



Desactivación de fluorescencia como principio de biodetección de proteínas

Edwin johan Ortiz Riaño

Centro de Investigaciones en Óptica
Fotónica, Laboratorio de Biosensores Ópticos
León, México
2018

Desactivación de fluorescencia como principio de biodetección de proteínas

Edwin johan Ortiz Riaño

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Maestro en Ciencias (Óptica)

Director(a):
Dr Eden Morales Narváez

Área de Investigación:
Fotónica

Centro de Investigaciones en Óptica
Fotónica, Laboratorio de Biosensores Ópticos
León, México
2018

Dedico este trabajo

A mis padres quienes siempre me han apoyado y me han brindado su cariño, comprensión y ejemplo.

A mis amigos con los cuales puedo charlar sobre temas tan interesantes como lo es la ciencia.

La ciencia natural, no se limita a describir y explicar la naturaleza, sino que es parte de la interacción entre la naturaleza y nosotros mismos.

Werner Heisenberg

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis padres puesto que ellos hicieron que yo fuera quien soy e el presente. Una parte muy importante de mis logros, especialmente éste, se los debo a ustedes. Mientras me inculcaron los valores de responsabilidad y deber, me dieron algunas libertades. Pero lo mas importante fue la motivación que constantemente me dieron para lograr mis metas.

Gracias madre y padre.

De igual forma, quiero agradecer al CONACYT por su apoyo económico, al Centro de Investigaciones en Óptica por haberme permitirme ser parte de esta grandiosa institución gracias a todas las personas que hicieron parte de mi formación académica: investigadores, amigos y compañeros.

Lista de Figuras

1-1. Unidades de un biosensor. a) muestreo b) estimulación c) bioreconocimiento d) unidad de transducción e) unidad de detección.	7
1-2. Esquema de llave-cerradura para: a) enzimas b) anticuerpos.	8
1-3. Diagrama de Jablonski.	11
1-4. Anticuerpos de membrana; b) anticuerpos solubles.	13
1-5. Estructura de un anticuerpo.	14
1-6. Estructura química de la Fluoresceína y el FITC.	15
1-7. (a) grafeno y grafito; (b) orillas zigzag y armchair.	16
1-8. (a) fotografía de GO en su verdadera forma 2D (b) imagen de microscopia electrónica de barrido de capas de GO. Adaptado con permiso de “(Dimiev Ayrat M. and Eigler Siegfried, 2016). Derechos de autor [2016], Wiley”.	17
2-1. Principio de funcionamiento del biosensor basado de nanopapel compuesto de óxido de titanio TiO_2 y grafeno. La presencia del GO mejora la fotocorriente generada. Adaptado con permiso de “(Y. Zhang et al., 2013). Derechos de autor [2013], Elsevier”.	20
2-2. Principio de funcionamiento de biosensor basado en grafeno como agente amplificador de la señal. Adaptado con permiso de “(Song et al., 2016). Derechos de autor [2016], Elsevier”.	21
2-3. Principio de funcionamiento del biosensor basado hidrogel y GO. Cuando el analito está presente, no hay un apagamiento de la intensidad de fluorescencia. Adaptado con permiso de “(Shirai et al., 2017). Derechos de autor [2017], RSC”.	23
2-4. Principio de funcionamiento del biosensor descrito. En presencia del analito, hay un apagamiento de la intensidad de fluorescencia debido a la formación de complejos tipo sándwich. Adaptado con permiso de “(Shirai et al., 2016). Derechos de autor [2016], RSC”.	23
2-5. Principio de funcionamiento del biosensor de flujo lateral. El analito es transportado hasta la línea de prueba donde se forman inmunocomplejos tipo sándwich y el GO funciona como agente revelador debido a que cuando se forman inmunocomplejos la intensidad de fluorescencia se mantiene. Adaptado con permiso de “(Zamora-Gálvez et al., 2018). Derechos de autor [2018], Elsevier”.	24
2-6. Principio de funcionamiento del biosensor basado en nanopapel y GO. El analito funciona como espaciador entre el GO y los puntos cuánticos y, cuando está presente, la intensidad de fluorescencia se recupera. Adaptado con permiso de “(Cheeveewattanagul et al., 2017). Derechos de autor [2017], Advance Functional Materials”.	25

2-7. Principio de funcionamiento del biosensor para múltiples analitos. Cuando el analito es añadido, uno a la vez (3 y 4) o mixtos (5) se recupera la intensidad de fluorescencia. Adaptado con permiso de “(Anfossi et al., 2014). Derechos de autor [2014], Springer Link”.	26
2-8. Principio de funcionamiento del biosensor SPR basado en GO y bipirámides de oro. La alta capacidad de carga y la buena biocompatibilidad de GO lo hace un buen candidato como plataforma de biosensado. Adaptado con permiso de “(J. Zhang et al., 2013). Derechos de autor [2013], RSC”.	28
2-9. Principio de funcionamiento del biosensor SPR para detección clembuterol. La buena biocompatibilidad del grafeno, permite la inmovilización del anticuerpo para la detección del analito. Adaptado con permiso de “(Yan et al., 2015). Derechos de autor [2014], Springer Link”.	29
2-10. Principio de funcionamiento del biosensor SPR basado en nanohíbridos de grafeno y nanopartículas metálicas. Adaptado con permiso de “(H. Zhang et al., 2013). Derechos de autor [2013], Elsevier”.	30
2-11. Principio de funcionamiento del biosensor basado en transferencia de energía resonante electroquimioluminiscente. Adaptado con permiso de “(Cui et al., 2016). Derechos de autor [2016], Elsevier”.	31
2-12. Principio de funcionamiento del biosensor basado en transferencia de energía resonante quimioluminiscente adaptado con permiso de “(Al-Ogaidi et al., 2014). Derechos de autor [2013], RSC”.	32
3-1. El blanco sin analito: a) fluorescente b) apagamiento de fluorescencia después de cierto tiempo.	38
3-2. El blanco sin analito: a) apagamiento de acuerdo concentración analito b) analito como espaciador c) complejo analito-sonda.	39
3-3. Placa de 96 pocillos recubierta con tres concentraciones diferentes de GO: $3200 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente b) Interacción electrostática entre el GO y el poliestireno modificado.	40
3-4. Representación de un pocillo después de las etapas de lavado con el GO que se adhirió a su superficie.	40
3-5. Espectro UV-Vis para a) poliestireno b) grafeno oxidado (GO).	41
3-6. Espectro UV-Vis para diferentes concentraciones de GO.	42
3-7. Espectro Raman para a) poliestireno b) grafeno oxidado GO c) Poliestireno recubierto con GO.	42
3-8. Gráfica donde se muestra como desciende la intensidad de fluorescencia para cada concentración de GO durante cierto intervalo de tiempo.	43
3-9. Gráfica de apagamiento de fluorescencia para concentraciones relativamente bajas de GO. a) Con IgG-FITC de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ b) Con IgG-FITC de $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$.	44
3-10. Apagamiento de fluorescencia para concentraciones relativamente altas de GO.	45
3-11. Gráficas de apagamiento para concentraciones de GO: a) $400 \mu\text{g mL}^{-1}$; b) $800 \mu\text{g mL}^{-1}$; c) $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$.	46
3-12. Gráficas para optimización de tiempo a) para IgG-FITC de $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ b) para IgG-FITC de $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ c) para IgG-FITC de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.	47
3-13. Gráfica donde se muestra el apagamiento de la intensidad de fluorescencia para diferentes concentraciones del analito.	48

3-14. Gráficas donde se muestran el apagamiento de la intensidad de fluorescencia para diferentes concentraciones del analito. a) gráfica de curvas b) gráfica de tablas.	49
3-15. Gráficas donde se muestran el apagamiento de la intensidad de fluorescencia para diferentes concentraciones del analito. a) IgG-FITC $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ b) IgG-FITC $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ c) $0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$	50
3-16. Gráficas donde se muestran el apagamiento de la intensidad de fluorescencia con variación de volumen.	51
3-17. Primer experimento con resultados positivos. Se logra apreciar que todas las concentraciones del analito se diferencian de la referencia.	52
3-18. En las gráficas se observa que la barra de error de cada concentración mejora considerablemente respecto al experimento anterior (ver Figura 3-17).	53
4-1. Mejor experimento obtenido con la plataforma de biosensado propuesta.	59
4-2. Curvas de calibración lineal del comportamiento de la intensidad de la fluorescencia para cada concentración de analito.	60
4-3. Curvas de calibración no lineal del comportamiento de la intensidad de la fluorescencia para cada concentración de analito.	60
4-4. Curva de calibración para los 30 minutos. Se puede observar los parámetros de m, b y R^2 con su respectiva ecuación.	61
4-5. Curva de calibración para los 45 minutos. Se puede observar los parámetros de m, b y R^2 con su respectiva ecuación.	62
4-6. Curva de calibración para los 60 minutos. Se puede observar los parámetros de m, b y R^2 con su respectiva ecuación.	62
4-7. Curva de calibración para los 90 minutos. Se puede observar los parámetros de m, b y R^2 con su respectiva ecuación.	63
4-8. Gráfica de apagamiento de la intensidad de fluorescencia para concentraciones desconocidas del analito.	66
4-9. Prueba de especificidad para la plataforma de biosensado propuesta. Se puede observar que para ninguna de las concentraciones de ASB hay una diferencia apreciable respecto al blanco.	68
A-1. Primer experimento obtenido con la plataforma de biosensado propuesta.	73
A-2. Curva de calibración para el primer experimento obtenido.	74
A-3. Segundo experimento obtenido con la plataforma de biosensado propuesta.	75
A-4. Curva de calibración para el segundo experimento obtenido.	75
A-5. Tercer experimento obtenido con la plataforma de biosensado propuesta.	76
A-6. Curva de calibración para el tercer experimento obtenido.	77
A-7. Cuarto experimento obtenido con la plataforma de biosensado propuesta.	77
A-8. Curva de calibración para el cuarto experimento obtenido.	78

Lista de Tablas

1-1. Resumen de forma de transducción óptica.	9
2-1. Aspectos destacados para cada propuesta de biosensor basado en grafeno con enfoques fotoelectroquímicos.	22
2-2. Aspectos destacados para cada propuesta de biosensor basado en grafeno con enfoque de apagamiento de fluorescencia.	26
2-3. Aspectos destacados para cada propuesta de biosensor basado en grafeno con enfoque de resonancia de plasmones superficiales.	30
2-4. Aspectos destacados para cada propuesta de biosensor basado en grafeno con diferentes enfoques ópticos.	32
4-1. Coeficientes de determinación para los ajustes lineales y no lineales. . . .	61
4-2. Precisiones para cada concentración del analito en cada tiempo.	65
4-3. Valores medidos y exactitud de A, B Y C para cada uno de los tiempos analizados.	67
4-4. Resultados relevantes para cada uno de los tiempos analizados en este capítulo.	69
A-1. Precisiones para el primer experimento descrito.	74
A-2. Precisiones para el segundo experimento descrito.	76
A-3. Precisiones para el tercer experimento descrito.	76
A-4. Precisiones para el cuarto experimento descrito.	78

Indice General

Agradecimientos	VII
Lista de Figuras	XI
Lista de Tablas	XIII
Introducción	1
1. Marco teórico	5
1.1. Biosensores ópticos	5
1.1.1. ¿Qué es un biosensor?	5
1.1.2. Elementos básicos de un biosensor	6
1.1.3. Bioreconocimiento	6
1.1.4. Transducción óptica	8
1.1.5. Métodos de detección utilizados en el biosensado	9
1.2. Fenómenos físicos involucrados en el sensado óptico	10
1.2.1. Fluorescencia	10
1.2.2. Apagamiento de fluorescencia	11
1.2.3. Transferencia de energía de resonancia de Förster	11
1.2.4. Comparación entre FRET y apagamiento dinámico y estático	12
1.3. Anticuerpos y antígenos	13
1.4. Fluoresceína y FITC	14
1.5. Grafeno y su derivado: óxido de grafeno	15
1.6. Referencias	17
2. Biosensores ópticos basados en Grafeno: Estado del arte	19
2.1. Biosensores con enfoques fotoelectroquímicos	19
2.2. Biosensores con enfoque en apagamiento de Fotoluminiscencia	21
2.3. Biosensores con enfoque en Resonancia de Plasmones Superficiales	27
2.4. Otros enfoques ópticos	29
2.5. Referencias	33
3. Desarrollo experimental	37
3.1. Anti-IgG-FITC: Descripción general	37
3.2. Analito por detectar: IgG humano	37
3.3. Funcionamiento de la plataforma de biosensado propuesta	38
3.4. Recubrimiento de la superficie de la placa con GO	39
3.5. Comprobación de adhesión del GO	41

3.6. Optimización del GO y el fluoróforo (IgG-FITC)	43
3.6.1. Procedimiento experimental	43
3.6.2. Análisis cinético	45
3.6.3. Experimentación con el analito IgG humano	48
3.6.4. Influencia del volumen	51
3.6.5. Homogeneidad de los resultados	51
3.7. Discusión sobre la utilidad de la agitación	54
3.8. Referencias	55
4. Análisis y resultados	57
4.1. Regresión lineal: métodos de mínimos cuadrados	57
4.2. Curvas de calibración	58
4.3. Límites de detección, cuantificación y el intervalo analítico	63
4.4. Precisión y exactitud	65
4.5. Sensibilidad y especificidad	67
4.6. Referencias	69
Conclusiones	71
A. Anexo: Otros experimentos analizados	73

Introducción

Resumen

En nuestros días los inmunoensayos son la principal herramienta para el diagnóstico médico, el desarrollo de fármacos y el monitoreo medioambiental. Sin embargo, la mayoría de los inmunoensayos involucran procedimientos que requieren de muchos elementos para su desarrollo. En el presente trabajo, se desarrolló una novedosa plataforma de biosensado para la detección de IgG humana basada en el apagamiento de fluorescencia causada por el óxido de grafeno. Se utilizó solo un anticuerpo (conjugado con el fluoróforo isotiocianato de fluoresceína) en los procesos de captura y detección sin la necesidad de etapas de lavado. La simple plataforma de biosensado consiste en el recubrimiento de una microplaca de 96 pocillos (con fondo de poliestireno) con óxido de grafeno. La adhesión del óxido de grafeno es posible gracias a interacciones electrostáticas entre el óxido de grafeno (negativamente cargado) y la superficie de la placa modificada con grupos aminos (positivamente cargados). Cuando se agregó el analito y el anticuerpo (conjugado con el fluoróforo) se realizó una cinética durante dos horas con lecturas cada 5 minutos de la intensidad de fluorescencia, observando que cuanto mayor era la concentración del analito menor era el apagamiento de fluorescencia. Esta propuesta mostró una excelente detección para IgG humana, con una aceptable precisión (desde 0.27 % hasta 4.80 %). El límite de detección alcanzado fue 2.71 ng mL^{-1} y el límite de cuantificación alcanzado fue de 15.5 ng mL^{-1} . De igual forma, fue posible la cuantificación de concentraciones desconocidas del analito dentro de un rango aceptable de exactitud (desde 73 % hasta 126 %). Todo esto hace de esta plataforma de biosensado una buena opción para la detección de diversos tipos de analitos (biomarcadores) con potencial futuro en diagnóstico.

Abstract

The immunoassays are nowadays the principal tool for diagnostics, drug development and environmental monitoring. However, most of immunoassays involve procedures that require many elements for its development. In this thesis, a novel biosensing platform based on fluorescence quenching caused by graphene oxide for detection of Human-IgG was developed. For capture and detection processes it was used a single antibody (conjugated with the FITC fluorophore) and without the need for washing steps. The simple biosensing platform consist in the covering of a 96 wells microplate (with polystyrene bottom) with graphene oxide. The graphene oxide adhesion is possible by means of electrostatic interactions between the plate surface modified with amino groups (positively charged) and the graphene oxide (negatively charged). When the analyte and the antibody (conjugated with the fluorophore) are added a kinetic analysis performed throughout 2 hours

with readings every 5 minutes of the fluorescence intensity was carried out, observing that the higher analyte concentration, the less fluorescence quenching. This proposal showed an excellent detection for Human IgG, with an acceptable precision (from 0.27 % to 4.80 %). The limits of detection and quantification reached were 2.71 ng mL^{-1} and 15.5 ng mL^{-1} , respectively. In the same manner, it was possible the quantification of unknown concentrations of the analyte within acceptable range of accuracy (from 73 % to 126 %). All these results make of this biosensing platform a good option for the detection of various kind of analytes (biomarkers) with future potential in diagnostics.

Breves antecedentes y justificación

El área de biosensado surgió a partir de la necesidad del diagnóstico médico, el monitoreo medioambiental, el monitoreo de la calidad de alimentos y el desarrollo y descubrimiento de fármacos (Mehrotra, 2016). Desde que los biosensores empezaron a emerger a mediados de la década de los sesenta por los pioneros Clark and Lyons, se han desarrollado varios tipos de biosensores con diversas técnicas de sensado. Por ejemplo, para biosensores que se basan en enfoques ópticos, son diversas las técnicas empleadas para la biodetección enfoques tales como: apagamiento de fluorescencia, resonancia de plasmones superficiales, fibras ópticas, fotoelectroquímica. Cada una de estas técnicas tienen ciertas ventajas respecto a otras haciendo de su uso conveniente en situaciones específicas (Paras, 2003).

Tener una buena sensibilidad y bajos límites de detección son requerimientos muy importantes que debe poseer un biosensor para potenciales aplicaciones en el diagnóstico temprano de enfermedades (Mehrotra, 2016). Los nanomateriales han sido prometedores candidatos para mejorar estos aspectos dentro del área de biosensado gracias a la posibilidad que ofrecen de inmovilizar una mayor cantidad de bioreceptores e incluso de actuar como el elemento de transducción (Holzinger et al., 2014). Los nanomateriales que más han sido estudiados para aplicaciones de biosensado son las nanopartículas de plata y de oro, los puntos cuánticos semiconductores, las nanopartículas de polímero, los nanotubos de carbón, nanodiamantes y grafeno (Holzinger et al., 2014). El grafeno y sus derivados, han atraído la atención de varios investigadores para el desarrollo de biosensores debido a sus peculiares propiedades ópticas. Por ejemplo, el óxido de grafeno ha mostrado ser un excelente aceptor de energía en los biosensores que se basan en transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, es decir que el óxido de grafeno es un excelente apagador de fotoluminiscencia y por tal motivo ha sido ampliamente usado en biosensores. Además, la presencia de grupos hidroxilos, carboxilos, epoxy y éster sobre el plano basal y orillas de este material, permite una fácil decoración con biomoléculas o biomarcadores (Dimiev Ayrat M. and Eigler Siegfried, 2016).

Aparte de tener un bajo límite de detección y sensibilidad, un biosensor es más útil si su costo de fabricación es barato y si su desarrollo no requiere de tantos procedimientos e implica el uso de diversos elementos. Cuando se hace una revisión de la literatura acerca de biosensores con enfoques ópticos (el capítulo 2 está dedicado a esto), se hace evidente que son diversos los biosensores o plataformas de biosensado propuestos para la detección de diversas proteínas, bacterias, biomarcadores, toxinas etcétera. En algunos de ellos se ha reportado bajos límites de detección; en otros se reporta novedosas formas de sensado debido al uso de diversos nanomateriales como el grafeno; en otros se resalta

diversas ventajas tales como: rápidos tiempos de sensado, mayor sensibilidad, plataformas de biosensado con excelente biocompatibilidad etcétera. Uno de los problemas que más se hace evidente, al realizar esta consulta, es la cantidad de elementos implicados en el desarrollo de biosensores haciendo, en muchas ocasiones, un poco complicado entender la forma como opera estas propuestas e incrementando el costo de producción de estos. Por tal motivo, se hace necesario diseñar e implementar plataformas de biosensado las cuales sean sencillas de entender y que no involucren demasiados elementos y pasos en su operación.

En el presente trabajo, se propone una plataforma de biosensado la cual busca ser simple, rápida, sin requerir de tantos elementos en su desarrollo y manteniendo parámetros de validación aceptables. De acuerdo con los excelentes resultados que se han reportado acerca del óxido de grafeno, se eligió utilizar este material en este trabajo con la intención de aprovechar sus propiedades ópticas, en especial de su gran habilidad de apagar fotoluminiscencia.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar una plataforma de biosensado para la detección de la inmunoglobulina G humana (IgG) basada en la desactivación de fluorescencia, causada por la presencia de óxido de grafeno, como el principio de biodetección.

Objetivos específicos

- Realizar una revisión en la literatura acerca del estado del arte con la intención de resaltar lo innovador de la plataforma de biosensado propuesta.
- Realizar una descripción de los fenómenos involucrados en el biosensado óptico.
- Establecer la concentración de óxido de grafeno óptima para la plataforma de biosensado propuesta.
- Establecer la concentración de IgG-FITC óptima para la plataforma de biosensado propuesta.
- Realizar los respectivos análisis con la intención de validar el método analítico desarrollado (límite de detección, límite de cuantificación, especificidad, precisión y exactitud).

Hipótesis

La hipótesis que se tiene para la plataforma de biosensado consiste en que en ausencia del analito se experimentará un apagamiento máximo de fluorescencia, debido a la interacción del fluoróforo empleado y el óxido de grafeno. Cuando el analito este presente, la separación entre el fluoróforo y el óxido de grafeno será mayor y el apagamiento de fluorescencia será menor. Esta hipótesis surge a partir de biosensores basados en transferencia de energía de resonancia de fluorescencia.

Se espera que entre mayor sea la concentración del analito, mayor será la distancia entre el fluoroforo y el óxido de grafeno presentándose un menor apagamiento de fluorescencia. Así, se piensa que el analito puede actuar como un espaciador. Esta es la idea *a priori* que se tiene de la plataforma de biosensado propuesta en el presente trabajo.

Organización de la tesis de investigación

El presente trabajo se desarrolló en cuatro capítulos fundamentales pensados para describir todos los aspectos importantes involucrados en el desarrollo de la plataforma de biosensado propuesta. A continuación, se describe brevemente el contenido de cada capítulo.

- **Capítulo 1:** en este capítulo se describen todos los elementos involucrados en el desarrollo del presente trabajo. De igual forma, se muestra los fenómenos físicos que involucra el trabajo y se muestra la diferencia con otros fenómenos similares.
- **Capítulo 2:** esta sección está dedicada en analizar el estado del arte respecto a los biosensores con enfoques ópticos. Esta consulta es de vital importancia para destacar los aspectos novedosos que aporta la plataforma de biosensado propuesta.
- **Capítulo 3:** aquí se describe los procedimientos experimentales que se llevaron a cabo para el desarrollo de la plataforma. De igual forma, se describe el principio de funcionamiento y los elementos involucrados en el trabajo.
- **Capítulo 4:** en este capítulo se analizan los resultados obtenidos para el mejor experimento obtenido en el presente trabajo. Se muestran parámetros importantes para la validación de la plataforma de biosensado tales como: límite de detección y cuantificación, sensibilidad y especificidad.

Capítulo 1

Marco teórico

1.1. Biosensores ópticos

El área de biosensado surgió debido a la necesidad de diagnóstico médico y detección de bacterias que afectan el medio ambiente (Paras, 2003). En los últimos 20 años, se ha tenido gran interés en el desarrollo y diseño de nuevos biosensores que permitan la detección temprana de ciertas enfermedades con el objetivo de poderlas tratar a tiempo antes de su expansión descontrolada. Los sensores ópticos, utilizan técnicas ópticas para detectar e identificar especies químicas o biológicas (Paras, 2003; Wang and Liu, 2011). Estos biosensores ofrecen ventajas al permitir el sensado remoto y una gran sensibilidad y especificidad. Por tales motivos, se hace necesario dar una descripción acerca de que se entiende por sensor y en particular por biosensor.

1.1.1. ¿Qué es un biosensor?

Una primera definición de sensor podría ser “*cualquier cosa que responda a una entrada de interés*” (Jones and Watson, 2010). Otra definición un poco más precisa sería “*un dispositivo que recibe un estímulo y responde con una señal eléctrica*” (McGrath and Scanail, 2013). En muchas ocasiones, la definición de sensor parece estar sujeta a las perspectivas de las aplicaciones. Por tal motivo, para aplicaciones en áreas de ingeniería biomédica y física médica (entre otras) estas definiciones quedan muy cortas debido a que un dispositivo que sólo registre la presencia o ausencia de una cantidad física sería más un detector que un sensor. Una definición más adecuada para aplicaciones en dichas áreas es la siguiente “*un dispositivo que responda a una entrada física de interés con una salida grabable, funcionalmente relacionada que por lo general es eléctrica u óptica*” (Jones and Watson, 2010). Dentro del contexto biomédico “*entrada física*” también incluye las cantidades químicas, bioquímicas y biológicas.

En muchas ocasiones las palabras sensor y transductor son empleadas en el contexto de medición de sistemas, generando esto cierto grado de confusión. Una definición aceptada en el ámbito científico y tecnológico de transductor es “*un dispositivo que convierte una forma de energía en otra, siendo esta última, en general, eléctrica*” (Jones and Watson, 2010). Un sensor, por lo general, responde a esta definición y por tanto puede ser descrito como un transductor. De alguna manera, los sensores de cantidades bioquímicas convier-

ten los fenómenos bioquímicos en energía óptica o eléctrica. Sin embargo, un transductor, a diferencia de un sensor, por lo general tiene una salida eléctrica (Jones and Watson, 2010).

En este contexto, podemos decir que un biosensor es un dispositivo analítico que puede detectar especies químicas, biológicas o un microorganismo (Paras, 2003). Utiliza por lo general un elemento de reconocimiento biológico que detecta la presencia de un analito (la especie a ser detectada) y crea una respuesta química o física, la cual, es transformada a una señal eléctrica u óptica. Teniendo estos un amplio rango de aplicaciones como: diagnóstico clínico, desarrollo de fármacos, monitoreo medioambiental, control de calidad de alimentos entre otros.

1.1.2. Elementos básicos de un biosensor

Ahora el objetivo central es describir los elementos básicos involucrados en el biosensado en general. En la Figura 1-1 se muestran las unidades básicas de un biosensor. Se tiene la unidad de muestreo en la cual se introduce el analito que se quiere detectar. A continuación, está la unidad de bioreconocimiento en donde se encuentra el elemento de bioreconocimiento biológico, el cual, reacciona o se une a un analito específico brindando una especificidad única. Este elemento de bioreconocimiento puede ser un anticuerpo, una enzima o incluso células. La unidad de estimulación es muy importante debido a que extrae una respuesta a consecuencia de la biodetección y en general puede ser óptica, eléctrica u otra clase de campo (Paras, 2003). En el proceso de transducción, la respuesta química o física, que se obtiene gracias al bioreconocimiento, se transforma en señales ópticas o eléctricas que son finalmente leídas por la unidad de detección.

Hablando específicamente de biosensores ópticos, la estimulación es en forma de luz. De esta forma, en el proceso de transducción, hay un cambio ya sea en la amplitud (intensidad), polarización, fase o frecuencia de la luz de entrada (McGrath and Scanaill, 2013). En muchos casos, la sensibilidad y selectividad del biosensor se puede mejorar inmovilizando el elemento de biodetección en un elemento óptico tal como un fluoróforo, una fibra óptica, etcétera (Paras, 2003). De hecho, actualmente muchos de los elementos de biodetección empleados en el biosensado vienen conjugados con diversos fluoróforos con la intención de mejorar los parámetros anteriormente mencionados.

El tema de los biosensores lleva un poco más de dos décadas empleándose en el ámbito tecnológico y científico. Los biosensores con respuestas electroquímicas han dominado dichos campos, pero gracias al avance en temas como fibras ópticas y óptica integrada (como por ejemplo canales de guías de onda y ondas plasmónicas superficiales) han hecho a los biosensores ópticos muy atractivos para las aplicaciones anteriormente mencionadas (Paras, 2003).

1.1.3. Bioreconocimiento

Mencionamos anteriormente algunos de los elementos que podrían funcionar como elementos de bioreconocimiento biológico: anticuerpos, enzimas y algunas células. Lo importante de estos elementos es la gran afinidad que tienen con un analito específico. De hecho, esta especificidad del elemento de bioreconocimiento es de gran importancia en el

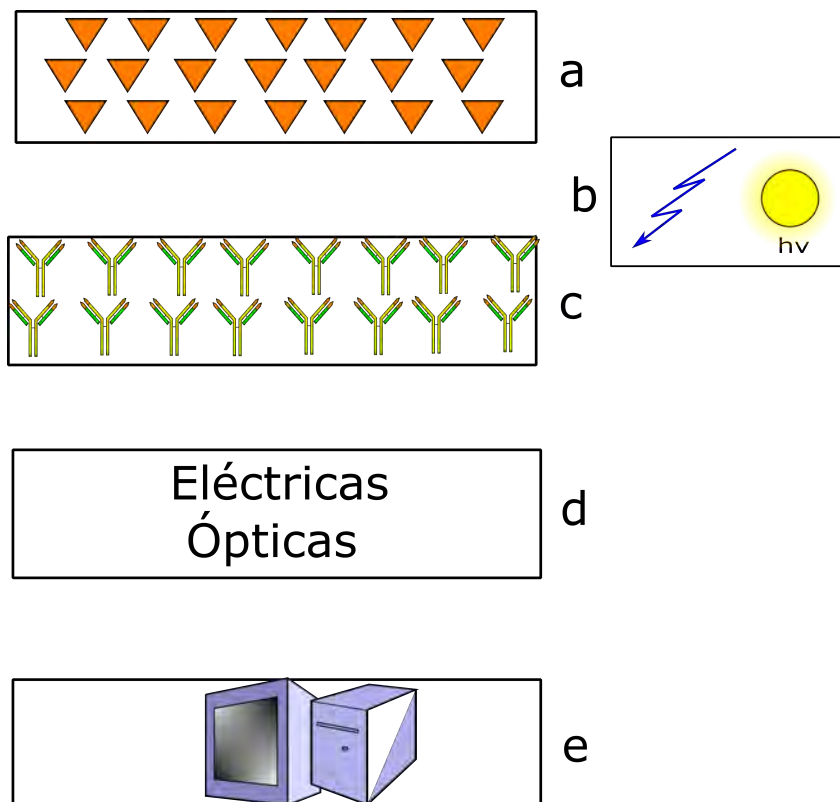


Figura 1-1. Unidades de un biosensor. a) muestreo b) estimulación c) bioreconocimiento d) unidad de transducción e) unidad de detección.

biosensado. A continuación, se describen algunos de los elementos de bioreconocimiento más utilizados, aunque, actualmente, son muchos más los empleados en el área del biosensado como por ejemplo bacteriófagos, péptidos antimicrobianos, polímeros.

Enzimas: son proteínas considerados catalizadores biológicos. Los catalizadores son aquellas sustancias cuya función es acelerar reacciones químicas sin modificarse (Eduardo, 1986). La especificidad de las enzimas hacia su sustrato (la sustancia en la que actúa la enzima) es muy grande. Es decir, que una enzima actúa sobre cierto sustrato específico, el cual, es químicamente modificado para ser convertido en uno o más productos (Paras, 2003). Esta especificidad es lo que hace a las enzimas candidatos adecuados como elementos de bioreconocimiento. Se puede considerar al sustrato y la enzima similar a una llave con su respectiva cerradura, como se muestra en la Figura 1-2a. Los lugares específicos donde los sustratos se adhieren a las enzimas se conocen como sitios activos (Eduardo, 1986). Aparte de su especificidad, la interacción de analitos/sustratos con enzimas puede proveer una transducción óptica mediante la obtención de productos que absorban a diferentes longitudes de onda (Paras, 2003).

Anticuerpos: son proteínas que, gracias a su geometría, se adhieren a determinados antígenos o analitos, más adelante se describirán con detalle. De igual forma a las enzimas, se podría asociar a un anticuerpo como una cerradura la cual puede ser abierta con una única llave (el antígeno), como se muestra en la Figura 1-2b. Gracias a su especificidad, los anticuerpos son candidatos perfectos para actuar como el elemento de bioreconocimiento. También pueden ser marcados con transductores (como por ejemplo un marcador fluorescente) que reportan su interacción con su respectivo antígeno.

Lectinas: también son proteínas las cuales se unen a oligosacáridos y algunas glucoproteínas tales como inmunoglobulinas (Paras, 2003). Por tal motivo, las lectinas sirven como elementos de bioreconocimiento para tales moléculas. Estas proteínas son empleadas en biosensores para la detección de glucosa, en estos casos el analito, donde se conjugan con ciertos fluoróforos que mediante determinados métodos ópticos permiten la detección de niveles altos de glucosa.

ADN: se sabe que ADN (ácido desoxirribonucleico) es una macromolécula de suma importancia biológica debido al hecho de que constituye el depósito fundamental de la información genética (Eduardo, 1986). El ADN se compone de dos cadenas polinucleotídicas helicoidales formando una doble hélice alrededor del eje central (Bruce, 2009; Eduardo, 1986). Las dos hélices se unen por medio de cuatro bases, las cuales, se unen específicamente. Estas bases son adenina, timina, guanina y citosina y se unen de la siguiente manera: la adenina con la timina y la guanina con la citosina. De hecho, es esta especificidad o complementariedad del ADN que lo hace un excelente elemento de bioreconocimiento para detectar pares de bases del ADN y el ARN.

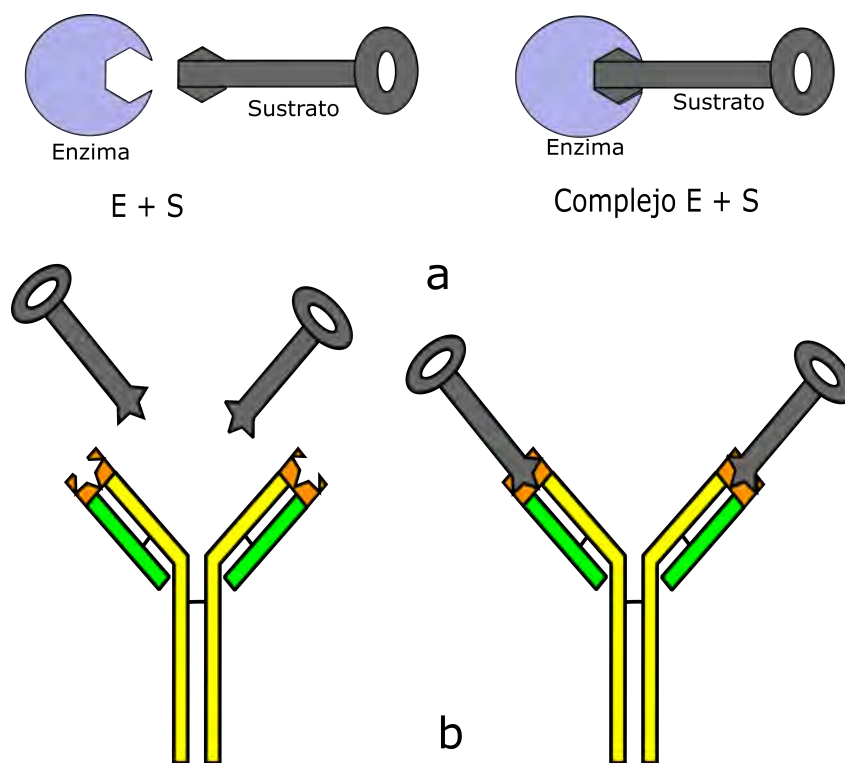


Figura 1-2. Esquema de llave-cerradura para: a) enzimas b) anticuerpos.

1.1.4. Transducción óptica

El proceso de transducción en un biosensor consiste en convertir la actividad biológica que este ha medido por medio del elemento de bioreconocimiento en una señal cuantificable tal como una corriente, un voltaje o una señal óptica (McGrath and Scanail, 2013). Para el caso de biosensores ópticos, hay una gran variedad de manifestaciones ópticas (transducciones) las cuales se resumen en la Tabla 1-1. Como se dijo anteriormente, el proceso de transducción consiste en la variación de algunos parámetros de la luz incidente tales como su fase, su intensidad o su frecuencia. Los cambios en la fase pueden deberse

a cambios en la parte real del índice de refracción que se puede manifestar como un cambio en la polarización de una luz, un cambio en la distribución óptica de campo debido particularmente a una interferencia o en un cambio en las características de propagación como por ejemplo en una fibra óptica (Paras, 2003).

Por otro lado, los cambios en intensidad se derivan de la reflexión, absorción u otros mecanismos de pérdida por transmisión. Los cambios en frecuencia se pueden deber a fenómenos como corrimientos de Stokes, esparcimiento Raman o interacciones ópticas no lineales como por ejemplo generación de segundo armónico (McGrath and Scanail, 2013; Paras, 2003).

Tabla 1-1. Resumen de forma de transducción óptica.

Formas de transducción óptica			
Cambios de fase	Cambios de amplitud		Cambios de frecuencia
Se producen debido a cambios en el índice de refracción	Absorción	Propagación	Debido principalmente a desplazamientos Stokes gracias a diferentes fenómenos como:
	Se deben a cualquier mecanismo de pérdida por transmisión		Fluorescencia, efecto Raman o óptica no lineal

1.1.5. Métodos de detección utilizados en el biosensado

Son muchos los métodos de sensores empleados en la detección de analitos en un biosensor. Por tal motivo, no se puede decir que exista un método preferente dentro del biosensado (Syahir et al., 2015). Algunos de los métodos utilizados en el biosensado son: resonancia de plasmón de la superficie (por sus siglas en inglés *Surface Plasmon Resonance* SPR), espectroscopia de masa, microbalanza de cristal de cuarzo, etiquetado fluorescente, etiquetado de nanopartículas, entre muchas otras más (Paras, 2003). Aunque sean muchos los métodos disponibles, estos se pueden clasificar en dos grupos: los basados en etiquetas y los libres de etiqueta (Syahir et al., 2015).

DetECCIÓN BASADA EN ETIQUETA

Se comprende por etiqueta a una molécula extranjera que está químicamente o temporalmente unida al elemento de bioreconocimiento y los resultados de ese bioreconocimiento pueden potencialmente alterar las propiedades intrínsecas de dicha etiqueta (Syahir et al., 2015). Las etiquetas ya sean fluorescentes, quimioluminiscentes o de nanopartículas frecuentemente involucran enlaces covalentes entre ciertos grupos químicos. En particular, los métodos de detección basados en etiquetas fluorescentes son los más utilizados debido a que son fáciles de manipular, son estables y brindan una buena sensibilidad y resolución (Syahir et al., 2015). En la actualidad, son muchas las etiquetas fluorescentes disponibles tales como puntos cuánticos, pequeñas moléculas orgánicas, diversos fluoróforos hasta diferentes proteínas fluorescentes (Paras, 2003; Syahir et al., 2015). Todas estas etiquetas fluorescentes son biofuncionalizadas para diferentes aplicaciones; haciéndolas excelentes candidatos para aplicaciones en el área de biosensado.

Detección libre de etiqueta

Por otro lado, la detección libre de etiqueta se basa en propiedades biofísicas moleculares tales como índice de refracción (como por ejemplo SPR), peso molecular (como por ejemplo espectroscopia de masa) y carga molecular para monitorear interacciones relacionadas con el bioconocimiento (Syahir et al., 2015). La gran ventaja que tiene este tipo de detección es que se puede realizar en tiempo real. Así vemos que son diversos los métodos de detección que se pueden utilizar y escoger entre uno de ellos depende del tipo de aplicación que se quiera realizar.

1.2. Fenómenos físicos involucrados en el sensado óptico

1.2.1. Fluorescencia

Durante los últimos 30 años el uso de la fluorescencia ha aumentado considerablemente en las ciencias biológicas (Lakowicz, 2006). De hecho, su uso se ha expandido a áreas de bioquímica y biofísica como herramienta fundamental de investigación. En nuestros tiempos, es común encontrar el uso de técnicas de fotoluminiscencia para el desarrollo de investigaciones en diversos campos de la ciencia. Por este motivo, es importante hablar un poco acerca de la fotoluminiscencia, en particular de la fluorescencia.

La fotoluminiscencia se define como la emisión de luz de cualquier sustancia desde estados eléctricamente excitados (Lakowicz, 2006). Formalmente se divide en dos categorías fluorescencia y fosforescencia que dependen de la naturaleza del estado excitado. Una primera definición de la fluorescencia sería la emisión de luz, de una molécula o un átomo, como consecuencia de absorción de energía electromagnética. Esta definición queda un poco corta si queremos diferenciar fluorescencia de fosforescencia. Una mejor definición de fluorescencia sería: la transición de especímenes fotoexcitados desde su primer estado singlete excitado hasta su estado fundamental (Jameson, 2014). En los estados singletes excitados, el electrón, en dicho estado excitado, está apareado (por espín opuesto) con un segundo electrón en el estado fundamental y como consecuencia regresar al estado fundamental es permitido, ocurriendo rápidamente por la emisión de un fotón de menor energía al absorbido. En cambio, la fosforescencia es la emisión de luz desde estados excitados tripletes, en donde el espín del electrón en el estado triplete excitado, tiene la misma orientación que el electrón en el estado fundamental. Los tiempos de vida de la fluorescencia se dan típicamente en nanosegundos gracias al hecho de que las transiciones al estado fundamental son espín permitido en cambio los tiempos de vida de la fosforescencia son del orden de los milisegundos hasta los segundos.

Los procesos que ocurren entre la absorción y la emisión de la luz típicamente son representados en un diagrama de Jablonski. En la Figura 1-3 se muestra uno de estos diagramas en donde se representa los mecanismo de la fluorescencia y la fosforescencia. A temperatura ambiente, la energía térmica no es suficiente para poblar estados vibracionales excitados. Por esta razón, la absorción y emisión de luz, en la mayoría de las veces, se dan desde moléculas con la energía vibracional más baja (Lakowicz, 2006). Cuando se absorbe luz, un fluoróforo es excitado hasta un nivel alto vibracional ya sea de S_1 o S_2 donde (con muy pocas excepciones) el fluoróforo se relaja hasta el nivel vibracional

más bajo de S_1 . Este proceso es conocido como conversión interna y se muestra en la Figura 1-3. Algunas moléculas en el estado S_1 pueden ir a conversión de espín al estado triplete T_1 en un proceso conocido como cruce entre sistemas el cual, es el mecanismo de la fosforescencia (Jameson, 2014; Lakowicz, 2006).

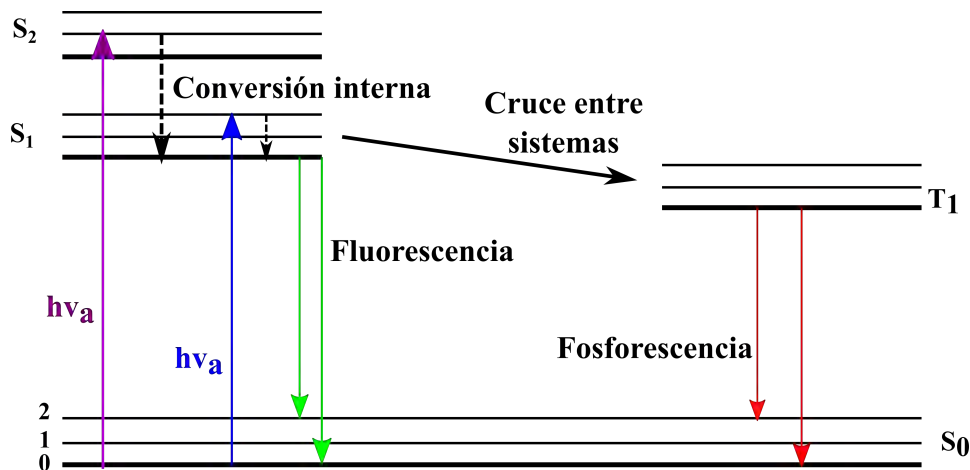


Figura 1-3. Diagrama de Jablonski.

1.2.2. Apagamiento de fluorescencia

El apagamiento de fluorescencia se refiere a cualquier proceso químico y/o físico que disminuya la intensidad de la fluorescencia (Jameson, 2014; Lakowicz, 2006). Son diversos los mecanismos que pueden producir el apagamiento: transferencia de energía, reordenamientos moleculares, apagamiento colisional por dar algunos ejemplos. En particular, estamos interesados en describir en que consiste el apagamiento producido por encuentros colisionales entre fluoróforos y apagadores, el cual, es conocido como apagamiento colisional o dinámico.

Un aspecto importante para que el apagamiento colisional suceda es que debe haber contacto entre el apagador y el fluoróforo (Lakowicz, 2006). Así, cuando ocurre dicho contacto, el fluoróforo regresa al estado fundamental sin la emisión de un fotón y, por lo general, sin que haya un cambio permanente en la molécula. Este es un proceso que depende del tiempo, es decir, que debe transcurrir cierto tiempo para que el apagador entre en contacto con el fluoróforo. También existe otro tipo de apagamiento conocido como apagamiento estático. Este proceso sucede cuando se forman complejos de estado fundamental no-fluorescentes entre el fluoróforo y el apagador (Jameson, 2014; Lakowicz, 2006). Entonces, tanto para el apagamiento dinámico como para el estático, debe haber contacto entre el apagador y el fluoróforo para que sucede dicha disminución de la intensidad de fluorescencia.

1.2.3. Transferencia de energía de resonancia de Förster

Otro de los procesos que tienen lugar durante el estado excitado de un fluoróforo es la transferencia de energía de resonancia de Förster abreviado FRET (por sus siglas en inglés *Förster resonance energy transfer*). Este fenómeno ocurre cuando el espectro de

emisión de un fluoróforo llamado donador se traslapa con el espectro de absorción de otra molécula llamada aceptor (Lakowicz, 2006). De esta forma, el donador, electrónicamente excitado, puede ceder su energía de absorción al aceptor de forma no radiativa por medio de interacciones de largo alcance dipolo-dipolo. Con esto, la teoría utilizada para explicar FRET consiste en modelar un fluoróforo como un dipolo oscilante que puede intercambiar energía con otro dipolo con frecuencias similares (Jameson, 2014; Lakowicz, 2006). En este caso la mecánica clásica es suficiente para explicar este fenómeno.

La transferencia de energía no radiativa ocurre en distancias mucho más grandes que en efectos de solvente de corto rango (Syed, 2009). Como se mencionó anteriormente, el apagamiento dinámico o estático requiere de contacto molecular en cambio en FRET no se requiere de dicho contacto. Por otro lado, el aceptor no necesariamente tiene que ser fluorescente. Puede haber casos donde el aceptor sea fluorescente pero diferente al donador; que el aceptor sea no fluorescente y diferente al donador; que el aceptor sea fluorescente e igual al donador. La tasa de transferencia de energía depende de diferentes parámetros como: el alcance de traslapamiento espectral entre el espectro de emisión del donador con el espectro de absorción del aceptor, la eficiencia cuántica del donador, la orientación relativa de los dipolos del aceptor y el donador y la distancia entre el donador y el aceptor. (Jameson, 2014; Lakowicz, 2006; Syed, 2009). El fenómeno de FRET se manifiesta con una disminución en la intensidad de la fluorescencia (emitida por un fluoróforo) y una reducción del tiempo de vida del estado excitado (Syed, 2009). Por último, la distancia en la cual se transfiere el 50 % de la energía de excitación al aceptor se conoce como la distancia de Förster R_0 y típicamente está entre el rango de 20 a 60 Å (Jameson, 2014; Lakowicz, 2006).

1.2.4. Comparación entre FRET y apagamiento dinámico y estático

Como se describió anteriormente, el apagamiento de fluorescencia se puede dar por medio del fenómeno FRET o por los procesos dinámicos o estáticos. Pero ¿Cómo podemos diferenciar a estos fenómenos? de algún modo ya se ha mostrado un poco su diferencia cuando se argumentó que el apagamiento, tanto el dinámico como el estático, requiere de contacto molecular a diferencia de FRET que no requiere de dicho contacto. Como consecuencia, el alcance del apagamiento (dinámico y estático) es sensible a factores moleculares que afectan la probabilidad de contacto como por ejemplo las interacciones entre cargas (Lakowicz, 2006). En contraste, como FRET no requiere de contacto molecular, este fenómeno es debido a interacciones a través del espacio y no es afectado por factores moleculares.

En pocas palabras, la principal diferencia es que el apagamiento (dinámico o estático) es debido a interacciones de corto alcance entre el fluoróforo y el apagador mientras que FRET se debe a interacciones dipolares de largo alcance entre el donador y el aceptor (Jameson, 2014; Lakowicz, 2006). Cuando el apagador entra en contacto con el fluoróforo excitado, su electrón o electrones excitados regresa al estado fundamental y como consecuencia el fluoróforo no puede emitir y la energía es disipada como calor. Como en el apagamiento (dinámico y estático) se requiere de contacto molecular, se permite interacción entre las nubes electrónicas de ambas moléculas. Estas interacciones entre nubes electrónicas se conocen habitualmente como intercambio de electrones o interacciones de

intercambio debido a que los electrones se pueden mover entre las moléculas a estas cortas distancias (Jameson, 2014). En cambio, si consideramos una distancia de Förster de 30 Å, esta sería demasiada grande para que haya una interacción directa entre las nubes electrónicas. Entonces se puede concluir diciendo que FRET es eficiente en distancias relativamente largas mientras que el apagamiento (dinámico o estático) es eficiente en distancias relativamente cortas, es decir, cuando las nubes electrónicas están dentro de los 2 Å (Jameson, 2014; Lakowicz, 2006; Syed, 2009).

1.3. Anticuerpos y antígenos

El sistema inmunológico es de fundamental importancia en los seres vivos para combatir agentes patogénicos, tales como bacterias y virus, que se encuentran en el medio ambiente. Uno de los principales componentes involucrados en el sistema inmunológico son los anticuerpos, los cuales, son producidos por celular conocidas como linfocitos B y T (Parhan, 2016). Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, son glucoproteínas que se encuentran en el suero, los líquidos tisulares y las membranas celulares (Male, 2014). Su principal función es ayudar a eliminar antígenos, los cuales son sustancias que generan dichos anticuerpos causando así una respuesta inmune. Estos anticuerpos son específicos, es decir, que solo pueden unirse a un solo antígeno. En la mayoría de los mamíferos hay 5 diferentes tipos de anticuerpos: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD los cuales se pueden diferenciar por su secuencia de aminoácidos, su carga, su tamaño y el contenido de glúcidos (Male, 2014). Estos anticuerpos se pueden expresar ya sea como receptores ligados a la membrana de los linfocitos B o como moléculas solubles en el suero y líquidos tisulares, los cuales son secretados por las células plasmáticas. En la Figura 1-4 se muestra estos tipos de anticuerpos.

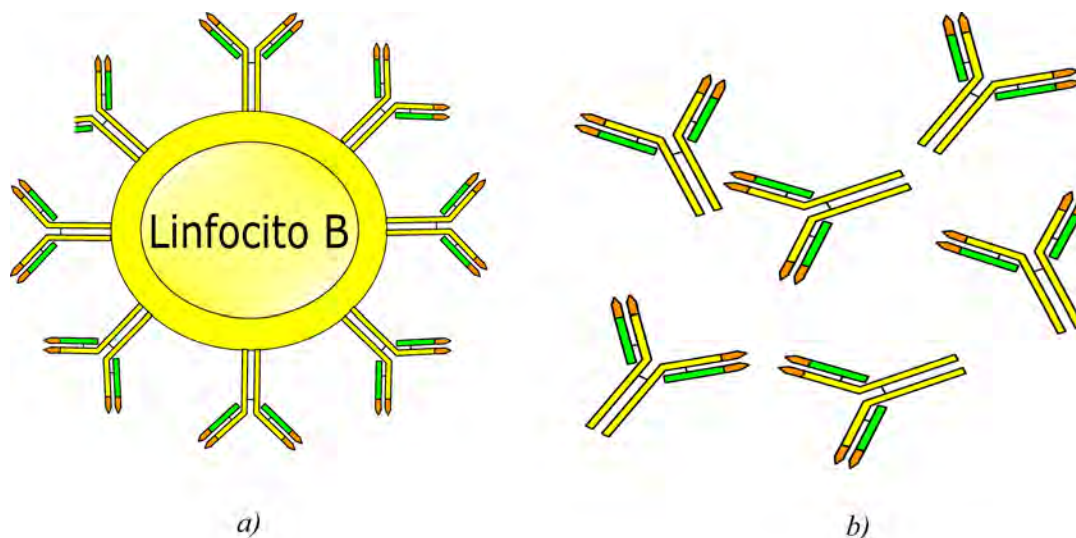


Figura 1-4. Anticuerpos de membrana; b) anticuerpos solubles.

De los isotipos de anticuerpos que hay, la IgG es la más abundante en el suero humano. En cuanto a su estructura, los anticuerpos consisten en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas livianas idénticas. Tienen forma de “Y” en donde cada brazo se compone

de una cadena liviana unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro. De esta forma, se puede decir que su estructura se compone de tres partes: dos de estas son idénticas relacionadas con la unión del antígeno conocidas como Fab (*fragment antigen binding*; fragmento de unión al antígeno) y la tercera es la Fc (fragmento cristalizante) en donde el anticuerpo se une a las proteínas séricas y a los receptores de la superficie celular (Parhan, 2016). Los brazos de los anticuerpos tienen zonas variables (como se ve en la Figura 1-5), los cuales cambian mucho de un anticuerpo a otro confiriéndoles su especificidad única. En la Figura 1-5 se muestra las componentes principales de los anticuerpos.

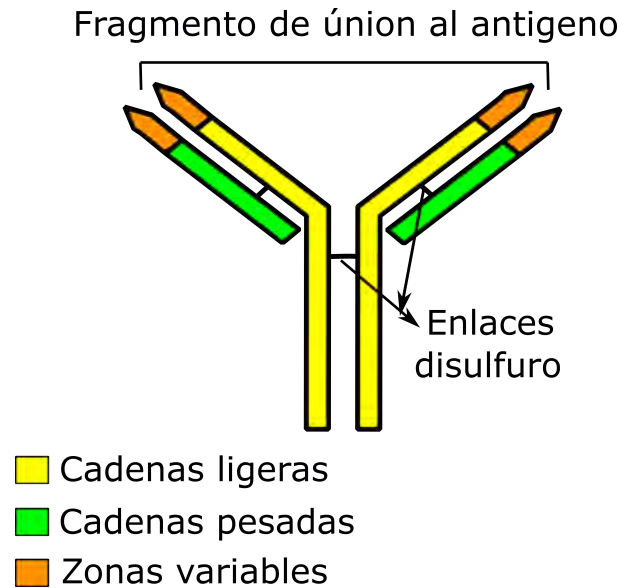


Figura 1-5. Estructura de un anticuerpo.

La interacción entre el antígeno y el anticuerpo es el resultado de la formación de enlaces no covalentes múltiples tales como: interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas hidrófobas y fuerzas de van der Waals (Male, 2014). Estos enlaces no son tan intensos como los covalentes, pero al presentarse juntos confieren una interacción de alta afinidad. De hecho, las fuerzas en conjunto de atracción y repulsión tienen un importante papel en la determinación de la especificidad de los anticuerpos y la capacidad de estos entre discriminar moléculas con estructuras parecidas (Male, 2014).

1.4. Fluoresceína y FITC

La fluoresceína es uno de los fluoróforos más utilizados en el campo del diagnóstico médico e investigación biológica (Lakowicz, 2006). Típicamente, este fluoróforo tiene un máximo de absorción en los 494 nm y un máximo de emisión en 512 nm (Johnson and Spence, 2010). Uno de sus derivados más conocidos es el isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína 5-isotiocianato, por sus siglas en inglés FITC (*Fluorescein IsoThioCyanate*). Este fluoróforo derivado, generalmente tiene un máximo de absorción de 490 nm y máximo de emisión de 520 nm (Johnson and Spence, 2010). Frecuentemente es utilizado para el marcado de diversas biomoléculas como inmunoglobulinas, lectinas, diversas proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, polinucleótidos, polisacáridos, etcétera. Las principales ventajas que ofrece la fluoresceína y sus derivados son buena solubilidad en agua, una excelente

eficiencia cuántica fluorescente y una absorción relativamente alta (Johnson and Spence, 2010). La estructura del FITC es igual a la de la fluoresceína con la única diferencia de que un grupo isotiocianato (es el grupo químico conformado por $-N=C=S$) reemplaza un átomo de hidrogeno en uno de los anillos que componen a la fluoresceína (Johnson and Spence, 2010; Lakowicz, 2006). En la Figura 1-6 se muestra esta diferencia en la estructura de la fluoresceína y el FITC.

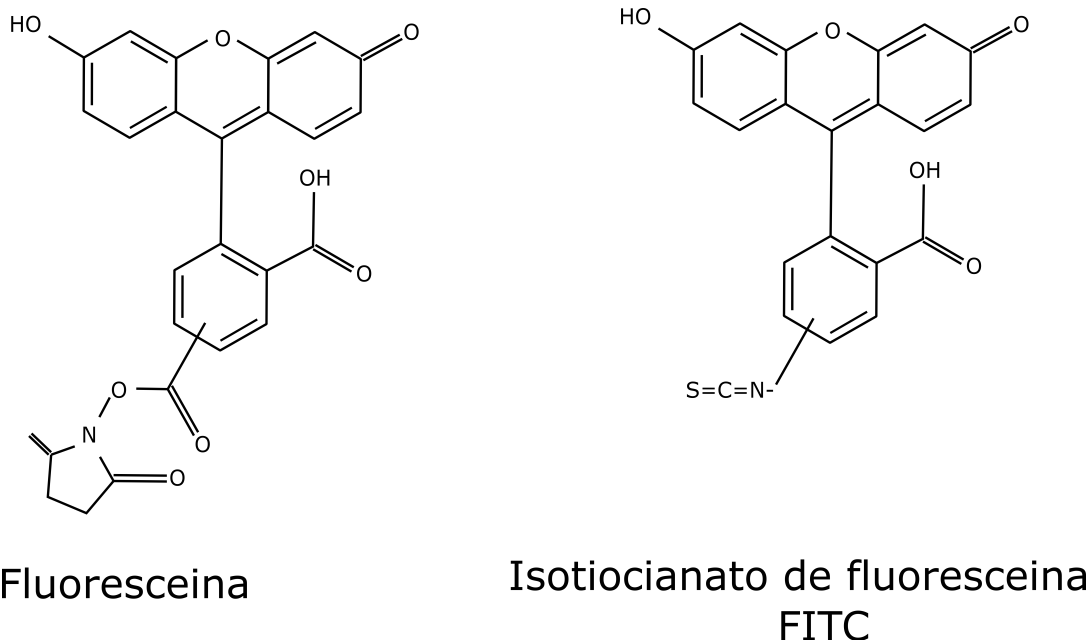


Figura 1-6. Estructura química de la Fluoresceína y el FITC.

De igual forma, estos fluoróforos tienen algunas desventajas tales como: una dependencia de su fluorescencia con el PH (para PH debajo de 8 su fluorescencia es más baja) y una tasa de fotoblanqueo relativamente alta (Johnson and Spence, 2010). Aunque, en algunas aplicaciones, estas desventajas son aprovechadas para obtener medidas cuantitativas, como por ejemplo en estudios relacionados con la dinámica de la membrana plasmática (Lakowicz, 2006).

1.5. Grafeno y su derivado: óxido de grafeno

El grafeno se define como una capa bidimensional de átomos de carbono enlazados mediante una hibridación sp^2 dispuestos en una red hexagonal (Pumera, 2010; Toshiaki and Tsuneya, 2013). Cuando se tienen varias capas de grafeno una encima de la otra se forma el grafito, por esta razón, se dice que el grafeno es la unidad fundamental del grafito, como se muestra en la Figura 1-7a. Desde su descubrimiento, ha atraído la atención de varios campos como la física, la química y la ciencia de materiales debido a sus increíbles propiedades. De hecho, no solo ha sido un tema de la ciencia fundamental, sino que se ha convertido en un objetivo desafiante en las aplicaciones de vanguardia. En el año 2010, el premio nobel de física fue otorgado a los científicos Andre Geim y Konstantin Novoselov por sus contribuciones teóricas para el entendimiento de este novedoso material. Las propiedades electrónicas y electroquímicas del grafeno, y sus derivados, dependen fuertemente de su estructura (Pumera, 2010). Es importante mencionar que debido a que cada

capa de este material es finita, este material se compone de una capa basal y de orillas. De hecho, hay dos tipos de orillas: orillas en zigzag y orillas armchair como se muestra en la Figura 1-7b. Esta clase de configuraciones tiene una profunda influencia en las propiedades electrónicas del grafeno y sus derivados (Pumera, 2010; Toshiaki and Tsuneya, 2013). El grafeno exhibe cero band gap y puede ser clasificado como un semiconductor de cero band gap (Pumera, 2010).

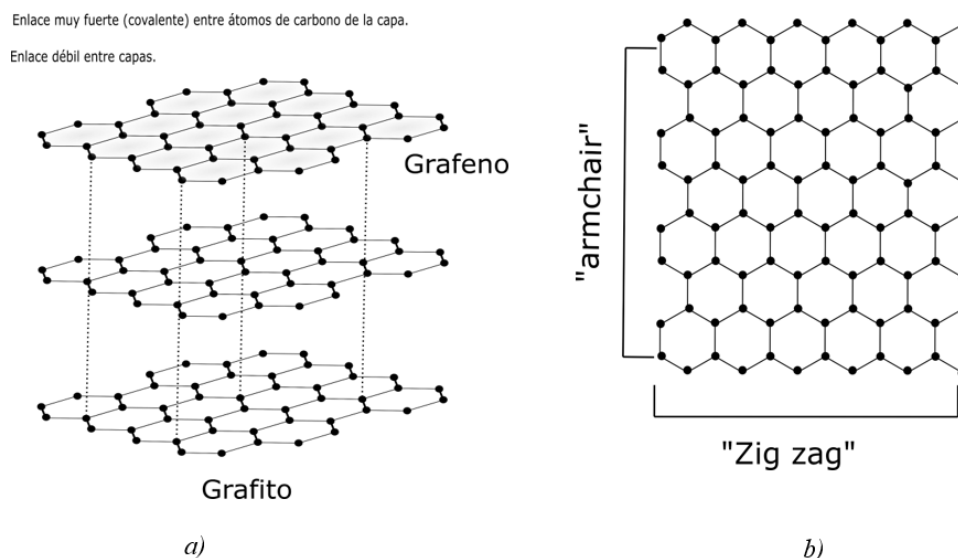


Figura 1-7. (a) grafeno y grafito; (b) orillas zigzag y armchair.

El grafeno puede ser oxidado por medio de fuertes oxidantes como el permanganato de potasio (KMnO_4) o con ácido sulfúrico (H_2SO_4) obteniendo así el óxido de grafeno (*Graphene Oxide* o GO por sus siglas en inglés) (Toshiaki and Tsuneya, 2013). De esta forma, la oxidación produce una capa de grafeno aleatoriamente enlazada con grupos funcionales que contienen átomos de oxígeno. Los átomos de carbono se enlazan covalentemente con los átomos de oxígeno, pasando del estado hibridado sp^2 al estado hibridado sp^3 (Dimiev Ayrat M. and Eigler Siegfried, 2016). Estos grupos funcionales de oxígeno pueden considerarse como defectos introducidos en la capa ideal de grafeno convirtiendo la estructura electrónica de un semiconductor de cero band gap a un aislante. El GO adquiere propiedades únicas que el grafeno no tiene tales como: hidrofiliidad y un band gap sintonizable, el cual es responsable de las propiedades ópticas y electrónicas de este material (Dimiev Ayrat M. and Eigler Siegfried, 2016; Toshiaki and Tsuneya, 2013). La proporción atómica C/O varía hasta cierto punto, pero para muestras de GO lo suficientemente oxidado, esta proporción es aproximadamente de 2:1 (Pumera, 2010). Sigue teniendo un átomo de espesor con algunos oxígenos funcionales saliendo del plano en ciertos puntos. Al igual que el grafeno, tiene orillas que varían de nanómetros o incluso micrómetros, debido a que se acumulan más átomos tanto de carbono como de oxígeno. Este material, solo puede existir en solución líquida en donde es completamente exfoliado en capas y, además, dichas capas, están cargadas negativamente debido a la formación de una doble capa eléctrica en la interfaz GO/agua (Dimiev Ayrat M. and Eigler Siegfried, 2016). Por otro lado, su composición química depende tanto de su estructura como del ambiente en donde se encuentre (Dimiev Ayrat M. and Eigler Siegfried, 2016; Toshiaki and Tsuneya, 2013). De hecho, su estructura química no está completamente entendida

y sigue siendo estudiada actualmente.

Gracias a su forma plana y estructura química, el grafeno tiene algunas ventajas respecto a otros nanomateriales para aplicaciones en el área de biosensado. Por ejemplo, el espesor atómico de una capa y su alta relación superficie-volumen hacen que este material sea muy sensible a los cambios ambientales locales, siendo importante candidato para el mejoramiento de la sensibilidad de detección de analitos, aspecto muy importante en el rendimiento de un biosensor (Morales-Narváez et al., 2016). Además, el grafeno y el GO pueden adherirse muy bien con biomoléculas por medio de interacciones hidrofóbicas y apilamiento $\pi - \pi$ mostrando así una excelente biocompatibilidad (Morales-Narváez and Merkoçi, 2012). Estudios teóricos y experimentales han demostrado que el grafeno y el GO son apagadores altamente eficientes para una gran variedad de fluoróforos siendo excelentes candidatos para el desarrollo de biosensores basados en FRET (Morales-Narváez and Merkoçi, 2012; Wang et al., 2011). En resumen, debido a las excelentes propiedades del grafeno y sus derivados, tales como una estructura química y electrónica heterogénea, la capacidad de procesarse en suspensión acuosa y la posibilidad de sintonizarse como aislante, semiconductor o semimetal; los biosensores que se basan en grafeno o sus derivados tienen una gran ventaja respecto a los biosensores que se basan en nanomateriales (Morales-Narváez et al., 2016). En la figura 1-8 se muestra el aspecto del GO y una imagen de las capas de este material.

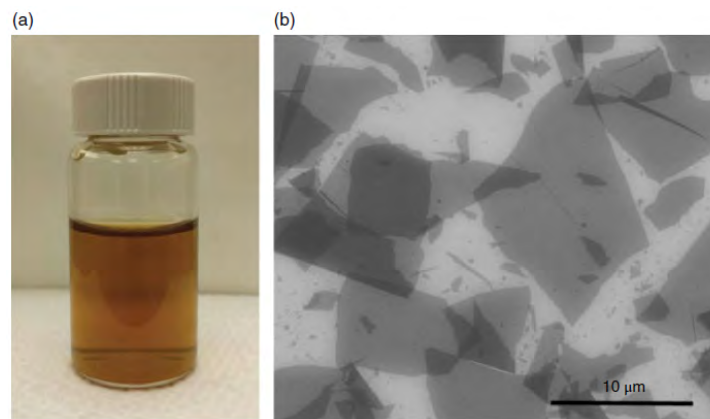


Figura 1-8. (a) fotografía de GO en su verdadera forma 2D (b) imagen de microscopía electrónica de barrido de capas de GO. Adaptado con permiso de “(Dimiev Ayrat M. and Eigler Siegfried, 2016). Derechos de autor [2016], Wiley”.

1.6. Referencias

- Bruce, A., 2009. Essential cell biology, 3rd ed. Garland Science, Estados Unidos.
- Dimiev Ayrat M., Eigler Siegfried, 2016. Graphene Oxide: Fundamentals and Applications, 1st ed. John Wiley & Sons, Reino Unido.
<https://doi.org/10.1002/9781119069447>
- Eduardo, R., 1986. biología celular y molecular, 11th ed. El Ateneo, Argentina.
- Jameson, D., 2014. Introduction to Fluorescence, 1st ed. CRC Press, Estados Unidos.

- Johnson, L., Spence, M., 2010. *The Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11th ed. Life Technologies.
- Jones, D., Watson, J., 2010. *Biomedical Sensors*. Momentum Press, Estados Unidos.
- Lakowicz, J., 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. Springer, Estados Unidos. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Male, D., 2014. *Inmunología*, 8th ed. Elsevier, España.
- McGrath, M.J., Scanaill, C.N., 2013. Sensing and Sensor Fundamentals, in: McGrath, M.J., Scanaill, C.N. (Eds.), *Sensor Technologies: Healthcare, Wellness, and Environmental Applications*. Apress, Berkeley, CA, pp. 15–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4302-6014-1_2
- Morales-Narváez, E., Baptista-Pires, L., Zamora-Gálvez, A., Merkoçi, A., 2016. Graphene-Based Biosensors: Going Simple. *Adv. Mater.* 29, 1604905. <https://doi.org/10.1002/adma.201604905>
- Morales-Narváez, E., Merkoçi, A., 2012. Graphene Oxide as an Optical Biosensing Platform. *Adv. Mater.* 24, 3298–3308. <https://doi.org/10.1002/adma.201200373>
- Paras, P., 2003. *Introduction to Biophotonics*, 1st ed. John Wiley & Sons, United States of America.
- Parhan, P., 2016. *Inmunología*, 4th ed. El Manual Moderno, México.
- Pumera, M., 2010. Graphene-based nanomaterials and their electrochemistry. *Chem. Soc. Rev.* 39, 4146–4157. <https://doi.org/10.1039/C002690P>
- Syahir, A., Usui, K., Tomizaki, K., Kajikawa, K., Mihara, H., 2015. Label and Label-Free Detection Techniques for Protein Microarrays. *Microarrays* 4. <https://doi.org/10.3390/microarrays4020228>
- Syed, A., 2009. *An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)*.
- Toshiaki, E., Tsuneya, A., 2013. *Physics and Chemistry of Graphene*, 1st ed. CRC Press.
- Wang, P., Liu, Q., 2011. Introduction, in: Wang, P., Liu, Q. (Eds.), *Biomedical Sensors and Measurement*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–15. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19525-9_1
- Wang, Y., Li, Z., Wang, J., Li, J., Lin, Y., 2011. Graphene and graphene oxide: bio-functionalization and applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 29, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.01.008>

Capítulo 2

Biosensores ópticos basados en Grafeno: Estado del arte

El grafeno ha sido ampliamente utilizado en los últimos años en el desarrollo de biosensores que se basan en enfoques ópticos debido a sus propiedades físicas y químicas. En este capítulo, se hace una revisión del papel que ha tenido el grafeno y materiales derivados en el mejoramiento de la sensibilidad de los biosensores ópticos. De igual forma, se discuten las ventajas que tienen cada una de las diferentes técnicas ópticas en el área de biosensado, la forma como funcionan dichos biosensores y sus respectivas potenciales aplicaciones en diagnóstico médico, control de tóxicos medioambientales y detección de bacterias en alimentos.

2.1. Biosensores con enfoques fotoelectroquímicos

El proceso fotoelectroquímico se refiere a la conversión de fotones a electricidad que resulta de la separación de cargas y subsecuentemente de la transferencia de cargas justo después de la absorción de fotones durante la irradiación (Devadoss et al., 2015). Esta es una herramienta analítica de bajo costo que involucra reacciones de transferencia de carga entre un material fotoactivo, el analito y un electrodo bajo irradiación de luz. Las fuentes de luz en estos métodos de detección fotoelectroquímico se utilizan como agentes de excitación mientras que la corriente se mide como la señal de detección de salida. En este proceso, son tres los eventos involucrados 1) la absorción de la luz por medio de un semiconductor recolector de luz, 2) generación de portadores fotoexcitados (carga) de electrones e^- y agujeros h^+ y 3) la separación de los portadores fotoexcitados (carga) a ciertas terminales electrónicas (Devadoss et al., 2015). En un biosensor fotoelectroquímico típico, la presencia de la biomolécula objetivo (analito) induce un aumento en la fotocorriente tras la oxidación. De esta forma, la fotocorriente generada es directamente proporcional a la cantidad de analito.

Uno de los aspectos más importantes y destacados en los biosensores basados en grafeno con enfoques fotoelectroquímicos es la gran sensibilidad que ofrecen (Devadoss et al., 2015). La gran mayoría han tenido aplicaciones clínicas como: la detección de diferentes tipos de cánceres (Y. Zhang et al., 2013; Zhang et al., 2016), detección de tumores (Zhang et al., 2014) y algunos para aplicaciones de control medioambiental como por ejemplo la

detección de la toxina microcystin-LR (MC-LR) (Tian et al., 2012). Este es un reciente método analítico empleado para ensayos biológicos rápidos y con alto rendimiento (Zhang et al., 2016). La gran mayoría de quienes utilizan este enfoque reportan límites de detección del orden de pg mL^{-1} y una gran especificidad, destacando que esta clase de enfoque es ventajosa para aplicaciones de biosensado.

Un biosensor fotoelectroquímico fue construido para la detección del antígeno de carcinoma de células escamosas (el segundo cáncer de piel más frecuente de todos) en el cual se utilizaron compuestos de sulfuro de bismuto (Bi_2S_3) como los materiales fotoactivos, luminol como productor de quimioluminiscencia y óxido de grafeno reducido rGO (por sus siglas en inglés reduced graphene oxide) como etiquetas amplificadoras de la respectiva señal (Zhang et al., 2016). Para evitar sitios en donde se puedan dar enlaces no específicos, utilizaron peroxidasa de rábano picante. El óxido de rGO actúa como un aceptor, mientras que el luminol como donador, desencadenando el fenómeno de transferencia de energía de resonancia quimioluminiscente entre el rGO y el luminol. Se reporta que esta novedosa estrategia permite un mayor rendimiento analítico con un límite de detección de 0.21 pg mL^{-1} manteniéndose una amplia relación lineal y con buena especificidad.

Para la detección del antígeno carcinoembrionario fueron fabricados dos biosensores fotoelectroquímicos. En el primero se utiliza un complejo de nanopapel compuesto de óxido de titanio TiO_2 y grafeno como plataforma de biosensado, la cual, gracias al excelente transporte de electrones del grafeno, mejora la fotocorriente generada haciéndola una prometedora plataforma de biosensado fotoelectroquímica con buena biocompatibilidad, como se muestra en la Figura 2-1 (Y. Zhang et al., 2013). En el segundo, el grafeno se utiliza como agente de amplificación de señal de la fotocorriente facilitando el transporte de electrones (fotogenerados por nanopartículas de plata) hasta la superficie de biosensado compuesta de óxido de titanio, manganeso y sulfuro de cadmio CdS: Mn/TiO_2 , como se observa en la Figura 2-2 (Song et al., 2016). El primer biosensor descrito, muestra un límite de detección mucho menor (0.28 pg mL^{-1}) comparado con el segundo (1.0 pg mL^{-1}).

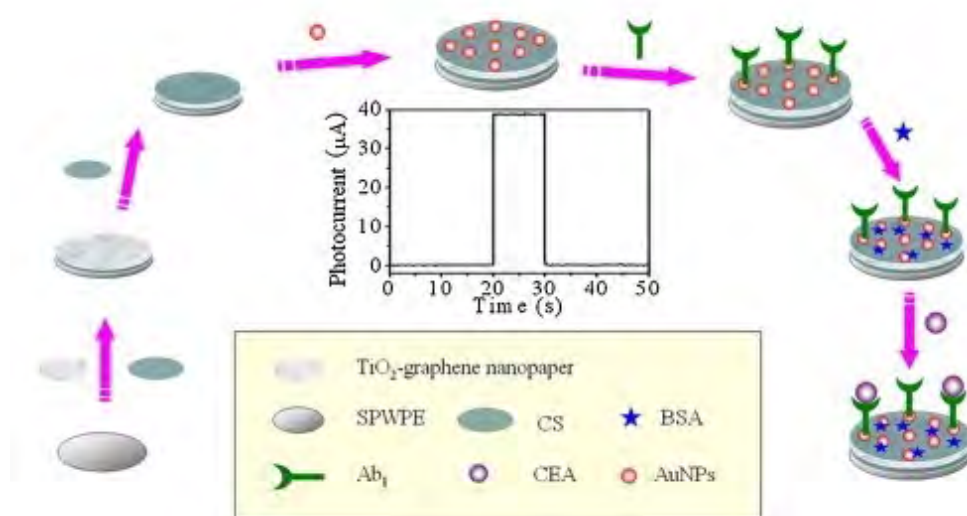


Figura 2-1. Principio de funcionamiento del biosensor basado de nanopapel compuesto de óxido de titanio TiO_2 y grafeno. La presencia del GO mejora la fotocorriente generada. Adaptado con permiso de "(Y. Zhang et al., 2013). Derechos de autor [2013], Elsevier".

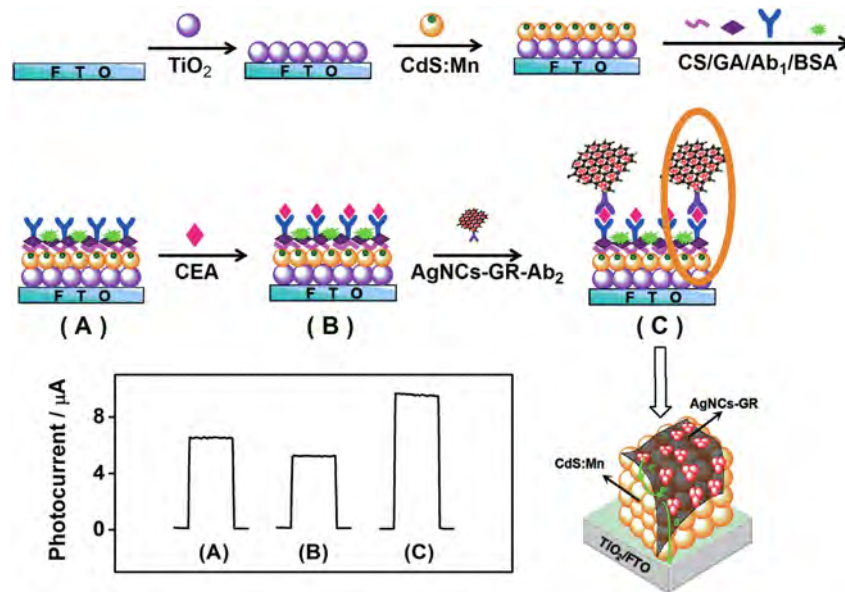


Figura 2-2. Principio de funcionamiento de biosensor basado en grafeno como agente amplificador de la señal. Adaptado con permiso de "(Song et al., 2016). Derechos de autor [2016], Elsevier".

Se ha reportado un interesante desarrollo de un biosensor fotoelectroquímico para la detección de antígenos de carbohidratos asociados a tumores de mama Tn como modelo para la detección ultrasensible de anticuerpos contra dichos antígenos Tn (Zhang et al., 2014). Materiales como el grafeno y el óxido de grafeno se utilizaron durante la construcción del biosensor con el objetivo de mejorar la sensibilidad de esta propuesta ya que cuando estos materiales están presentes, la fotocorriente aumenta en el biosensor (Zhang et al., 2014). El límite de detección (0.1 pg mL^{-1}) reportado para este biosensor, es uno de los más bajos para los biosensores fotoelectroquímicos encontrados. De igual forma, se reporta que este método fotoelectroquímico es 5 órdenes de magnitud más sensitivo que los métodos tradicionales de glicoarreglo.

Para aplicaciones relacionadas con tóxicos, se desarrolló un biosensor fotoelectroquímico para la determinación de la toxina microcystin-LR (MC-LR) (Tian et al., 2012). Como materiales activos se utilizaron híbridos de grafeno y óxido de cadmio (grafeno-CdS). El anticuerpo MC-LR se inmovilizó en la superficie de un electrodo modificado con CdS-grafeno para la detección del MC-LR con base a las propiedades únicas de los híbridos de CdS-grafeno. El límite de detección para este biosensor fue $0.021 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ y puede ser aplicado para determinar MC-LR en muestras de agua ambiental. En la Tabla 2-1 se resumen los aspectos más importantes de estos biosensores fotoelectroquímicos.

2.2. Biosensores con enfoque en apagamiento de Fotoluminiscencia

Los biosensores de apagamiento de fluorescencia se basan en el fenómeno de transferencia de energía de resonancia fluorescente FRET donde se involucra un donador y un grupo aceptor con transferencia electrónica de energía entre ellos que se ve afectada como resultado del bioconocimiento (Paras, 2003). Este proceso ocurre cuando el espectro de emisión del donador se traslapa con el espectro de absorción del aceptor. Así, cuando se

Tabla 2-1. Aspectos destacados para cada propuesta de biosensor basado en grafeno con enfoques fotoelectroquímicos.

Tipo de grafeno	Propiedades destacadas	Analito	Límite de detección	Ref
Grafeno	El modo de activación de la señal proporciona una sensibilidad 2,48 veces mayor en comparación con el modo de desactivación de la señal	antígeno carcinoembrionario	1.0 pg mL ⁻¹	(Song et al., 2016)
Óxido de grafeno reducido rGO	La emisión quimioluminiscente inducida actúa como una fuente de luz interna para excitar materiales fotoactivos	carcinoma de células escamosas	0.21 pg mL ⁻¹	(Zhang et al., 2016)
Óxido de grafeno GO y grafeno	El método PEC es más sensible (5 órdenes de magnitud) que el método tradicional de glicoarreglo	Antígeno de carbohidratos asociados a tumores de mama Th	1.0 x10 ⁻¹³ g mL ⁻¹	(Zhang et al., 2014)
Grafeno	Una excelente biocompatibilidad del nanopapel	antígeno carcinoembrionario	0.28 pg mL ⁻¹	(Y. Zhang et al., 2013)
Grafeno	Determinación libre de etiquetas	MC-LR	0.021 μg mL ⁻¹	(Tian et al., 2012)

produce el bioreconocimiento (tal como la asociación de anticuerpo-antígeno) se producen cambios en la intensidad de fluorescencia que actúa como indicador de que se produjo dicho bioreconocimiento. Este fenómeno se describe con más detalle en la sección 1.2.

Los biosensores basados en apagamiento de fluorescencia son dispositivos fáciles de usar, de bajo costo y brindan una buena selectividad (Paras, 2003). Algunas de las aplicaciones realizadas bajo este método incluyen las clínicas como: la detección de diferentes tipos de anticuerpos como IgG (Shirai et al., 2016; Zamora-Gálvez et al., 2018), IgM (Shirai et al., 2017), entre otros; la detección de patógenos como *Escherichia Coli* (Chee-veewattanagul et al., 2017; Morales-Narváez et al., 2015); y la detección de algunos tóxicos como la toxina microcistina-LR (MC-LR) (Liu et al., 2012). La fluorescencia hoy en día es uno de los métodos más empleados en el área del biosensado óptico debido a la alta sensibilidad de la detección que ofrece (Paras, 2003).

Se ha propuesto un biosensor para la detección de inmunoglobulina M (IgM) que se basa en el apagamiento de fluorescencia (Shirai et al., 2017). La plataforma de biosensado de esta propuesta consiste en un hidrogel que contiene GO y de un arreglo de microcanales de polidimetilsiloxano el cual tiene un recubrimiento de polietilenglicol. De esta forma, en ausencia del analito, el anticuerpo (libre) marcado fluorescentemente se adhiere con éxito al hidrogel que contiene al GO provocando así la extinción de fluorescencia debido al fenómeno FRET reportando una alta eficiencia, aproximadamente del 90 % (Shirai et al., 2017). Cuando el analito está presente, la formación de inmunocomplejos analito-anticuerpo no se adhieren a la superficie de biosensado y como consecuencia la intensidad de fluorescencia se mantenía (Shirai et al., 2017). El límite de detección reportado para este biosensor fue de 0.29 μg mL⁻¹. En la Figura 2-3 se muestra el principio de funcionamiento de esta propuesta de biosensado.

Para la detección de la inmunoglobulina G (IgG) se desarrolló un biosensor compuesto por un recubrimiento de polietilenglicol (PEG) que contiene dos clases de anticuerpo:

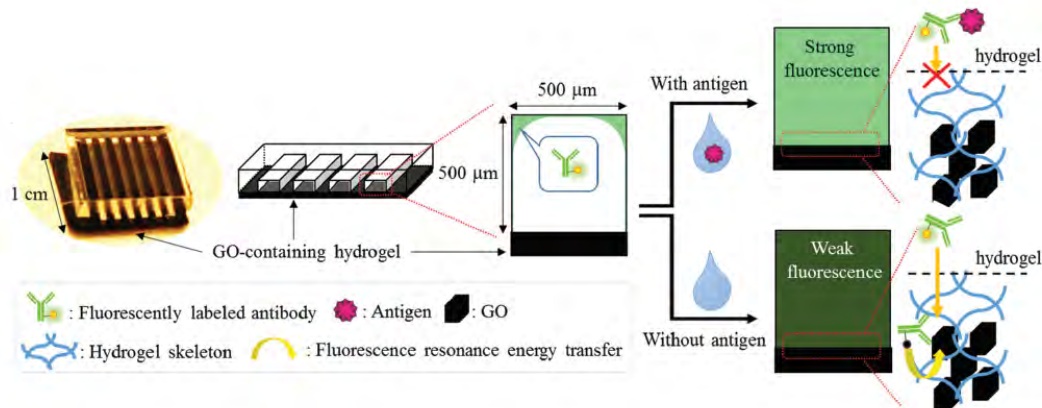


Figura 2-3. Principio de funcionamiento del biosensor basado hidrogel y GO. Cuando el analito está presente, no hay un apagamiento de la intensidad de fluorescencia. Adaptado con permiso de "(Shirai et al., 2017). Derechos de autor [2017], RSC".

uno conjugado con GO y el segundo conjugado con un fluoróforo. Cuando está presente el analito, se forman complejos analito-anticuerpo tipo sándwich ocasionando el apagamiento de fluorescencia debido al fenómeno FRET entre el anticuerpo conjugado con el fluoróforo y el anticuerpo conjugado con GO (Shirai et al., 2016). De esta forma, la concentración del analito es proporcional al nivel de apagamiento de fluorescencia, es decir, entre mayor concentración más apagamiento. En la Figura 2-4 se muestra el principio de funcionamiento de esta propuesta. El límite de detección reportado es de $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para un tiempo de reacción aproximadamente de 1 minuto, destacando ser uno de los métodos de biosensado más rápidos jamás reportados (Shirai et al., 2016).

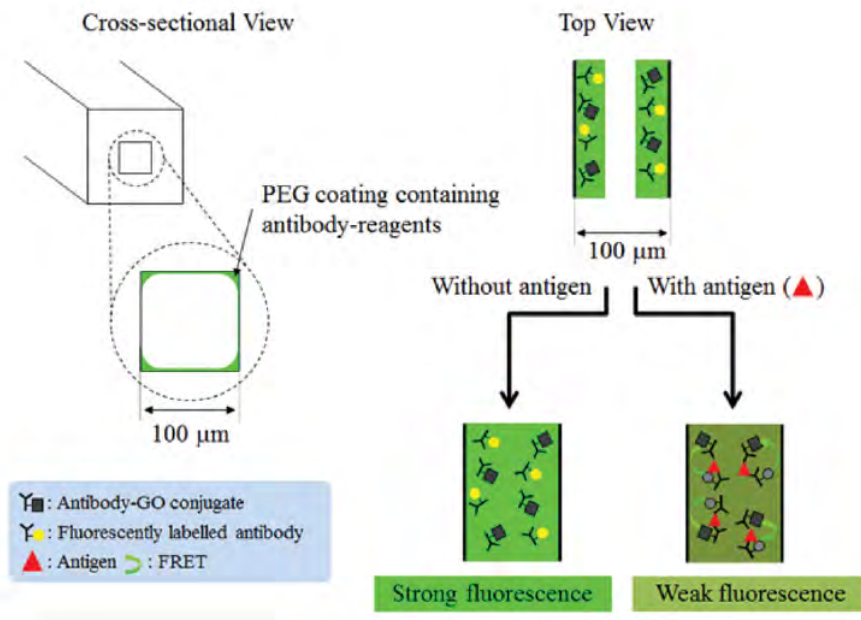


Figura 2-4. Principio de funcionamiento del biosensor descrito. En presencia del analito, hay un apagamiento de la intensidad de fluorescencia debido a la formación de complejos tipo sándwich. Adaptado con permiso de "(Shirai et al., 2016). Derechos de autor [2016], RSC".

Un biosensor de flujo lateral fue desarrollado e investigado como una posible plataforma

universal para detección de proteínas usando la inmunoglobulina G como proteína modelo (Zamora-Gálvez et al., 2018). Cuando el analito es añadido, es selectivamente capturado por anticuerpos conjugados con perlas de sílica y gracias a la capilaridad fluye hasta la línea de prueba donde forman inmunocomplejos tipo sándwich con anticuerpos conjugados con puntos cuánticos en dicha línea de prueba (Zamora-Gálvez et al., 2018). El GO es añadido como agente revelador debido a que cuando se forman los inmunocomplejos tipo sándwich no se presenta un apagamiento de fluorescencia mientras que la fluorescencia de los anticuerpos conjugados con puntos cuánticos que no formaron inmunocomplejos son apagados debido al fenómeno FRET entre los puntos cuánticos y el GO. En la Figura 2-5 se muestra el principio de funcionamiento de esta propuesta de biosensado. Se reporta que el dispositivo propuesto alcanza un límite de detección de 1.35 ng mL^{-1} en tampón estándar mientras que en suero humano alcanza un límite de detección de 6.30 ng mL^{-1} .

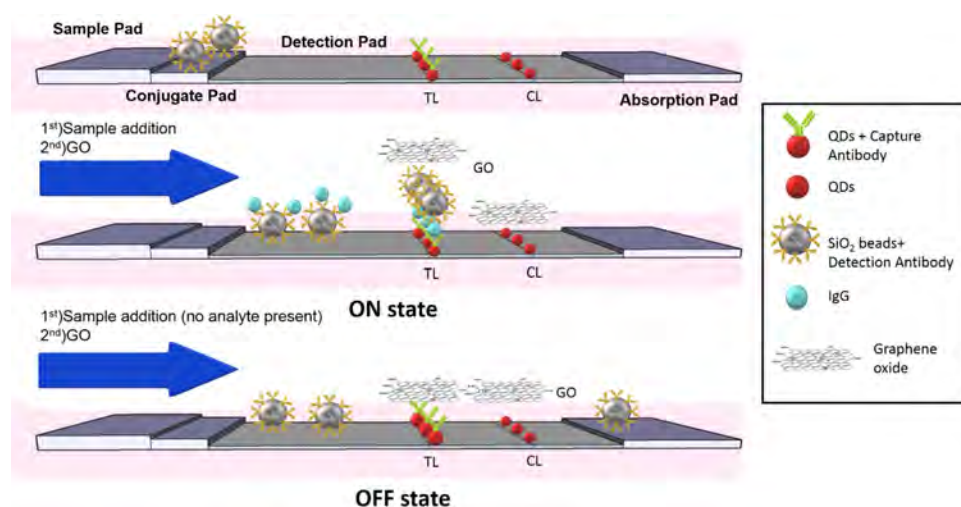


Figura 2-5. Principio de funcionamiento del biosensor de flujo lateral. El analito es transportado hasta la línea de prueba donde se forman inmunocomplejos tipo sándwich y el GO funciona como agente revelador debido a que cuando se forman inmunocomplejos la intensidad de fluorescencia se mantiene. Adaptado con permiso de "(Zamora-Gálvez et al., 2018). Derechos de autor [2018], Elsevier".

Otro biosensor basado en flujo lateral también ha sido desarrollado para la detección de patógenos utilizando a la bacteria *Escherichia Coli* como patógeno modelo (Morales-Narváez et al., 2015). La lógica de funcionamiento es la misma que se muestra en la Figura 2-5, cuando se produce la formación de complejos analito-anticuerpo conjugado con punto cuántico se recupera la fluorescencia de los puntos cuánticos. El límite de detección reportado para este biosensor es de 10 CFU mL^{-1} en tampón estándar y de 100 CFU mL^{-1} en agua embotellada y leche (Morales-Narváez et al., 2015).

También se ha reportado un nanopapel decorado con GO como una ventajosa plataforma de biosensado gracias al carácter hidrófilo, poroso y apagamiento de fluorescencia que adquiere este nanopapel decorado con GO (Cheeveewattanagul et al., 2017). Debido a estas propiedades que adquiere el nanopapel, anticuerpos conjugados con puntos cuánticos son adsorbidos y como consecuencia su fluorescencia es apagada por medio del fenómeno FRET. La fluorescencia se recupera cuando se forman inmunocomplejos de anticuerpo-analito ya que el analito se une a la superficie del nanopapel decorado con GO mediante interacciones electroestáticas actuando como un espaciador entre los anticuerpos conjugados con puntos cuánticos y el papel decorado con GO dificultando el FRET (Cheeveewattanagul et al., 2017). En esta propuesta se utilizan don analitos modelo:

inmunoglobulina G IgG y la bacteria *Escherichia Coli*. En la Figura 2-6 se muestra el principio de funcionamiento de esta plataforma de biosensado. El límite de detección para la bacteria *Escherichia Coli* fue de 55 CFU mL^{-1} mientras que para la inmunoglobulina G IgG fue de 1.91 ng mL^{-1} .

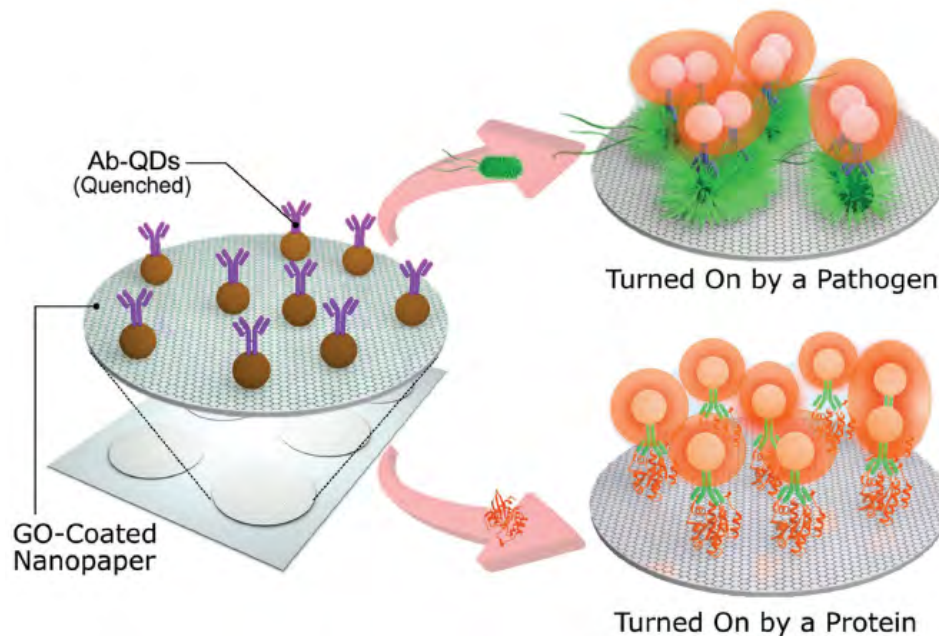


Figura 2-6. Principio de funcionamiento del biosensor basado en nanopapel y GO. El analito funciona como espaciador entre el GO y los puntos cuánticos y, cuando está presente, la intensidad de fluorescencia se recupera. Adaptado con permiso de "(Cheeveewattanagul et al., 2017). Derechos de autor [2017], Advance Functional Materials".

Para la detección del toxico microcistina-LR (MC-LR) se presenta el ensamblaje de bioconjugados de grafeno coloidal y microcistina (MC)-LR-DNA como plataforma de biosensado (Liu et al., 2012). La microcistina (MC)-LR-DNA, la cual se encuentra conjugada con el fluoróforo amidita de fluoresceína, es absorbida por la superficie del grafeno coloidal debido a interacciones de apilamiento $\pi - \pi$ y su fluorescencia puede ser así apagada debido al grafeno coloidal. Cuando se presenta la detección del analito, la intensidad de la fluorescencia se recupera mostrando que hubo detección. Así, el modo de funcionamiento es similar a los descritos anteriormente. El límite de detección fue de $0.14 \mu\text{g mL}^{-1}$ en muestras de agua el cual satisface el límite guía impuesto por la organización mundial de la salud (OMS) de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para la detección de MC-LR en agua potable (Liu et al., 2012).

Se propone la implementación de un biosensor que se basa en el apagamiento de fluorescencia de puntos cuánticos por medio de grafeno, como posible plataforma de biosensado para la detección de múltiples analitos (Anfossi et al., 2014). Puntos cuánticos de 636 nm y 607 nm se conjugaron con inmunoglobulina de ratón y pollo, respectivamente, y grafeno funcionalizado con restos carboxilos fueron enlazados con los respectivos analitos. Entonces cuando se producen los complejos anticuerpo-analito la fluorescencia de los puntos cuánticos se apaga. La adición de analito (libre) que compiten con aquellos unidos con el grafeno actúa como restaurador de la fluorescencia de los puntos cuánticos debido al hecho de que habrá una preferencia a unirse a analitos que se encuentren libres (Anfossi

et al., 2014). El principio de funcionamiento para este biosensor se muestra en la Figura 2-7. Se reporta un límite de detección en el rango nanomolar. En la Tabla 2-2 se resumen los aspectos más relevantes de los biosensores descritos en esta sección.

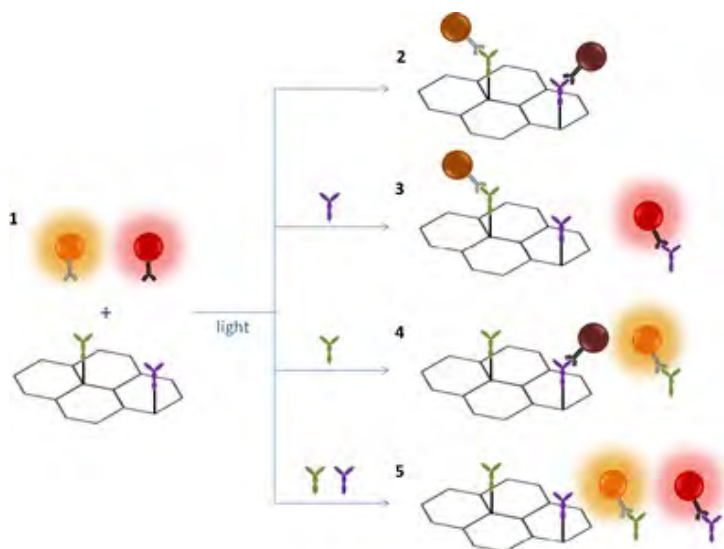


Figura 2-7. Principio de funcionamiento del biosensor para múltiples analitos. Cuando el analito es añadido, uno a la vez (3 y 4) o mixtos (5) se recupera la intensidad de fluorescencia. Adaptado con permiso de "(Anfossi et al., 2014). Derechos de autor [2014], Springer Link".

Tabla 2-2. Aspectos destacados para cada propuesta de biosensor basado en grafeno con enfoque de apagamiento de fluorescencia.

Tipo de grafeno	Propiedades destacadas	Analito	Límite de detección	Ref
Óxido de grafeno GO	Evita el uso de anticuerpos secundarios	La bacteria <i>Escherichia Coli</i>	10 CFU mL ⁻¹ en tampón estándar y 100 CFU mL ⁻¹ en agua embotellada y leche	(Morales-Narváez et al., 2015)
Óxido de grafeno GO	Uno de los biosensores más rápidos jamás reportados	Inmunoglobulina G humana (IgG)	0.2 µg mL ⁻¹	(Shirai et al., 2016)
Óxido de grafeno GO	Una alta eficiencia de FRET (~ 90%)	Inmunoglobulina M humana (IgM)	0.29 µg mL ⁻¹	(Shirai et al., 2017)
Óxido de grafeno GO	Dispositivo de bajo costo y fácil de usar	Inmunoglobulina G humana (IgG)	1.35 ng mL ⁻¹ en tampón estándar y 6.30 ng mL ⁻¹ en suero humano	(Zamora-Gálvez et al., 2018)
Óxido de grafeno GO	Uso de un solo anticuerpo y sin la necesidad de etapas de lavado	Inmunoglobulina G humana (IgG) y la bacteria <i>Escherichia Coli</i>	55 CFU mL ⁻¹ para la bacteria y 1.91 ng mL ⁻¹ para la inmunoglobulina	(Cheeveewattanagul et al., 2017).
Grafeno funcionalizado con restos carboxilos	Detección de múltiples analitos	Inmunoglobulina de ratón y pollo	En el rango nanomolar	(Anfossi et al., 2014)
Grafeno coloidal	Reduce el tiempo de detección en menos de 35 minutos	MC-LR	0.14 µg mL ⁻¹	(Liu et al., 2012)

2.3. Biosensores con enfoque en Resonancia de Plasmones Superficiales

Los plasmones superficiales son ondas electromagnéticas las cuales se propagan a lo largo de una interfaz entre un metal y un material dieléctrico (Paras, 2003). Por lo general, la excitación de plasmones superficiales no se realiza directamente. Uno de los métodos que más se utiliza para producir ondas de plasmones superficiales es conocido como la reflexión total atenuada. La configuración de Kretschmann de reflexión total atenuada, se usa para excitar plasmones superficiales. Esta configuración consiste en un portaobjetos el cual está cubierto de una fina película de metal (por lo general nanopartículas de oro o plata). Después, una capa de biodetección que contiene un elemento de bioreconocimiento inmovilizado se puede recubrir sobre la capa de metal (Paras, 2003). El portaobjetos se encuentra acoplado a un prisma por medio de una capa de polímero y un rayo láser polarizado incide sobre el prisma y la luz que se refleja (en la película de oro) pasa a través de un detector. De esta forma, los cambios en la reflectividad respecto al ángulo o la longitud de onda proporcionan una señal la cual es proporcional al elemento de bioreconocimiento inmovilizado cerca de la superficie. Gracias a esta señal de salida se puede analizar interacciones de complejos anticuerpo-antígeno y aplicarlo a plataformas de biosensado. Una ventaja de la resonancia de plasmones superficiales, aparte de su gran sensibilidad, es que no necesita de etiquetados fluorescentes de los interactuantes en el proceso.

Los biosensores ópticos que se basan en resonancia de plasmones superficiales SPR (por sus siglas en inglés *Surface Plasmon Resonance*) son, quizá, los más utilizados en monitoreo ambiental, calidad de alimentos y diagnóstico médico debido al análisis en tiempo real (libre de etiquetas) y la alta sensibilidad que ofrecen los dispositivos que utilizan este método (Paras, 2003; J. Zhang et al., 2013). Algunas de las aplicaciones incluyen la detección de anticuerpos tales como la inmunoglobulina G (IgG) de ratón (H. Zhang et al., 2013) y conejo (Wu et al., 2015; J. Zhang et al., 2013), la detección de proteínas como albúmina de suero bovino BSA (por sus siglas en inglés *Bovine Serum Albumin*) (Chiu et al., 2014), y la detección de fármacos como el clenbuterol (Yan et al., 2015).

Se ha construido un biosensor SPR para la detección de inmunoglobulina G (IgG) que se basa en el uso de GO y bipirámides de oro como una ventajosa plataforma de biosensado (Wu et al., 2015). Las bipirámides de oro fueron modificadas con la proteína estafilocócica A para la inmovilización orientada de anticuerpos, gracias al hecho de que esta proteína tiene la capacidad de reconocer anticuerpos en especial IgG. Posteriormente, dichas bipirámides de oro son ensambladas sobre las capas del GO mediante interacciones covalentes (Wu et al., 2015). Se destaca que esta configuración puede mejorar sustancialmente la sensibilidad de la modulación de longitud de onda en el biosensor propuesto gracias a la combinación de la alta capacidad de carga del GO y las excelentes propiedades ópticas de las bipirámides de oro. De hecho, se reporta una buena respuesta en la detección de IgG de conejo en un rango de concentración entre $0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. De igual forma, se destaca que con esta configuración se obtiene un mejor límite de cuantificación comparado con los biosensores que se basan en nanopartículas de oro (Wu et al., 2015).

De igual forma, se ha reportado otro biosensor SPR de modulación de longitud de onda

para la detección de IgG de conejo en el cual se utiliza nanopartículas de oro (con un tamaño de 15-20 nm) decoradas con GO como una mejorada plataforma de biosensado (J. Zhang et al., 2013). Como el biosensor anterior, el compuesto de GO y nanopartículas de oro se modifican con la proteína estafilocócica A para la inmovilización del anticuerpo sin la necesidad de modificarlo. Posteriormente, estos compuestos se ensamblan sobre la superficie de una película de oro. En la Figura 2-8 se muestra el principio de funcionamiento de este biosensor. Esta estrategia muestra una buena respuesta al IgG de conejo en el rango de concentración entre $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Además, también se reporta que las capas de GO poseen una favorable dispersabilidad de agua y buena biocompatibilidad que ayuda a mejorar la sensibilidad del biosensor (J. Zhang et al., 2013).

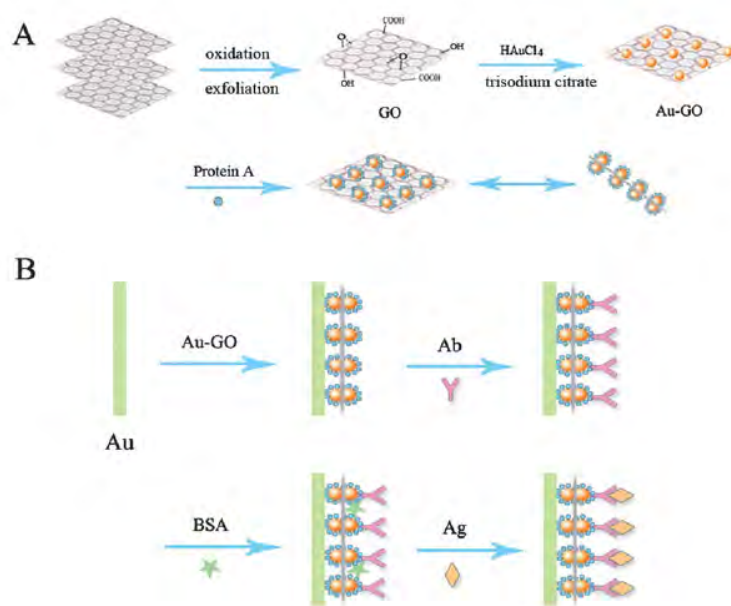


Figura 2-8. Principio de funcionamiento del biosensor SPR basado en GO y nanopartículas de oro. La alta capacidad de carga y la buena biocompatibilidad de GO lo hace un buen candidato como plataforma de biosensado. Adaptado con permiso de "(J. Zhang et al., 2013). Derechos de autor [2013], RSC".

Para la detección de clenbuterol, se ha desarrollado un eficiente método de biosensado SPR que se basa en el uso de grafeno funcionalizado con grupos carboxilos (Yan et al., 2015). Posteriormente, ácido octadecanoico fue ensamblado sobre el grafeno con grupos hidroxilos por medio de interacciones moleculares, como agente que facilite el ensamblaje de los anticuerpos sobre la superficie de biosensado. Anti-IgG de ratón y el anticuerpo contra el clenbuterol se conjugaron con el grafeno funcionalizado con grupos hidroxilos y posteriormente se ensambló sobre una película de oro. En la Figura 2-9 se muestra el principio de funcionamiento de este biosensor. El rango de concentración en el cual trabajó el biosensor está entre 0.1 ng mL^{-1} y 10 ng mL^{-1} con un límite de detección de 6.57 pg mL^{-1} (Yan et al., 2015).

Con el ánimo de tener biosensores que sean cada vez más sensibles y selectivos es importante desarrollar plataformas de biosensado que ayuden a mejorar estas dos características. Para esto, se reportó el desarrollo de un biosensor muy sensible que se basa en el uso de capas de GO químicamente modificadas, como plataforma de biosensado, que contiene enlaces covalentes los cuales interactúan fuertemente con la proteína de albúmina de suero bovino (ASB) (Chiu et al., 2014). Se destaca que esta plataforma de

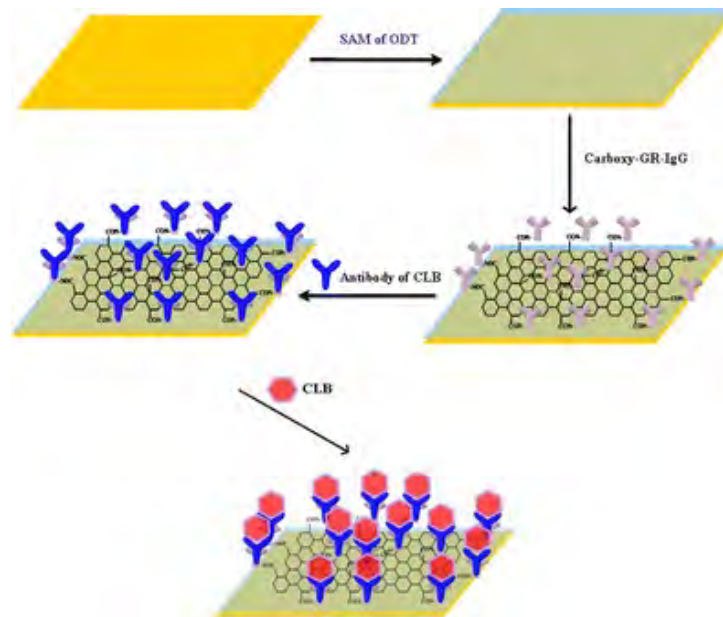


Figura 2-9. Principio de funcionamiento del biosensor SPR para detección clenbuterol. La buena biocompatibilidad del grafeno, permite la inmovilización del anticuerpo para la detección del analito. Adaptado con permiso de “(Yan et al., 2015). Derechos de autor [2014], Springer Link”.

biosensado tiene un límite de detección de concentración de ASB 100 veces más alto que las plataformas de biosensado basadas en películas de oro debido a que esta propuesta tiene una constante de afinidad 5.2 veces más grande que las plataformas convencionales (Chiu et al., 2014). Es decir, que el biosensor tiene la capacidad de detectar cambios de ángulos para pequeñas concentraciones de anti-ASB. El límite de detección del biosensor fue de 100 pg mL^{-1} .

Se desarrollaron biosensores para la detección de IgG de ratón que se basan en nanohíbridos de Au-grafeno y nanohíbridos de Ag-grafeno (H. Zhang et al., 2013). Posteriormente estos nanohíbridos se ensamblaron a una película de oro mediante 1,6-hexanodiol debido a interacciones covalentes y, posteriormente, los anticuerpos (anti-IgG de ratón) se enlazaron a los nanohíbridos mediante el ácido 3-mercaptopropiónico, como se muestra en la Figura 2-10 (H. Zhang et al., 2013). Los nanohíbridos de Au-grafeno y Ag-grafeno mostraron una buena respuesta para detectar IgG de ratón entre los rangos de concentración de $0.30\text{-}40.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.15\text{-}40.00 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, en comparación con los biosensores no modificados con nanohíbridos los cuales muestran una respuesta para este analito en el rango de $2.50\text{-}40.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ (H. Zhang et al., 2013). En concreto, el uso de grafeno en esta propuesta es de vital importancia en el mejoramiento de la sensibilidad del biosensor propuesto. En la Tabla 2-3 se resumen los aspectos más relevantes de los biosensores descritos en esta sección.

2.4. Otros enfoques ópticos

Es importante considerar que existen otros enfoques ópticos que se han utilizados para el diseño y construcción de biosensores basados en grafeno tales como: electroquimioluminiscencia, quimioluminiscencia y método de densidad óptica. Con estos enfoques, se desarrollaron biosensores para aplicaciones en áreas como: el diagnóstico médico para la

Tabla 2-3. Aspectos destacados para cada propuesta de biosensor basado en grafeno con enfoque de resonancia de plasmones superficiales.

Tipo de grafeno	Propiedades destacadas	Analito	Límite de detección	Ref
Óxido de grafeno GO	Mejora la sensibilidad de la modulación de la longitud de onda del biosensor SPR	Inmunoglobulina G (IgG) de conejo	$0.15-40 \mu\text{g mL}^{-1}$	(Wu et al., 2015)
Grafeno funcionalizado con grupos carboxilos	También se realizó la medición por espectroscopia de impedancia electroquímica	clenbuterol	$0.1-10 \text{ ng mL}^{-1}$	(Yan et al., 2015)
Óxido de grafeno GO	Una constante de afinidad 5.2 veces más grande que las plataformas convencionales	Albúmina de suero bovino ASB	100 pg mL^{-1}	(Chiu et al., 2014)
Grafeno	La respuesta al analito cubre un mejor rango de concentración que los métodos convencionales	Inmunoglobulina G (IgG) de ratón	$0.15-40 \mu\text{g mL}^{-1}$	(H. Zhang et al., 2013)
Óxido de grafeno GO	El GO ayuda a mejorar la sensibilidad del biosensor	Inmunoglobulina G (IgG) de conejo	$0.1-50 \mu\text{g mL}^{-1}$	(J. Zhang et al., 2013)

detección de Antígeno carcinoembrionario 19-9 (CA 19-9) (Gan et al., 2013), la proteína α -fetoproteína (AFP) (Cui et al., 2016), el biomarcador de cáncer de ovario CA-125 (Al-Ogaidi et al., 2014), la proteína C-reactiva (CRP) (Lee et al., 2012); y aplicaciones medioambientales como la detección de la toxina aflatoxina B1 (AFB1) (Das et al., 2015). De esta forma, nuevas investigaciones en el área de biosensado óptico buscan técnicas alternativas que permitan tener mejores resultados con mejor sensibilidad y especificidad permitiendo así la terapia temprana de graves enfermedades tales como el cáncer o el Alzheimer.

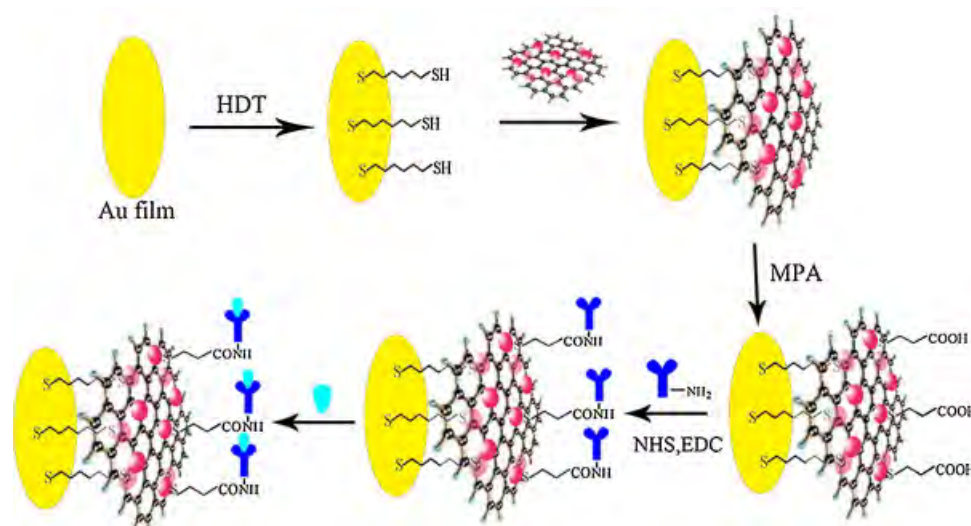


Figura 2-10. Principio de funcionamiento del biosensor SPR basado en nanohíbridos de grafeno y nanopartículas metálicas. Adaptado con permiso de "(H. Zhang et al., 2013). Derechos de autor [2013], Elsevier".

Se ha desarrollado un biosensor que se basa en electroquimioluminiscencia para la detección ultrasensible del antígeno carcinoembrionario 19-9 (CA 19-9) (Gan et al., 2013).

Este biosensor consiste en nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 (óxido de hierro) en las cuales se inmovilizó un primer anticuerpo, representando los elementos de captura. De igual forma, un segundo anticuerpo se inmovilizó en puntos cuánticos de telururo de cadmio CdTe, conjugados con grafeno los cuales pueden emitir una señal electroquimioluminiscente más intensa (que los puntos cuánticos por si solos) debido a que el grafeno puede retener decenas de puntos cuánticos en su superficie, representando así los elementos de amplificación de señal (Gan et al., 2013). Esta configuración arroja una ultrasensible detección del analito dentro del rango de concentración entre 0.005 pg mL^{-1} y 100 pg mL^{-1} con un límite de detección de 0.002 pg mL^{-1} (Gan et al., 2013).

Para la detección de la α -fetoproteína (AFP) se ha desarrollado un biosensor basado en transferencia de energía resonante electroquimioluminiscente (Cui et al., 2016). Para esta propuesta, se utiliza grafeno conjugado con nanopartículas de oro Au y puntos cuánticos (compuesto de sulfuro de cadmio y europio CdS:Eu) como la plataforma de biosensado. En dicha plataforma, se inmoviliza un primer anticuerpo y albúmina de suero bovino ASB para evitar otro tipo de interacciones. De igual manera, se conjuga un segundo anticuerpo con nanofibras de oro Au y cuando el analito está presente se crean complejos tipo sándwich desencadenando así la transferencia de energía electroquimioluminiscente (Cui et al., 2016). En la Figura 2-11 se muestra el principio de funcionamiento de este biosensor. El límite de detección reportado es de 0.05 pg mL^{-1} .

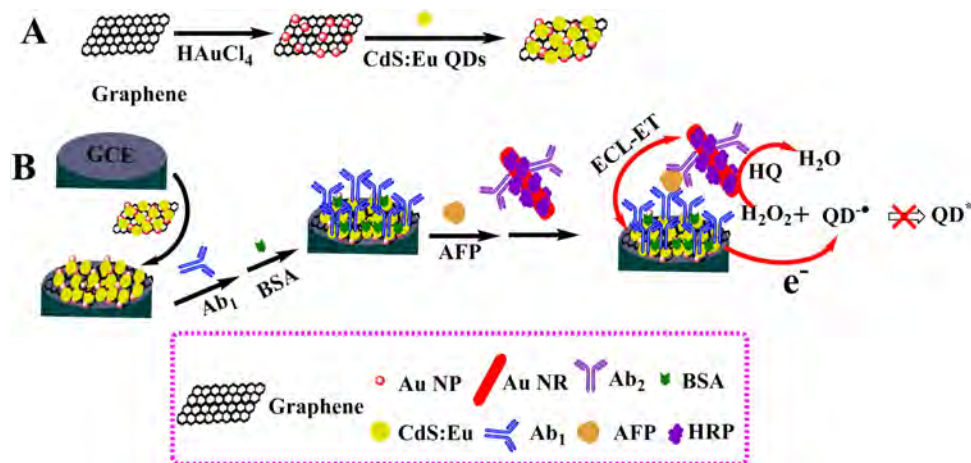


Figura 2-11. Principio de funcionamiento del biosensor basado en transferencia de energía resonante electroquimioluminiscente. Adaptado con permiso de "(Cui et al., 2016). Derechos de autor [2016], Elsevier".

Otro interesante enfoque para el desarrollo de biosensores es el de quimioluminiscencia. Especialmente respecto al fenómeno de transferencia de energía resonante quimioluminiscente, el cual, en principio, es igual al FRET solo difiere de la forma como se genera la fuente luminosa. La quimioluminiscencia es el fenómeno en el cual una molécula, por medio de reacciones químicas, libera exceso de energía en forma de luz sin la necesidad de excitación de fuentes externas (Paras, 2003). Con base a este fenómeno, se ha presentado un biosensor para la detección del biomarcador contra cáncer de ovario CA-125 el cual hace uso de grafeno (conjugado con puntos cuánticos) acoplado sobre la superficie de vidrio silanizado como plataforma de biosensado, como se muestra en la Figura 2-12b (Al-Ogaidi et al., 2014). Posteriormente, se inmoviliza un anticuerpo sobre la superficie de la plataforma de biosensado y para evitar sitios de interacciones no específicas se utiliza ASB, como se muestra en la Figura 2-12(c y d). Un segundo anticuerpo es conjugado

con peroxidasa de rábano picante la cual cataliza la producción de especies reactivas de oxígeno a partir del peróxido de hidrogeno que a su vez oxida al luminol permitiendo así el fenómeno de transferencia de energía resonante quimioluminiscente (entre el grafeno y el luminol) haciendo evidente la biodetección, como se muestra en la Figura 2-12(f y g) (Al-Ogaidi et al., 2014). El límite de detección del biosensor fue de 0.05 U mL^{-1} . Otro biosensor que se basa del mismo fenómeno se reporta para la detección de la proteína C-reactiva (CRP) (Lee et al., 2012). Básicamente, el proceso es el mismo al descrito anteriormente. El límite de detección para este biosensor es de 0.93 ng mL^{-1} en suero humano.

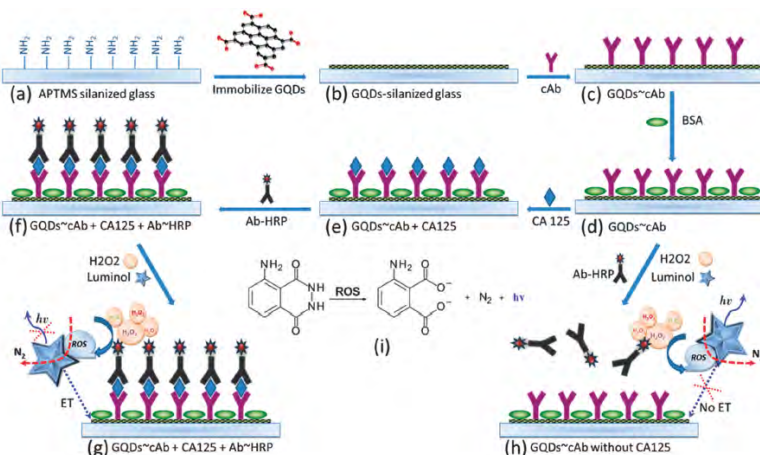


Figura 2-12. Principio de funcionamiento del biosensor basado en transferencia de energía resonante quimioluminiscente adaptado con permiso de “(Al-Ogaidi et al., 2014). Derechos de autor [2013], RSC”.

Una interesante propuesta de biosensado de silicio nanoporoso basado en grafeno fue desarrollada para la detección de la toxina aflatoxina B1 (AFB1) (Das et al., 2015). La densidad de anticuerpos que se unen al silicio poroso recubierto con grafeno fue establecida mediante la técnica de densidad óptica. Se reporta que, el sustrato basado en grafeno tiene una capacidad de unión de anticuerpos de 1.5 veces mayor que los sustratos convencionales (Das et al., 2015). De igual forma, el máximo valor de sensibilidad alcanzado, para la detección de la toxina aflatoxina B1 (AFB1), por este sustrato basado en grafeno fue 1.3 veces más alto que los sustratos convencionales de silicio. El rango de concentración alcanzado por este biosensor fue de 1 fg mL^{-1} a 1 pg mL^{-1} mostrando que el sustrato de silicio nanoporoso basado en grafeno tiene la capacidad de detectar esta toxina a escala femtomolar. En la Tabla 2-4 se resumen los aspectos más relevantes de los biosensores descritos en esta sección.

Tabla 2-4. Aspectos destacados para cada propuesta de biosensor basado en grafeno con diferentes enfoques ópticos.

Tipo de grafeno	Método óptico	Analito	Límite de detección	Ref
Grafeno	Método de densidad óptica	Aflatoxina B1 (AFB1)	0.7 pg mL^{-1}	(Das et al., 2015)
Grafeno	Electroquimioluminiscencia	α -fetoproteína (AFP)	0.05 pg mL^{-1}	(Cui et al., 2016)
Grafeno	Electroquimioluminiscencia	Antígeno carcinoembrionario 19-9 (CA 19-9)	0.002 pg mL^{-1}	(Gan et al., 2013)
Grafeno	Quimioluminiscencia	proteína C-reactiva (CRP)	0.93 ng mL^{-1}	(Lee et al., 2012)
Grafeno	Quimioluminiscencia	CA-125	0.05 U mL^{-1}	(Al-Ogaidi et al., 2014)

En resumen, la forma como se emplea el grafeno en los diferentes biosensores difiere. Algunos lo utilizan como material de amplificación de señal y otros como el elemento aceptor de energía. Lo importante es que, en la mayoría de los artículos analizados, destacan la importancia de este material para el mejoramiento de la sensibilidad debido a su conductividad eléctrica, la alta tasa de transferencia de electrones, la capacidad de apagar fotoluminiscencia y su gran capacidad de carga, así como de inmovilizar enzimas.

La principal desventaja de la mayoría de los biosensores descritos en este capítulo es la cantidad de elementos que se requieren para su funcionamiento y pasos requeridos para su desarrollo. Aquellos que hacen uso de un solo anticuerpo hacen que estos biosensores sean un poco más sencillos de desarrollar.

2.5. Referencias

- Al-Ogaidi, I., Gou, H., Aguilar, Z.P., Guo, S., Melconian, A.K., Al-kazaz, A.K.A., Meng, F., Wu, N., 2014. Detection of the ovarian cancer biomarker CA-125 using chemiluminescence resonance energy transfer to graphene quantum dots. *Chem. Commun.* 50, 1344–1346. <https://doi.org/10.1039/C3CC47701K>
- Anfossi, L., Calza, P., Sordello, F., Giovannoli, C., Di Nardo, F., Passini, C., Cerruti, M., Goryacheva, I.Y., Speranskaya, E.S., Baggiani, C., 2014. Multi-analyte homogenous immunoassay based on quenching of quantum dots by functionalized graphene. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 4841–4849. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7885-6>
- Cheeveewattanagul, N., Morales-Narváez, E., Hassan, A.-R.H.A., Bergua, J.F., Sureeungchai, W., Somasundrum, M., Merkoçi, A., 2017. Straightforward Immunosensing Platform Based on Graphene Oxide-Decorated Nanopaper: A Highly Sensitive and Fast Biosensing Approach. *Adv. Funct. Mater.* 1702741–n/a. <https://doi.org/10.1002/adfm.201702741>
- Chiu, N.-F., Huang, T.-Y., Lai, H.-C., Liu, K.-C., 2014. Graphene oxide-based SPR biosensor chip for immunoassay applications. *Nanoscale Res. Lett.* 9, 445. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-445>
- Cui, M., Yu, R., Wang, X., Zhou, H., Liu, J., Zhang, S., 2016. Novel graphene/Au-CdS:Eu composite-based electrochemiluminescence immunosensor for cancer biomarker detection by coupling resonance energy transfer and enzyme catalytic reaction. *Spec. Issue Honor Chin. Acad. Prof Hong-Yuan Chen His 80th Birthd.* 781, 410–417. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.06.045>
- Das, N., Basu, J., Roychaudhuri, C., 2015. Graphene coated nanoporous silicon immunosensor for food toxin detection. <https://doi.org/10.1007/s12572-015-0144-z>
 - Devadoss, A., Sudhagar, P., Terashima, C., Nakata, K., Fujishima, A., 2015. Photoelectrochemical biosensors: New insights into promising photoelectrodes and signal amplification strategies. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 24, 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2015.06.002>

- Gan, N., Zhou, J., Xiong, P., Li, T., Jiang, S., Cao, Y., Jiang, Q., 2013. An Ultra-sensitive Electrochemiluminescence Immunoassay for Carbohydrate Antigen 19-9 in Serum Based on Antibody Labeled Fe₃O₄ Nanoparticles as Capture Probes and Graphene/CdTe Quantum Dot Bionanoconjugates as Signal Amplifiers. *Int. J. Mol. Sci.* 14. <https://doi.org/10.3390/ijms140510397>
- Lee, J.S., Joung, H.-A., Kim, M.-G., Park, C.B., 2012. Graphene-Based Chemiluminescence Resonance Energy Transfer for Homogeneous Immunoassay. *ACS Nano* 6, 2978–2983. <https://doi.org/10.1021/nn300684d>
- Liu, M., Zhao, H., Chen, S., Yu, H., Quan, X., 2012. Colloidal Graphene as a Transducer in Homogeneous Fluorescence-Based Immunosensor for Rapid and Sensitive Analysis of Microcystin-LR. *Environ. Sci. Technol.* 46, 12567–12574. <https://doi.org/10.1021/es3028583>
- Morales-Narváez, E., Naghdi, T., Zor, E., Merkoçi, A., 2015. Photoluminescent Lateral-Flow Immunoassay Revealed by Graphene Oxide: Highly Sensitive Paper-Based Pathogen Detection. *Anal. Chem.* 87, 8573–8577. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02383>
- Paras, P., 2003. *Introduction to Biophotonics*, 1st ed. John Wiley & Sons, United States of America.
- Shirai, A., Henares, T.G., Sueyoshi, K., Endo, T., Hisamoto, H., 2016. Fast and single-step immunoassay based on fluorescence quenching within a square glass capillary immobilizing graphene oxide-antibody conjugate and fluorescently labelled antibody. *Analyst* 141, 3389–3394. <https://doi.org/10.1039/C5AN02637G>
- Shirai, A., Nakashima, K., Sueyoshi, K., Endo, T., Hisamoto, H., 2017. Development of a single-step immunoassay microdevice based on a graphene oxide-containing hydrogel possessing fluorescence quenching and size separation functions. *Analyst* 142, 472–477. <https://doi.org/10.1039/C6AN02485H>
- Song, J., Wang, J., Wang, X., Zhao, W., Zhao, Y., Wu, S., Gao, Z., Yuan, J., Meng, C., 2016. Using silver nanocluster/graphene nanocomposite to enhance photoelectrochemical activity of CdS: MN/TiO₂ for highly sensitive signal-on immunoassay. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.02.030>
- Tian, J., Zhao, Huimin, Zhao, Huirou, Quan, X., 2012. Photoelectrochemical immunoassay for microcystin-LR based on a fluorine-doped tin oxide glass electrode modified with a CdS-graphene composite. *Microchim. Acta* 179, 163–170. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0872-8>
- Wu, Q., Song, D., Zhang, D., Zhang, H., Ding, Y., Yu, Y., Sun, Y., 2015. A highly sensitive SPR biosensor based on a graphene oxide sheet modified with gold bipyramids, and its application to an immunoassay for rabbit IgG. *Microchim. Acta* 182, 1739–1746. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1497-5>
- Yan, F., Zhang, Y., Zhang, S., Zhao, J., Liu, S., He, L., Feng, X., Zhang, H., Zhang, Z., 2015. Carboxyl-modified graphene for use in an immunoassay for the illegal feed

- additive clenbuterol using surface plasmon resonance and electrochemical impedance spectroscopy. *Microchim. Acta* 182, 855–862. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1399-y>
- Zamora-Gálvez, A., Morales-Narváez, E., Romero, J., Merkoçi, A., 2018. Photoluminescent lateral flow based on non-radiative energy transfer for protein detection in human serum. *Biosens. Bioelectron.* 100, 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.013>
 - Zhang, H., Song, D., Gao, S., Zhang, J., Zhang, Hanqi, Sun, Y., 2013. Novel SPR biosensors based on metal nanoparticles decorated with graphene for immunoassay. *Sens. Actuators B Chem.* 188, 548–554. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.07.055>
 - Zhang, J., Sun, Y., Wu, Q., Zhang, H., Bai, Y., Song, D., 2013. A protein A modified Au-graphene oxide composite as an enhanced sensing platform for SPR-based immunoassay. *Analyst* 138, 7175–7181. <https://doi.org/10.1039/C3AN01553J>
 - Zhang, X., Liu, M., Mao, Y., Xu, Y., Niu, S., 2014. Ultrasensitive photoelectrochemical immunoassay of antibody against tumor-associated carbohydrate antigen amplified by functionalized graphene derivatives and enzymatic biocatalytic precipitation. *Biosens. Bioelectron.* 59, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.071>
 - Zhang, Y., Ge, L., Ge, S., Yan, M., Yan, J., Zang, D., Lu, J., Yu, J., Song, X., 2013. TiO₂-graphene complex nanopaper for paper-based label-free photoelectrochemical immunoassay. *Electrochimica Acta* 112, 620–628. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.09.009>
 - Zhang, Y., Sun, G., Yang, H., Yu, J., Yan, M., Song, X., 2016. Multifunctional reduced graphene oxide triggered chemiluminescence resonance energy transfer: Novel signal amplification strategy for photoelectrochemical immunoassay of squamous cell carcinoma antigen. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.008>

Capítulo 3

Desarrollo experimental

Como se detalla abajo, uno de los elementos más importantes involucrado en el desarrollo de la plataforma de biosensado propuesta es el óxido de grafeno debido a que este material es el que nos permite disminuir la intensidad de fluorescencia del fluoróforo. Por tal motivo, es importante saber la concentración adecuada para que el apagamiento del fluoróforo sea el más eficiente. Un aspecto importante de resaltar es que el proceso para conocer la concentración adecuada de GO está directamente ligado con la concentración del fluoróforo empleado en el biosensor, que en nuestro caso es FITC. Esto se hará evidente cuando se muestren las gráficas de apagamiento.

3.1. Anti-IgG-FITC: Descripción general

El elemento o sonda de bioreconocimiento utilizado en la plataforma de biosensado consiste en un anticuerpo, anti-IgG, conjugado con el fluoróforo FITC (descrito en el marco teórico). En particular, este anticuerpo es específico para IgG humano. De hecho, es muy importante asegurarse de que sólo reaccione con IgG humana para evitar falsos positivos en los experimentos. De acuerdo con las especificaciones de la empresa que desarrolló el producto (abcam, Cambridge, Reino Unido), la reactividad cruzada con otras inmunoglobulinas y cadenas ligeras es inferior al 0.1 %. La relación F/P efectiva (es el número promedio aparente de fluoróforos conjugados por cada molécula de anticuerpo) es de 5. La concentración de fábrica que tiene este producto es de 1 mg mL⁻¹. Conocer estas especificaciones es de suma importancia para el desarrollo de procedimientos posteriores.

3.2. Analito por detectar: IgG humano

El analito por detectar es este caso, es IgG humano. Como se mostró en el marco teórico, esta es una de las cinco clases de inmunoglobulinas (anticuerpos), la cual, es la más abundante en los fluidos internos del cuerpo humano. Son purificados del suero humano mediante diversas técnicas. La pureza del producto es verificada mediante inmunoelectroforesis y cromatográfica líquida de alta eficiencia HPLC (por sus siglas en inglés *high performance liquid chromatography*). Por medio de estas técnicas, según el fabricante, la pureza de las inmunoglobulinas en el producto es de al menos del 95 %. La concentración

de fabrica del producto es de 4.87 mg mL^{-1} , determinada mediante absorbancia. En el presente trabajo se decidió utilizar IgG debido a que es una proteína modelo y económica. Por otro lado, esta proteína tiene gran relevancia en el diagnóstico médico puesto que sirve como biomarcador de enfermedades tales como: la artritis reumatoide (Ohshima, 2014) y el Alzheimer (Reddy et al., 2011) por tal motivo se hace importante la detección de esta proteína.

3.3. Funcionamiento de la plataforma de biosensado propuesta

La lógica de funcionamiento de la plataforma de biosensado propuesta es la siguiente: entre más alta sea la concentración del analito, menor apagamiento de fluorescencia habrá. Es decir, el principio operacional se basa en que en ausencia del analito se experimentará un apagamiento máximo de fluorescencia. La razón por la cual se presenta tal apagamiento de fluorescencia se debe al fenómeno de FRET (el cual se describe en el marco teórico). En este caso, el donador es el fluoróforo FITC y el receptor es el GO. Entre más tiempo pase, la transferencia de energía no radiativa aumentará (debido a que una mayor concentración del fluoróforo FITC se acerca al GO) y habrá mayor apagamiento de fluorescencia. Como se muestra en la Figura 3-1, cuando el biosensado comienza, la sonda de bioconocimiento tiene cierta fluorescencia inicial Figura 3-1a y después de determinado tiempo dicha fluorescencia disminuirá debido a que el donador (es decir el fluoróforo) se acerca cada vez más al receptor (es decir al GO). La situación cuando el analito está presente será dramáticamente diferente. En presencia del analito, después de determinado tiempo, el apagamiento de fluorescencia será inversamente proporcional a la concentración de analito presente como se muestra en la Figura 3-2a. Un primer factor al que puede deberse es el hecho de que el analito puede actuar como espaciador entre el fluoróforo y el GO y así entre mayor sea su concentración mayor número de complejos analito-sonda de bioconocimiento habrá; así mismo habrá mayor separación GO-fluoróforo, Figura 3-2b. Otro fenómeno que puede ocurrir es que la formación del complejo analito-sonda de bioconocimiento no tenga mucha afinidad con el GO, provocando que estos complejos no se acerquen demasiado a la superficie donde se encuentra el GO, Figura 3-2c.

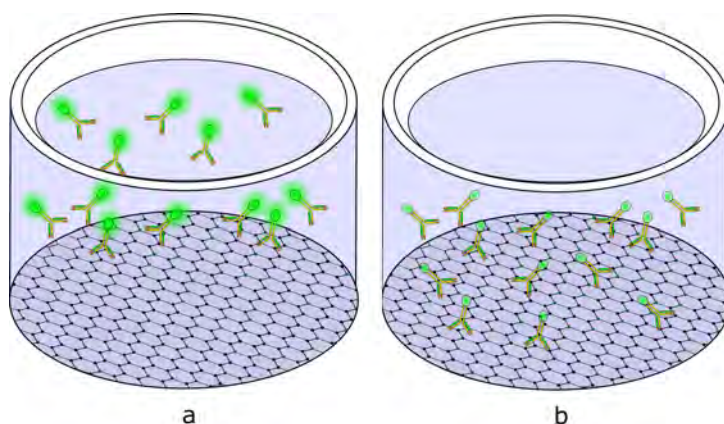


Figura 3-1. El blanco sin analito: a) fluorescente b) apagamiento de fluorescencia después de cierto tiempo.

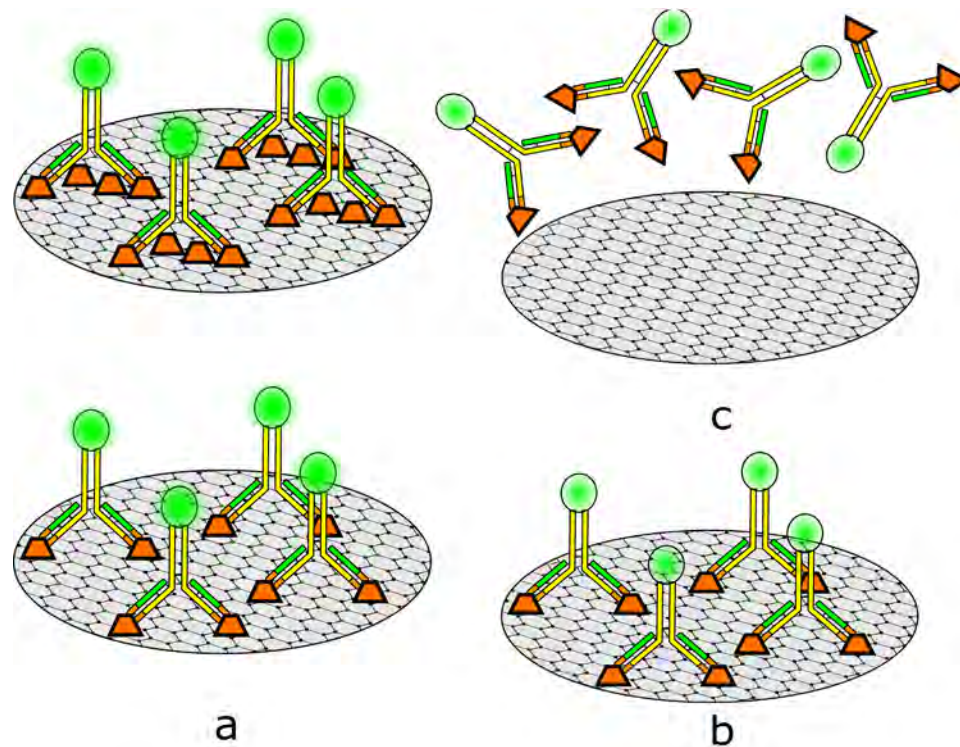


Figura 3-2. El blanco sin analito: a) apagamiento de acuerdo a concentración analito b) analito como espaciador c) complejo analito-sonda.

3.4. Recubrimiento de la superficie de la placa con GO

En la plataforma de biosensado propuesta, se utilizaron placas negras para cultivo celular de 96 pocillos con tapa y fondo de poliestireno marca Corning. El primer paso consiste en recubrir el fondo de dicha placa con el GO. Para ello, se introduce 100 μL de este material en cada pocillo de la placa y se deja durante cierto tiempo con la intención de que se adhiera a la superficie del poliestireno, por lo general se deja durante 12 horas (aprovechando una noche). En la Figura 3-3a se muestra la placa con diferentes concentraciones de GO.

Un aspecto importante por tratar en este paso es ¿Por qué motivo el GO se adhiere a la superficie de poliestireno en cada pocillo? la respuesta de esta cuestión subyace en la composición de la placa utilizada. La carga superficial de las placas es modificada debido a que contiene grupos aminos (positivamente cargados) y grupos carboxilos (negativamente cargados) con la intención de mejorar la adhesión de ciertas células (Corning, 2014). La superficie de la placa utilizada en este trabajo, esta modificada con grupos aminos, según las especificaciones brindadas por el proveedor. Por otro lado, como el GO tiene una carga neta negativa (ver marco teórico), la adhesión de este sobre la superficie de la placa será producto de interacciones electrostáticas principalmente, en la Figura 3-3b se muestra la interacción electrostática entre el GO y poliestireno modificado para un pocillo de la placa. Pero también puede haber interacciones de otro tipo entre el GO y la superficie que contribuya a la adhesión del primero. Es importante resaltar que, estas placas no habían sido antes reportadas como plataformas de biosensado, dándole mayor relevancia al presente trabajo.

Transcurrido ese tiempo, se realizan etapas de lavado añadiendo y aspirando 100 μL de

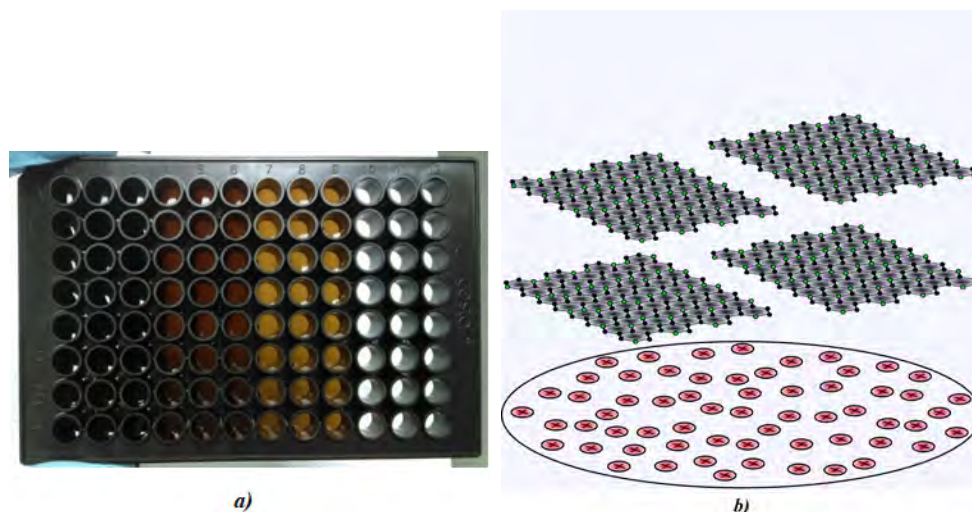


Figura 3-3. Placa de 96 pocillos recubierta con tres concentraciones diferentes de GO: $3200 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente b) Interacción electrostática entre el GO y el poliestireno modificado.

agua ultrapura (por lo general tres veces) para remover los excesos que no se adhirieron a la superficie de la placa. En la Figura 3-4 se muestra una representación de un pocillo después de realizar los lavados. En la imagen vemos el GO que logró adherirse a la superficie del pocillo. Tanto la dilución del GO como las etapas de lavado se realizan con agua ultrapura.

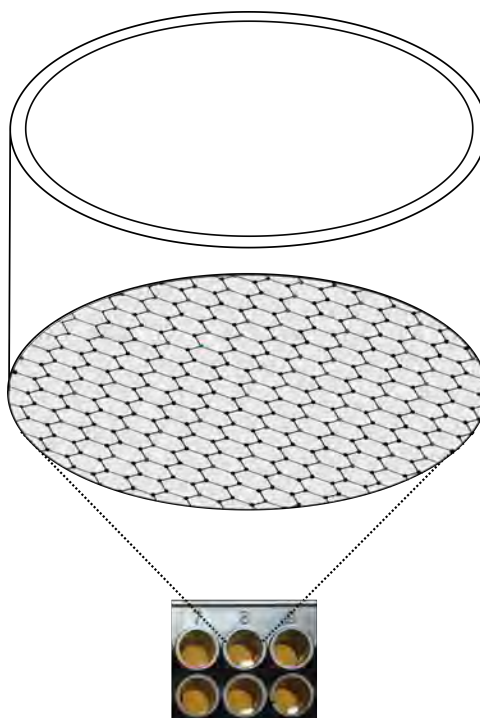


Figura 3-4. Representación de un pocillo después de las etapas de lavado con el GO que se adhirió a su superficie.

3.5. Comprobación de adhesión del GO

Es de suma importancia asegurarse y demostrar que el GO realmente se adhiere a la superficie de la placa para continuar con el desarrollo de la plataforma de biosensado propuesta. El apagamiento de fluorescencia es una forma de verificar si en realidad el GO está presente en cada pocillo, estos experimentos se describen en la sección 3.6. Otro método que se puede utilizar para comprobar la adhesión de GO es por medio de obtención de espectro de absorción UV-Vis. Esto es posible conociendo los respectivos espectros de absorción del GO y del poliestireno. Para ello, se realizaron mediciones de absorbancia entre 280 nm y 500 nm de ambos materiales, en la Figura 3-5 se muestra el espectro para el poliestireno y para el GO. Para el poliestireno, se observa un hombro característico en los 290 nm mientras que para GO se encuentra alrededor de los 302 nm. Estas mediciones se realizaron en seco, es decir que no había contenido líquido en los pocillos cuando se realizaron las mediciones.

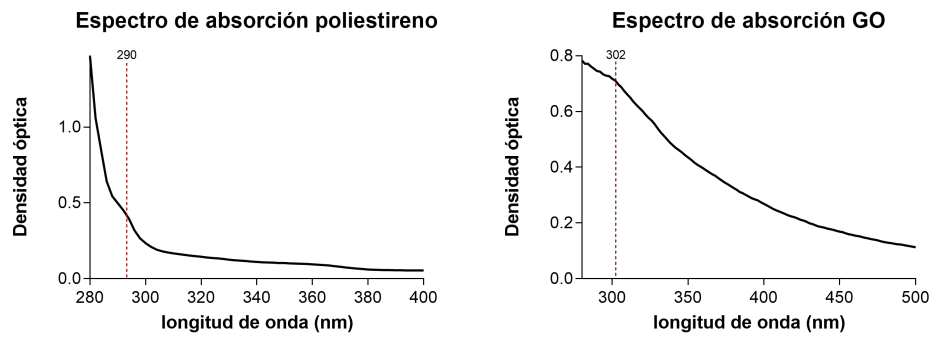


Figura 3-5. Espectro UV-Vis para a) poliestireno b) grafeno oxidado (GO).

Teniendo los espectros de referencia de ambos materiales podemos realizar mediciones de la placa después de las etapas de lavado mencionadas anteriormente. El procedimiento consiste en realizar mediciones de absorbancia dentro del mismo rango de longitudes de onda (280 nm – 500 nm) para diferentes concentraciones de GO. Es importante establecer un blanco dentro de las mediciones (poliestireno sin GO) con el objetivo de sustraer el ruido de fondo (background) de cada medida. Las concentraciones de GO empleadas fueron $800 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$, $3200 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$, los resultados se muestran en la Figura 3-6.

De acuerdo con estos resultados, la concentración de $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ es la que más se logra adherir en la superficie de la placa. Para las concentraciones más altas, su adhesión parece ser no tan eficiente. Así, por medio de este método, podemos verificar si el GO en realidad se adhiere en la superficie de la placa.

También se puede utilizar la espectroscopia Raman como posible técnica que permita verificar la adhesión del GO en la placa. Los espectros Raman para el poliestireno y el GO se muestran en la Figura 3-7. El GO tiene dos picos característicos en 1352 cm^{-1} y 1591 cm^{-1} mientras que el poliestireno tiene varios picos característicos. Al observar el espectro Raman del poliestireno, es evidente que tiene picos cercanos a los característicos del GO. Esto puede que sea una desventaja cuando se quiera comprobar si el GO está en la superficie ya que la cantidad de GO en comparación al poliestireno será mucho menor. Cuando se realizó la obtención del espectro Raman para pocillos con las mismas concentraciones de GO que se muestran en la Figura 3-6, efectivamente no se evidencia-

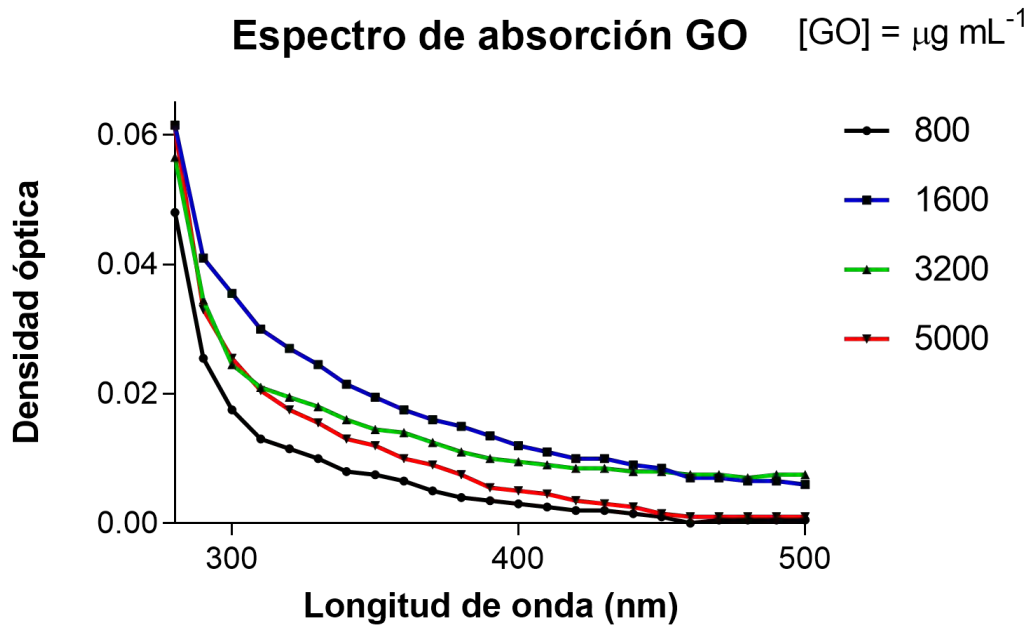


Figura 3-6. Espectro UV-Vis para diferentes concentraciones de GO.

ron los picos característicos del GO, predominando el espectro Raman del poliestireno. Con esto, se concluye que dada la intensidad del esparcimiento Raman del poliestireno, comparada con la intensidad del esparcimiento Raman generado por el GO, esta técnica no fue contundente para comprobar la adhesión del GO en la superficie de la placa.

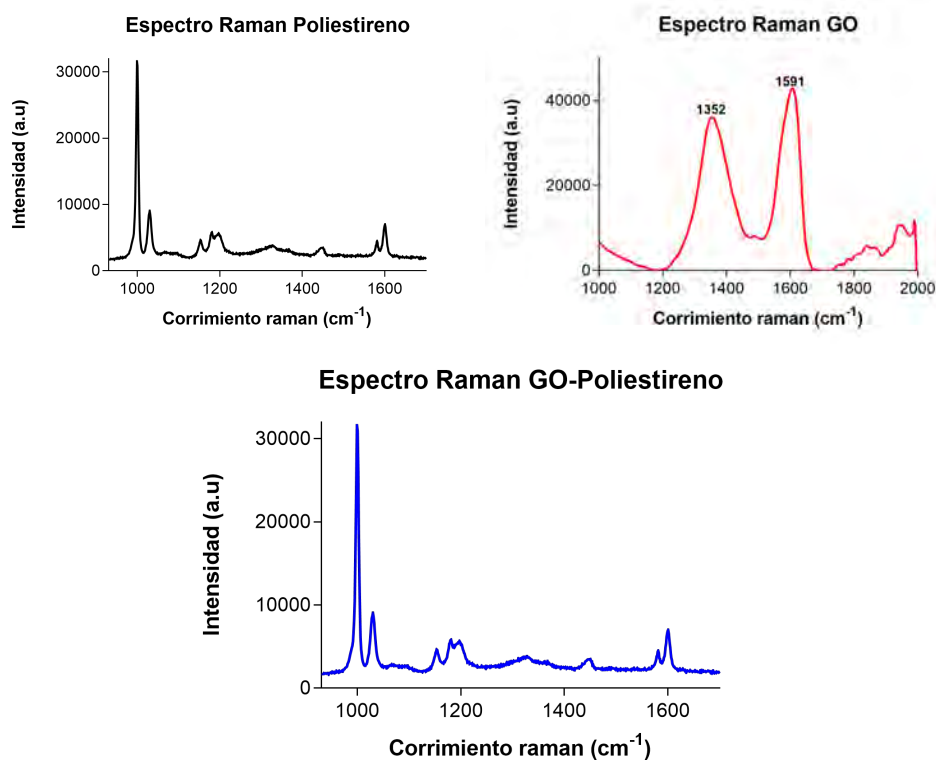


Figura 3-7. Espectro Raman para a) poliestireno b) grafeno oxidado GO c) Poliestireno recubierto con GO.

3.6. Optimización del GO y el fluoróforo (IgG-FITC)

3.6.1. Procedimiento experimental

El proceso que se realizó para conocer la concentración de optimización de GO fue por medio de mediciones de la cinética de la fluorescencia durante determinado tiempo. Se eligió un tiempo de 2 horas con lecturas cada 5 minutos. Primeramente, se tomaron las siguientes concentraciones de GO: $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $400 \mu\text{g mL}^{-1}$. La concentración inicial del GO es de $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ y para llegar a las concentraciones deseadas, se diluyó en agua ultrapura. La ecuación empleada para realizar estas diluciones es la siguiente:

$$C_i V_i = C_f V_f \quad (3-1)$$

Para el primer experimento realizado, se utilizó una concentración de IgG-FITC de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, la cual también se diluyó empleando la ecuación 3-1. Tras añadir la sonda de bioconocimiento, se introdujo la placa en el espectrofotómetro durante el tiempo previamente mencionado. La longitud de onda de excitación de la fluoresceína es de 485 nm y su longitud de onda de emisión es de 528 nm. Los resultados de este experimento se resumen en la Figura 3-8. Para ninguna de las concentraciones de GO se aprecia una disminución en la intensidad de la fluorescencia. Esto puede suceder debido a que la concentración del fluoróforo es muy alta impidiendo que el GO sea capaz de apagar su fluorescencia. De igual forma, se tiene un control con el cual se puede comparar el comportamiento de las diferentes concentraciones. La intensidad de la fluorescencia se encuentra normalizada respecto a la intensidad inicial I_0 con la intención de observar cuánto apagamiento hay en determinado instante respecto a dicho valor inicial.

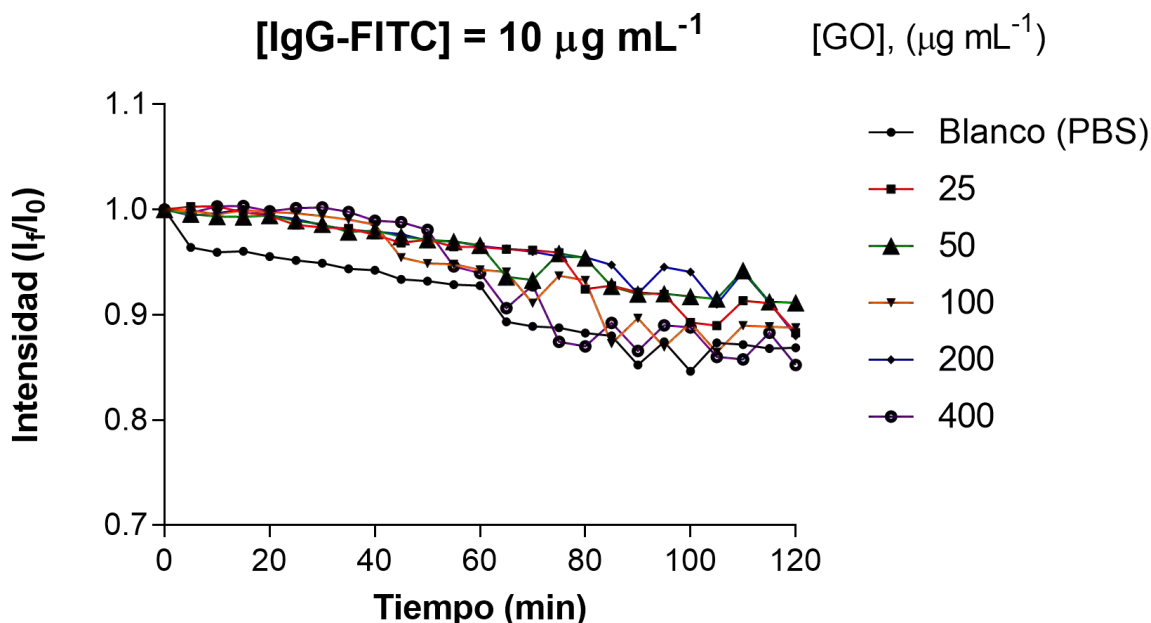


Figura 3-8. Gráfica donde se muestra como desciende la intensidad de fluorescencia para cada concentración de GO durante cierto intervalo de tiempo.

Teniendo lo anterior en mente, se realizó un experimento con las mismas concentraciones de GO, pero con diferente concentración del fluoróforo. Esto con la intención de observar si la concentración utilizada del fluoróforo en realidad era muy alta. Se eligieron dos concentraciones: $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados se muestran en la Figura 3-9. En cada pocillo se introducía $100 \mu\text{L}$ del fluoróforo diluido a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

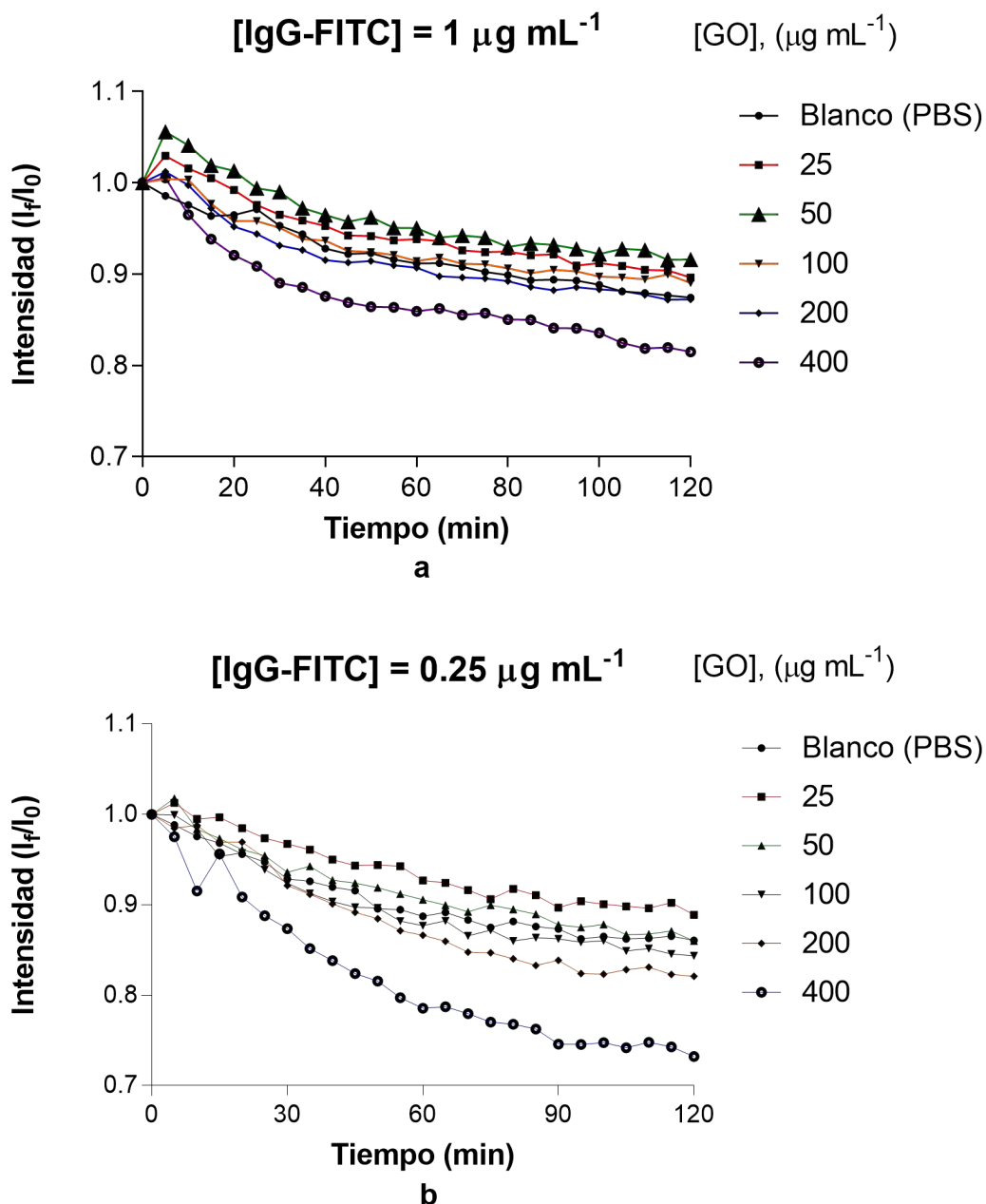


Figura 3-9. Gráfica de apagamiento de fluorescencia para concentraciones relativamente bajas de GO. a) Con IgG-FITC de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ b) Con IgG-FITC de $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Por lo observado, efectivamente se concluye que la concentración del fluoróforo era demasiado alta para las concentraciones utilizadas de GO. Por otro lado, de la Figura 3-9 se observa que la concentración de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ es la única que se diferencia (en términos de apagamiento) de las otras curvas, esto indica que a partir de esta concentración se

comienza a evidenciar una disminución en la intensidad de la fluorescencia. Además, para la concentración del fluoróforo de $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 3-9b), es donde más se evidencia esto. De acuerdo con estos resultados, es adecuado experimentar con concentraciones de GO mayores si se quiere tener resultados más favorables de apagamiento de fluorescencia. Por lo tanto, se utilizaron tres concentraciones de GO: $800 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $3200 \mu\text{g mL}^{-1}$, los resultados se muestran en la Figura 3-10. Es evidente que entre mayor sea la concentración de GO, mayor es el apagamiento de fluorescencia.

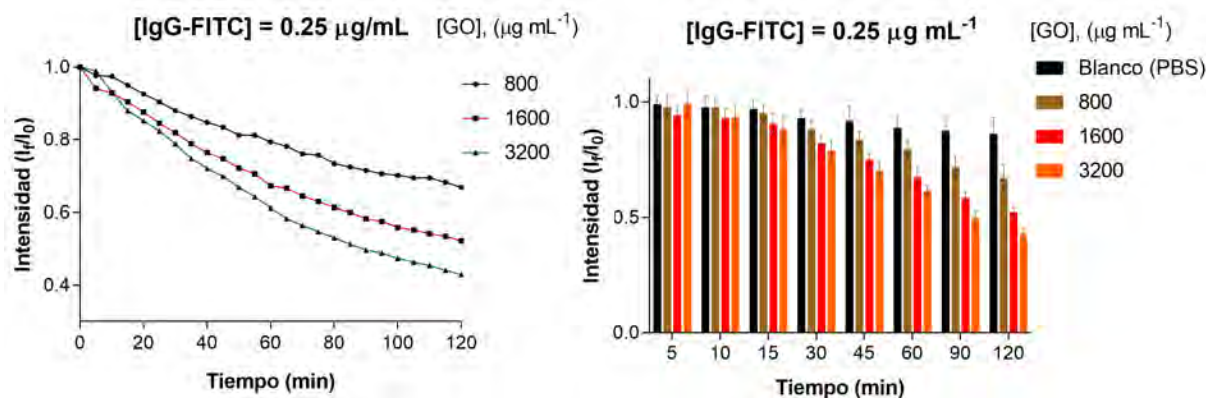


Figura 3-10. Apagamiento de fluorescencia para concentraciones relativamente altas de GO.

La cuestión que surge es ¿Cuál es la concentración de GO más adecuada para optimizar el apagamiento de fluorescencia? Para resolver esta duda, se realizó un experimento en el cual se utilizaron tres concentraciones tanto para el fluoróforo ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$) como para el GO ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$, $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$). Donde, tal como se observa en la Figura 3-11c, la concentración más estable, en cuanto de apagamiento de fluorescencia se trata, es la de $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ observando que concentraciones menores a esta no son suficientes para apagar diferentes concentraciones del fluoróforo. De acuerdo con los resultados experimentales hasta el momento, las concentraciones más adecuadas de GO para optimizar el fenómeno de apagamiento son $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $3200 \mu\text{g mL}^{-1}$. De igual forma, la concentración del fluoróforo más adecuada (hasta el momento) es $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$. El siguiente paso por realizar es introducir el analito y observar con cuales parámetros de GO e IgG-FITC se optimiza la biodetección propuesta.

3.6.2. Análisis cinético

Hasta el momento el tiempo que se ha utilizado para la realización de los experimentos (2 horas) fue seleccionado sabiendo que es el tiempo convencional para una inmunorreacción, pero no se sabe si es el tiempo adecuado en el cual se alcance el mayor apagamiento del fluoróforo. Por tal motivo, fue pertinente realizar un experimento para conocer dicho tiempo. Las concentraciones de GO utilizadas en este experimento fueron $800 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $3200 \mu\text{g mL}^{-1}$. En cuanto a las concentraciones del fluoróforo utilizadas, fueron las mismas que se muestran en la Figura 3-11. Aunque el experimento se realizó durante 5 horas, se logra apreciar que a partir de los 120 minutos las barras comienzan a estabilizarse. Es decir que, a partir de este tiempo, el fluoróforo se apaga muy poco siendo innecesario extender el experimento a tiempos más largos de dos horas.

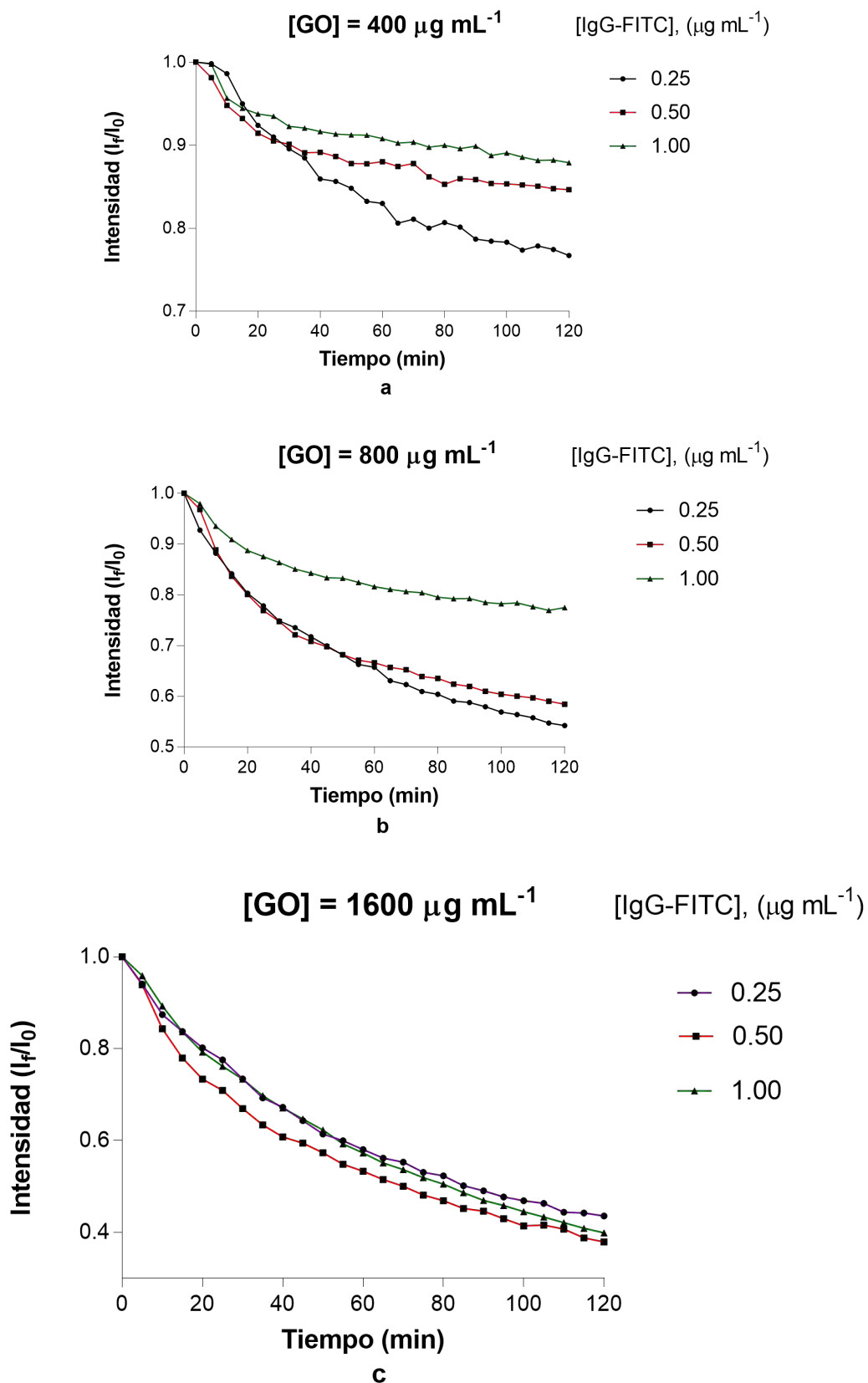


Figura 3-11. Gráficas de apagamiento para concentraciones de GO: a) $400 \mu\text{g mL}^{-1}$; b) $800 \mu\text{g mL}^{-1}$; c) $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$.

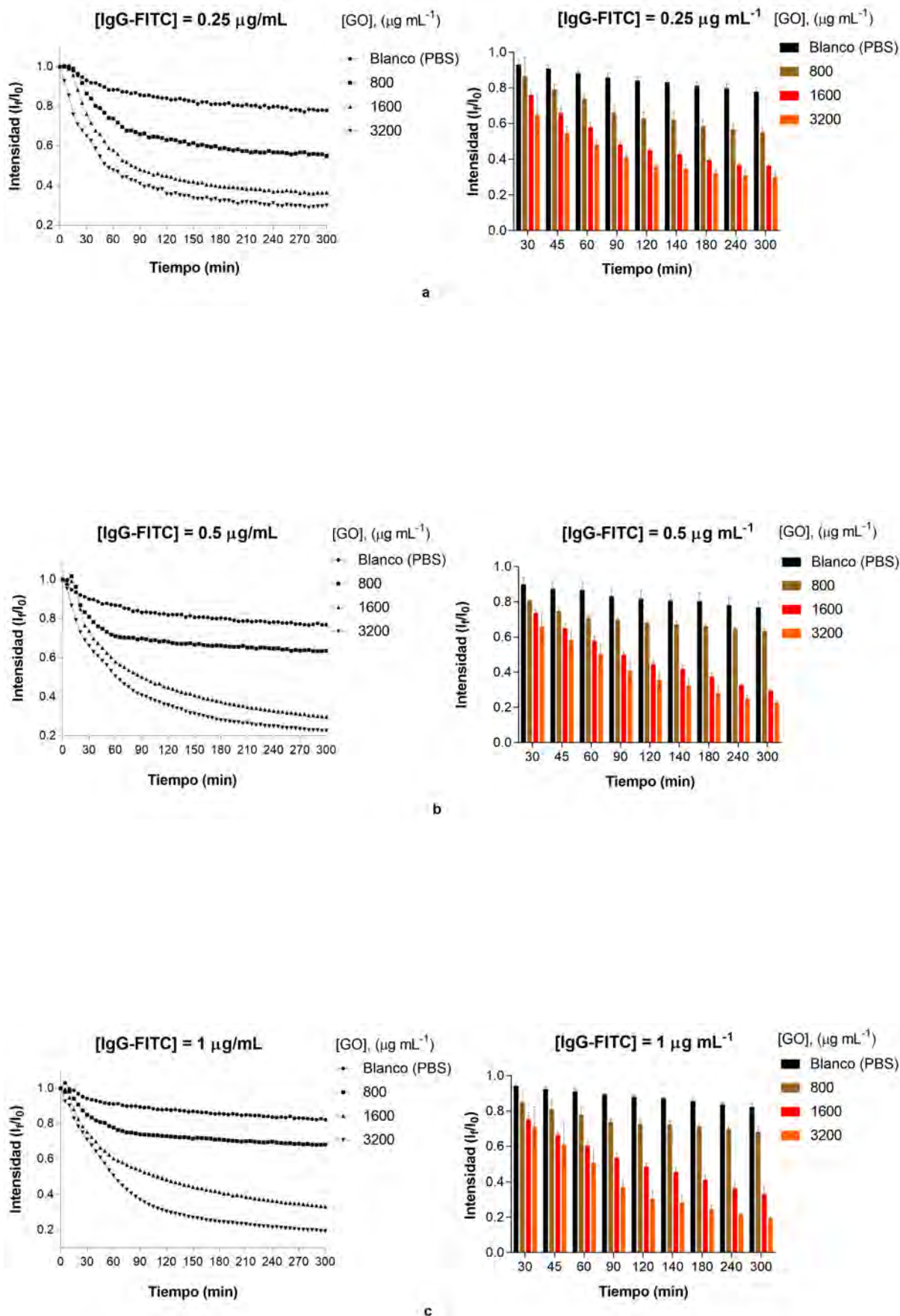


Figura 3-12. Gráficas para optimización de tiempo a) para IgG-FITC de $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ b) para IgG-FITC de $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ c) para IgG-FITC de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.6.3. Experimentación con el analito IgG humano

Teniendo las concentraciones de GO y IgG-FITC con las cuales se logra un mayor apagamiento de fluorescencia, se procedió a experimentar con el analito, en este caso, IgG humano, con la intención de determinar las concentraciones óptimas para la plataforma de biosensado. Como se explicó previamente, la idea fundamental de detección es que entre mayor sea la concentración del analito a detectar, menos apagamiento se va a presentar. Con ello en mente, se eligieron 7 diferentes concentraciones del analito para realizar un primer experimento con el fin de observar si esta hipótesis se cumple. Las concentraciones utilizadas fueron: 960 ng mL^{-1} , 480 ng mL^{-1} , 240 ng mL^{-1} , 120 ng mL^{-1} , 60 ng mL^{-1} , 15 ng mL^{-1} y 7.5 ng mL^{-1} . Respecto a las concentraciones de IgG-FITC y GO, estas fueron $0.25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ y $3200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 3-13. Se puede observar que, para las dos concentraciones más altas del analito, hay un aumento en la intensidad de la fluorescencia en los primeros 20 minutos y después empieza a disminuir. Estos resultados son confusos en el sentido de que no se entiende la razón de estos aumentos. A pesar de esto, ocurre solo para las concentraciones más altas. Una posible causa de este comportamiento puede estar relacionada con la homogenización dentro del pocillo, ya que, como se mencionó previamente, primero se deposita el analito y después la sonda de bioreconocimiento. Sin embargo, esto es una mera especulación.

[IgG-FITC] = $0.25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; [GO] = $3200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ [H-IgG], (ng mL^{-1})

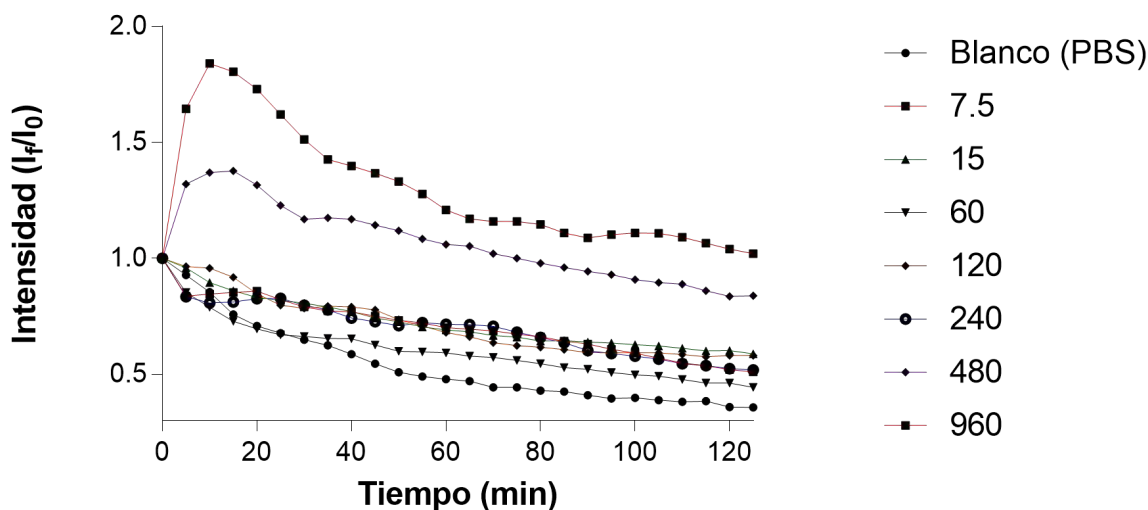
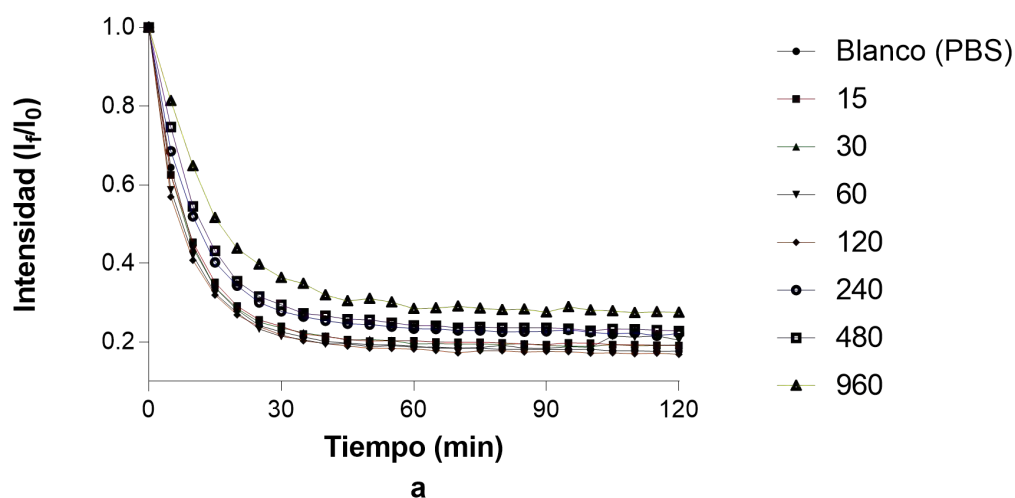


Figura 3-13. Gráfica donde se muestra el apagamamiento de la intensidad de fluorescencia para diferentes concentraciones del analito.

Para hacer que la solución dentro de cada pocillo sea más homogénea, se realizó un experimento con agitación orbital de la placa completa (esta función está disponible en el lector de placas utilizado en todos estos experimentos). Las concentraciones de la sonda de bioreconocimiento, el GO y el analito fueron las mismas a las de experimento anteriormente mencionado. Los resultados obtenidos de este experimento se muestran en la figura 3-14. De la Figura 3-14a se observa que ya no se tienen aumentos de intensidad

de fluorescencia observados en la Figura 3-13. Se piensa que, de acuerdo con estos resultados, la constante agitación ayuda a que la solución, dentro de cada pocillo, quede un poco más homogénea. Por otro lado, de la Figura 3-14b se observa que para las tres concentraciones más altas del analito se comienza a evidenciar interacción entre la sonda de bioreconocimiento y el analito, es decir, que el apagamiento estudiado es menos eficiente en estos casos y esto sirve para detectar al analito en dichas concentraciones. Otra gran ventaja observada de usar agitación es que el apagamiento de fluorescencia se da en un periodo de tiempo menor, pudiendo esto ser de utilidad para una detección más rápida. En la sección 3.7. se discute este fenómeno.

[IgG-FITC] = 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; [GO] = 3200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [H-IgG], (ng mL $^{-1}$)



[IgG-FITC] = 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; [GO] = 3200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [H-IgG], (ng mL $^{-1}$)

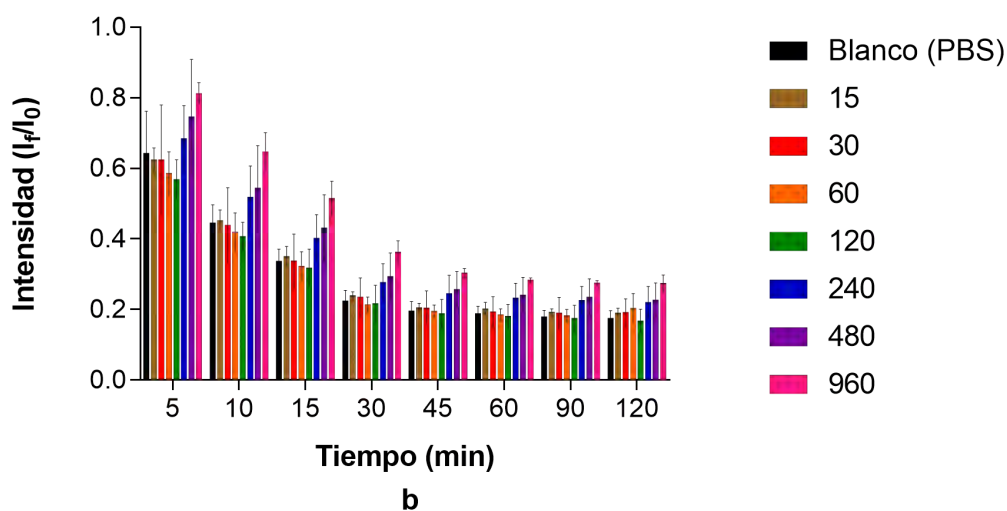


Figura 3-14. Gráficas donde se muestran el apagamiento de la intensidad de fluorescencia para diferentes concentraciones del analito. a) gráfica de curvas b) gráfica de tablas.

En este punto, el problema que surge de este experimento es la detección de concentraciones bajas, lo cual es crucial en dispositivos de diagnóstico ya que cada vez se

demandan límites de detección más bajos (Turner, 2013). Con las condiciones utilizadas, solo se logra detectar las concentraciones más altas, pero, según lo anterior, se necesita que el biosensor logre detectar concentraciones lo más bajas posibles. Por tal motivo, se debe buscar las condiciones adecuadas para lograrlo. Como primera medida, se decide realizar tres experimentos con la concentración de $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ de GO, manteniendo las mismas concentraciones para el analito y para tres concentraciones de la sonda de bioreconocimiento $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 3-15. En cuanto a detección, para esta concentración de GO, es mejor comparada con los resultados obtenidos con la concentración de $3200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Este experimento nos indica que la concentración de GO óptima para la plataforma de biodetección es $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$. Lo que ahora se necesita saber es la concentración adecuada de la sonda de bioreconocimiento (IgG-FITC) con la cual se logre una mejor detección de concentraciones bajas del analito.

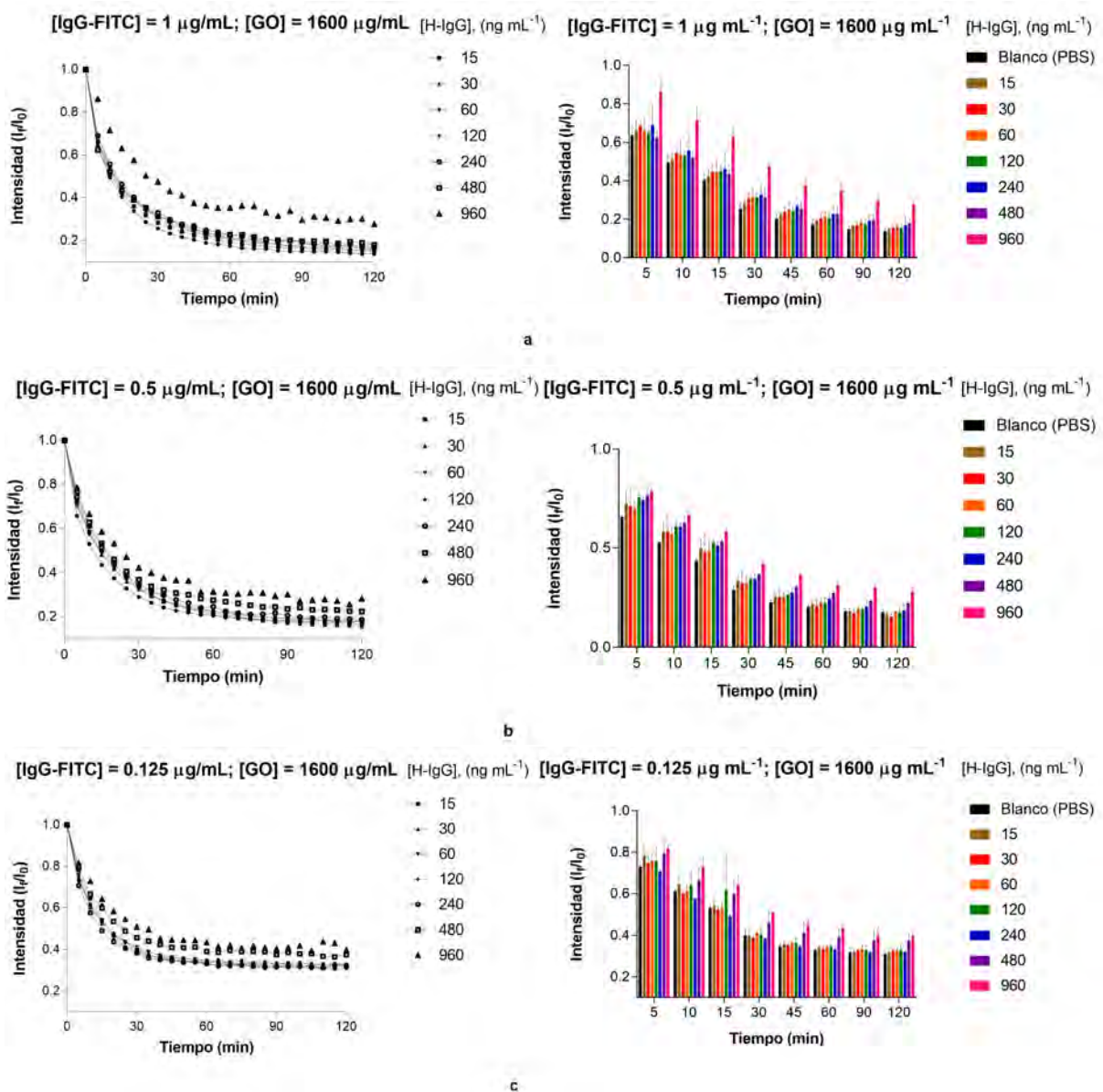


Figura 3-15. Gráficas donde se muestran el apagamiento de la intensidad de fluorescencia para diferentes concentraciones del analito. a) IgG-FITC $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ b) IgG-FITC $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ c) $0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.6.4. Influencia del volumen

En paralelo, sabiendo la concentración óptima de GO, se realizó un experimento con el objetivo de observar si una variación de volumen de la solución contribuye significativamente a mejorar la detección. Como se observa en todas las gráficas de esta sección, el volumen empleado hasta el momento era de 200 μL (100 μL del analito y 100 μL de la sonda de bioreconocimiento). En este experimento se aplicó un volumen de 150 μL (75 μL del analito y 75 μL de la sonda de bioreconocimiento). Respecto a la concentración de la sonda de bioreconocimiento, se utilizó aquella con la cual se obtuvo mejores resultados en el experimento previo, es decir, 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como se observa en la Figura 3-16, la variación del volumen no ayuda a mejorar la detección del analito. Con esto, se demuestra que es innecesario cambiar el volumen utilizado hasta el momento.

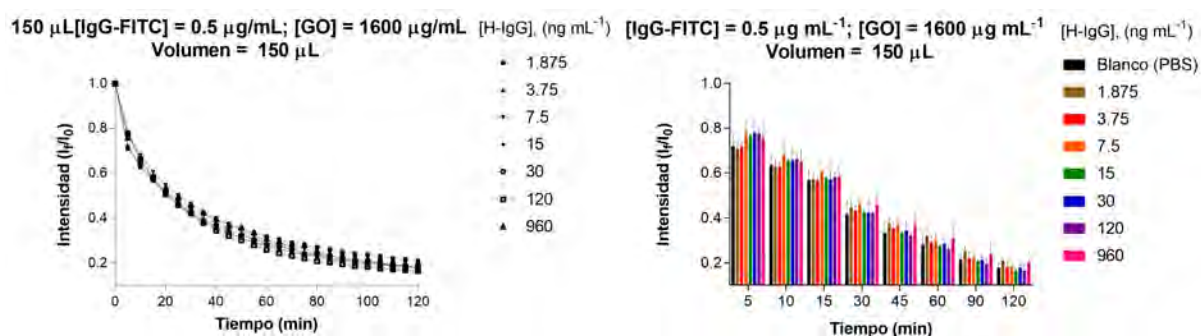


Figura 3-16. Gráficas donde se muestran el apagamiento de la intensidad de fluorescencia con variación de volumen.

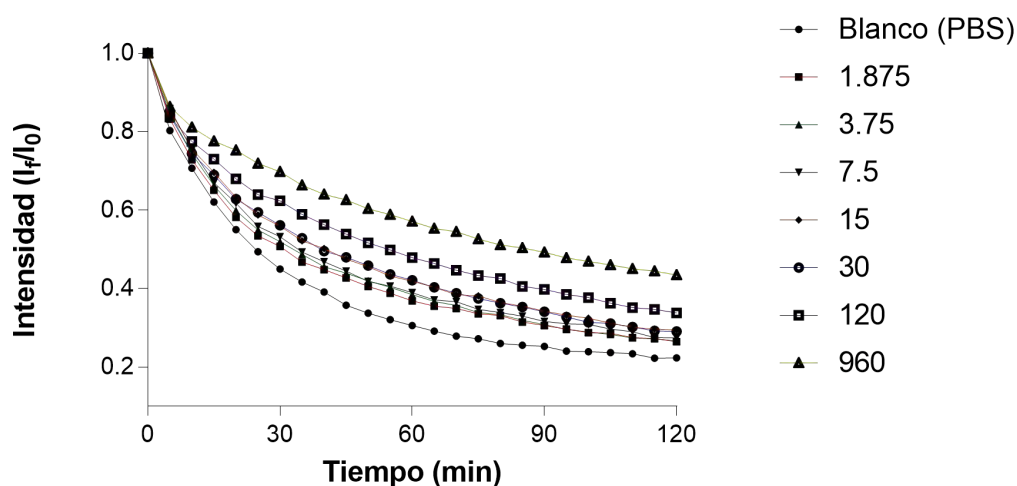
3.6.5. Homogeneidad de los resultados

Sabiendo que no es necesario variar el volumen y conociendo la concentración de óptima de GO, lo más adecuado de considerar, de acuerdo con los resultados presentados, es experimentar con concentraciones de la sonda de bioreconocimiento por debajo de 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. De nuevo, se experimentó con una concentración de 0.125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ manteniendo las concentraciones del analito constantes. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 3-17. Para esta concentración de la sonda de bioreconocimiento la detección del analito es mejor (de acuerdo con la hipótesis de biodetección) comparada con experimentos previos, mostrando que esta concentración es adecuada para mejorar la sensibilidad de la plataforma de biosensado. El problema de este experimento es que las barras error para algunas concentraciones son considerablemente grandes. Este problema debe minimizarse para que los resultados obtenidos tengan una mayor precisión.

Una vez más, se piensa que la barra de error se puede deber a que la solución en cada pocillo, con las mismas condiciones, no está lo suficientemente homogénea. Como se vio anteriormente, la agitación ayuda considerablemente a la mejora de los resultados ya que puede contribuir a la homogenización de la solución en cada pocillo. Se piensa que un pipeteo antes de comenzar el experimento también puede contribuir a obtener mejores resultados en cada experimento, en particular, puede ayudar a disminuir el error en los resultados. Para ver si lo anterior en realidad contribuye, se repitió el experimento mostrado en la Figura 3-17 con la única diferencia de realizar dicho pipeteo. Los resultados se muestran en la Figura 3-18.

Se observa que las barras de error mejoran considerablemente comparado con las del experimento anterior. Resultando ser de gran ayuda el pipeteo en la realización del experimento. Obtener barras de error pequeñas es de gran importancia debido a que influye mucho en obtener mejores límites de detección, como se mostrará más adelante. En conclusión, los parámetros de optimización de la sonda de bioreconocimiento y GO son $0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. Con estas condiciones se logra la detección de concentraciones relativamente bajas del analito IgG humano (es decir del orden de pocos ng mL^{-1}).

**[IgG-FITC] = $0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$; [GO] = $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ [H-IgG], (ng mL^{-1})
Volumen = $200 \mu\text{L}$**



**[IgG-FITC] = $0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$; [GO] = $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ [H-IgG], (ng mL^{-1})
Volumen = $200 \mu\text{L}$**

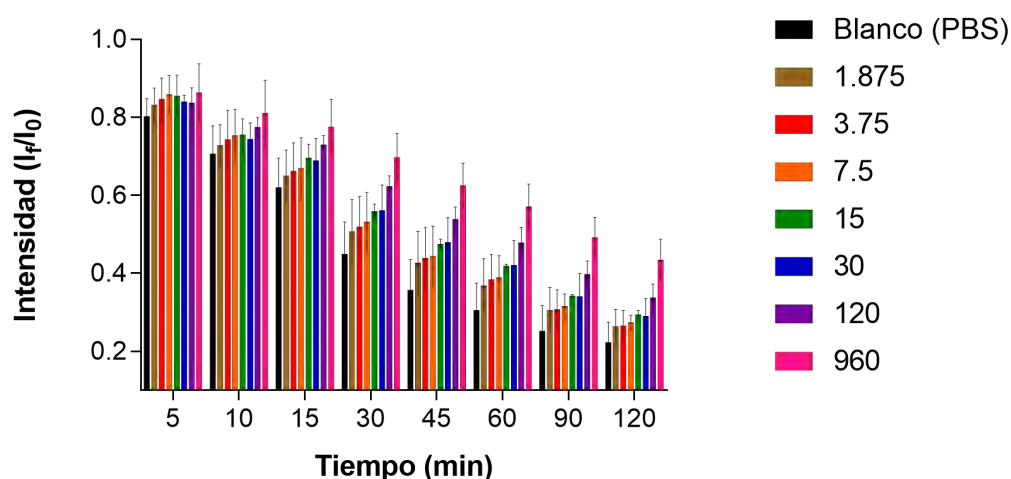


Figura 3-17. Primer experimento con resultados positivos. Se logra apreciar que todas las concentraciones del analito se diferencian de la referencia.

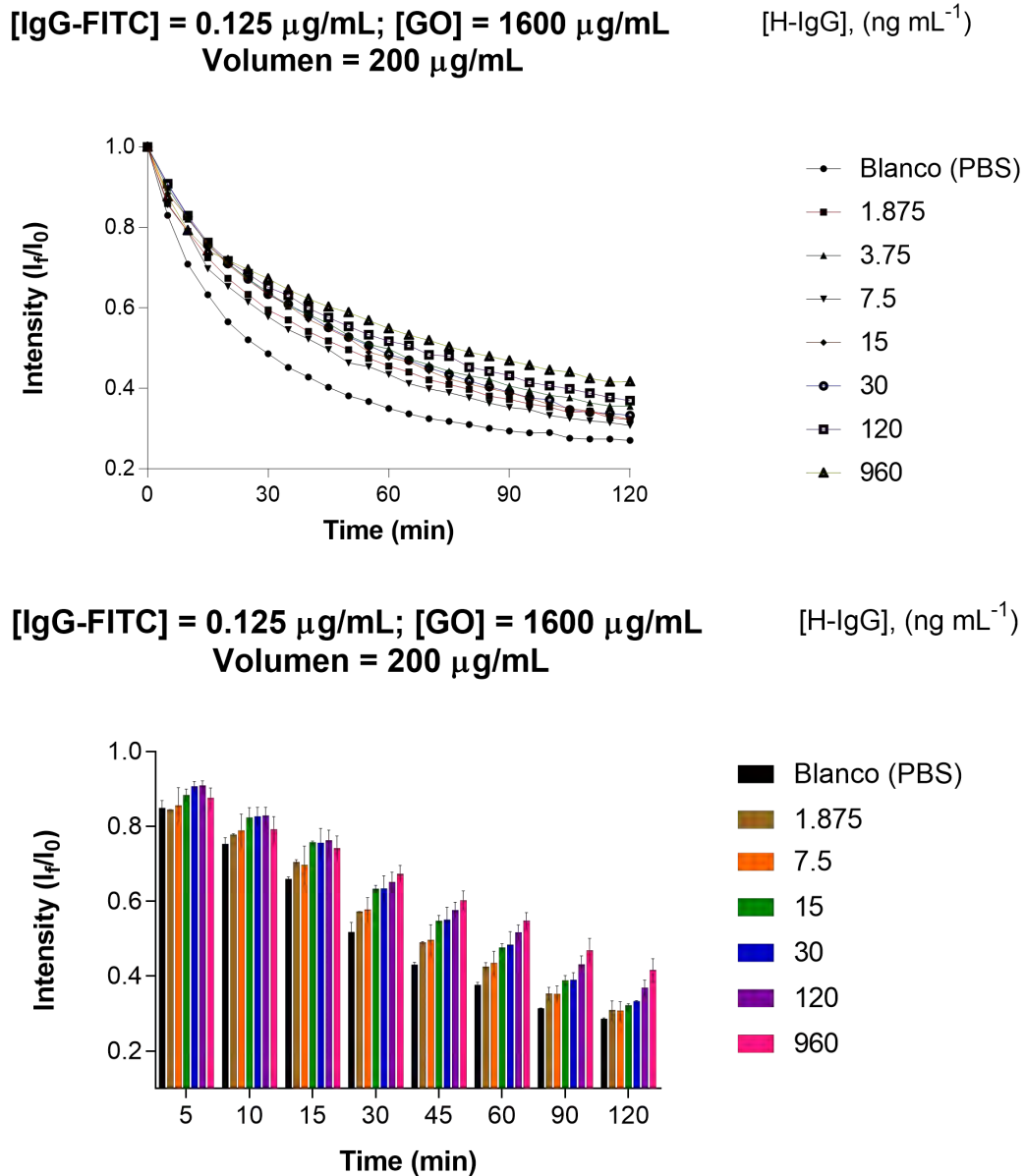


Figura 3-18. En las gráficas se observa que la barra de error de cada concentración mejora considerablemente respecto al experimento anterior (ver Figura 3-17).

3.7. Discusión sobre la utilidad de la agitación

Es conocido que la agitación contribuye considerablemente en la obtención de resultados altamente sensibles y precisos en los biosensores basados en superficies. Por tal motivo, indagar en la literatura acerca del tema es necesario con la intención de comprender el porqué de dicha utilidad. En el desarrollo de un biosensor, es de gran importancia que se tenga un buen rendimiento de biodetección con la finalidad de obtener una buena respuesta analítica del biosensor. Diversas estrategias son utilizadas para mejorar dicho rendimiento y entre ellas la agitación (o que implique movimiento) es una de las más utilizadas. El transporte de cada analito para la unión con un bioreceptor molecular en una superficie de sensado, es de gran importancia para el rendimiento de biodetección en biosensores basados en superficies (Morales-Narváez et al., 2014). Como un ejemplo, en microarreglos de ADN, la hibridación estática por medio de difusión es la técnica predominante en esta tecnología (Hertzsch et al., 2007). Se ha reportado que la difusión es bastante ineficiente para alcanzar la hibridación debido a que para un tiempo de 24 horas la eficiencia de unión máxima será aproximadamente del 0.2 % y si se quisiera tener al menos un 2 % de eficiencia tendrían que pasar 6 días mínimo (Hertzsch et al., 2007). Con la intención de solucionar este problema, técnicas que involucren agitación o de mezcla han sido propuestas y utilizadas por diversos grupos alrededor del mundo. Técnicas tales como: agitación de la cámara de hibridación (Vanderhoeven et al., 2005), barras de agitación magnética (Yuen et al., 2003), límites móviles (Pappaert et al., 2003), e incluso mover la sonda de bioreconocimiento uniéndola a perlas paramagnéticas en movimiento (Fan et al., 1999).

De igual forma, han sido utilizados micromotores y nanomotores para mejorar el rendimiento de biodetección. Por ejemplo, utilizar micromotores autopropulsados para generar agitación puede ayudar a transportar de una forma más eficiente un analito determinado (dentro de cierta solución) hasta la superficie donde se encuentra anclado el bioreceptor (Morales-Narváez et al., 2014). De igual forma, se ha reportado que utilizar nanomotores que funcionan como catalizadores ayuda considerablemente en la detección de ADN y ARN ribosomal bacteriano de una forma mucho más rápida (Kagan et al., 2009; Wu et al., 2010). Lo importante de utilizar técnicas que involucren agitación, que a su vez produce mezcla, es que mejora significativamente el rendimiento de biodetección, el tiempo de reacción (Morales-Narváez et al., 2014), la sensibilidad y la reproducibilidad (Hertzsch et al., 2007; Kagan et al., 2009; Morales-Narváez et al., 2014; Wu et al., 2010). En los experimentos realizados en este trabajo se utilizó la función de agitación orbital disponible en el lector de placas utilizado (Cytation 5, Biotek, Winooski, Vermont, Estados Unidos), la cual, contribuyó en gran medida a tiempos de detección mucho más rápidos, a homogenizar la solución en cada pocillo y en la sensibilidad de la plataforma de biosensado. Por tales razones la utilización de agitación es de gran importancia en el desarrollo de la plataforma de biosensado propuesta.

3.8. Referencias

- Corning, 2014. Corning Cell Culture Surfaces.
- Fan, Z.H., Mangru, S., Granzow, R., Heaney, P., Ho, W., Dong, Q., Kumar, R., 1999. Dynamic DNA Hybridization on a Chip Using Paramagnetic Beads. *Anal. Chem.* 71, 4851–4859. <https://doi.org/10.1021/ac9902190>
- Hertzsch, J.-M., Sturman, R., Wiggins, S., 2007. DNA Microarrays: Design Principles for Maximizing Ergodic, Chaotic Mixing. *Small* 3, 202–218. <https://doi.org/10.1002/sml.200600361>
- Kagan, D., Calvo-Marzal, P., Balasubramanian, S., Sattayasamitsathit, S., Manesh, K.M., Flechsig, G.-U., Wang, J., 2009. Chemical Sensing Based on Catalytic Nanomotors: Motion-Based Detection of Trace Silver. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 12082–12083. <https://doi.org/10.1021/ja905142q>
- Morales-Narváez, E., Guix, M., Medina-Sánchez, M., Mayorga-Martinez, C.C., Merkoçi, A., 2014. Micromotor Enhanced Microarray Technology for Protein Detection. *Small* 10, 2542–2548. <https://doi.org/10.1002/sml.201303068>
- Pappaert, K., Vanderhoeven, J., Van Hummelen, P., Dutta, B., Clicq, D., Baron, G.V., Desmet, G., 2003. Enhancement of DNA micro-array analysis using a shear-driven micro-channel flow system. 16th Int. Symp. Microscale Sep. Anal. Part II 1014, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00715-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00715-5)
- Turner, A.P.F., 2013. Biosensors: sense and sensibility. *Chem. Soc. Rev.* 42, 3184–3196. <https://doi.org/10.1039/C3CS35528D>
- Vanderhoeven, J., Pappaert, K., Dutta, B., Van Hummelen, P., Desmet, G., 2005. DNA Microarray Enhancement Using a Continuously and Discontinuously Rotating Microchamber. *Anal. Chem.* 77, 4474–4480. <https://doi.org/10.1021/ac0502091>
- Wu, J., Balasubramanian, S., Kagan, D., Manesh, K.M., Campuzano, S., Wang, J., 2010. Motion-based DNA detection using catalytic nanomotors. *Nat. Commun.* 1, 36.
- Yuen, P.K., Li, G., Bao, Y., Müller, U.R., 2003. Microfluidic devices for fluidic circulation and mixing improve hybridization signal intensity on DNA arrays. *Lab. Chip* 3, 46–50. <https://doi.org/10.1039/B210274A>
- Reddy, M.M., Wilson, R., Wilson, J., Connell, S., Gocke, A., Hynan, L., German, D., Kodadek, T., 2011. Identification of Candidate IgG Biomarkers for Alzheimer’s Disease via Combinatorial Library Screening. *Cell* 144, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.054>
- Ohshima, S., 2014. Rheumatoid Arthritis and IgG as Biomarker, in: Endo, T., Seeburger, P.H., Hart, G.W., Wong, C.-H., Taniguchi, N. (Eds.), *Glycoscience: Biology and Medicine*. Springer Japan, Tokyo, pp. 1–5. https://doi.org/10.1007/978-4-431-54836-2_178-1

Capítulo 4

Análisis y resultados

En el presente capítulo se presenta el análisis y resultados de datos obtenidos para el mejor experimento obtenido a lo largo de la etapa experimental. El análisis de los demás experimentos que se llevaron a cabo en el presente trabajo se encuentra en el apéndice A. Cabe aclarar que los métodos empleados para el análisis de datos de todos los experimentos exitosos obtenidos son los mismos. Los resultados que se presentaran en este capítulo son muy importantes para demostrar que la plataforma de biosensado propuesta es potencialmente útil para aplicaciones de diagnóstico médico, en especial para la detección de analito IgG humano.

4.1. Regresión lineal: métodos de mínimos cuadrados

Se sabe que una regresión lineal es un modelo matemático empleado para aproximar la relación de dependencia entre una variable independiente x y una variable dependiente y (Danzer and Currie, 1998). El método más utilizado para una regresión lineal de un conjunto de datos es el de mínimos cuadrados (Harris, 2013). En este procedimiento se supone que los errores en y son mucho mayores que los errores en x . Este método busca que la suma de los cuadrados de las distancias verticales entre cada punto experimental y recta del ajuste sea mínima o tienda a cero. A esta distancia vertical entre el punto experimental y la recta se conoce como residual (Dosal and Villanueva, 2008). Al realizar el anterior procedimiento, se obtienen el conjunto de datos más probables de los valores de y . Las ecuaciones para hallar los valores de m y b que minimizan la sumas de los residuales (según este método) son las siguientes:

$$m = \frac{n \sum(x_i y_i) - \sum x_i \sum y_i}{n \sum(x_i^2) - (\sum x_i)^2} \quad (4-1)$$

$$b = \frac{\sum(x_i^2) \sum y_i - \sum(x_i y_i) \sum x_i}{n \sum(x_i^2) - (\sum x_i)^2} \quad (4-2)$$

Donde n representa el número de datos que se tienen en el ajuste. Con estas ecuaciones se puede obtener la recta que mejor se ajusta a un conjunto de datos experimentales. Para que los parámetros tengan fiabilidad es necesario conocer las incertidumbres para la pendiente m y para ordenada al origen b , las cuales están dadas en términos de la

incertidumbre al medir los valores de y (Harris, 2013). Esto se obtiene mediante el análisis de incertidumbre de las ecuaciones 4-1 y 4-2 dando como resultado:

$$s_m^2 = \frac{ns_y^2}{n \sum(x_i^2) - (\sum x_i)^2} \quad (4-3)$$

$$s_b^2 = \frac{s_y^2 \sum(x_i^2)}{n \sum(x_i^2) - (\sum x_i)^2} \quad (4-4)$$

Donde s_m^2 es una estimación de la incertidumbre (desviación estándar) de la pendiente, s_b^2 es una estimación de la incertidumbre de la ordenada al origen y s_y^2 es la incertidumbre de la población de valores de y la cual está dada por:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum(d_i^2)}{n-2}} \quad (4-5)$$

Donde d_i^2 representa los residuales. El coeficiente de determinación R^2 es de vital importancia en la regresión lineal debido que nos refleja la bondad del ajuste (Harris, 2013). El valor de R^2 siempre oscila entre 0 y 1 indicando que entre más cerca estemos del 1 mayor será el ajuste. El coeficiente de determinación, para el método de mínimos cuadrados está dado por:

$$R^2 = \frac{(n(\sum x_i y_i) - \sum x_i \sum y_i)^2}{(n \sum(x_i^2) - (\sum x_i)^2) - (n \sum(y_i^2) - (\sum y_i)^2)} = \frac{s_{xy}^2}{s_x^2 s_y^2} \quad (4-6)$$

Donde s_y^2 y s_x^2 son la desviación estándar de y e x respectivamente y s_{xy}^2 es la covarianza de (x, y) . Estas ecuaciones son las utilizadas en el método de mínimos cuadrados para realizar la regresión lineal.

4.2. Curvas de calibración

Una curva de calibración es una gráfica que representa la respuesta de un método analítico a concentraciones conocidas de un analito (Dosal and Villanueva, 2008; Harris, 2013). Esta gráfica se construye a partir de concentraciones conocidas del analito a las cuales se les llama como diluciones patrón o estándar y deben ser preparadas de forma independiente a partir de una solución madre (Dosal and Villanueva, 2008). Las disoluciones que contienen todos los reactivos, a excepción del analito, usados en el análisis son conocidos como blancos y su función es medir la respuesta del procedimiento analítico ya sea a las impurezas o especies que existan en los reactivos o el comportamiento del procedimiento sin la presencia del analito. Las curvas de calibración determinan el conjunto de concentraciones en el cual será posible cuantificar el analito por analizar, es decir permite establecer el rango de cuantificación para el analito.

En la literatura se establece que la linealidad de las curvas de calibración es un requerimiento fundamental en la práctica del análisis químico (Dosal and Villanueva, 2008).

Cuando se realizan curvas de calibración y los resultados obtenidos no muestran un comportamiento lineal, esta no linealidad se puede eliminar mediante una transformación matemática definida (Harris, 2013). El intervalo lineal puede variar de una matriz a otra que depende de las diferentes interferencias que puede tener cada una de las matrices.

Teniendo en cuenta lo anterior, se procedió a obtener las curvas de calibración para la plataforma de biosensado propuesta en el presente trabajo. En primera medida, de acuerdo con procedimiento óptimo descrito en el desarrollo experimental, se eligió el experimento en el cual se obtuvo los mejores resultados. Este experimento se muestra en la Figura 4-1. El mejor experimento se refiere a aquel que respondió mejor al criterio de biodetección de la plataforma de biosensado propuesta: entre mayor sea la concentración del analito, menor apagamiento de fluorescencia habrá (en la sección 3.3. se describe el criterio de biodetección con más detalle).

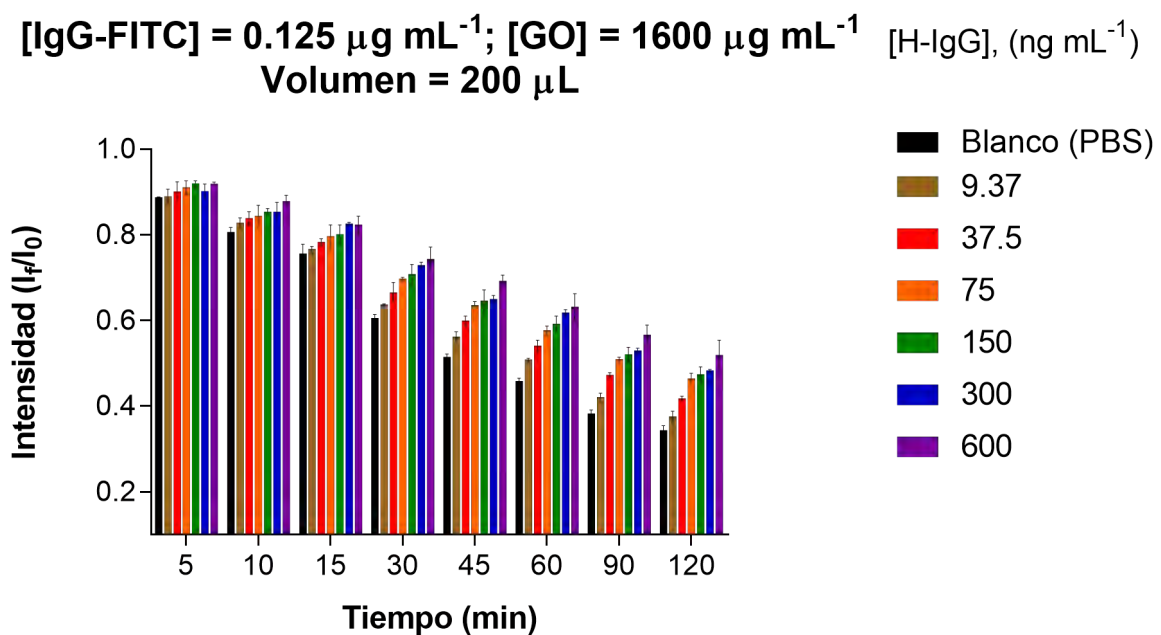


Figura 4-1. Mejor experimento obtenido con la plataforma de biosensado propuesta.

Para la construcción de las curvas de calibración se adoptó el siguiente procedimiento: primero, se preparó muestras conocidas del analito cubriendo un intervalo adecuado de concentraciones y se obtuvo la cinética (durante 2 horas) de la fluorescencia en función de estas concentraciones, como se muestra en la Figura 4-1. Posteriormente se realizó un gráfico en donde se muestra el comportamiento de la intensidad de fluorescencia de cada concentración del analito. Se realizaron dos tipos de regresiones una lineal y otra no lineal como se muestra en las Figuras 4-2 y 4-3 respectivamente. Para el ajuste lineal, primero se realizó una transformación logarítmica de las concentraciones del analito, los valores del eje x .

Después de realizar la transformación logarítmica, se aplicó la regresión lineal por medio del método de mínimos cuadrados obteniendo los ajustes mostrados en la Figura 4-2. El ajuste no lineal se realizó por medio de asociación de una fase obteniendo los ajustes mostrados en la Figura 4-3. Para saber que ajuste es más conviene, es necesario ver para cuál de los dos el coeficiente de determinación arroja mejores resultados. Estos

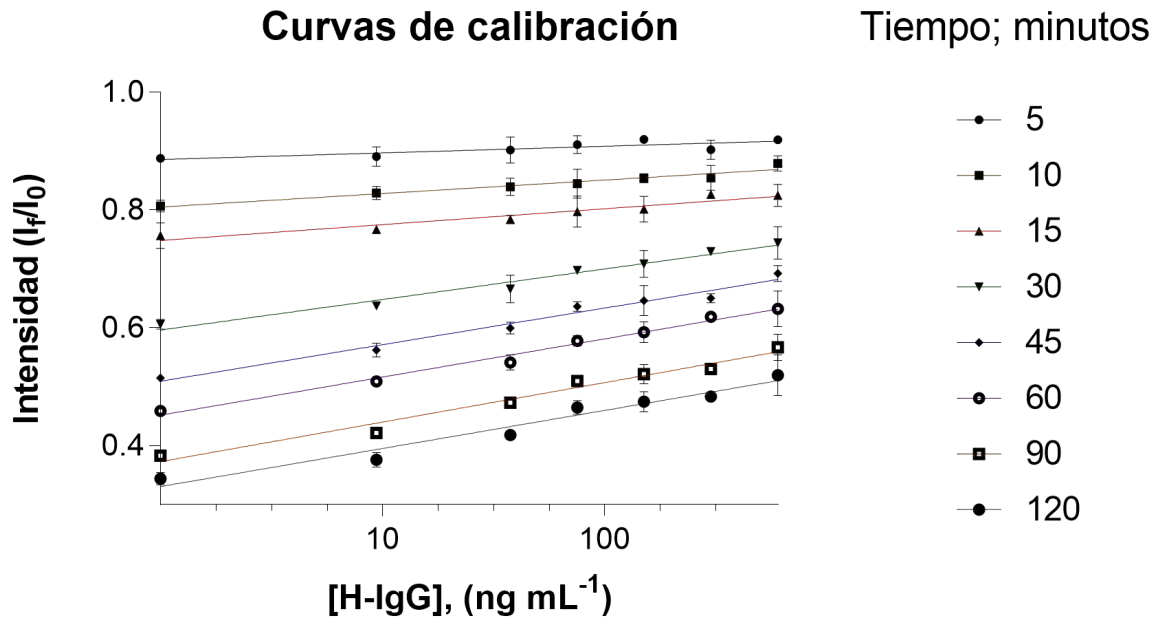


Figura 4-2. Curvas de calibración lineal del comportamiento de la intensidad de la fluorescencia para cada concentración de analito.

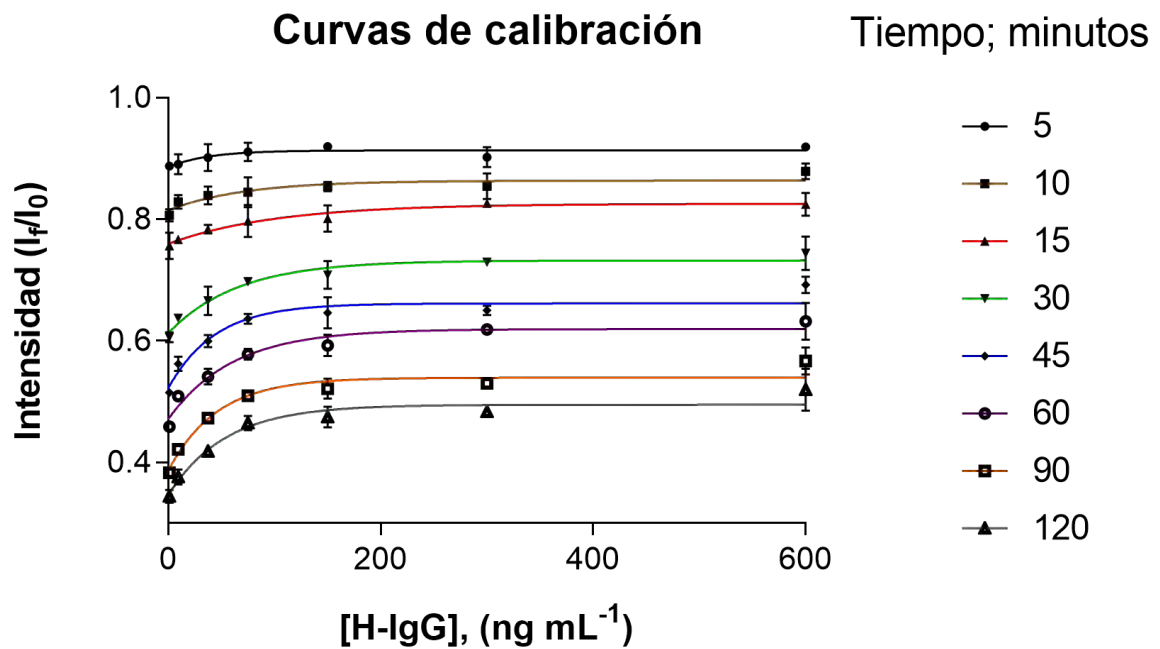


Figura 4-3. Curvas de calibración no lineal del comportamiento de la intensidad de la fluorescencia para cada concentración de analito.

Tabla 4-1. Coeficientes de determinación para los ajustes lineales y no lineales.

R^2	5 min	10 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
regresión Lineal	0.7046	0.9414	0.9207	0.9755	0.9752	0.9869	0.9731
Regresión no Lineal	0.3948	0.5972	0.732	0.9024	0.9047	0.929	0.9441

resultados se muestran en la Tabla 4-1 para cada uno de los ajustes. Como vemos en la tabla, los valores de R^2 para el ajuste lineal son mejores que para el no lineal mostrado que los análisis que se realicen serán más confiables partiendo de la regresión lineal.

De acuerdo con estos resultados, las curvas de calibración mostradas en la Figura 4-2 nos indican que el apagamiento de fluorescencia es inversamente proporcional a la concentración del analito, lo que es congruente con el principio de funcionamiento de la plataforma de biosensado. La cuestión que surge ahora es seleccionar aquellas curvas de calibración con las que se tengan los mejores resultados. De acuerdo con la Tabla 4-1, las curvas de calibración para los 30, 45, 60 y 90 minutos fueron las que mostraron los mejores ajustes. El siguiente paso es calcular los parámetros de la pendiente m y la ordenada al origen b para poder establecer la ecuación de la recta del ajuste lineal. En las Figuras 4-4, 4-5, 4-6 y 4-7 se muestran los cálculos pertinentes para las curvas de calibración para los 30, 45, 60 y 90 minutos respectivamente, utilizando una regresión lineal, cuyo coeficiente de determinación (R^2) es mejor comparado con aquel de la regresión no lineal, como se comentó anteriormente.

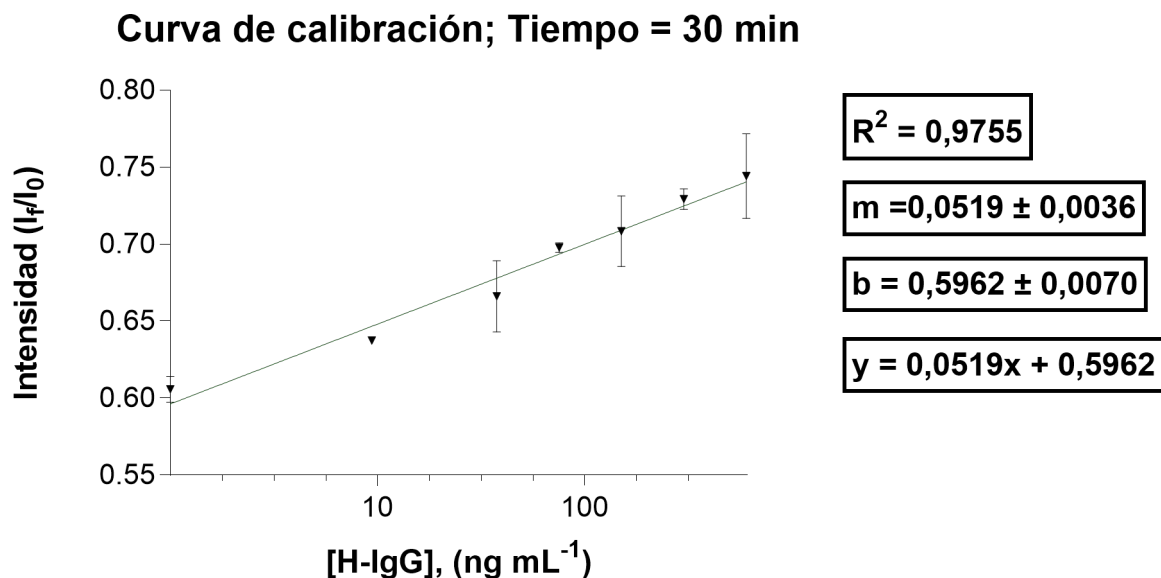


Figura 4-4. Curva de calibración para los 30 minutos. Se puede observar los parámetros de m , b y R^2 con su respectiva ecuación.

En las gráficas se puede observar que también se realizó el cálculo de las incertidumbres para la pendiente y la ordenada al origen de acuerdo con las ecuaciones 4-3 y 4-4 respectivamente. De esta forma, fue posible establecer la ecuación de la recta que más se ajusta a los datos experimentales, para los tiempos dados. Estos resultados son de gran

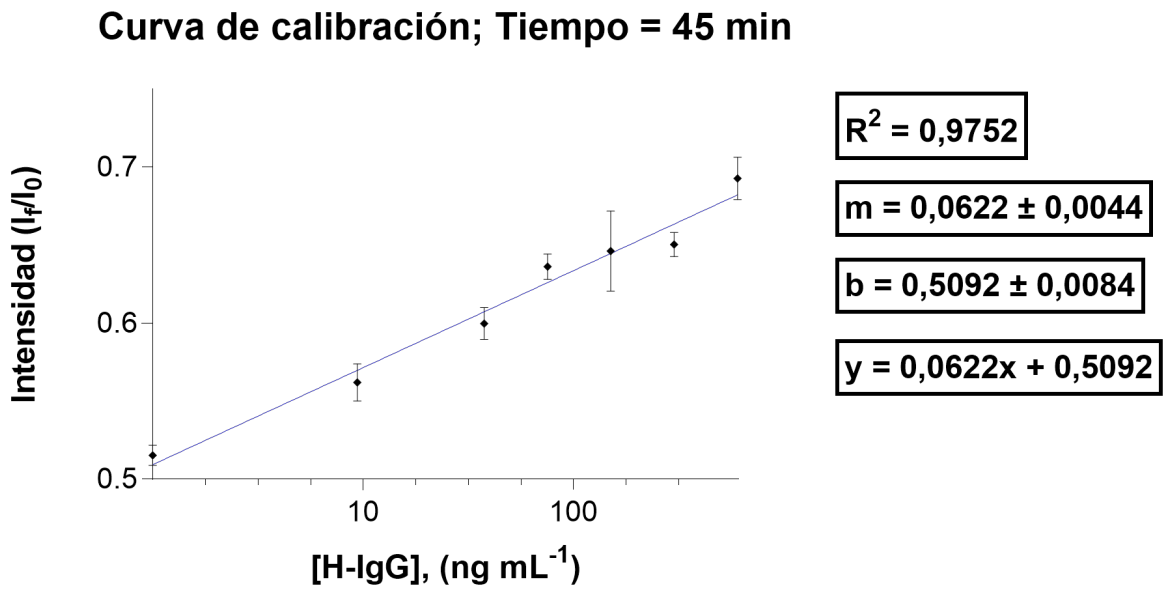


Figura 4-5. Curva de calibración para los 45 minutos. Se puede observar los parámetros de m , b y R^2 con su respectiva ecuación.

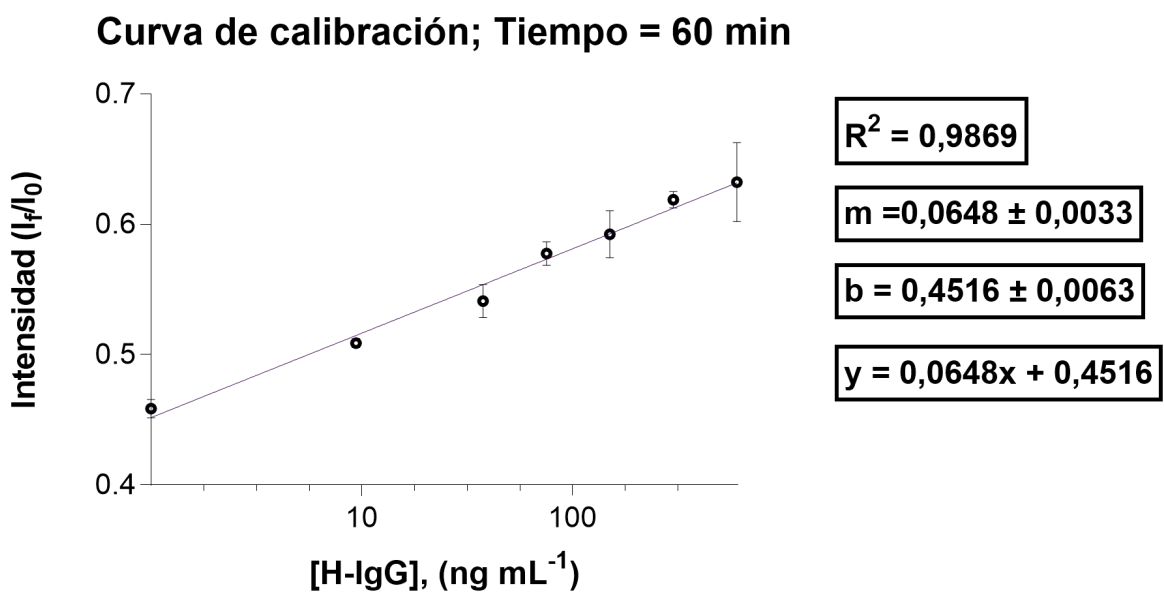


Figura 4-6. Curva de calibración para los 60 minutos. Se puede observar los parámetros de m , b y R^2 con su respectiva ecuación.

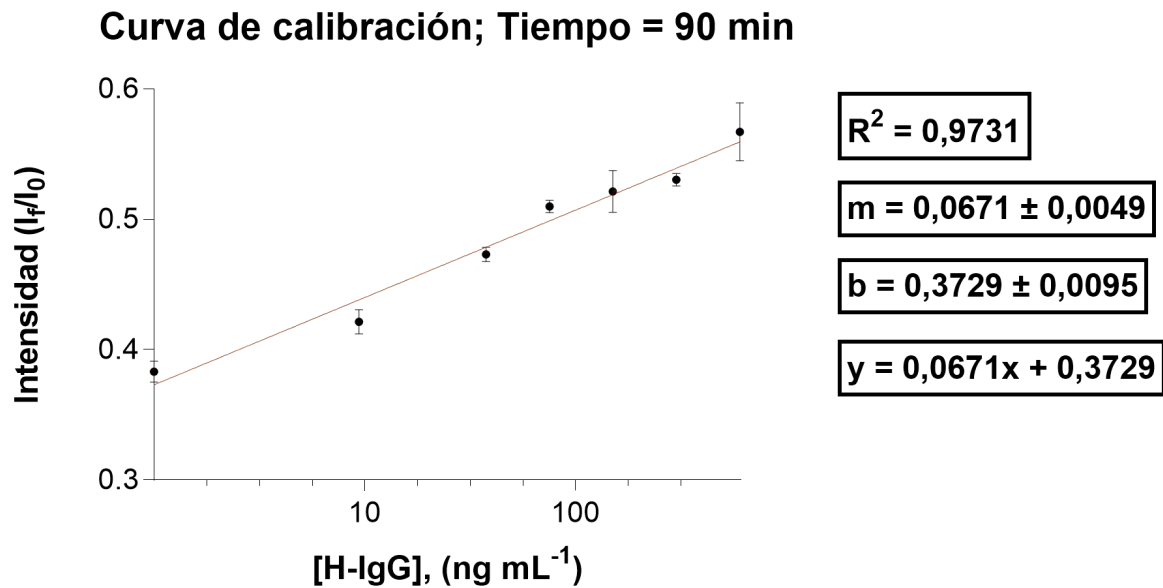


Figura 4-7. Curva de calibración para los 90 minutos. Se puede observar los parámetros de m , b y R^2 con su respectiva ecuación.

importancia para otros cálculos como se verá en las próximas secciones.

4.3. Límites de detección, cuantificación y el intervalo analítico

La validación y calidad de un método analítico evalúa en términos de la sensibilidad, la estabilidad del analito, el tiempo que lleva el tiempo para la detección, la facilidad del análisis y el costo de este (Shrivastava and Gupta, 2011). De igual forma, parámetros como el límite de detección LDD, el límite de cuantificación LDC y el intervalo analítico IA son de gran importancia para validar la calidad y eficiencia de un método analítico (Dosal and Villanueva, 2008). LDD y LDC son términos que se utilizan para establecer la cantidad mínima de analito que se puede detectar mediante determinado método analítico desarrollado. A primera vista parece ser que estos parámetros son iguales, pero en realidad tienen significados diferentes. LDD: se refiere a la mínima cantidad de analito que puede ser detectado sin la necesidad de obtener buena precisión y exactitud. En contraste LDC: se refiere a la mínima concentración del analito que puede ser detectado con un nivel de exactitud y precisión aceptables bajo determinadas condiciones de ensayo (para este caso estas condiciones de ensayo se describen en el desarrollo experimental) (Dosal and Villanueva, 2008; Shrivastava and Gupta, 2011). Por otro lado, el IA se define como aquel intervalo de concentración en el cual el analito puede ser determinado sin que se pierda la linealidad (Dosal and Villanueva, 2008).

Los métodos más utilizados para estimar o calcular el LDC y el LDD son mediante la relación de señal-ruido y por medio de la desviación estándar del blanco y de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración (Shrivastava and Gupta, 2011). Para el presente trabajo, el cálculo de estos parámetros se hará por medio de la desviación

estándar del blanco y de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración. Para que este método sea efectivo, es necesario que el error en la medida del blanco sea pequeño de lo contrario el resultado obtenido será poco confiable. Las ecuaciones utilizadas para calcular el LDD y LDC son las siguientes:

$$LDD = \frac{(\Delta BL - 3S_{BL}) - b}{m} \quad (4-7)$$

$$LDC = \frac{(\Delta BL - 10S_{BL}) - b}{m} \quad (4-8)$$

Donde ΔBL representa el promedio del blanco y S_{BL} la desviación estándar del blanco. Aclarado esto, se puede calcular los LDD y LDC que habría para los tiempos de 30, 45, 60 y 90 minutos mostrados en las Figuras 4-4, 4-5, 4-6 y 4-7 respectivamente. Los valores de LDD y LDC para el tiempo de 30 minutos que se obtiene a partir del blanco es:

$$LDD = \frac{(0,63061) - 0,5962}{0,0519} = 0,663$$

$$LDC = \frac{(0,688781) - 0,5962}{0,0519} = 1,783$$

Como se realizó una transformación logarítmica, realizamos la potencia en base 10 para saber los resultados obteniendo así:

$$\boxed{LDD=4.6 \text{ ng mL}^{-1}}$$

$$\boxed{LDC=60.6 \text{ ng mL}^{-1}}$$

Realizando el mismo proceso para el tiempo de 45 minutos obtenemos los siguientes resultados para el LDD y LDC:

$$\boxed{LDD=2.56 \text{ ng mL}^{-1}}$$

$$\boxed{LDC=13.7 \text{ ng mL}^{-1}}$$

Para los 60 minutos obtenemos los siguientes resultados para el LDD y LDC:

$$\boxed{LDD=2.71 \text{ ng mL}^{-1}}$$

$$\boxed{LDC=15.5 \text{ ng mL}^{-1}}$$

Finalmente, para los 90 minutos obtenemos los siguientes resultados para el LDD y LDC:

$$\boxed{LDD=3.24 \text{ ng mL}^{-1}}$$

$$\boxed{LDC=22.3 \text{ ng mL}^{-1}}$$

4.4. Precisión y exactitud

En el lenguaje común estas dos palabras pueden parecer sinónimos, pero en estadística estas dos tienen un significado muy diferente una de la otra. La *Precisión* se define como la dispersión que se obtiene de medidas repetidas para la misma muestra homogénea (Findlay et al., 2000). Por lo general, se expresa mediante el coeficiente de variación C.V y cuanto menor es este C.V, más precisa es la serie de medidas (Harris, 2013). La ecuación del C.V (que cuantifica la precisión) está dada por:

$$P = \frac{s}{\Delta x} 100 \% \quad (4-9)$$

Donde s es la desviación estándar y Δx es la media o promedio. De acuerdo con esta ecuación, se calculó el porcentaje de la precisión para cada una de las concentraciones analizadas en los tiempos mostrados anteriormente. En la Tabla 4-2 se muestra los resultados para cada concentración.

Tabla 4-2. Precisiones para cada concentración del analito en cada tiempo.

[H-IgG]	C.V (30 min)	C.V (45 min)	C.V (60 min)	C.V (90 min)
Blanco	1.37 %	1.26 %	1.53 %	2.10 %
9.37 ng mL⁻¹	0.27 %	2.10 %	0.69 %	2.18 %
37.5 ng mL⁻¹	3.49 %	1.72 %	2.35 %	1.16 %
75 ng mL⁻¹	0.44 %	1.29 %	1.59 %	0.93 %
150 ng mL⁻¹	3.24 %	3.98 %	3.04 %	3.10 %
300 ng mL⁻¹	0.92 %	1.19 %	1.0 %	0.89 %
600 ng mL⁻¹	3.71 %	1.96 %	4.80 %	3.93 %

Para el presente trabajo se tomaron como referencia las pautas de validación de la administración de alimentos y medicamentos para inmunoensayos farmacocinéticos que estipula un criterio aceptable de precisión cuando se obtiene resultados de menos del 30 % (Morales-Narváez et al., 2012; Urbanowska et al., 2006). Como vemos de la Tabla 4-2, los porcentajes varían dentro un rango del 0.27 % hasta aproximadamente el 5 % indicando que todas las concentraciones bajo análisis se detectaron con una alta precisión.

Por otro lado, la *exactitud* se refiere a la proximidad del valor medido experimentalmente al valor verdadero o teórico (Harris, 2013). Se puede expresar mediante el porcentaje de recuperación (cercanía) del valor medido experimentalmente al valor teórico verdadero mediante la siguiente ecuación:

$$E = \frac{\text{valor medido}}{\text{valor esperado}} 100 \% \quad (4-10)$$

Para conocer la exactitud, se prepararon tres concentraciones virtualmente desconocidas con la intención de conocer el valor que se obtiene (para cada una) cuando se interpole con la ecuación de la curva de calibración. En la Figura 4-8 se muestra la cinética obtenida para estas concentraciones. Las concentraciones fueron preparadas por una persona ajena a quienes desarrollaron el presente trabajo. Hay que aclarar que la cinética realizada para estas concentraciones se realizó junto al experimento descrito en secciones anteriores.

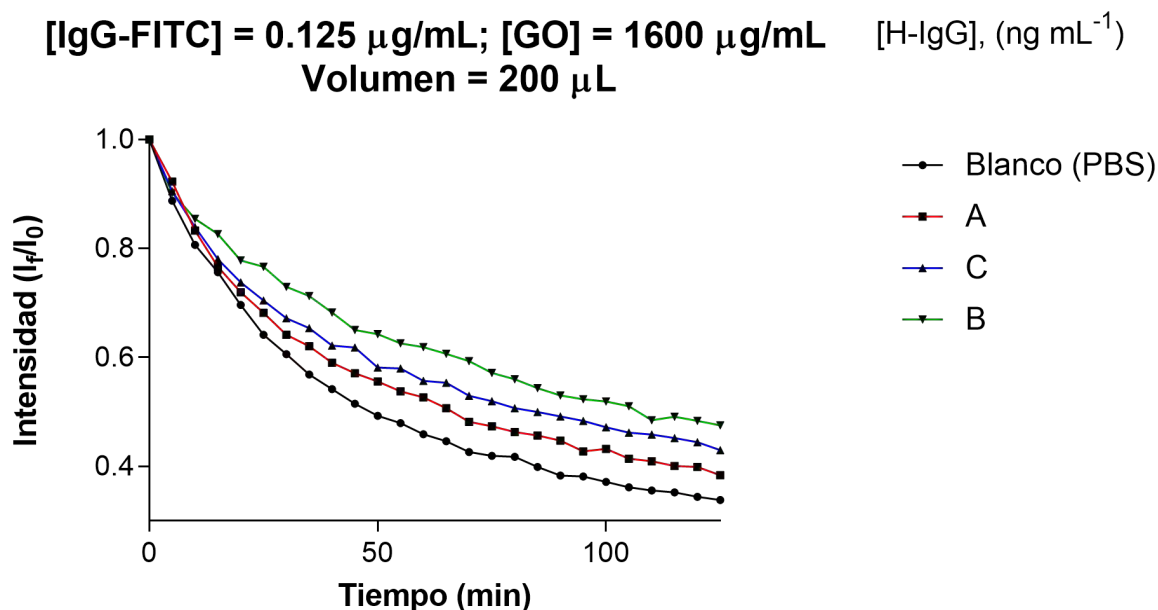


Figura 4-8. Gráfica de apagamiento de la intensidad de fluorescencia para concentraciones desconocidas del analito.

Para obtener los valores de las tres concentraciones mostradas en la Figura 4-8 se hace uso de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración para cada tiempo. Donde el valor de x será el valor obtenido para cada una de las concentraciones. Para el ajuste de 30 minutos tenemos que:

$$y = 0,0519x + 0,5962 \rightarrow x = \frac{\Delta y - 0,5962}{0,0519}$$

Entonces el valor que tendrán las concentraciones trascurridos 30 minutos serán:

$$A = \frac{(0,6412) - 0,5962}{0,0519} = 0,869$$

$$B = \frac{(0,7293) - 0,5962}{0,0519} = 2,564$$

$$C = \frac{(0,6717) - 0,5962}{0,0519} = 1,456$$

De igual forma que para el cálculo del LDD y LDC, debemos realizar la potencia en base 10 para saber los resultados obteniendo así:

$$A = 7.39 \text{ ng mL}^{-1}$$

$$B = 366 \text{ ng mL}^{-1}$$

$$C = 28.5 \text{ ng mL}^{-1}$$

Los valores esperados para las concentraciones son: $A = 15 \text{ ng mL}^{-1}$, $B = 300 \text{ ng mL}^{-1}$ y $C = 50 \text{ ng mL}^{-1}$. Realizando el mismo procedimiento para los 45, 60 y 90 minutos y de acuerdo con la ecuación 4-10, la exactitud obtenida en cada tiempo analizado para A, B y C se muestra en la Tabla 4-3

Tabla 4-3. Valores medidos y exactitud de A, B Y C para cada uno de los tiempos analizados.

Tiempo (minutos)	[H-IgG] medido ng mL	Exactitud
30	A = 7.39	EA = 49.2 %
	B = 366	EB = 122 %
	C = 28.5	EC = 57 %
45	A = 9.8	EA = 65.3 %
	B = 185	EB = 61.6 %
	C = 56.8	EC = 113.6 %
60	A = 14.1	EA = 94 %
	B = 379	EB = 126 %
	C = 41.9	EC = 83.8 %
90	A = 12.8	EA = 85 %
	B = 220	EB = 73 %
	C = 59.1	EC = 118 %

De igual forma, se adoptó las pautas de validación de la administración de alimentos y medicamentos para inmunoensayos farmacocinéticos que estipula un criterio aceptable de exactitud para un rango de variación de 70 % hasta 130 % (Morales-Narváez et al., 2012; Urbanowska et al., 2006). Entonces de acuerdo con los resultados obtenidos, para los tiempos de 60 minutos y 90 minutos se tienen valores dentro de este rango siendo los únicos dos que muestran una exactitud aceptable.

4.5. Sensibilidad y especificidad

Al igual que los conceptos anteriores, la sensibilidad y especificidad son de vital importancia para la validación de un método analítico. La sensibilidad se define con la capacidad que tiene un método analítico para diferenciar pequeñas diferencias de concentraciones de un analito (Dosal and Villanueva, 2008). La *sensibilidad* de un método analítico depende directamente de la pendiente; entre mayor sea la pendiente, más sensible es el método. Cuando se tiene un ajuste no lineal para un método analítico, se suele considerar su intervalo lineal para cálculos de sensibilidad puesto que cuando se pierde linealidad la pendiente también cambia (Danzer and Currie, 1998). De esta forma, observando las curvas de calibración para los tiempos analizados, se observa que para el tiempo de 90 minutos la pendiente es mayor (Figura 4-7) siendo así el tiempo en el cual se obtiene la mayor sensibilidad.

Por otro lado, la especificidad se define como capacidad de un determinado método analítico de detectar y medir a un analito de forma inequívoca en presencia de otros componentes que pueden existir en una muestra (Findlay et al., 2000; Harris, 2013). Para verificar la especificidad de la plataforma de biosensado propuesta, se realizó un

experimento en el cual se utilizó la proteína albúmina de suero bovino BSA. Este consistió en realizar la cinética de ciertas concentraciones de BSA bajo las condiciones óptimas de biosensado. De igual forma, se mezcló H-IgG con la proteína BSA para observar si se detectaba el analito. Las concentraciones de H-IgG utilizadas fueron 1200 ng mL^{-1} y 600 ng mL^{-1} y cada una de estas se mezcló con una concentración de BSA de 600 ng mL^{-1} . En la figura 4-9 se muestra los resultados para este experimento.

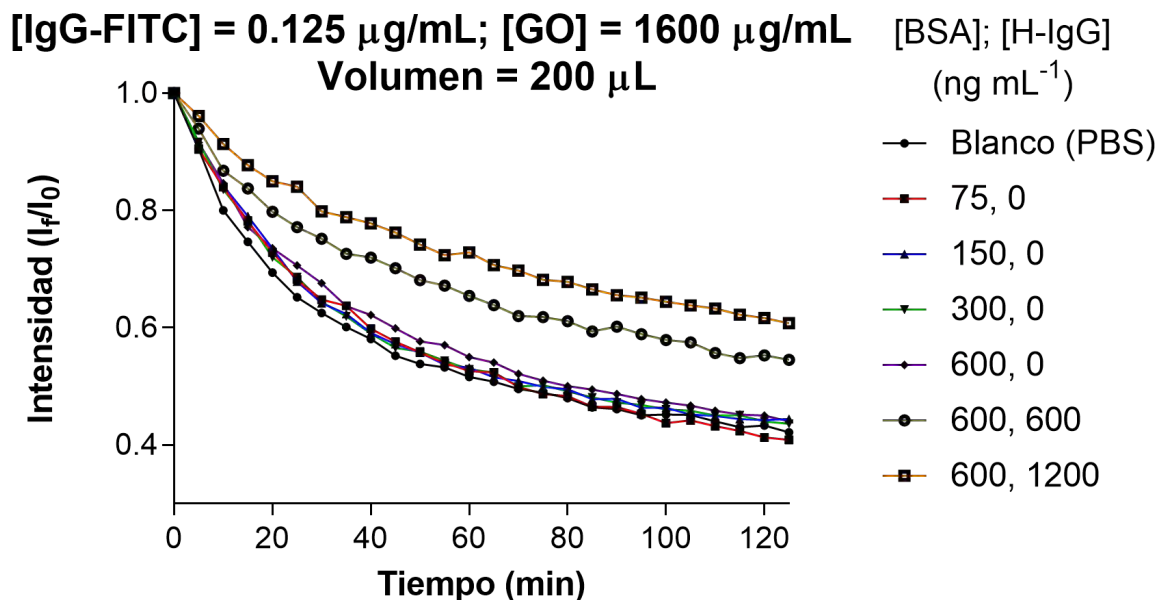


Figura 4-9. Prueba de especificidad para la plataforma de biosensado propuesta. Se puede observar que para ninguna de las concentraciones de ASB hay una diferencia apreciable respecto al blanco.

Como se observa en la Figura 4-9, prácticamente todas las concentraciones de BSA tienen un comportamiento similar al blanco indicando que no hubo interferencias que pudieran afectar la cinética del experimento. La matriz empleada en este experimento fue PBS (por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*), es decir que todas las concentraciones fueron diluidas en PBS. En contraste, claramente hay una detección para las concentraciones de H-IgG empleadas en este experimento indicando que el anticuerpo empleado en este trabajo tiene una buena afinidad por su respectivo analito. Las altas concentraciones del analito empleadas en este experimento fueron intencionalmente seleccionadas para hacer evidente la detección puesto que con bajas concentraciones podía haber cierta dificultad en observar esta diferencia. En la Tabla 4-4 se resume todos los resultados obtenidos de las curvas de calibración para los tiempos analizados en esta sección.

Tabla 4-4. Resultados relevantes para cada uno de los tiempos analizados en este capítulo.

Tiempo (minutos)	LDD ng mL ⁻¹	LDC ng mL ⁻¹	[H-IgG] ng mL ⁻¹	C.V %	[H-IgG] medido ng mL ⁻¹	Exactitud %	R ²
30	4.6	60.6	Blanco	1.37	A = 7.39	EA = 49.2	0.9755
			9.37	0.27			
			37.5	3.49	B = 366	EB = 122	
			75	0.44			
			150	3.24	C = 28.5	EC = 57	
			300	0.92			
			600	3.71			
45	2.56	13.7	Blanco	1.26	A = 9.8	EA = 65.3	0.9752
			9.37	2.10			
			37.5	1.72	B = 185	EB = 61.6	
			75	1.29			
			150	3.98	C = 56.8	EC = 113.6	
			300	1.19			
			600	1.96			
60	2.71	15.5	Blanco	1.53	A = 14.1	EA = 94	0.9869
			9.37	0.69			
			37.5	2.35	B = 379	EB = 126	
			75	1.59			
			150	3.04	C = 41.9	EC = 83.8	
			300	1.0			
			600	4.80			
90	3.24	22.3	Blanco	2.10	A = 12.8	EA = 85	0.9731
			9.37	2.18			
			37.5	1.16	B = 220	EB = 73	
			75	0.93			
			150	3.10	C = 59.1	EC = 118	
			300	0.89			
			600	3.93			

4.6. Referencias

- Danzer, K., Currie, L., 1998. Guidelines for calibration in analytical chemistry. IUPAC, 4 70, 993–1014.
- Dosal, M., Villanueva, M., 2008. Curvas de calibración en los métodos analíticos.
- Findlay, J.W.A., Smith, W.C., Lee, J.W., Nordblom, G.D., Das, I., DeSilva, B.S., Khan, M.N., Bowsher, R.R., 2000. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. J. Pharm. Biomed. Anal. 21, 1249–1273. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00244-7)
- Harris, D., 2013. Análisis químico cuantitativo, 3rd ed. Reverté.
- Morales-Narváez, E., Montón, H., Fomicheva, A., Merkoçi, A., 2012. Signal Enhancement in Antibody Microarrays Using Quantum Dots Nanocrystals: Application to Potential Alzheimer's Disease Biomarker Screening. Anal. Chem. 84, 6821–6827. <https://doi.org/10.1021/ac301369e>
- Shrivastava, A., Gupta, V., 2011. Methods for the determination of limit of detection

and limit of quantitation of the analytical methods. *CYS* 2, 21–25.
<https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>

- Urbanowska, T., Mangialaio, S., Zickler, C., Cheevapruk, S., Hasler, P., Regenass, S., Legay, F., 2006. Protein microarray platform for the multiplex analysis of biomarkers in human sera. *J. Immunol. Methods* 316, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.03.019>

Conclusiones

Se desarrolló una novedosa plataforma de biosensado para la detección de IgG humano basada en el apagamiento de fluorescencia causada por el GO. Este trabajo es relevante puesto que se obtiene una excelente eficiencia de apagamiento de fluorescencia permitiendo que el principio de funcionamiento pensado antes de llevar a cabo los experimentos funcione correctamente en la práctica. En promedio se obtuvo una eficiencia de apagamiento entre el 60 % y el 70 %.

Con este método fue posible alcanzar buenos límites de detección y cuantificación para tiempos cortos, lo cual es fundamental en el desarrollo de un sistema de biosensado. Por otro lado, de acuerdo con los resultados que se muestran en la Tabla 4-3, fue posible establecer valores de concentraciones del analito virtualmente desconocidas con una buena exactitud para los tiempos de 60 y 90 minutos; medir concentraciones conocidas del analito con excelente precisión gracias al buen ajuste lineal que se obtuvo de los datos experimentales. De igual forma, se logró realizar una plataforma de biosensado sencilla, fácil de usar, rápida y sin la necesidad de utilizar tantos elementos para su funcionamiento. Solo fue necesario utilizar un anticuerpo conjugado con el fluoroforo en esta propuesta haciéndola muy ventajosa para la detección de IgG humano sin perder especificidad y sensibilidad.

Como se comentó, factores como la agitación y el pipeteo fueron de gran utilidad para una mejor homogeneización contribuyendo en una biodetección y mayor apagamiento de fluorescencia en tiempos más cortos. Por otro lado, de aquí se desprende una de las principales desventajas que se observó de esta propuesta de biosensado la cual es que la obtención de resultados con buena precisión y exactitud está directamente relacionada con las habilidades de pipeteo que tenga la persona que realiza el experimento. Si se quiere aplicar esta propuesta de biosensado al diagnóstico médico, se hace necesario en idear formas de solucionar este tipo de inconvenientes para no agregar más parámetros a considerar cuando se examinen muestras reales.

Futuros trabajos están relacionados con determinar si esta propuesta de biosensado es adecuada para la detección de otros analitos ya sean bacterias, otras proteínas o toxinas. De igual forma, sería interesante observar si con otros fluoroforos se podría incrementar el rendimiento analítico de esta propuesta. Si el método muestra ser una plataforma universal, podría ser utilizado para el diagnóstico rápido y de bajo costo de diversos biomarcadores basados en proteínas clínicamente relevantes como por ejemplo la alfa-fetoproteína asociada con cáncer de hígado, la HSP72 (*Heat Shock Protein 72*) asociada con falla renal aguda, la glucoproteína CA-125 asociada con el cáncer de ovario, las proteínas S100 asociadas con melanoma, y mucho otros. Una de las metas más ambiciosa que se tiene para un futuro está relacionada con la obtención de límites de detección lo más bajo posibles. De hecho, muchas de las propuestas de biosensado que se encuentran en

la literatura están pensadas con alcanzar este objetivo puesto que es de vital importancia para aplicaciones relacionadas con el diagnóstico temprano de enfermedades terminales.

Apéndice A

Anexo: Otros experimentos analizados

otros experimentos fueron analizados y comparados para determinar cual de todos estos fue el que mejores resultados mostró. A continuación, se muestran estos experimentos y se aclara la razón por la cual se escogió el experimento que se analiza en el capítulo 4. cabe resaltar que, la forma de análisis para todos estos experimentos fue la misma que se describió en el capítulo 4.

Primer experimento con buenos resultados

Uno de los primeros experimentos con buenos resultados que se obtuvo bajo las condiciones optimas se muestra en la figura A-1. Las barras de error obtenidas en este experimento para prácticamente todas las concentraciones fueron muy buenas. Esto podría indicar que estas concentraciones del analito se midieron con una gran precisión.

[IgG-FITC] = 0.125 $\mu\text{g/mL}$; [GO] = 1600 $\mu\text{g/mL}$ [H-IgG], (ng mL^{-1})
Volumen = 200 $\mu\text{g/mL}$

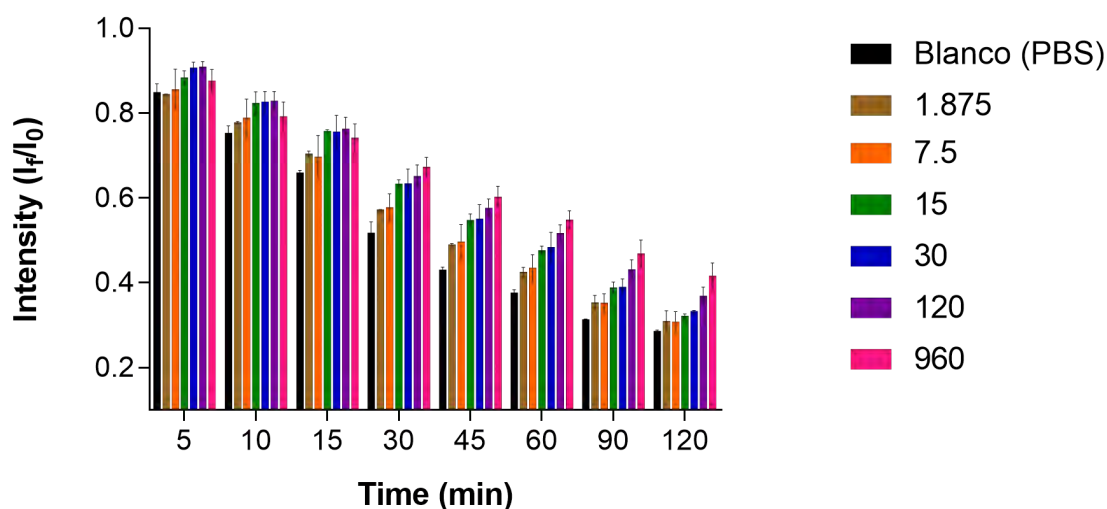


Figura A-1. Primer experimento obtenido con la plataforma de biosensado propuesta.

Después de realizar las curvas de calibración para este experimento, de acuerdo al coeficiente de determinación, se observó que la mejor curva que se obtuvo fue aquella para los 60 minutos. Esta se observa en la figura A-2. Vemos que, aunque parámetros como LDD y LDC son mejores que para el experimento analizado en el capítulo 4, el coeficiente de determinación para este experimento es menor que para el mejor experimento analizado.

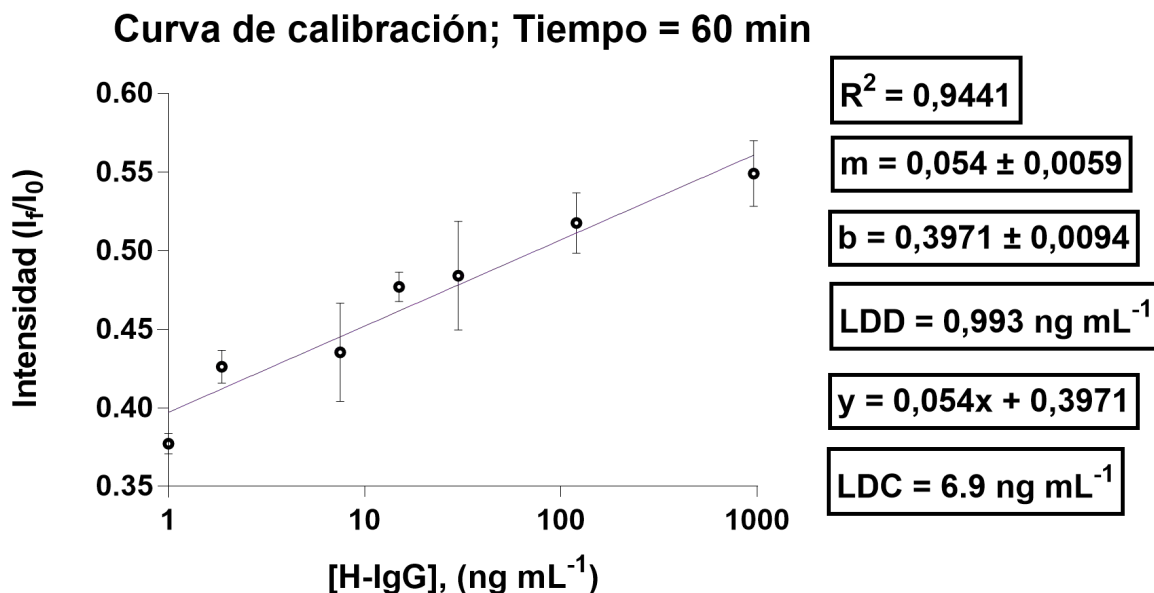


Figura A-2. Curva de calibración para el primer experimento obtenido.

En la figura A-1 se muestran todos los parámetros que se calcularon para el mejor experimento. Otro criterio por el cual no fue seleccionado este experimento fue debido a que los de precisión fueron mayores respecto al mejor experimento. Como se muestra en la Tabla A-1.

Tabla A-1. Precisiones para el primer experimento descrito.

[H-IgG] ng mL	Blanco	1.87	7.5	15	30	120	960
C.V %	1.75	2.46	7.16	1.98	7.14	3.70	3.79

Entonces, de acuerdo a los resultados, las desviaciones verticales para este experimento son más altas que para el mejor experimento. Por todos estos motivos este experimento no fue escogido para ser analizado en el capítulo 4.

Segundo experimento con buenos resultados

Este experimento mostró unos resultados un poco diferentes respecto a los demás. Como se muestra en la figura A-2, al parecer se alcanzó una saturación a partir de la concentración de 30 ng mL^{-1} .

La mejor curva de calibración fue igualmente para los 60 minutos. De igual forma, como

**[IgG-FITC] = 0.125 $\mu\text{g mL}^{-1}$; [GO] = 1600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [H-IgG], (ng mL^{-1})
Volumen = 200 μL**

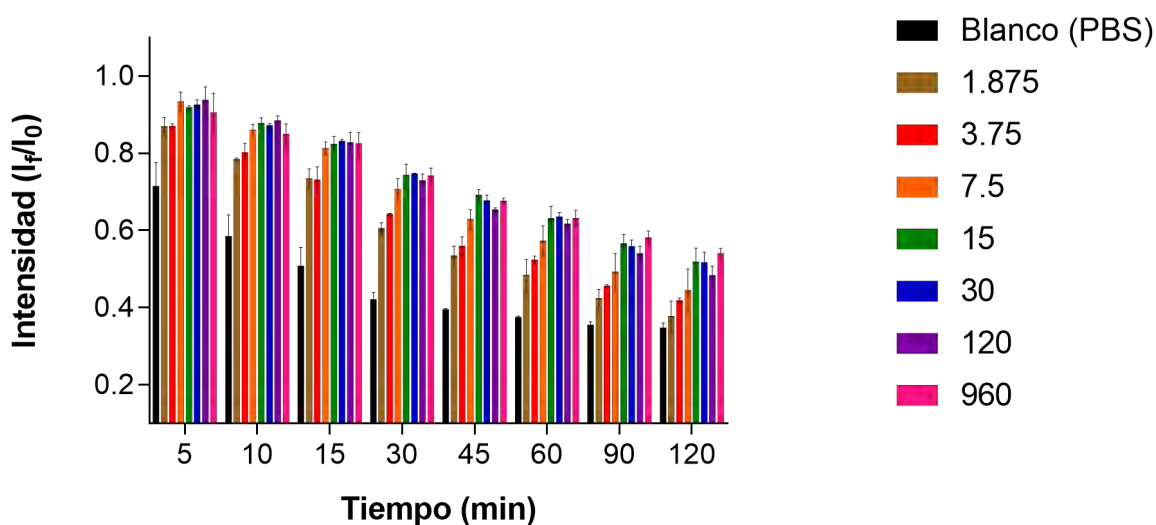


Figura A-3. Segundo experimento obtenido con la plataforma de biosensado propuesta.

se observa, el coeficiente de determinación no es tan bueno como el mejor experimento. Los parámetros para este experimentos se muestran en la figura A-4.

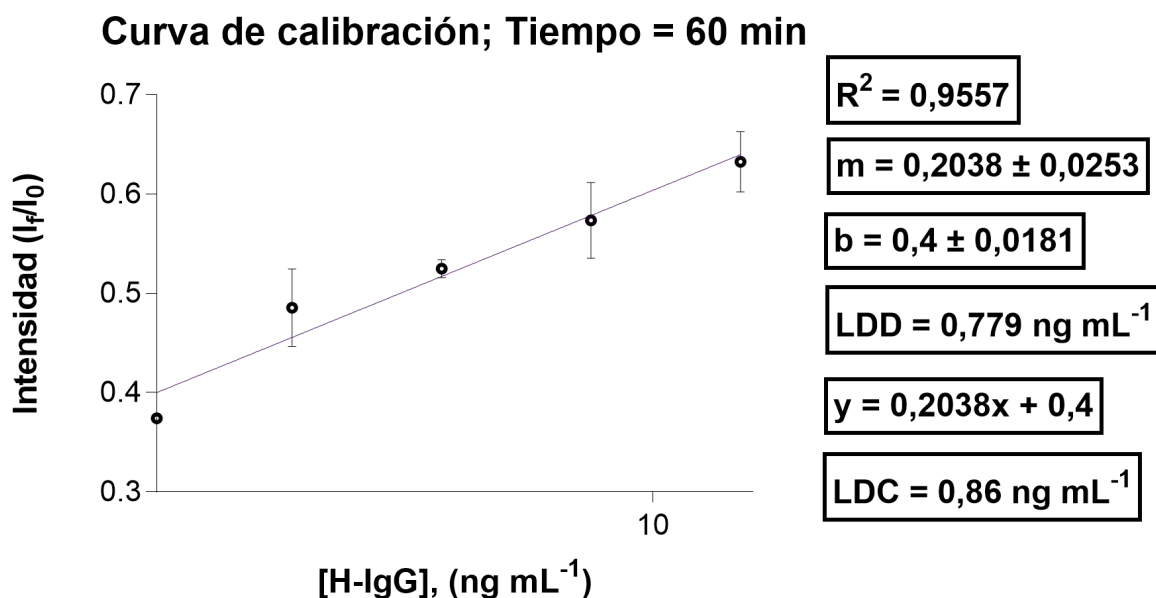


Figura A-4. Curva de calibración para el segundo experimento obtenido.

Por ultimo, aunque las precisiones están dentro del rango tolerable, son mayores que para el experimento analizado en el capítulo 4.

Tabla A-2. Precisiones para el segundo experimento descrito.

[H-IgG] ng mL	Blanco	1.87	7.5	15	30	120	960
C.V %	0.80	8.16	5.41	6.65	8.22	1.57	1.72

Tercer experimento con buenos resultados

Este experimento tuvo un buen comportamiento con barras de errores pequeñas. En la figura A-5 se muestra los resultados para las concentraciones del analito medidas.

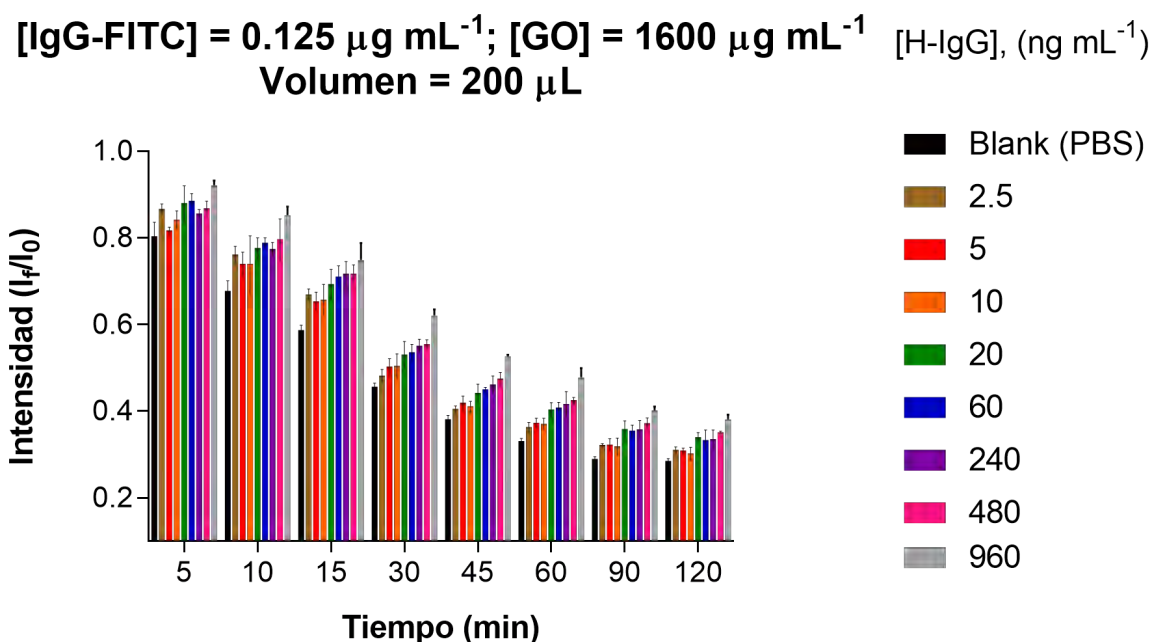


Figura A-5. Tercer experimento obtenido con la plataforma de biosensado propuesta.

Para este experimento, el mejor ajuste se dio en un tiempo menor 45 minutos. Sin embargo, su R^2 es muy baja siendo la principal razón por la que se descartó y se continuó experimentando. En la figura A-6 se muestra la curva de calibración para este experimento

Como se observa, el LDC es muy elevado haciendo que la confianza en esta configuración no sea buena. En cuanto a las precisiones, fueron muy buenas como se muestra en la Tabla A-3.

Tabla A-3. Precisiones para el tercer experimento descrito.

[H-IgG] ng mL	Blanco	2.5	5	10	20	60	240	480	960
C.V %	1.72	2.79	2.82	3.46	3.76	3.05	6.81	1.56	4.48

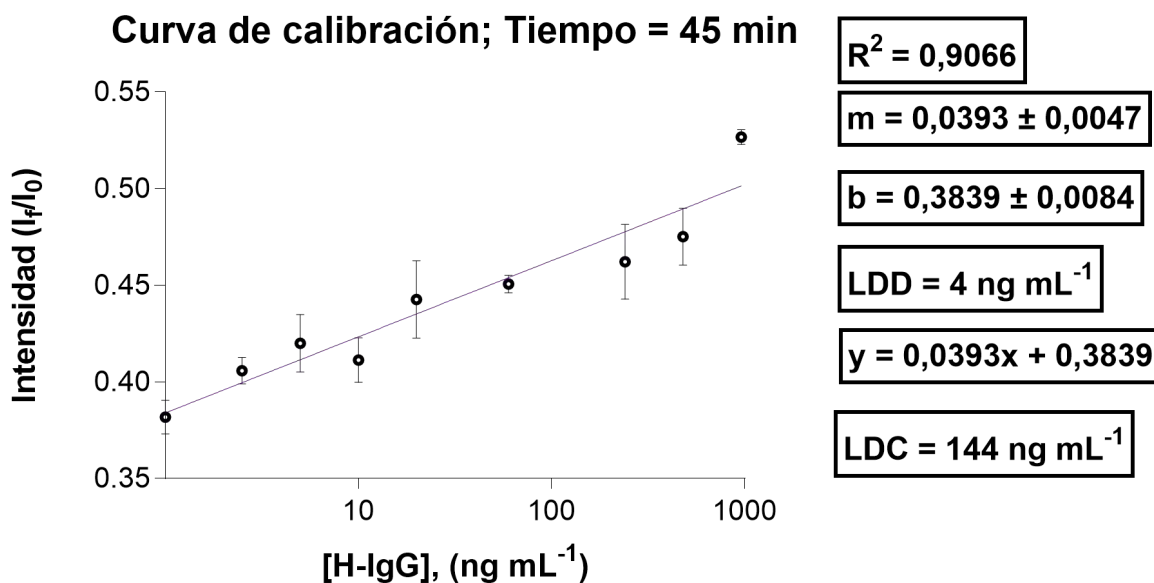


Figura A-6. Curva de calibración para el tercer experimento obtenido.

Cuarto experimento con buenos resultados

Los resultados de este experimento se muestran en la figura A-7. Como se observa, la concentración más baja del analito casi se confunde con el blanco por lo que el límite de detección estará muy cerca de esta última concentración.

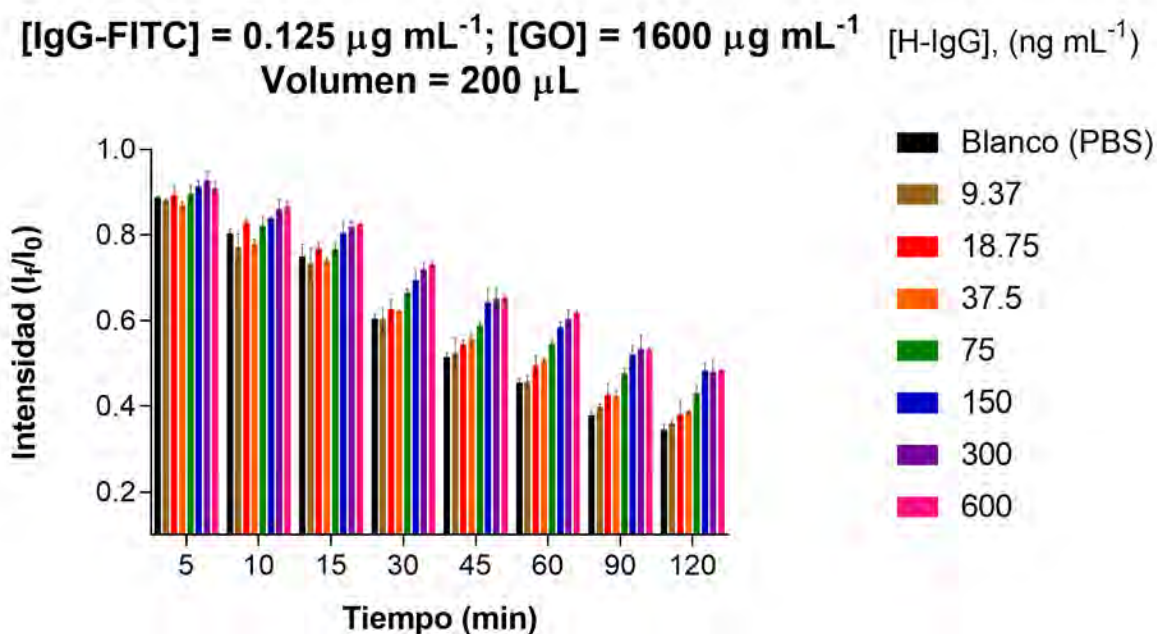


Figura A-7. Cuarto experimento obtenido con la plataforma de biosensado propuesta.

La curva de calibración para este experimento (para los 60 minutos), se muestra en la figura A-8, con todos sus respectivos parámetros. De esta se puede observar que el ajuste es muy bajo, de hecho es el peor ajuste de los experimentos descritos previamente.

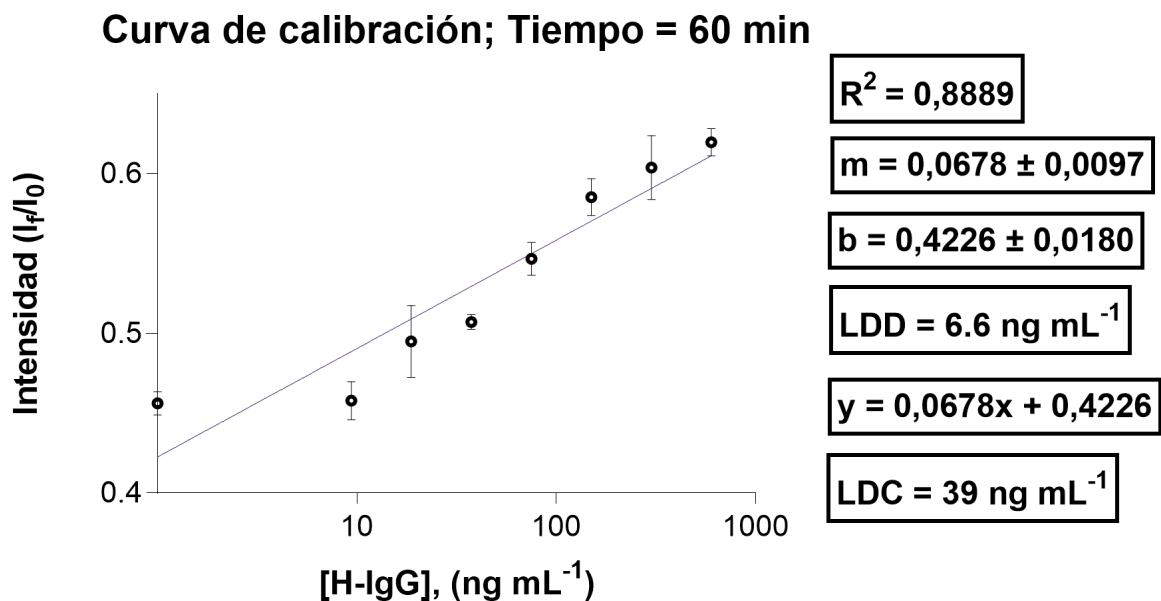


Figura A-8. Curva de calibración para el cuarto experimento obtenido.

Tabla A-4. Precisiones para el cuarto experimento descrito.

[H-IgG] ng mL	Blanco	9.37	18.75	37.5	75	150	300	600
C.V %	1.63	2.1	4.58	0.92	1.89	1.97	3.33	1.39

De igual forma, el LDC es alto para este experimento. En la Tabla A-4 se muestran las precisiones para cada una de las concentraciones.

En resumen, todos estos experimentos mostraron buena precisión para todas las concentraciones medidas. Aunque algunos de estos mostraron excelentes LDD y LDC, sus R^2 no son tan buenas siendo la principal razón de descartar estos experimentos debido a que los datos son confiables si este parámetro es mayor.