



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Desarrollo de un genosensor piezoeléctrico

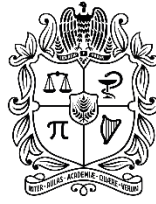
Kaory Barrientos Urdinola

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2019



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Piezoelectric genosensor

Kaory Barrientos Urdinola

Universidad Nacional de Colombia

Science Faculty

Medellín, Colombia

2019

Desarrollo de un genosensor piezoeléctrico

Kaory Barrientos Urdinola

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias – Biotecnología

Directora:

Ph. D. Marisol Jaramillo Grajales
Universidad EIA

Codirector:

Ph. D. Neil Aldrin Vásquez Araque
Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Tecnologías para la obtención y detección de biomarcadores

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica EIA (GIBEC)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2019

A mi familia

Agradecimientos

Esta tesis es fruto de muchos años de trabajo, en los que he podido compartir y conocer personas que me apoyaron tanto en lo profesional como en lo personal, es por esto que no puedo dejar de pasar la oportunidad sin darles un profundo agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer a Marisol Jaramillo, mi directora de tesis. Gracias Mari por el enorme apoyo que has sido durante toda mi carrera profesional, por ser no sólo mi directora desde el trabajo de grado de pregrado sino también mi mentora en todo este mundo académico, gracias por ser un apoyo indispensable y una “mamá” en todo este proceso de formación. No exagero si digo que sin ti, esta tesis no estaría escrita.

En segundo lugar, quiero agradecer a Neil Vásquez por su continuo apoyo en el desarrollo de esta tesis, por sus preguntas acertadas, por la formación en las exposiciones y por siempre darse cuenta de los “controles”. Gracias por siempre sacar un espacio de tiempo, aunque en la agenda no haya espacio.

De forma particular quiero agradecerle a Camilo Ortiz por el apoyo que ha sido en estos años, siempre he encontrado su ayuda cuando la he necesitado. Gracias por ayudarme en medio de mis frustraciones académicas desde el primer día en el laboratorio, por las charlas, los chistes, los viernes de clásicos y hasta compartir y apoyar mis ideas como el *splash* “espanta malas energías”. También quiero agradecer a Jorge Mario Guerra por los documentales de animales que hacían más llevaderas las horas de trabajo en el laboratorio, y por sus ofrendas para que el equipo funcionara.

Un profundo agradecimiento con María del Socorro Yepes, Paula Andrea Marín y Yeison Javier Montagutt por sus aportes, comentarios y sugerencias en este trabajo. Los tres han aportado mucho al desarrollo de esta tesis.

De manera muy especial me gustaría agradecerle a mi familia, a mis padres, hermanos y sobrinos por su constante apoyo y por preguntarme siempre como voy con la maestría, aunque no entiendan que es lo que hago. Quiero dar gracias especiales a Juanes por su apoyo, acompañamiento y soporte en la recta final de la tesis, gracias por escucharme varias horas hablando de este trabajo y por apoyarme, tener empatía y ayudar cuando lo he necesitado.

Sé que dejo muchos nombres por escribir, pero todos tienen un agradecimiento especial.

Resumen

Escherichia coli O157:H7 es un patógeno importante en la contaminación de alimentos que causa brotes con una alta morbilidad. Dado que los métodos tradicionales para su detección, a menudo tardan 24 horas en emitir el resultado, existe la necesidad de desarrollar nuevas metodologías que permitan una detección rápida, simple, confiable y específica. Bajo este escenario, el desarrollo de biosensores puede ser una alternativa para dar un resultado rápido cuando exista sospecha de contaminación. Un genosensor piezoeléctrico es un dispositivo capaz de modificar la frecuencia de vibración del cristal de cuarzo, debido a los cambios de masa producidos en la superficie del electrodo de oro, estos son el resultado de la interacción entre el biomarcador de interés y el biorreceptor génico que se encuentra inmovilizado a la superficie del transductor por medio de la interfaz biológica. El adecuado diseño y selección de los elementos específicos de reconocimiento biológico, la apropiada inmovilización sobre el transductor y la selección y desarrollo del sistema de caracterización, se convierten en tareas fundamentales para el éxito en el desarrollo de estos dispositivos de detección.

En esta investigación, se seleccionó como biomarcador del patógeno, una región del gen *rfbE*, que codifica para el antígeno O de la bacteria. Aplicando el método de fisisorción basado en la unión entre la proteína estreptavidina y la molécula biotina, se inmovilizó el biorreceptor génico sobre la superficie, para detectar la hibridación de este con su secuencia complementaria. Para la detección del evento biológico de interés, se utilizó un genosensor piezoeléctrico, configurado como microbalanza de cristal de cuarzo de alta frecuencia. Finalmente, se analizó el desempeño del dispositivo por medio de las características de especificidad, repetibilidad y reusabilidad.

Palabras clave: ADN, *Escherichia coli* O157:H7, genosensor, inmovilización, hibridación, microbalanza de cristal de cuarzo, HFF-QCM.

Abstract

Escherichia coli O157: H7 is a major pathogen in food contamination that causes outbreaks with high morbidity. The traditional methods for their detection often take a long time, therefore there is a need to develop new methodologies that allow rapid, simple, reliable and specific detection. Under this scenario, development in biosensors could offer an alternative for fast testing in suspected cases of bacterial contamination.

A piezoelectric genosensor is a device that is able to shift its quartz crystal frequency give mass changed on the surface of its gold electrode, which occur due to the interaction between the biomarker and the gene bioreceptor, which is immobilized on the transducer surface through biological interface.

The appropriate design and selection of the specific elements for biological recognition, adequate immobilization on the transducer and the selection and development of the characterization system, are essential tasks for successfully develop these devices.

In this research, it was selected a sequence of the *rfbE* gene as a biomarker, which encodes O-antigen in *Escherichia coli*. Applying the physisorption method based on the union between the streptavidin protein and the biotin molecule, the bioreceptor was immobilized on the surface for the detection of the complementary strand. The piezoelectric genosensor was configured to be a high-frequency quartz crystal microbalance. Finally, the performance of the device was analyzed assessing specificity, repeatability, and reusability characteristics.

Keywords: DNA, *Escherichia coli* O157:H7, genosensor, immobilization, hybridization, quartz cristal microbalance, HFF-QCM.

Contenido

	Pág.
Resumen	VIII
Abstract	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XVI
Lista de símbolos y abreviaturas.....	XVIII
Introducción	1
Objetivos	4
Objetivo General	4
Objetivos específicos	4
1 Generalidades sobre <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y su detección.....	5
1.1 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	5
1.1.1 <i>E. coli</i> productora de toxinas shiga (STEC) o productora de verotoxinas (VTEC)	6
1.1.1.1 <i>E. coli</i> O157:H7.....	7
1.1.1.2 Brotes a nivel mundial de <i>E. coli</i> O157:H7 productora de toxinas shiga (STEC) o productora de verotoxinas (VTEC).....	9
1.2 Métodos utilizados para la detección de <i>E. coli</i> O157:H7.....	11
1.2.1 Técnicas de cultivo.....	12
1.2.2 Inmunoensayos.....	12
1.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	13
1.2.4 Otros sistemas de detección	13

1.2.4.1 Biosensores	14
1.2.4.1.1 Genosensores piezoeléctricos.....	24
1.2.4.1.2 Métodos de fisisorción electrostática	25
1.2.4.1.3 Quimiadsorción.....	26
1.2.4.1.4 Avidina/Estreptavidina y Biotina.....	30
2 Selección y diseño de la secuencia de ADN.....	32
2.1 Introducción	32
2.2 Materiales y métodos.....	33
2.3 Resultados.....	35
2.3.1 Selección de la secuencia de ADN.....	35
2.3.2 Diseño de la sonda biorreceptora.....	38
2.4 Conclusiones	40
3 Desarrollo de un genosensor piezoeléctrico para la detección de <i>E. coli</i>	
O157:H7	41
3.1 Introducción	41
3.2 Materiales y métodos.....	43
3.2.1 Materiales	43
3.2.1.1 Cristales piezoeléctricos.....	43
3.2.1.2 Celda de flujo	44
3.2.1.3 Plataforma de medida	44
3.2.1.4 Reactivos	46
3.2.2 Métodos	47
3.2.2.1 Protocolo de lavado de la plataforma A20 y F20	47
3.2.2.2 Protocolo de inmovilización por medio de MSAM.....	47
3.2.2.3 Protocolo de inmovilización por medio de estreptavidina/biotina	51
3.3 Resultados.....	53
3.3.1 Inmovilización de sondas de ADN sobre el transductor piezoeléctrico de 150 MHz	53
3.3.1.1 Método MSAM	53
3.3.1.2 Método estreptavidina – biotina.....	61
3.3.1.3 Comparación metodologías de inmovilización.....	67

3.3.2	Análisis del proceso de hibridación	70
3.3.2.1	Recubrimiento molecular.....	71
3.3.2.2	Controles de hibridación.....	74
3.3.2.3	Variabilidad	77
3.3.2.4	Regeneración.....	79
3.3.3	Inmovilización e hibridación de sondas de ADN sobre cristales de 100 MHz .	85
3.3.4	Radios acústicos	88
3.4	Conclusiones	94
4	Conclusiones generales y recomendaciones.....	96
4.1	Conclusiones	96
4.2	Recomendaciones	97
5	Bibliografía.....	99

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Clasificación de <i>E. coli</i> de acuerdo al lugar de colonización en el organismo... 6	
Figura 1-2. Compilación de los 15 brotes por <i>E. coli</i> O157:H7 con mayor número de casos registrados entre 1982 y 2018 a nivel mundial..... 11	
Figura 1-3. Tendencia de publicación de documentos entre 1997 – 2018 sobre biosensores para la detección de <i>E. coli</i> O157:H7..... 14	
Figura 1-4. Esquema de un biosensor..... 16	
Figura 1-5. Clasificación de los biosensores..... 18	
Figura 1-6. Modelo de ADN. A. Representación contorno cintas. B. Estructura química.. 20	
Figura 1-7. Partes de un alcanotiol..... 27	
Figura 1-8. Monocapa autoensamblada (SAM)..... 28	
Figura 1-9. Monocapas autoensambladas mixtas (MSAM)..... 30	
Figura 1-10. Inmovilización de cadenas de ADN por medio de la unión entre la proteína estreptavidina y la molécula biotina. A. Inmovilización de la proteína estreptavidina. B. Unión entre la proteína estreptavidina y la molécula de biotina conjugada en el extremo de la molécula de ADN..... 32	
Figura 2-1. Matriz de priorización para la selección del analito de interés..... 37	
Figura 3-1. Cristal de cuarzo recubierto de oro. A. 50 y 100 MHz. B. 5 MHz..... 43	
Figura 3-2. A. Celda de flujo para cristales de 50 y 100 MHz. B. Celda de flujo para cristales de 5 MHz..... 44	
Figura 3-3. Plataforma A20..... 45	
Figura 3-4. Plataforma F20..... 45	
Figura 3-5. Conexión entre la plataforma A20 y F20. A. Esquema del circuito de fluidica. B. Imagen de las plataformas..... 46	
Figura 3-6. Reacción EDC/NHS..... 49	

Figura 3-7. Esquema de las etapas de inmovilización e hibridación de cadenas de ADN por medio de MSAM	51
Figura 3-8. Esquema de las etapas de inmovilización e hibridación por medio de la unión entre la proteína estreptavidina y la molécula de biotina	53
Figura 3-9. Estructura hexagonal de alcanotioles. A. Estructura hexagonal triple. B. Estructura hexagonal de cadena de alcanotioles en modelo de conectivas	54
Figura 3-10. Ensayo de hibridación por medio de la técnica MSAM en un cristal piezoeléctrico de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz)	57
Figura 3-11. Representación tridimensional en contorno de cinta de la unión estreptavidina – biotina (PDB ID 2IZG)	61
Figura 3-12. Estructura tridimensional de la proteína estreptavidina (PDB ID 2IZG). A. Representación en contorno de cintas. B. Representación en contorno de superficie. C. Representación de los aminoácidos Lisina (verde) y Arginina (amarillo) en la proteína modelo de esferas. D. Representación del elemento nitrógeno (anaranjado) de los aminoácidos Lisina (verde) y Arginina (amarillo) en la proteína modelo de esferas	62
Figura 3-13. Ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en un cristal piezoeléctrico de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz)	64
Figura 3-14. Ensayo de recubrimiento molecular en un cristal piezoeléctrico de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz).....	71
Figura 3-15. Ensayo de control de hibridación en un cristal piezoeléctrico de 100 MHz ...	74
Figura 3-16. Ensayo de control de hibridación en un cristal piezoeléctrico de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz)	76
Figura 3-17. Regeneración de la superficie con 0.02 M de NaOH.....	80
Figura 3-18. Regeneración de la superficie con 0.01 M de NaOH.....	81
Figura 3-19. Regeneración de la superficie con 0.012 M de NaOH.....	83
Figura 3-20. Regeneración de la superficie con 0.014 M de NaOH.....	83
Figura 3-21. Ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en un cristal piezoeléctrico de 100 MHz	86
Figura 3-22. Ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en un cristal piezoeléctrico de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz)	89
Figura 3-23. Ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en un cristal piezoeléctrico de 100 MHz	90

Figura 3-24. Ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en un cristal piezoeléctrico de 5 MHz en el séptimo armónico (35 MHz) 93

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1. Valores mínimos, deseables y puntuación de las características de la secuencia de <i>E. coli</i> O157:H7.....	34
Tabla 2-2. Resumen de criterios considerados para la selección de la secuencia	35
Tabla 2-3. Representación de secuencias de ADN con modificaciones en los extremos 3' y 5'	39
Tabla 3-1. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de hibridación por medio de la técnica MSAM.....	58
Tabla 3-2. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina.....	65
Tabla 3-3. Comparación metodologías de inmovilización.....	69
Tabla 3-4. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de recubrimiento molecular.....	72
Tabla 3-5. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de control de hibridación.....	75
Tabla 3-6. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de control de hibridación.....	77
Tabla 3-7. Ensayos de repetibilidad	78
Tabla 3-8. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de regeneración por medio de solución de NaOH 0.02 M.....	80
Tabla 3-9. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de regeneración por medio de solución de NaOH 0.01 M.....	82
Tabla 3-10. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de regeneración por medio de solución de NaOH 0.012 y 0.014 M	84
Tabla 3-11. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina.....	86
Tabla 3-12. Cambios de frecuencia, masa y disipación; del ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en cristales de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz).....	90

Tabla 3-13. Cambios de frecuencia, masa y disipación; del ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en cristales de 100 MHz	91
Tabla 3-14. Cambios de frecuencia, masa y disipación; del ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en cristales de 5 MHz en el séptimo armónico	94

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Ubicación
f	Frecuencia natural de resonancia	Hz	<i>Piezoeléctricos</i>
A_p	Área sensible	cm^2	<i>Piezoeléctricos</i>
C_f	Factor de sensibilidad del cristal	$\frac{kg \cdot s}{m^2}$	Piezoeléctricos
K_a	Constante de afinidad	M	Avidina/Estreptavidina y Biotina
m_L	Masa de líquido perturbada	$\frac{ng}{mm^2}$	<i>Piezoeléctricos</i>
CH_3CH_2OH	Etanol		Materiales
H_2O_2	Peróxido de hidrogeno		Materiales
KOH	Hidróxido de potasio		Materiales
$NH_2CH_2CH_2OH$	Etanolamina		Materiales

Símbolo	Término	Unidad SI	Ubicación
$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	Biotina		Materiales
CO_2	Dióxido de carbono		Métodos
H_2O	Agua		Métodos
N	Nitrógeno		Métodos
O_2	Oxígeno		Métodos
NaOH	Hidróxido de sodio		Métodos

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Ubicación
μ_p	Módulo de corte	$\frac{g}{cm \cdot s^2}$	Piezoeléctricos
ρ_p	Densidad del resonador	$\frac{g}{cm^3}$	Piezoeléctricos
$\Delta\varphi$	Cambio de fase	V	Piezoeléctricos
Δf	Cambio en la frecuencia del resonador	Hz	<i>Piezoeléctricos</i>

Símbolo	Término	Unidad SI	Ubicación
Δm	Cambio en la masa	$\frac{ng}{cm^2}$	<i>Piezoeléctricos</i>
ΔD	Cambio en la disipación de energía		Radios acústicos

Abreviaturas

Abreviatura Término

A Adenina

ADN Ácido desoxirribonucleico

AFM *Atomic force microscopy*

C Citosina

CDC *Centers for disease control and prevention*

CH Colitis hemorrágica

CRISPR *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

CV *Cyclic voltammetry*

Abreviatura Término

DAEC *Diffusely adherent Escherichia coli*

DEC *Diarrheagenic Escherichia coli*

E. coli Escherichia coli

EAggEC *Enteroggregative Escherichia coli*

ECDC *European centre for disease prevention and control*

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

EEUU Estados Unidos de América

EIEC *Enteroinvasive Escherichia coli*

ELISA *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EPEC *Enteropathogenic Escherichia coli*

ETEC *Enterotoxigenic Escherichia coli*

ExPEC *Extraintestinal pathogenic Escherichia coli*

Abreviatura Término

FTIR *Fourier transform infrared spectroscopy*

G Guanina

HFF-QCM *High fundamental frequency quartz cristal
microbalance*

IMS Inmunomagnética

IUPAC *International Union of Pure and Applied
Chemistry*

Kpb Kilo pares de bases

LEE *Locus of enterocyte effacement*

LPS Lipopolisacáridos bacterianos

MHDA *16-Mercaptohexadecanoic acid*

Mpb Mega pares de bases

MSAM *Mixed self assembled monolayers*

MUD *11-Mercapto-1-undecanol*

Abreviatura Término

OMS Organización Mundial de la Salud

PBS *Phosphate buffered saline*

PCR *Polymerase chain reaction*

PEEK *Polyether ether ketone*

PFTE *Polytetrafluoroethylene*

PMMA *Poly methyl methacrylate*

PSU *Polysulfone*

QCM Microbalanza de cristal de cuarzo

SAM *Self assembled monolayers*

SAW Onda acústica superficial

SD *Standard deviation*

SDS *Sodium dodecyl sulfate*

SFG *Sum-frequency generation*

Abreviatura Término

SHG *Second-harmonic generation*

SPR *Superficial plasmon resonance*

STEC *Shiga toxin-producing Escherichia coli*

STM *Scanning tunneling microscopy*

Stxs *Shiga toxins*

SUH Síndrome urémico hemolítico

T Timina

Taq *Thermus aquaticus*

Tris Tris(hidroximetil)aminometano

U Uracilo

UPEC *Uropathogenic Escherichia coli*

VT1 Verotoxina 1

VT2 Verotoxina 2

Abreviatura Término

VTEC *Verotoxin-producing Escherichia coli*

VTs *Verotoxins*

XPS *X-ray photoelectron spectroscopy*

Introducción

El centro de control y prevención de enfermedades en EEUU, estima que cada año se detectan aproximadamente 265000 infecciones causadas por *Escherichia coli* enteropatógena, de las cuales el 36% es por la acción de la cepa *Escherichia coli* O157:H7 [1]. A pesar de que los brotes reportados en EEUU para este patógeno han disminuido desde 1999, continúan ocurriendo casos esporádicos, por lo que la carga para el sistema fiscal se ha estimado en 405 millones de dólares incluyendo la pérdida de productividad, cuidados médicos y muertes prematuras [2,3]. En Colombia, aunque no se cuentan con reportes sobre la morbilidad, mortalidad y pérdida de productividad causada por *Escherichia coli* O157:H7, el Ministerio de agricultura y desarrollo rural y el Ministerio de salud y protección social establecieron, por medio de la Resolución 2690 de 2015, las directrices para la formulación del programa de verificación microbiológica del sistema oficial de inspección, vigilancia y control de la carne y productos cárnicos comestibles, en el que se incluye *Escherichia coli* O157:H7 como uno de los microorganismos de verificación, considerando el riesgo que presenta para el consumidor, ya que es comúnmente asociada a manifestaciones clínicas muy severas como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico [4,5].

Desde el reconocimiento de esta cepa como un patógeno humano, se han desarrollado varios métodos para su detección y cuantificación, tales como ensayos microbiológicos, bioquímicos e inmunológicos; los cuales, en su mayoría, tardan 24 horas en emitir el resultado, no son miniaturizables, están restringidas al espacio de los laboratorios, requieren equipos y personal capacitado para llevar a cabo las pruebas y utilizan secuencias marcadas con enzimas, fluorocromos o materiales radioactivos [6]; por lo que el desarrollo de nuevas metodologías para la detección e identificación microbiológica de *Escherichia coli* O157:H7, que permitan obtener resultados en tiempo real y de manera rápida, específica, sensible y libre de marcaje fluorescente o radiactivo; como los biosensores, representan una nueva forma de aportar a la inspección, vigilancia y control de esta cepa patógena.

Los biosensores son dispositivos que acoplan una interfaz biológica a un sistema de transducción para transformar un evento de reconocimiento biológico entre el analito de interés y su receptor específico, en una señal electromagnética que puede ser medida y cuantificada [7]. Estos dispositivos pueden ser clasificados de acuerdo al sistema de transducción, es decir, por el principio físico subyacente en el fenómeno de transformación del evento biológico; y según el elemento de reconocimiento, el cual condiciona la aplicación y tipo de reacción que ocurre entre el receptor y el analito [8]. Así, cuando el componente biológico son ácidos nucleicos y la reacción de reconocimiento molecular es la hibridación de estos, el dispositivo recibe el nombre de genosensor.

Los biosensores, específicamente genosensores piezoeléctricos de alta frecuencia (*HFF-QCM*, *high fundamental frequency – quartz cristal microbalance*), detectan los cambios de masa producidos por la hibridación entre ácidos nucleicos por medio de la variación en la fase o la frecuencia del cristal [9]. Los biosensores piezoeléctricos convencionales emplean una Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM) con una frecuencia de resonancia entre 5 y 30 MHz; y se considera que tienen una sensibilidad más baja con respecto a otros tipos de transductores [10]. Una de las metodologías utilizadas para mejorar la sensibilidad del dispositivo consiste en aumentar la frecuencia de resonancia, sin embargo, el incremento en la sensibilidad está influenciado negativamente por el aumento del ruido debido a la inestabilidad que presenta el dispositivo en altas frecuencias. Para resolver este problema, un nuevo método fue propuesto por Montagut [11], el cual permite mejorar la relación señal/ruido utilizando una frecuencia de resonancia de 100 y 150 MHz.

Este biosensor piezoeléctrico de alta frecuencia se ha empleado, hasta el momento, en el desarrollo de inmunosensores para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* [12] y el pesticida carbaril [13,14]. Es por esto que los resultados de la presente investigación se consideran novedosos y constituirán la base fundamental para el diseño y construcción de genosensores piezoeléctricos de alta frecuencia, los cuales se consideran una herramienta nueva y prometedora para la detección de la hibridación de cadenas de ADN en tiempo real y libre de marcaje fluorescente o radioactivo.

El propósito del presente trabajo fue desarrollar un genosensor piezoeléctrico de alta frecuencia, para la detección de un gen específico de *Escherichia coli* O157:H7. Para esto, se analizó la secuencia que serviría como indicador biológico y específico del patógeno, además de evaluar dos metodologías diferentes de funcionalización y analizar el

desempeño del dispositivo mediante los parámetros de especificidad, reusabilidad y repetibilidad. Además, se evaluó la viabilidad de los ensayos mediante la disipación de energía de la superficie sensora, y se corroboró el modelo molecular planteado, a través del cálculo del radio acústico para la molécula que se utilizó para verificar el proceso de hibridación.

Objetivos

Objetivo General

Desarrollar un genosensor piezoeléctrico de alta frecuencia para la detección de un organismo modelo.

Objetivos específicos

- Evaluar parámetros de inmovilización de las sondas de ADN biorreceptoras sobre la superficie del electrodo de oro de cristal de cuarzo del genosensor piezoeléctrico de alta frecuencia.
- Evaluar la hibridación de secuencias de ADN de un organismo modelo sobre el transductor de un genosensor piezoeléctrico de alta frecuencia.

1 Generalidades sobre *Escherichia coli* O157:H7 y su detección

1.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

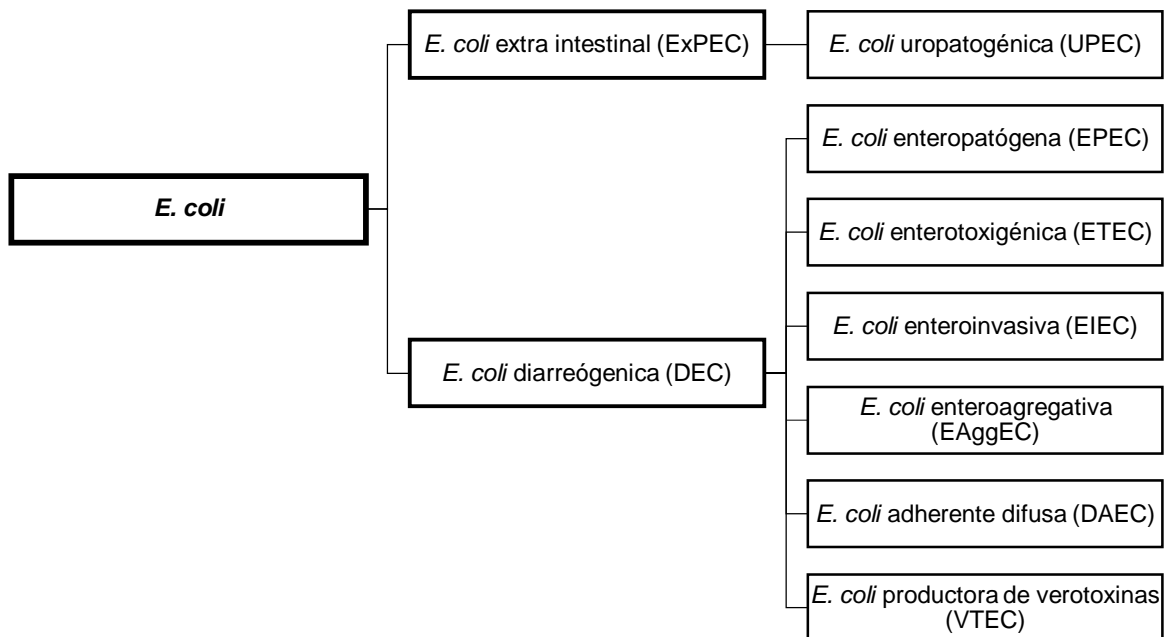
En 1885, Theodor Escherich identificó a la bacteria *E. coli* a partir de un cultivo de heces de niños saludables. Esta bacteria pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y es un bacilo Gram negativo, no formador de esporas y usualmente móvil por medio de flagelos peritricos. *E. coli* es una bacteria anaerobia facultativa que produce gas a partir de la fermentación de carbohidratos, tiene actividad β -galactosidasa y la mayoría están microcapsuladas en polisacáridos ácidos [15].

E. coli es conocida como una de las especies bacterianas con mayor adaptabilidad a diferentes nichos, ya sea en el ambiente o en el interior de algunos organismos. Este bacilo coloniza el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente incluyendo la especie humana, y establece una relación de simbiosis con su hospedero, ya que contribuye a mantener el equilibrio entre las especies bacterianas que se encuentran en la microbiota digestiva [16], e interviene en el metabolismo de sustancias como el ácido fólico, biotina, vitaminas B₁₂, K y E [17].

E. coli es un organismo natural de la microbiota intestinal, pero algunas de sus cepas han adquirido factores de virulencia y son responsables de causar varias enfermedades en sus hospederos. Las especies de *E. coli* nocivas se clasifican de acuerdo al lugar de colonización en el organismo en dos grupos patogénicos: *E. coli* extraintestinal (ExPEC, *extraintestinal pathogenic Escherichia coli*) que infecta compartimentos corporales fuera del ambiente entérico y, *E. coli* diarreógena (DEC, *diarrheagenic Escherichia coli*) la cual altera las funciones del tracto gastrointestinal. ExPEC incluye la *E. coli* uropatógena (UPEC, *uropathogenic Escherichia coli*), la cual causa el 70 – 95% de casos de infección en el tracto urinario; y es comúnmente asociada a los casos de meningitis neonatal. Por otro lado, DEC causa gastroenteritis y es responsable de varios síndromes y enfermedades diarreicas, las cuales tienen un mecanismo propio de colonización y se clasifican de acuerdo al grupo específico de toxinas que producen: *E. coli* enteropatógena (EPEC,

enteropathogenic Escherichia coli), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC, *enterotoxigenic Escherichia coli*), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, *enteroinvasive Escherichia coli*), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC, *enteroaggregative Escherichia coli*), *E. coli* adherente difusa (DAEC, *diffusely adherent Escherichia coli*) y *E. coli* productora de toxinas shiga (STEC, *shiga toxin-producing Escherichia coli*) o productora de verotoxinas (VTEC, *verotoxin-producing Escherichia coli*) [15,18,19]. En el esquema de la Figura 1-1, se muestra la clasificación de la bacteria *E. coli* según el lugar de colonización en el hospedero.

Figura 1-1. Clasificación de *E. coli* de acuerdo al lugar de colonización en el organismo



1.1.1 *E. coli* productora de toxinas shiga (STEC) o productora de verotoxinas (VTEC)

Hasta la fecha, VTEC son las *E. coli* más virulentas clasificadas en el grupo DEC [19]. Su principal característica es la capacidad de sintetizar citotoxinas denominadas verotoxinas (VTs, *verotoxins*), las cuales son capaces de bloquear la síntesis de proteínas y producir la muerte celular. Las VTs son también llamadas toxinas shiga (Stxs, *shiga toxins*) debido a la similitud estructural con la exotoxina producida por *Shigella dysenteriae* [20].

El tracto intestinal de los rumiantes se considera el reservorio natural de STEC, la cual puede ser liberada al medio a través de las heces, que pueden contaminar la carne durante las operaciones de procesamiento, llevadas a corrientes de agua, ser depositadas sobre frutas

y verduras por el uso de abonos orgánicos o agua de riego contaminadas por aguas residuales, también por contacto directo con animales y personas positivas para STEC [21].

Las bacterias STEC constituyen un grupo heterogéneo de aproximadamente 400 serotipos diferentes, no todos asociados a patologías humanas. Los serotipos de gran incidencia en salud pública son O157:H7, O26, O91, O103, O104, O111, O113, O117, O118, O121, O128 y O145; destacándose O157:H7 como la cepa predominante, ya que se estima que cerca del 50% de brotes que causan colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (SUH), son causadas por este serotipo [22,23]. La CH se caracteriza por tener un cuadro clínico marcado con dolores abdominales y diarrea, seguido de una descarga hemorrágica [22]; esta patología hace parte del conjunto de enfermedades diarreicas, las cuales son la segunda causa de muerte, a nivel mundial, de niños menores de cinco años [24]. Por otra parte, el SUH está clínicamente caracterizado por un conteo bajo de plaquetas, insuficiencia renal aguda y anemia hemolítica no inmunitaria; la mayoría de pacientes que desarrollan el SUH requieren una transfusión de sangre o una diálisis debido al fallo renal que se presenta por la acción de las Stxs sobre el endotelio glomerular, y algunos casos reportan discapacidad neurológica debido a lesiones isquémicas causadas por la acción de las toxinas en las células cerebrales endoteliales [19].

1.1.1.1 *E. coli* O157:H7

E. coli O157: H7 fue descrita por primera vez en 1982 como un patógeno humano asociado con brotes de colitis hemorrágica en Oregón y Michigan, EEUU [25]. Luego en 1983, Karmali *et al.* reportaron una asociación entre la infección de *E. coli* que produce Stxs (incluyendo la cepa O157: H7) y el síndrome urémico hemolítico [26].

Esta cepa de *E. coli* expresa el antígeno somático (O) 157 y el antígeno flagelar (H) 7, retrasa la fermentación de D-sorbitol, es incapaz de producir β -glucuronidasa y no crece a una temperatura de 45.5 °C [27]. El tamaño del genoma de este serotipo es de 5.5 mega pares de bases (Mpb), el cual incluye 4.1 Mpb que se conservan en todas las cepas de *E. coli* y 1.4 Mpb representan las secuencias específicas para el serotipo, de las cuales la mayoría pertenece a ADN transferido horizontalmente y por recombinación, a partir de profagos y elementos parecidos a profagos. En el genoma de *E. coli* O157: H7 se encuentra un cambio de contenido de guanina (G) y citosina (C), con respecto a la cepa no patogénica *E. coli* K12, lo cual indica que se ha adquirido una región genómica por transferencia

horizontal [28]. Putonti *et al.* [29] estiman que al menos 53 especies diferentes de otras bacterias y elementos como profagos, han contribuido al desarrollo de las secuencias únicas de *E. coli* O157: H7 [3]; esto se da debido a que este serotipo es hábil en incorporar ADN foráneo como resultado de altas tasas de defectos en los mecanismos de reparación del ADN [28,30].

Entre las características más importantes de virulencia de *E. coli* O157, se encuentra su habilidad para producir una o más VTs. La verotoxina 1 (VT1) es indistinguible de la toxina shiga producida por *Shigella dysenteriae*, en cambio la verotoxina 2 (VT2) solo tiene 56% de homología en la secuencia de aminoácidos con VT1 [28]. En Europa el 25% del serogrupo *E. coli* O157 produce las toxinas VT1 y VT2, mientras que el 75% restante solo produce VT2. En cambio, en Norte América y Japón más del 80% de esta cepa produce ambas toxinas [31].

VT1 y VT2 pertenecen a una familia de toxinas conocidas como AB₅, la unidad A consta de dos subunidades, A₁ y A₂, mientras que la unidad B consta de cinco subunidades. Las VTs atacan los tejidos del hospedero, en cuyas membranas celulares se encuentran receptores identificados como globotriaosilceramidas (Gb₃), estos glucoesfingolípidos son abundantes en especial en los tejidos renales y el sistema nervioso central. El pentámero de las toxinas es la unidad responsable de ubicar al receptor Gb₃, mientras que la subunidad A₁ es la parte activa, con acción enzimática sobre la subunidad ribosomal 60S (de la célula blanco) que conduce a un bloqueo de la síntesis de proteínas en la célula afectada; la subunidad A₂ opera como puente entre A₁ y B₅ [30].

La producción de VTs no es suficiente para causar la CH o el SUH, es necesaria la contribución de otros factores de virulencia como el plásmido pO157 y el locus de esfecelamiento del enterocito (LEE, *locus of enterocyte effacement*), otra característica de las STEC. El plásmido codifica la proteasa de serina extracelular (*espP*), la peroxidasa – catalasa (*katP*), la proteína – tirosina de *E. coli* (*etp*) y la hemolisina A (*hlyA*); las cuales en combinación con sistemas de transporte especializados de la bacteria, permiten que *E. coli* O157 utilice como fuente de hierro la sangre que es liberada en el intestino. El locus LEE codifica el sistema de secreción tipo III y las proteínas asociadas a la formación de lesiones patológicas en las células epiteliales intestinales [32].

Todas las cepas de *E. coli* que se asocian a la CH y el SUH expresan el antígeno somático O que induce inmunidad humeral bactericida en huéspedes infectados. La región rfb es un segmento complejo que ha adquirido secuencias por medio de transferencia horizontal de genes, y han sido importantes en la evolución de la patogenicidad de la bacteria. Esta región varía en una longitud entre 8 – 14 kilo pares de bases (kpb), y contiene genes que expresan las enzimas necesarias para la síntesis de las cadenas laterales del antígeno somático O de lipopolisacáridos bacterianos (LPS, lipopolisacáridos bacterianos), el cual le confiere la especificidad del serogrupo. Las cepas estrechamente relacionadas de *E. coli* tienen distintos genes rfb que expresan antígenos O diferentes, específicamente para el serotipo O157:H7 se reporta la región rfbE, la cual es muy utilizada en el desarrollo de métodos de detección que utilizan secuencias de ADN, debido a que las cadenas laterales del antígeno O se constituyen como moléculas de superficie inmunodominantes [33–35].

1.1.1.2 Brotes a nivel mundial de *E. coli* O157:H7 productora de toxinas shiga (STEC) o productora de verotoxinas (VTEC)

En 1982 se detectó el primer brote por contaminación de alimentos, y fue causado por sándwiches que contenían carne de res poco cocida, expandidas en un restaurante de comida rápida en EEUU [25]. En 1993, un brote que involucró a 700 individuos en cuatro estados de EEUU, reportó 51 casos de SUH y causó la muerte de 4 individuos, el foco de contaminación fue carne de res poco cocida. A partir de estos episodios, se comenzó a asociar los procesos de manufactura de la carne como potenciales fuentes de contaminación con el serotipo *E. coli* O157:H7 [25,26]. En el mismo año, otros brotes surgieron en 26 estados de EEUU, en el que se reportaron 102 individuos hospitalizados, 31 de ellos desarrollaron SUH y 3 murieron; en estos casos el foco de contaminación fue un lote de espinaca fresca [36].

Entre 2000 – 2018, la mortalidad de casos reportados en EEUU por patologías causadas debido a la acción de *E. coli* O157:H7 ha disminuido, esto se debe a las normas adoptadas por los productores de alimentos y las compañías transportadoras. Sin embargo, en esos 18 años se han reportado 1132 casos de infección por este patógeno, en los que las fuentes de contaminación más frecuentes son la carne de res, las verduras de hojas verdes y los lácteos, como el queso y la mantequilla [1].

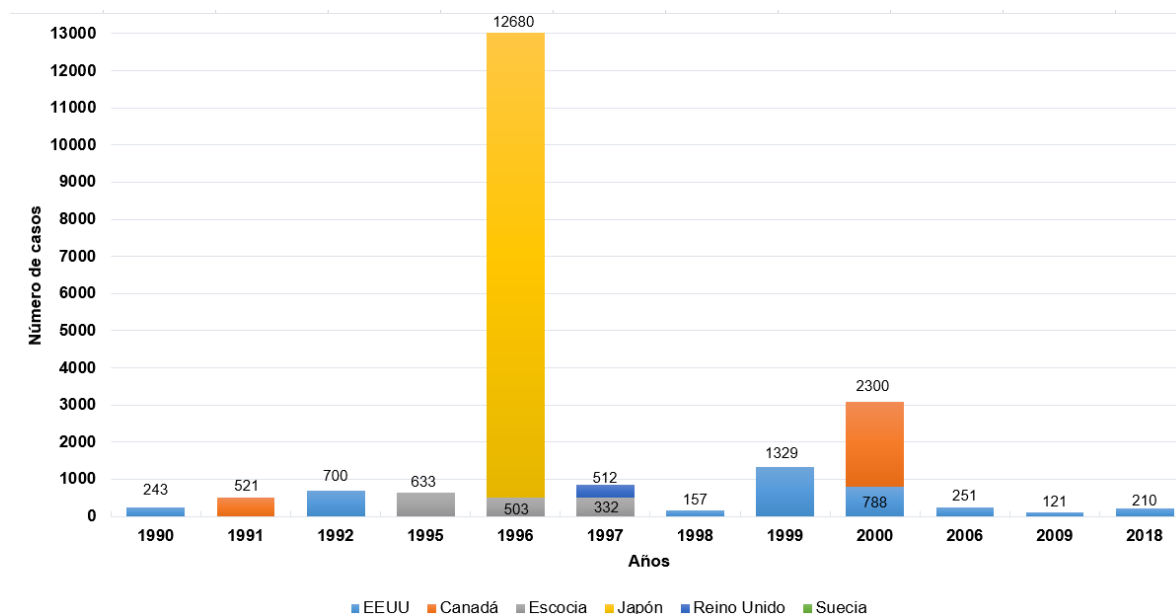
En los países europeos se han reportado menos casos en relación a EEUU, debido a que el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC, *European centre for disease prevention and control*) solo fue establecido en 2005; por esta razón es más difícil estimar la incidencia real de casos debidos a *E. coli* O157:H7 [37]. A pesar de esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 633 casos de infección en Escocia durante 1995, y se estableció una fuente hídrica como el foco de infección [38]. El caso más reciente, fue reportado en 2017 por las autoridades alemanas, en el que se encontraron bacterias patogénicas y resistentes a antibióticos en un kit de ingeniería CRISPR (*CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), el cual es producido y comercializado en EEUU bajo el uso de “do-it-yourself” [39].

El mayor brote de *E. coli* O157:H7, desde su descubrimiento en 1982, ocurrió en la ciudad de Sakai, Japón en 1996; en el que se reportaron 12680 casos de infección y 12 muertes, debido al consumo de ensaladas en una escuela pública de básica secundaria [37].

En Colombia, el Instituto Nacional de Salud publicó en 2015 un documento sobre la evaluación de riesgos e inocuidad de alimentos, en el que se reportan de acuerdo a la información suministrada por el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública, que durante los años 2011 – 2014 se presentaron 21 brotes relacionados al consumo de queso contaminado con *E. coli*. Sin embargo, las cepas bacterianas aisladas no fueron serotipificadas, por lo que no puede asociarse a O157:H7 o cualquier otra cepa patógena [40]. A pesar de esto, la revista Lasallista de investigación publicó en el 2013, un artículo, en el que se identificó el serotipo O157:H7 en aproximadamente el 28% de las muestras que se evaluaron, a partir de carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena [41]. Estos pocos casos conocidos, demuestran la necesidad de llevar a cabo estudios con el propósito de detectar el serotipo O157:H7 en alimentos de origen cárnico y no cárnico, con el fin de establecer controles más rigurosos a los proveedores y distribuidores de alimentos. Es por esto que el Ministerio de agricultura y desarrollo rural y el ministerio de salud y protección social, establecieron por medio de la Resolución 2690 de 2015, las directrices para la formulación del programa de verificación microbiológica del sistema oficial de inspección, vigilancia y control de la carne y productos cárnicos comestibles, en el que se incluye *E. coli* O157:H7 como uno de los microorganismos de verificación, considerando el riesgo que presenta para el consumidor [5].

La Figura 1-2 muestra la compilación de los 15 brotes por *E. coli* O157:H7 con mayor número de casos registrados entre 1982 y 2018 a nivel mundial.

Figura 1-2. Compilación de los 15 brotes por *E. coli* O157:H7 con mayor número de casos registrados entre 1982 y 2018 a nivel mundial



En el 2010, el centro de control y prevención de enfermedades (CDC, *centers for disease control and prevention*) en EEUU estimó que las infecciones causadas por *E. coli* O157:H7 son aproximadamente 73000 al año, lo que conlleva a 2200 hospitalizaciones y 60 muertes en ese mismo periodo. A pesar de que los brotes reportados para este patógeno han disminuido desde 1999, continúan ocurriendo casos esporádicos, por lo que la carga para el sistema fiscal se ha estimado en 405 millones de dólares, incluyendo la pérdida de productividad, cuidados médicos y muertes prematuras [2,3].

1.2 Métodos utilizados para la detección de *E. coli* O157:H7

La detección de este patógeno se realiza principalmente por métodos basados en el cultivo de microorganismos, sin embargo se trabaja en la implementación de otras metodologías más rápidas basadas en la detección de biomarcadores, tales como los inmunoensayos y técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*), ya que estas biomoléculas se constituyen en una herramienta fiable y pueden usarse como indicadores de la severidad o el progreso de una infección causada por una

cepa de *E. coli* patógena como O157:H7, así como también, puede emplearse para hacer seguimiento de la eficacia del tratamiento aplicado al paciente [42]. A continuación, se hace una descripción de los métodos más empleados para la detección e identificación de *E. coli* O157:H7.

1.2.1 Técnicas de cultivo

El retraso en la fermentación de D-sorbitol se utiliza como marcador bioquímico para diferenciar esta cepa de otras no patogénicas. Los medios de cultivo selectivos como Sorbitol – MacConkey (SMAC), se utiliza para identificar colonias sospechosas a partir de heces. Este agar se considera como un medio de selección y no una forma definitiva de diagnóstico, por lo que se han desarrollado otros medios de confirmación como Fluorocult® *E. coli* O157:H7 (Merck, Alemania), agar Chromocult® (Merck, Alemania), agar Rainbow® O157 (Biolog, USA), medio de cultivo Biosynth® O157:H7 (Biosynth, Suiza) y el enriquecimiento de SMAC a través de la adición de cefixima y ramnosa (CR-SMAC), cefixima y telurito de potasio (CT-SMAC), y 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido (MSA-MUG).

A pesar del mejoramiento en los medios de cultivo, los resultados de estos métodos demoran aproximadamente 24 horas; recientemente se han reportado algunas cepas de *E. coli* O157:H7 capaces de fermentar sorbitol, lo que conduce a una pérdida de identificación de la bacteria [15,43].

1.2.2 Inmunoensayos

Se han implementado con mucho éxito para la detección de células bacterianas, esporas, virus y toxinas. La base de estas técnicas es la interacción antígeno – anticuerpo [44]. Para el serotipo O157:H7 se emplean comúnmente los antígenos somático O157, el flagelar H7 y/o los factores de virulencia asociados con las VTs. Algunos de los inmunoensayos que se realizan son: la separación inmunomagnética (IMS, *immunomagnetic separation*), la cual permite la captura, separación y concentración de la bacteria a través de partículas sintetizadas a partir de Fe_2O_4 y Fe_3O_4 que vienen conjugadas con el anticuerpo de interés [43,45]. Los ensayos tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizan el anticuerpo conjugado con una enzima que permite un cambio de color en presencia del antígeno [46]. Los inmunoensayos de flujo lateral que utilizan anticuerpos conjugados con metales pesados e inmovilizados sobre una membrana de nitrocelulosa, para dejar pasar la muestra por capilaridad y permitir la interacción entre el antígeno presente en la muestra

y su respectivo anticuerpo [47]. Finalmente, los ensayos de aglutinación usan partículas de látex recubiertas con anticuerpo, de manera que cuando se da la interacción antígeno – anticuerpo, se observa un agregado o aglutinado [3]. A pesar de la alta sensibilidad y especificidad de estas técnicas, resultan muy costosas debido a la complejidad de los procesos de producción de anticuerpos monoclonales [48].

1.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica de amplificación genética, que se basa en la habilidad *in vitro* de la enzima Taq polimerasa para producir copias complementarias de segmentos específicos de ADN a partir de una secuencia molde. Esta metodología emplea un par de oligonucleótidos llamados cebadores, que corresponden a segmentos de ADN que limitan la región de interés y se utilizan como iniciadores de la polimerización enzimática, para obtener una acumulación exponencial del fragmento específico de ADN [49]. Hay varias modalidades de PCR, siendo las más empleadas la convencional o punto final y la cuantitativa o PCR en tiempo real, la primera requiere un revelado por electroforesis, mientras que la segunda permite la cuantificación del producto por medio de la señal de intensidad de fluorescencia emitida por las sondas génicas específicas, que hibridan con la región de interés [50]. Estas técnicas se han empleado con éxito en la detección de *E. coli* O157: H7 en muestras de agua, alimentos y heces; sin embargo, la extracción de la muestra es laboriosa, y existen muchos riesgos de contaminación e inhibición de la enzima Taq polimerasa, los cuales pueden inducir a falsos positivos y falsos negativos, respectivamente [51,52].

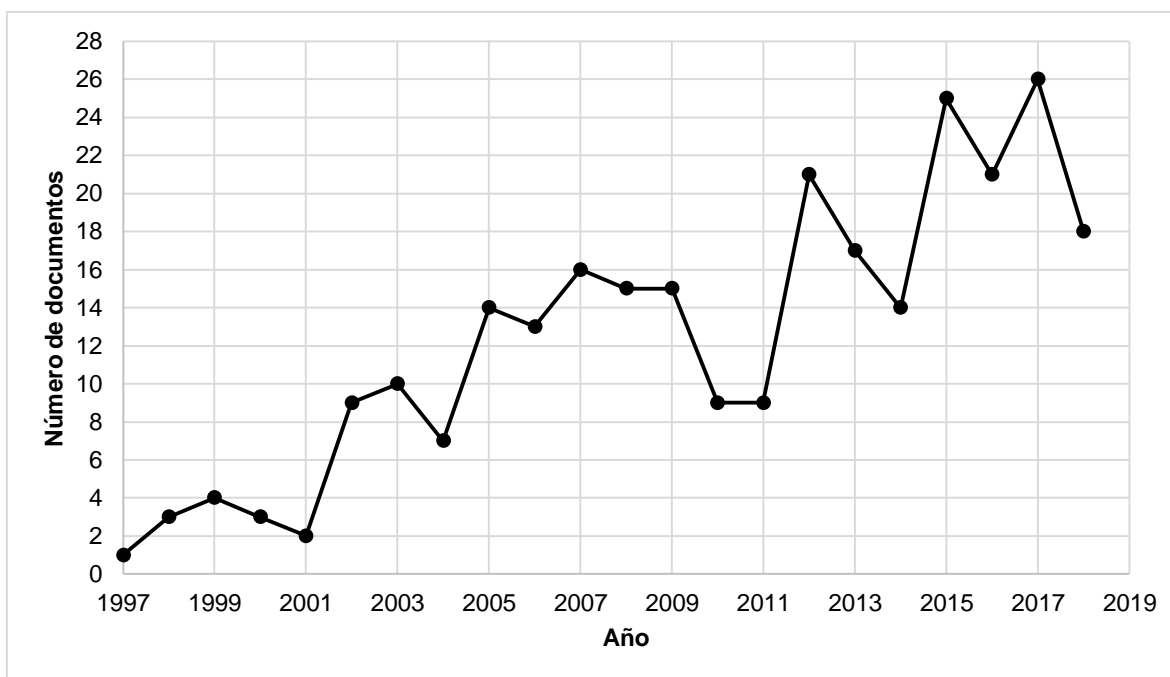
1.2.4 Otros sistemas de detección

Se han propuesto nuevos sistemas de detección biológica para la identificación y cuantificación de microorganismos patógenos, como nanopartículas fluorescentes [53–55] y biosensores [4,56–58]. Estos últimos, son dispositivos que se basan en el acople de una interfaz biológica con un sistema de transducción, para transformar un evento de reconocimiento biológico entre el analito de interés y su receptor específico, en una señal electromagnética que puede medirse y cuantificarse [7].

De acuerdo a la base de datos de Scopus, se han reportado 281 documentos relacionados con biosensores para la detección de la cepa patógena *E. coli* O157:H7 entre 1997 y 2019. De esos 281 documentos el 80.1% son artículos de investigación, 2.1% son sobre el estado de la técnica aplicada a la detección de la bacteria, 17.4% son memorias de congresos y el

0.4% pertenece a capítulos de libros. El país que lidera la producción de literatura científica es EEUU, el cual a través del CDC ha hecho un seguimiento riguroso de muestreo y serotipificación del patógeno, con el fin de diseñar y establecer controles a los proveedores y distribuidores de alimentos [37]. La Figura 1-3 muestra la tendencia positiva sobre la publicación de documentos desde 1997, lo que muestra la importancia y el interés por desarrollar biosensores para la detección de *E. coli* O157:H7.

Figura 1-3. Tendencia de publicación de documentos entre 1997 – 2018 sobre biosensores para la detección de *E. coli* O157:H7



Una recopilación de los recientes avances del uso de biosensores en el campo de la detección de microorganismos patógenos como *E. coli* O157:H7 enfocada en el diagnóstico clínico e identificación de fuentes de contaminación, se presenta en la siguiente sección.

1.2.4.1 Biosensores

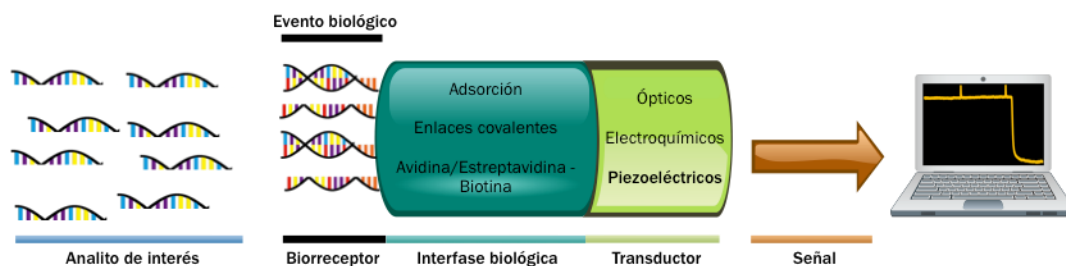
Las biomoléculas son estructuras químicas que interactúan entre sí y se asocian para cumplir varias funciones esenciales en los seres vivos. Algunas de ellas como los anticuerpos, proteínas de diversa naturaleza, ácidos nucleicos, entre otros; basan estos procesos en un mecanismo de reconocimiento interbiomolecular altamente específico, por lo que cada molécula tiene su estructura complementaria a la que se une de forma selectiva

y es capaz de reconocer entre un conjunto o una mezcla de ellas [59]. Esta característica permitió el desarrollo del primer biosensor en 1962, el cual determinaba la concentración de glucosa en sangre por medio de la interacción entre la hexosa y la enzima glucosa-oxidasa que participa en su metabolismo, y la cual se encontraba previamente depositada en el sistema biosensor. El funcionamiento de este dispositivo se basaba en la unión de la enzima glucosa – oxidasa a unas membranas que se encontraban depositadas sobre un electrodo, cuando la sangre del paciente entraba en contacto con la enzima, la glucosa se degradaba y el electrodo convertía dicha degradación en un valor de concentración de glucosa en sangre [60]. El éxito de este estudio, junto con el realizado en 1965 por Kadish y Hall [61], y en 1967 por Updike y Hicks [62]; permitieron la comercialización de este sistema de detección en 1975, permitiendo que los pacientes con diagnóstico de diabetes puedan monitorear en tiempo real la concentración de glucosa, tal y como se sigue haciendo hoy en día.

Un biosensor se puede definir como un dispositivo analítico capaz de medir reacciones biológicas, a través de la generación de señales eléctricamente cuantificables y proporcionales a la concentración del analito de interés en la reacción [63]. Los biosensores están constituidos básicamente por dos partes: un biorreceptor y un transductor. El biorreceptor es el elemento biológico que está en contacto directo con la muestra y le confiere la especificidad al biosensor a través de sitios específicos de unión con el analito por medio de un mecanismo bioquímico de reconocimiento, el biorreceptor puede ser una especie molecular (anticuerpo, enzima o ácido nucleico), sistema biológico (célula o tejido), compuestos biomiméticos o materiales inteligentes (aptámeros o polímeros de microporosidad intrínseca) [64]. Una vez establecido el enlace entre el biorreceptor y el analito de interés se produce una variación de diferentes parámetros físico-químicos, tales como cambios dieléctricos, ópticos, másicos, entre otros; este cambio es detectado por el transductor quien es finalmente el responsable de generar y emitir una señal asociada a dicha magnitud de naturaleza físico-química, y que es proporcional a la concentración del analito de interés [65]. Uno de los requerimientos esenciales para el diseño de un biosensor es el sistema que inmoviliza el biorreceptor y recibe el nombre de interfaz biológica, esta representa la funcionalización del dispositivo por ser la encargada de enlazar la superficie del transductor con el elemento biológico que representa el biorreceptor [66]. Algunos de los métodos más utilizados para el desarrollo de la interfaz biológica utilizan uniones

químicas como adsorción, enlaces covalentes e interacciones Avidina/Estreptavidina y Biotina (Figura 1-4).

Figura 1-4. Esquema de un biosensor

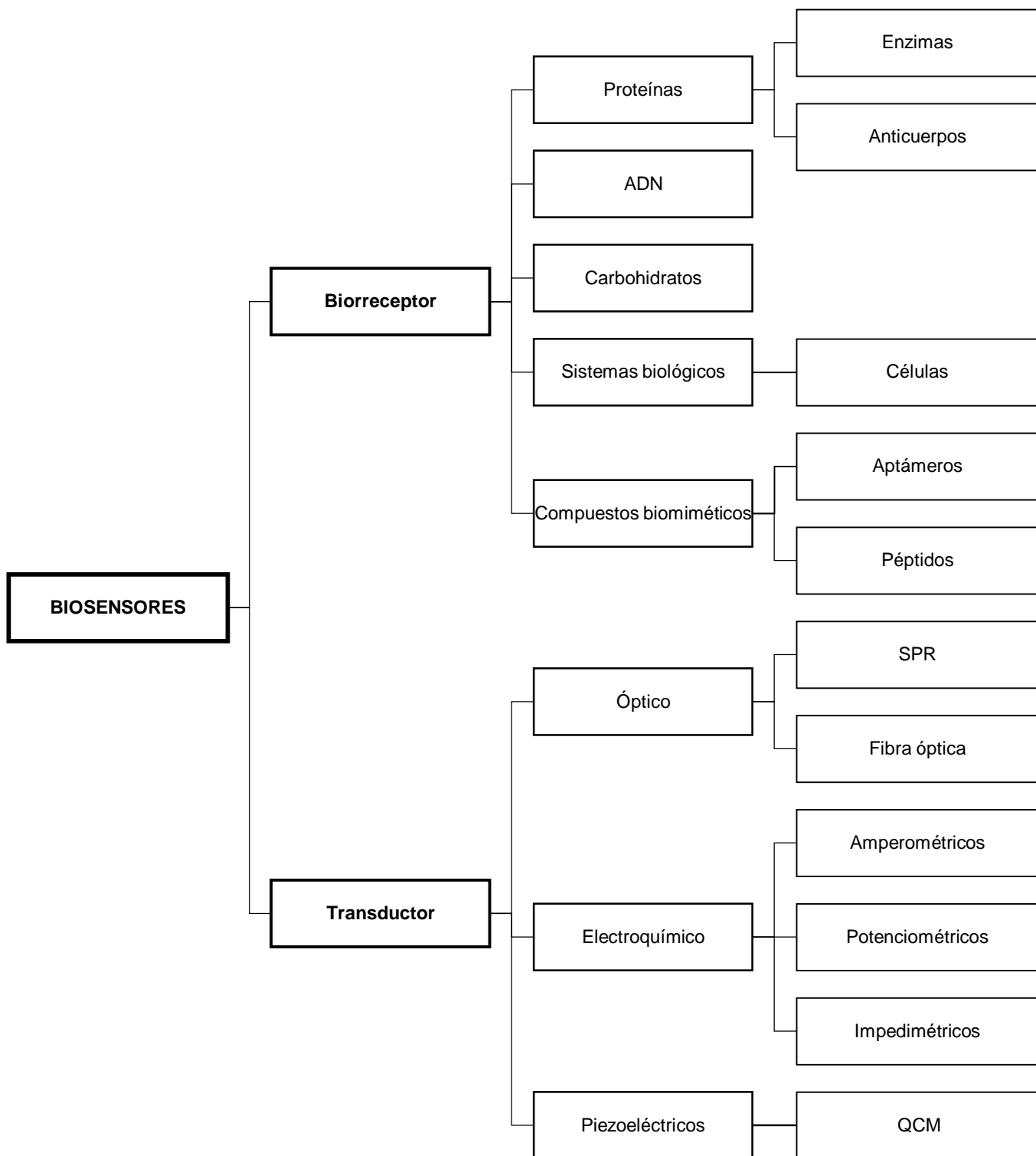


Un biosensor permite detectar, identificar, medir, cuantificar y analizar en tiempo real un proceso de interacción interbiomolecular. Las dos partes de un biosensor, biorreceptor y transductor, forman una unidad funcional cuya especificidad está dada por la parte biológicamente activa; y la sensibilidad depende del sistema de transducción y de la estrategia de inmovilización del biorreceptor a la superficie de este. Los biosensores proporcionan una integración temporal, ya que permiten medir de manera directa la unión entre biomoléculas al generar una señal continua y reversible; además de una integración espacial que favorece la miniaturización y automatización del sistema. Los beneficios más destacados de los biosensores son la minimización de tiempos de análisis y la posibilidad de obtener resultados en tiempo real y libres de marcaje fluorescente o radioactivo, por lo que permiten no solo realizar un análisis cuantitativo, sino también de evaluar la cinética de interacción entre las biomoléculas [67].

Desde la introducción en el mercado de los biosensores de glucosa [60] y hasta la actualidad, el desarrollo de biosensores ha tenido un crecimiento vertiginoso, generando más de 64000 publicaciones hasta el año 2019, de acuerdo a la base de datos de Scopus. El aumento exponencial que refleja el uso de biosensores en distintos campos de la ciencia como genética, microbiología, ciencias ambientales y bioterrorismo; se debe en parte a las ventajas que representa utilizar este dispositivo en el desarrollo de técnicas de detección de biomarcadores.

Los biosensores pueden ser clasificados en función del tipo de biorreceptor inmovilizado y del sistema de transducción que se utilice para reconocer el evento biológico [68] (Figura 1-5).

Figura 1-5. Clasificación de los biosensores



Basados en el tipo de biorreceptor, los biosensores pueden ser clasificados en cinco categorías: proteínas, carbohidratos, sistemas biológicos, compuestos biomiméticos y ADN (Figura 1-5).

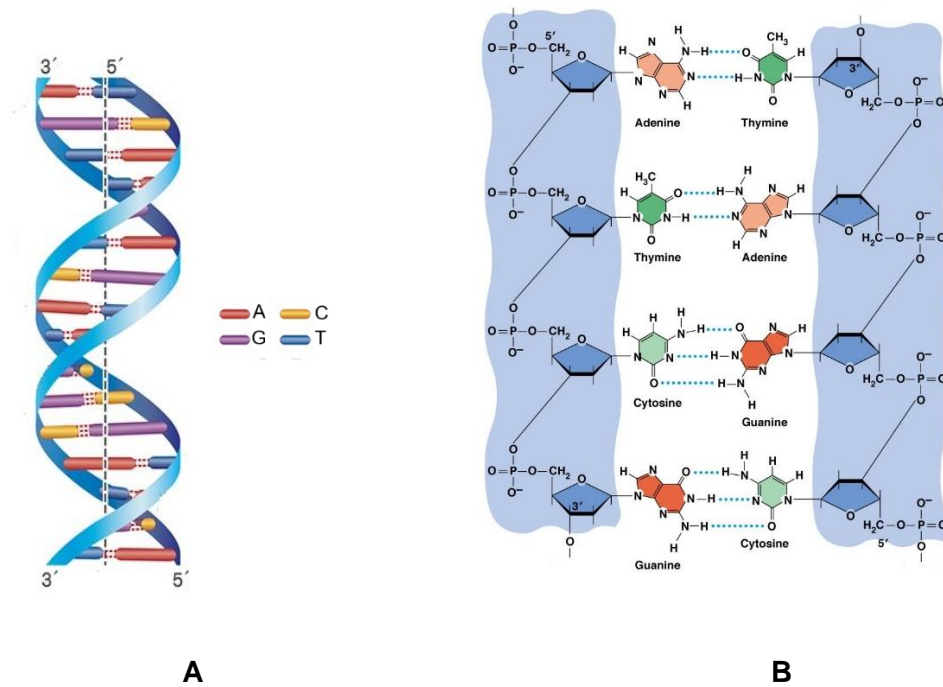
ADN

Son polímeros de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster que enlazan los carbonos 5' y 3' de los azúcares de los nucleótidos adyacentes, las cuales se unen a las bases púricas (adenina (A) y guanina (G)) y a las bases pirimidínicas (timina (T), citosina (C) y uracilo (U)). Se distinguen principalmente dos tipos de ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), los cuales se encargan principalmente del almacenamiento y decodificación de la información genética, respectivamente.

El ARN es una molécula poco estable que se degrada rápida y fácilmente, por lo que su manejo y utilización como biorreceptor es más difícil que el ADN, sin embargo, la ventaja de esta molécula es que a través de ella se puede distinguir entre organismos vivos y no vivos, lo cual puede ser necesario para detectar patógenos [69,70].

La Figura 1-6 [71,72] muestra el modelo de ADN propuesto por James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins y Rosalind Franklin en 1953. Este modelo de ADN se caracteriza por estar compuesto por dos cadenas complementarias y antiparalelas de nucleótidos, formando una doble hélice. Cada base está unida por puentes de hidrógeno a su base complementaria de la hebra opuesta, es decir, cada residuo de adenina se une única y exclusivamente a un residuo de timina en la cadena complementaria, mientras que el residuo de guanina se aparea específicamente con un residuo de citosina. Es por tal motivo que el ADN es uno de los biorreceptores más utilizados para el desarrollo de sistemas de detección, puesto que es una molécula estable que se aparea específicamente con su cadena complementaria, permitiendo detectar secuencias características de cada organismo. La inmovilización de esta molécula a la superficie del transductor se debe hacer a través de un único punto de unión con la superficie por medio del extremo 3' o 5', asegurando que la orientación sea la adecuada para facilitar la accesibilidad de la molécula diana y evitando una cinética de reacción más lenta, compleja e impedida [73,74]. Si el biosensor tiene inmovilizada sobre su superficie una sonda de ADN y el evento biológico que detecta es la hibridación de cadenas, entonces recibe el nombre de genosensor.

Figura 1-6. Modelo de ADN. A. Representación contorno cintas. B. Estructura química



Los biosensores también se pueden clasificar de acuerdo al sistema de transducción empleado, es decir, según el principio físico subyacente en el fenómeno de transformación. Este se encuentra ligado al sistema de detección que permite monitorizar y registrar los cambios que el transductor detecta como consecuencia de los procesos de reconocimiento intermolecular. Los tipos de transductores más empleados son los basados en fenómenos ópticos, electroquímicos y piezoeléctricos.

Piezoeléctricos

El fenómeno piezoeléctrico fue descubierto por los hermanos Jaques y Pierre Curie en 1880, los cuales observaron que, al comprimir un material piezoeléctrico en determinadas direcciones, de acuerdo a la simetría del cristal, aparecían cargas positivas y negativas en la zona superficial del material. En cambio, si el cristal no era sometido a ningún esfuerzo externo, los centros de gravedad de las cargas positivas y negativas coincidían, dando lugar a una molécula eléctricamente neutra [75]. Este fenómeno permite la transformación de energía mecánica en energía eléctrica, dado que el material se polariza y en consecuencia aparece un campo eléctrico, debido a una deformación mecánica [76].

Un año después del descubrimiento del fenómeno piezoeléctrico, los hermanos Curie llevaron a cabo varios estudios para verificar la existencia del proceso inverso que había sido predicho por Lippman en 1881 [75]. El efecto piezoeléctrico inverso consiste en la aplicación de un campo eléctrico al cristal, lo que provoca una reacción interna de las cargas electrostáticas, y por ende, un esfuerzo mecánico proporcional a la acción del campo eléctrico; por lo que se da una conversión de energía eléctrica a energía mecánica [76].

La primera aplicación del efecto piezoeléctrico se dio a finales de la primera guerra mundial, cuando se presentó el cristal de cuarzo como resonador piezoeléctrico y su utilidad como estabilizador, oscilador y filtro. A partir de ese momento, se concluyó que el cristal de cuarzo es el material piezoeléctrico más adecuado para un control de frecuencia en circuitos de transmisión, recepción y monitorización; debido a que es el cristal más abundante en la naturaleza, es químicamente estable en un amplio rango de temperaturas (aproximadamente hasta 573 °C), y de acuerdo al corte que se haga del cristal, se pueden obtener resonadores libres de modos de vibración no deseados [77,78].

El corte AT, sobre la estructura de prisma hexagonal del cristal de cuarzo, es el más adecuado para desarrollar resonadores de bajo coeficiente de temperatura, y libres de modos de vibración no deseados. Debido a la orientación de este corte, la aplicación de un potencial alterno entre dos electrodos depositados sobre la superficie del cristal, produce una deformación en forma de cizalla, a la misma frecuencia que la tensión aplicada. Bajo estas condiciones, se generan ondas acústicas que se propagan en dirección del espesor del cristal, y se reflejan en la parte superior e inferior de la lámina, dando como resultado ondas incidentes y reflejadas que se propagan en direcciones opuestas. La interferencia constructiva de estas ondas que dan lugar a resonancias mecánicas, solo es posible a ciertas relaciones entre el espesor del cristal y la longitud de onda que se propaga por el material. El cristal puede ser excitado alrededor de diferentes armónicos, por lo que cada uno de ellos corresponde a un patrón de onda a lo largo del espesor del cristal [76,78].

Para evitar acoplamientos indeseados entre modos de vibración, se recomienda darle al cuarzo una forma circular y depositar los electrodos de forma concéntrica en la zona central del material. Los electrodos suelen ser capas de oro depositadas sobre el cristal por electrovaporación, debido a que está estandarizado su proceso de manufacturación, es compatible con la mayoría de técnicas analíticas para materiales, y no es tóxico para aplicaciones biológicas [79,80].

Las primeras aplicaciones del efecto piezoeléctrico, mediante cristales de cuarzo, era utilizarlos como patrones de frecuencia en los osciladores que generaban las ondas portadoras de las emisoras de radio. Sin embargo, Sauerbrey en 1959, consolidó el uso del cristal de cuarzo como sensor para medir cambios de masa sobre la superficie del material, ya que demostró de manera experimental, que para películas finas uniformemente depositadas sobre el cristal, la desviación de la frecuencia de resonancia del material es proporcional a la masa añadida. Sauerbrey determinó una relación matemática (ver ecuación (1.1)) entre la variación de frecuencia y los cambios de masa [81].

$$\Delta f = -\frac{2Nf^2}{A_p\sqrt{\mu_p\rho_p}}\Delta m \quad (1.1)$$

Donde Δm es la masa que se deposita sobre el área sensible y provoca un cambio en la frecuencia del resonador (Δf), A_p es el área sensible, μ_p el módulo de corte, ρ_p la densidad del resonador, f es la frecuencia natural de resonancia y N es el armónico. Con el fin de simplificar la interpretación de datos proporcionados, la ecuación (1.1) se puede reducir a la siguiente expresión:

$$\Delta f = -C_f\Delta m \quad (1.2)$$

Donde C_f es el factor de sensibilidad del cristal. Las ecuaciones (1.1) y (1.2) sólo son válidas cuando la capa depositada sobre la superficie del cristal es muy fina, ya que el material depositado queda rígidamente acoplado, por lo que sufre una deformación despreciable cuando es atravesado por las ondas acústicas; y de esta manera, las variaciones en la frecuencia del material son debidas exclusivamente a un efecto inercial, es decir, es como si el cristal de cuarzo solo aumentara su espesor [81,82].

Estudios posteriores demostraron que utilizar el cristal de cuarzo como microbalanza, permitía determinar masa en un rango de 50 – 100 pg sobre 10 mm². Esta sensibilidad es aproximadamente un millón de veces superior a las microbalanzas convencionales; y es debida a la aceleración que sufren las partículas rígidamente unidas a la superficie del material [82].

Durante mucho tiempo, la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) se usó, como elemento de monitorización de espesores de película delgada en sistemas de evaporación de metales al vacío, ya que el uso de este resonador en medios líquidos, no era posible debido al cese de oscilación del cristal por el efecto viscoso de la solución. Sin embargo, Kanazawa y Gordon establecieron en 1985, un modelo físico que relacionaba la variación de frecuencia del cristal, y las propiedades viscosas del medio líquido en contacto con la superficie del material [83,84]. Entre todas las aplicaciones del sensor de cristal de cuarzo en medio líquido, una de las que más expectativas ha generado es el uso de este sistema como biosensor, ya que al modificarse bioquímicamente la superficie del material, se desarrolla una interfaz biológica disponible para ser expuesta a complejos moleculares en solución acuosa [10,12,85,86]. Este enfoque impulsó el desarrollo de sistemas que no sólo midieran el cambio en la frecuencia de resonancia del cristal, sino también el factor de disipación, ya que este último permite conocer las propiedades viscoelásticas de la interfaz, los fenómenos de unión sobre el material y la oscilación en las capas moleculares. La energía de disipación se mide por medio del decaimiento de la oscilación del cristal después de una excitación cercana a la frecuencia de resonancia, ya que la tasa de decaimiento es proporcional a la energía de disipación del oscilador (ecuación (1.3)) [87,88].

$$D = \left(\frac{E_{lost}}{2\pi E_{stored}} \right) \quad (1.3)$$

Donde E_{lost} es la energía disipada durante la oscilación y E_{stored} es la energía total almacenada en el sistema. Por medio de la medida de disipación, es posible determinar la rigidez de la capa que se deposita sobre el cristal, y por lo tanto, determinar la precisión de la ecuación de Sauerbrey para estimar la masa de las moléculas que se depositan sobre la superficie del cristal [51].

Tradicionalmente, la frecuencia de resonancia fundamental de los biosensores basados en el funcionamiento de la microbalanza de cristal de cuarzo, está en un rango entre 5 – 30 MHz, por lo que desde el punto de vista práctico, la sensibilidad de estos dispositivos comparados con otros sistemas de transducción como los basados en propiedades ópticas es menor [10,74,78]. Debido a lo anterior, se comenzaron a desarrollar sistemas QCM con frecuencias de resonancia fundamentales más altas.

El aumento en la sensibilidad de los sistemas QCM, se logra al incrementar la frecuencia de resonancia, sin embargo, al operar el sistema electrónico en medios líquidos, la ganancia teórica de sensibilidad está influenciada negativamente por el aumento de ruido que acompaña a la fase, y se obtiene una respuesta inestable del sistema a altas frecuencias. Con el fin de reducir este ruido, recientemente se ha propuesto un nuevo sistema de caracterización electrónico, basado en la relación de fase/masa a una frecuencia fija (ecuación (1.4)), que permite mejorar hasta 3 veces la relación señal/ruido, incluso para los sistemas convencionales de 10 MHz [89].

$$\Delta\varphi \approx -\left(\frac{\Delta m}{m_L}\right) \quad (1.4)$$

Donde $\Delta\varphi$ es el cambio de fase producido por la alteración de masa Δm sobre la superficie del sensor, m_L es la masa de líquido perturbada por el resonador. A pesar de que Uttenthaler *et al.*, fueron los primeros en desarrollar un biosensor de alta frecuencia en modo fundamental (HFF-QCM, *high fundamental frequency quartz cristal microbalance*) [90], muy pocos grupos de investigación han trabajado con resonadores HFF-QCM en medios líquidos, ya que estos resonadores se suelen describir como pequeños, frágiles y de difícil implementación en sistemas de celdas de flujo [10]. Sin embargo, recientemente se han publicado algunos estudios que utilizan biosensores piezoeléctricos de alta frecuencia para la detección de interacciones moleculares de tipo antígeno – anticuerpo [12,86,91].

1.2.4.1.1 Genosensores piezoeléctricos

Un genosensor piezoeléctrico, es un sistema analítico que se encuentra constituido por un transductor de cristal de cuarzo altamente preciso y estable que actúa como una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), una sonda de ADN inmovilizada en la superficie del transductor y un sistema de procesamiento de información. El cambio en la frecuencia de oscilación del cristal, se da como consecuencia de la hibridación entre cadenas de ADN [92].

Debido a su bajo costo, reproducibilidad en los resultados, fácil operación, flexibilidad, y recientemente con la introducción de sistemas de alta frecuencia, su aumento de

sensibilidad; los genosensores piezoeléctricos ofrecen la posibilidad de desarrollar sistemas altamente específicos para la detección de una secuencia de ADN; por lo que pueden ser aplicados en distintas áreas como diagnóstico clínico, bioterrorismo, y ciencias ambientales; ya que en estos campos, es necesario el desarrollo de herramientas precisas, sensibles, pequeñas, ágiles y específicas que permitan brindar una detección y cuantificación del biomarcador [6,93,94].

El desarrollo de un genosensor basado en QCM requiere del diseño y construcción de una interfaz biológica, la cual es la base fundamental para la especificidad de los ensayos realizados en esta plataforma, además de ser un componente que influye en aspectos tan críticos como la accesibilidad del ligando a la superficie, la reactividad cruzada con otras especies, la reproducibilidad de la prueba y en la sensibilidad del dispositivo [95]. Además, este proceso debe llevarse a cabo de manera selectiva hacia el analito de interés, pero de manera que no se alteren las propiedades del transductor y que se genere la mayor señal posible.

Esta interfaz representa la funcionalización del biosensor a través del método que inmoviliza la sonda de ADN, ya que es la directamente responsable de adaptar la superficie del dispositivo para la detección de la molécula de interés. Muchos de los avances en el área de biosensores, se centran en el desarrollo de múltiples técnicas de inmovilización orientadas a conseguir superficies que mejoren la eficiencia de la reacción interbiomolecular entre el biorreceptor y el analito de interés.

Generalmente, la inmovilización de sondas de ADN sobre la superficie del transductor se ha realizado a través de uniones químicas como adsorción, enlaces covalentes e interacciones Avidina/Estreptavidina y Biotina [56,96–100]. A continuación, se hace una breve descripción de las metodologías más utilizadas para el desarrollo de la interfaz biológica de genosensores piezoeléctricos.

1.2.4.1.2 Métodos de fisiadsorción electrostática

La adsorción es la técnica más sencilla para inmovilizar sondas de ADN sobre la superficie del cristal de cuarzo, ya que no requiere la unión de otras moléculas a la superficie, ni modificaciones de las sondas de ADN. Este procedimiento se basa en la adsorción electrostática del grupo fosfato del biorreceptor génico, que se encuentra cargado

negativamente, sobre la superficie del material modificado previamente con una película positiva. Algunos autores, reportan el uso de películas poliméricas catiónicas como una interfaz que proporciona una alta densidad de carga positiva [101,102].

A pesar de que esta técnica de inmovilización está dada por la aplicación de un protocolo rápido y con un uso mínimo de reactivos químicos, existen algunas limitaciones como la alta probabilidad de desorción del biorreceptor génico bajo la influencia de cambios de pH, fuerzas iónicas y temperatura. Además, las sondas de ADN se inmovilizan en una orientación aleatoria con múltiples sitios de anclaje a la superficie, lo que implica poca accesibilidad para el proceso de hibridación con la cadena complementaria [103].

1.2.4.1.3 Quimiadsorción

A diferencia de la técnica de adsorción, la técnica de inmovilización de sondas de ADN por medio de uniones covalentes demuestra tener buena estabilidad, por lo que previene la desorción del biomarcador por agentes externos, y por consiguiente, permite regenerar la superficie del transductor. Además, esta técnica proporciona una buena orientación vertical, ya que el biorreceptor se une de manera covalente a la superficie del transductor, previamente modificada, por medio de un grupo químico que se conjuga en su extremo 5' o 3' [103–105].

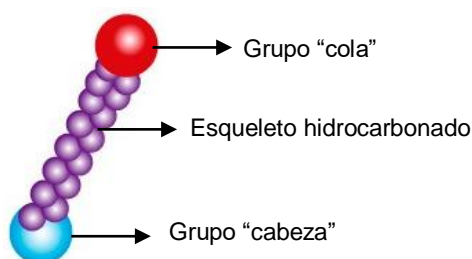
Uno de los sistemas más estudiados y utilizados para modificar superficies por medio de uniones covalentes, es el de la formación de monocapas autoensambladas (SAM, *self assembled monolayers*). Éstas permiten la inmovilización ordenada de cadenas de ADN a superficies metálicas, por medio del acople de moléculas bifuncionales que tienen un extremo terminal con una fuerte afinidad por el sustrato elegido, y otro extremo con un grupo funcional capaz de formar enlace covalente con la biomolécula a inmovilizar [106].

Monocapas autoensambladas

Las monocapas autoensambladas representan un sistema eficaz, flexible y reproducible con el cual se puede modificar las propiedades superficiales de distintos materiales como semiconductores, metales y óxidos metálicos. Estos conjuntos moleculares se forman espontáneamente en la superficie del material por medio de la adsorción de constituyentes moleculares a partir de una solución o fase gaseosa que se deposita sobre el sustrato formando estructuras cristalinas o semicristalinas [80,107].

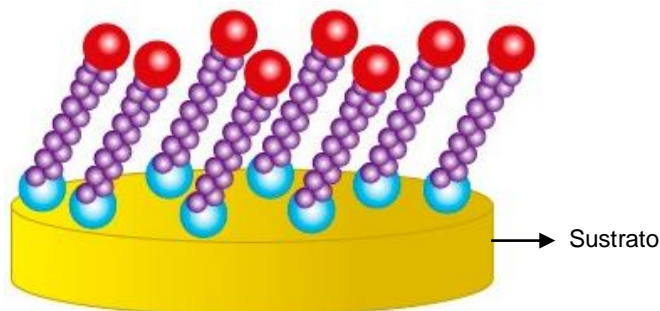
Las moléculas bifuncionales más estudiadas, para la inmovilización de cadenas de ADN sobre sustratos de oro, son los alcanotioles debido a su buena estabilidad térmica, mecánica y química, fácil preparación y versatilidad en el grupo funcional [74]. Tal como se representa en la Figura 1-7, los alcanotioles se pueden dividir en tres partes: el grupo funcional terminal de “cabeza” que es adsorbido por afinidad a la superficie del sustrato a través de enlaces químicos, es decir, por medio del proceso de quimiadsorción; un esqueleto hidrocarbonado de cadena alquílica que propicia la aparición de fuerzas Van der Waals entre las cadenas; y finalmente, el grupo funcional terminal o grupo “cola” que es el que le proporciona su funcionalidad y especificidad por su capacidad de formar enlaces covalentes con la biomolécula de interés [108] (Figura 1-7).

Figura 1-7. Partes de un alcanotiol

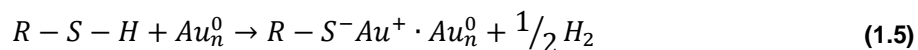


Desde el punto de vista energético, el grupo funcional “cabeza” es el que propicia el proceso más exotérmico, debido a la tendencia de las partículas de la superficie a adsorber el material orgánico que se deposita sobre ellas con el fin de disminuir la energía libre entre el ambiente y la superficie del material, por lo que las moléculas intentan ocupar los sitios disponibles sobre la superficie del sustrato a través de enlaces químicos; formando estructuras moleculares cristalinas o semicristalinas (Figura 1-8) [107].

Figura 1-8. Monocapa autoensamblada (SAM)



La reacción específica de anclaje por quimisorción entre el alcanoil y el sustrato de oro se muestra en la ecuación (1.5). Esta reacción se da a través de una adición oxidativa del grupo tiol o grupo cabeza del alcanoil a la superficie del oro, seguida de una eliminación reductiva del hidrógeno. Si la superficie del sustrato se encuentra libre de partículas químicamente activas, el hidrógeno del enlace S-H se separa como una molécula de H_2 [109].



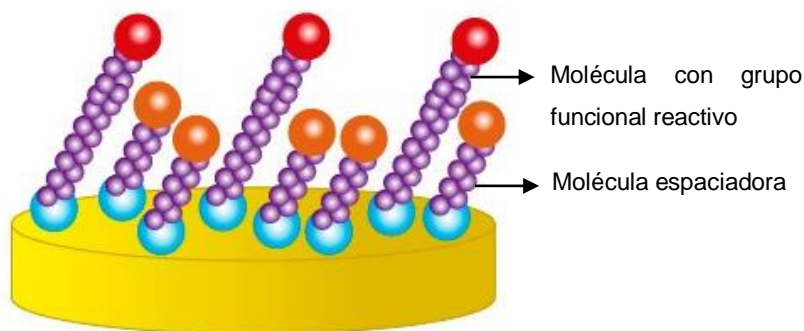
De acuerdo a la anterior reacción, la especie que sufre quimisorción sobre el oro es la molécula de tiol y la interacción más importante para que se forme el paquete cerrado y organizado de monocapas es la fortaleza del enlace Au – S que se forma. La naturaleza de esta interacción covalente ha sido confirmada mediante distintas técnicas de caracterización como: espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS, *X-ray photoelectron spectroscopy*), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, *Fourier transform infrared spectroscopy*), espectroscopia Raman, y otras técnicas electroquímicas [110].

El proceso de inmovilización de la molécula de interés a través de monocapas autoensambladas más empleado y estudiado es la inmersión del sustrato limpio en una solución de alcanotioles en etanol a una concentración que oscila entre 1 – 10 mM por aproximadamente 12 – 18 horas a temperatura ambiente. La unión covalente entre los átomos de oro y azufre se da rápidamente, sin embargo, el proceso de reorganización es lento y requiere de un tiempo relativamente largo para maximizar la densidad molecular y disminuir los defectos que se forman en la monocapa. Debido a que las moléculas adoptan

estructuras y patrones geométricos regidos por la termodinámica de un proceso de quimisorción complejo, los defectos que se forman se originan por factores extrínsecos e intrínsecos al proceso de autoensamble. Luego de que se forma la monocapa, algunos experimentos proceden a realizar la modificación del otro grupo funcional terminal o “cola” de las moléculas a través de una alteración química que tiene como objetivo activar este grupo funcional y maximizar la reacción entre las moléculas de la monocapa y la molécula que se quiere inmovilizar. Posterior a este paso, se debe exponer la superficie del sustrato ya modificada a la presencia de una solución rica en la molécula a inmovilizar con el fin de que dicha estructura se una por medio de enlaces químicos covalentes a la SAM. Finalmente, se recomienda incubar el sustrato en una solución de bloqueo la cual inhiba los grupos funcionales que sean potencialmente activos y que no hayan reaccionado para formar el enlace covalente con la molécula a inmovilizar [12,13,80].

Una alternativa de las SAM, son las monocapas autoensambladas mixtas (MSAM, *mixed self assembled monolayers*) que se esquematizan en la Figura 1-9. Estas comprenden una mezcla con proporciones definidas de diferentes estructuras moleculares. Esta configuración provee una ruta para controlar las propiedades de la superficie del material a nivel molecular, ya que permite formar arreglos moleculares cuya propia dimensión física impediría un montaje directo y organizado. El método más estudiado para la formación de MSAM sobre sustratos de oro es la adsorción a partir de soluciones que contienen mezclas de alcanotioles de diferentes longitudes.

El uso de MSAM a partir de la combinación de moléculas de alcanotioles segregadas por el tipo de grupo funcional que presentan, permite controlar la densidad de puntos de interacción de la biomolécula con la estructura. De esta manera el alcanotiol con grupo funcional inerte, que no va a reaccionar con la molécula a inmovilizar, se utiliza en una fracción molar mayor que el alcanotiol con grupo funcional reactivo, y ejerce la función de molécula espaciadora permitiendo minimizar el impedimento estérico entre las moléculas que forman la estructura inmovilizada, posibilitando una distribución y densidad controlada de la biomolécula sobre la superficie por medio de la variación de la proporción entre las moléculas que conforman la monocapa [111,112].

Figura 1-9. Monocapas autoensambladas mixtas (MSAM)

Las moléculas de alcanotiol que forman la monocapa mixta pueden tener el mismo número de átomos de carbono en sus cadenas, sin embargo, si la longitud de la cadena hidrocarbonada que corresponde al tiol con grupo funcional inerte es menor que la cadena hidrocarbonada de la molécula con grupo funcional reactivo, se aumenta la accesibilidad de la molécula de interés al grupo funcional de “cola” libre para reaccionar y se evitan los impedimentos estéricos que causarían inactividad de la estructura a inmovilizar. Muchos autores describen las MSAM con diferentes longitudes de cadenas hidrocarbonadas y a pesar de que no se tiene una dupla ideal, muchos trabajos concluyen que una diferencia de 5 átomos de carbono entre las moléculas que conforman la monocapa es suficiente [108,113]. Además, distintos estudios confirman que arreglos moleculares por medio de MSAM, especialmente aquellas formadas por alcanotioles de cadena larga, son más eficaces que las SAM compuestas por un único tiol porque previenen las interacciones inespecíficas y la desnaturalización del biorreceptor [112].

1.2.4.1.4 Avidina/Estreptavidina y Biotina

Otra estrategia para la inmovilización no covalente de las sondas de ADN sobre la superficie del genosensor piezoeléctrico, se basa en el complejo de formación avidina/estreptavidina – biotina. Esto se debe a que la molécula de biotina puede interactuar con el sitio de unión de las proteínas avidina y estreptavidina, con una constante de afinidad muy alta ($K_a = 1 \times 10^{-15} M$), cercana al enlace covalente; por lo que la formación del complejo proteico no se afecta por variaciones de pH, temperatura, solventes orgánicos, presencia de agentes desnaturizantes, detergentes, y enzimas proteolíticas [103,114,115].

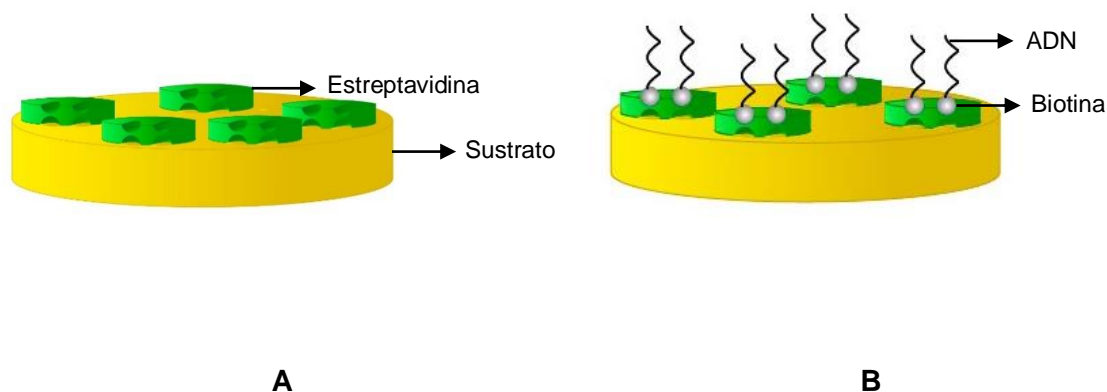
La estreptavidina y la avidina son proteínas tetraméricas que incorporan cuatro sitios de unión idénticos. La primera es una proteína aislada de la bacteria *Streptomyces avidinni*, mientras que la segunda es una proteína glicosilada que se aísla de la clara de huevo. Debido a que la estreptavidina carece de cadenas laterales de carbohidratos y tiene un punto isoeléctrico cercano al pH neutro, es más utilizada en aplicaciones que involucran interacciones biológicas [116].

La estreptavidina es un homotetrámero de aproximadamente 56 kDa que tiene una alta termoestabilidad, su temperatura de desnaturalización es de 73 °C para el estado nativo de la proteína y 112 °C para el complejo estreptavidina – biotina. Además, es resistente a variaciones de pH, temperatura, agentes desnaturalizantes y degradación enzimática, por lo que es usada en un amplio rango de condiciones experimentales. Se han identificado proteínas homólogas de la estreptavidina en bacterias, hongos, ranas y pollos; los cuales son organismos que están taxonómicamente distantes entre sí, y la mayoría de estas proteínas comparten estructuras terciarias y cuaternarias, lo que sugiere que la estructura tiene una energía favorable en su plegado. Debido a que la molécula puede tolerar varias mutaciones, representa una buena plataforma para estudios experimentales, especialmente su uso en sistemas químicos y biológicos [117,118].

Generalmente, el uso de estreptavidina en sistemas que involucran la interacción biológica de moléculas, requiere conjugar el biorreceptor con una molécula de biotina. Esta molécula es un anillo de tetrahidrotiofeno de aproximadamente 244 Da, que tiene una cadena lateral de ácido valérico unido a un anillo de imidazolidona que forma ocho posibles esteroisómeros. Solo la biotina D (+) se encuentra presente en algunos alimentos, pero no puede ser sintetizada por mamíferos. Estos la deben tomar como un suplemento esencial, ya que esta vitamina del complejo B es fundamental para metabolizar aminoácidos, carbohidratos y grasas; además, algunos estudios señalan que esta proteína podría participar en la regulación de la transcripción o expresión de diferentes proteínas [119,120].

El desarrollo de genosensores piezoeléctricos emplea la unión estreptavidina – biotina para inmovilizar el biorreceptor sobre la superficie del transductor, la Figura 1-10 muestra una de las estrategias más utilizadas, la cual consiste en la inmovilización de la estreptavidina sobre la superficie del cristal de cuarzo con electrodo de oro (Figura 1-10A) para su posterior interacción con la biotina, la cual se encuentra unida al extremo 5' o 3' de la cadena de ADN que se emplea como biorreceptor (Figura 1-10B) [99,103,121].

Figura 1-10. Inmovilización de cadenas de ADN por medio de la unión entre la proteína estreptavidina y la molécula biotina. A. Inmovilización de la proteína estreptavidina. B. Unión entre la proteína estreptavidina y la molécula de biotina conjugada en el extremo de la molécula de ADN



2 Selección y diseño de la secuencia de ADN

2.1 Introducción

En el desarrollo de un genosensor para la detección de *E. coli* O157:H7, el paso inicial es la selección del biomarcador adecuado, que al ser detectado por el sistema indique directamente la presencia del patógeno en la respectiva muestra. Se han caracterizado aproximadamente 1.4 Mpb dentro del genoma de la bacteria, que representan secuencias específicas para el serotipo, por lo que se tiene una cantidad considerable de genes que podrían ser candidatos potenciales, para ser seleccionados como biomarcadores. Los genes más utilizados en el desarrollo de pruebas moleculares, son aquellos que codifican para los factores de virulencia asociados con las toxinas shiga y los antígenos flagelar H7 y somático O157. Este último es muy utilizado debido a que las cadenas laterales de este antígeno se constituyen como moléculas de superficie inmunodominante [36,122].

Por lo tanto, para realizar el proceso de detección del biomarcador por medio del genosensor piezoeléctrico es necesario seleccionar la sonda biorreceptora de ADN, la cual debe estar inmovilizada sobre la superficie del sustrato y es la encargada de reconocer e interactuar con el analito de interés, por lo que deben tener una fuerte afinidad y ser complementarias entre ellas [123]. Las condiciones que se tienen en cuenta al momento de la selección de la secuencia de ADN que representa el biorreceptor y el biomarcador, no sólo influyen en la afinidad entre las cadenas de ácidos nucleicos, sino también en la especificidad de la técnica y la escasa aparición de estructuras secundarias que puedan dificultar los procesos de hibridación. Además, el diseño del biorreceptor es esencial para la funcionalización de la superficie, ya que de este depende la adecuada unión de la sonda biorreceptora a la superficie del transductor, por medio de la interfaz biológica [124].

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó una matriz de priorización para seleccionar la secuencia de ADN que se emplea como biorreceptor y analito de interés en el genosensor piezoeléctrico. El diseño de la sonda biorreceptora, se llevó a cabo teniendo en cuenta las metodologías de funcionalización de superficies más empleadas para el desarrollo de genosensores piezoeléctricos.

2.2 Materiales y métodos

Debido a que las cadenas laterales del antígeno O de las cepas de *E. coli* se constituyen como moléculas de superficie inmunodominantes, y existe una variabilidad en los genes que expresan este antígeno entre las cepas estrechamente relacionadas de *E. coli*, se decidió seleccionar una secuencia de la región *rfbE* como biomarcador para la detección de *E. coli* O157:H7 [33,35]. Para elegir la secuencia a detectar del gen *rfbE* se realizó una matriz de priorización o decisión según la metodología descrita por Ulrich *et al.* [125], con el fin de evaluar una serie de secuencias potenciales para utilizar como analito de interés y sonda biorreceptora en el genosensor piezoeléctrico.

Para la selección de la secuencia, se analizaron los valores de especificidad que indica la capacidad que tiene la prueba de identificar la presencia de *E. coli* O157:H7 en las muestras que efectivamente contienen al patógeno [6]. La longitud de la cadena de ADN que incide en la selectividad de la técnica, es decir, en la probabilidad de encontrar la misma secuencia en otro organismo diferente al de interés; además también influye en la aparición de estructuras secundarias que impiden el proceso de hibridación [126,127]. El porcentaje de

guanina y citosina incide en la estabilidad de la estructura de la doble cadena de ADN, ya que la formación de tres puentes de hidrógeno entre las bases de guanina y citosina, no sólo le confiere una mayor estabilidad al sistema, comparado con la formación de dos puentes de hidrógeno que se forman entre las bases de adenina y timina, sino que también evita la hibridación no específica. Finalmente, se tuvo en cuenta la información bibliográfica disponible, es decir, el número de estudios reportados en la literatura que empleaban una secuencia de la región rfbE para la detección de *E. coli* O157:H7. A continuación se le asignó una puntuación relativa de 0 a 100 a cada parámetro, según la importancia de la característica en la aplicación particular, y finalmente se definió un valor mínimo y un valor deseable a cada propiedad, según lo recomendado por la literatura [51,74,92,127,128].

A continuación se presenta la Tabla 2-1, que tiene los valores mínimos y los valores deseables de las características que se tuvieron en cuenta para la selección de la secuencia de *E. coli* O157:H7, así como la máxima puntuación que se le puede dar a cada una de ellas.

Tabla 2-1. Valores mínimos, deseables y puntuación de las características de la secuencia de *E. coli* O157:H7

Característica del antígeno	Valor mínimo	Valor deseable	Puntuación máxima
Especificidad	95%	100%	35
Longitud de la secuencia (pb)	16	24	25
Porcentaje de guanina y citosina	30%	50%	20
Información bibliográfica	2 referencias	5 referencias	20

Para el diseño de la sonda biorreceptora, se tuvieron en cuenta las metodologías más utilizadas para la inmovilización de sondas de ADN sobre la superficie de un cristal de cuarzo con electrodo de oro, tales como la formación de enlaces covalentes, por medio de monocapas autoensabladas mixtas, entre grupos aminos del biorreceptor y grupos carboxilos de la monocapa; y la interacción entre la proteína estreptavidina y la molécula de biotina. El diseño de la sonda tuvo en cuenta la incorporación de un espaciador vertical y la conjugación de la secuencia biorreceptora con moléculas que faciliten su inmovilización sobre la superficie del transductor.

La empresa *Eurogentec*[®] fue el proveedor de todas las cadenas de ADN, las cuales fueron adquiridas en forma liofilizada, y reconstituidas a una concentración de 100 μ M en tampón TE (10 mM Tris + 1 mM EDTA, pH 7.5) para conservar su estabilidad.

2.3 Resultados

2.3.1 Selección de la secuencia de ADN

A partir de una revisión bibliográfica, se tomaron como candidatas cinco secuencias de la región rfbE, que hayan sido utilizadas en por lo menos dos estudios para el desarrollo de técnicas moleculares de detección. En la Tabla 2-2, se presentan los valores específicos de las características consideradas para las secuencias que se seleccionaron como posibles candidatas.

Tabla 2-2. Resumen de criterios considerados para la selección de la secuencia

Secuencia	Características			
	Especificidad	Longitud de la secuencia	Porcentaje de guanina y citosina	Información bibliográfica
CGCTATGGTGAAGGTG GAATGGTTGTCACGAA TAGCG (1)	100%	36	50%	2 referencias [129,130]

AATAAATTTGCGGAAC AAAACCATGTGCAA (2)	100%	30	33.33%	2 referencias [131,132]
AATTAAGGAATCACCT TGCAGATAAACTCATC GAAA (3)	100%	36	33.33%	2 referencias [133,134]
TACAAGTCCACAAGGA AAG (4)	100%	19	42.11%	2 referencias [135,136]
AGGACCGCAGAGGAAA GAGAGGAATTAAGG (5)	100%	30	50%	3 referencias [23,122,137]

El diseño, selección y modificación de oligonucleótidos se basa en el uso de herramientas bioinformáticas y acceso a bases de datos genómicas, ya que permiten el análisis funcional y personalizado de genes. Una de las herramientas más utilizadas es BLASTn (*Nucleotide Basic Alignment Search Tool*) que posibilita el diseño de cebadores específicos para PCR, selección de enzimas de restricción y verificación de los alineamientos con secuencias análogas [138]. Se utilizó la herramienta BLAST para confirmar la especificidad y la pertinencia de la secuencia con el organismo a detectar, los parámetros dados por la plataforma arrojan un 100% de identidad de las secuencias candidatas con el genoma reportado para *E. coli* O157:H7.

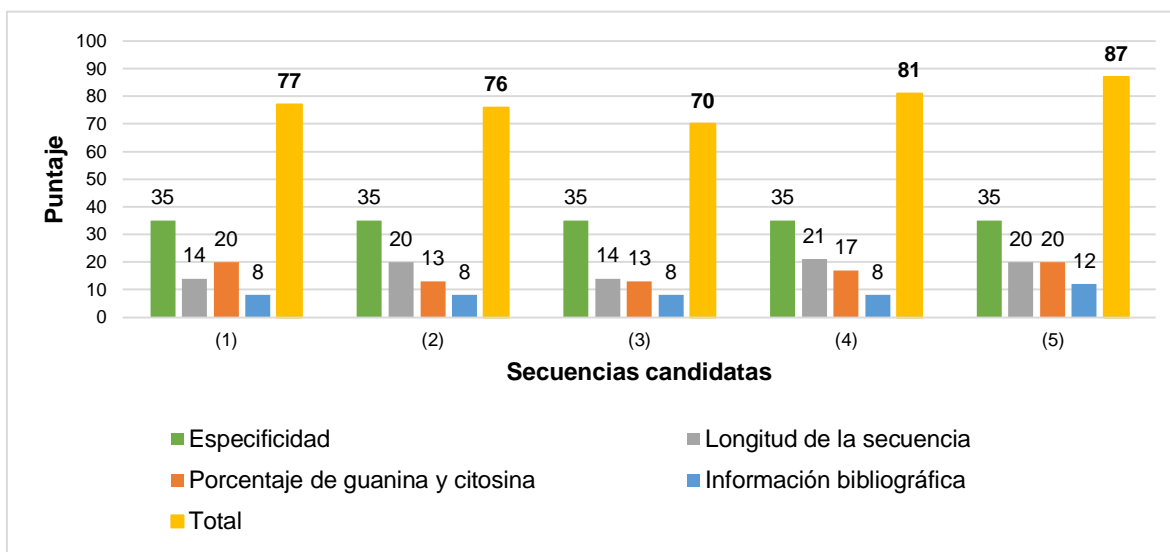
En la determinación de la longitud de la secuencia, se tuvo en cuenta que la sonda de ADN se debe fijar en el soporte a través de uno de sus extremos, de forma que las moléculas se encuentren en posición vertical para favorecer la accesibilidad e hibridación con la secuencia diana. Sin embargo, a medida que se aumenta la longitud de la sonda de ADN, es más probable que se presente auto complementariedad o comiencen a hacer múltiples contactos con la superficie y sea más difícil de remover estos enlaces [74]. De acuerdo al modelo matemático planteado por Chan *et al.* [139], la densidad óptima de la sonda en una superficie se da cuando las moléculas tienen menos de 100 bases para una hibridación directa en solución; además el estudio presentado por Steel *et al.* [127] complementa este modelo, al concluir que la densidad superficial es independiente de la longitud de la sonda

de ADN para cadenas con un tamaño de 24 bases. Por otro lado, la unicidad de la secuencia se tiene parcialmente garantizada a partir de una cadena de 16 nucleótidos, ya que si se asume que las cuatro bases aparecen de forma aleatoria e independiente con una probabilidad de 0.25, la longitud (λ) será potencialmente única si $4^\lambda > 3 \times 10^9$, lo cual requeriría que $\lambda > 15.741$; este cálculo se hace tomando en cuenta el tamaño del genoma humano [126].

Con respecto al porcentaje de guanina y citosina se recomienda un porcentaje entre 30 – 50%, ya que la unión entre las bases G – C es mucho más estable debido a los tres puentes de hidrogeno que se forman, en comparación a los dos puentes de hidrogeno que se dan entre las bases A – T; por lo cual le confiere mayor estabilidad a la estructura de doble cadena y disminuye la probabilidad de hibridación no específica para proporciones de G – C que se encuentren en este rango [124,140,141].

A partir de las secuencias de ADN candidatas y de las características de selección, se realizó la matriz de priorización que se encuentra en la Figura 2-1.

Figura 2-1. Matriz de priorización para la selección del analito de interés



Los resultados presentados en la Figura 2-1 evidencian las cinco secuencias que se consideraron como candidatas para la detección de *E. coli* O157:H7, el resultado más bajo fue para la secuencia (3) con una puntuación de 70, ya que es la cadena de ADN que presenta uno de los porcentajes más bajos de G – C y la que más difiere del valor deseado

para la longitud de la secuencia. Por otro lado, los puntajes más altos fueron para las secuencias (4) y (5) debido a que la diferencia entre el número de bases con respecto al valor deseado del tamaño de la cadena es aproximadamente igual, sin embargo, la secuencia (5) cumple con el valor deseado del porcentaje de G – C y se encontraron dos referencias bibliográficas en las que se realiza una validación de la sonda, diseñada inicialmente por Perelle *et al.* [137], aplicando un acercamiento modular a la combinación de variables no prescritas y desarrolladas en uno o más laboratorios [23,122]. De acuerdo a lo anterior, se selecciona la secuencia (5) como analito de interés, y su respectiva complementaria como biorreceptor.

2.3.2 Diseño de la sonda biorreceptora

Una vez seleccionada la secuencia del biomarcador y su respectiva secuencia complementaria como sonda biorreceptora, se procede a elegir las modificaciones pertinentes de esta última, con el fin de facilitar su inmovilización a la superficie por medio de la interfaz biológica, la cual se basa en la formación de enlaces covalentes y la unión entre la proteína estreptavidina y la molécula biotina.

Las especificaciones de las secuencias de ADN adquiridas para el desarrollo de este trabajo, se describen a continuación:


- Sonda de ADN para funcionalización de la superficie por medio del método de MSAM: la sonda fue conjugada con un grupo amino en su extremo 5' para facilitar el proceso de inmovilización, mediado por el grupo carboxilo de la molécula reactiva que compone las monocapas autoensambladas mixtas. Además, a esta secuencia le ha sido incorporada en el extremo 5', una secuencia de 15 timinas como espaciador vertical entre la interfaz biológica y la secuencia a detectar, cuya finalidad es alejar de la superficie del transductor la zona de la cadena donde se va a producir la hibridación. El número de timinas empleado fue estudiado previamente por García [74], en el que empleó diferentes números de timinas, y concluyó que una secuencia espaciadora óptima de 15 nucleótidos favorece la hibridación entre el biorreceptor y el analito de interés. La modificación se incluyó en el extremo 5', ya que de las dos posiciones es la más frecuentemente utilizada. Esto se debe a que el anclaje de sondas de ADN, sobre superficies de oro por medio del extremo 3',



muestran una conformación plana o paralela a la superficie del material, lo que impide el proceso de hibridación [142].

- Sonda de ADN con biotina para funcionalización por medio de la proteína estreptavidina: la cadena de ADN fue conjugada con una biotina en su extremo 5' que contiene un espaciador de 16 átomos, basado en la molécula trietilenglicol con cuatro átomos de oxígeno. Estos últimos le confieren propiedades hidrofílicas al brazo, lo que lo hace más lineal con respecto a otras conjugaciones más hidrófobas cuando se utiliza en tampones acuosos para experimentos de hibridación [143,144]. Además, a esta secuencia de ADN le fue agregada una cadena de 15 timinas como espaciador vertical [74].
- Cadena complementaria de ADN con biotina: La cadena complementaria fue conjugada en su extremo 5' con una molécula de biotina, la cual está unida a la secuencia por medio de un nucleótido de timina y un espaciador de 10 átomos. Esta secuencia de ADN se utilizó para la verificación del proceso de hibridación.

Las sondas de ADN y las secuencias complementarias, usadas en este trabajo se presentan en la Tabla 2-3.

Tabla 2-3. Representación de secuencias de ADN con modificaciones en los extremos 3' y 5'

Oligonucleótidos	Secuencia 5' – 3'	Representación gráfica
Sonda de ADN para funcionalización de la superficie por medio del método de MSAM	5' [NH ₂] TTT-TTT-TTT-TTT-TTT- AGG-ACC-GCA-GAG-GAA- AGA-GAG-GAA-TTA-AGG – 3'	 <p>Diagrama de una sonda de ADN representada como una hélice de doble cadena. El extremo inferior izquierdo está etiquetado como NH₂. Las bases nitrogenadas están representadas por barras horizontales de colores: rojo, amarillo, verde, azul y naranja.</p>

Sonda de ADN con biotina para funcionalización por medio de la proteína estreptavidina	5' [Biotina-TEG] TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-AGG-ACC-GCA-GAG-GAA-AGA-GAG-GAA-TTA-AGG – 3'	
Cadena complementaria de ADN con biotina	5' [Biotina] CCT-TAA-TTC-CTC-TCT-TTC-CTC-TGC-GGT-CCT– 3'	

2.4 Conclusiones

Se seleccionó la secuencia AGG-ACC-GCA-GAG-GAA-AGA-GAG-GAA-TTA-AGG (5), la cual se encuentra en la región rfbE de la bacteria *E. coli* O157:H7 y codifica parte de las cadenas laterales del antígeno O; para ser no solo la secuencia que representa la sonda biorreceptora que se inmoviliza sobre la superficie del transductor a través de la interfaz biológica, sino también para ser el analito de interés para el biosensor piezoeléctrico, que es la técnica de detección desarrollada en este trabajo. Esta secuencia es una buena candidata para ser tomada en cuenta en el desarrollo de una prueba de detección por medio de hibridación de cadenas de ADN, ya que mostró alta especificidad al serotipo de la bacteria, el 50% de su secuencia son enlaces G – C, la longitud de la cadena no difiere mucho del valor en el que se considera que la densidad de la sonda sobre la superficie no depende del tamaño, y se encuentra validada por dos autores diferentes, los cuales demuestran la sensibilidad, especificidad y exactitud alcanzada para el desarrollo de técnicas moleculares cuando se utiliza esta secuencia como biomarcador.

Por otro lado, a las sondas biorreceptoras de ADN les fueron incorporadas 15 timinas como espaciador vertical en el extremo 5', con el fin de disminuir el impedimento estérico del evento biológico a detectar. Además, la sonda de ADN que se empleará para la

funcionalización por medio de MSAM, fue conjugada en su extremo 5' con un grupo amino para facilitar su interacción con el alcanotiol con grupo funcional reactivo. La metodología de inmovilización que se basa en la interacción entre la proteína estreptavidina y la molécula biotina, utiliza una sonda conjugada en su extremo 5' con esta vitamina por medio de una molécula basada en trietilenglicol; y la cadena complementaria se conjugó en el mismo extremo con biotina para verificar el proceso de hibridación.

3 Desarrollo de un genosensor piezoeléctrico para la detección de *E. coli* O157:H7

3.1 Introducción

Un biosensor es un dispositivo analítico que utiliza un componente biológico (biorreceptor) y un transductor eléctrico para detectar la presencia de compuestos químicos o analitos de interés dentro de una muestra compleja [7]. Un biosensor que emplea una sonda de ADN como biorreceptor y de transductor un cristal piezoeléctrico configurado como microbalanza de cristal de cuarzo, es conocido como genosensor piezoeléctrico.

La estrategia de inmovilización es el proceso mediante el cual se da la integración del biorreceptor con el transductor del biosensor. Esta molécula de reconocimiento es la encargada de interactuar con el analito, de modo que se produzca un efecto capaz de ser detectado y cuantificado de acuerdo al principio físico que utilice el transductor. Una de las estrategias más utilizadas para la inmovilización del biorreceptor sobre la superficie del biosensor es por medio de interacciones químicas fuertes, ya que este tipo de unión logra formar una interfaz biológica que proporciona una carga superficial muy estable frente a las variaciones de pH, temperatura, agentes desnaturizantes y degradación enzimática [104].

La construcción de una interfaz biológica adecuada, constituye una etapa esencial para desarrollar un biosensor, ya que influye en aspectos como la accesibilidad de la molécula de interés al biorreceptor, la especificidad, la sensibilidad y la reproducibilidad del ensayo

[74]. Para ello, se ha propuesto para este trabajo la aplicación de dos metodologías: MSAM e interacciones estreptavidina – biotina. Las MSAM permiten controlar la densidad de puntos de interacción del biorreceptor con la monocapa formada, mediante la combinación de moléculas de alcanotioles con diferentes grupos funcionales, para lograr una inmovilización ordenada que permita la accesibilidad de la molécula diana con la molécula biorreceptora, sin impedimentos estéricos con otras estructuras de la interfaz [112]. Por otro lado, la unión del biorreceptor a la superficie del transductor, a través de la interacción estreptavidina – biotina es una opción robusta y simple para el desarrollo de la interfaz biológica, ya que el arreglo molecular formado, no depende del punto isoeléctrico de la proteína, la inmovilización se puede hacer en flujo, y la superficie tiene cargas electrostáticas mucho más bajas, comparadas con las modificaciones que emplean la reacción de la carbodiimida para inmovilizar biomoléculas [145].

Por otro lado, un cristal piezoeléctrico actuando como una QCM permite medir los cambios de la densidad superficial de masa que ocurren en una capa infinitesimalmente delgada y considerada rígida, la cual se encuentra en contacto con el cristal [84]. Los cambios en la delgada capa en contacto con el cristal modifican las propiedades electroacústicas del sensor piezoeléctrico; por lo tanto, una adecuada medida de las propiedades eléctricas del cristal permitirá registrar los cambios de masa ocurridos en la delgada capa que se encuentra en la superficie del sensor. En biosensores piezoeléctricos son empleadas dos metodologías, para obtener la variación de masa a partir de la medida de una de las variables eléctricas del sensor: variación de la frecuencia de resonancia y variación de fase. La primera se basa en la medición continua de la frecuencia de resonancia del cristal, que está relacionada con la variación de la densidad superficial de masa depositada sobre la superficie del cristal [81]; mientras que la segunda metodología, se basa en integrar el cristal piezoeléctrico con una señal de frecuencia constante y cercana a la frecuencia de resonancia del cristal, y medir continuamente la fase de la señal [89].

Una capa rígida delgada puede ser generada sobre la superficie del electrodo de oro de un cristal de cuarzo al inmovilizar, mediante una monocapa de alcanotioles y una monocapa proteica de estreptavidina, una sonda de ADN. Cuando el sensor piezoeléctrico, previamente funcionalizado se pone en contacto con la muestra que contiene la cadena complementaria de ADN y ocurre el proceso de hibridación, se modifican las propiedades eléctricas de la QCM permitiendo establecer una relación entre las variaciones de la

concentración del analito y los cambios de la señal. La medición de la concentración de analitos ha sido la aplicación más común con los biosensores piezoeléctricos [146–148].

En este capítulo se describe el desarrollo de un genosensor piezoeléctrico de alta frecuencia para la detección de la secuencia que codifica el antígeno O de la bacteria *E. coli* O157:H7.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Materiales

3.2.1.1 Cristales piezoeléctricos

La Figura 3-1 muestra los cristales piezoeléctricos recubiertos con oro empleados para el desarrollo de este trabajo, los cuales son comercializados por la empresa Advanced Wave Sensors S.L., (Paterna, España). Estos sensores son cristales de cuarzo de mesa invertida en corte AT, con un área total de 36 mm² y un espesor de aproximadamente 330, 33 y 17 μm para los cristales de 5, 50 y 100 MHz, respectivamente. La superficie activa de los sensores es de 0.79 mm² para un diámetro de 1 mm en los sensores de 100 y 50 MHz, mientras que para los cristales de 5 MHz se tiene una superficie de 113.1 mm² y un diámetro de 12 mm. Los cristales de 50 y 100 MHz son ensamblados en una ficha de poliéter étercetona (PEEK, *polyether ether ketone*) con un orificio cónico para exponer la superficie del cristal de cuarzo recubierto de oro, que es donde se producen los eventos de inmovilización e hibridación de cadenas de ADN.

Figura 3-1. Cristal de cuarzo recubierto de oro. A. 50 y 100 MHz. B. 5 MHz



A



B

3.2.1.2 Celda de flujo

Los sensores de 50 y 100 MHz se introducen en una celda de flujo, que fue adquirida a la empresa Advanced Wave Sensors S.L., (Paterna, España), que tiene dos componentes principales: la estructura superior e inferior (Figura 3-2A). Los cristales se acomodan en la estructura inferior de aluminio, para luego acoplar la estructura superior de polimetilmetacrilato (PMMA, *poly methyl methacrylate*) y polisulfona (PSU, *polysulfone*), por medio de una junta tórica de nitrilo. Las dimensiones de la celda son de 47 (L) x 33 (W) x 60 (H) mm y tiene un volumen interno de 5.5 μ L. Las soluciones de trabajo llegan al cristal por medio de una tubería de politetrafluoroetileno (PTFE, *polytetrafluoroethylene*) con espesor de pared de 1.59 mm, la cual se acopla a la celda por medio de un racor de polipropileno M6 y una contera de clorotrifluoroetileno (CTFE, *chlorotrifluoroethylene*). A diferencia de la celda anteriormente descrita, la cámara de flujo que se utiliza para los sensores de 5 MHz tiene una estructura inferior de aluminio con un acople específico para la forma y tamaño de los cristales en esta frecuencia (Figura 3-2B).

Figura 3-2. A. Celda de flujo para cristales de 50 y 100 MHz. B. Celda de flujo para cristales de 5 MHz



3.2.1.3 Plataforma de medida

La celda de flujo se acopla en la plataforma A20 de la empresa Advanced Wave Sensors S.L., (Paterna, España), la cual se utiliza para caracterizar la respuesta del sensor en tiempo real. Este sistema mide la frecuencia de resonancia de cristales piezoeléctricos en un rango de 5 – 150 MHz, por lo que se empleó para monitorear la respuesta en tiempo real de

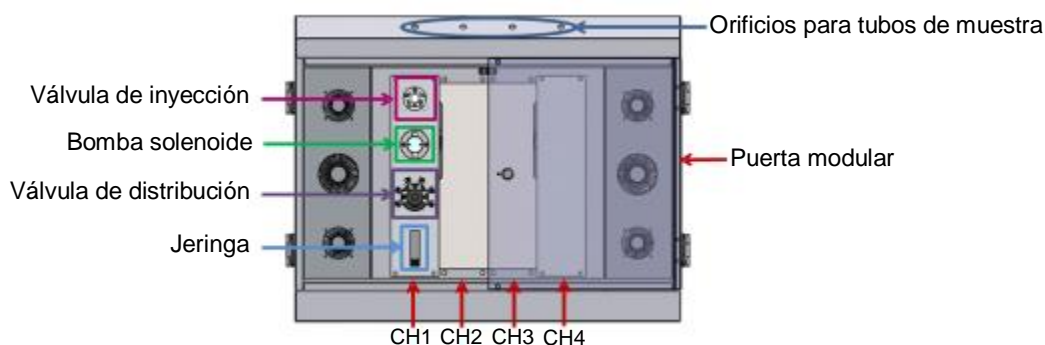
cristales de 5 MHz en el séptimo armónico (35 MHz), sensores de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz) y cristales de 100 MHz en el primer armónico (Figura 3-3).

Figura 3-3. Plataforma A20



El sistema que permite el paso de las soluciones a través del sensor es controlado por medio de la plataforma F20, adquirida a la empresa Advanced Wave Sensors S.L., (Paterna, España). Esta plataforma consta de un equipo automatizado de flujo controlado por una jeringa con volumen de 250 μL (Hamilton, Bonaduz, Suiza), una válvula de distribución HCVX con seis puertos (Hamilton, Bonaduz, Suiza), una válvula de inyección PSD4 (Hamilton, Bonaduz, Suiza) y una bomba solenoide 120SP, que se utiliza para la inyección de la muestra (Bio-Chemvalve, Zurüch, Alemania) (Figura 3-4).

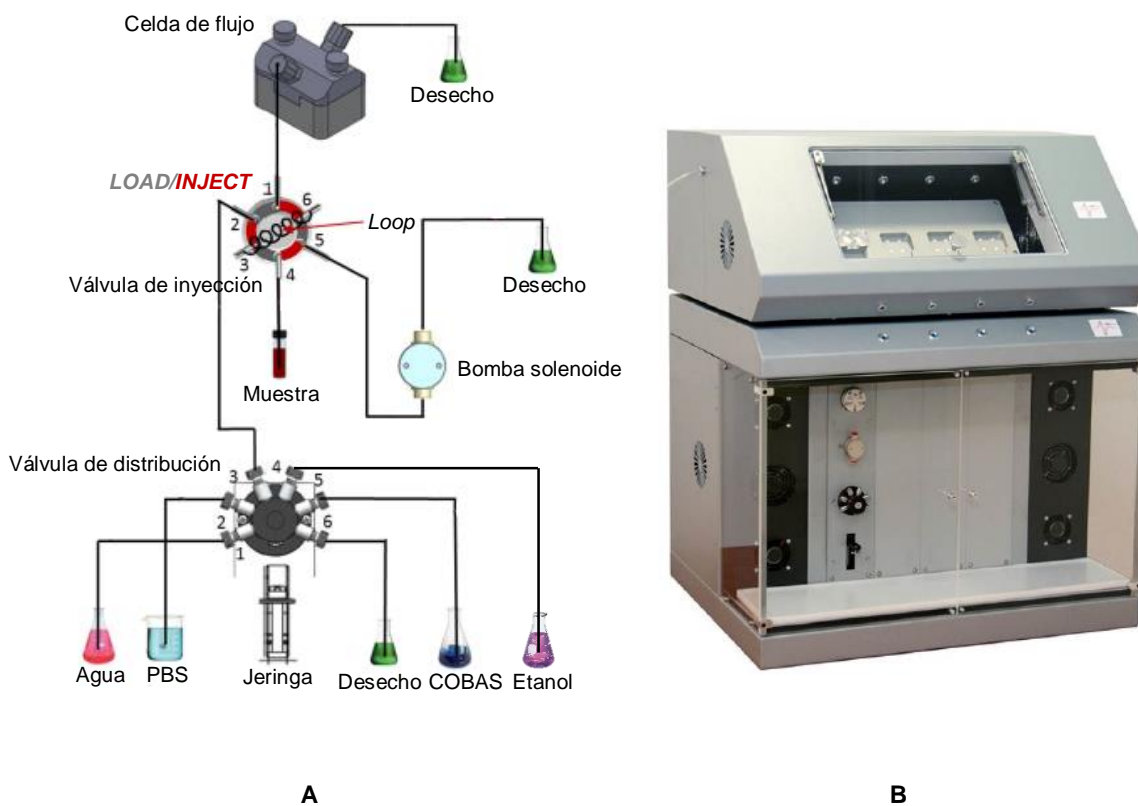
Figura 3-4. Plataforma F20



Las soluciones de trabajo son recolectadas por la válvula de distribución, la cual se conecta a la válvula de inyección y esta a su vez, a la celda de flujo donde se encuentra el área activa del cristal piezoeléctrico. La válvula de inyección tiene dos modos de conexión: *load* e *inject*. En el modo *load*, se carga la muestra que contiene el analito de interés, por medio

de la bomba solenoide, a un circuito con un volumen de 250 μL (*loop*) que está conectado a la válvula de inyección; el excedente de la muestra es llevado a un recipiente de descarte, además, las soluciones que llegan desde la válvula de distribución son llevadas directamente a la celda de flujo. En el modo *inject*, la muestra que se encuentra cargada en el *loop* es transportada a la celda de flujo y las soluciones que son impulsadas por la válvula de distribución pasan por el *loop* y luego al cristal piezoeléctrico recubierto de oro (Figura 3-5).

Figura 3-5. Conexión entre la plataforma A20 y F20. A. Esquema del circuito de fluidica. B. Imagen de las plataformas



3.2.1.4 Reactivos

Los reactivos utilizados en la funcionalización de los cristales de cuarzo con electrodo de oro, fueron suministrados por Merck®, entre ellos: tampón fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*) 0.1 M pH 7.5, dodecilsulfato sódico 20% (SDS, *sodium dodecyl sulfate*),

hidróxido de potasio (KOH), peróxido de hidrógeno 50% (H₂O₂), etanol ultra puro (CH₃CH₂OH), ácido 16-mercaptohexadecanoico 97% (MHDA, *16-Mercaptohexadecanoic acid*), 11-Mercapto-1-undecanol 97% (MUD, *11-Mercapto-1-undecanol*), 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida 99% (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) 98%, etanolamina 99% (NH₂CH₂CH₂OH), estreptavidina, biotina (C₁₀H₁₆N₂O₃S) e hidróxido de sodio (NaOH). Los oligonucleótidos con sus respectivas modificaciones fueron adquiridos en la empresa *Eurogentec*[®] (ver Tabla 2-3). El COBAS Cleaner[®] es elaborado y distribuido de forma exclusiva por Hoffman – La Roche[®].

3.2.2 Métodos

Para el desarrollo de este proyecto, la funcionalización de la superficie del sustrato de oro a partir de la inmovilización de la sonda biorreceptora de ADN, se realizó por medio de la técnica de MSAM y la unión estreptavidina/biotina. La detección del analito de interés por medio de la hibridación de cadenas de ADN, se realizó a través de una microbalanza de cristal de cuarzo con frecuencia fundamental de 5, 50 y 100 MHz. Las QCM de 5 y 50 MHz, detectaron el evento biológico en el séptimo y tercer armónico de la frecuencia fundamental, respectivamente.

3.2.2.1 Protocolo de lavado de la plataforma A20 y F20

Es necesario limpiar la plataforma A20 y el sistema de fluídica, con el fin de desnaturalizar y remover las moléculas orgánicas que pudieron quedar inmovilizadas por adsorción o atrapamiento físico en el sistema.

Inicialmente se debe lavar la tubería que distribuye agua, PBS 0.1 M pH 7.5, y la muestra; con COBAS[®] Cleaner, agua Milli-Q y etanol, luego deben ser secadas con Nitrógeno gaseoso. Una vez limpias esas tuberías, se procede a hacerle pasar al sistema con ayuda del sistema de fluídica y en modo *inject*: COBAS[®] Cleaner, agua Milli-Q, etanol, y nuevamente agua Milli-Q; durante 25 minutos a una velocidad de 250 µL/min. Finalmente, se conecta la celda de flujo con el cristal piezoeléctrico recubierto de oro, para comenzar los ensayos de inmovilización e hibridación de cadenas de ADN.

3.2.2.2 Protocolo de inmovilización por medio de MSAM

Lavado del cristal

Inicialmente se debe hacer un lavado del cristal de cuarzo recubierto de oro, para disponer de una superficie libre de componentes orgánicos que puedan obstaculizar el proceso de quimisorción, entre la superficie del sustrato de oro y el grupo tiol de las moléculas de la monocapa. Esto se hace sumergiendo el cristal en una solución de SDS al 2% por 30 minutos a temperatura ambiente [149,150]. Luego se deben realizar lavados con agua destilada y etanol. La superficie del cristal debe ser secada con un gas inerte como Nitrógeno gaseoso, ya que la evidencia empírica sugiere que, el desplazamiento de oxígeno antes de sumergir el cristal en la solución de tioles mantiene una atmósfera lo más inerte posible, por lo que se mejora la reproducibilidad de las propiedades de las MSAM y se impide la oxidación de los tioles a sulfonatos y otras especies oxigenadas [151].

Posteriormente, se debe sumergir el cristal de cuarzo recubierto de oro en una solución de 50 mM de KOH y 25% de H₂O₂ por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se debe lavar el cristal con agua destilada y etanol, y secar su superficie con Nitrógeno gaseoso. Finalmente, se introducen los cristales por 30 minutos en el dispositivo UV *Ozone Cleaner* – Procleaner™ Plus de BioForce®, el cual produce fotólisis y genera sustancias como iones, radicales libres y moléculas excitadas; que reaccionan con oxígeno atómico para formar moléculas simples como dióxido de carbono (CO₂), agua (H₂O), nitrógeno (N) y oxígeno (O₂); que son removidas por medio de etanol ultra puro y Nitrógeno gaseoso [152,153].

Inmersión del cristal en solución de alcanotioles

Una vez limpia la superficie del cristal de cuarzo, se sumergió durante aproximadamente 12 horas y protegido de la luz en una solución de 1 mM [154,155] de 11 mercapto-1-undecanol (MUD) y ácido 16-mercaptohexadecanoico (MHDA), en una proporción 63:1 respectivamente. Durante esta etapa se da la formación de la monocapa autoensamblada mixta como consecuencia de la interacción entre el sustrato y el grupo sulfuro de los compuestos tiolados.

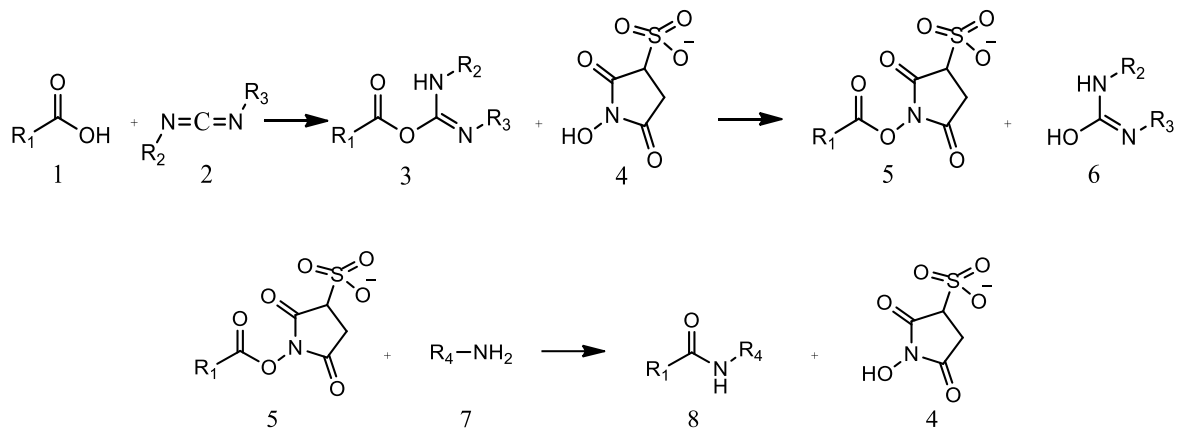
Activación del grupo funcional de la MSAM

La activación del grupo carboxílico del MHDA se hace a través de la conversión de este grupo en un reactivo intermediario llamado éster N-hidroxi-succinamida por medio de la inmersión del cristal modificado en una solución con etanol y EDC/NHS (0.2/0.05 M) por 4 horas a temperatura ambiente [12,156]. En la reacción, el 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]

carbodiimida (EDC) es un agente de activación/reticulación de carbodiimida que activa los grupos carboxilo del MHDA por reacción espontánea con el fin de facilitar el enlace con aminas primarias. Los intermediarios del EDC son muy inestables en solución acuosa, por este motivo es necesario utilizar en la proporción correcta el reactivo N-hidroxisuccinimida (NHS), ya que este último estabiliza el reactivo intermedio mediante su conversión a un éster de sulfo-NHS-amina o NHS-amina reactiva, aumentando así la eficiencia de las reacciones de acoplamiento mediadas por EDC para la inmovilización de proteínas [157].

En la Figura 3-6 [158] se esquematizan las reacciones involucradas en el proceso de inmovilización de la sonda de ADN, por medio de la amina conjugada en el extremo 5' del biorreceptor, donde el grupo carboxílico del MHDA (1) reacciona con EDC (2) para producir un intermediario inestable llamado O-acilisourea (3), que puede ser considerado un éster carboxílico con un grupo saliente activo. La O-acilisourea reacciona con NHS (4) generando una amina reactiva éster sulfuro-NHS (5), la cual al reaccionar con una amida primaria (7) de la sonda de ADN, produce un conjugado estable tipo amida (8) [159].

Figura 3-6. Reacción EDC/NHS



Unión del biorreceptor

Una vez activado el grupo funcional de la monocapa se procede a lavar el cristal con etanol y secar su superficie con Nitrógeno gaseoso. Luego, se añade 1 μ M [51,74,160] de la sonda de ADN que tiene conjugado en su extremo 5' un grupo amino (Tabla 2-3), disuelta en agua Milli-Q y durante toda la noche. Antes de adicionar la solución de la sonda de ADN al cristal piezoeléctrico, se calienta durante tres minutos a 95 °C, con el fin de romper los enlaces inespecíficos que se hayan establecido entre las cadenas de ADN.

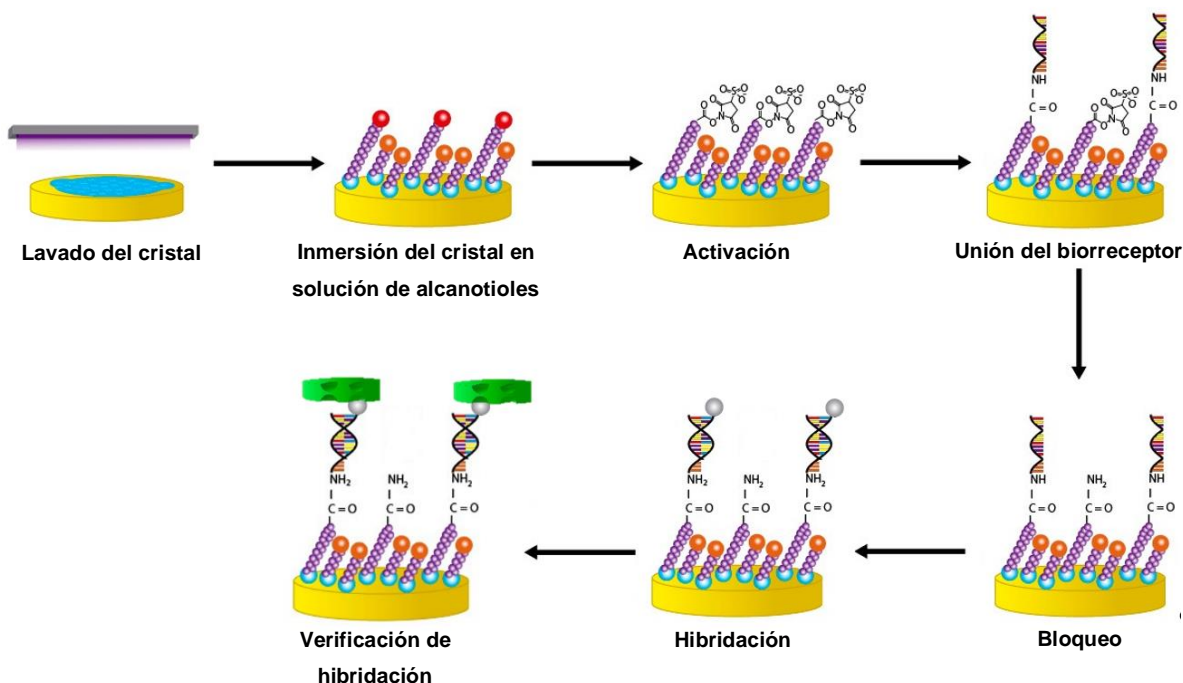
Bloqueo

Posterior a la activación de los grupos funcionales y a la unión covalente de la sonda de ADN, es necesario bloquear los sitios activos que no pudieron unirse al biorreceptor con el fin de evitar uniones no específicas que puedan alterar el resultado. Para el bloqueo se deja el cristal en inmersión con la solución de etanolamina a 1 M en tampón PBS 0.1 M y pH 7.5 durante 1 hora [12,161,162]. Se utiliza una solución de etanolamina, ya que en su estructura molecular se encuentra una amina primaria que es capaz de unirse a los grupos éster – NHS amino reactivos con la misma eficiencia que las aminas presentes en la proteína, garantizando que no quedan sitios activos para reacciones inespecíficas, y que las interacciones están restringidas únicamente por la proteína inmovilizada [12].

Hibridación

Para el proceso de hibridación, se hace pasar por el sistema de fluídica 300 μL de la solución que contiene la cadena complementaria de ADN y esta conjugada en su extremo 5' con una molécula de biotina (Tabla 2-3). Este oligonucleótido está preparado en PBS 0.1 M pH 7.5, previamente calentado durante tres minutos a 95 $^{\circ}\text{C}$, y se lleva al cristal de cuarzo con electrodo de oro que tiene inmovilizada en su superficie el biorreceptor génico, a una velocidad de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Para confirmar la hibridación entre cadenas de ADN, se hace pasar 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la proteína estreptavidina a una velocidad de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Figura 3-7. Esquema de las etapas de inmovilización e hibridación de cadenas de ADN por medio de MSAM



3.2.2.3 Protocolo de inmovilización por medio de estreptavidina/biotina

Lavado del cristal

El oro se utiliza como una superficie químicamente activa para la inmovilización de biomoléculas, por lo que la calidad de la superficie y los contaminantes ambientales que se depositan sobre el oro, afectará la cinética de unión de estas estructuras. Es por esta razón que la superficie de oro debe limpiarse antes de su respectiva modificación química [152]. El protocolo de lavado se hace sumergiendo el cristal en una solución de SDS al 2% por 30 minutos a temperatura ambiente [149,150]. Luego se deben realizar lavados con agua destilada y etanol, y la superficie del cristal debe ser secada con un gas inerte como Nitrógeno gaseoso. Finalmente, se introducen los cristales por 30 minutos en el dispositivo UV *Ozone Cleaner* – Procleaner™ Plus de BioForce®, y luego son lavados por medio de etanol ultra puro y secados con Nitrógeno gaseoso [152,153].

Inmovilización de la proteína estreptavidina

Los cristales de cuarzo recubiertos de oro se acoplaron a la celda de flujo y a la plataforma de medida, para hacerle pasar por medio del sistema de fluídica, 50 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína estreptavidina, diluida en PBS 0.1 M pH 7.5, a una velocidad de 50 $\mu\text{L/min}$. Durante esta etapa se da la inmovilización de la estreptavidina sobre la superficie de oro, por medio de interacciones con los grupos lisina y arginina, que se encuentran libres en la superficie de la proteína [163,164].

Unión del biorreceptor

Una vez inmovilizada la proteína estreptavidina, se añade 1 μM de la sonda de ADN que tiene conjugado en su extremo 5' una molécula de biotina (Tabla 2-3), disuelta en PBS 0.1 M pH 7.5, previamente calentada durante tres minutos a 95 $^{\circ}\text{C}$, a una velocidad de 50 $\mu\text{L/min}$.

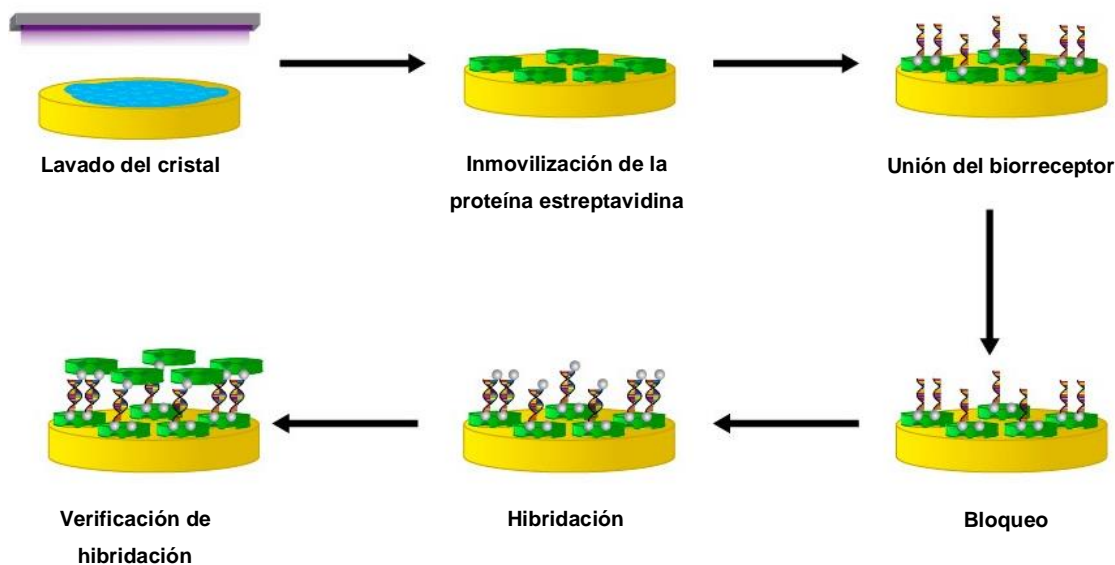
Bloqueo

Posterior a la unión de la sonda de ADN, es necesario bloquear los sitios de interacción de la proteína estreptavidina que no pudieron unirse a la molécula de biotina del biorreceptor, con el fin de evitar uniones no específicas que puedan alterar el resultado. Para bloquear la superficie, se hace pasar por el cristal de cuarzo con electrodo de oro, la solución de 100 μM de biotina en tampón PBS 0.1 M pH 7.5, a una velocidad de 50 $\mu\text{L/min}$.

Hibridación

Para el proceso de hibridación, se hace pasar por el sistema de fluídica 300 μL de la solución que contiene la cadena complementaria de ADN, y esta conjugada en su extremo 5' con una molécula de biotina (Tabla 2-3). Este oligonucleótido está preparado en PBS 0.1 M pH 7.5, previamente calentado durante tres minutos a 95 $^{\circ}\text{C}$, y se lleva al cristal de cuarzo con electrodo de oro que tiene inmovilizada en su superficie el biorreceptor génico, a una velocidad de 50 $\mu\text{L/min}$. Para confirmar la hibridación entre cadenas de ADN, se hace pasar 50 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína estreptavidina a una velocidad de 50 $\mu\text{L/min}$.

Figura 3-8. Esquema de las etapas de inmovilización e hibridación por medio de la unión entre la proteína estreptavidina y la molécula de biotina



3.3 Resultados

3.3.1 Inmovilización de sondas de ADN sobre el transductor piezoeléctrico de 150 MHz

El fenómeno de hibridación en el genosensor piezoeléctrico, es más desfavorable que aquel que se da en solución, debido a que el biorreceptor se encuentra inmovilizado sobre la superficie del cristal, produciendo una disminución en la movilidad y en la libertad de conformación espacial de las sondas de ADN [74]. Para conseguir maximizar la detección durante la hibridación, es necesario caracterizar los procesos de inmovilización para elegir las condiciones más adecuadas. Es por esto que se ha llevado a cabo un estudio con el biosensor piezoeléctrico de alta frecuencia de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz), con el fin de seleccionar el tipo de funcionalización que se empleará para fijar las sondas de ADN sobre las superficies de oro. Para estos experimentos se han considerado dos tipos de funcionalización: MSAM y la unión entre estreptavidina – biotina.

3.3.1.1 Método MSAM

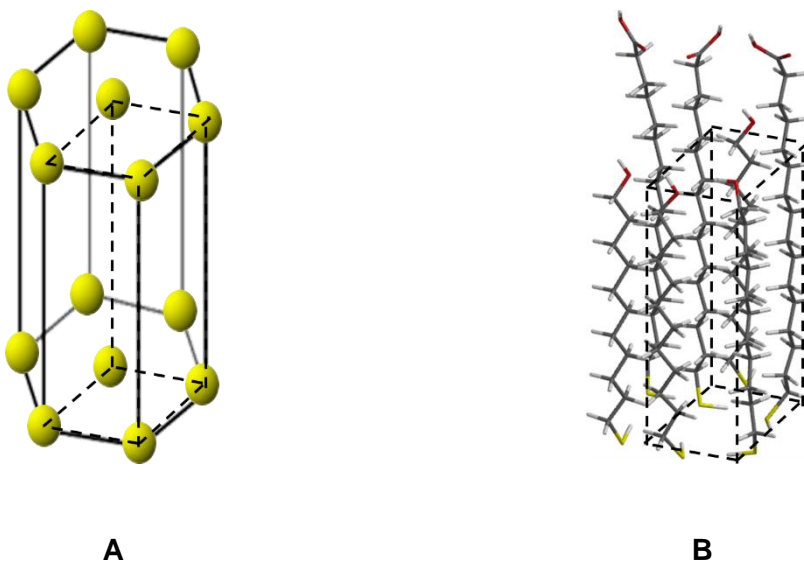
Para el proceso de inmovilización de sondas de ADN, por medio de la técnica de MSAM,

es indispensable que la sonda biorreceptora posea un grupo amino disponible para interactuar con la amina reactiva éster sulfuro, que se forma por la interacción del EDC – NHS con el grupo carboxílico del MHDA (Figura 3-6). Es por esto, que para la inmovilización de cadenas de ADN por medio de MSAM, se empleará la sonda conjugada en su extremo 5' con un grupo amino (Tabla 2-3).

De acuerdo al modelo conformacional planteado por Tseytlin [165] y Smith *et al.* [166], el área de la sección transversal de la doble cadena de ADN es de 346 \AA^2 , y el único punto de anclaje con el grupo carboxílico del MHDA, es la amina conjugada en su extremo 5'. A pesar de que la cadena de ADN tiene aminas disponibles para interactuar en la estructura de sus bases nitrogenadas, estas son menos básicas y nucleofílicas que sus contrapartes alquílicas debido a la donación del par de electrones del nitrógeno al sistema aromático, por lo que están menos disponibles para una reacción directa [167].

Por otro lado, Barrientos *et al.* [158] determinaron mediante el método semiempírico Austin Modelo 1, que la simetría que presentan los núcleos de azufre, de los alcanotioles usados, sobre la superficie de oro es hexagonal con un espacio entre núcleos de 4.991 \AA , y un área del cuadrado formado en la base del hexágono de 21.373 \AA^2 (Figura 3-9).

Figura 3-9. Estructura hexagonal de alcanotioles. A. Estructura hexagonal triple. B. Estructura hexagonal de cadena de alcanotioles en modelo de conectivas



A partir de la ecuación (3.1), se calcula la cantidad de cuadrados formados por la geometría de la MSAM que se requieren para cubrir el área de la sección transversal de la doble cadena de ADN; y teniendo en cuenta que cada cuadrado está compuesto por 4 átomos de azufre, se tiene que se necesitarían 64 moléculas de alcanotioles para cubrir el área superficial de la sonda de ADN hibridada con el analito de interés. Sin embargo, el biorreceptor se inmoviliza a la superficie de oro por medio de la interacción con un solo alcanotiol, por lo que la proporción que se necesita para anclar la sonda de ADN al cristal y darle suficiente espacio para la hibridación con su cadena complementaria es de 63 moléculas espaciadoras de MUD y 1 molécula de MHDA, la cual es la proporción 63 MUD: 1 MHDA utilizada en este trabajo.

$$\frac{\text{Área de la sección transversal de ADN}}{\text{Área del cuadrado formado por MSAM}} = \frac{346 \text{ \AA}^2}{21.373 \text{ \AA}^2} = 16 \quad (3.1)$$

Con el fin de verificar si las concentraciones estudiadas poseen el número suficiente de moléculas para cubrir el área total del electrodo de oro del cristal, se procederá a calcular en primera instancia el número de moléculas que se pueden inmovilizar sobre la superficie del cristal (ecuación (3.3)), y finalmente se calculará el número de moléculas presentes en la solución de la monocapa y ADN. El área de la superficie de oro disponible para interactuar con las moléculas de la MSAM es 0.79 mm^2 , y conociendo que las moléculas de la monocapa se organizan en un cuadrado con cuatro núcleos de azufre (Figura 3-9), que tienen una separación entre átomos de 4.991 \AA [158], se obtiene que en el área activa del cristal se pueden hallar 3.67×10^{12} cuadrados (ecuación (3.2)).

$$\frac{\text{Área activa del cristal}}{\text{Área del cuadrado formado por MSAM}} = \frac{\pi \cdot (5 \times 10^6 \text{ \AA})^2}{21.373 \text{ \AA}^2} = 3.67 \times 10^{12} \quad (3.2)$$

El número de átomos de azufre, según la geometría descrita por Barrientos *et al.* [158], se obtuvo mediante la siguiente serie:

$$\text{Número de átomos} = \{n + 2(2\sqrt{n} + 1) + [(\sqrt{n} - 1)(2\sqrt{n} + 2)]\} \quad (3.3)$$

Donde n es el número de cuadrados. Reemplazando en (3.3) $n = 3.67 \times 10^{12}$ que es el número de estructuras disponibles en el área activa del cristal, se obtiene que el número de átomos de azufre es 1.10×10^{13} .

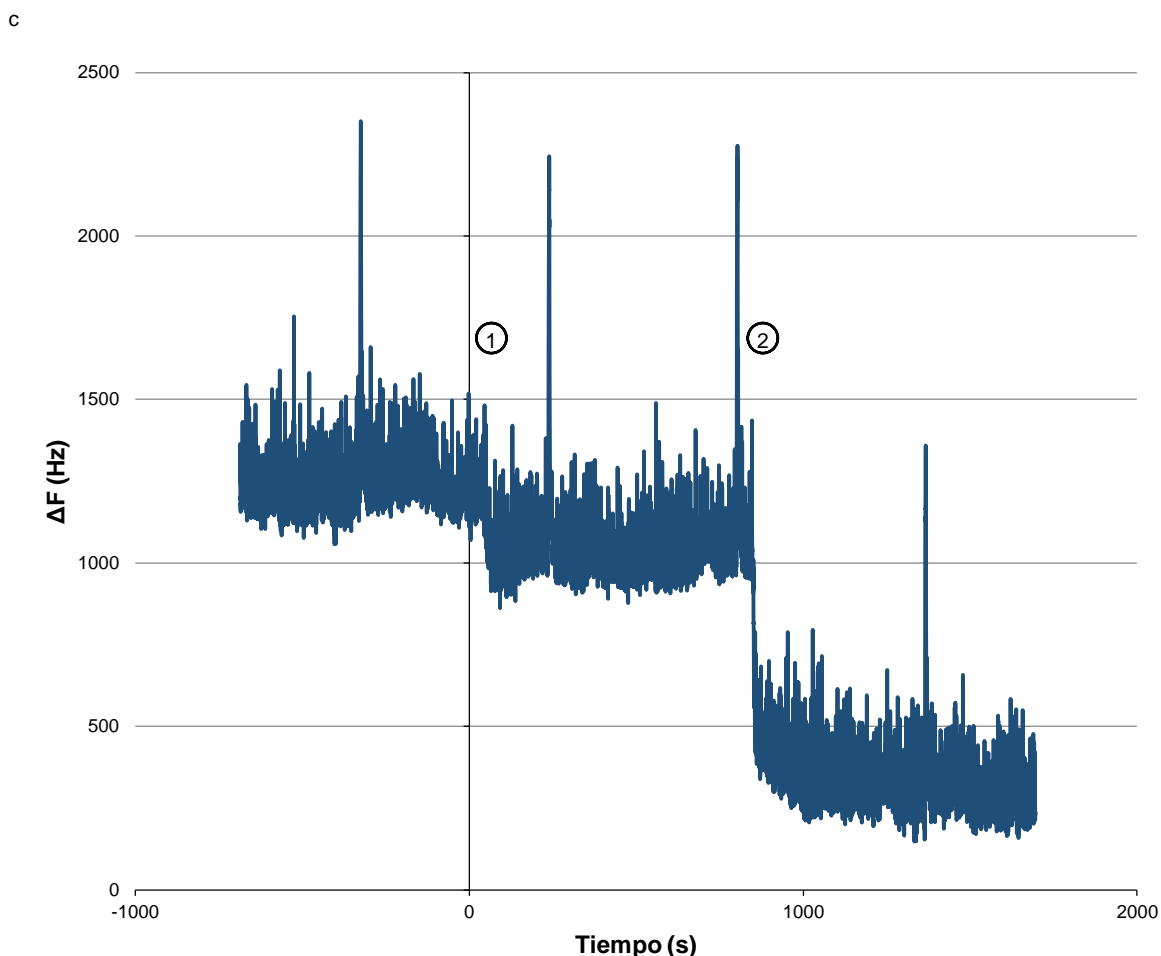
La solución mixta de 1 mM con volumen de 1 mL que contiene la mezcla de alcanotioles, tiene 6.023×10^{17} moléculas, por lo tanto posee el número suficiente de moléculas para cubrir la superficie del electrodo de oro del cristal de cuarzo.

1.10×10^{13} alcanotioles es el número máximo de moléculas que se unirían a la superficie, teniendo en cuenta la formación descrita en la Figura 3-9. Sin embargo, considerando la proporción 63 (MUD): 1 (MHDA) que tiene la mezcla, el número máximo de moléculas de MHDA, las cuales tienen como grupo funcional “cola” un ácido carboxílico susceptible de interactuar con las moléculas de ADN es 1.72×10^{11} moléculas.

Por otra parte, el número de moléculas de ADN presentes en la solución de 1 mL con concentración de $1 \mu\text{M}$ es de 6.023×10^{14} moléculas, lo que sugiere que la solución tiene el número suficiente de estructuras de ADN para unirse covalentemente a la MSAM, por lo que, suponiendo una estructura sin defectos, se espera una cobertura total de la superficie, desde la perspectiva del modelo.

En un biosensor el proceso de interacción entre el biomarcador de interés y su respectivo biorreceptor, debe transducirse en una señal que sea proporcional a la cantidad de analito de interés. En los biosensores piezoeléctricos de alta frecuencia, el principio de detección se basa en la medida del cambio de fase o frecuencia que se produce como consecuencia del aumento de masa, asociado al evento de reconocimiento del biomarcador. Esto conlleva a que el proceso de transducción esté de forma inequívoca ligado a la cantidad de analito que se está detectando. La Figura 3-10 muestra la variación de frecuencia, en tiempo real, del ensayo llevado a cabo en la plataforma A20 sobre cristales de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz). De acuerdo a la ecuación de Sauerbrey (ecuación (1.2)), los cambios en la frecuencia (Hz) del cristal se pueden asociar a la cantidad de masa (ng/cm^2) depositada sobre la superficie del material piezoeléctrico. Basados en esta relación, se obtuvieron los siguientes resultados.

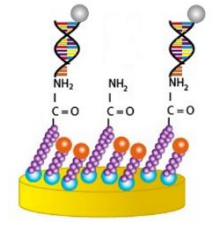
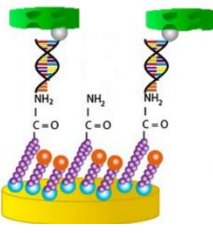
Figura 3-10. Ensayo de hibridación por medio de la técnica MSAM en un cristal piezoeléctrico de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz)



Antes de comenzar la inmovilización de moléculas sobre la superficie del cristal, es necesario alcanzar una línea base estable con la solución de trabajo (PBS 0.1 M pH 7.5), a partir de la cual se cuantifica el cambio de frecuencia, asociado a la unión de estructuras moleculares sobre la superficie del electrodo de oro. Una vez obtenida una línea base estable, se inyectó 1 μM de la cadena complementaria de ADN que tiene conjugado en su extremo 5' una molécula de biotina (Tabla 2-3). Esta inyección produjo una variación en la frecuencia del cristal, indicando que el analito de interés se hibridó a la sonda de ADN, que se encuentra inmovilizada a la superficie de oro por medio de MSAM (①). Finalmente, se inyectó 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptavidina para corroborar el proceso de hibridación, ya que esta proteína se debe unir a la molécula de biotina que está conjugada en el extremo 5' de la cadena complementaria (②) (Figura 3-10).

La Tabla 3-1 muestra los cambios de masa asociados al ensayo de hibridación de cadenas de ADN, por medio de la técnica MSAM.

Tabla 3-1. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de hibridación por medio de la técnica MSAM

Paso	Molécula	Δf (Hz)	Δm ($\frac{ng}{cm^2}$)	Representación gráfica
①	1 μ M sonda complementaria de ADN conjugada con biotina en su extremo 5'	-232.24	39	
②	50 μ g/mL estreptavidina	-749.33	126	

De acuerdo al modelo molecular planteado, el número de moléculas de MHDA que se pueden inmovilizar a la superficie es 1.72×10^{11} , además considerando que el biorreceptor de ADN tiene un solo punto de interacción con el grupo carboxilo activado de la MSAM, 1.72×10^{11} es el número de moléculas de ADN que se pueden inmovilizar a la superficie. Por otro lado, la variación de frecuencia al inyectar 1 μ M del analito de interés fue de -232.24 Hz, lo que equivale a 39 ng/cm^2 ; si se tiene en cuenta que el área de la superficie activa del cristal es de 0.79 mm^2 , se obtiene que 0.31 ng es la masa total inmovilizada sobre la superficie de oro. 0.31 ng equivalen a 2×10^{10} moléculas de ADN, asumiendo que la masa molar del analito de interés es de 9382.3 g/mol; lo que indica que se hibridó aproximadamente el 11.6% de sondas de ADN inmovilizadas sobre la superficie del sustrato.

El rendimiento para la hibridación por medio de MSAM sugiere que, a pesar de la idealización del modelo, la formación de monocapas conlleva a defectos estructurales en la

ubicación y formación de las moléculas, lo que implica no sólo la formación de multicapas [80,158], sino también que el proceso de autoensamblaje conlleva a la separación de dos fases que tienen diferencias en la densidad de empaquetamiento. Distintos estudios, realizados por medio de microscopia de fuerza atómica (AFM, *atomic force microscopy*), microscopia de efecto túnel (STM, *scanning tunneling microscopy*), voltametría cíclica (CV, *cyclic voltammetry*), espectroscopia de segundo armónico (SHG, *second-harmonic generation*) y espectroscopia vibracional (SFG, *sum-frequency generation*); demuestran que el dominio de la MSAM con mayor densidad de ADN es uniforme, lo que indica que representa el estado final de la monocapa, en el que las sondas de ADN adoptan una conformación preferentemente alineada de forma perpendicular al sustrato, lo que permite que el biorreceptor sea accesible al analito de interés y se pueda dar el proceso de hibridación. El dominio menos denso representa un estado metaestable e inconcluso del estado final de la monocapa, por lo que tiene defectos estructurales que conllevan a la formación de ADN autoensamblado de forma paralela a la superficie, en consecuencia, está inhabilitado para reconocer e interactuar con la cadena complementaria de ADN. Este comportamiento bifásico, se debe principalmente a la dinámica del proceso de autoensamblaje de la monocapa, ya que la unión covalente entre los átomos de oro y azufre se da rápidamente, sin embargo, el proceso de reorganización es lento y requiere de un tiempo relativamente largo para maximizar la densidad molecular y disminuir los defectos que se forman en la MSAM. Debido a que las moléculas adoptan estructuras y patrones geométricos regidos por la termodinámica de un proceso de quimisorción complejo, los defectos que se forman se originan por factores extrínsecos e intrínsecos al proceso de autoensamble. Factores externos como la rugosidad de la superficie, defectos estructurales en el sustrato como grietas o la variación de la distancia entre los átomos de oro, pureza de la solución de tioles, entre otros; son responsables de algunos defectos que se forman en la monocapa, no obstante, algunos son el resultado de la naturaleza de las MSAM, es decir de ser sistemas dinámicos con comportamientos de fases complejas [80,109,168,169].

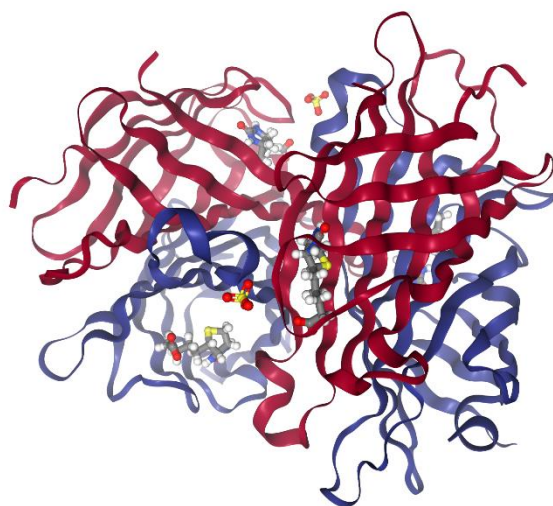
Por otro lado, el proceso de bloqueo utiliza una solución de etanolamina, la cual tiene en su estructura molecular una amina primaria capaz de unirse, no solo a los grupos éster – NHS amino reactivos que quedaron libres después del proceso de inmovilización, sino también de interactuar con las aminas disponibles de las bases nitrogenadas del biorreceptor génico, lo cual implica que dichas sondas quedan inaccesibles al analito de interés. Aunque varios estudios utilizan la solución de etanolamina para bloquear los sitios activos

[12,161,162,170], no existen estudios que comprueben o rechacen la unión no específica de etanolamina a las bases nitrogenadas que conforman las sondas de ADN.

Finalmente, al inyectar 50 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína estreptavidina, se obtuvo un cambio de frecuencia de -749.33 Hz, lo que equivale a 126 ng/cm^2 (Tabla 3-1). La cantidad de masa inmovilizada sobre la superficie del cristal de estreptavidina corresponde a 10×10^9 moléculas, que representan el 50% del número total de moléculas de cadenas de ADN que hibridaron con el biorreceptor génico. Esto indica que todas las moléculas hibridadas interactuaron, por medio de la biotina conjugada en el extremo 5' de la cadena complementaria, con uno de los sitios activos de la estreptavidina.

La Figura 3-11 muestra la representación tridimensional de la unión entre la biotina y la estreptavidina, las cuatro estructuras de la proteína que están representadas en contorno de líneas indican los residuos que interactúan con cada uno de los cuatro ligandos, mientras que aquellos marcados en color amarillo representan los aminoácidos que establecen enlaces de hidrógeno con la molécula de biotina, el resto de residuos forman interacciones débiles. La afinidad entre la estreptavidina y su ligando, se da por la participación de varios factores como la formación de múltiples enlaces de hidrógeno e interacciones Van der Waals entre la proteína y la molécula de biotina, el ordenamiento de los polipéptidos de superficie que adsorben al ligando, y las alteraciones estructurales en el sitio de unión a la biotina que producen cambios cuaternarios en la estreptavidina; estos elementos se combinan para producir una fuerte unión y una alta energía de activación para la disociación que caracteriza la casi irreversibilidad de la interacción entre la estreptavidina y biotina [171–174]. A pesar de que la proteína tiene cuatro sitios de unión disponibles con la molécula de biotina, sólo dos de ellos pueden interactuar con el analito de interés, lo que implica que por cada molécula de estreptavidina, dos cadenas de ADN interactúan con ella; lo cual coincide con el número de moléculas que se unieron al producto hibridado.

Figura 3-11. Representación tridimensional en contorno de cinta de la unión estreptavidina – biotina (PDB ID 2IZG)

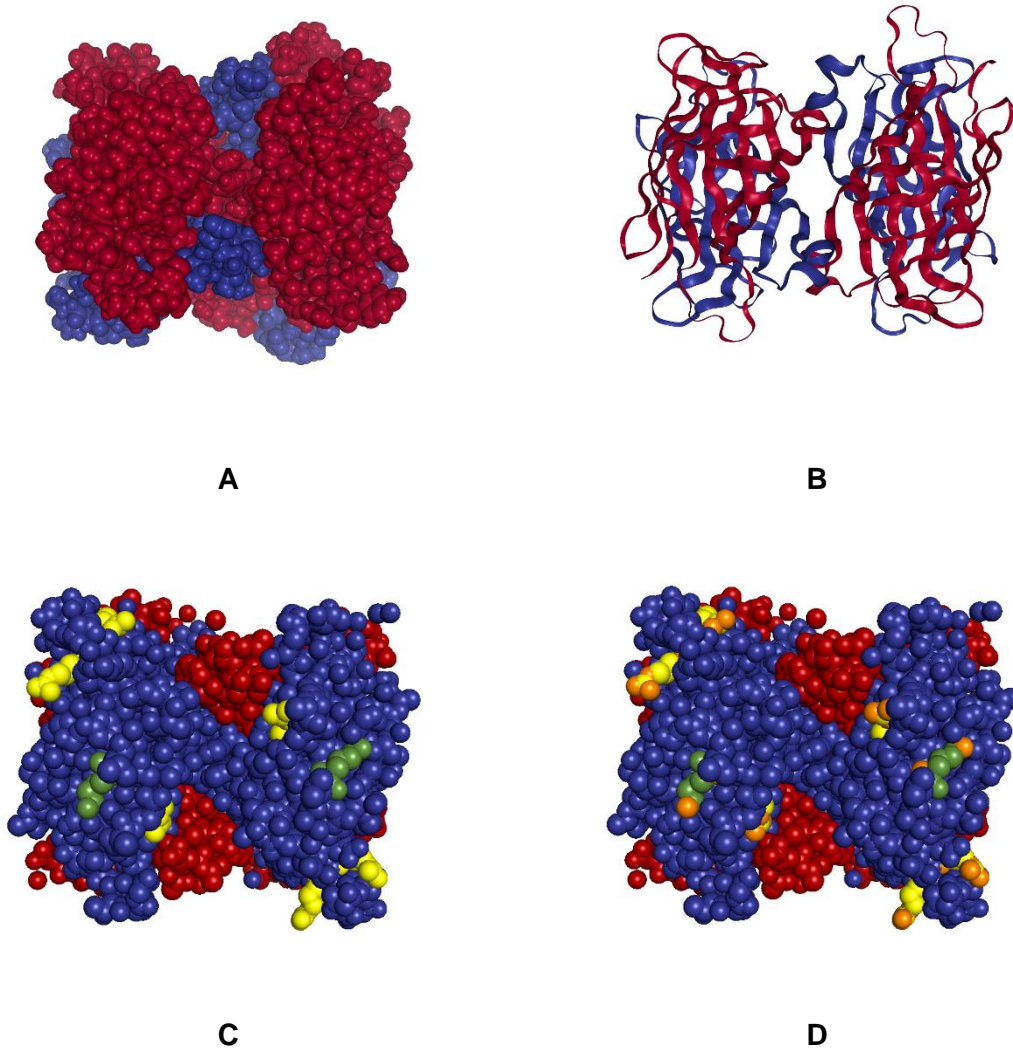


3.3.1.2 Método estreptavidina – biotina

Para la inmovilización de sondas de ADN por medio de la técnica de estreptavidina – biotina, desarrollada en este trabajo, es necesario que el oligonucleótido tenga una molécula de biotina disponible para interactuar con la proteína estreptavidina que se encuentra fija sobre la superficie del cristal. Es por esto que se usará la sonda conjugada en su extremo 5' con una molécula de biotina (Tabla 2-3).

La Figura 3-12 muestra la representación estructural de la proteína estreptavidina. La proteína está formada por cuatro unidades idénticas que tienen 159 aminoácidos. Cada subunidad posee cinco residuos de aminoácidos tipo Arginina y nueve tipo Lisina, para un total de 14 aminoácidos tipo amina primaria disponibles para que la proteína se fisisorba a la superficie de oro, lo que facilita su inmovilización sobre la superficie y conserva las propiedades estructurales de la molécula. La estreptavidina nativa de *Streptomyces avidinii* tiene una ausencia total de aminoácidos que tienen grupos sulfuro, tales como la Metionina y Cisteína. Este último es el que le confiere la capacidad, a algunas proteínas, de unirse de forma covalente a las superficies de oro [174–177].

Figura 3-12. Estructura tridimensional de la proteína estreptavidina (PDB ID 2IZG). A. Representación en contorno de cintas. B. Representación en contorno de superficie. C. Representación de los aminoácidos Lisina (verde) y Arginina (amarillo) en la proteína modelo de esferas. D. Representación del elemento nitrógeno (anaranjado) de los aminoácidos Lisina (verde) y Arginina (amarillo) en la proteína modelo de esferas



La orientación más probable de la proteína estreptavidina sobre la superficie, es aquella en la que tiene más puntos de interacción con el sustrato (Figura 3-12D). En esta conformación, la proteína tiene aproximadamente un área de 17.64 nm^2 y dos puntos de interacción con la molécula de biotina, lo cual sugiere que por cada proteína de estreptavidina se pueden inmovilizar dos sondas de ADN conjugadas en sus extremos 5' con una molécula de biotina.

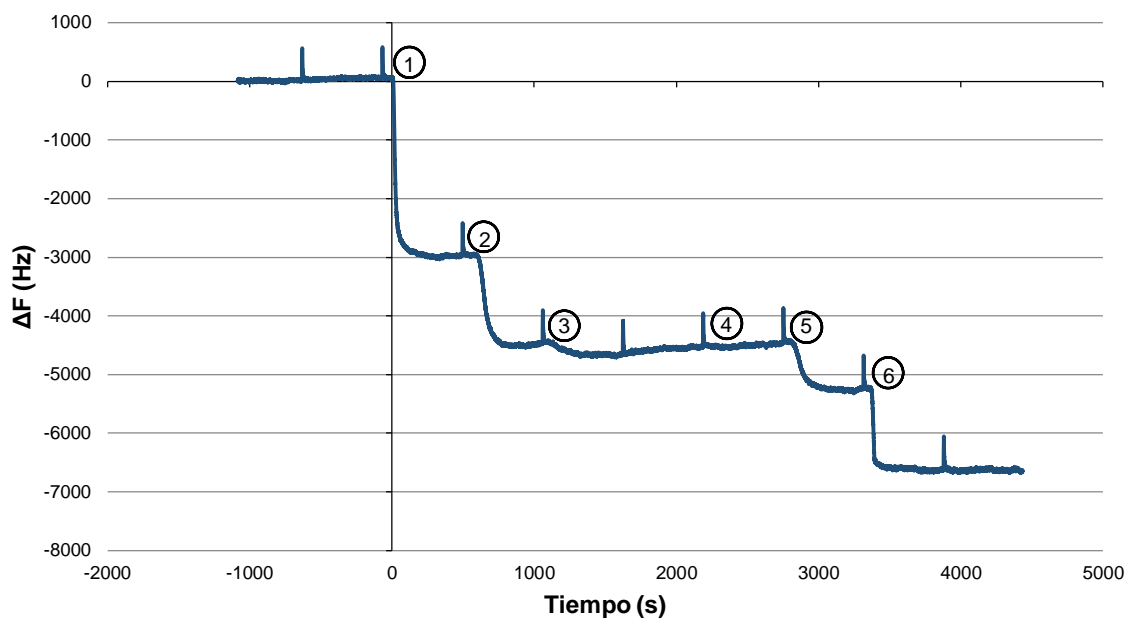
Con el objetivo de confirmar si las concentraciones empleadas tienen el número suficiente de moléculas para cubrir el área activa del cristal, se procederá a calcular el número de proteínas que se pueden inmovilizar en la superficie, y el número de moléculas presentes en la solución de estreptavidina y ADN. Teniendo en cuenta que el área de la superficie del sensor que puede interactuar con las proteínas es 0.79 mm^2 , y el área superficial de la estreptavidina que se inmoviliza sobre el sustrato es 17.64 nm^2 , se obtiene que en la superficie del cristal se pueden unir 4.48×10^{10} moléculas de estreptavidina.

La solución de estreptavidina de $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$ con volumen de $300 \text{ }\mu\text{L}$ tiene 1.50×10^{26} moléculas, por lo tanto, tiene el número suficiente de proteínas para cubrir el área activa del electrodo de oro del cristal de cuarzo.

Por otra parte, el número de moléculas de ADN presentes en la solución de $300 \text{ }\mu\text{L}$ con concentración de $1 \text{ }\mu\text{M}$ es de 1.8×10^{14} moléculas, lo que permite sugerir que la solución de ADN tiene el número suficiente de sondas de ADN para unirse a la estreptavidina, por medio de la biotina conjugada en su extremo 5'. De acuerdo al modelo molecular planteado y suponiendo una estructura sin defectos, se espera una cobertura total de la superficie.

Con el fin de corroborar el modelo molecular anteriormente descrito, se procedió a inmovilizar en tiempo real la proteína estreptavidina sobre la superficie del sustrato, junto con su respectivo ligando conjugado en el extremo 5' de la sonda de ADN. La Figura 3-13 muestra el cambio de la variable frecuencia, en tiempo real, del ensayo llevado a cabo en la plataforma A20 sobre cristales de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz) a una velocidad de $50 \text{ }\mu\text{L/min}$.

Figura 3-13. Ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en un cristal piezoeléctrico de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz)

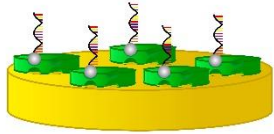
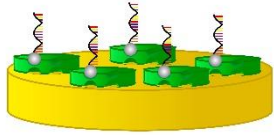
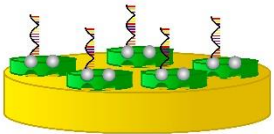


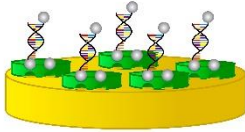
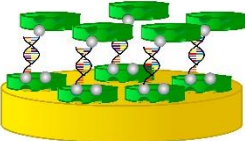
El primer paso, una vez alcanzada la estabilidad de la línea base, es inyectar 300 μL de la solución de estreptavidina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La inmovilización de la proteína sobre la superficie del sustrato es corroborada por la variación en la frecuencia de vibración del cristal (①). Luego, el segundo y tercer paso comprueba la inmovilización de la sonda biorreceptora sobre la superficie, previamente modificada con estreptavidina (② y ③). En el cuarto paso, se hace pasar por el sistema de fluídica 300 μL de la solución de biotina a 100 μM , con el fin de bloquear los sitios activos de la proteína que no se unieron a la sonda de ADN, no se observa un cambio en la variación de frecuencia porque el peso molecular de la biotina es de aproximadamente 244 Da [178], lo cual se sale del rango de detección de la técnica (④). El quinto paso representa la hibridación de la sonda con la cadena complementaria de ADN que tiene conjugado en su extremo 5' una molécula de biotina (⑤) (Tabla 2-3). La modificación de la cadena complementaria de ADN es una estrategia para corroborar el fenómeno de hibridación, ya que en caso de no formarse la doble cadena de ADN, el analito de interés se podría unir a la superficie de oro por dos mecanismos: i) en caso de no haberse bloqueado correctamente, se podría inmovilizar, por medio de la molécula biotina que tiene conjugado en su extremo 5', a las proteínas que se encuentran fijas en la superficie [179]; ii) el ADN podría interactuar con la superficie de oro por medio de las aminas disponibles

en sus bases, en este caso, el ADN tendría una conformación paralela a la superficie del cristal [74]. Aunque se dieran estos casos, las moléculas de biotina presentes en las cadenas complementarias de ADN, no serían accesibles a las proteínas, por lo que no habría variaciones en la frecuencia de vibración del cristal. Sin embargo, tal y como se muestra en el sexto paso, la inyección de la solución de estreptavidina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produce un cambio de frecuencia, lo que sugiere que el fenómeno de hibridación se produjo de manera exitosa (⑥).

La Tabla 3-2 muestra los cambios de frecuencia y masa asociados al ensayo de inmovilización e hibridación de cadenas de ADN, por medio de la técnica estreptavidina – biotina.

Tabla 3-2. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina

Paso	Molécula	Δf (Hz)	Δm ($\frac{ng}{cm^2}$)	Representación gráfica
②	1 μM sonda de ADN conjugada con biotina en su extremo 5'	-1592.60	268	
③	1 μM sonda de ADN conjugada con biotina en su extremo 5'	-141.93	23.86	
④	100 μM biotina	-	-	

⑤	1 μM sonda complementaria de ADN conjugada con biotina en su extremo 5'	-598.15	101	
⑥	50 $\mu\text{g/mL}$ estreptavidina	-1399.51	235	

Según el modelo molecular de adsorción descrito anteriormente, 8.96×10^{10} es el número de biorreceptores génicos que se pueden inmovilizar sobre la superficie del cristal, ya que por cada molécula de estreptavidina que se fisisorba sobre el sustrato, se inmovilizan dos sondas de ADN con una molécula de biotina conjugada en su extremo 5'. Dado que la variación de la frecuencia al inyectar 1 μM de la estructura biorreceptora fue en total -1734.53 Hz, lo que equivale a 291.86 ng/cm^2 , y teniendo en cuenta que la masa molar de la sonda conjugada con una molécula de biotina en su extremo 5' es de 14568 g/mol , se tiene un total de 9.5×10^{10} moléculas de ADN inmovilizadas sobre la superficie del cristal. De acuerdo a esto, por medio de la unión de la estreptavidina a la superficie de oro, se logran inmovilizar un 6% más de sondas de ADN, con respecto a lo pronosticado por el modelo molecular. Sin embargo, el cambio en la frecuencia al inyectar 1 μM de la cadena complementaria de ADN fue de -598.15 Hz, lo que equivale a 101 ng/cm^2 , y esto a su vez a 5.1×10^{10} moléculas. Esto indica que se logró hibridar a lo sumo el 54% de las sondas inmovilizadas sobre la superficie modificada con estreptavidina, lo cual sugiere que el 46.3% restante de moléculas biorreceptoras eran inaccesibles al analito de interés.

Esta diferencia se puede dar por los defectos intrínsecos asociados a la superficie del cristal, tales como rugosidad, separación entre átomos de oro y grietas; lo cual provoca una inmovilización no uniforme de la proteína sobre la superficie, y por ende la cesión de espacio libre sobre el oro para que esté interaccione con las aminas disponibles de las bases nitrogenadas por medio de un mecanismo de donación/donación, donde el átomo de nitrógeno dona carga a la superficie, la cual luego devuelve al grupo amina de la molécula

[176,180]. Por el contrario, distintos autores como Dolatshahi-Pirouz *et al.* [181] y Rechendorff [182] estudiaron la adsorción directa de proteínas sobre superficies de platino y tantalio, respectivamente. En sus investigaciones encontraron que la densidad superficial de la proteína incrementaba con el valor de rugosidad del sustrato, es decir que mientras más nano alturas por encima del plano de referencia existan más grande será la masa de moléculas de proteínas depositada sobre una unidad de área, ya que probablemente se incrementa el área superficial disponible para interactuar. Estos resultados sugieren que a pesar de que la rugosidad de la superficie del cristal favorece adsorciones no específicas sobre el sustrato, también incrementa el área superficial y por lo tanto, favorece la interacción con otras moléculas como la biotina conjugada en el extremo 5' de la sonda de ADN. Esta dualidad en las propiedades intrínsecas al proceso de fabricación del sustrato, explican el aumento en la cantidad de sondas de ADN inmovilizadas con respecto al modelo, ya que este considera una superficie plana y libre de defectos; así como también la razón por la cual no hibridan todas las moléculas de ADN.

Por otro lado, la variación de la frecuencia al inyectar la estreptavidina después del proceso de hibridación fue de -1399.51 Hz, lo que equivale a 235 ng/cm² y esto a su vez, representa 1.87×10^{10} moléculas que interactuaron con la superficie modificada del cristal. De acuerdo al modelo molecular planteado, una molécula de estreptavidina tiene dos sitios activos y disponibles para interactuar con dos moléculas de biotina, y por ende con dos cadenas de ADN hibridadas. 1.87×10^{10} moléculas de estreptavidina indican que el 73.3% de las moléculas que representan el analito de interés se unieron a por lo menos a un sitio activo de la proteína, mientras que el 26.7% restante probablemente no interactuaron, debido a que el exceso de grupos biotina en capas moleculares densamente compactadas impone restricciones estéricas que limitan la unión de los receptores de biotina como la proteína estreptavidina [183,184].

3.3.1.3 Comparación metodologías de inmovilización

La inmovilización de biomoléculas sobre superficies metálicas, siempre se da por adsorción física o fisiadsorción y/o adsorción química o quimiadsorción. En la adsorción física las interacciones predominantes son de tipo van der Waals, mientras que en la adsorción química las interacciones se dan por la formación de enlaces covalentes. Es por esto, que en la literatura se encuentra más ampliamente explorada el proceso de inmovilización por quimiadsorción, ya que se cree que el proceso es más selectivo, permite ejercer un buen

control de la densidad de moléculas y la organización espacial de sus componentes [92,185,186]. Mientras que la adsorción física se caracteriza por ser más rápida y sencilla que la adsorción química, pero permite la presencia de una gran cantidad de moléculas que interactúan de manera no específica con la interfaz biológica, lo que contribuye negativamente al proceso de hibridación [187–189].

Para el desarrollo de este trabajo, se estudió la inmovilización e hibridación de cadenas de ADN por medio de la química de monocapas autoensambladas y la unión entre la estreptavidina y biotina. La primera de ellas permite la quimiadsorción a través del enlace covalente que se forma entre los átomos de azufre del grupo mercapto y los átomos de oro de la superficie del cristal; pero al mismo tiempo algunas cadenas de ADN interactúan con la monocapa por medio de enlaces covalentes, y otras se inmovilizan a la superficie por fisiadsorción, adoptando una configuración preferentemente horizontal con varios puntos de unión entre las bases nitrogenadas y el oro. La metodología que utiliza la interacción entre la estreptavidina y la molécula de biotina, permiten la fisiadsorción de la proteína por medio de los aminoácidos tipo Lisina y Arginina, y aunque la unión entre la estreptavidina y su ligando se da por interacciones Van der Waals, otros factores como el cambio conformacional de la proteína, influyen a aumentar su afinidad a valores cercanos al enlace covalente.

De acuerdo al modelo molecular planteado, la metodología que utiliza monocapas autoensambladas puede inmovilizar potencialmente 8.24×10^{10} más moléculas de ADN que la técnica que utiliza preferentemente interacciones Van der Waals. Sin embargo, al estudiar el fenómeno de inmovilización e hibridación por medio del biosensor piezoeléctrico, se refleja un mayor cambio de frecuencia en el caso en que se usa la interacción estreptavidina – biotina, ya que la metodología por MSAM hibridó aproximadamente el 11.6% de las cadenas de ADN que potencialmente podían interactuar con su complementaria, mientras que la técnica de fisiadsorción logró hibridar aproximadamente el 53.7% del analito de interés (Tabla 3-3).

Tabla 3-3. Comparación metodologías de inmovilización

	Molécula	Δf (Hz)	Δm ($\frac{ng}{cm^2}$)	Representación gráfica
Hibridación por medio de MSAM	1 μ M sonda complementaria de ADN conjugada con biotina en su extremo 5'	-232.24	39	
	50 μ g/mL estreptavidina	-749.33	126	
Hibridación por medio de la unión entre estreptavidina y biotina	1 μ M sonda complementaria de ADN conjugada con biotina en su extremo 5'	-598.15	101	
	50 μ g/mL estreptavidina	-1399.51	235	

Estos resultados son coherentes con lo encontrado en el estudio de Wan *et al.* [190], en el que comparan la hibridación de cadenas de ADN por medio de técnicas por quimiadsorción como las MSAM, y metodologías que utilizan preferentemente la interacción entre la estreptavidina y biotina, en este trabajo observan por medio de AFM y CV que la cobertura del biorreceptor génico por medio de monocapas es de aproximadamente el 10%, mientras que los procesos mediados por estreptavidina y su ligando, producen mayores coberturas y respuestas en los cambios electroquímicos del sensor. Por lo que, a pesar de la unión no específica de algunas moléculas a la interfaz, nuestro trabajo ha demostrado que para el desarrollo de genosensores piezoeléctricos de alta frecuencia, se obtiene una mayor eficiencia en los procesos de inmovilización e hibridación utilizando la técnica de unión estreptavidina – biotina, ya que la MSAM, bajo las condiciones analizadas, produce en su mayoría una fase metaestable e inconclusa en la que los oligonucleótidos quedan paralelos a la superficie en una geometría desfavorable para los procesos de hibridación. Además, la técnica de inmovilización mediada por la unión entre la estreptavidina y biotina, no sólo aumenta la eficiencia del proceso de detección del evento biológico, sino que también permite un desarrollo en tiempo real de la interfaz y acorta en aproximadamente 29.2 horas el proceso de inmovilización del biorreceptor a la superficie del cristal.

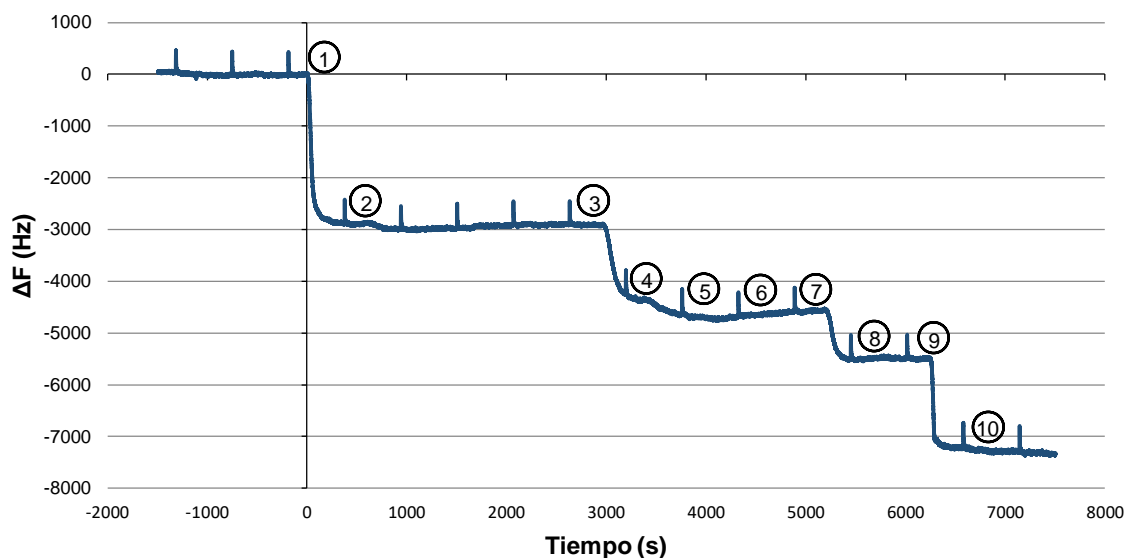
3.3.2 Análisis del proceso de hibridación

El análisis de la metodología de inmovilización, permitió seleccionar la técnica basada en la unión entre la estreptavidina y la biotina, como la forma más sencilla, rápida y eficiente de detectar la hibridación de cadenas de ADN en un genosensor piezoeléctrico de alta frecuencia, con respecto a la técnica basada en la quimiadsorción de monocapas autoensambladas. Sin embargo, la detección durante el proceso de hibridación se puede maximizar para obtener una mayor eficiencia, y por lo tanto alcanzar una alta sensibilidad, especificidad, repetibilidad y reusabilidad del dispositivo. Por ello se ha llevado a cabo, un estudio con el biosensor piezoeléctrico de alta frecuencia y el cristal de 50 MHz en el tercer armónico; con el fin de evaluar y seleccionar las condiciones de inmovilización, hibridación y regeneración en flujo. Para estos experimentos se han considerado aspectos como la cantidad de recubrimiento molecular, controles de hibridación y las condiciones de regeneración de la superficie. Además, se ha considerado un análisis estadístico de la repetibilidad del ensayo.

3.3.2.1 Recubrimiento molecular

El primer aspecto que se ha considerado, ha sido el de evaluar el recubrimiento molecular que se da en el proceso de construcción de la interfaz biológica. Debido a que el proceso de hibridación depende de la obtención de una superficie organizada, densa y estructurada, se ha procedido a estudiar el número de inyecciones necesarias para formar una capa de ADN con alto recubrimiento molecular. La Figura 3-14 muestra el cambio de frecuencia, en tiempo real, del ensayo llevado a cabo en la plataforma A20 sobre cristales de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz).

Figura 3-14. Ensayo de recubrimiento molecular en un cristal piezoeléctrico de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz)



Inicialmente se obtiene una línea base estable para cuantificar los cambios de frecuencia asociados a las variaciones de masa en la superficie del cristal. Las dos primeras inyecciones representan la unión de la proteína estreptavidina [50 $\mu\text{g/mL}$] a la superficie del cristal. Luego el tercer y cuarto paso muestran la variación de frecuencia al inyectar 300 μL de la solución de la sonda biorreceptora a una concentración de 1 μM . En el quinto y sexto paso, se hace pasar por el sistema de fluídica 300 μL de la solución de biotina a 100 μM , para bloquear los sitios activos de la estreptavidina. Luego, se inyectan dos veces 1 μM de la cadena complementaria de ADN que tiene conjugado en su extremo 5' una molécula de

biotina. Finalmente, se observa el cambio de frecuencia, en la novena y décima inyección, de la unión entre la estreptavidina y la biotina conjugada al analito de interés.

La Tabla 3-4 muestra los cambios de frecuencia y masa asociados al ensayo de inmovilización e hibridación de cadenas de ADN, por medio de la técnica estreptavidina – biotina.

Tabla 3-4. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de recubrimiento molecular

Molécula	Δf (Hz)	Δm ($\frac{ng}{cm^2}$)
50 μ g/mL estreptavidina (1)	-2878	-
50 μ g/mL estreptavidina (2)	-95.52	-
1 μ M sonda de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (3)	-1234.53	218
1 μ M sonda de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (4)	-406.97	71.74
100 μ M biotina (5)	-	-
100 μ M biotina (6)	-	-
1 μ M sonda complementaria de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (7)	-877.13	155

1 μM sonda complementaria de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (8)	22.95	-4.04
50 $\mu\text{g/mL}$ estreptavidina (9)	-1746.32	308
50 $\mu\text{g/mL}$ estreptavidina (10)	-63.43	11

El interés de este estudio se centra en conseguir un alto recubrimiento molecular, por lo que se ha determinado que el parámetro que permite identificar la proporción de moléculas en superficie que están interactuando entre ellas, es el cambio en la variable de frecuencia. Se consideró que el sustrato estaba saturado, en el momento en que se obtuviera una variación inferior a 100 Hz, ya que este valor representa el promedio de ruido de la señal, por lo que un cambio de esta magnitud supone variaciones asociadas al funcionamiento del dispositivo, más no a la interacción entre moléculas de la interfaz biológica. De acuerdo a lo anterior y a los datos obtenidos (Tabla 3-4), se encuentra que solo es necesario realizar dos inyecciones de la sonda de ADN que representa el biorreceptor génico. Esto se debe probablemente a que al inyectar la proteína estreptavidina que interactúa con el oro, se logra un recubrimiento molecular alto; por lo que al inyectar en flujo la sonda de ADN, esta no tiene tiempo suficiente para unirse con todos los sitios activos y disponibles sobre la superficie del cristal. La primera inyección de la sonda de ADN produce un cambio de masa de 218 ng/cm^2 , lo que equivale a 7.12×10^{10} moléculas. De acuerdo al modelo molecular planteado para la inmovilización de cadenas de ADN, este valor indica que el 80% de los sitios activos de la estreptavidina inmovilizada sobre la superficie interactúan con las moléculas biorreceptoras de ADN. Sin embargo, al realizar la segunda inyección no sólo se alcanza el 100% de interacción, sino que también se inmoviliza un 6% más de moléculas mediante interacciones no específicas con la superficie de oro.

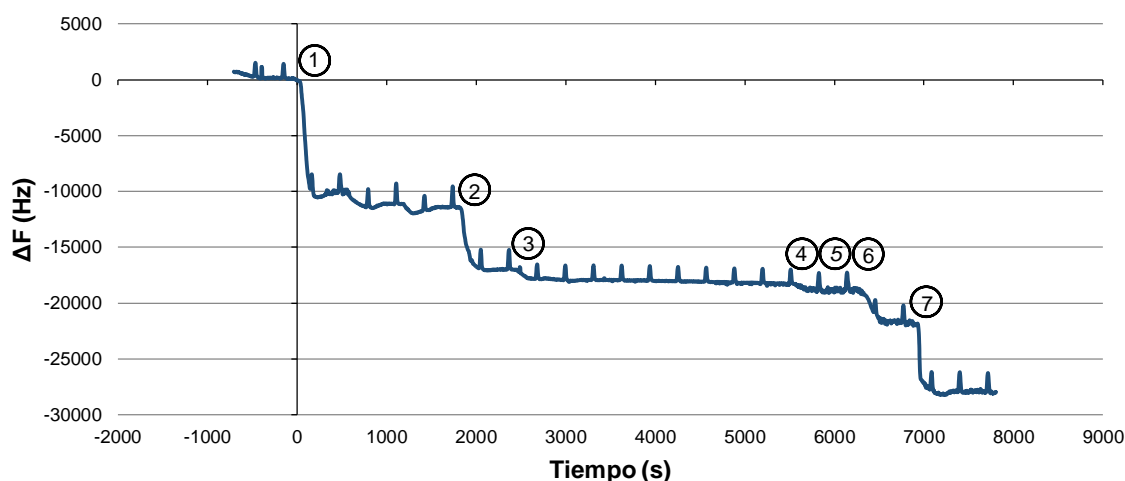
Por otro lado, es necesario destacar el comportamiento de la segunda inyección del analito de interés, ya que a diferencia de todas las demás, no sólo produce un cambio inferior a

100 Hz, sino que ocasiona un cambio positivo en la variación de la frecuencia de 22.5 Hz, lo que equivale a un cambio negativo de masa de -4.04 ng/cm^2 . Esto implica que se produjo una desorción de moléculas, propiciado por el fenómeno de interacción que se da entre la sonda biorreceptora que tiene algunos puntos de interacción con los átomos de oro, por medio de las bases nitrogenadas, y el analito de interés. La cantidad de moléculas que se separan de la superficie es de aproximadamente 2.3%, lo cual representa la tercera parte de las sondas de ADN que se unieron de forma no específica al cristal.

3.3.2.2 Controles de hibridación

Uno de los aspectos más importantes que tiene la investigación experimental es la obtención de inferencias válidas, las cuales se obtienen en un mayor porcentaje cuando se han aplicado controles adecuados a los ensayos realizados durante la investigación. La Figura 3-15 muestra el control llevado a cabo, en la plataforma A20 sobre cristales de 100 MHz, para verificar que la hibridación entre la sonda biorreceptora y el análogo de interés sea específica. Además, la Figura 3-16 muestra la inclusión de un control para verificar que la variación de frecuencia obtenida durante la última inyección de estreptavidina, esté asociada exclusivamente a la interacción de la proteína con el producto hibridado.

Figura 3-15. Ensayo de control de hibridación en un cristal piezoeléctrico de 100 MHz



Una vez alcanzada una línea base estable, se lleva a cabo la inyección de la proteína estreptavidina, la sonda biorreceptora de ADN y la molécula de biotina; en los pasos 1, 2, 3 y 4. El quinto paso representa la inyección de $1 \mu\text{M}$ de una secuencia control de 26 pares

de bases con secuencia 5'-ACATTAAACACTAAAGAACAGCGTTG-3', la cual hace parte de la región satélite del ADN nuclear del parásito *Trypanosoma brucei*. Finalmente, en el sexto y séptimo paso se da el proceso de hibridación, y su respectiva verificación por medio de la proteína estreptavidina.

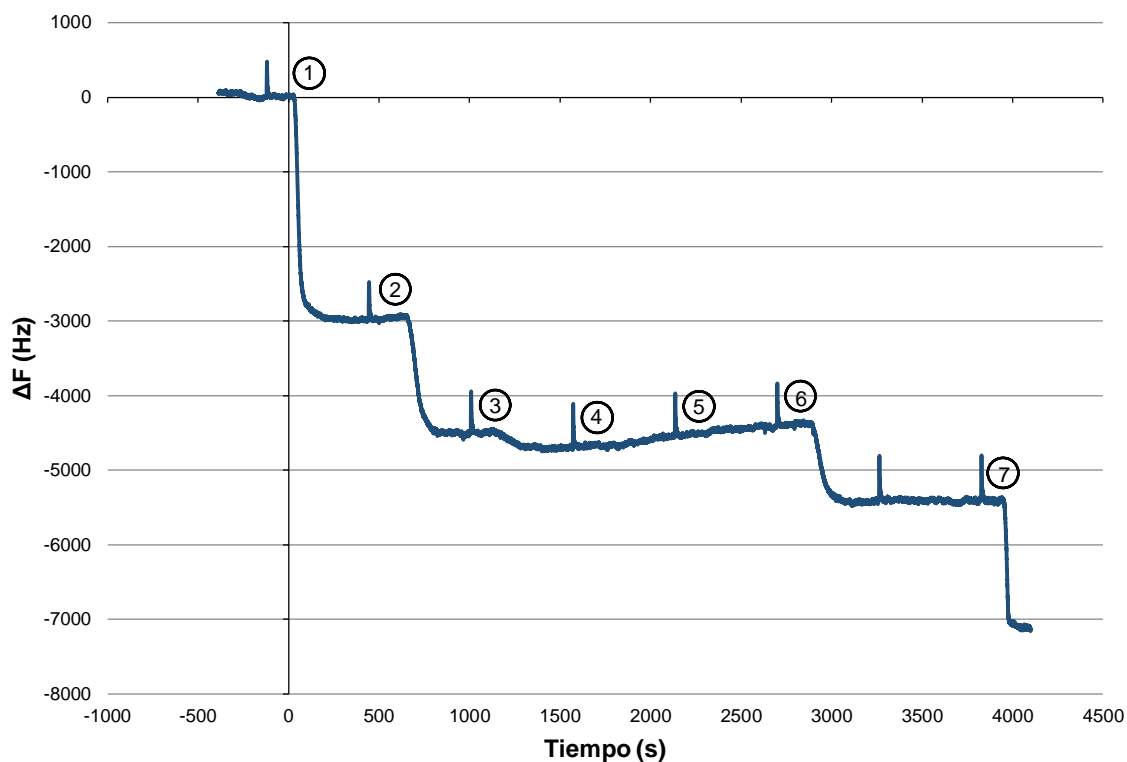
La Tabla 3-5 muestra los cambios de frecuencia y masa asociados al ensayo de control de hibridación de cadenas de ADN, por medio de la técnica estreptavidina – biotina.

Tabla 3-5. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de control de hibridación

Molécula	Δf (Hz)	Δm ($\frac{ng}{cm^2}$)
Control: secuencia satélite de <i>Trypanosoma brucei</i> (5)	76	-

Al inyectar la secuencia control, se obtuvo un cambio de frecuencia de aproximadamente 76 Hz, lo cual se encuentra dentro de la variación por ruido del dispositivo. Por lo tanto, se sugiere que no existe variación en la frecuencia de vibración del cristal asociado al paso de la secuencia control, lo que indica que esta no interactúa con las moléculas inmobilizadas a la superficie; y el cambio de frecuencia al inyectar el analito de interés, se da exclusivamente por la interacción de esta con la sonda biorreceptora.

Figura 3-16. Ensayo de control de hibridación en un cristal piezoeléctrico de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz)



Los pasos de la inmovilización están representados mediante las inyecciones 1, 2, 3 y 4; que muestran la unión a la superficie de la estreptavidina, la sonda de ADN y la molécula de biotina que se utiliza para bloquear la superficie, respectivamente. El quinto paso muestra la inyección de la solución de estreptavidina a 50 $\mu\text{g/mL}$, la cual representa el control negativo llevado a cabo durante este ensayo. La inyección 6 indica la hibridación de las cadenas de ADN mediante la interacción del analito de interés con el biorreceptor génico, y la inyección 7 muestra el cambio de frecuencia asociado a la unión de la estreptavidina al producto hibridado.

La Tabla 3-6 muestra los cambios de frecuencia y masa asociados al ensayo de control de hibridación de cadenas de ADN, por medio de la técnica estreptavidina – biotina.

Tabla 3-6. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de control de hibridación

Molécula	Δf (Hz)	Δm ($\frac{ng}{cm^2}$)
Control: 50 μ g/mL estreptavidina (5)	145	-26

De acuerdo a los datos obtenidos en la Tabla 3-6, se encuentra que la proteína estreptavidina que se inyecta después del proceso de hibridación, interactúa de manera exclusiva con la biotina conjugada en el extremo 5' del analito de interés, ya que al inyectarla antes de este, se obtuvo un cambio de frecuencia de 296 Hz, lo que equivale a -52 ng/cm². Esto implica, no solo que no interaccionó con las moléculas de la interfaz biológica, sino que produjo una desorción de algunas de las estructuras moleculares inmovilizadas sobre la superficie del transductor piezoeléctrico. Esto se debe a que la proteína estreptavidina puede interactuar con la biotina conjugada en el extremo 5' de las sondas de ADN que se fisisorben de manera no específica sobre el cristal.

3.3.2.3 Variabilidad

Los estudios de variabilidad tienen como propósito cuantificar la variación asociada al sistema de medición y evaluar la variabilidad total del proceso. Los resultados obtenidos permitirán decidir si la metodología de detección desarrollada en este trabajo obtiene mediciones repetidas bajo las mismas condiciones experimentales [191]. De lo contrario, el cambio de la variable respuesta podría ser confundido con la variabilidad propia del sistema, y por lo tanto la técnica perdería confiabilidad para ser usada como un método de identificación del gen del antígeno O de la bacteria patógena *E. coli* O157:H7.

Para determinar la variabilidad entre los ensayos de hibridación de cadenas de ADN, llevados a cabo en la plataforma A20 sobre cristales de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz), se procedió a realizar un análisis de desviación estándar (SD, *standard deviation*), por medio de un estudio observacional descriptivo de tipo transversal. En este estudio, se registró el cambio de masa, es decir, el cociente entre el cambio de frecuencia y el factor de sensibilidad del cristal, que se obtuvo al inyectar el biomarcador. La Tabla 3-7 indica los valores obtenidos durante los ensayos.

Tabla 3-7. Ensayos de repetibilidad

Molécula	$\Delta m \left(\frac{ng}{cm^2} \right)$
1 μ M sonda complementaria de ADN conjugada con biotina en su extremo 5'	155
	172
	99
	83
	91
	98
	77
	101
	95

Para evaluar la normalidad de los datos, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk la cual arrojó un valor p igual a 0.056, lo que indica que los datos tienen una distribución normal. Una vez comprobado el supuesto de normalidad, se procedió a calcular la SD de los datos adquiridos, la cual arrojó un valor de 32.7; y dado que el nivel de detección del dispositivo es de 33.6 ng/cm², el cual se determinó por selección propia al tomar en consideración el ruido promedio en los ensayos; se sugiere que el proceso de hibridación, bajo las condiciones analizadas en este trabajo, tiene una variabilidad aceptable; ya que la variación

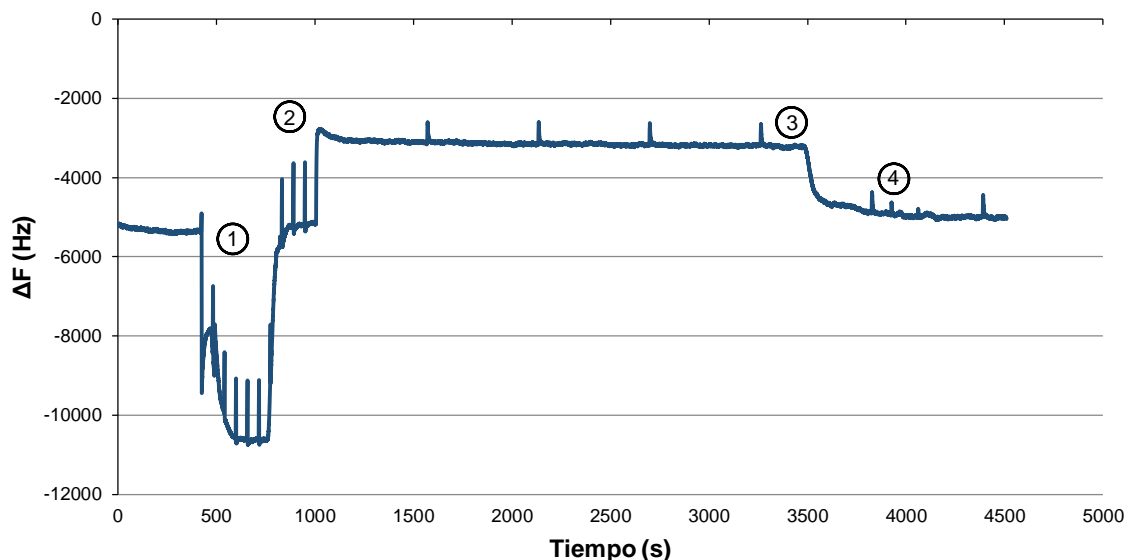
del conjunto de datos numéricos se encuentra por debajo del ruido que presenta el dispositivo.

3.3.2.4 Regeneración

La reutilización de la superficie sensora se alcanza mediante su regeneración, es decir, al romper las uniones entre el complejo formado por la molécula biorreceptora y el biomarcador, con el fin de lograr medidas sucesivas del evento biológico de interés. Dependiendo de la naturaleza de la molécula inmovilizada y de las condiciones de regeneración, una misma interfaz biológica puede ser utilizada decenas o cientos de veces [192]. El objetivo, en el caso de genosensores es la ruptura de los puentes de hidrógeno que se establecen entre las bases nitrogenadas de las cadenas complementarias de ADN, mediante cambios de pH y/o temperatura [74,193]. Dado que las válvulas de la plataforma F20 no soportan temperaturas superiores a los 50 °C, se procedió a evaluar la regeneración mediante alteraciones de pH en el ambiente de la superficie sensora, para esto se inyectó durante 4 - 5 minutos una solución de hidróxido de sodio (NaOH) a diferentes concentraciones [92,194] y a una velocidad de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$; luego se pasa la solución de trabajo de 4 a 5 minutos a la misma velocidad, y finalmente se restaura la velocidad del sistema a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, se vuelve a alcanzar una línea base estable, y se inyecta el analito de interés que tiene conjugado en su extremo 5' una molécula de biotina y la proteína estreptavidina, para verificar el proceso de regeneración.

Dado que el proceso de inmovilización e hibridación se llevó a cabo por medio de la unión entre la proteína estreptavidina y la molécula de biotina, tal y como se ha mostrado anteriormente, en los cristales de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz); la Figura 3-17, Figura 3-18, Figura 3-19 y Figura 3-20 muestra únicamente los cambios de frecuencia asociados al proceso de regeneración, desde la inyección de la solución de NaOH.

Figura 3-17. Regeneración de la superficie con 0.02 M de NaOH



Una vez comprobado el proceso de hibridación por medio de la proteína estreptavidina, el primer paso de la regeneración consiste en hacerle pasar a la superficie sensora la solución de NaOH a 0.02 M, luego en el segundo paso se pasa la solución de PBS pH 7.5 y finalmente, en el tercer y cuarto paso se inyecta 1 μM del analito de interés y 50 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína estreptavidina.

La Tabla 3-8 muestra los cambios de frecuencia y masa asociados al ensayo de regeneración, por medio de la solución de NaOH 0.02 M.

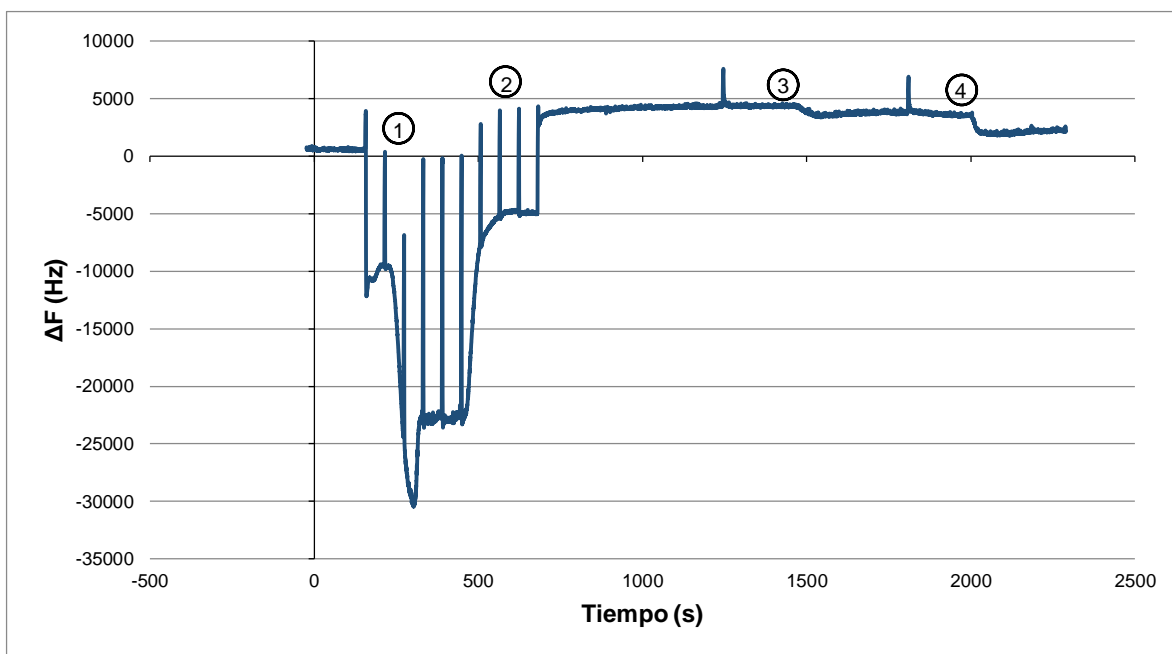
Tabla 3-8. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de regeneración por medio de solución de NaOH 0.02 M

Molécula	Δf (Hz)	Δm ($\frac{ng}{cm^2}$)
1 μM sonda complementaria de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (3)	-1482.54	306

50 $\mu\text{g/mL}$ estreptavidina (4)	-336.23	56
----------------------------------------	---------	----

Dado que la variación de frecuencia al inyectar 1 μM del analito de interés fue de -1482.54 Hz, lo que equivale a 306 ng/cm^2 , y teniendo en cuenta que el cambio de masa para esta misma molécula en los ensayos anteriores es de 101 ng/cm^2 , se sugiere que el NaOH no sólo ocasiona la ruptura de los puentes de hidrógeno que se establecen entre las cadenas de ADN, sino que también retira la estreptavidina que se fisisorbe a la superficie del cristal, por lo que quedan más vacantes disponibles para que el analito de interés interactúe con los átomos de oro. Esto se corrobora, ya que al inyectar 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptavidina se obtiene un cambio de masa equivalente a 56 ng/cm^2 , lo cual es considerablemente menor a la cantidad alcanzada en ensayos anteriores. Esto sugiere que las cadenas de ADN adoptan una geometría que resulta inaccesible a la proteína, la cual no coincide con el proceso de hibridación entre el biorreceptor y su respectiva secuencia complementaria.

Figura 3-18. Regeneración de la superficie con 0.01 M de NaOH



Después de la inmovilización e hibridación de las cadenas de ADN, se procedió a regenerar la superficie con NaOH 0.01 M, bajo las condiciones explicadas anteriormente, luego se hizo pasar la solución de trabajo hasta obtener nuevamente una línea base estable, y

finalmente se inyectó 1 μM del analito de interés y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptavidina en el cuarto y quinto paso, respectivamente.

La Tabla 3-9 muestra los cambios de frecuencia y masa asociados al ensayo de regeneración, por medio de la solución de NaOH 0.01 M.

Tabla 3-9. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de regeneración por medio de solución de NaOH 0.01 M

Molécula	Δf (Hz)	Δm ($\frac{ng}{cm^2}$)
1 μM sonda complementaria de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (3)	-472.24	79
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptavidina (4)	-744.8	125

A pesar de que el cambio de masa asociado a la variación de frecuencia del analito de interés, se asemeja a los valores obtenidos en los ensayos de hibridación realizados anteriormente (101 ng/cm^2), la cantidad de masa alcanzada en este ensayo para la proteína estreptavidina representa el 53% del valor esperado (235 ng/cm^2), por lo que se sugiere que aun cuando la concentración de NaOH de 0.01 M es menos agresiva que la concentración de 0.02 M, es necesario aumentar la cantidad de ruptura de puentes de hidrógeno entre las cadenas de ADN en la superficie del cristal.

Figura 3-19. Regeneración de la superficie con 0.012 M de NaOH

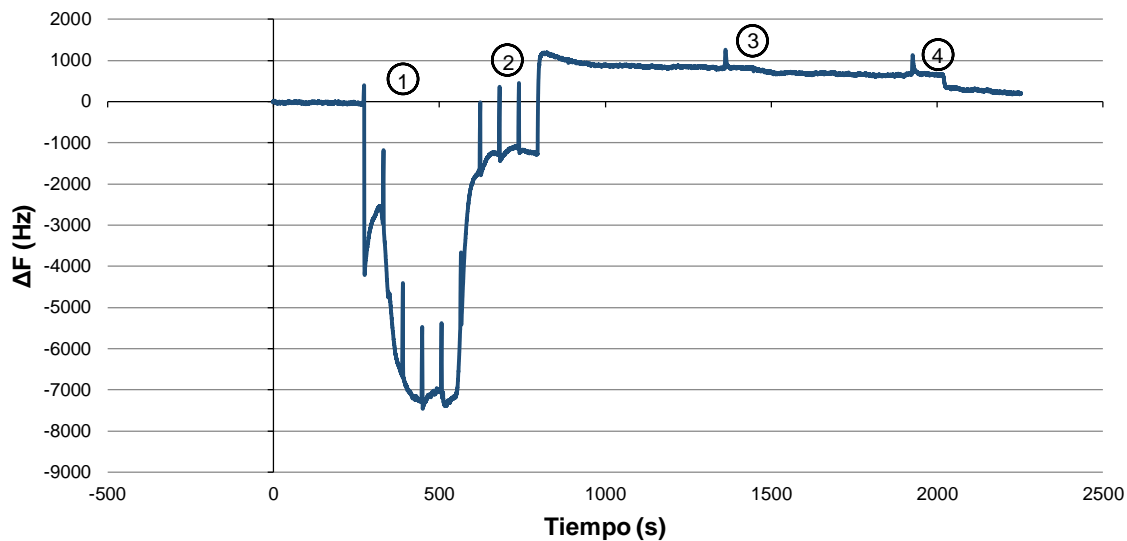
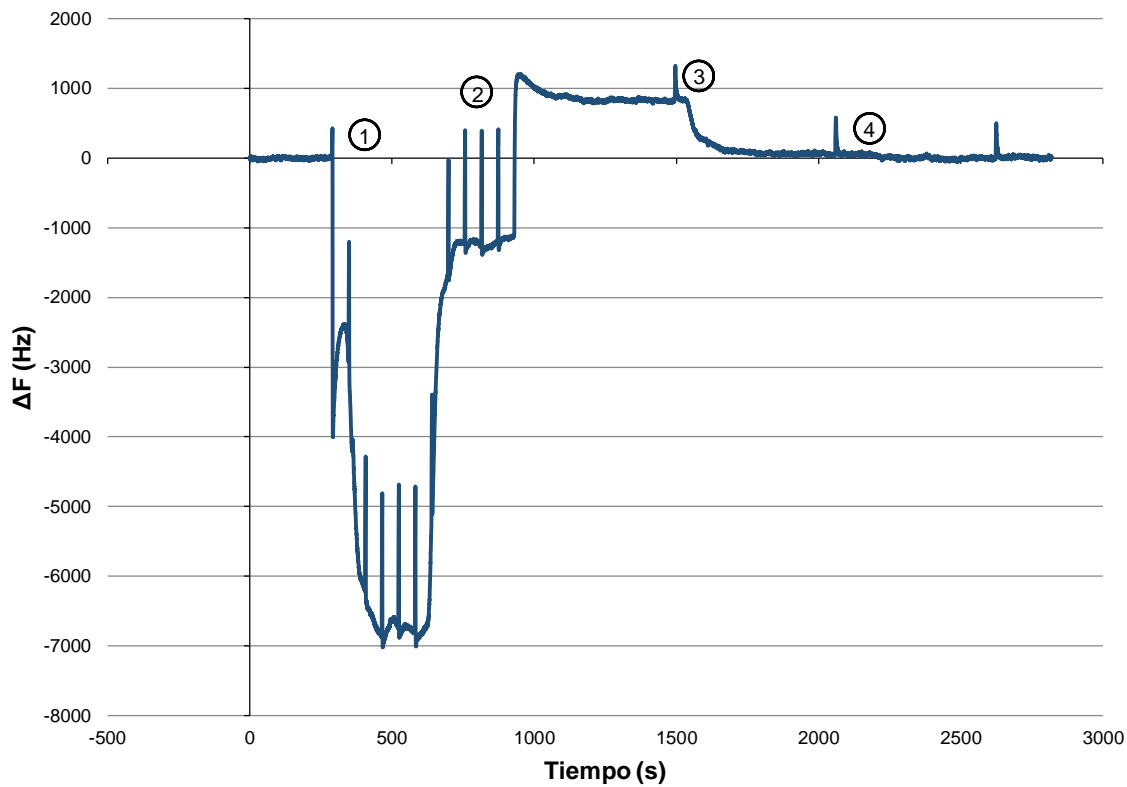


Figura 3-20. Regeneración de la superficie con 0.014 M de NaOH



El orden de inyecciones se conserva entre la Figura 3-17, Figura 3-18, Figura 3-19 y Figura 3-20. La Tabla 3-9 muestra los cambios de frecuencia y masa asociados al ensayo de regeneración, por medio de la solución de NaOH 0.02 M.

Tabla 3-10. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de regeneración por medio de solución de NaOH 0.012 y 0.014 M

Molécula	NaOH 0.012		NaOH 0.014	
	Δf (Hz)	Δm ($\frac{ng}{cm^2}$)	Δf (Hz)	Δm ($\frac{ng}{cm^2}$)
1 μ M sonda complementaria de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (3)	-161.37	27	-801.41	135
50 μ g/mL estreptavidina (4)	-447.43	75	-69.86	12

De acuerdo a los datos obtenidos con las concentraciones de NaOH de 0.012 y 0.014 M, se tiene una similitud con los cambios alcanzados en las concentraciones de 0.01 y 0.02 M, respectivamente; ya que con la concentración de 0.012 M no se logra una cantidad aceptable de ruptura de puentes de hidrógeno entre el biorrecetor génico y el analito de interés. Mientras que con la concentración de 0.014 M se alcanza a retirar no sólo las moléculas que representan al biomarcador sino también a la proteína fisiadsorbida sobre la superficie del cristal, por lo que al inyectar nuevamente el analito de interés, este no procede a hibridar con su secuencia complementaria, sino que interactúa de forma no específica con los átomos de oro del sustrato.

Las diferencias entre los valores cuantitativos del cambio de masa entre las concentraciones de 0.02 y 0.014 M, se debe a que el efecto de esta última es menos agresivo, aunque lo suficiente como para causar una desorción de la proteína estreptavidina

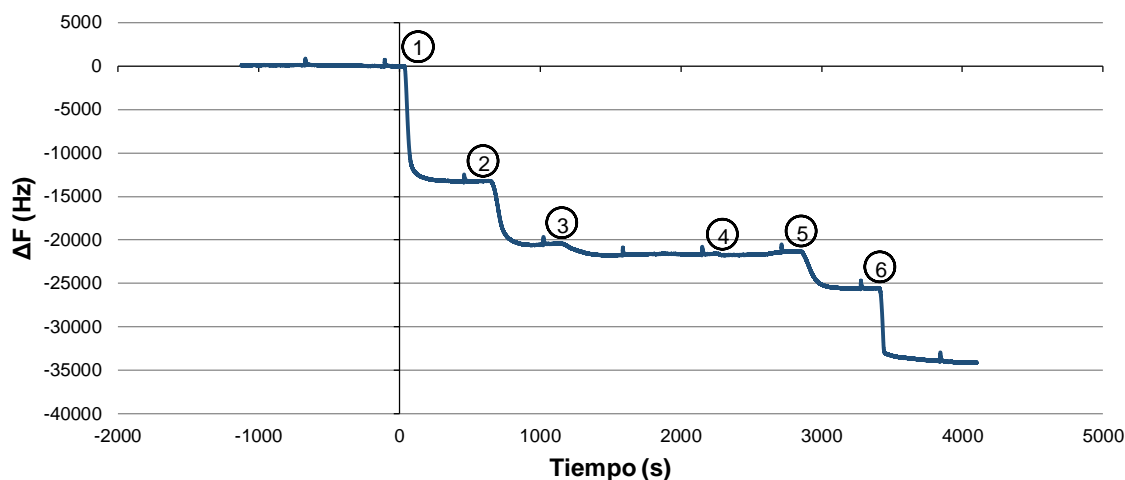
fisiadsorbida sobre la superficie del cristal. Sin embargo, al comparar los valores entre 0.01 y 0.012 M, se encuentra una mejor eficiencia en la regeneración de la superficie con 0.01 M, ya que esta concentración logra recuperar aproximadamente el 78% del analito de interés y 53% de la estreptavidina, con respecto a las coberturas moleculares alcanzadas durante los ensayos de inmovilización e hibridación; mientras que la concentración de 0.012 M sólo logra recuperar el 27% y 32% de la cadena complementaria a la sonda biorreceptora y de la proteína estreptavidina, respectivamente.

Aunque el mejor porcentaje de recuperación de la interfaz biológica se logró con la concentración de 0.01 M, los valores alcanzados no alcanzan a regenerar lo suficiente la superficie como para obtener medidas repetibles en los siguientes ensayos, es por esto que con las concentraciones evaluadas en este trabajo, no es posible reutilizar la interfaz biológica del genosensor desarrollado.

3.3.3 Inmovilización e hibridación de sondas de ADN sobre cristales de 100 MHz

A pesar de que se utiliza el mismo principio de detección en los cristales de 100 y 150 MHz, el análisis cuantitativo del cambio de frecuencia y por ende la variación de masa, se hace en el primer y tercer armónico, respectivamente. De acuerdo al estudio reportado por Cervera-Chiner *et al.* [86] y Johannsmann [195], las medidas realizadas en el modo fundamental de los sensores piezoeléctricos tienen una mayor dispersión que aquellos que se hacen en el tercer armónico o superior, ya que los modos de vibración de los cristales en sus respectivos armónicos, se comportan como fuentes de atrapamiento de energía y campos marginales eléctricos; lo que se traduce en una mayor estabilidad de la señal. Sin embargo, March *et al.* [91] desarrollaron un inmunosensor piezoeléctrico de alta frecuencia, por medio de cristales de 100 y 50 MHz en el primer y tercer armónico, respectivamente; con el fin de detectar y cuantificar el pesticida carbarilo. Al comparar el límite inferior de detección de los inmunosensores, se observa que el cristal de 100 MHz es más sensible que el cristal de 50 MHz, en el tercer armónico; aunque dicha diferencia no es considerablemente mayor. Con el fin de ampliar el estudio de biosensores piezoeléctricos de alta frecuencia, se llevó a cabo la evaluación de la metodología de inmovilización e hibridación, por medio de la unión entre la proteína estreptavidina y la molécula de biotina, en cristales de 100 MHz. La Figura 3-21 muestra la variación de frecuencia, en tiempo real, del ensayo llevado a cabo en la plataforma A20 sobre este cristal.

Figura 3-21. Ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en un cristal piezoeléctrico de 100 MHz



El primer paso es inyectar 300 μL de la solución de estreptavidina a 50 $\mu\text{g/mL}$, luego el segundo y tercer paso representan el cambio de frecuencia asociado a la inmovilización de 1 μM de la sonda biorreceptora a la interfaz biológica. En el cuarto paso, se hace pasar por el sistema de fluídica 100 μM de la solución de biotina para bloquear los sitios activos de la estreptavidina. Finalmente, el quinto y sexto paso representan el proceso de hibridación y verificación del mismo, por medio de la unión de la secuencia complementaria con la sonda biorreceptora, y de la proteína al producto hibridado, respectivamente.

La Tabla 3-11 muestra los cambios de frecuencia y masa asociados al ensayo de inmovilización e hibridación de cadenas de ADN, por medio de la técnica estreptavidina – biotina, en cristales de 100 MHz.

Tabla 3-11. Cambios de masa y frecuencia del ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina

Molécula	Δf (Hz)	Δm ($\frac{ng}{cm^2}$)

1 μM sonda de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (2)	-7319	309
1 μM sonda de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (3)	-1239	52.3
100 μM biotina (4)	-	-
1 μM sonda complementaria de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (5)	-3816	161
50 $\mu\text{g/mL}$ estreptavidina (6)	-8529	349

La variación total de la frecuencia al inyectar 1 μM de la sonda biorreceptora es de 8648 Hz, lo que equivale a 361.3 ng/cm^2 , y esto a su vez a 1.17×10^{11} moléculas de ADN inmovilizadas sobre la superficie. Según el modelo molecular de adsorción descrito para la hibridación de cadenas de ADN, por medio de la estrategia de unión entre la estreptavidina y biotina, la cantidad de biorreceptores génicos que pueden interactuar de forma específica con su respectivo ligando es 8.96×10^{10} . De acuerdo a lo anterior, se logró inmovilizar un 31% más de moléculas de ADN con respecto a lo pronosticado en el modelo. Sin embargo, al inyectar 1 μM de la cadena complementaria de ADN se obtuvo un cambio equivalente a 161 ng/cm^2 , lo que es igual a 8.16×10^{10} secuencias de ADN. Esto indica que a lo sumo se hibridó el 70% de las sondas inmovilizadas sobre la superficie del cristal, mientras que el 30% restante de las moléculas biorreceptoras eran inaccesibles a su respectiva cadena complementaria. Esta diferencia corresponde a la cantidad de moléculas que se inmovilizaron de más en la superficie, y que probablemente interactuaron de forma no específica con los átomos de oro del sustrato.

Por otro lado, la variación de la frecuencia al inyectar la proteína estreptavidina como estrategia para verificar la hibridación de cadenas de ADN fue de -8529 Hz, lo que equivale a 2.8×10^{10} moléculas de estreptavidina. De acuerdo al modelo molecular, una proteína de estreptavidina tiene la capacidad de interactuar con dos moléculas de biotina, y por ende con dos cadenas de ADN hibridadas. El número de moléculas de proteína que interactuaron con la superficie sensora indica que el 69% del producto hibridado interactuó con un sitio activo de la estreptavidina.

Los resultados mostrados anteriormente para la detección de la inmovilización e hibridación de cadenas de ADN en cristales de 100 MHz, es coherente con los resultados encontrados para los cristales de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz). Sin embargo, al compararlos con respecto al modelo, el evento biológico de interés es más eficiente sobre la superficie sensora de 100 MHz, ya que logra detectar un 16% más del proceso de hibridación que el cristal de 50 MHz, lo que hace que se aproxime más al modelo molecular planteado para esta estrategia de inmovilización y detección.

3.3.4 Radios acústicos

El estudio de la conformación y la estructura de las moléculas que funcionalizan las superficies de los biosensores, es fundamental para obtener información de los procesos de unión con su respectivo ligando. Es por esto, que se han desarrollado varias técnicas que caracterizan estructuralmente la conformación de las moléculas inmovilizadas sobre superficies sensoras, algunas de ellas son AFM [196], STM [197], resonancia de plasmones superficiales (SPR, *superficial plasmon resonance*) [198] y últimamente, se han desarrollado estudios conformacionales por medio de dispositivos acústicos como las QCM [87,199]. Este nuevo enfoque plantea obtener información estructural de la proteína estreptavidina que se une a las cadenas de ADN hibridadas, a partir de la medida de la variación de la frecuencia del cristal y de la disipación. Esta última es una medida de la energía disipada durante un ciclo de oscilación del cristal, con respecto a la energía total almacenada en el oscilador; por lo que al medir la disipación, es posible evaluar la rigidez de la capa molecular formada sobre la superficie del cristal. Sólo cuando la película es rígida, la ecuación de Sauerbrey puede ser usada para estimar la masa adsorbida; si la disipación alcanza valores superiores a 1×10^{-6} / Hz, la capa molecular no se considera rígida, y por lo tanto, utilizar la ecuación de Sauerbrey para calcular la cantidad de masa, asociada a la variación de frecuencia no es confiable [51].

El cociente entre la energía disipada (ΔD) y la variación de frecuencia del cristal (ΔF), representa el radio acústico de energía perdida por unidad de masa, el cual se considera una medida de la viscosidad intrínseca $[\eta]$ de la unión de la molécula a la superficie del sensor, en ese caso, de la unión de la proteína estreptavidina al producto hibridado. La correlación entre la viscosidad intrínseca y el radio acústico es un parámetro hidrodinámico característico de la estructura y la unión de la molécula con su respectivo ligando [199].

La Figura 3-22, la Figura 3-23 y la Figura 3-24; muestran el cambio de frecuencia y la variación en la disipación de energía, en tiempo real, de los ensayos llevados a cabo en la plataforma A20 sobre cristales de 5, 50 y 100 MHz en el séptimo (35 MHz), tercer (150 MHz) y primer armónico, respectivamente; durante la inmovilización e hibridación de cadenas de ADN por medio de la técnica de unión entre la proteína estreptavidina y la molécula de biotina.

Figura 3-22. Ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en un cristal piezoeléctrico de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz)

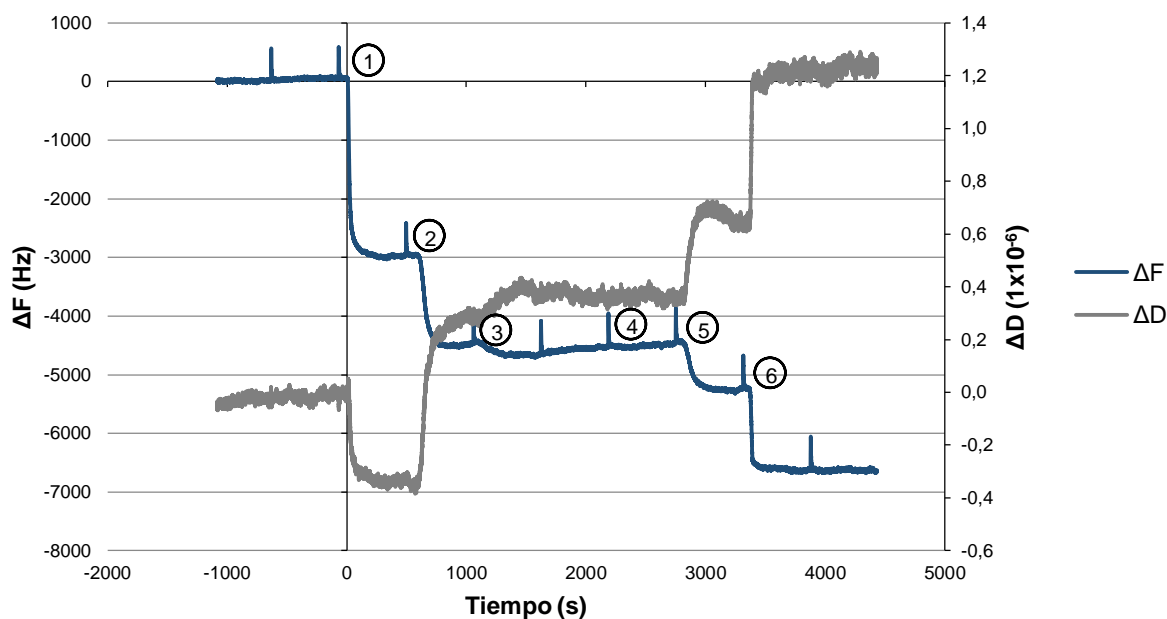
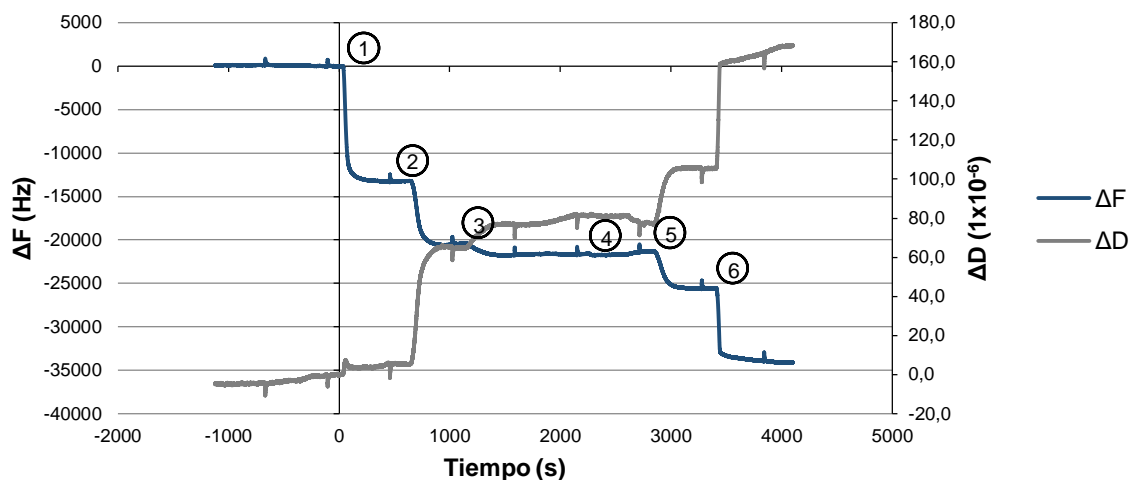


Figura 3-23. Ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en un cristal piezoeléctrico de 100 MHz



La Figura 3-22 y la Figura 3-23 muestran en el primer paso la unión de la proteína estreptavidina a la superficie de los cristales de 50 y 100 MHz, respectivamente; luego el segundo y tercer paso representan la inmovilización de la sonda biorreceptora por medio de la biotina conjugada en su extremo 5'. El cuarto paso muestra el bloqueo de la superficie por medio de 100 μM de la solución de biotina, y el quinto y sexto paso representan el proceso de hibridación de ADN por medio de la secuencia complementaria, y la unión de la proteína estreptavidina al producto hibridado, respectivamente.

La Tabla 3-12 y la Tabla 3-13 muestran los cambios de frecuencia, masa y disipación; asociados al ensayo de inmovilización e hibridación de cadenas de ADN, por medio de la técnica estreptavidina – biotina, en cristales de 50 y 100 MHz, respectivamente.

Tabla 3-12. Cambios de frecuencia, masa y disipación; del ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en cristales de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz)

Molécula	Δf (Hz)	Δm ($\frac{ng}{cm^2}$)	ΔD (1×10^{-6})

1 μM sonda de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (2)	-1592.60	268	0.590
1 μM sonda de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (3)	-141.93	23.86	0.128
100 μM biotina (4)	-	-	-
1 μM sonda complementaria de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (5)	-598.15	101	0.298
50 $\mu\text{g/mL}$ estreptavidina (6)	-1399.51	235	0.537

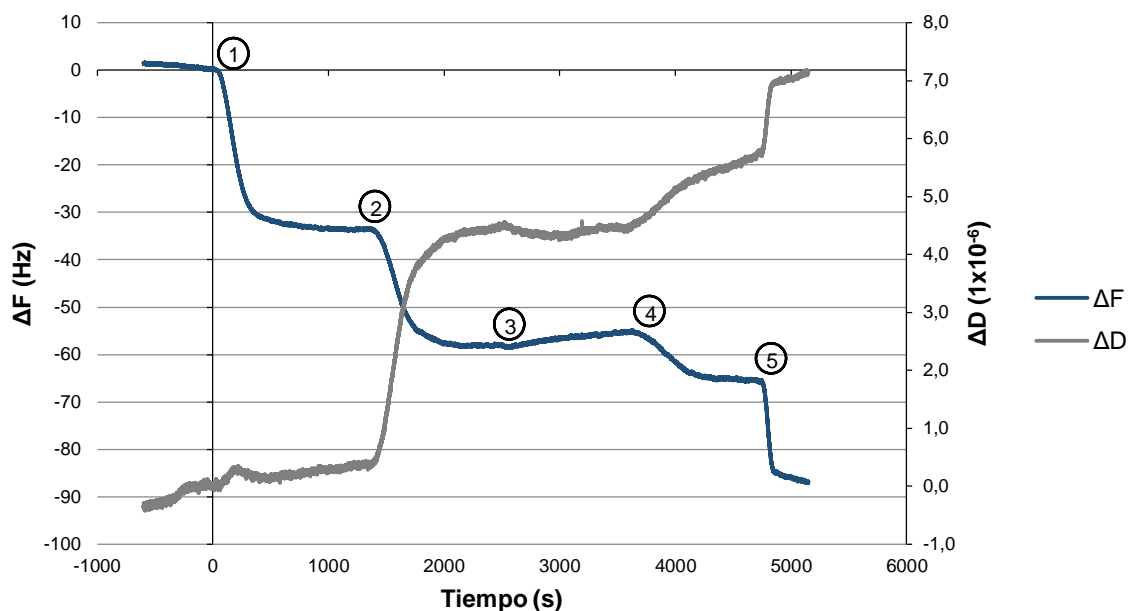
Tabla 3-13. Cambios de frecuencia, masa y disipación; del ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en cristales de 100 MHz

Molécula	Δf (Hz)	Δm ($\frac{ng}{cm^2}$)	ΔD (1×10^{-6})
1 μM sonda de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (2)	-7319	309	0.608

1 μM sonda de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (3)	-1239	52.3	0.120
100 μM biotina (4)	-	-	-
1 μM sonda complementaria de ADN conjugada con biotina en su extremo 5' (5)	-3816	161	0.287
50 $\mu\text{g/mL}$ estreptavidina (6)	-8529	349	0.577

De acuerdo a los resultados obtenidos con respecto a la disipación, en los ensayos realizados con los cristales de 50 MHz en el tercer armónico y 100 MHz, se sugiere que los cambios en la rigidez de la monocapa molecular son despreciables, por lo que la ecuación de Sauerbrey es válida para calcular la cantidad de masa que se adsorbe sobre la superficie del sustrato. Sin embargo, la disipación de la estreptavidina que constituye la interfaz biológica, es decir, la proteína que interactúa con los átomos de oro y utiliza dos de sus sitios activos para inmovilizar la sonda biorreceptora de ADN, es negativa. Un valor de disipación negativo es incoherente, ya que la disipación depende, entre otros, del espesor del cristal, por lo que a medida que se van depositando moléculas sobre la superficie del cristal, el espesor aumenta, y en consecuencia la disipación también [200]. Dado que el comportamiento del sensor fue errático en la medida de esta molécula, no es confiable la cuantificación de la variación de frecuencia, y por lo tanto de la masa adsorbida sobre la superficie del sustrato; por lo que no se incluyó en el análisis de este trabajo. Este comportamiento se podría dar debido a que el cambio de la variable respuesta en frecuencia, al inyectar la estreptavidina es muy alta, lo que podría inducir tensiones internas del cristal que, provocan cambios erráticos en el sistema como una caída de la disipación [201].

Figura 3-24. Ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en un cristal piezoeléctrico de 5 MHz en el séptimo armónico (35 MHz)



Una vez alcanzada la línea base, se procedió a inyectar 300 μL de la solución de estreptavidina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, luego en el segundo paso se hizo pasar, por medio del sistema de fluídica, 1 μM de la sonda biorreceptora a la interfaz biológica. En el tercer paso se realizó el bloqueo de la superficie con 100 μM de la solución de biotina, mientras que el cuarto paso representa el proceso de hibridación de la sonda biorreceptora con 1 μM de la secuencia complementaria de ADN. Finalmente, el quinto paso muestra la variación de frecuencia asociada a la inyección de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la solución de estreptavidina.

En vista de que se corroboró la inmovilización e hibridación de cadenas de ADN sobre la superficie del cristal de 5 MHz en el tercer armónico (35 MHz), se procedió a calcular el radio acústico para la inyección de la proteína estreptavidina que representa la estrategia de evaluación del evento biológico de interés; con el fin de comparar este valor con el reportado en el estudio de Milioni *et al.* [199] en cristales piezoeléctricos con las mismas características. La Tabla 3-14 muestra los cambios de frecuencia y disipación, asociados a la proteína estreptavidina, en el cristal de 5 MHz en el séptimo armónico (35 MHz).

Tabla 3-14. Cambios de frecuencia, masa y disipación; del ensayo de inmovilización e hibridación por medio de la técnica estreptavidina – biotina en cristales de 5 MHz en el séptimo armónico

Molécula	Δf (Hz)	ΔD (1×10^{-6})	$-\frac{\Delta D}{\Delta F}$
50 $\mu\text{g/mL}$ estreptavidina (5)	-21	0.16	0.008

El radio acústico reportado por Milioni *et al.* [199], para la proteína estreptavidina que interactúa con la molécula de biotina conjugada al producto hibridado de cadenas de ADN con aproximadamente 21 pb de longitud, es de aproximadamente $0.00152 \times 10^{-6}/\text{Hz}$; lo cual no coincide con el valor obtenido en este trabajo. Esto indica que la estructura de la molécula no puede ser evaluada con este modelo, ya que este solo se puede usar si la molécula está unida de forma que se permita su libre oscilación alrededor de un único punto de anclaje, y no tenga otro contacto con la superficie o moléculas adyacentes; por lo que el radio obtenido en este trabajo, sugiere que la proteína estreptavidina se une al producto hibridado haciendo más de un punto de contacto, tal y como se planteó en el modelo molecular.

3.4 Conclusiones

El presente capítulo ha consistido en desarrollar una técnica de detección para la hibridación de cadenas de ADN, por medio de una microbalanza de cristal de cuarzo de alta frecuencia. Los resultados obtenidos permiten concluir que:

- La metodología que se basa en la unión entre la estreptavidina y biotina es la que mejores resultados en eficiencia de hibridación genera, ya que, en términos de densidad de moléculas y rapidez de la técnica, es la que mejor ha conseguido detectar el evento biológico de interés, comparado con la técnica basada en la quimiadsorción de monocapas autoensambladas mixtas. Esto se debe a que, bajo las condiciones experimentales evaluadas en este trabajo, las MSAM quedan en un estado metaestable e inconcluso del estado final de la monocapa, por lo que se tienen defectos estructurales que conllevan a la inmovilización de la sonda

biorreceptora de forma paralela a la superficie, quedando inhabilitada para interactuar con la cadena complementaria.

- El cristal de alta frecuencia de 100 MHz es más sensible para la detección de estas secuencias, ya que logra detectar un 16% más el proceso de hibridación que el cristal de 50 MHz, sin embargo, este último en el tercer armónico (150 MHz) demostró ser más estable en la señal a lo largo del tiempo, por lo que se lograron hacer más ensayos con este. Además, se estudió el recubrimiento molecular de la técnica de inmovilización seleccionada anteriormente, y se encontró que dos inyecciones de la sonda biorreceptora permite obtener una capa más densa molecularmente, y por lo tanto detectar con más eficiencia el proceso de hibridación, debido a que durante la primera inyección, la sonda de ADN no tiene tiempo suficiente para interactuar con todos los sitios disponibles de la estreptavidina inmovilizada sobre el cristal de cuarzo con electrodo de oro.
- La hibridación de cadenas de ADN usando la técnica de unión entre la estreptavidina y la biotina es específica, ya que se corroboró que la superficie no detecta secuencias de ADN de otro organismo como *Trypanosoma brucei*, y que la variación de la frecuencia al inyectar la proteína después del proceso de hibridación, se da por la unión de forma exclusiva de la estreptavidina al producto hibridado.
- La SD que se calculó para medir la variabilidad de la respuesta del equipo al detectar el evento biológico de interés, arrojó un valor de 32.7 ng/cm², el cual es inferior a la señal que producen interferencias no controlables en el dispositivo; lo que indica que el ensayo, bajo las condiciones experimentales desarrolladas en este trabajo, tiene una variabilidad aceptable.
- A pesar de que se realizaron varios ensayos utilizando diferentes concentraciones de NaOH (0.02, 0.014, 0.012, 0.01 M) para regenerar la superficie sensora y realizar medidas sucesivas del analito de interés, no se encontraron las condiciones para reusar el dispositivo, ya que las concentraciones de 0.02 y 0.014 M, no solo rompen las interacciones entre las cadenas de ADN, sino que también retiran la estreptavidina que se fisisorbe a la superficie del cristal de cuarzo con electrodo de oro; mientras que las concentraciones de 0.012 y 0.01 M no logran una cantidad aceptable de ruptura de puentes de hidrógeno entre el biorreceptor génico y el analito

de interés. A pesar de ello, la construcción de la interfaz biológica no es un proceso largo, laborioso o complejo, ya que se lleva a cabo en tiempo real en la plataforma A20 y sólo requiere alrededor de 40 minutos por muestra, en comparación de los protocolos llevados a cabo por quimiadsorción, para la detección de *E. coli* O157:H7, que se demoran entre 500 y 1500 minutos en desarrollar la interfaz biológica [202–204].

- La evaluación del modelo teórico de adsorción por medio de la obtención de radios acústicos, corroboró que el cambio en la disipación de energía es menor a 1×10^{-6} , por lo que se comprueba que la película molecular que se adsorbe sobre la superficie constituye una capa rígida, y por lo tanto la ecuación de Sauerbrey para calcular el cambio de masa, asociado a los cambios de frecuencia es válida. Además, se confirmó por medio del radio acústico y por lo tanto de la viscosidad intrínseca, que la molécula de estreptavidina que se une al producto hibridado hace más de un punto de interacción con el analito de interés, lo que valida la participación de esta molécula en el modelo teórico planteado.

4 Conclusiones generales y recomendaciones

4.1 Conclusiones

El presente trabajo de investigación desarrolló un genosensor piezoeléctrico de alta frecuencia para la detección de la secuencia CCT-TAA-TTC-CTC-TCT-TTC-CTC-TGC-GGT-CCT, la cual se encuentra en la región rfbE de la bacteria *E. coli* O157:H7 y codifica parte de las cadenas laterales del antígeno O. La detección del biomarcador de ADN se realizó por medio de la hibridación del analito de interés con su respectiva cadena complementaria de ADN (AGG-ACC-GCA-GAG-GAA-AGA-GAG-GAA-TTA-AGG), la cual representa la molécula biorreceptora que se inmoviliza a la superficie del transductor piezoeléctrico por medio de la técnica basada en la unión entre la proteína estreptavidina y la molécula biotina; para llevar a cabo esta funcionalización, le fue incorporada a la sonda

biorreceptora, una secuencia de 15 timinas y una molécula de biotina en el extremo 5'. Bajo estas condiciones, se concluyó que dos inyecciones de la sonda biorreceptora permite obtener una capa más densa molecularmente, y por lo tanto detectar con más eficiencia el proceso de hibridación en cristales de 50 MHz en el tercer armónico (150 MHz) y 100 MHz. Además, los ensayos realizados permitieron analizar la especificidad, repetibilidad y reusabilidad del dispositivo desarrollado, concluyendo que la hibridación entre la sonda biorreceptora y el analito de interés se da de forma específica, los ensayos son repetibles, pero no se hallaron las condiciones para regenerar la superficie sensora. Finalmente, la evaluación de los radios acústicos, permitió validar la ecuación de Sauerbrey para calcular el cambio de masa asociado a los cambios de frecuencia; y confirmó que la proteína estreptavidina que se une al producto hibridado hace más de un punto de interacción con el analito de interés, lo que valida la participación de esta molécula en el modelo teórico planteado.

4.2 Recomendaciones

De acuerdo a los resultados obtenidos, los estudios que se proponen a futuro como continuación de este trabajo, están principalmente enfocados a:

- Proponer los radios acústicos para las plataformas de alta frecuencia, inmovilizando el producto hibridado por medio de neutravidina, ya que esta última se une de forma no específica a la superficie de oro y no forma una capa densa molecularmente, por lo que las moléculas de ADN quedan espaciadas entre sí.
- Regenerar la superficie del sensor utilizando otras soluciones desnaturalizantes como HCl o formamida, con el fin de romper la interacción que se da entre el analito de interés y la sonda biorreceptora, la cual se encuentra inmovilizada a la superficie del transductor por medio de la técnica basada en la unión entre la proteína estreptavidina y la molécula biotina.
- Realizar una curva de hibridación, bajo condiciones experimentales, utilizando diferentes concentraciones del analito de interés; con el fin de determinar el límite inferior y superior de detección, el rango de trabajo y el parámetro I_{50} .
- Detectar productos de PCR del gen que codifica el antígeno O de la bacteria.

- Demostrar la viabilidad de la aplicación a muestras reales, empleando productos de PCR extraídos de ADN proveniente de carne de rumiantes.
- Extender los logros obtenidos con las QCM de alta frecuencia a otros dispositivos que utilicen otro sistema de transducción, como biosensores ópticos basados en puntos cuánticos de carbono o test biológicos como inmunoensayos de flujo lateral.

5 Bibliografía

- [1] Centers for Disease Control and Prevention, Timeline for reporting cases of E.coli O157 Infection, 2019. <https://www.cdc.gov/ecoli/reporting-timeline.html> (accessed May 22, 2019).
- [2] K.E. Heiman, R.K. Mody, S.D. Johnson, P.M. Griffin, L.H. Gould, Escherichia coli O157 Outbreaks in the United States, 2003-2012., *Emerg. Infect. Dis.* 21 (2015) 1293–1301. <https://doi.org/10.3201/eid2108.141364>.
- [3] J.Y. Lim, J.W. Yoon, C.J. Hovde, A brief overview of Escherichia coli O157:H7 and its plasmid O157, *J. Microbiol. Biotechnol.* 20 (2010) 1–10. <https://doi.org/10.4014/jmb.0908.08007>.
- [4] F. Malvano, R. Pilloton, D. Albanese, Sensitive Detection of Escherichia coli O157:H7 in Food Products by Impedimetric Immunosensors., *Sensors (Basel)*. 18 (2018). <https://doi.org/10.3390/s18072168>.
- [5] Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Ministerio de Salud y Protección Social, Resolución 2690 de 2015. Directrices para la formulación del Programa de Verificación Microbiológica del Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control de la Carne y Productos Cárnicos Comestibles, Bogotá, D.C., Colombia, 2015. https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resolución_2690_de_2015.pdf (accessed August 5, 2019).
- [6] A. Ahmed, J. V. Rushworth, N. a. Hirst, P. a. Millner, Biosensors for whole-cell bacterial detection, *Clin. Microbiol. Rev.* 27 (2014) 631–646. <https://doi.org/10.1128/CMR.00120-13>.
- [7] B. Nagel, H. Dellweg, L.M. Gierasch, Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992), *Pure Appl. Chem.* 64 (1992) 143–168. <https://doi.org/10.1351/pac199264010143>.
- [8] C. Jiménez, D. León, Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios, *Vitae*. 16 (2009) 144–154. <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/view/1436>.

- [9] Y. Montagut, J. V. García, Y. Jiménez, C. March, Á. Montoya, A. Arnau, Validation of a phase-mass characterization concept and interface for acoustic biosensors, *Sensors*. 11 (2011) 4702–4720. <https://doi.org/10.3390/s110504702>.
- [10] P. Skládal, Piezoelectric biosensors, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 79 (2016) 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.009>.
- [11] Y.J. Montagut, Estudio y análisis del efecto rugoso sobre la respuesta del sensor de cuarzo AT en medios fluidos, Universidad Politécnica de Valencia, 2011. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/9688>.
- [12] A. Montoya, C. March, Y. Montagut, M. Moreno, J. Manclus, A. Arnau, Y. Jimenez, M. Jaramillo, P. Marin, R. Torres, A High Fundamental Frequency (HFF)-based QCM Immunosensor for Tuberculosis Detection, *Curr. Top. Med. Chem.* 17 (2017) 1623–1630. <https://doi.org/10.2174/1568026617666161104105210>.
- [13] C. March, J. V. García, Á. Sánchez, A. Arnau, Y. Jiménez, P. García, J.J. Manclús, Á. Montoya, High-frequency phase shift measurement greatly enhances the sensitivity of QCM immunosensors, *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.001>.
- [14] L. Cervera-Chiner, M. Juan-Borrás, C. March, A. Arnau, I. Escriche, Á. Montoya, Y. Jiménez, High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCM) immunosensor for pesticide detection in honey, *Food Control*. 92 (2018) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.026>.
- [15] S.L. Percival, D.W. Williams, *Escherichia coli*, Second Edi, Elsevier, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00006-8>.
- [16] S.D. Manning, *Escherichia coli* infections, 2nd ed., Chelsea House, 2010.
- [17] M.J. Hill, Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis, *Eur. J. Cancer Prev.* 6 (1997) 43–45.
- [18] J.M. Van Hattem, A. Cabal, M.S. Arcilla, J. Alvarez, M.D. De Jong, D.C. Melles, J. Penders, M.C.J. Bootsma, P.J. Van Genderen, A. Goorhuis, M. Grobusch, N. Molhoek, A.M.L.O. Lashof, E.E. Stobberingh, H.A. Verbrugh, C.G. Schmidt, C.

- Schultsz, Risk of acquisition of human diarrhoeagenic *Escherichia coli* virulence genes in intercontinental travellers: A prospective, multi-centre study, *Travel Med. Infect. Dis.* (2018) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.12.005>.
- [19] S. Morabito, *Pathogenic escherichia coli: molecular and cellular microbiology*, Caister Academic Press, Norfolk, 2014.
- [20] N.K.D. Ragupathi, D.P.M. Sethuvel, F.Y. Inbanathan, B. Veeraraghavan, Accurate differentiation of *Escherichia coli* and *Shigella* serogroups: challenges and strategies, *New Microbes New Infect.* 21 (2018) 58. <https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2017.09.003>.
- [21] A. Caprioli, S. Morabito, H. Brugère, E. Oswald, Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission, *Vet. Res.* 36 (2005) 289–311. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005002>.
- [22] G. Kang, C.A. Hart, P. Shears, *Bacterial Enteropathogens*, Twenty Thi, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5101-2.00025-X>.
- [23] D.M. Kagkli, T.P. Weber, M. Van den Bulcke, S. Folloni, R. Tozzoli, S. Morabito, M. Ermolli, L. Gribaldo, G. Van den Eede, Application of the modular approach to an in-house validation study of real-time PCR methods for the detection and serogroup determination of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 6954–6963. <https://doi.org/10.1128/AEM.05357-11>.
- [24] WHO, Diarrhoeal disease, Ginebra, 2017. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease> (accessed May 21, 2019).
- [25] L.W. Riley, R.S. Remis, S.D. Helgerson, H.B. McGee, J.G. Wells, B.R. Davis, R.J. Hebert, E.S. Olcott, L.M. Johnson, N.T. Hargrett, P.A. Blake, M.L. Cohen, Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype, *N. Engl. J. Med.* 308 (1983) 681–685. <https://doi.org/10.1056/NEJM198303243081203>.
- [26] M.A. Karmali, M. Petric, C. Lim, P.C. Fleming, G.S. Arbus, H. Lior, The Association Between Idiopathic Hemolytic Uremic Syndrome and Infection by Verotoxin-Producing *Escherichia coli*, *J. Infect. Dis.* 151 (1985) 775–782. <https://doi.org/10.1093/infdis/151.5.775>.

- [27] O.M. Bouvet, S. Pernoud, P.A. Grimont, Temperature-dependent fermentation of D-sorbitol in *Escherichia coli* O157:H7, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4245–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473445> (accessed May 22, 2019).
- [28] N.T. Perna, G. Plunkett, V. Burland, B. Mau, J.D. Glasner, D.J. Rose, G.F. Mayhew, P.S. Evans, J. Gregor, H.A. Kirkpatrick, G. Pósfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E.J. Grotbeck, N.W. Davis, A. Lim, E.T. Dimalanta, K.D. Potamouisis, J. Apodaca, T.S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D.C. Schwartz, R.A. Welch, F.R. Blattner, Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Nature.* 409 (2001) 529–533. <https://doi.org/10.1038/35054089>.
- [29] C. Putonti, Y. Luo, C. Katili, S. Chumakov, G.E. Fox, D. Graur, Y. Fofanov, A Computational Tool for the Genomic Identification of Regions of Unusual Compositional Properties and Its Utilization in the Detection of Horizontally Transferred Sequences, *Mol. Biol. Evol.* 23 (2006) 1863–1868. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl053>.
- [30] P.S. Mead, P.M. Griffin, *Escherichia coli* O157:H7, *Lancet.* 352 (1998) 1207–1212. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)01267-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)01267-7).
- [31] M.A. Karmali, V. Gannon, J.M. Sargeant, Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), *Vet. Microbiol.* 140 (2010) 360–370. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2009.04.011>.
- [32] F.M. Franzin, M.P. Sircili, Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation., *Biomed Res. Int.* 2015 (2015) 534738. <https://doi.org/10.1155/2015/534738>.
- [33] R. Bertrand, B. Roig, Evaluation of enrichment-free PCR-based detection on the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157-Application to municipal wastewater, *Water Res.* 41 (2007) 1280–1286. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.027>.
- [34] P. Reeves, Role of O-antigen variation in the immune response., *Trends Microbiol.* 3 (1995) 381–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8564356> (accessed May 22, 2019).

- [35] L. Wang, P.R. Reeves, Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes., *Infect. Immun.* 66 (1998) 3545–3551.
- [36] T. Zangari, A.R. Melton-Celsa, A. Panda, M.A. Smith, I. Tatarov, L. De Tolla, A.D. O'Brien, Enhanced virulence of the *Escherichia coli* O157:H7 spinach-associated outbreak strain in two animal models is associated with higher levels of Stx2 production after induction with ciprofloxacin., *Infect. Immun.* 82 (2014) 4968–77. <https://doi.org/10.1128/IAI.02361-14>.
- [37] M. Ellin Doyle, J. Archer, C.W. Kaspar, R. Weiss, Human Illness Caused by *E. coli* O157:H7 from Food and Non-food Sources, Wisconsin, 2006. www.cdc.gov/foodnet/annual/2004/report.pdf (accessed May 22, 2019).
- [38] T.H. Pennington, *E. coli* O157 outbreaks in the United Kingdom: past, present, and future., *Infect. Drug Resist.* 7 (2014) 211–22. <https://doi.org/10.2147/IDR.S49081>.
- [39] European Centre for Disease Prevention and Control, Risk related to the use of 'do-it-yourself' CRISPR-associated gene engineering kit contaminated with pathogenic bacteria, Estocolmo, 2017. https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/2-May-2017-RRA_CRISPR-kit-w-pathogenic-bacteria_2.pdf (accessed May 22, 2019).
- [40] Instituto Nacional de Salud, Evaluación de riesgos e inocuidad de alimentos, Bogotá, 2015. [https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Publicaciones ERIA y Plaguicidas/PERFIL E. COLI.pdf](https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Publicaciones%20ERIA%20y%20Plaguicidas/PERFIL%20E.%20COLI.pdf) (accessed May 22, 2019).
- [41] P.A.F. Anaya, L.M.R. Medina, M.E.O. Ugarriza, L.A.L. Gutiérrez, Determinación de *Escherichia coli* e identificación del serotipo O157: H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena, *Rev. Lasallista Investig.* 10 (2013) 91–100.
- [42] S. Suresh, P. Kolhe, M. Gupta, O. Kumar, V.K. Rao, Comparison of Self Assembled Molecules for the Detection of Ricin by Using Label-Free Immunosensor Based on Quartz Crystal Microbalance, *Sens. Lett.* 16 (2018) 334–340. <https://doi.org/10.1166/sl.2018.3963>.
- [43] J.-Y. Kim, S.-H. Kim, N.-H. Kwon, W.-K. Bae, J.-Y. Lim, H.-C. Koo, J.-M. Kim, K.-M. Noh, W.-K. Jung, K.-T. Park, Y.-H. Park, Isolation and identification of *Escherichia*

- coli O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD., *J. Vet. Sci.* 6 (2005) 7–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15785118> (accessed May 26, 2019).
- [44] L. Anfossi, Immunoassays, Food applications, in: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (Eds.), *Encycl. Anal. Sci.*, 3rd editio, Elsevier Inc., Torino, 2017: pp. 324–329. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14312-4>.
- [45] Z. Fu, S. Rogelj, T.L. Kieft, Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR, *Int. J. Food Microbiol.* 99 (2005) 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.07.013>.
- [46] S. Shan, D. Liu, Q. Guo, S. Wu, R. Chen, K. Luo, L. Hu, Y. Xiong, W. Lai, Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on cascade signal amplification in ELISA, *J. Dairy Sci.* 99 (2016) 7025–7032. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11320>.
- [47] J. Wang, R. Katani, L. Li, N. Hegde, E.L. Roberts, V. Kapur, C. DebRoy, Rapid Detection of *Escherichia coli* O157 and Shiga Toxins by Lateral Flow Immunoassays., *Toxins (Basel)*. 8 (2016) 92. <https://doi.org/10.3390/toxins8040092>.
- [48] S. Sommerfeld, J. Strube, Challenges in biotechnology production—generic processes and process optimization for monoclonal antibodies, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 44 (2005) 1123–1137. <https://doi.org/10.1016/J.CEP.2005.03.006>.
- [49] J. Meng, S. Zhao, M.P. Doyle, S.E. Mitchell, S. Kresovich, Polymerase chain reaction for detecting *Escherichia coli* O157:H7, *Int. J. Food Microbiol.* 32 (1996) 103–113. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01110-5](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01110-5).
- [50] B. Li, H. Liu, W. Wang, Multiplex real-time PCR assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and screening for non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli*, *BMC Microbiol.* 17 (2017) 215. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1123-2>.
- [51] R. Oliveira, Development and optimization of a biological protocol for DNA detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation (QCM-D), Instituto Politécnico de Bragança, 2012.
- [52] D.J. Bopp, B.D. Sauders, A.L. Waring, J. Ackelsberg, N. Dumas, E. Braun-Howland,

- D. Dziewulski, B.J. Wallace, M. Kelly, T. Halse, K.A. Musser, P.F. Smith, D.L. Morse, R.J. Limberger, Detection, isolation, and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak., *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 174–80. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.1.174-180.2003>.
- [53] N.T. Vo, H.D. Ngo, D.L. Vu, A.P. Duong, Q. V. Lam, Conjugation of *E. coli* O157:H7 Antibody to CdSe/ZnS Quantum Dots, *J. Nanomater.* 2015 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/265315>.
- [54] H. Xu, F. Tang, J. Dai, C. Wang, X. Zhou, Ultrasensitive and rapid count of *Escherichia coli* using magnetic nanoparticle probe under dark-field microscope, *BMC Microbiol.* 18 (2018) 100. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1241-5>.
- [55] H. Zhu, U. Sikora, A. Ozcan, Quantum dot enabled detection of *Escherichia coli* using a cell-phone., *Analyst.* 137 (2012) 2541–4. <https://doi.org/10.1039/c2an35071h>.
- [56] Lijiang Wang, Qingshan Wei, Chunsheng Wu, Jian Ji, Qingjun Liu, Mo Yang, Ping Wang, Detection of *E. coli* O157:H7 DNA by a novel QCM biosensor coupled with gold nanoparticles amplification, in: 2007 7th IEEE Conf. Nanotechnol. (IEEE NANO), IEEE, 2007: pp. 330–333. <https://doi.org/10.1109/NANO.2007.4601201>.
- [57] M. Xu, R. Wang, Y. Li, Electrochemical biosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Talanta.* 162 (2017) 511–522. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.050>.
- [58] C. Zhou, H. Zou, M. Li, C. Sun, D. Ren, Y. Li, Fiber optic surface plasmon resonance sensor for detection of *E. coli* O157:H7 based on antimicrobial peptides and AgNPs-rGO, *Biosens. Bioelectron.* 117 (2018) 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.06.005>.
- [59] B. Smith, ed., *Synthetic Receptors for Biomolecules*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2015. <https://doi.org/10.1039/9781782622062>.
- [60] L.C. Clark, C. Lyons, Electrode systems for Continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102 (1962) 29–45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.

- [61] A.H. Kadish, D.A. Hall, A new method for the continuous monitoring of blood glucose by measurement of dissolved oxygen., *Clin. Chem.* 11 (1965) 869–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5835655> (accessed June 5, 2019).
- [62] S.J. Updike, G.P. Hicks, The Enzyme Electrode, *Nature*. 214 (1967) 986–988. <https://doi.org/10.1038/214986a0>.
- [63] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, P. Estrela, Introduction to biosensors., *Essays Biochem.* 60 (2016) 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.
- [64] D. Rodríguez-Lázaro, M. Hernández, Future directions for molecular microbial diagnostic methods for the food industry, in: N. Cook, M. D'Agostino, K.C. Thompson (Eds.), *Mol. Microb. Diagnostic Methods*, Academic Press, Inc., 2016: pp. 19–37. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416999-9.00002-2>.
- [65] S. Patel, R. Nanda, S. Sahoo, E. Mohapatra, Biosensors in Health Care: The Milestones Achieved in Their Development towards Lab-on-Chip-Analysis, *Biochem. Res. Int.* 2016 (2016) 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/3130469>.
- [66] P. Mehrotra, Biosensors and their applications - A review, *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 6 (2016) 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>.
- [67] R. Thompson, Fluorescence sensors and biosensors, in: *Fluoresc. Sensors Biosens.*, Taylor & F, Florida, 2005: p. 377. <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=2-KBQAAQBAJ&pgis=1> (accessed February 21, 2015).
- [68] M. Jaramillo, K. Barrientos, M.E. Londoño, Y. Montoya, C.E. Echeverri, Y.J. Montagut, J.E. Betancur, P.G. Molina, *Desarrollo de Biosensores para detección de biomarcadores*, Universidad EIA, Medellín, 2018.
- [69] E. Feduchi, *Bioquímica: Conceptos esenciales*, Ed. Médica Panamericana, 2014. <https://books.google.com/books?id=DhDxOpmclfIC&pgis=1> (accessed March 10, 2016).
- [70] M. Zourob, Chapter 2: Surface Sensitization Techniques and Recognition Receptors Immobilization, in: *Recognit. Recept. Biosens.*, 2010: pp. 47–134.

- [71] University of Tokyo, Life Science, (n.d.). <http://csls-text.c.u-tokyo.ac.jp/index.html> (accessed July 11, 2019).
- [72] University of Newfoundland, DNA, Chromosomes & the Nucleus, (n.d.). <https://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-18/CB18.html> (accessed July 11, 2019).
- [73] J.M. Teji3n, M.D. Blanco, C. Agrasal, R. Olmo, *Bioquímica Estructural*, Casa Editorial Mares, S.L., 2009.
- [74] L. Garc3a, *Desarrollo de un multibiosensor de ADN para el diagn3stico temprano de c3ncer de mama*, Universidad Aut3noma de Madrid, 2008.
- [75] J. Curie, P. Curie, D3veloppement par compression de l'3lectricit3 polaire dans les cristaux h3mi3dres 3 faces inclin3es, *Bull. La Soci3t3 Min3ralogique Fr.* 3 (1880) 90–93. <https://doi.org/10.3406/bulmi.1880.1564>.
- [76] A. Arnau, *Piezoelectric Transducers and Applications*, Springer Science & Business Media, 2008. <https://books.google.com/books?id=az1RYaJr5HsC&pgis=1> (accessed May 29, 2015).
- [77] W.G. Cady, The Piezo-Electric Resonator, *Proc. IRE.* 10 (1922) 83–114. <https://doi.org/10.1109/JRPROC.1922.219800>.
- [78] J. Fern3ndez, *Desarrollo y optimizaci3n de t3cnicas de inmovilizaci3n basadas en monocapas autoensambladas mixtas (MSAMs) para su uso en inmunosensores piezoel3ctricos*, Valencia, 2011.
- [79] R. Vaughan, G. Guilbault, *Piezoelectric Immunosensors*, Springer Verlag. 5 (2007) 237–280.
- [80] J.C. Love, L.A. Estroff, J.J. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology, *Chem. Rev.* 4 (2005) 1103–1169.
- [81] G. Sauerbrey, Verwendung von Schwingquarzen zur W3gung d3nner Schichten und zur Mikrow3gung, *Zeitschrift F3r Phys.* 155 (1959) 206–222.

<https://doi.org/10.1007/BF01337937>.

- [82] C.D. Stockbridge, A.W. Warner, A Vacuum System for Mass and Thermal Measurement with Resonating Crystalline Quartz, in: *Vac. Microbalance Tech.*, Springer US, Boston, MA, 1962: pp. 93–114. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6285-0_8.
- [83] V. Mecea, J. Carlsson, R. Bucur, Extensions of the quartz-crystal-microbalance technique, *Sensors Actuators A Phys.* 53 (1996) 371–378. [https://doi.org/10.1016/0924-4247\(96\)80161-0](https://doi.org/10.1016/0924-4247(96)80161-0).
- [84] K. Kanazawa, J.G. Gordon, The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid, *Anal. Chim. Acta.* 175 (1985) 99–105. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)82721-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)82721-X).
- [85] S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini, Piezoelectric biosensors: strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices., *Methods.* 37 (2005) 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.05.005>.
- [86] L. Cervera-Chiner, M. Juan-Borrás, C. March, A. Arnau, I. Escriche, Á. Montoya, Y. Jiménez, High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCM) immunosensor for pesticide detection in honey, *Food Control.* 92 (2018) 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.04.026>.
- [87] A. Tsortos, G. Papadakis, E. Gizeli, Shear acoustic wave biosensor for detecting DNA intrinsic viscosity and conformation: A study with QCM-D, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 836–841. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.006>.
- [88] M.C. Dixon, Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: enabling real-time characterization of biological materials and their interactions., *J. Biomol. Tech.* 19 (2008) 151–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19137101> (accessed July 9, 2019).
- [89] Y.J. Montagut, J.V. García Narbon, Y. Jiménez Jiménez, C. March Iborra, A. Montoya Baidés, R.A. Torres Villa, A. Arnau Vives, Oscilador para biosensores basado en microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), *Rev. Fac. Ing.* (2011) 114–122. <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/ingenieria/article/view/13543>

(accessed April 5, 2015).

- [90] E. Uttenthaler, M. Schröml, J. Mandel, S. Drost, Ultrasensitive quartz crystal microbalance sensors for detection of M13-Phages in liquids, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 735–743. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00220-2](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00220-2).
- [91] C. March, J. V. García, A. Sánchez, A. Arnau, Y. Jiménez, P. García, J.J. Manclús, A. Montoya, High-frequency phase shift measurement greatly enhances the sensitivity of QCM immunosensors., *Biosens. Bioelectron.* 65C (2014) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.001>.
- [92] P. Abdul Rasheed, N. Sandhyarani, Quartz crystal microbalance genosensor for sequence specific detection of attomolar DNA targets, *Anal. Chim. Acta.* 905 (2016) 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.033>.
- [93] S. Gupta, A. Venkatesh, S. Ray, S. Srivastava, Challenges and prospects for biomarker research: a current perspective from the developing world., *Biochim. Biophys. Acta.* 1844 (2014) 899–908. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.12.020>.
- [94] A. Ziegler, A. Koch, K. Krockenberger, A. Großhennig, Personalized medicine using DNA biomarkers: A review, *Hum. Genet.* 131 (2012) 1627–1638. <https://doi.org/10.1007/s00439-012-1188-9>.
- [95] W. Göpel, P. Heiduschka, Interface analysis in biosensor design, *Biosens. Bioelectron.* 10 (1995) 853–883. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(95\)99225-A](https://doi.org/10.1016/0956-5663(95)99225-A).
- [96] A. Dupont-Filliard, M. Billon, G. Bidan, S. Guillerez, Investigation by QCM of the Specific and Nonspecific Avidin Interaction onto a Biotinylated Polypyrrole Film, *Electroanalysis.* 16 (2004) 667–673. <https://doi.org/10.1002/elan.200302867>.
- [97] R. Singh, G. Sumana, R. Verma, S. Sood, M.K. Pandey, R.K. Gupta, B.D. Malhotra, DNA biosensor for detection of *Neisseria gonorrhoeae* causing sexually transmitted disease, *J. Biotechnol.* 150 (2010) 357–365. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2010.09.935>.
- [98] A. Benvidi, A. Dehghani Firouzabadi, M. Dehghan Tezerjani, S.M. Moshtaghiun, M. Mazloum-Ardakani, A. Ansarin, A highly sensitive and selective electrochemical DNA

- biosensor to diagnose breast cancer, *J. Electroanal. Chem.* 750 (2015) 57–64. <https://doi.org/10.1016/J.JELECHEM.2015.05.002>.
- [99] M.. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret, Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 291–303. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(00\)00071-3](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(00)00071-3).
- [100] X. Ding, Y. Yan, S. Li, Y. Zhang, W. Cheng, Q. Cheng, S. Ding, Surface plasmon resonance biosensor for highly sensitive detection of microRNA based on DNA super-sandwich assemblies and streptavidin signal amplification, *Anal. Chim. Acta.* 874 (2015) 59–65. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2015.03.021>.
- [101] Y.Q. Fu, J.K. Luo, N.T. Nguyen, A.J. Walton, A.J. Flewitt, X.. Zu, Y. Li, G. McHale, A. Matthews, E. Iborra, H. Du, W.I. Milne, Advances in piezoelectric thin films for acoustic biosensors, acoustofluidics and lab-on-chip applications, *Prog. Mater. Sci.* 89 (2017) 31–91. <https://doi.org/10.1016/J.PMATSCI.2017.04.006>.
- [102] A. Correia, Development of a piezoelectric biosensor based on PVDF films, Universidade Nova de Lisboa, 2011. <https://pdfs.semanticscholar.org/c625/9711997c335d4b863990c21dfbfff93fade9.pdf> (accessed June 9, 2019).
- [103] J.I.A. Rashid, N.A. Yusof, The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review, *Sens. Bio-Sensing Res.* 16 (2017) 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2017.09.001>.
- [104] M. Pohanka, Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications, *Mater.* (Basel, Switzerland). 11 (2018). <https://doi.org/10.3390/ma11030448>.
- [105] M. Datta, D. Desai, A. Kumar, Gene Specific DNA Sensors for Diagnosis of Pathogenic Infections., *Indian J. Microbiol.* 57 (2017) 139–147. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0650-8>.
- [106] B. Ratner, A. Hoffman, Physicochemical Surface Modification of Materials Used in Medicine, in: *Biomater. Sci.*, Academic Press, 2013: pp. 259–276.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00027-9>.

- [107] S. Casalini, C.A. Bortolotti, F. Leonardi, F. Biscarini, Self-assembled monolayers in organic electronics, *Chem. Soc. Rev.* 46 (2017) 40–71. <https://doi.org/10.1039/C6CS00509H>.
- [108] T. Wink, S.J. van Zuilen, a Bult, W.P. van Benkom, Self-assembled monolayers for biosensors., *Analyst.* 122 (1997) 43R-50R. <https://doi.org/10.1039/a606964i>.
- [109] M.A. Daza, Monocapas auto-organizadas sobre metales : adsorción no específica de moléculas bioactivas y su aplicación en el desarrollo de biosensores, Universidad Nacional de la Plata, 2006.
- [110] L.A. Godínez, Substratos modificados con monocapas autoensambladas: dispositivos parafabricar sensores y estudiar procesos químicos y fisicoquímicos interfaciales, *J. Mex. Chem. Soc.* 43 (1999) 219–229. <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=47543608> (accessed May 11, 2015).
- [111] C. Moldovan, C. Mihailescu, D. Stan, L. Ruta, R. Iosub, R. Gavrilă, M. Purica, S. Vasilica, Characterization of self-assembled monolayers (SAMs) on silicon substrate comparative with polymer substrate for *Escherichia coli* O157:H7 detection, *Appl. Surf. Sci.* 255 (2009) 8953–8959. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.06.113>.
- [112] L. Zhang, Z. Li, X. Xu, G. Yang, X. Zhou, Effect of mixed thiols on the adsorption , capacitive and hybridization performance of DNA self-assembled monolayers on gold, *J. Solid State Electrochem.* (2016). <https://doi.org/10.1007/s10008-016-3220-9>.
- [113] E. Briand, M. Salmay, J.-M. Herry, H. Perrot, C. Compère, C.-M. Pradier, Building of an immunosensor: how can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency?, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 440–8. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.05.018>.
- [114] D.G. Castner, B.D. Ratner, Proteins Controlled With Precision at Organic, Polymeric, and Biopolymer Interfaces for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Princ. Regen. Med.* (2019) 523–534. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00031-X>.
- [115] R.C. Ebersole, J.A. Miller, J.R. Moran, M.D. Ward, Spontaneously Formed

- Functionally Active Avidin Monolayers on Metal Surfaces: A Strategy for Immobilizing Biological Reagents and Design of Piezoelectric Biosensors, *J. Am. Chem. Soc.* (1990). <https://doi.org/10.1021/ja00164a070>.
- [116] L. Chalet, F.J. Wolf, The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by *Streptomyces*, *Arch. Biochem. Biophys.* 106 (1964) 1–5. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(64\)90150-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(64)90150-X).
- [117] C.M. Dundas, D. Demonte, S. Park, Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications, *Appl Microbiol Biotechnol.* (2013) 9343–9353. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5232-z>.
- [118] K.H. Lim, H. Huang, A. Pralle, S. Park, Engineered Streptavidin Monomer and Dimer with Improved Stability and Function, *Biochemistry.* 50 (2011) 8682–8691. <https://doi.org/10.1021/bi2010366>.
- [119] J. Luong, K. Male, J. Glennon, Biotin interference in immunoassays based on biotin-strept(avidin) chemistry: An emerging threat, *Biotechnol. Adv.* (2019). <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2019.03.007>.
- [120] M. Obermayer, F. Lynen, Structure of biotin enzymes, *Trends Biochem. Sci.* 1 (1976) 169–171. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(76\)90198-5](https://doi.org/10.1016/0968-0004(76)90198-5).
- [121] J. Gómez Oliver, *Resonadores Piezoeléctricos Como Plataforma para el Desarrollo de Inmunosensores*, Universidad de Castilla La Mancha, 2013.
- [122] A. Garrido, M.-J. Chapela, B. Román, P. Fajardo, J.M. Vieites, A.G. Cabado, In-house validation of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes*, *Int. J. Food Microbiol.* 164 (2013) 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.024>.
- [123] N. Paniel, J. Baudart, A. Hayat, L. Barthelmebs, Aptasensor and genosensor methods for detection of microbes in real world samples., *Methods.* 64 (2013) 229–40. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.001>.
- [124] M. Aquino de Muro, Probe design, production and applications, in: J.. Walker, R. Rapley (Eds.), *Med. Biomethods Handb.*, 1st ed., Humana Press, 2005: pp. 41–53.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1385/1-59259-870-6:013>.

- [125] K.T. Ulrich, S.D. Epinge, R.V. Madrigal Alvarez, *Diseño y desarrollo de productos : enfoque multidisciplinario*, McGraw-Hill, 2004. https://books.google.com.co/books?id=z_5MOgAACAAJ&dq=Diseño+y+desarrollo+de+productos.+Enfoque+multidisciplinario&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi2m72v4rziAhUqneAKHe78DDcQ6AEIKTAA (accessed May 27, 2019).
- [126] A. Yuryev, *PCR primer design*, 1st ed., Humana Press, Totowa, NJ, United States, 2007.
- [127] A.B. Steel, R.L. Levicky, T.M. Herne, M.J. Tarlov, Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly., *Biophys. J.* 79 (2000) 975–81. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76351-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76351-X).
- [128] F. Teles, L. Fonseca, Trends in DNA biosensors, *Talanta.* 77 (2008) 606–623. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.024>.
- [129] N. Fortin, A. Mulchandani, W. Chen, Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157:H7., *Anal. Biochem.* 289 (2001) 281–288. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4935>.
- [130] W. Yanko, *Development of practical methods to assess the presence of bacterial pathogens in water*, 1st ed., Water Environment Research Foundation, 2004.
- [131] V.K. Sharma, Real-time reverse transcription-multiplex PCR for simultaneous and specific detection of *rfbE* and *eae* genes of *Escherichia coli* O157:H7, *Mol. Cell. Probes.* 20 (2006) 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2006.03.001>.
- [132] B. Mull, V.R. Hill, Recovery and Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Surface Water, Using Ultrafiltration and Real-Time PCR, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 3593–3597. <https://doi.org/10.1128/AEM.02750-08>.
- [133] E. Omiccioli, G. Amagliani, G. Brandi, M. Magnani, A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk, *Food Microbiol.* 26 (2009) 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.008>.

- [134] B. Suo, Y. Wang, Evaluation of a multiplex selective enrichment broth SEL for simultaneous detection of injured *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*., *Braz. J. Microbiol.* 44 (2013) 737–42. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822013000300011>.
- [135] R. Gordillo, A. Rodríguez, M.L. Werning, E. Bermúdez, M. Rodríguez, Quantification of viable *Escherichia coli* O157:H7 in meat products by duplex real-time PCR assays, *Meat Sci.* 96 (2014) 964–970. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.10.018>.
- [136] J.A. Ordóñez, F. Jiménez, J. Arnau, *Avances en la producción de elaborados cárnicos seguros y saludables*, Consolider, Barcelona, 2013.
- [137] S. Perelle, F. Dilasser, J. Grout, P. Fach, Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases, *Mol. Cell. Probes.* 18 (2004) 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2003.12.004>.
- [138] J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, T.L. Madden, Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction., *BMC Bioinformatics.* 13 (2012) 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
- [139] V. Chan, D.J. Graves, S.E. Mckenzie, *The Biophysics of DNA Hybridization with Immobilized Oligonucleotide Probes*, *Biophys. J.* 69 (1995) 2243–2255.
- [140] S. Stamm, C.W.J. Smith, R. Lührmann, *Alternative Pre-mRNA Splicing : Theory and Protocols*, Wiley-Blackwell, 2012.
- [141] E. van Pelt-Verkuil, A. van Belkum, J.P. Hays, *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*, Springer Science & Business Media, 2008.
- [142] M. Sam, E.M. Boon, J.K. Barton, M.G. Hill, E.M. Spain, Morphology of 15-mer duplexes tethered to Au(111) probed using scanning probe microscopy, *Langmuir.* 17 (2001) 5727–5730. <https://doi.org/10.1021/la010496d>.
- [143] M. Piliarik, H. Vaisocherová, J. Homola, Towards parallelized surface plasmon resonance sensor platform for sensitive detection of oligonucleotides, *Sensors Actuators, B Chem.* 121 (2007) 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.09.009>.

- [144] L. Dyadyusha, H. Yin, S. Jaiswal, T. Brown, J.J. Baumberg, F.P. Booy, T. Melvin, Quenching of CdSe quantum dot emission, a new approach for biosensing, *Chem. Commun.* (2005) 3201–3203. <https://doi.org/10.1039/b500664c>.
- [145] D.-J. Chung, K.-C. Kim, S.-H. Choi, Electrochemical DNA biosensor based on avidin–biotin conjugation for influenza virus (type A) detection, *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 9390–9396. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2011.06.015>.
- [146] R.-Z. Hao, H.-B. Song, G.-M. Zuo, R.-F. Yang, H.-P. Wei, D.-B. Wang, Z.-Q. Cui, Z. Zhang, Z.-X. Cheng, X.-E. Zhang, DNA probe functionalized QCM biosensor based on gold nanoparticle amplification for *Bacillus anthracis* detection., *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 3398–404. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.01.010>.
- [147] T. Ito, N. Aoki, A. Tsuchiya, S. Kaneko, K. Akiyama, K. Uetake, K. Suzuki, Detection of Stress Hormone in the Milk for Animal Welfare Using QCM Method, *J. Sensors.* 2017 (2017) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/6486891>.
- [148] F.N. Dultsev, E.A. Kolosovsky, M.A. Cooper, A.A. Lomzov, D.V. Pyshnyi, QCM-based rapid analysis of DNA, *Sens. Bio-Sensing Res.* 4 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2014.10.004>.
- [149] A.A. Moosavi-Movahedi, Thermodynamics of protein denaturation by sodium dodecyl sulfate, *J. Iran. Chem. Soc.* 2 (2005) 189–196. <https://doi.org/10.1007/BF03245921>.
- [150] X. Wang, H.J. Lim, A. Son, Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization., *Environ. Health Toxicol.* 29 (2014) e2014007. <https://doi.org/10.5620/eh.2014.29.e2014007>.
- [151] D. García, Monocapas autoensambladas (SAMs) y nanopartículas metálicas (MPCs) como elementos en la arquitectura de interfases funcionales, Universidad de Córdoba, 2009.
- [152] L.M. Fischer, M. Tenje, A.R. Heiskanen, N. Masuda, J. Castillo, A. Bentien, J. Émneus, M.H. Jakobsen, A. Boisen, Gold cleaning methods for electrochemical detection applications, *Microelectron. Eng.* 86 (2009) 1282–1285. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2008.11.045>.

- [153] Three Bond Technical News, Ultraviolet-Ozone Surface Treatment, 1987. <https://www.threebond.co.jp/en/technical/technicalnews/pdf/tech17.pdf> (accessed June 14, 2019).
- [154] C. Bamdad, A DNA Self-Assembled Monolayer for the Specific Attachment of Unmodified Double- or Single-Stranded DNA, *Biophys. J.* 75 (1998) 1997–2003. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77641-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77641-6).
- [155] A. Germishuizen, C. Wälti, R. Wirtz, DNA self-assembly-driven positioning of molecular components on nanopatterned surfaces Related content Selective dielectrophoretic manipulation of surface-immobilized DNAmolecules, *Nanotechnology.* 27 (2016) 395301. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/39/395301>.
- [156] C. March, J. V García, Á. Sánchez, A. Arnau, Y. Jiménez, P. García, J.J. Manclús, Á. Montoya, Biosensors and Bioelectronics High-frequency phase shift measurement greatly enhances the sensitivity of QCM immunosensors, *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.001>.
- [157] J.J. Gooding, D.B. Hibbert, The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes, *TrAC Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 525–533. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00133-8](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00133-8).
- [158] K. Barrientos, P.A. Marín, P. Araque, M. Jaramillo, In-Silico Prediction on the MSAMs-Assisted Immobilization of Bovine Serum Albumin on 10 MHz Piezoelectric Immunosensors, *J. Mol. Eng. Mater.* 7 (2019). <https://doi.org/10.1142/s2251237319500011>.
- [159] N. Nakajima, Y. Ikada, Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media, *Bioconjug. Chem.* 6 (1995) 123–130. <https://doi.org/10.1021/bc00031a015>.
- [160] T. Kaewphinit, S. Santiwatanakul, C. Promptmas, K. Chansiri, Detection of non-amplified Mycobacterium tuberculosis genomic DNA using piezoelectric DNA-based biosensors., *Sensors (Basel).* 10 (2010) 1846–58. <https://doi.org/10.3390/s100301846>.

- [161] M. Ozsoz, *Electrochemical DNA biosensors*, 1st ed., Pan Stanford Publishing, Singapur, 2012.
- [162] S.C.B. Gopinath, T. Lakshmi Priya, *Nanobiosensors for biomolecular targeting*, 1st ed., Elsevier Inc., India, 2019.
- [163] P. Wang, X. Wang, L. Wang, X. Hou, W. Liu, C. Chen, Interaction of gold nanoparticles with proteins and cells., *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16 (2015) 034610. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/3/034610>.
- [164] R. D'agata, P. Palladino, G. Spoto, Streptavidin-coated gold nanoparticles: critical role of oligonucleotides on stability and fractal aggregation, *Beilstein J. Nanotechnol.* 8 (2017) 1–11. <https://doi.org/10.3762/bjnano.8.1>.
- [165] Y.M. Tseytlin, DNA molecule elastic nonlinearity: A functional helicoidal model, *ZAMM Zeitschrift Fur Angew. Math. Und Mech.* 94 (2014) 505–508. <https://doi.org/10.1002/zamm.201300008>.
- [166] S.B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, Overstretching B-DNA: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules, *Science* (80-.). 271 (1996) 795–799.
- [167] K.P.C. Vollhardt, N.E. Schore, *Organic chemistry: structure and function.*, 7th ed., W. H Freeman and Company, New York, 2014.
- [168] P.M. Kosaka, S. González, C.M. Domínguez, A. Cebollada, A. San Paulo, M. Calleja, J. Tamayo, Atomic force microscopy reveals two phases in single stranded DNA self-assembled monolayers, *Nanoscale.* 5 (2013) 7425–32. <https://doi.org/10.1039/c3nr01186k>.
- [169] T.M. Uehara, H.B. De Aguiar, K. Bergamaski, P.B. Miranda, Adsorption of alkylthiol self-assembled monolayers on gold and the effect of substrate roughness: A comparative study using scanning tunneling microscopy, cyclic voltammetry, second-harmonic generation, and sum-frequency generation, *J. Phys. Chem. C.* 118 (2014) 20374–20382. <https://doi.org/10.1021/jp5054919>.
- [170] L.K. Wolf, D.E. Fullenkamp, R.M. Georgiadis, Quantitative angle-resolved SPR

- imaging of DNA-DNA and DNA-drug kinetics, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 17453–17459. <https://doi.org/10.1021/ja056422w>.
- [171] C.-L. Ren, D. Carvajal, K.R. Shull, I. Szeleifer, Streptavidin-biotin binding in the presence of a polymer spacer. A theoretical description., *Langmuir ACS J. Surfaces Colloids.* 25 (2009) 12283–92. <https://doi.org/10.1021/la901735d>.
- [172] C.J. Van Oss, R.F. Giese, P.M. Bronson, A. Docoslis, P. Edwards, W.T. Ruyechan, Macroscopic-scale surface properties of streptavidin and their influence on aspecific interactions between streptavidin and dissolved biopolymers, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 30 (2003) 25–36. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(03\)00025-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00025-0).
- [173] B.A. Katz, Binding of biotin to streptavidin stabilizes intersubunit salt bridges between Asp61 and His87 at low pH, *J. Mol. Biol.* 274 (1997) 776–800. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1444>.
- [174] P.C. Weber, M.J. Cox, F.R. Salemme, D.H. Ohlendorf, Crystallographic data for *Streptomyces avidinii* streptavidin., *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 12728–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3624275> (accessed July 11, 2019).
- [175] A. Rodes, M. Rueda, F. Prieto, C. Prado, J.M. Feliu, A. Aldaz, Adenine Adsorption at Single Crystal and Thin-Film Gold Electrodes: An In Situ Infrared Spectroscopy Study, *J. Phys. Chem. C.* 111 (2009) 18784–18794.
- [176] E. De La Llave, R. Clarenc, D.J. Schiffrin, F.J. Williams, Organization of alkane amines on a gold surface: Structure, surface dipole, and electron transfer, *J. Phys. Chem. C.* 118 (2014) 468–475. <https://doi.org/10.1021/jp410086b>.
- [177] C.E. Argaraña, I.D. Kuntz, S. Birken, R. Axel, C.R. Cantor, Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene., *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 1871–82. <https://doi.org/10.1093/nar/14.4.1871>.
- [178] R. Karlsson, R. Ståhlberg, Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities, *Anal. Biochem.* (1995). <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1350>.

- [179] E. Williams, M.I. Pividori, A. Merkoçi, R.J. Forster, S. Alegret, Rapid electrochemical genosensor assay using a streptavidin carbon-polymer biocomposite electrode., *Biosens. Bioelectron.* 19 (2003) 165–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14611751> (accessed June 11, 2019).
- [180] R.C. Hoft, M.J. Ford, A.M. McDonagh, M.B. Cortie, Adsorption of amine compounds on the Au(111) surface: A density functional study, *J. Phys. Chem. C.* (2007). <https://doi.org/10.1021/jp072494t>.
- [181] A. Dolatshahi-Pirouz, K. Rechendorff, M.B. Hovgaard, M. Foss, J. Chevallier, F. Besenbacher, Bovine serum albumin adsorption on nano-rough platinum surfaces studied by QCM-D, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 66 (2008) 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.05.010>.
- [182] K. Rechendorff, The influence of surface roughness on protein adsorption, Universidad de Aarhus, 2006.
- [183] P.M. Wolny, J.P. Spatz, R.P. Richter, On the Adsorption Behavior of Biotin-Binding Proteins on Gold and Silica, *Langmuir.* 26 (2009) 1029–1034. <https://doi.org/10.1021/la902226b>.
- [184] F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, Protein immobilization strategies for protein biochips, *Biomacromolecules.* 8 (2007) 1775–1789. <https://doi.org/10.1021/bm061197b>.
- [185] C.M. Pandey, R. Singh, G. Sumana, M.K. Pandey, B.D. Malhotra, Electrochemical genosensor based on modified octadecanethiol self-assembled monolayer for Escherichia coli detection, *Sensors Actuators, B Chem.* 151 (2011) 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.07.046>.
- [186] Ó. a. Loaiza, S. Campuzano, M. Pedrero, J.M. Pingarrón, DNA sensor based on an Escherichia coli lac Z gene probe immobilization at self-assembled monolayers-modified gold electrodes, *Talanta.* 73 (2007) 838–844. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.04.059>.
- [187] T.M. Herne, M.J. Tarlov, Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 8916–8920. <https://doi.org/10.1021/ja9719586>.

- [188] R. Levicky, T.M. Herne, M.J. Tarlov, S.K. Satija, Using Self-Assembly To Control the Structure of DNA Monolayers on Gold: A Neutron Reflectivity Study, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 9787–9792. <https://doi.org/10.1021/ja981897r>.
- [189] D.Y. Petrovykh, H. Kimura-Suda, L.J. Whitman, M.J. Tarlov, Quantitative Analysis and Characterization of DNA Immobilized on Gold, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 5219–5226. <https://doi.org/10.1021/ja029450c>.
- [190] J.W. Park, H.Y. Lee, J.M. Kim, R. Yamasaki, T. Kanno, H. Tanaka, H. Tanaka, T. Kawai, Electrochemical Detection of Nonlabeled Oligonucleotide DNA Using Biotin-Modified DNA(ss) on a Streptavidin-Modified Gold Electrode, *J. Biosci. Bioeng.* (2004). [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70161-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70161-9).
- [191] Y. Portuondo, J. Portuondo, La repetibilidad y reproducibilidad en el aseguramiento de la calidad de los procesos de medición, *Tecnol. Química.* XXX (2010) 117–121. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445543770014>.
- [192] J. Treviño, Desarrollo de un biosensor de resonancia de plasmón superficial para la determinación de hormonas pituitarias en muestra biológicas, Universidad Autónoma de Madrid, 2009.
- [193] B. Martín, Determinación indirecta de gluten mediante métodos basados en la detección de ADN: PCR y genosensores electroquímicos, Universidad Complutense de Madrid, 2015. <https://doi.org/ISBN:978-84-693-1123-3>.
- [194] N. Wrobel, Optimization of Interfaces for Genosensors Based on Thiol Layers on Gold Films, Universität Regensburg, 2001.
- [195] D. Johannsmann, Piezoelectric Stiffening, in: 1st (Ed.), *Quartz Cryst. Microbalance Soft Matter Res.*, Springer, Cham, 2015: p. 387. https://doi.org/10.1007/978-3-319-07836-6_5.
- [196] S. Trajkovic, X. Zhang, S. Daunert, Y. Cai, Atomic force microscopy study of the conformational change in immobilized calmodulin., *Langmuir.* 27 (2011) 10793–9. <https://doi.org/10.1021/la2016885>.
- [197] T. Matsumoto, DNA Molecular Electronics, in: 2017: pp. 95–109.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-57096-9_5.

- [198] J. Escorihuela, M.Á. González-Martínez, J.L. López-Paz, R. Puchades, Á. Maquieira, D. Gimenez-Romero, Dual-polarization interferometry: a novel technique to light up the nanomolecular world., *Chem. Rev.* 115 (2015) 265–94. <https://doi.org/10.1021/cr5002063>.
- [199] D. Milioni, A. Tsortos, M. Velez, E. Gizeli, Extracting the Shape and Size of Biomolecules Attached to a Surface as Suspended Discrete Nanoparticles, *Anal. Chem.* 89 (2017) 4198–4203. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00206>.
- [200] S.K. Vashist, P. Vashist, Recent Advances in Quartz Crystal Microbalance-Based Sensors, *J. Sensors.* 2011 (2011) 1–13. <https://doi.org/10.1155/2011/571405>.
- [201] Biolin Scientific Q-Sense, Q-Sense E4 Operator Manual, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jacr.2004.05.021>.
- [202] S.T. Ten, U. Hashim, S.C.B. Gopinath, W.W. Liu, K. Foo, S. Sam, C. Rahman, A. Nordin, Highly sensitive Escherichia coli shear horizontal surface acoustic wave biosensor with silicon dioxide nanostructures, *Biosens. Bioelectron.* 93 (2017) 146–154. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2016.09.035>.
- [203] S. Brosel-Oliu, R. Ferreira, N. Uria, N. Abramova, R. Gargallo, F. Muñoz, A. Bratoc, Novel impedimetric aptasensor for label-free detection of Escherichia coli O157:H7, *Sensors Actuators B Chem.* 255 (2018) 2988–2995. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2017.09.121>.
- [204] S. Xu, Y. Zhang, K. Dong, J. Wen, C. Zheng, S. Zhao, Electrochemical DNA Biosensor Based on Graphene Oxide-Chitosan Hybrid Nanocomposites for Detection of Escherichia Coli O157:H7, *Int. J. Electrochem. Sci.* 12 (2017) 3443–3458. <https://doi.org/10.20964/2017.04.16>.