente y se obtiene registrando los valores de la desviación del cantiléver y comparándolos con el valor establecido. El valor obtenido se representa como un matiz, entre más cercana este la región de la muestra (es decir más alto sea ese punto), más clara el color será en la imagen, mientras que entre más lejano este la región de la muestra, más oscuro el color será. (Eaton & West, 2010). En la Figura 7, se muestran diferentes ejemplos de imágenes de altura.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

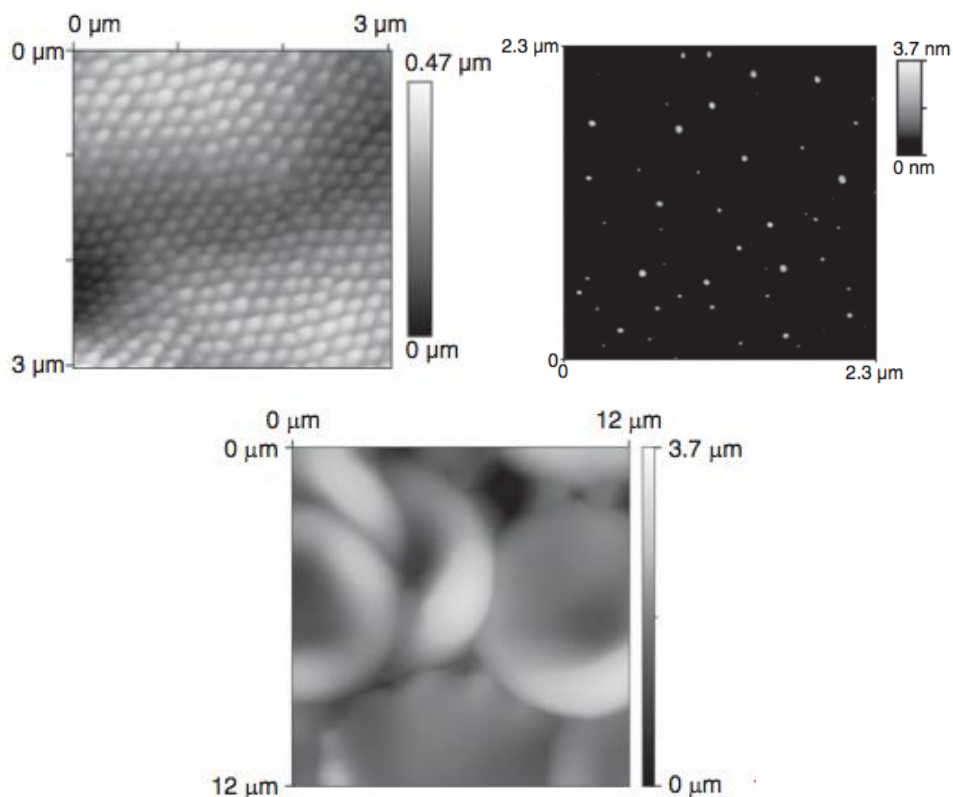


Figura 7. Imágenes de altura. Arriba izquierda: imagen obtenida de la superficie de un ojo de mosquito en AFM de contacto. Arriba derecha: imagen obtenida de nanopartículas de 1 nm en AFM de no contacto. Abajo: imagen obtenida de células rojas humanas en AFM de pulso (tapping). (Eaton & West, 2010)

Por último, es importante mencionar otro tipo de imágenes que se pueden obtener con AFM de pulso (tapping) llamadas imagen de fase. En este modo se puede registrar la fase de la oscilación del cantiléver y compararla con la fase de la oscilación establecida, permitiendo así conocer características más allá de la topografía, como variaciones en la composición, fricción, visco elasticidad, entre otras, dado que estas características influyen mucho en el retardo de la fase que se pueda presentar. Como la fase es una medida de la disipación de la energía en el contacto de la sonda con la muestra, que depende de muchos factores como las características mencionadas anteriormente y también área de contacto, dependiente de la altura de la región, este tipo de imágenes son muy similares a las topográficas. En la Figura 8, se muestra una comparación entre una imagen de altura y una d fase de la misma muestra. (Eaton & West, 2010) (Li, 1997)

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

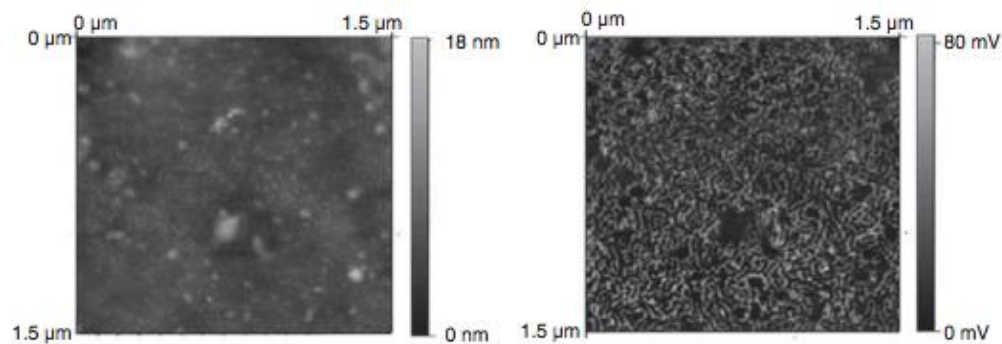


Figura 8. Izquierda: imagen de altura de un copolímero tribloque. Derecha: imagen de fase de un copolímero tribloque. (Eaton & West, 2010)

Esta metodología ha sido utilizada en muchos estudios. Lv, Z., Wang, J., Chen, G. & Deng, L., utilizaron AFM en su estudio para medir la fuerza de interacción entre Inmunoglobulina G (IgG) humana y IgG anti-humana de rata, muestra que fue preparada con monocapas autoensambladas. Describen como AFM ha surgido recientemente como una alternativa para medir interacciones de interés en muestras biológicas. Mencionan como ventajas que la mayoría de las interacciones de fuerza en muestras biológicas se encuentran en el rango de medición de esta técnica, las lecturas se pueden llevar a cabo en condiciones muy cercanas a las biológicas manteniendo la resolución y, además, con una sonda específica se pueden medir interacciones en muestras de área grande. Por otra parte, puntualizan en la buena combinación que representa esta técnica con las SAM, dado que uno de los retos que presenta AFM es la preparación de la muestra y el revestimiento de las partículas en la superficie del sustrato, para lo cual las SAM, uniéndose químicamente este conjunto, son una muy buena alternativa. Se utilizó el modo de contacto con PBS como medio, obteniendo curvas de fuerzas en repetidas ocasiones. Los resultados les permitieron concluir que cuando la metodología de las monocapas autoensambladas es utilizada de manera adecuada para preparar superficies de muestra, la técnica de caracterización AFM es suficientemente simple, sensible y confiable para medir interacciones de fuerza en muestras biológicas. En la investigación de Torun, B., Ozkaya, B. & Grundmeier, G., AFM es utilizado para demostrar la heterogeneidad de superficies de Aluminio y diferentes aleaciones, que usualmente son recubiertas con polímeros para proporcionar estabilidad en aplicaciones automotrices y espaciales. Se utilizan SAM para facilitar el proceso de tratamiento de estas superficies. Emplearon tanto el modo de contacto como el modo de pulso (tapping) con condiciones ambientales y electrolitos líquidos y se obtuvieron imágenes de topografía, fricción y fase, que les permitieron conocer mejor las características de las superficies de interés. Con estos estudios y muchos otros que se han llevado a cabo, se puede concluir que la técnica de caracterización AFM, es una buena opción para esta investigación, dado que proporciona datos de gran interés como la topografía y propiedades mecánicas que pueden influir en la estructura de las SAM y por ende en el desempeño del biosensor. Como se ha mencionado anteriormente, conocer las propiedades y estado de la superficie funcionalizada, como las fuerzas existentes y su heterogeneidad, permiten identificar valores de importancia y dar paso a optimizaciones que entreguen sistemas más precisos, rápidos y sensibles. (Boray Torun, 2012) (Zhengjian Lv, 2010).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

b) Microscopio electrónico de barrido o SEM

Técnica de caracterización que implementa electrones en lugar de luz para formar imágenes. Por medio de una pistola de electrones, un haz de electrones de alta energía es producido en la parte superior del microscopio. El camino hacia la muestra, contenido en vacío para permitir el paso libre de los electrones, comprende campos electromagnéticos y lentes que enfocan el haz hacia la muestra. Cuando el haz impacta la muestra, esta libera rayos X, electrones retrodispersados y electrones secundarios, que son detectados y convertidos en una señal que es enviada a una pantalla y así la imagen final es producida. En la Figura 9, se muestra un diagrama esquemático de este tipo de microscopios. (Purdue University, s.f.)

Esta técnica representa ventajas sobre tecnologías de microscopía tradicionales porque posee una alta resolución, gran profundidad de campo, lo que significa que más de un objeto puede ser enfocado al mismo tiempo, además de que se posee un mejor control sobre el grado de magnificación. Con las señales que se obtienen, es posible conocer información sobre la morfología de la muestra, composición química y la estructura cristalina y orientación de materiales. (Purdue University, s.f.) (Swapp, s.f.)

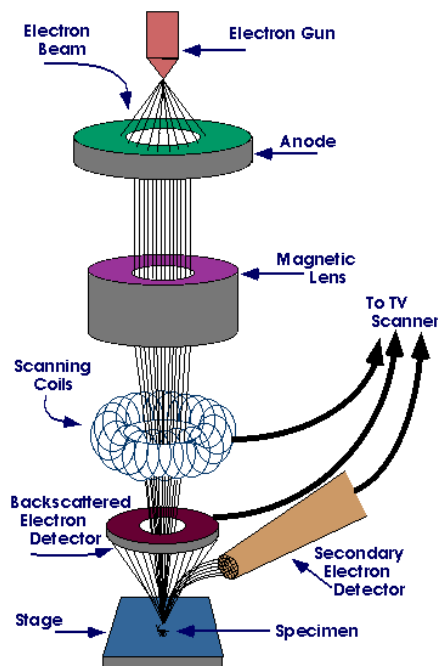


Figura 9. Diagrama esquemático de un microscopio electrónico de barrido o SEM. (Purdue University, s.f.)

El haz de electrones es emitido utilizando una fuente térmica, como un filamento de tungsteno o por un cátodo de emisión de campo. Mediante una serie de lentes electromagnéticas, el haz es enfocado en la columna del SEM. Al final de esta columna, se

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

encuentran las bobinas de escaneo que direccionan y posicionan el haz en la superficie de la muestra. Este haz recorre la muestra en patrón de trama, es decir, se hace un barrido de izquierda a derecha por líneas, donde cada posición es detectada por un detector de electrones. La intensidad de esta señal emitida, se ve como brillo en la imagen. (Materials Evaluation and Engineering, INC. , s.f.)

Los electrones incididos poseen cantidades significativas de energía cinética, la cual es disipada en una amplia variedad de señales, por eventos de propagación elástica o inelástica:

- **Electrones Auger:** Cuando una muestra es incidida por una radiación de alta energía, electrones de niveles inferiores pueden ser desprendidos. A esta vacancia cae un electrón de un mayor nivel de energía. La energía que se libera después de este proceso, puede causar la eyección de otro electrón. Las energías de estos electrones son características del material de la muestra. (Atkins De Paula, 2007)
- **Electrones secundarios:** Electrones de baja energía, resultantes de dispersión inelástica (la energía cinética no es conservada) y formados por colisiones con el núcleo donde se pierde mucha energía o electrones con enlaces débiles son eyectados. (Materials Evaluation and Engineering, INC. , s.f.)
- **Electrones retrodispersados:** Electrones de alta energía, resultantes de una colisión elástica entre el electrón incidente y el núcleo del átomo de la muestra. Son electrones emitidos desde la muestra que no pierden energía dentro de esta. (Materials Evaluation and Engineering, INC. , s.f.)
- **Rayos X característicos:** Como se mencionó anteriormente, cuando un electrón de un nivel alto de energía, ocupa la vacancia dejada por un electrón de menor nivel, se libera energía. Esta puede ser en forma de rayos X característicos al elemento presente en la muestra. (Atkins De Paula, 2007)

También se producen Rayos X fluorescentes y continuos. En la Figura 10, se muestra un diagrama de las diferentes señales obtenidas en la lectura de una muestra por medio de Microscopio electrónico de barrido.

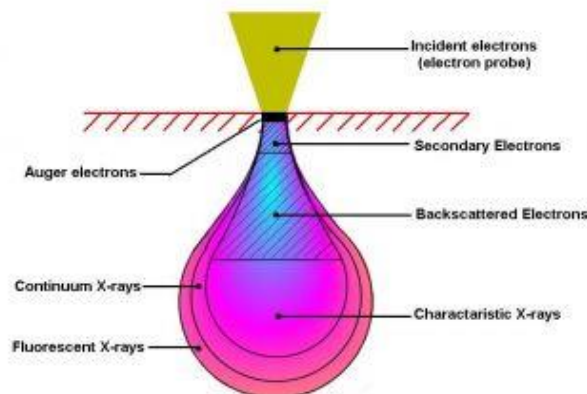


Figura 10. Diagrama esquemático las interacciones haz-muestra. (Materials Evaluation and Engineering, INC. , s.f.)

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Existen dos tipos de detectores de electrones que son usados típicamente en SEM.

1. Detector de electrones secundarios: El más utilizado se llama Everhart-Thornley que consiste de una jaula Faraday, la cual acelera los electrones hacia un centelleador, que está cargado positivamente para atraerlos, produciendo así una nube de fotones que se dirige a un fotomultiplicador, donde la señal es amplificada y enviada a un fotodiodo. Allí se genera una señal eléctrica que se puede medir por medio de un pico amperímetro, generando la imagen. En la Figura 11, se muestra un diagrama de un detector Everhart-Thornley. (nanoScience Instruments, s.f.) (Scharf, 1998)

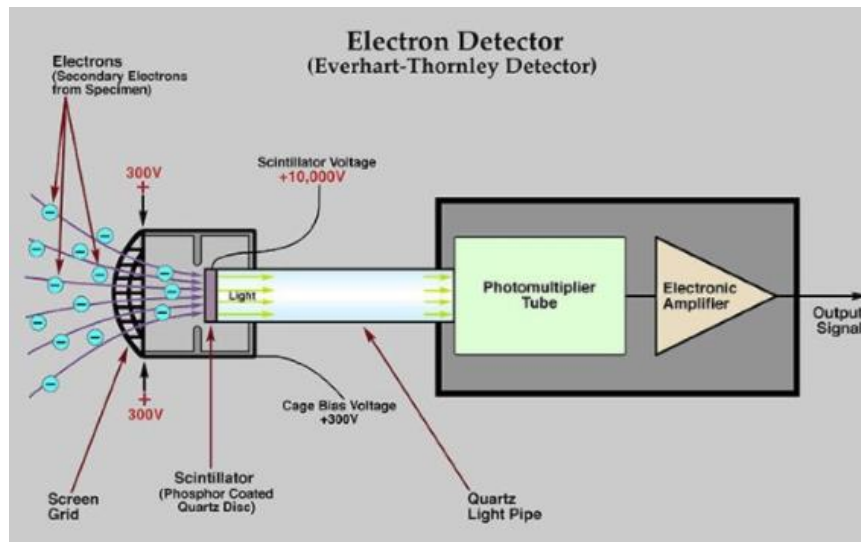


Ilustración 11. Diagrama esquemático de un detector Everhart-Thornley (Scharf, 1998)

El tipo de imágenes producidas con este detector son de alta resolución de la topografía y morfología de la superficie de la muestra, en la Figura 12 se muestra un ejemplo de este tipo de imágenes. Son específicas para cada muestra, porque dependiendo de la topografía de esta en un área en específico, varía el número de electrones que alcanzan el detector. Estos cambios locales crean un contraste en la imagen que revela sus características. (nanoScience Instruments, s.f.)

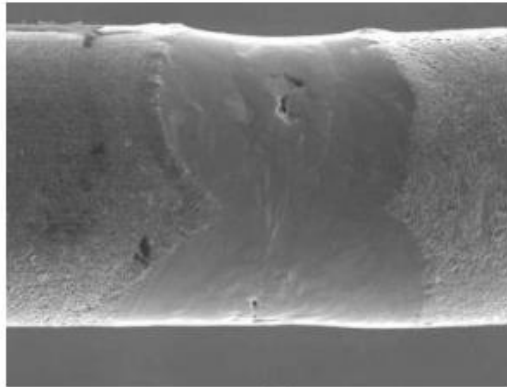


Figura 12. Imagen de un alambre soldado a laser proveniente de un detector de electrones secundarios. (nanoScience Instruments, s.f.)

Para este tipo de imágenes es necesario que las muestras sean conductoras eléctricas. Si el material de la superficie no es conductor, pueden ser cubiertas por medio de evaporación con una capa fina de carbón, oro u otro material conductor que no afecte demasiado la topografía de la superficie. (nanoScience Instruments, s.f.)

2. Detector de electrones retrodispersados: Proporciona información sobre la composición de la muestra dado que los átomos con mayor número atómico, retrodispersan más eficientemente. Estos detectores pueden ser centelladores o semiconductores.

El tipo de imágenes producidas tienen su contraste como función de la composición de la muestra, es decir un número atómico más alto representa una parte de la imagen más brillante, mientras que un número atómico más pequeño, se verá más oscuro. En la Figura 13, se muestra un ejemplo de este tipo de imágenes. (nanoScience Instruments, s.f.)

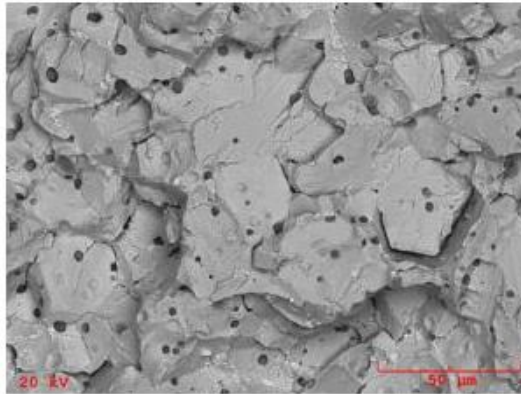


Figura 13. Imagen de una superficie de fractura de metal en polvo con partículas esféricas de sílice, proveniente de un detector de electrones retrodispersados. (nanoScience Instruments, s.f.)

Este tipo de análisis se puede realizar en superficies conductoras y no conductoras. (nanoScience Instruments, s.f.).

Diferentes estudios han utilizado esta técnica de caracterización, como Pandey, C., Singh, R., Sumana, G., Pandey, M.K. & Malhotra, B.D. (2011), quienes desarrollaron un biosensor electroquímico basado en la funcionalización de DNA con monocapas autoensambladas de 1-fluoro-2-nitro-4-azidobenceno (FNAB) modificado con octadecanotiol (ODT), sobre un cristal recubierto de oro. El proceso de funcionalización se realizó por etapas, primero con una modificación de ODT al electrodo con recubrimiento de oro, luego agregando FNAB y por último, inmovilizando DNA. Se caracterizaron los electrodos en las diferentes etapas: ODT/Au, FNAB/ODT/Au y DNA/FNAB/ODT/Au con SEM y espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), mientras que el análisis electroquímico se realizó con un potenciostato/galvanostato. En las gráficas obtenidas de la caracterización con SEM, se puede apreciar que la superficie del electrodo con FNAB/ODT/Au presenta un aumento de rugosidad y porosidad en comparación con la superficie del electrodo con ODT/Au. Además, se observa para el electrodo con ADN/FNAB/ODT/Au, una inmovilización de la sonda de DNA con mayor cobertura en la superficie. Dentro de las conclusiones dadas por los investigadores, el biosensor fabricado presentó un incremento en el área de superficie de inmovilización de las sondas de DNA, respecto a otros biosensores desarrollados anteriormente, aumentando así la eficiencia, el límite de detección y disminuyendo el tiempo. Esto demuestra que pudieron utilizar la técnica SEM como un medio confiable para determinar características del sistema desarrollado y poder comparar su eficiencia con otros existentes, permitiendo así una posible optimización de procesos en los que se usen estos tipos de sensores. Por otro lado, los investigadores Yang, H., Zhou, H., Gong, Q., & Nie, K. (2016), desarrollaron un biosensor impedimétrico altamente sensible a base de lectina, para la determinación de *E. coli* a partir de monocapas autoensambladas, con el fin de determinar la sensibilidad y rapidez del dispositivo y así implementar el diseño en la detección de otras bacterias. En el estudio se utilizaron técnicas de caracterización como la espectroscopia electroquímica de impedancia para determinar la señal de la resistencia del electrón transferido (Ret). Para la visualización

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

de la bacteria capturada con la interfase se utilizó SEM, técnica que demostró los buenos resultados que se obtuvieron, debido a que se observaron las células de E. coli distribuidas sobre la superficie, evidenciando que fueron capturadas de manera eficiente. Los resultados arrojaron además, que el sensor desarrollado presenta alta sensibilidad, características que pudieron ser identificadas en parte gracias al uso de SEM, tecnología de alta resolución que brinda información importante y de interés en estudios como el presente. (Pandey, C., Singh, R., Sumana, G., Pandey, M.K. & Malhotra, B.D., 2011) (Yang, H., Zhou, H., Gong, Q., & Nie, K., 2016).

c) Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier

Técnica de caracterización que hace parte de las espectroscopias, las cuales se basan en las interacciones entre la radiación y la materia, más específicamente, en la absorción de la radiación por parte de esta última. Este tipo de técnicas se fundamentan en las características únicas vibratorias de los diferentes componentes que puede tener una muestra. Esto quiere decir que cuando un haz de luz, en este caso de la región infrarroja, incide sobre una molécula y tiene la energía suficiente para producir una vibración, esta se dará de una manera determinada y única para esa molécula. Este proceso se ilustra en la por medio de un diagrama esquemático de un FTIR, en la Figura 14. (Física UNAM, s.f.) (Barrientos, 2015) (Ortiz, 2016).

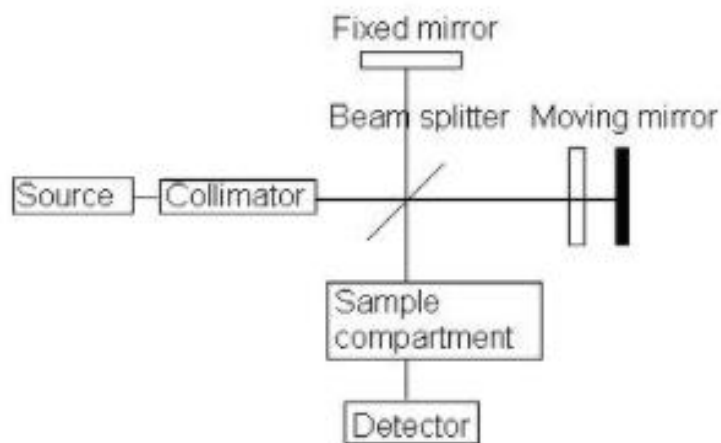


Figura 14. Diagrama esquemático de un FTIR. (Nancy Birkner, s.f.)

Es una tecnología ampliamente utilizada dado que posee muchas ventajas, entre ellas están su precisión, rapidez, capacidad para analizar muestras de todo tipo, gas, líquido y sólido, además de alta resolución.

Un espectrómetro FTIR está compuesto de una fuente que genera una radiación, esta pasa por un interferómetro, es incidida en la muestra y, por último, detectada. La señal pasa por un proceso de amplificación y conversión a señal digital para ser llevada al computador del sistema, donde se produce la transformada de Fourier. El interferómetro típico de estos

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

sistemas, se llama interferómetro Michelson, el cual es usado para dividir el haz de luz utilizado en dos partes, las cuales se reflejan en un espejo fijado y en un espejo móvil, para luego volver al divisor de haz y recombinarse. Dado que uno de los espejos se mueve, el haz de luz reflejado en este sufrirá un cambio de fase, por lo tanto, cuando ocurra la recombinación entre los dos haces de luz, estos interfieren entre sí. Cuando se produce interferencia constructiva, quiere decir que el espejo móvil se está alejando del fijado y se puede observar una máxima intensidad de la señal. Por el contrario, cuando se produce interferencia destructiva, el espejo móvil se puede encontrar más cerca del fijado y la intensidad de la señal es menor. La señal entonces varía con el movimiento del espejo, el cual es proporcional al tiempo, obteniéndose así una gráfica Tiempo vs Intensidad. Esta grafica es llamada un Interferograma, el cual es la suma de todas las señales interfiriendo con cada movimiento del espejo. (Bradley, s.f.) (Nancy Birkner, s.f.)

Siendo el Interferograma una función de tiempo, por medio de un software de análisis es posible realizarle una Transformada de Fourier y convertirlo en un espectro, grafica que representa los números de onda vs el porcentaje de radiación que atraviesa la muestra, es decir la intensidad de la señal detectada.

En la Figura 15 se puede observar el Interferograma del dispositivo de FTIR sin una muestra, llamado fondo o background, y su respectiva transformada de Fourier, llamado haz simple. Además, en la Figura 16, se puede observar un Interferograma de una muestra y su transformada de Fourier. La diferencia entre las gráficas se basa en que las bandas que se pueden ver en la transformada de Fourier de la muestra, se deben a que esos números de onda están ausentes porque la muestra los absorbió. Luego, el mismo software del equipo, genera una proporción de los dos, permitiendo observar la gráfica de la manera convencional.

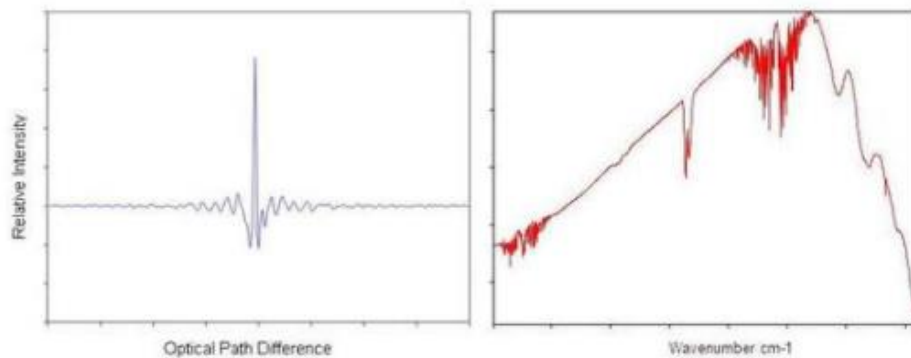


Figura 15. Izquierda: Interferograma de una luz monocromática. Derecha: Espectro de la imagen a la izquierda. (Nancy Birkner, s.f.)

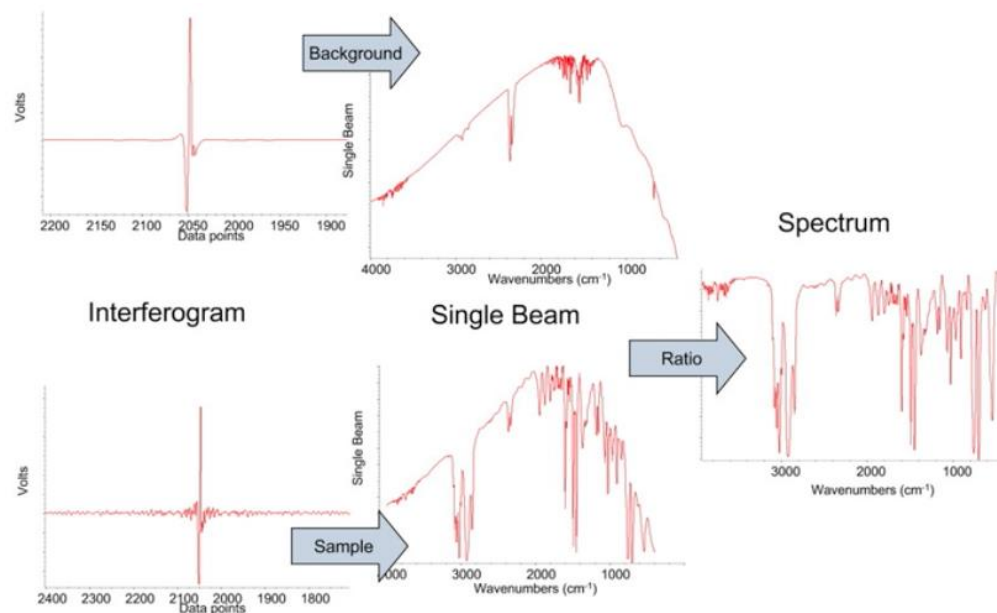


Figura 16. Formación del espectro. Arriba: Interferograma del dispositivo de FTIR y su transformada de Fourier. Abajo: Interferograma de la muestra y su transformada de Fourier. Derecha: Espectro, proporción de las gráficas anteriores. (Bradley, s.f.)

Como se mencionó anteriormente, en muchas investigaciones se ha utilizado FTIR como una técnica de caracterización confiable para conocer propiedades de las muestras de interés. Pandey, C., Singh, R., Sumana, G., Pandey, M.K. & Malhotra, B.D. (2011), utilizaron FTIR para caracterizar los electrodos desarrollados en sus diferentes etapas, ODT/Au, FNAB/ODT/Au y DNA/FNAB/ODT/Au. Debido a la teoría fundamental de esta técnica de caracterización, a partir de la gráfica obtenida se pudo concluir que la sonda de DNA fue inmovilizada en el electrodo que contenía DNA/FNAB/ODT/Au correctamente, debido a las bandas de absorción y las bandas que se pueden apreciar en esta son únicas para esto. FTIR también ha sido usado en conjunto con otras tecnologías, demostrando que proporciona información complementaria de valor que permite conocer propiedades fundamentales de las muestras de interés. El equipo de Li, Y. *et Al.* (2016), realizó un estudio de la superficie de un electrodo de carbón vítreo en el cual fueron inmovilizados puntos cuánticos de grafeno por medio de monocapas autoensambladas para detección de dopamina. La superficie fue caracterizada con FTIR, TEM y AFM, y sus propiedades electroquímicas fueron obtenidas con espectroscopia electroquímica de impedancia (EIS), voltamperometría cíclica y voltamperometría de pulso diferencial. En el estudio se demostró gracias a las diferentes técnicas de caracterización que el electrodo presentó una buena conductividad eléctrica, y una respuesta electroquímica favorable a la dopamina. Por último, vale la pena destacar que en la línea de investigación de Tecnologías para la obtención y detección de biomarcadores del grupo de investigación en Ingeniería Biomédica de la Universidad EIA y la Universidad CES (GIBEC) se han desarrollado biosensores piezoeléctricos desde el 2007. En muchas de las investigaciones llevadas a cabo, se ha utilizado FTIR como técnica de caracterización principal. Por ejemplo, en el año 2016 con el trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Biomédico de Camilo Ortiz Monsalve,

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

se realizó en la línea de investigación la inmovilización de sondas de ADN de cadena sencilla para un genosensor piezoeléctrico, en el cual, se evaluó el proceso de inmovilización de las biomoléculas sobre la superficie de oro de los cristales de cuarzo de 10 MHz, mediante FTIR. Los resultados de este ensayo permitieron determinar que el proceso de inmovilización se llevó a cabo correctamente, conclusiones importantes que permitieron a la línea de investigación realizar avances y recomendaciones para proyectos futuros. (Li, Y. et Al., 2016) (Ortiz, 2016) (Pandey, C., Singh, R., Sumana, G., Pandey, M.K. & Malhotra, B.D., 2011).

d) Espectroscopia Raman

Tipo de espectroscopia que provee información acerca de las vibraciones moleculares de una muestra. Consiste en incidir un haz de luz monocromático sobre una muestra y detectar la luz propagada. La mayoría de esta luz propagada es de la misma frecuencia que la de la fuente, esto es llamado propagación elástica o Rayleigh. Una pequeña parte de la luz propagada, sufre cambios en su frecuencia por las interacciones entre las ondas electromagnéticas que inciden y los niveles de energía vibratorios de las moléculas de la muestra, siendo esta propagación inelástica. Hacer el gráfico de la intensidad de esta luz cambiada vs los resultados de frecuencia, significa obtener el espectro Raman de la muestra. Las bandas de este espectro estarán en frecuencias que serán coincidentes con los niveles de energía de diferentes grupos vibratorios. Así, es posible interpretar este espectro como se hace con el espectro infrarrojo. Cuando la frecuencia de la radiación propagada es menor a la de la radiación incidente, aparecen líneas Stokes en el espectro. Cuando es mayor, aparecen líneas anti-Stokes. (InPhotonics, s.f.)

La espectroscopia Raman puede ser usada tanto para análisis cuantitativos como para análisis cualitativos. Para cuantitativos, se mide la intensidad de las radiaciones propagadas, mientras que, para cualitativos, la frecuencia de las radiaciones propagadas. (Gurvinder Singh Bumbrah, 2016)

e) Voltametría cíclica

La voltametría hace parte de las caracterizaciones electroquímicas, esta técnica arroja un conjunto amplio de información cualitativa sobre el comportamiento redox de la muestra de interés y su concentración, así como de las reacciones químicas en esta y sus parámetros termodinámicos, en general, provee información de los procesos de transferencia de electrones. En esta técnica se utiliza una perturbación de potencial variante en el tiempo, dando así una respuesta llamada voltagrama, voltamograma o voltamperograma que es el registro de la corriente obtenida en función del potencial aplicado, este proceso se realiza en una celda electroquímica con una solución sin agitar (Vasquez, 2016).

La voltametría cíclica es el tipo más diverso utilizado, tiene muy buena sensibilidad y selectividad para técnicas electroquímicas. En esta caracterización existe una oxidación que sucede por un voltaje particular, siendo este último dependiente de las propiedades de los analitos que se están analizando. Cuando se realiza una oxidación, se observa una corriente por la pérdida de un electrón que se muestra como un pico de oxidación, siendo

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

esta corriente proporcional a la concentración. Después de ser oxidado, el potencial se revierte observándose así un pico de reducción. (Vasquez, 2016)

Para esta técnica se utiliza un equipo compuesto de la celda de trabajo que contiene tres electrodos:

- Uno de trabajo: usualmente construido de platino, oro o carbón vitrificado, que son materiales inertes. Aquí se llevan a cabo las reacciones de interés.
- Uno de referencia: usualmente son de calomel saturado (SCE) o de Ag/AgCl. Este electrodo tiene un potencial conocido.
- Un contraelectrodo: usualmente es de platino o algún otro material inerte.

Se utilizan los tres para garantizar que las caídas óhmicas en la solución, no generen errores. Además, la celda posee cinco orificios, tres para los electrodos, uno para la introducción de gas inerte (opcional) y uno para introducir el electrolito y la muestra de interés. Este electrolito es de gran importancia porque evita corrientes de migración por las partículas cargadas que se puedan mover, además asegura la conductividad. Los más usados son sales de tetraalquilamonios, soluciones tampón a partir de un ácido débil y su base conjugada para tener un pH fijo.

El potencial del electrodo de trabajo se mide teniendo como referencia al electrodo referencia, mientras que la corriente fluye entre este primero y el contraelectrodo.

Mediante un potencióstato se controla el potencial aplicado (al electrodo de trabajo) y se mide la corriente de salida. Este instrumento se conecta a los terminales de los electrodos y aplica un potencial en forma de rampa lineal gradualmente, luego la invierte. En la Figura 17, se muestra la forma característica de esta señal. (Flores, 1995)

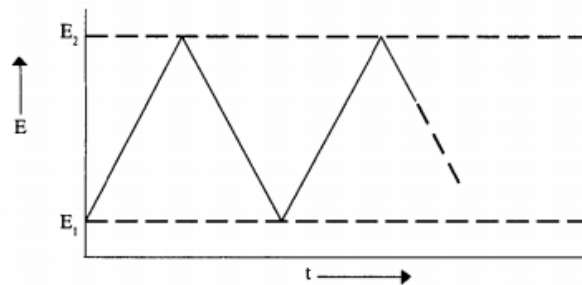


Figura 17. Forma de la señal característica en voltametría. (Flores, 1995)

Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos por esta técnica se muestran en una gráfica llamada voltamograma que muestra la variación de la corriente versus el potencial. En la Figura 19 se puede observar la parte inicial de la curva, siendo esta una onda catódica que crece a medida que la corriente lo hace, con un pico máximo llamado E_p^{RED} o potencial de pico catódico. A partir de este punto máximo, la corriente disminuye, pero el potencial sigue creciendo, dado que la especie electroactiva disminuye cerca al electrodo. En la Figura 18, también se puede observar el potencial máximo alcanzado o t_1 , donde la corriente catódica ha llegado a un valor muy bajo. Después de este punto, el potencial se invierte y la corriente catódica sigue circulando, con el potencial lo

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

suficientemente negativo para que la sustancia continúe reduciéndose. La sustancia que se estaba reduciendo cerca de la superficie del electrodo, empieza a oxidarse cuando el potencial es menos negativo. Esta onda llega a su punto máximo, E_p^{OX} o potencial de pico anódico, observándose una onda anódica, la cual vuelve al valor original a medida que la sustancia reducida se consume. (Flores, 1995)

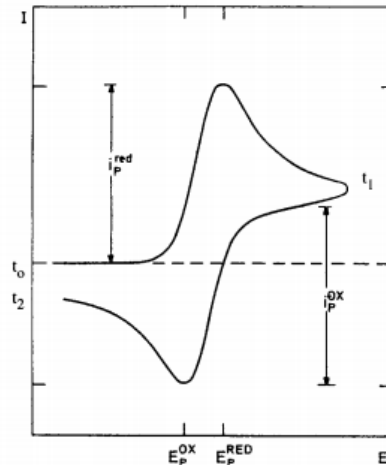


Figura 18. Voltamograma cíclico. (Flores, 1995)

Canepa *et. Al* (2013) utilizaron esta técnica para complementar la información arrojada por la elipsometría espectroscópica, la cual provee información sobre las propiedades ópticas y el grosor de las SAM utilizadas en su estudio. Para la caracterización química utilizaron voltametría cíclica, llegando a la conclusión de que las SAM de cadena corta estudiadas tienen una densidad de empaquetamiento baja comparada a las SAM de cadena larga. Kun Chen y Michael Schmittel, utilizaron voltametría cíclica para la caracterización de SAM formadas en superficies de oro, como medio de detección y cuantificación de heparina. Los resultados obtenidos por medio de esta técnica, permitieron encontrar información importante sobre el comportamiento de las reacciones químicas presentes en las SAM utilizadas, lo cual hizo posible su modificación. Además, como se mencionó anteriormente, esta técnica también ha sido utilizada para complementar la información obtenida de técnicas como la espectroscopia electroquímica de impedancia (EIS). Esta técnica no ha sido utilizada en el grupo de investigación en Ingeniería Biomédica de la Universidad EIA y es conocida por proveer datos complicados de analizar (Frank Marken, 2005).

2. METODOLOGÍA

2.1 MATERIALES Y EQUIPOS

2.1.1 Identificación de técnicas de caracterización de superficies metálicas.

Se utilizaron las diferentes bases de datos disponibles para estudiantes de la Universidad EIA y Universidad CES. Para el funcionamiento de las diferentes metodologías, se realizó una consulta de diferentes sitios web, libros y artículos que explicaran el principio físico y/o químico de cada una de las metodologías, así como información sobre su desarrollo y resultados.

2.1.2 Inmovilización de ADN sobre electrodos de oro

a) Conjugación química del ADN

La secuencia de ssADN que fue utilizada en este proyecto fue la siguiente:

5'-TTTTTTTTTTTTTTTAAATGTGTGCAATATTAATTACAAGTGTG-3'

Esta secuencia fue suministrada por *Invitrogen* y purificada por *HPLC*.

Se utilizó EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) almacenado a -20°C y NHS (N-hidroxisuccinimida) almacenado a 4°C, estos fueron suministrados por *Thermo Scientific*. También se utilizó etilendiamina y etanol que fueron almacenados a temperatura ambiente y suministrados por *Panreac*, ácido acético y acetato de sodio que fueron suministrados por Merck, además el agua utilizada fue agua MilliQ purificada por el equipo *Synergy UV* de la marca *Millipore*.

Durante este proceso se utilizó también una centrifuga con control de temperatura y un baño maría para la evaporación del etanol, ambos equipos se utilizaron en el Laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad CES. Para la medición de las concentraciones obtenidas de ADN se utilizó el equipo *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* de la marca *Thermo Scientific*, encontrado también en este laboratorio.

b) Etapas de inmovilización

Se utilizaron alcanotioles 11-mercaptop-1-undecanol ($\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{OH}$) y ácido-16-mercaptophexadecanoico ($\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{COOH}$) almacenados a 4°C y suministrados por *Sigma-Aldrich*. Para las soluciones de lavado se utilizaron peróxido de hidrogeno y ácido sulfúrico para la solución piraña, almacenados a temperatura ambiente y suministrados por *Panreac*, hidróxido de potasio almacenado a temperatura ambiente y suministrado por *ProtoKimica* y agua MilliQ. En el proceso de lavado también se utilizó el equipo *UV/Ozone ProCleaner Plus* de la marca *Bioforce*.

Para el proceso de activación, se utilizó N-Hydroxysuccinimida o NHS, suministrado por MSDS y almacenada a 4°C, además de N-(3Dimetilaminopropil)- N'etilcarbodiimida, clorhidrato o EDC, suministrado por Fluka y almacenado a -20°C.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

QuartzPRO suministró los cristales de cuarzo con frecuencia fundamental de 10 MHz, con un diámetro total de 14 mm, electrodo de Cr/Au y diámetro de 5.1 mm. (QuartzPRO, s.f.)

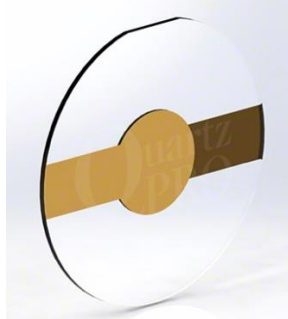


Figura 19. Cristal de cuarzo de 10 MHz (QuartzPRO, s.f.)

Para la inmovilización sobre los cristales, se utilizó una celda especial que permite la inmovilización de únicamente una de las caras del cristal, suministrada por AWSensors.

2.1.3 Caracterización de superficies inmovilizadas sobre electrodos de oro

La caracterización y curva de calibración por espectrometría infrarroja se realizaron por medio de un espectrofotómetro infrarrojo *Spectrum 100* de la marca *PerkinElmer*, que cuenta con un accesorio Attenuated Total Reflectance (ATR). Este equipo es capaz de trabajar en un rango de onda entre 7800 y 370 cm^{-1} , resolución máxima de 0.5 cm^{-1} y se maneja por medio del software *Spectrum*. Para los análisis cuantitativos se utilizó también el software *SpectrumQuant*.

2.2 PROCEDIMIENTO

2.2.1 Identificación de técnicas de caracterización de superficies metálicas.

En las bases de datos mencionadas, se realizó una revisión sistemática de la bibliografía existente de proyectos con objetivos similares o que hubieran trabajado con superficies metálicas con aplicaciones en sensores, como criterio de inclusión. También se realizó un sondeo de las diferentes metodologías disponibles en la región, así como las que se encontraran en las universidades mencionadas y se tuviera experiencia con ellas, utilizando como criterio de exclusión la no disponibilidad en el área de Medellín. Por último, se realizó una revisión de los funcionamientos físicos y/o químicos de cada caracterización, para tener un mayor entendimiento de la información que posiblemente se pueda obtener con ellas. Se elaboró una tabla donde se hace un resumen de la información encontrada, respecto a las técnicas de caracterización que se consideran de interés para superficies metálicas y

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

aplicaciones en biosensores, esto con el fin de presentar la información consultada de manera resumida y clara.

2.2.2 Inmovilización de ADN sobre electrodos de oro

a) Conjugación química del ADN

Este proceso se realizó en el Laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad CES. A continuación, se describe el protocolo utilizado en este trabajo y en el trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Biomédico de Camilo Ortiz Monsalve (Ortiz, 2016) (Hermanson, 2013).

Para este proceso fue necesaria la preparación inicial de soluciones de acetato de sodio (3 M) y buffer de acetato con pH 4.5 (1 M). Se agregó 5 µl de buffer de acetato de sodio en un tubo Eppendorf de 0.2 mL, posteriormente se adicionó 10.1 µl de etilendiamina al 99%. Después, se agregaron 33.3 µl de ADN para una concentración final de 200 µM, e inmediatamente después, 1.6 µl de agua MilliQ (para un volumen final de 60 µl), 0.6 mg de NHS y 4.9 mg de EDC. Finalmente, se homogenizó con el spin y se dejó reaccionar por 2 horas a temperatura ambiente.

Al finalizar la reacción, se transfirió la solución a un tubo Eppendorf de 1.5 mL para el proceso de separación del ADN. Se agregó 150 µl de agua MilliQ, 20 µl de solución acetato de sodio y 400 µl de etanol absoluto. La solución obtenida se homogenizó e incubó a -20°C durante toda la noche. Cuando el tiempo de incubación terminó, se centrifugó la muestra durante 30 minutos en una centrifuga con control de temperatura a 4°C y una aceleración de 13000 g. Se procedió a aspirar el sobrenadante y lavar el pellet con 100 µl de etanol al 95%. Posteriormente, se puso la muestra en baño maría a 70°C para secar el etanol de una manera más rápida y finalmente se resuspendió el ADN en 200 µl y 100 µl (para muestras más concentradas) de agua MilliQ.

Para la medición de las concentraciones resultantes, se utilizó equipo *NanoDrop 2000 Spectrophotometer*, mencionado anteriormente. En la Tabla 1 se observan los datos de las concentraciones obtenidas y su promedio.

Tabla 1. Datos de muestras de ADN

Muestra	Medición	Concentraciones (ng/uL)	Promedio (ng/uL)
DNA_3	1	502,4	506,82
	2	510,6	
	3	507,6	
	4	505,4	
	5	508,1	
DNA_4	1	471,1	472,72
	2	477,3	
	3	472,1	
	4	473,5	

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

	5	469,6	
DNA_5	1	646,1	644,6
	2	646	
	3	645,8	
	4	644,3	
	5	640,8	
DNA_6	1	952,7	953,12
	2	959,4	
	3	956,2	
	4	947,3	
	5	950	

b) Etapas de inmovilización

• Lavado de los cristales de cuarzo con electrodo de oro

El lavado se realizó por medio de dos protocolos. Inicialmente se lavaron con solución piraña, compuesta por una proporción 1:3 de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido sulfúrico (H_2SO_4), respectivamente. Se preparó entonces 3 ml de esta solución y se sumergió cada cristal por 5 minutos en aproximadamente 1,5 ml de la solución piraña. Se lavaron los cristales con agua MilliQ y etanol, para luego ser secados con nitrógeno gaseoso e introducidos en el *UV/Ozone ProCleaner Plus* durante 20 minutos. Finalmente, se lavaron con etanol y se secaron con nitrógeno gaseoso (Carolina Galeano, 2016)

De acuerdo a los resultados obtenidos en las primeras lecturas en el equipo *Spectrum 100*, así como los obtenidos en estudios previos en el semillero de Tecnologías para la detección de biomoléculas, se optó por cambiar al protocolo de limpieza al protocolo $KOH+H_2O_2+UV$. Inicialmente, se lavó el cristal con agua MilliQ y etanol, se secó la superficie con nitrógeno gaseoso y se introdujo los cristales en el *UV/Ozone ProCleaner Plus* por 20 minutos. Posteriormente se sumergieron los cristales en 50mM de KOH y 25% de H_2O_2 durante 5 minutos, luego fueron lavados con agua Milli-Q y etanol y, por último, fueron secados con nitrógeno gaseoso (Carolina Galeano, 2016).

• Formación de las SAM mixtas

Para la formación de las MSAM se utilizó una solución de 3×10^{-5} moles, con 11-mercapto-1-undecanol y ácido-16-mercaptohexadecanoico en una proporción 25:1 respectivamente, preparados en 3 ml de etanol. Se sumergió cada cristal en 1.5 ml de esta solución durante toda la noche, en agitación constante, a temperatura ambiente y con protección de luz.

• Activación

Al día siguiente de la formación de las SAM, se preparó una solución de EDC a 200 mM y NHS a 50 mM en etanol para la activación de los grupos carboxilos de las SAM. Se lavaron los cristales con etanol y se secaron con nitrógeno gaseoso. Posteriormente, se

sumergieron cada uno en 1.5 ml de la solución de activación durante 4 horas, en agitación constante, a temperatura ambiente y con protección de luz.

- **Inmovilización de ADN**

Las concentraciones en solución trabajadas para la inmovilización de ADN fueron 40, 20, 10, 7.5, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 y 0.02604 μM . Inicialmente se lavó la celda de activación con agua bidestilada y alcohol, se lavaron los cristales con agua MilliQ y se secaron con nitrógeno gaseoso. Consecutivamente, se agregó 60 μL de la solución de interés en cada cristal y se dejó reaccionando por 4 horas en agitación constante y a temperatura ambiente. En cada ensayo se utilizó la misma concentración en los dos cristales, A y B, en una de sus caras, la otra cara de cada uno se utilizó como blanco.

2.2.3 Caracterización de superficies inmovilizadas sobre cristales de oro

Se utilizó el espectrofotómetro infrarrojo *Spectrum 100*. Para utilizar este equipo fue necesario realizar primero una lectura del Background por medio del software, cada día que se utilizara el equipo. Posteriormente fue posible realizar las lecturas de la cara inmovilizada de cada cristal y la cara opuesta como blanco. Se configuró el software para que realizara las lecturas con 25 barridos, una resolución de 4cm^{-1} , en un rango de onda entre 4000 y 650cm^{-1} y con una fuerza indicada por la prensa de 100.

- **Estudio cualitativo**

Para este estudio, se analizaron las bandas obtenidas con las diferentes concentraciones en solución con el fin de comprobar la presencia de las bandas características de SAM, la etapa de activación y la presencia de ADN. Para esto se utilizó el software *Spectrum*, donde por medio del cursor vertical, se determinaron los valores de longitud de onda de las bandas obtenidas, los cuales se compararon con literatura de estudios previos.

- **Estudio cuantitativo**

Por medio del software *SpectrumQuant*, se realizó el cálculo del área bajo la banda de interés, teniendo en cuenta la Ley de Beer-Lambert, la cual establece que la absorbancia de un molécula o analito, está directamente relacionada con la concentración de este en la muestra estudiada (Departamento de Biología Aplicada - Universidad Miguel Hernández de Elche, s.f.). Con las áreas calculadas para cada cristal, se realizó un promedio y este se utilizó para realizar las curvas de calibración. También se realizó una lectura con una concentración de 7.5 μM para analizar si esta se ajustaba a la curva y obtener los diferentes porcentajes de error respecto a esto.

3. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 IDENTIFICACIÓN DE TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES METÁLICAS.

Con el fin de presentar la información consultada de una manera resumida y clara, permitiendo así una mejor decisión, en la Tabla 2 se recapitula la información principal de cada caracterización.

Tabla 2. Datos de técnicas de caracterización.

Técnica de caracterización	Principio físico/químico	Resultado	Destruye/Cambia la muestra de interés	Preparación de la muestra	Disponibilidad en Medellín
Microscopía de fuerza atómica (AFM)	Interacciones de fuerza entre la sonda y la muestra.	Curvas de fuerza, imágenes de altura y de fase. Imágenes de tamaño limitado y con problemas ocasionales por velocidad lenta que genera errores en distancias cercanas (MicroscopeMaster, s.f.),	Depende de la muestra, si es delicada o suave como las biológicas y los polímeros respectivamente. Además, depende también del tipo de AFM, AFM de pulso es más delicado con las muestras.	No necesita preparación previa.	Universidad de Antioquia, Universidad EAFIT, TecnoParque.
Microscopio electrónico de barrido (SEM)	Formación de imágenes por medio de electrones secundarios y retrodispersados, que son desprendidos de la muestra por medio de un haz de electrones.	Imágenes de alta resolución de la topografía y morfología de la muestra. Imágenes con contraste en función de la composición de la muestra.	El haz de electrones puede alterar la muestra. Además, el montaje la puede destruir, como ocurre con los cristales de cuarzo, dado que es necesario pegarlos y se quiebran al intentar despegarlos.	Depende del tipo de muestra. Por ejemplo, para muestras biológicas es necesario una previa fijación y deshidratación de estas.	Universidad EIA, Universidad EAFIT, Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín (ITM), Universidad Nacional.
Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	Absorción de la radiación por parte de la materia, teniendo en cuenta sus características de vibración únicas. En este caso, se utilizan haces de luz infrarrojo.	Gráficas que muestran número de onda versus la transmitancia o absorbancia de la muestra.	La prensa del equipo puede generar alteraciones en la muestra.	No necesita de preparación previa.	Universidad EIA, Universidad EAFIT, Universidad de Antioquia, Instituto de Capacitación e Investigación del

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

					Plástico y del Caucho (ICIP).
Espectroscopia RAMAN	Absorción de la radiación por parte de la materia, teniendo en cuenta sus características de vibración únicas. En este caso, se utilizan haces de luz monocromática.	Graficas que muestran la intensidad de la luz versus frecuencia.	Se pueden generar alteraciones en la muestra. No es recomendada en pruebas delgadas (Barrientos, 2015).	No necesita de preparación previa.	Universidad de Antioquia.
Voltametría cíclica	Respuesta en corriente a una perturbación de potencial variante en el tiempo.	Voltamograma cíclico que da información sobre comportamiento redox de la muestra. Provee datos complicados de analizar y a veces considerandos inconclusos (Frank Marken, 2005).	No destruye la muestra.	Se deben preparar los electrodos, el electrolito y el montaje de la celda.	Universidad Nacional.

Teniendo en cuenta la información recolectada, además de variables importantes como el tiempo con el que se contaba para el desarrollo de este trabajo, disponibilidad y experiencia en el manejo con el equipo, se decidió trabajar con Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR). En la Universidad EIA se cuenta con el equipo espectrofotómetro infrarrojo *Spectrum 100*, el cual tiene una alta resolución y no altera de forma considerable los cristales de cuarzo si se maneja la prensa con cuidado. Los ensayos con FTIR no requieren de una preparación previa o complicada y con esta técnica, se puede obtener información útil y única para cada muestra, dado que permite saber las moléculas. Aun así, hay diferentes técnicas que pueden ser utilizadas para caracterización de inmobilizaciones de ADN y, por lo tanto, se recomienda su exploración en futuros estudios.

La experiencia con el equipo de FTIR que se poseía en el grupo de investigación Biosensores, al momento de iniciar este proyecto, se consideró como una base fuerte en la cual apoyarse para realizar experimentos en él, y un punto de partida para realizar ensayos que suministraran información diferente a la que se había obtenido antes. Por esto mismo,

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

se consideró no solo adecuado sino pertinente utilizar la técnica de caracterización FTIR, para así obtener resultados cualitativos como los espectros anteriormente observados, además de resultados cuantitativos como una curva de calibración en el FTIR según la concentración en solución utilizada, procedimiento que no se había realizado hasta el momento.

3.2 INMOVILIZACIÓN DE ADN SOBRE SUPERFICIES DE ORO

3.2.1 Lavado de los cristales de cuarzo con electrodo de oro

Inicialmente se utilizó el método de lavado por medio de la solución piraña y UV/Ozono (Carolina Galeano, 2016). La solución piraña es un fuerte agente oxidante que permite la remoción de materia orgánica de una superficie, además produce en esta una hidroxilación, que la vuelve muy hidrofílica. Su mecanismo de limpieza ocurre porque el ácido sulfúrico remueve partículas de H y O como unidades de agua, es decir, se produce una deshidratación. Luego, el ácido sulfúrico convierte el peróxido de hidrógeno en un potente agente oxidante, por la deshidratación energéticamente favorable del H_2O_2 para formar iones de hidronio, iones de sulfato y oxígeno atómico. Finalmente, el oxígeno atómico formado anteriormente, se une directamente a la superficie de los carbones presentes, formando un grupo carbonilo y destruyendo los enlaces de dicho carbono. Esto genera un efecto en cascada porque también afecta los enlaces del carbono con los vecinos, este proceso puede tomar unos minutos. (Liquisearch, s.f.) (Carolina Galeano, 2016). A este método se le adicionó el lavado por medio de UV/Ozono para asegurar un mayor grado de pureza, el cual ocurre mediante una lámpara de mercurio de baja presión que emite rayos ultravioletas con longitudes de onda de 184.9 nm y 253.7 nm. Los rayos con longitud de onda de 184.9 nm irradian O_2 atmosférico, el cual los absorbe y produce ozono y los rayos con longitud de onda de 253.7 nm irradian el O_3 , el cual los absorbe y se descompone. En el proceso de formación y descomposición del ozono, se forma oxígeno atómico que posee una fuerte habilidad de oxidación. Los contaminantes orgánicos que son irradiados por rayos UV absorben esta energía, mayor que su energía de enlace, por lo cual se produce fotólisis y se generan sustancias como iones, radicales libres, moléculas excitadas y moléculas neutras. Las formaciones anteriores, reaccionan con el oxígeno atómico para formar moléculas simples como CO_2 , H_2O , N, y O_2 , que son removidas de la superficie. (Three Bond Technical News, 1987) (Carolina Galeano, 2016)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las primeras lecturas de este trabajo y los resultados obtenidos en el estudio de métodos de lavado para superficies de oro, realizado por el semillero de Tecnologías para la detección de biomoléculas, se decidió cambiar el método de lavado por el protocolo $KOH+H_2O_2+UV/Ozono$ el cual ya había mostrado mejores resultados en cuanto a la limpieza y remoción de moléculas en el cristal (Carolina Galeano, 2016). Esta mejoría se puede observar en la Figura 20, donde se puede ver la reducción de bandas de interés del lavado con $KOH+H_2O_2+UV/Ozono$ (rojo) respecto al lavado con solución piraña y UV/Ozono (negro).

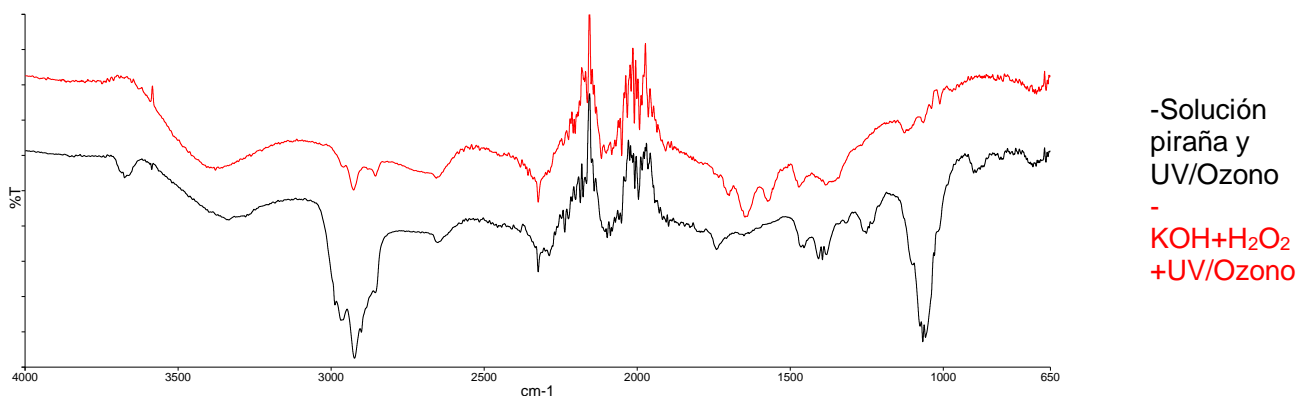


Figura 20. Espectros de un cristal de cuarzo con electrodo de oro (blancos) después de haber sido lavado. Negro: Solución piraña y UV/Ozono, Rojo: KOH+H₂O₂+UV/Ozono.

A pesar de esto, los resultados obtenidos en las caras de los cristales que se usaron como blanco, sugieren que este nuevo protocolo de limpieza todavía puede optimizarse más. En los espectros obtenidos en las caras usadas como blancos, se puede observar bandas características de ADN, lo cual no debería suceder dado que solo se inmoviliza una de las dos caras, esto se puede observar en la Figura 20. Los protocolos para preparar la solución piraña y la solución KOH+H₂O₂, varían muy poco según la literatura, lo que sí se puede encontrar diferente y se debe ver como una variable de optimización, es el tiempo de lavado. En este estudio, se usó un tiempo de lavado de 4 y 5 minutos para la solución piraña y la solución KOH+H₂O₂ respectivamente, según los protocolos establecidos en el grupo de investigación y los estudios realizados en el semillero de Tecnologías para la detección de biomoléculas. No se acostumbra a dejar los cristales por un tiempo más prolongado por la degradación que se pueda presentar en el electrodo de oro, dado que estos métodos pueden dañarlo y alterar la superficie de interés. Pero se ha encontrado en diferentes estudios, tiempos de lavado de hasta 10 minutos para superficies de oro con ambos protocolos (Arto Heiskanen, 2009) (Xueling Quan, 2012), por lo cual es necesario evaluar diferentes tiempos de concentración versus la reducción de las bandas de interés, así como la posible degradación que se le pueda causar al electrodo de oro con los diferentes tiempo y número de repeticiones de lavado.

3.2.2 Caracterización de superficies inmovilizadas sobre cristales de oro

La caracterización se realizó utilizando el equipo de FTIR presente en la Universidad EIA, esta técnica se basa en las propiedades únicas vibratorias de las moléculas. Para esta etapa, primero se quiso evaluar si utilizando un número mayor de scans o barridos en el equipo de FTIR, se lograba ver una diferencia significativa o una mejoría frente a los 25 scans utilizados típicamente. En la Figura 21, se pueden observar los espectros de la misma muestra a 25 (negro), 50 (rojo) y 100 (azul) scans. Es muy claro que no hay una diferencia visible entre estos y dado que siempre será importante la optimización del tiempo en estos protocolos, se decide que 25 scans es el número óptimo de barridos considerando resultado y tiempo.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

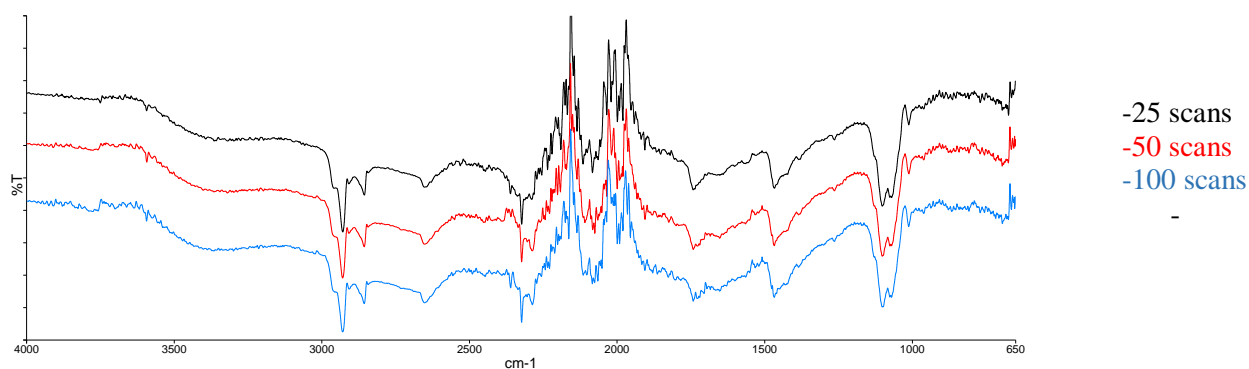


Figura 21. Espectros de un cristal de cuarzo con electrodo de oro inmovilizado con una concentración de ADN de 2.5 μM y diferentes números de scans. Negro: 25 scans, Rojo: 50 scans, Azul: 100 scans.

Las concentraciones en solución trabajadas inicialmente para la inmovilización de ADN fueron 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 y 0.15625 μM , cada concentración se hizo por duplicado. Es importante aclarar que, en este tipo de ensayos, se evalúa la concentración en solución que es conocida, no la concentración inmovilizada que no se conoce exactamente dada la morfología del cristal de cuarzo con electrodo de oro y la misma naturaleza del ensayo.

Se decidió seguir un factor 2 hacia abajo para obtener un rango óptimo de trabajo y que se pudiera realizar no solo un estudio cuantitativo de los espectros representativos, sino también, un estudio cuantitativo de estos por medio de la obtención de una curva de calibración: concentración en solución versus área bajo la banda de interés.

• Estudio cualitativo

En las figuras 22, 23 y 24 se pueden observar 3 espectros representativos de los obtenidos en esta caracterización, para las concentraciones 40, 2.5 y 0.3125 μM respectivamente.

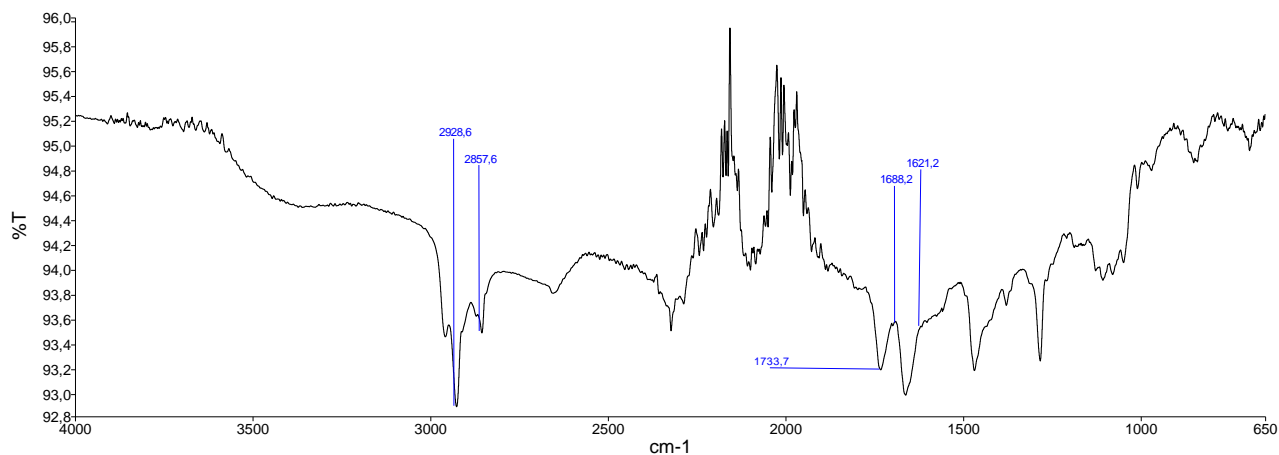


Figura 22. Espectro de un cristal de cuarzo con electrodo de oro inmovilizado con una concentración de ADN de 40 μM .

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

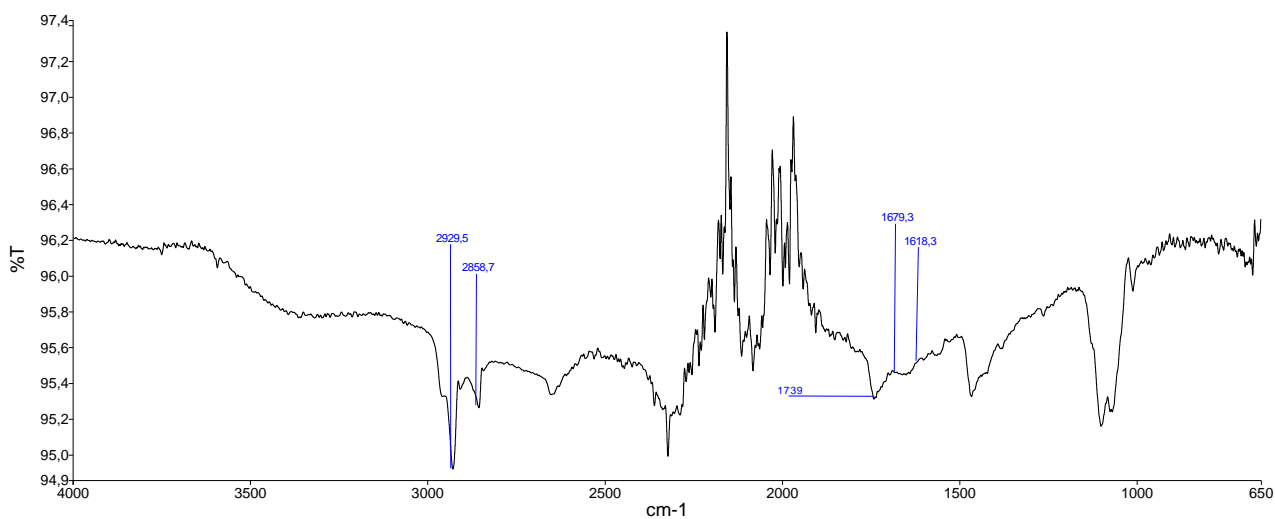


Figura 23. Espectro de un cristal de cuarzo con electrodo de oro inmovilizado con una concentración de ADN de 2.5 μM .

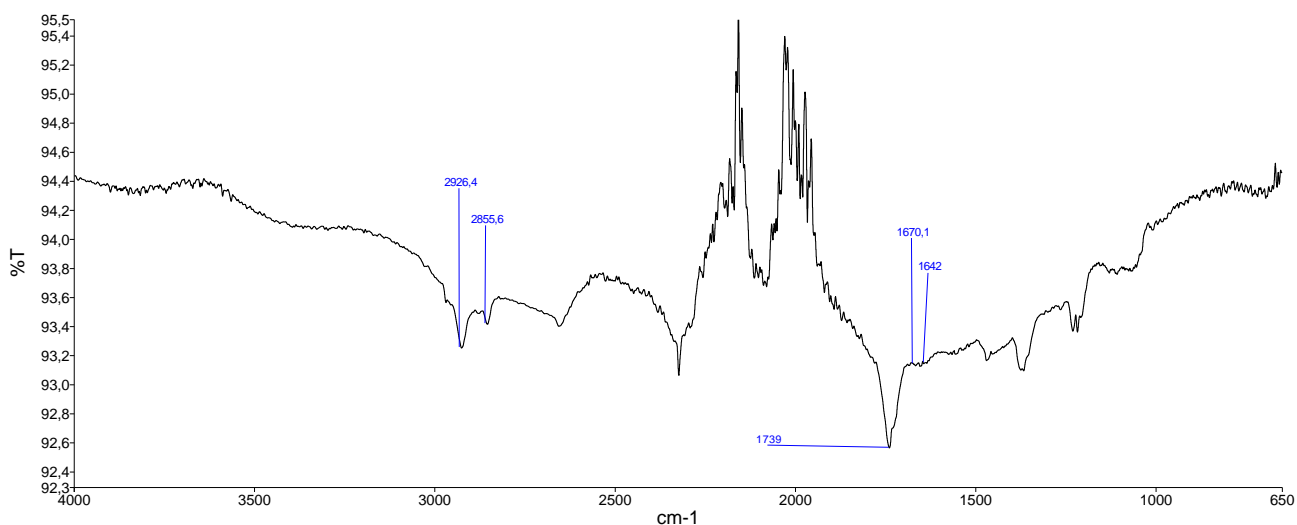


Figura 24. Espectro de un cristal de cuarzo con electrodo de oro inmovilizado con una concentración de ADN de 0.3125 μM .

En estos espectros se pueden observar las bandas típicas de las SAM, alrededor de 2927 cm^{-1} y 2856 cm^{-1} , que son bandas características de los alcanos (C-H, carbono sp^3) presentes en las monocapas. Estos hallazgos son similares a los encontrados en estudios donde se utilizó la misma técnica de caracterización. Según Sam *et. Al* (2009) es de esperar encontrar bandas referentes a los alcanos (CH_2) en las longitudes de onda de 2925 cm^{-1} y 2855 cm^{-1} . Jamie King demostró en su trabajo que a los alcanos presentes en el alcanotiol MUA, utilizado en este trabajo, se les podía atribuir las bandas observadas en 2855 cm^{-1} y

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

2940 cm^{-1} (King, 2009) y Sirnegeda D. Techane, Lara J. Gamble, y David G. Castner, encontraron en su estudio que para estos mismos alcanos las bandas se encontraban por debajo de 2920 cm^{-1} para la vibración asimétrica de este grupo funcional y, alrededor de 2851 cm^{-1} , para la vibración simétrica (Sirnegeda D. Techane, 2011).

Las diferencias observadas entre este estudio y los encontrados en la bibliografía, así como entre ellos mismos, se deben a muchos factores. Para empezar, no es posible asegurar que la morfología de las superficies de los electrodos de oro utilizadas en este estudio son exactamente iguales dado que pueden venir con diferencias de fábrica, además de las modificaciones que cada una puede sufrir durante el desarrollo de los protocolos, situación que aplica para cualquier estudio que utilice electrodos como superficies de trabajo. Además, se deben considerar los errores que se pudieron presentar en la realización de los protocolos. Como se mencionó anteriormente, el protocolo de lavado no dio los resultados esperados completamente y, por otro lado, se puede considerar la contaminación del mismo equipo de FTIR. Sin embargo, considerando la bibliografía revisada, los valores esperados para las MSAM sí estuvieron presentes en los espectros obtenidos.

Otra banda que es importante analizar, es la banda correspondiente a la etapa de activación de las monocapas. En los espectros presentados en las figuras 22, 23 y 24, se pueden encontrar la banda característica de esta etapa, alrededor de 1736 cm^{-1} , lo cual es proporcional a lo encontrado en estudios similares. En el estudio de Jamie King, mencionado anteriormente, las bandas 1815 cm^{-1} , 1790 cm^{-1} y 1750 cm^{-1} , corresponden al éster presente en NHS (King, 2009), así como las bandas 1818 cm^{-1} , 1784 cm^{-1} y 1743 cm^{-1} según Palazon *et. al* (2014). Las diferencias presentes se explican de igual forma que las diferencias encontradas en las bandas de las SAM. Es importante destacar y analizar cómo esta banda crece significativamente de la concentración 40 μM hasta 0.3125 μM , lo cual es lógico si se tiene en cuenta que entre más concentración de ADN haya, menor será el área de activación dado que es aquí donde se une el bioreceptor, que en este caso es la cadena de ADN.

Por último, es muy importante analizar las bandas respectivas del ADN que es el objeto de estudio de este trabajo. Estas se encuentran en las figuras 22, 23 y 24 entre 1688 cm^{-1} y 1618 cm^{-1} , lo cual es similar a lo encontrado por Boncheva *et. al* (1999) que mencionan que las bandas encontradas entre 1650 y 1680 cm^{-1} corresponden a las vibraciones del doble enlace presente en las bases nitrogenadas del ADN (timina, guanina, adenina y citosina), así como Das *et. al* (2015) asignaron la banda de 1665 cm^{-1} a las vibraciones de la timina. Por otro lado, Petrovykh *et. Al*, determinaron que la banda encontrada en 1714 cm^{-1} , corresponde a los grupos carbonilos en el anillo de las timinas y con estudios previos, pudieron asignar esta banda a las bases de timina contenidas en el ADN que no estuvieran interactuando fuertemente con la superficie de oro. Por esto y lo observado en los espectros obtenidos, la banda de interés se asignó entre 1731 cm^{-1} y 1608 cm^{-1} . Un hallazgo muy significativo fue encontrar como esta banda de interés iba creciendo en intensidad a medida que se aumentaba la concentración de la solución. Esto tiene sentido si se considera la Ley de Beer-Lambert, la cual establece que la absorbancia de un molécula o analito, está directamente relacionada con la concentración de este en la muestra estudiada (Departamento de Biología Aplicada - Universidad Miguel Hernández de Elche, s.f.). Además, se debe analizar la razón por la cual esta banda se iba desplazando más hacia la izquierda a medida que se aumentaba la concentración de la solución. Esto se da porque,

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

entre más concentración de ADN este en la solución, más enlaces C=O correspondientes a amidas presentes por la conjugación de ADN, se van a observar. Al contrario, en concentración bajas de ADN, más enlaces C=O correspondientes a los ésteres de la activación se verán.

- **Estudio cuantitativo**

Para el estudio cuantitativo, se tuvo en cuenta la Ley de Beer-Lambert previamente mencionada, la cual estipula que la absorbancia de una molécula está relacionada proporcionalmente con su concentración, por lo que el área bajo esta banda de absorbancia, también estará relacionada con la concentración.

Para los cálculos del área se utilizó el software *SpectrumQuant*. Este software permite el cálculo bajo la banda que se desee, fijando los extremos para el ancho, así como una base, la cual puede ser escogida o si se selecciona ninguna, el software automáticamente utiliza como base la absorbancia 0. Se decidió analizar el área y no la altura por lo que se mencionó anteriormente del desplazamiento de la banda, lo cual hace más comparable los resultados si son áreas, pero también se pueden realizar estudios de altura de bandas en este software.

Se siguieron los siguientes pasos:

1. Se agruparon los espectros para cada grupo, Cristal A, Blancos A, Cristal B y Blancos B, para todas las concentraciones, 40, 20, 10, 7.5, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 y 0.02604 μM .
2. A todos los espectros se les realizó corrección de línea base por medio del software *Spectrum*.
3. Por medio de este mismo software, se fijaron los números de onda para el ancho de cada espectro. Como se explicó anteriormente, la banda de interés no solo crece, sino que también se desliza, por esto el ancho es diferente para cada concentración.
4. En el software *SpectrumQuant* se creó un método, el cuál es la manera de abrir un nuevo estudio cuantitativo.
5. Se añadieron los parámetros, es decir los espectros, a los cuales se les agrego la propiedad que en este caso es la concentración.
6. Se seleccionó la Ley de Beer-Lambert, así como estudio de áreas y no se seleccionó ninguna base.
7. Los espectros se analizan en modo de absorbancia.
8. Para cada uno, se ingresó los números de onda que conformaban el ancho del área.
9. El software arroja el área calculada.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

10. En Excel, se realizaron tablas con la información obtenida y allí se realizó la gráfica promediando los resultados obtenidos en el Cristal A y Cristal B.

Es necesario mencionar que la concentración límite superior se fijó en 40 μM , esto dado que concentraciones mayores representan un gasto de reactivo muy alto, además es poco probable que se llega a trabajar con concentraciones tan altas. Por otro lado, para la concentración límite inferior se realizó una concentración muy baja, 0.02604 μM , la cual es un factor 6 hacia abajo de la última trabajada que fue 0.15625 μM . Esto se hizo con el fin de encontrar cual concentración es la mínima observada en los espectros y, aunque no es completamente seguro afirmar que este es el límite de detección, una concentración inferior sería muy difícil de analizar por medio de este ensayo de inmovilización al ser volúmenes tan pequeños, además de que representaría una dificultad para su análisis al tener una banda de interés poco visible en los espectros.

Como se mencionó anteriormente, los blancos utilizados en este estudio no dieron los resultados que se esperaban, se cree que por problemas de lavado. Por este motivo la curva de calibración y los datos que se presentarán a continuación, no se deben considerar como una verdad absoluta al presentar problemas con los blancos. Aun así, se considera que es información valiosa y acorde a lo encontrado en la teoría.

En la Tabla 3 se muestran los datos para el Cristal A, en la Tabla 4 para el Cristal B y en la Tabla 5 el promedio de las áreas entre las encontradas en el Cristal A y el Cristal B. Las diferencias entre las áreas y los anchos de estas, se pueden analizar de la misma manera que se analizaron las divergencias de las bandas en el estudio cualitativo. Las diferencias se deben por las discrepancias topográficas de los cristales, así como posibles errores en el protocolo y el lavado. Aun así, los resultados fueron muy similares entre sí y respecto a los rangos esperados.

Tabla 3. Datos Cristal A

Cristal A			
Concentración (μM)	Valor izquierdo ancho (cm^{-1})	Valor derecho ancho (cm^{-1})	Valor área
40	1688	1621	2.0178
20	1686	1608	1.8365
10	1708	1644	1.6295
5	1672	1614	1.424
2.5	1679	1618	1.2237
1.25	1671	1626	1.0116
0.625	1679	1619	0.8374
0.3125	1670	1642	0.52672
0.15625	1666	1653	0.1884
0.02604167	1663	1657	0.079979

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Tabla 4. Datos Cristal B

Cristal B			
Concentración (μM)	Valor izquierdo ancho (cm^{-1})	Valor derecho ancho (cm^{-1})	Valor área
40	1727	1652	1.9349
20	1731	1655	1.8382
10	1679	1617	1.5768
5	1677	1618	1.3698
2.5	1675	1610	1.218
1.25	1667	1630	1.0608
0.625	1673	1637	0.85104
0.3125	1675	1653	0.5927
0.15625	1671	1653	0.18066
0.02604167	1661	1655	0.069047

Tabla 5. Datos promedios de áreas

Concentración (μM)	Promedio valor área
0.02604167	0.074513
0.15625	0.18453
0.3125	0.55971
0.625	0.84422
1.25	1.0362
2.5	1.22085
5	1.3969
10	1.60315
20	1.83735
40	1.97635

A continuación, en la Figura 25, se muestra la curva de calibración obtenida de concentración en la solución versus promedio de área bajo la banda de interés, así como la línea de tendencia, ecuación y el coeficiente de determinación R^2 .

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

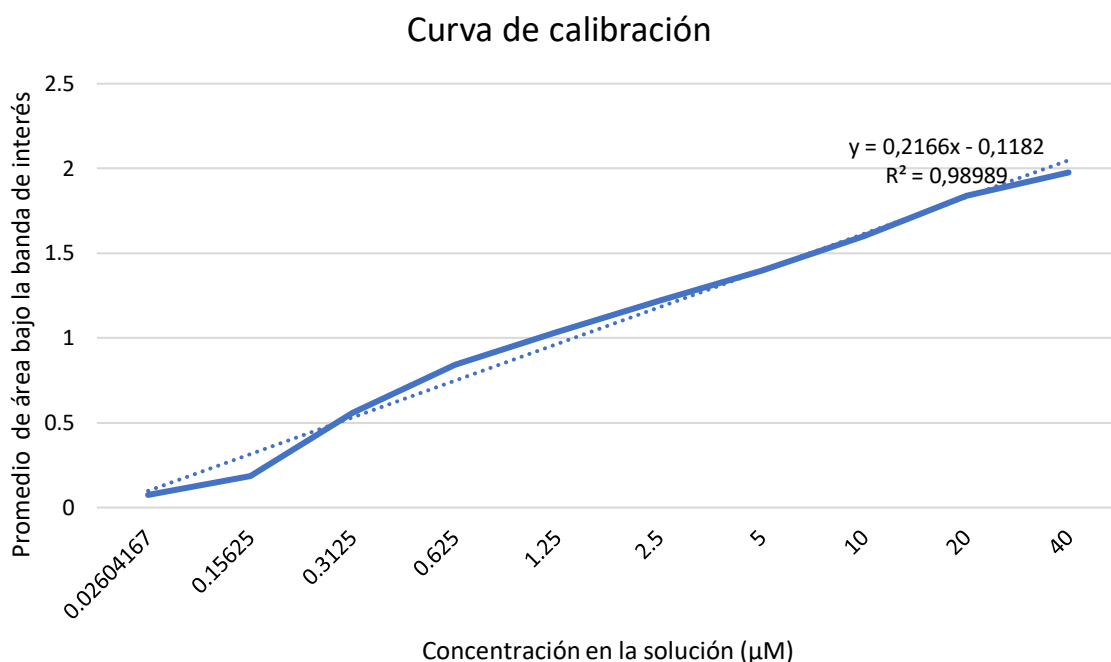


Figura 25. Curva de calibración.

Por último, se realizó un ensayo con una concentración de 7.5 µM, por duplicado, con el fin de ver cuánto se ajustaba a la curva obtenida. Se escogió esta concentración porque según Wrobel, esta concentración es la óptima de inmovilización para un estudio con el sensor y los cristales de cuarzo de 100 MHz, conclusión a la que llegó en su tesis doctoral. Por lo tanto, se considera una concentración de interés (Wrobel, 2001). En la Tabla 6, se presentan los datos obtenidos para esta concentración.

Tabla 6. Datos concentración 7.5 µM.

Ancho Cristal A (cm ⁻¹)	Ancho Cristal B (cm ⁻¹)	Valor área A	Valor área B	Promedio valor área
1718-1608	1681-1635	1,4728	1,6204	1,5466

La ecuación obtenida en la gráfica fue la siguiente:

$$y = 0.2166 * x - 0.1182$$

Donde:

y= Promedio área bajo la banda de interés.

x= Concentración en solución.

Según esto, si se utiliza una concentración de 7.5 µM, se debería obtener un área de 1.5063. El área obtenida fue de 1.5466, lo cual representa un error del 2.675%. De modo contrario, si se utilizará el área obtenida en la ecuación, se encontraría que la concentración

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

en la solución fue de 7.686 μM , lo cual representa un error del 2.48%. Estos resultados son bastante alentadores para la intención de utilizar la técnica de FTIR como una técnica cuantitativa y no solo cualitativa, como cotidianamente se usa.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

4. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

- Al realizar una búsqueda bibliográfica para la identificación de técnicas de caracterización para superficies metálicas, esto con el fin de caracterizar un cristal de cuarzo con electrodo de oro de 10 MHz, se concluye que hay varias técnicas que pueden ser utilizadas para caracterización de inmobilizaciones de ADN. Se recomienda en futuros estudios su exploración.
- La técnica de caracterización Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), es adecuada para caracterización de superficies inmobilizadas con ADN sobre electrodos de oro de 10 MHz en este trabajo, dado que se contaba con el equipo y la experiencia necesaria, posee una muy buena resolución y se trabaja con esta técnica frecuentemente en el campo de biosensores, no destruye la muestra lo cual es muy importante en este tipo de estudios dado que se busca la reproducibilidad y, por último, presentaba una oportunidad de trabajar con esta cuantitativamente, lo cual no se había hecho antes en el grupo de investigación de Biosensores de la Universidad EIA.
- Para la caracterización cualitativa del cristal de cuarzo con electrodo de oro de 10 MHz inmobilizado con sondas de ADN, se utilizó la técnica de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), disponible en la Universidad EIA. Los resultados obtenidos fueron acordes a la literatura encontrada, lo que permitió comprobar la correcta formación de las SAM, la activación de estas y la inmobilización de la sonda de ADN. Además, se encontró que a medida que la concentración aumenta, el área de activación disminuye y por esto la banda correspondiente a la activación, entre 1815 cm^{-1} y 1743 cm^{-1} , se reduce.
- Se implementó una metodología para la inmobilización de una sonda bioreceptora de ADN sobre la superficie del electrodo de oro de un cristal de cuarzo de 10 MHz, esto con el fin de caracterizar esta interfase. Se utilizaron concentraciones que permitieran trabajar en un rango amplio y se llegó a la conclusión de que el límite superior para este ensayo sería $40\text{ }\mu\text{M}$, debido a la poca probabilidad de trabajar con concentraciones más altas y el gran gasto de reactivo que esto conllevaría, así como el límite inferior fue fijado en $0.02604\text{ }\mu\text{M}$ dado que concentraciones más bajas serían muy difíciles de manejar por el volumen tan pequeño que representan, así como la poca visibilidad que tendría en la caracterización. Se recomienda que, en estudios futuros, se estudie una zona de este rango con un factor más pequeño para ver los cambios a un nivel más detallado.
- Se encontraron inconsistencias en los blancos utilizados debido a problemas en los protocolos de lavado. Esto se debió probablemente al tiempo empleado en el lavado, por lo cual es necesario considerar tiempos más prolongados y se sugiere que en estudios futuros se analice el impacto que esto tendría en la superficie de oro. También se debe considerar un mejor manejo del FTIR dado que este puede estar contaminado.
- Se encontró que la diferencia entre el número de scans o barridos no es mucha en cuanto a la apariencia y el ruido del espectro, pero en cuanto a tiempo si, dado que

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

entre más scans, más tiempo tomará la lectura. Por esto se concluyó que, con el objetivo de optimizar sin sacrificar calidad, 25 scans es el número óptimo de barridos para lecturas en estudios como este.

- El estudio cuantitativo del cristal de cuarzo con electrodo de oro de 10 MHz inmovilizado con sondas de ADN, se realizó por medio de los espectros encontrados y el software *SpectrumQuant*, teniendo en cuenta la Ley de Beer-Lambert que asocia la concentración de un analito con sus propiedades de absorbancia. Se encontró un crecimiento lógico de la banda de ADN de interés, entre 1731 cm^{-1} y 1608 cm^{-1} , a medida que la concentración aumentaba, así como un desplazamiento de esta a la izquierda que es acorde a la desaparición de la banda de activación.
- Con el promedio de los duplicados de cada punto de inmovilización, se pudo graficar una curva de calibración, concentración de la solución versus promedio del área bajo la banda de interés. El coeficiente de R^2 obtenido permitió concluir que los datos estaban altamente correlacionados entre sí, así como el ensayo que se realizó con la concentración de $7.5\text{ }\mu\text{M}$ que arrojó porcentajes de error muy bajos, permite ver que la curva es adecuada. Sin embargo, es necesario mencionar de nuevo la necesidad de encontrar un protocolo de lavado más eficiente que permita darle mejor respaldo a este tipo de ensayos. También se recomienda para estudios a futuro, la realización de más ensayos con otras concentraciones para calcular si se ajustan a la curva y cuáles son los porcentajes de error.

REFERENCIAS

Arango, S. S. (12 de Julio de 2011). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Fac. Nacional Salud Pública*, 30(1), 75-82.

Arto Heiskanen, M. H.-L. (Abril de 2009). Share Request full-text Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. *MICROELECTRONIC ENGINEERING*.

Atkins De Paula, J. D. (2007). *Química Física. Médica Panamericana*.

Barrientos, K. (2015). Caracterización de cristales piezoeléctricos biofuncionalizados para la detección de una biomolécula modelo (Universidad EIA, Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Biomédica, Medellín, Colombia.)

Batalla, P. (2009). Nuevos métodos para la inmovilización orientada de anticuerpos sobre soportes sólidos. Universidad Autónoma de Madrid.

Boncheva, M., Scheibler, L., Lincoln, P., Vogel, H., & Åkerman, B. (1999). Design of oligonucleotide arrays at interfaces. *Langmuir*, 15(13), 4317-4320. <http://doi.org/10.1021/la981702t>

Boray Torun, B. O. (20 de Abril de 2012). Atomic Force Microscopy (AFM)-Based Nanografting for the Study of Self-Assembled Monolayer Formation of Organophosphonic Acids on Al₂O₃ Single-Crystal Surfaces. *Langmuir*.

Bradley, M. (s.f.). FTIR Basics . Recuperado el 17 de Febrero de 2017, de ThermoFisher: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-basics.html>

Carolina Galeano, S. M. (2016). Evaluación de protocolos de lavado para superficies de oro. Universidad EIA - Universidad CES, Semillero Tecnologías para la detección de biomoléculas.

COMSOL. (s.f.). COMSOL. Recuperado el 28 de Agosto de 2016, de Multiphysics Cyclopedia: <https://www.comsol.com/multiphysics/piezoelectric-effect>

Das, T., Kutty, S. K., Tavallaie, R., Ibugo, A. I., Panchompoo, J., Sehar, S., ... Manefield, M. (2015). Phenazine virulence factor binding to extracellular DNA is important for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Scientific reports*, 5, 1-9. <http://doi.org/10.1038/srep08398>

Daza, M. A. (2006). Monocapas Auto organizadas sobre Metales: Adsorción no específica de moléculas bioactivas y su aplicación en el desarrollo de Biosensores.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Departamento de Biología Aplicada - Universidad Miguel Hernández de Elche. (s.f.). TOXICOLOGÍA AMBIENTAL Y SALUD PÚBLICA. Recuperado el 28 de Octubre de 2017, de TRANSMITANCIA, ABSORBANCIA Y LEY DE LAMBERT-BEER: http://repositorio.innovacionumh.es/Proyectos/P_22CursoMateriales/Miguel_Angel_Sogorb/Wimba/Espectroscopia_05.htm

Eaton, P., & West, P. (2010). Atomic Force Microscopy. New York, New York, United States: Oxford University Press Inc.

Física UNAM. (s.f.). Recuperado el 28 de Agosto de 2016, de Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR): <http://www.fisica.unam.mx/andreahtecnicas Equipos/ftir.html>

Fundación Española del corazón. (s.f.). Recuperado el 22 de Agosto de 2016, de Herencia genética : <http://www.fundaciondelcorazon.com/prevencion/riesgo-cardiovascular/herencia-genetica.html>

Flores, E. (Diciembre de 1995). VOLTAMETRIA CICLICA: LA ESPECTROSCOPIA ELECTROQUIMICA PARTE I. Revista de Química.

Frank Marken, A. N. (2005). Springer Link. Recuperado el 28 de Octubre de 2017, de Cyclic Voltammetry : https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-04757-6_4

Fundación Mencía. (s.f.). *Fundación Mencía*. Recuperado el 22 de Agosto de 2016, de ¿QUÉ SON LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS? : <http://www.fundacionmencia.org/es/enfermedades-geneticas/que-son/>

García, L. (2008). Desarrollo de un multibiosensor de ADN para el diagnóstico temprano de cáncer de mama, 189. Recuperado a partir de https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/1551/14733_garcia_carrascosa.pdf?sequence=1

Giuseppe Novelli, C. C. (Mayo de 2008). Genetic tests and genomic biomarkers: regulation, qualification and validation. *Clinical Cases Miner Bone Metabolism*, 5(2), 149-154.

Gurvinder Singh Bumbrah, R. M. (Septiembre de 2016). Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6(3).

Hermanson, G. T. (2013). Nucleic Acid and Oligonucleotide Modification and Conjugation. En *Bioconjugate Techniques* (pp. 959-987). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-382239-0.00023-6>

lafrancesco, G. (2003). La investigación es educación y pedagogía. Bogotá: Magisterio.

InPhotonics. (s.f.). What is Raman Spectroscopy? Recuperado el 14 de Abril de 2017, de InPhotonics: <http://www.inphotonics.com/raman.htm>

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. (2000). *Citas y notas de pie de patina NTC 147*. Bogotá: ICONTEC.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. (2000). Documentación. Referencias bibliográficas para libros, folletos e informes. NTC 1160 segunda actualización. Bogotá: ICONTEC.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. (2000). *Documentación. Referencias bibliográficas para publicaciones seriadas. NTC 1308 segunda actualización*. Bogotá: ICOTEC.

Instituto Nacional del Cancer. (s.f.). Recuperado el 22 de Agosto de 2016, de Genética del cáncer : <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica>

Instituto Nacional de Salud. (s.f.). *Enfermedades Transmisibles* . Recuperado el 22 de Agosto de 2016, de <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Paginas/transmisibles.aspx#.V70nrZPhCCQ>

Instituto Nacional del Carbón. (s.f.). *Instituto Nacional del Carbón*. Recuperado el 1 de Noviembre de 2016, de Espectroscopía Raman : <http://www.incar.csic.es/espectroscopia-raman>

Joseph J. Carr, J. M. (23 de Septiembre de 2013). *Sensor Terminology*. Recuperado el 28 de Agosto de 2016, de National Instruments: <http://www.ni.com/white-paper/14860/en/>

King, J. (2009). Pike Technologies. Recuperado el 28 de Octubre de 2017, de Investigations of Thiolated Self-Assembled Monolayers on Gold Substrates by FTIR with Specular Reflectance: http://www.piketech.com/skin/fashion_mosaic_blue/application-pdfs/InvestigationsThiolatedSelf-AssembledMonolayersGold.pdf

Kun Chen, M. S. (19 de Febrero de 2013). Reversible binding and quantification of heparin and chondroitin sulfate in water using redox-stable biferrocenylene SAMs. *Analyst*, 138.

Kyle Strimbu, J. A. (01 de Noviembre de 2011). What are Biomarkers? Current Opinion in HIV and AIDS. *HHS Public Access*, 463-466.

Li, H.-Q. (24 de Abril de 1997). The Common AFM Modes . Recuperado el 10 de Febrero de 2017, de Chembio: <http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm729/afm/details.htm>

Liquisearch. (s.f.). Liquisearch. Recuperado el 28 de Noviembre de 2016, de Piranha Solution - Mechanism of Action: http://www.liquisearch.com/piranha_solution/mechanism_of_action

Lodish, H. (2005). Biología celular y molecular. En H. Lodish, *Biología celular y molecular* (págs. 36-39). Ed. Médica Panamericana.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Mai, W. (s.f.). Fundamental Theory of Atomic Force Microscopy. Recuperado el 04 de Febrero de 2017, de Professor Zhong L. Wang's Nano Research Group: <http://www.nanoscience.gatech.edu/zlwang/research/afm.html>

Magdalena Stobiecka, J. M. (Agosto de 2007). Piezoelectric Sensor for Determination of Genetically Modified Soybean Roundup Ready® in Samples not Amplified by PCR. *Sensors (Basel)*, 7(8), 1462–1479.

Malecka, K. et Al. (2016). Electrochemical genosensor based on disc and screen printed gold electrodes for detection of specific DNA and RNA sequences derived from Avian Influenza Virus H5N1. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 224, 290-297.

Manzanares-Palenzuela, Martín-Fernández, López & López-Ruiz. (2015). Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of genetically modified organisms. *Trends in Analytical Chemistry*, 66, 19-31.

Materials Evaluation and Engineering, INC.. (s.f.). SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM). Recuperado el 12 de febrero de 2017, de Materials Evaluation and Engineering, INC.: <http://www.mee-inc.com/hamm/scanning-electron-microscopy-sem/>

Maurizio Canepa, G. M. (9 de May de 2013). Spectroscopic ellipsometry of self assembled monolayers: interface effects. The case of phenyl selenide SAMs on gold. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15.

Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of oral biology and craniofacial research*, 6, 153-159.

MicroscopeMaster. (s.f.). MicroscopeMaster. Recuperado el 28 de Octubre de 2018, de The Atomic Force Microscope (AFM) : <http://www.microscopemaster.com/atomic-force-microscope.html>

Mutharasan, L.R, y Lee, Y.H. (2005). Biosensors. En J.S. Wilson. (Ed), *Sensor Technology Handbook* (pp. 161-180). Ciudad, País: Editorial

Nancy Birkner, Q. W. (s.f.). How an FTIR Spectrometer Operates. Recuperado el 17 de febrero de 2017, de Chemistry LibreTexts UCDAVIS: https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/How_an_FTIR_Spectrometer_Operates

nanoScience Instruments. (s.f.). How an AFM works. Recuperado el 04 de febrero de 2017, de nanoScience Instruments: <http://www.nanoscience.com/technology/afm-technology/how-afm-works/>

nanoScience Instruments. (s.f.). Scanning Electron Microscopy. Recuperado el 13 de febrero de 2017, de nanoScience Instruments: <http://nanoscience.com/technology/sem-technology/>

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Ocampo, A., Jaramillo, M., March, C., Montoya, Á. (2012). Inmunosensor piezoeléctrico para la detección del metabolito 3,5,6-tricloro-2-piridinol del plaguicida clorpirifós. *Revista EIA*, 16, 127-136.

OMS, IPCS. (1993). *IPCS INCHEM*. Recuperado el 28 de Agosto de 2016, de INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm>

Organización Mundial de la Salud. (s.f.). OMS. Recuperado el 22 de Agosto de 2016, de Las 10 causas principales de defunción en el mundo : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/index2.html>

Ortiz, C. (2016). Inmovilización de sondas de ADN para un genosensor piezoeléctrico de alta frecuencia (Universidad EIA, Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Biomédica, Medellín, Colombia.)

Palazon, F., Benavides, C. M., Léonard, D., Chevotot, Y., Cloarec, J., Lyon, U. De, ... Collongue, A. G. De. (2014). Supporting information for : Carbodiimide / NHS derivatization of COOH-terminated SAMs : activation or byproduct formation ?, 1-7.

Patologías construcción. (s.f.). Recuperado el 28 de Agosto de 2016, de SEM conceptos y usos: <http://www.patologiasconstruccion.net/2012/12/la-microscopia-electronica-de-barrido-sem-i-concepto-y-usos/>

Patología + Rehabilitación + Construcción. (s.f.). Patología + Rehabilitación + Construcción. Recuperado el 1 de Noviembre de 2016, de La microscopía electrónica de barrido: <https://www.patologiasconstruccion.net/2012/12/la-microscopia-electronica-de-barrido-sem-i-concepto-y-usos/>

Petrovykh, D. Y., Kimura-Suda, H., Whitman, L. J., & Tarlov, M. J. (2003). Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold. *Journal of the American Chemical Society*, 125(17), 5219-5226. <http://doi.org/10.1021/ja029450c>

PerkinElmer . (s.f.). PerkinElmer . Recuperado el 6 de Octubre de 2017, de Spectrum 100 and 400 series: http://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/PDFs/EH/Brochures/BRO_Spectrum_100_and_400_Series_Spanish.pdf

Purdue University. (s.f.). Scanning Electron Microscope . Recuperado el 12 de Febrero de 2017, de Purdue University: <https://www.purdue.edu/ehps/rem/rs/sem.htm>

QuartzPRO. (s.f.). QCM 10 MHz 14 mm Cr/Au Custom 1. Recuperado el 6 de Octubre de 2017, de QuartzPRO: http://www.quartzpro.com/product.html/qcm-10-mhz-14-mm-cr/au-custom-1?category_id=9

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Rasheed, A. & Sandhyarani, N. (2016). Quartz crystal microbalance genosensor for sequence specific detection of attomolar DNA targets. *Analytica Chimica Acta*, 805, 134-139.

Reviejo, A. & Pingarrón, J. (2000). Biosensores electroquímicos. Una herramienta útil para el análisis medioambiental, alimentario y clínico. *Investigación Química*, 5-15.

Sam, S., Touahir, L., Salvador Andresa, J., Allongue, P., Chazalviel, J. N., Gouget-Laemmel, A. C., ... Djebbar, S. (2010). Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces. *Langmuir*, 26(2), 809-814. <http://doi.org/10.1021/la902220a>

Scharf, D. (Agosto de 1998). Detectors. Recuperado el 14 de Febrero de 2017, de ScharfPhoto: <http://www.scharfphoto.com/articles/detectors>

Sirnegeda D. Techane, L. J. (21 de Abril de 2011). Multi-technique Characterization of Self-assembled Carboxylic Acid Terminated Alkanethiol Monolayers on Nanoparticle and Flat Gold Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry*, 115(19), 9432–9441.

Swapp, S. (s.f.). Scanning Electron Microscopy (SEM) . Recuperado el 12 de Febrero de 2017, de Geochemical Instrumentation and Analysis: http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html

Tamayo, M. T. (1999). Serie: Aprender a investigar módulo 5: el proyecto de investigación. Bogotá: ICFES.

Thermo Fisher Scientific . (s.f.). Thermo Fisher Scientific . Recuperado el 6 de Octubre de 2017, de NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-2000>

Three Bond Technical News . (20 de Marzo de 1987). Three Bond. Recuperado el 28 de Noviembre de 2016, de Ultraviolet-Ozone Surface Treatment : <https://www.threebond.co.jp/en/technical/technicalnews/pdf/tech17.pdf>

Tombelli S, M. M. (Octubre de 2000). Coupling of a DNA piezoelectric biosensor and polymerase chain reaction to detect apolipoprotein E polymorphisms. *Biosens Bioelectron*, 15(7-8), 363-70.

Tombelli, S. (2012). Piezoelectric biosensors for medical applications. *Biosensors for Medical Applications*, 41-64.

Universidad iberoamericana. (s.f.). *Biblioteca Francisco Javier Clavijero*. Recuperado el 4 de Febrero de 2008, de ¿Cómo cito la información que encontré en internet?: http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/biblioteca/articulos/pdf/refer_internet.pdf

Universidad los Andes. (s.f.). *Universidad los Andes*. Recuperado el 1 de Noviembre de 2016, de Fundamentos Microscopía de Fuerza Atómica:

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

<https://investigaciones.uniandes.edu.co/index.php/es/centro-de-microscopia/microscopio-de-barrido-por-sonda/fundamentos>

Vasquez, M. (30 de Abril de 2016). Aprende en línea UdeA. Recuperado el 25 de Octubre de 2017, de VOLTAMETRÍA CÍCLICA : <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=54362&inpopup=1>

Wrobel, N. (2001). Optimization of interfaces for genosensors based on thiol layers on gold films.

Wu, Wu, Wang, Shen & Yu. (2006). An amplified mass piezoelectric immunosensor for Schistosoma japonicum. Biosensors and Bioelectronics, 22, 207 – 212.

Xueling Quan, Y. S. (2012). DTU Orbit. Recuperado el 28 de Octubre de 2017, de Investigation of cleaning and regeneration methods for reliable construction of DNA cantilever biosensors: [http://orbit.dtu.dk/en/publications/investigation-of-cleaning-and-regeneration-methods-for-reliable-construction-of-dna-cantilever-biosensors\(4f22e9b3-3d4d-4890-9468-a7802d1adf95\).html](http://orbit.dtu.dk/en/publications/investigation-of-cleaning-and-regeneration-methods-for-reliable-construction-of-dna-cantilever-biosensors(4f22e9b3-3d4d-4890-9468-a7802d1adf95).html)

Zhengjian Lv, J. W. (14 de abril de 2010). Probing Specific Interaction Forces Between Human IgG and Rat Anti-Human IgG by Self-Assembled Monolayer and Atomic Force Microscopy. Nano Express.