

**I
N
A
O
E**

Estudio de la funcionalización de un chip plasmónico para la detección de SARS-CoV-2

por

Andrés Ramírez Cordero

Tesis sometida como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE ÓPTICA

en el

Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica

Enero, 2024

Tonantzintla, Puebla

Supervisada por

Dr. Rubén Ramos García
Investigador titular del INAOE

Dra. María Beatriz de la Mora Mojica
Investigador externo del ICAT-UNAM

©INAOE 2024
Derechos reservados

El autor otorga al INAOE el permiso de reproducir y distribuir copias de esta tesis en su totalidad o en partes.



Resumen

La enfermedad causada por el SARS-CoV-2 ha sido objeto de estudio durante los últimos años; su importancia radica en la mortalidad, índice de contagio, mutabilidad y falta de un tratamiento médico efectivo. Por lo anterior y debido a la alta demanda de pruebas para la detección clínica, es necesario el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas para la detección del virus que sean rápidas, confiables, específicas y menos costosas. Los metales nanoestructurados poseen propiedad conocida como frecuencia de plasma a la cual ocurre una oscilación colectiva de electrones conocida como plasmón. Estas estructuras depositadas en un sustrato dieléctrico forman una interfaz en la cual se puede excitar un plasmón de superficie a una longitud de onda de resonancia característica del metal y su geometría. La interacción molecular debido a la funcionalización permite modular algunas características de la luz en la superficie del metal como la intensidad, fase y polarización. En este trabajo, esta interacción se caracterizó con un prototipo de biosensor plasmónico de transductor óptico basado en *Surface Plasmon Resonance* (SPR) empleando la configuración de Kretschmann. Se realizó un estudio sobre la funcionalización y detección *in situ* de eventos de enlace en películas ultradelgadas y nanopartículas de oro depositadas en Corning® 2947N por la técnica de *direct current* (DC) *magnetron sputtering* que constituye la base de un chip plasmónico integrado con un canal microfluídico. Se demostró la detección *in situ* del proceso de funcionalización y eventos de enlace, por medio de la obtención de sensogramas en términos de la longitud de onda de resonancia. Se llevaron a cabo ensayos por lotes y mediante la inyección de flujo utilizando oligonucleótidos sintéticos y un sistema de proteínas biotina/estreptavidina aplicables para SARS-CoV-2.

Abstract

The disease caused by SARS-CoV-2 has been subject of study in recent years. Its importance lies in its mortality rate, contagion rate, mutability, and the lack of an effective medical treatment. Due to the aforementioned reasons and the high demand for clinical detection tests, the development of new diagnostic tools for virus detection that are rapid, reliable, specific, and less expensive is necessary. Nanostructured metals possess a property known as plasma frequency, at which a collective oscillation of electrons known as plasmon occurs. These structures deposited on a dielectric substrate form an interface where a surface plasmon can be excited at a characteristic resonance wavelength of the metal and its geometry. The molecular interaction due to functionalization allows for the modulation of some characteristics of light on the metal surface, such as intensity, phase, and polarization. In this work, this interaction was characterized using a prototype of *Surface Plasmon Resonance* (SPR) based optical transducer plasmonic biosensor, using the Kretschmann configuration. A study on the functionalization and *in situ* detection of binding events in ultra-thin films and gold nanoparticles deposited on Corning® 2947N by the DC magnetron sputtering technique, which constitutes the basis of an integrated plasmonic chip with a microfluidic channel, was conducted. The real-time detection of the functionalization process and binding events was demonstrated through the acquisition of sensograms in terms of the resonance wavelength. Batch and flow injection assays were performed with synthetic oligonucleotides and a biotin/streptavidin protein scheme applicable for SARS-CoV-2.

Agradecimientos

A mis asesores, el Dr. Rubén Ramos por su casi inagotable paciencia e invaluable conocimiento, a la Dra. Beatriz de la Mora por su constante acompañamiento y por el apoyo incondicional pese a la distancia.

A mis sinodales, la Dra. Svetlana Mansurova, la Dra. Teresita Spezzia y el Dr. Francisco J. Renero por sus comentarios y retroalimentación para la mejora de este trabajo de tesis.

A mis colegas, el Mtro. Juan Pablo Cuanalo y la Mtra. Cristina Díaz y por su compañerismo, mentoría y asesoramiento.

Al Grupo de Biofotónica y al Grupo de Optoelectrónica del Departamento de Óptica del INAOE encabezados por mi asesor y la Dra. Svetlana Mansurova respectivamente. Al Dr. Alexander Malik y al Dr. Mario Moreno, académicos del Departamento de Electrónica del Instituto. Al grupo de físicos teóricos de la UNAM dirigido por el Dr. Alejandro Reyes. A la Dra. Paulina Ramos y al Dr. Jorge Donato de la Universidad de Florida.

Al Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica donde me fue posible desarrollar la parte experimental de este trabajo; a sus académicos, administrativos y técnicos por su profesionalismo y por la comunidad de la que tuve el honor de formar parte.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el otorgamiento de la beca de maestría la cual me permitió culminar mis estudios de posgrado.

Dedicatorias

A mi *madre*, por todo el amor y el consuelo, por escucharme, por entenderme y guiarme a ser una mejor persona cada día. A mi padre, por toda la confianza y el apoyo, por compartirme siempre su punto de vista y por procurar mi bienestar. No hay palabras que alcancen para agradecer todo lo que han hecho por mí.

A mis *hermanos* y *hermana*, por estar al pendiente, por intentar comprenderme y desearme lo mejor.

A mi *pareja*, por ser mi confidente, mi refugio y mi alegría; por estar conmigo en mis mejores y peores momentos.

A mi hermoso rottweiler[†], porque sé que cuando me encuentre solo y no vea sino oscuridad, al mirar a lo lejos, ahí estará cuidando siempre de mí.

A mis amigos, por todas esas charlas, por las videollamadas, por escucharme, por motivarme a seguir adelante y superarme, por las noches de desvelo jugando hasta ganar, por todos esos divertidos momentos, aunque fuese de vez en cuando (ustedes saben quienes son).

A cierto personaje que me inspirará toda la vida a ser un maestro.

A la vida por permitirme acercarme más a mi sueño...

Prefacio

En el año 2020, todos conocimos una enfermedad nueva, desconcertante, y en muchos casos mortal. Hubo una cantidad abrumadora de personas que perdieron la vida debido a la propia enfermedad, pero también debido a la ignorancia e indiferencia de las demás personas. Desafortunadamente, con el paso del tiempo, se hizo frecuente saber que algún conocido, amigo o familiar había sucumbido ante este padecimiento. Fue muy triste y frustrante aceptar una nueva normalidad donde no podíamos interactuar físicamente con las demás personas sin poner en riesgo nuestra propia integridad. Cuando aún no existía vacuna alguna, hice todo lo que estuvo a mi alcance para evitar exponerme a mí y a mi familia. Sin embargo, me contagié. Ese hecho me inundó de incertidumbre y pavor, por mí presente, por mi futuro, por lo que he hecho con mi vida y por lo que todo lo que no hice. Inmerso en mis pensamientos decidí que quería ayudar de alguna manera, que me gustaría poder hacer algo por los demás y ser parte de la solución al problema. Esa resolución me motivó a unirme a un equipo multidisciplinario y emplear mi formación como químico para hacer aportes en un proyecto de investigación que ayudase a frenar los estragos por causados por la pandemia de COVID-19. Esa misma iniciativa es por la cual aspiro una formación académica integral que me permita trabajar en beneficio de la salud de las personas.

A pesar de las dificultades que hubo para desarrollar el trabajo experimental durante una contingencia sanitaria y pese a las diferencias personales que se presentaron con algunos miembros del proyecto, agradezco mucho la oportunidad de haber formado parte de este grupo. Espero que este trabajo sea un antecedente y que, eventualmente, parte de este esfuerzo sirva para implementarse como parte de una alternativa confiable y segura en el campo de biomedicina.

Esta tesis está dirigida a todos aquellos que tengan interés en estudiar y desarrollar técnicas para el uso de biosensores en el diagnóstico clínico. Deseo que la lectura de este trabajo sea de su agrado.

Andrés R. Cordero

Índice

Resumen	I
Abstract.....	II
Agradecimientos	III
Dedicatorias.....	IV
Prefacio.....	V
Índice.....	VI
Lista de abreviaturas.....	XI
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.2.1 Técnicas de diagnóstico de SARS-CoV-2.....	4
1.2.1.1 Diagnóstico mediante pruebas comerciales.....	5
1.2.1.2 Diagnóstico mediante biosensores plasmónicos	7
1.2.2 Comparación de las técnicas de diagnóstico: selectividad, sensibilidad y costo.....	9
1.3 Justificación	11
1.4 Objetivo general.....	11
1.5 Objetivos específicos.....	12
Capítulo 2 Marco teórico.....	13
2.1 Principios de los biosensores plasmónicos	13

2.1.1	Propiedades ópticas de metales	15
2.1.2	Plasmones de superficie resonantes	22
2.1.4	Transductor óptico basado en SPR	29
2.1.4.1	Configuración de Kretschmann	31
2.1.5	Resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPR).....	33
2.1.5.2	Efecto termoplasmónico	36
2.1.6	Rendimiento de un biosensor basado en SPR	42
2.2	Aplicaciones de los biosensores plasmónicos	44
2.2.1	Detección de analitos	45
2.2.2	Interacciones moleculares	47
2.2.2.1	Fuerzas intermoleculares.....	47
2.2.2.2	Fuerzas intramoleculares.....	48
2.2.2.3	Ácidos nucleicos	50
2.2.3	SARS-CoV-2.....	52
2.2.4	Funcionalización y eventos de enlace	55
2.2.4.1	Grupo tiol.....	56
2.2.4.2	Eventos de enlace	57
Capítulo 3.	Metodología.....	59
3.1	Fabricación del chip plasmónico.....	59
3.1.1	Fabricación del sustrato	59
3.1.2	Conformación del chip plasmónico	61
3.1.3	Preparación y acoplamiento del molde de PDMS	63

3.1.4 Puesta a punto del chip plasmónico.....	66
3.2 Prototipo de biosensor plasmónico	66
3.2.1 Arreglo óptico	67
3.2.2 Interfaz del programa en LabVIEW®	71
3.2.3 Calibración de sustratos.....	72
3.3 Funcionalización del chip plasmónico	74
3.3.1 Reactivos, analitos y bioreceptores.....	74
3.3.1.1 Agua de calidad reactivo.....	74
3.3.1.2 Cloruro de sodio	75
3.3.1.3 Polihidrocloreuro de alilamina.....	76
3.3.1.4 Sulfonato de poliestireno.....	76
3.3.1.5 Oligonucleótidos sintéticos de SARS-CoV-2.....	77
3.3.1.6 Ditiotreitól.....	78
3.3.1.7 Biotina-estreptavidina	78
3.3.1.8 Polidimetilsiloxano	79
3.3.3 Preparación de analitos y bioreceptores.....	79
3.4.3.1 Indicaciones generales y medidas de seguridad	80
3.4.3.2 Protocolo para la preparación de polielectrolitos: PAH / PSS.....	81
3.4.3.3 Protocolo para la preparación de oligonucleótidos: tiolados / complementarios de SARS-CoV-2.....	83
3.4.3.4 Protocolo para la preparación de proteínas: biotina / estreptavidina	88

3.3.4 Funcionalización <i>in situ</i>	90
3.3.4.1 Funcionalización en estado transitorio.....	90
3.3.4.2 Funcionalización con flujo continuo.....	91
3.4 Detección de eventos de enlace.....	92
3.4.1 Eventos de enlace en estado transitorio	92
3.4.2 Eventos de enlace con flujo continuo.....	93
3.5 Calentamiento localizado en AuNPs	94
Capítulo 4. Discusión y análisis de resultados.....	96
4.1 Análisis de sensogramas	96
4.1.1 Funcionalización y eventos de enlace en AuNF con el esquema PAH/PSS en sistema abierto	97
4.1.2 Funcionalización e hibridación en AuNF con oligonucleótidos en NFW en sistema abierto	99
4.1.3 Funcionalización e hibridación en AuNF con oligonucleótidos en DTT en sistema abierto	102
4.1.4 Funcionalización e hibridación en AuNPs con oligonucleótidos en NFW en sistema cerrado.....	104
4.1.5 Funcionalización e hibridación en AuNPs con oligonucleótidos en NFW empleando calentamiento localizado en sistema cerrado	107
4.1.6 Funcionalización y detección de eventos de enlace en AuNF con biotina/estreptavidina en sistema abierto	110
4.1.7 Funcionalización y detección de eventos de enlace en AuNPs con biotina/estreptavidina en sistema cerrado.....	113
4.2 Comparación del biosensor plasmónico con sistemas comerciales.....	115

4.2.1 Límite de resolución.....	115
4.2.2 Rapidez, costo y especificidad	115
4.2.3 Versatilidad de aplicaciones.....	116
Capítulo 5. Conclusiones.....	118
Trabajo a futuro	120
Apéndice 1	122
A1.1 Estequiometría	122
A1.2 Preparación de disoluciones	122
A1.3 Concentración molar y porcentaje en masa.....	123
A1.4 Cálculos para la preparación de soluciones salinas.....	124
3.3.2.5 Cálculos para la preparación de polielectrolitos	125
3.3.2.6 Cálculos para la preparación de oligonucleótidos.....	126
Lista de figuras	128
Referencias	130

Lista de abreviaturas

Sustancias:

A: Adenina

Au: Oro

C: Citosina

DIW: Agua desionizada (*Deionized water*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

DTT: Ditioneitol

G: Guanina

NaCl: Cloruro de sodio

NFW: Agua libre de nucleasas (*Nuclease-free water*)

PAH: Polihidrocloruro de alilamina (*Polyallylamine hydrochloride*)

PDMS: Polidimetilsiloxano

PSS: Sulfonato de poliestireno (*Polystyrene sulfonate*)

RNA: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

SARS-CoV-2: Coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)

T: Timina

Ti: Titanio

U: Uracilo

Términos:

LbL: Capa por capa (*Layer by layer*)

LSPR: Resonancia de plasmón de superficie localizado (*Localized surface plasmon resonance*)

M_w : Peso molecular (*Molecular weight*)

n_0 : Índice de refracción

n: Número de mol

NFs: Nanopelículas (*Nanofilms*)

NPs: Nanopartículas (*Nanoparticles*)
SPR: Resonancia de plasmón de superficie (*Surface plasmon resonance*)
SPP: Plasmón polaritón de superficie (*Surface plasmon polariton*)
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)
pH: Potencial de hidrógeno
Ŷ: Flujo volumétrico
V: Volumen
Q: Energía en forma de calor
T: Temperatura
ρ: Densidad
λ: Longitud de onda
ε: Permitividad eléctrica (constante dieléctrica)
μ: Permeabilidad magnética

Unidades:

Da: Dalton	s: Segundo
g: Gramo	rad: Radián
L: Litro	RPM: Revolución por minuto
m: Metro	W: Watt
mol: Mol	°C: Grado Celsius
M: Molar	

Prefijos:

k: kilo (10^3)	p: pico (10^{-12})
m: mili (10^{-3})	f: femto (10^{-15})
μ: micro (10^{-6})	
n: nano (10^{-9})	

Capítulo 1

Introducción

1.1 Antecedentes

Un sensor es un dispositivo capaz de detectar una perturbación en un sistema [1]. Etimológicamente, del latín *sensire* cuyo significado es detectar y *bios* que significa vida, el término **biosensor** hace referencia a un sensor capaz de detectar materiales de origen biológico. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) define un biosensor como: “Un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, organelos o células para detectar compuestos químicos generalmente por señales eléctricas, térmicas u ópticas” [1, 2]. La necesidad de medir y cuantificar diversas sustancias bioquímicas impulsó el desarrollo de los primeros biosensores.

En el año 1962, Leland C. Clark presentó el desarrollo del primer biosensor basado en la enzima glucosa oxidasa [3], este dispositivo permitía medir la glucosa en sangre sentando las bases para futuros avances en detección biomolecular.

Durante los años ochenta, los biosensores se consolidaron como una herramienta poderosa en diversas aplicaciones, desde la detección de biomarcadores en el campo de la medicina, hasta el seguimiento de la calidad del agua y productos alimenticios.

En los años noventa, los dispositivos plasmónicos emergieron como una opción destacada. Representan la convergencia entre la electrónica, fotónica y la nanotecnología; proporcionando los medios necesarios para llevar a cabo investigaciones a escalas nanométricas, donde los dispositivos electrónicos convencionales resultan limitados.

A partir del año 2000, el campo en biosensores experimentó un crecimiento significativo con tendencia a la miniaturización y portabilidad. Los dispositivos personales, tales como los glucómetros para pacientes con diabetes mellitus, se volvieron cada vez más comunes; lo que facilitó la medición de los niveles de glucosa presente en el líquido intersticial en tiempo real.

En la década del 2010, se produjo una integración más estrecha entre la biotecnología y la electrónica, lo que condujo al desarrollo de biosensores más sofisticados y versátiles. Los avances en ingeniería molecular y biología sintética permitieron la creación de biosensores personalizados para una amplia gama de aplicaciones.

En términos generales, los biosensores detectan la respuesta biológica de un sistema por medio de una señal eléctrica. Para alcanzar este objetivo, se han desarrollado una gran variedad de **transductores**. En el caso particular de los biosensores con transductores ópticos, aprovechan los cambios en las propiedades ópticas en ciertos materiales cuando se unen a un objetivo específico [4].

Los biosensores ópticos se emplean desde diversos enfoques y perspectivas en función al fenómeno utilizado. Uno enfoque común es la fluorescencia, la cual implica marcar un elemento de interés con un biomarcador fluorescente y medir la emisión de luz cuando se expone a una radiación de excitación: cuando el objetivo está presente en una muestra, se produce una interacción específica con un material de reconocimiento, lo que altera las propiedades de fluorescencia y genera una señal detectable.

Otro enfoque recientemente utilizado para el desarrollo de biosensores ópticos es la **plasmónica**. Esta área se basa en el uso del fenómeno de resonancia de plasmón de superficie (SPR) presente en ciertos materiales como películas delgadas de metales [4, 5]. Este efecto consiste en la oscilación de electrones presentes en la superficie al interactuar con un campo electromagnético.

Cuando se tiene este efecto físico es posible observar un pico máximo de absorción o mínimo de reflexión, que es sensible a cualquier cambio en el medio que lo rodea. Entonces, si un elemento de interés se une a un elemento bioreceptor en la superficie o a la superficie se observará un cambio en la banda característica de absorción o el mínimo de reflexión [6, 7]. Lo anterior puede ser usado para el desarrollo de biosensores basados en respuesta plasmónica. Comparado con SPR en un sustrato individual como una película metálica delgada, el fenómeno de plasmón producido al irradiar nanopartículas metálicas se describe como SPR localizada (LSPR). El fenómeno de plasmón generado en la superficie de la nanopartícula genera un campo eléctrico mejorado en las proximidades de las nanopartículas [8]. Dentro de esta región, la interacción de la luz con moléculas y otros tipos de nanomateriales fluorescentes se ve potenciada [9], lo que permite aumentar la sensibilidad de biosensores ópticos basados en fluorescencia. Los sensores plasmónicos permiten una detección altamente específica, sensible y en tiempo real [10].

1.2 Planteamiento del problema

La COVID-19 es una enfermedad causada por el coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2 (**SARS-CoV-2**, por sus siglas en inglés). Este padecimiento, es el responsable de múltiples cambios a nivel mundial en casi toda índole y estrato social, fundamentado en la cantidad de personas que han perdido la vida a causa del virus que asciende a casi **siete millones** de muertes a nivel mundial de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, diciembre 2023) y que nos ha llevado a interactuar en sociedad de manera diferente bajo un concepto de “nueva normalidad”.

Una de las razones por las cuales se consideró a la COVID-19 como una emergencia sanitaria internacional, fue su amplio periodo de incubación que puede extenderse de uno a catorce días, desde la exposición (cinco días en promedio).

Durante ese tiempo, la persona infectada podía ser asintomática y diseminar rápidamente el patógeno debido su alto índice de patogenicidad [11, 12]. Si bien, la pandemia de COVID-19 ha terminado (OMS, mayo 2023), el virus sigue presente y mutando continuamente; por lo tanto, es fundamental el desarrollo de métodos diagnóstico para una detección oportuna de este virus y prevenir otra posible crisis de salud pública.

En el año 2020, el grupo de biofotónica y el grupo de optoelectrónica orgánica del Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE) desarrollaron un prototipo de biosensor plasmónico para la detección de SARS-CoV-2. Como parte del desarrollo, era indispensable funcionalizar adecuadamente la superficie de los sustratos como elemento fundamental del biosensor.

En el presente trabajo, se presenta la metodología para funcionalizar oligonucleótidos tiolados como elemento de bioreconocimiento usando una secuencia de DNA sintético de SARS-CoV-2. De forma paralela a esta investigación, se desarrollaron protocolos para funcionalizar los chips plasmónicos con polímeros iónicos y proteínas; para demostrar las potenciales capacidades del biosensor plasmónico en diferentes sistemas para futuras aplicaciones, por ejemplo: en detección de anticuerpos o biomarcadores mediante el uso de un esquema biotina-estreptavidina.

1.2.1 Técnicas de diagnóstico de SARS-CoV-2

Las técnicas de diagnóstico cumplen una función crucial al identificar a individuos infectados, incluso si son asintomáticos, permitiendo su aislamiento y el seguimiento de sus contactos para evitar la propagación y diseminación del virus. Dada la diversidad de sintomatología clínica y la posibilidad de transmisión presintomática y asintomática, las pruebas de diagnóstico desempeñan un papel central en la mitigación de la pandemia.

1.2.1.1 Diagnóstico mediante pruebas comerciales

A lo largo de la pandemia, se han implementado diferentes técnicas para el diagnóstico de SARS-CoV-2, cada una con sus propias ventajas y limitaciones, a continuación, se describirá brevemente cada una de estas pruebas:

Prueba de antígenos

En las pruebas de antígenos para la detección del SARS-CoV-2, se buscan proteínas virales específicas que son características y únicas del virus. Las principales proteínas del SARS-CoV-2 que se suelen buscar en estas pruebas son la proteína de espiga (*Spike* o “S”) y la proteína de nucleocápside (N).

Estas pruebas detectan directamente las proteínas, en lugar del material genético del virus (como lo hace la RT-PCR) o la respuesta inmune (como lo hacen las pruebas de anticuerpos).

Prueba de anticuerpos

Las pruebas de anticuerpos, también conocidas como pruebas serológicas, detectan la presencia de anticuerpos específicos, inmunoglobulina G (IgG) e inmunoglobulina M (IgM), contra el SARS-CoV-2 en la sangre del paciente.

Estas pruebas son útiles para identificar infecciones pasadas o para evaluar la respuesta inmune de un individuo al virus. Tienen la ventaja de que pueden indicar si alguien ha estado previamente expuesto al virus, incluso si fue asintomático.

RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR por sus siglas en inglés) es una técnica utilizada en biología molecular para amplificar, detectar y cuantificar ácido nucleico específico. Esta técnica

combina la transcripción inversa de RNA a DNA complementario (DNAc) y la amplificación de un segmento específico de DNAc por PCR. Considerada el estándar de oro en el diagnóstico de SARS-CoV-2. A través de este método, se pueden detectar trazas de RNA viral y así determinar si una persona está infectada con el virus. No obstante, posee algunas limitaciones, como el tiempo requerido para obtener resultados (de unas horas a varios días). Puede ser costosa en comparación con la prueba de antígeno y anticuerpos; además, requiere equipos de laboratorio especializados y personal capacitado, disminuyendo su disponibilidad en entornos con recursos limitados.

Se puede comparar la eficacia en términos de la probabilidad de detección, considerando el momento de aparición de síntomas, ver **Figura 1.1**.

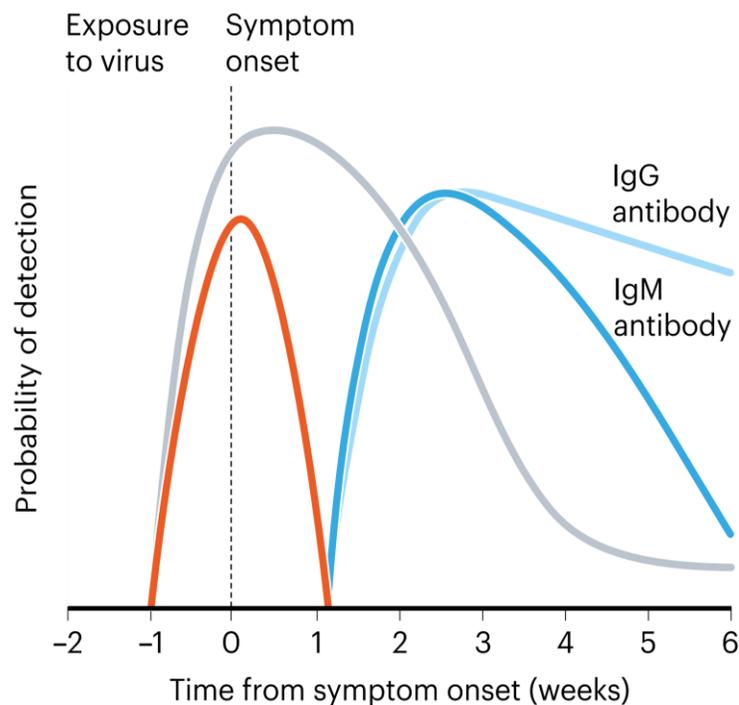


Figura 1.1. Probabilidad de detección de SARS-CoV-2 en función del tiempo desde la aparición de los síntomas (semanas). Línea gris: RT-PCR | Línea naranja: Prueba de antígeno | Líneas azules: Pruebas de anticuerpos (Inmunoglobulina G y M respectivamente). Figura reproducida de [13].

De la figura anterior, se puede inferir lo siguiente:

- La prueba RT-PCR destaca por su alta detección temprana de infecciones activas, incluyendo en aquellos individuos asintomáticos.
- Las pruebas de antígenos, a pesar de su rapidez, una menor probabilidad de detección. Esto es particularmente notorio en personas con cargas virales bajas o en las fases iniciales de la infección, lo que puede llevar a resultados falsos negativos.
- Las pruebas de anticuerpos no resultan idóneas para identificar infecciones activas, dado que la formación de anticuerpos puede demorar semanas tras la infección inicial. Por ende, no son el método más indicado para diagnosticar en las fases tempranas de la enfermedad.

Tomando en cuenta las limitaciones de los esquemas de detección comercialmente disponibles en la actualidad, se identifica una oportunidad para el desarrollo de un dispositivo capaz de realizar la detección de SARS-CoV-2 en tiempo real, de manera rápida, accesible y sin la necesidad de pruebas de laboratorio (*Point of Care*). Los biosensores plasmónicos emergen como una alternativa viable para dicho propósito.

1.2.1.2 Diagnóstico mediante biosensores plasmónicos

Los biosensores plasmónicos se destacan por su alta selectividad y sensibilidad en la detección de biomoléculas. Para el diagnóstico de SARS-CoV-2, los biosensores plasmónicos pueden diseñarse para reconocer específicamente proteínas virales o anticuerpos producidos en respuesta a una infección. En términos generales, un biosensor tendrá diferentes rendimientos en términos de selectividad y sensibilidad [14].

Estos parámetros son esenciales para determinar la eficiencia y precisión con la que estos dispositivos pueden detectar y cuantificar sustancias específicas presentes en una muestra. A continuación, se describen estos términos en detalle:

Selectividad

La selectividad de un biosensor se refiere a su capacidad para discriminar y detectar una sustancia específica en presencia de otras sustancias. Un biosensor altamente selectivo mostrará una respuesta mínima o nula a sustancias que no sean la sustancia de interés.

Esta característica es fundamental en aplicaciones donde las muestras contienen una variedad de compuestos, y es necesario identificar o cuantificar una sustancia en particular sin que otros componentes de la muestra afecten la medición.

Sensitividad (Sensibilidad clínica)

La sensibilidad es la capacidad del dispositivo para detectar pequeñas cantidades de una sustancia. Analíticamente, se obtiene a partir de la pendiente de la curva de calibración, que relaciona la respuesta del biosensor con la concentración de la sustancia de interés. Un biosensor con alta sensibilidad presentará un cambio significativo en su señal de salida incluso con pequeñas variaciones en la concentración de la sustancia. En el contexto de diagnóstico clínico, la sensibilidad (o sensibilidad clínica) se refiere a la capacidad de una prueba, o biosensor en este caso, para identificar correctamente a los individuos que presentan una condición o enfermedad específica.

La alta selectividad garantiza que los resultados sean confiables y que la detección sea altamente específica para el virus. Además, la sensibilidad de los biosensores plasmónicos permite la detección de concentraciones bajas de virus o anticuerpos, lo que los hace adecuados para identificar infecciones en las etapas tempranas o en individuos con cargas virales bajas [15, 16]. Debido a que la sensibilidad de un biosensor es una característica dependiente del transductor a utilizar, usualmente, para comparar biosensores que usan el mismo transductor se utiliza el parámetro de sensibilidad.

El costo de los biosensores plasmónicos puede variar según el diseño y la escala de producción, pero en comparación con la RT-PCR, que requiere una infraestructura de laboratorio regularmente costosa, los biosensores plasmónicos pueden ser más rentables. Además, la capacidad de miniaturización y producción en masa de los biosensores plasmónicos podría reducir aún más los costos a medida que esta tecnología se desarrolle y se implemente más ampliamente.

1.2.2 Comparación de las técnicas de diagnóstico: selectividad, sensibilidad y costo

Para comprender mejor la eficacia y la aplicabilidad de las diferentes técnicas de diagnóstico de SARS-CoV-2, es esencial realizar una comparación detallada de su selectividad, sensibilidad y costo.

Selectividad

- Las pruebas de antígenos tienen una selectividad moderada a alta, pero pueden generar falsos negativos en casos de carga viral baja.
- Las pruebas de anticuerpos son altamente específicas para infecciones pasadas, pero no son adecuadas para la detección de infecciones activas.
- La RT-PCR es altamente específica y adecuada para la detección oportuna de infecciones activas.
- Los biosensores plasmónicos son altamente específicos y pueden adaptarse para detectar tanto la presencia del virus como la respuesta inmunológica.

Sensibilidad

- Las pruebas de antígenos tienen una sensibilidad variable, siendo menos sensibles que la RT-PCR.

- Las pruebas de anticuerpos son sensibles para detectar la respuesta inmunológica a la infección, pero no son adecuadas para la detección de infecciones activas.
- La RT-PCR es altamente sensible y puede detectar cargas virales bajas (1 o 2 copias virales por cada microlitro [17]).
- Los biosensores plasmónicos son altamente sensibles y pueden detectar concentraciones bajas de virus o anticuerpos en ordenes de magnitudes picomolares por cada microlitro [18].

Costo (actualizado a diciembre, 2023)

- Las pruebas de antígenos suelen ser más económicas que la RT-PCR, en el rango de 100 a 500 pesos mexicanos por prueba y pueden ofrecer resultados rápidos.
- Las pruebas de anticuerpos tienen un costo similar o ligeramente inferior a las pruebas de antígeno, con un rango de precios que puede ir desde los 100 hasta los 400 pesos mexicanos.
- La RT-PCR puede ser costosa debido a la necesidad de equipos de laboratorio especializados, reactivos y personal capacitado, comúnmente se encuentran en el rango de 1,000 a 2,500 pesos mexicanos por prueba.

La elección de la técnica de diagnóstico adecuada depende de varios factores, como la situación epidemiológica, la disponibilidad de recursos y la necesidad de obtener resultados rápidos y precisos. Sin embargo, en los primeros meses de la pandemia, la escasez de pruebas necesarias limitó la capacidad de satisfacer la demanda, sin tener en cuenta la sensibilidad, selectividad, tiempos de análisis o costos.

A raíz de esta situación, surgieron varias iniciativas, incluyendo el desarrollo de un biosensor que podría servir como una herramienta viable y confiable para el diagnóstico clínico del SARS-CoV-2 en comparación con las alternativas

comerciales. Además, la creación de este prototipo puede resultar útil en la detección de otras sustancias de interés.

1.3 Justificación

El proyecto fue iniciado en el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE) como respuesta al programa "Proyecto Nacional de Investigación e Incidencia COVID-19" (PRONAI COVID-19), que formaba parte del Programa Nacional Estratégico de Salud. El objetivo principal de este programa era generar conocimiento, propuestas y prototipos que pudieran hacer frente a la contingencia sanitaria que enfrentaba el país en 2020.

El número de proyecto **CONACYT: 313146**, tiene como objetivo desarrollar un biosensor de transductor óptico basado en el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie (SPR) para la detección en tiempo real de SARS-CoV-2. La finalidad es proporcionar una alternativa viable en términos de costo y rendimiento. Para lograrlo, se requiere de la conformación de un equipo multidisciplinario compuesto por investigadores y estudiantes de diferentes universidades para desarrollar el prototipo de manera colaborativa.

Este tema de tesis surge a partir de la necesidad de estudiar el proceso de funcionalización en los chips fabricados y utilizados para la detección, optimizar los resultados y establecer los protocolos pertinentes con el objetivo de garantizar la reproducibilidad de dichos resultados.

1.4 Objetivo general

Estudiar el comportamiento de diferentes configuraciones de chips plasmónicos en la modalidad de películas ultradelgadas de oro (AuNFs) y nanopartículas de oro (AuNPs) a través de la preparación de materiales específicos

o aplicables para SARS-CoV-2 a diferentes concentraciones y en diversos medios mediante ensayos *in situ* haciendo uso del biosensor plasmónico desarrollado en el INAOE.

1.5 Objetivos específicos

- Determinar las condiciones óptimas en la preparación de bioreceptores para favorecer la funcionalización de un chip plasmónico.
- Determinar las condiciones óptimas en la preparación de las sustancias de interés para favorecer un evento de unión en un chip plasmónico previamente funcionalizado.
- Determinar las condiciones necesarias para favorecer la hibridación en el esquema de oligonucleótidos empleando calentamiento localizado.
- Establecer los protocolos para la preparación de oligonucleótidos y proteínas aplicables o específicas para SARS-CoV-2.
- Caracterizar los procesos de funcionalización y eventos de enlace empleando el biosensor plasmónico.
- Estudiar los procesos de funcionalización y eventos de enlace mediante el análisis de sensogramas.

Esta tesis se presentará en **cinco capítulos** para facilitar su lectura. El primer capítulo ofrece una introducción a los biosensores, seguido por el marco teórico con las consideraciones físicas, químicas y biológicas pertinentes en el segundo capítulo. El tercero describe la metodología utilizada para el desarrollo experimental, mientras que en el cuarto capítulo se presentan los resultados obtenidos. Finalmente, el quinto capítulo reúne las conclusiones, sirviendo como punto de partida para trabajos futuros.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1 Principios de los biosensores plasmónicos

El avance en biosensores ha tenido auge acelerado durante las dos últimas décadas y consiste en desarrollar dispositivos portátiles y sistemas empleados para identificar, monitorear y cuantificar fenómenos biológicos. Para ello, se debe tomar en consideración el elemento biológico que se busca reconocer y el mecanismo transductor. La configuración elegida deberá ser pertinente para cada escenario, debido a que se obtendrán diferentes rendimientos en términos de selectividad, sensibilidad y sensibilidad [14], ver **Figura 2.1**.

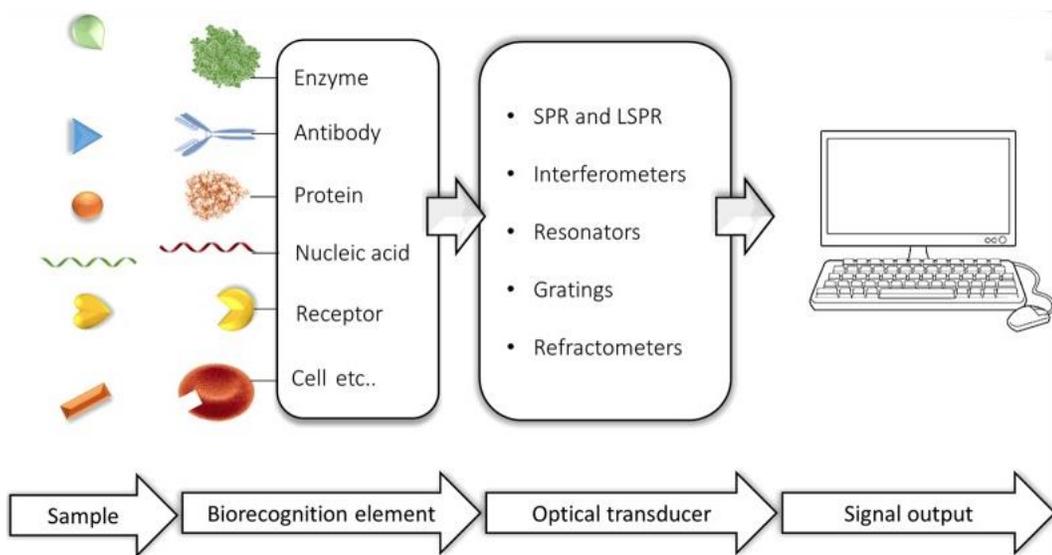


Figura 2.1. Clasificación de los biosensores ópticos en función del elemento biológico y el transductor. Figura reproducida de [4].

Un biosensor requiere una muestra del componente biológico de interés (enzimas, anticuerpos, proteínas, DNA/RNA, bacterias, virus, entre otros), un bioreceptor que reconoce la molécula objetivo de manera específica, el transductor que es el componente generador de señales; y por medio de una unidad de procesamiento, la interacción molecular resultante se detecta en una señal medible [19, 20], ver **Figura 2.2**. La presencia de moléculas biológicas en un medio dado se mide detectando la interacción que ocurre en la superficie del sensor en una señal cuantitativa. Esto implica que los receptores utilizados deben estar previamente inmovilizados en la superficie del transductor y ser altamente específicos para la sustancia objetivo.

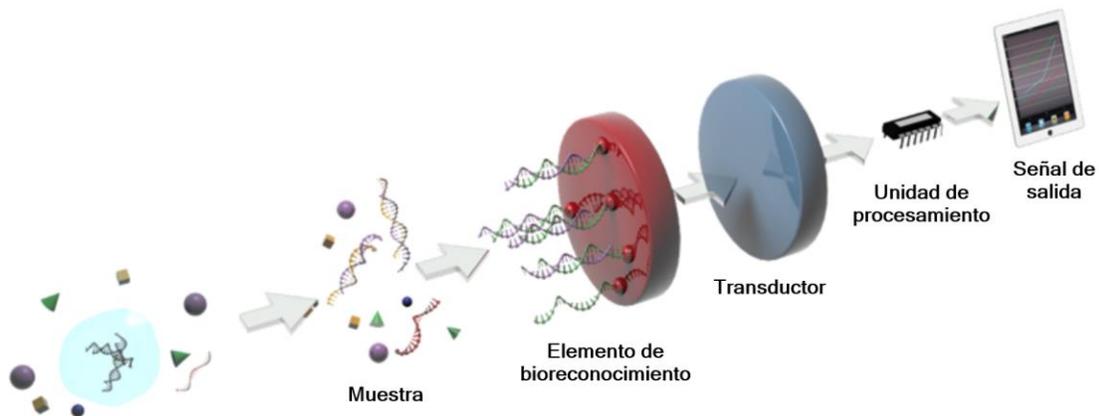


Figura 2.2. Representación esquemática de los elementos requeridos para la operación básica de un biosensor. Figura adaptada de [21].

Los biosensores ópticos pueden dividirse en detección con etiquetas (*labeled*) y sin etiquetas (*label-free*) [14]. Las técnicas con etiquetas son costosas y complejas, ya que requieren la ejecución de varios pasos. Los biosensores de DNA basados en diodos orgánicos emisores de luz (OLED) o los basados en fibras ópticas, utilizan un par de sondas de DNA: una sonda de captura que inmoviliza la sustancia a medir en el transductor y una sonda de detección, la cual está etiquetada con un marcador fluorescente o con una enzima para permitir la identificación del objetivo [22]. En contraste, los biosensores de detección sin etiquetas pueden sensar

directamente la interacción del objetivo con la sonda de captura inmovilizada en la capa del transductor. La detección sin etiquetas es la más utilizada, debido a que proporciona una respuesta rápida, bajo costo, y son técnicas no invasivas.

Los biosensores ópticos basados en resonancia de plasmón superficial (SPR), SPR localizada (LSPR), SPR de fibra óptica (FO-SPR), dispersión Raman potenciada por superficie (SERS), fluorescencia potenciada por superficie (SEF), reflexión interna total (TIR) y basados en guías de onda; utilizan sondas sin etiquetas. Por otra parte, los biosensores plasmónicos pueden clasificarse en función del elemento de reconocimiento; por mencionar algunos: genosensores, aptasensores, los basados en fagos, los basados en moléculas pequeñas, etc [18].

Las simulaciones y el diseño de biosensores plasmónicos son los aspectos más importantes por considerar antes de su fabricación. El rendimiento del sensor depende de varios parámetros, incluido el material plasmónico, las propiedades dieléctricas, el campo electromagnético asociado y las propiedades de la luz incidente. Las simulaciones para los biosensores plasmónicos basados en SPR generalmente se realizan estimando la reflectividad y el campo electromagnético correspondiente en cada capa mediante el conocido modelo de N-capas, que se basa principalmente en el enfoque de matriz de Abel de 2×2 [23, 24]. Por otra parte, para el diseño de sensores basados en LSPR, se utilizan teorías fundamentadas en la dispersión de la aproximación de dipolo discreto o la teoría de Lorentz-Mie generalizada para partículas individuales, mientras que para nanoestructuras con diferentes geometrías se utilizan métodos numéricos de dominio finito en el tiempo (FDTD) o de elemento finito (FEM) con paquetes de software potentes como COMSOL Multiphysics®.

2.1.1 Propiedades ópticas de metales

Los biosensores plasmónicos suelen estar basados en películas metálicas depositadas en la superficie de un material dieléctrico usando metales nobles.

Estos metales son altamente conductores, inertes a la corrosión y oxidación, por sus propiedades físicas que les proporcionan estabilidad. El oro (Au), la plata (Ag), el platino (Pt) y el paladio (Pd) suelen ser ampliamente utilizados para la fabricación de sustratos debido a sus propiedades ópticas.

Algunas de estas propiedades son la reflexión, refracción, difracción, dispersión, polarización, absorción, transmisión y fluorescencia. Estas propiedades dependen de factores como el índice de refracción, la longitud de onda, el ángulo de incidencia y el medio por el que se propaga la luz [25]. La naturaleza y topografía de los materiales nanoestructurados también resultan fundamentales para sus propiedades ópticas.

Un ejemplo de ello es la conocida copa de Licurgo del Imperio Romano que data del siglo IV d.C., ver **Figura 2.3**, la cual exhibe un color verdoso en la luz reflejada y un color rojizo en la luz transmitida [26].



Figura 2.3. Color exhibido en la copa de Licurgo. Figura reproducida de [26].

A finales del siglo XX, se concluyó que esta característica se debía al uso de nanopartículas de oro en la fabricación del vidrio cuyos diámetros variaban de 5 a 60 nm. Esto fue un indicio de que los artistas utilizaban algunas propiedades

ópticas, para obtener efectos y colores peculiares, incluso antes de que los científicos pudieran explicarlas.

En un metal, hay una alta densidad de electrones libres que pueden moverse a través de su estructura cristalina. El modelo Drude-Lorentz es utilizado para explicar las propiedades ópticas de los metales en un amplio rango de frecuencias, así como su interacción con los campos electromagnéticos (EM) [27, 28]. La interacción de los metales con un campo EM se puede describir mediante las ecuaciones de Maxwell y su respuesta óptica puede expresarse mediante una **constante dieléctrica**, $\epsilon(\omega)$, que es dependiente de la frecuencia ω de la radiación incidente. Esta función compleja tiene una parte real ϵ' y una parte imaginaria ϵ'' , dado por:

$$\epsilon(\omega) = \epsilon' + \epsilon'' \quad (\text{ec. 1})$$

donde, la constante dieléctrica puede relacionarse con el índice de refracción, n , por medio de las siguientes expresiones:

$$n(\omega) = n + i\kappa = \sqrt{\epsilon(\omega)} \quad (\text{ec. 2})$$

$$\epsilon' = n^2 - \kappa^2 \quad (\text{ec. 3})$$

$$\epsilon'' = 2n\kappa \quad (\text{ec. 4})$$

$$n^2 = \frac{\epsilon'}{2} + \frac{1}{2}\sqrt{\epsilon'^2 + \epsilon''^2} \quad (\text{ec. 5})$$

La parte real del índice de refracción $n(\omega)$ es responsable de la dispersión en el medio, la parte imaginaria $\kappa(\omega)$ (coeficiente de extinción) determina la constante de absorción $\alpha(\omega)$ dada por:

$$\alpha(\omega) = \frac{2\kappa(\omega)\omega}{c} \quad (\text{ec. 6})$$

donde $\omega = \frac{2\pi}{T}$ es la frecuencia angular incidente con periodo T y $c = \frac{\lambda}{T}$ representa la velocidad de la luz.

Las propiedades ópticas pueden describirse en un amplio rango de frecuencias utilizando el modelo de plasma, donde se asume un gas de electrones (con carga e y masa efectiva m_e) de densidad η que se propaga libremente detrás de un fondo de núcleos de átomos positivamente cargados. Estos electrones comienzan a oscilar a una frecuencia natural ω_0 en presencia de un campo electromagnético $\vec{E}(t) = \vec{E}_0 e^{-i\omega t}$ y se amortiguan a través de colisiones con una tasa característica conocida como factor de amortiguamiento del metal $\gamma = \frac{1}{\tau}$.

El **modelo de Lorentz** se emplea en la descripción de la interacción entre una onda electromagnética y un electrón en un medio material, en este caso se considera que los electrones en un material actúan como osciladores armónicos, capaces de absorber y emitir luz a frecuencias específicas. Según este modelo, el electrón se conceptualiza como un oscilador armónico caracterizado por la siguiente ecuación de movimiento:

$$m \frac{d^2\vec{x}}{dt^2} + m\gamma \frac{d\vec{x}}{dt} + m\omega_0^2 \vec{x} = e\vec{E}(t) \quad (\text{ec. 7})$$

cuya solución, es:

$$\vec{x}(t) = \frac{e}{m(\omega_0^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)} \vec{E}(t) \quad (\text{ec. 8})$$

Los electrones que se desplazan en relación con los núcleos de los átomos generando una polarización dada por:

$$\vec{P} = \eta e \vec{x} \quad (\text{ec. 9})$$

Recordando la definición del vector desplazamiento para materiales isotópicos en términos de la polarizabilidad:

$$\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E}(t) + \vec{P} = \epsilon_0 \epsilon(\omega) \vec{E}(t) \quad (\text{ec. 10})$$

Entonces, sustituyendo la (ec. 9) en la (ec. 10):

$$\epsilon_0 \epsilon(\omega) \vec{E}(t) = \left[\epsilon_0 + \frac{\eta e^2}{m_e (\omega_0^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)} \right] \vec{E}(t) \quad (\text{ec. 11})$$

$$\epsilon(\omega) = 1 - \frac{\eta e^2}{m_e \epsilon_0 (\omega_0^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)} \quad (\text{ec. 12})$$

Una de las propiedades de mayor interés, descritas en este modelo es la **frecuencia de plasma**, a la cual los electrones libres en un metal oscilan colectivamente en respuesta a una perturbación externa [29]. Esta oscilación es el resultado de una perturbación, tal como un campo eléctrico, que desplaza temporalmente los electrones de su posición de equilibrio. Una vez que se remueve o debilita la perturbación, los electrones, bajo la influencia de la fuerza restauradora del campo positivo de los iones del metal, regresan a su posición original, originando el fenómeno oscilatorio. La frecuencia de plasma, ω_p , es intrínseca para cada metal y puede ser definida por la siguiente relación:

$$\omega_p = \sqrt{\frac{\eta e^2}{m_e \epsilon_0}} \quad (\text{ec. 13})$$

donde, η es la densidad de electrones, e y m_e son la carga y masa efectiva del electrón respectivamente, por último ϵ_0 representa el valor de la permitividad en el espacio libre.

Sustituyendo la (ec. 13) en la (ec. 12), se obtiene:

$$\epsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega_0^2 + \omega^2 + i\gamma\omega} \quad (\text{ec. 14})$$

De la ecuación anterior, se obtiene la parte real e imaginaria de la función dieléctrica dadas por:

$$\epsilon'(\omega) = \frac{\omega_p(\omega_0^2 - \omega^2)}{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2\omega^2} \quad (\text{ec. 15})$$

$$\epsilon''(\omega) = \frac{\omega_p\gamma\omega}{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2\omega^2} \quad (\text{ec. 16})$$

Desde la perspectiva óptica, la parte real de la función dieléctrica ϵ' , afecta la velocidad de propagación de la luz en el material, mientras que su parte imaginaria ϵ'' , tiene un impacto en la atenuación de la luz a través del material.

Por otra parte, el **modelo de Drude** proporciona un enfoque distinto para describir la respuesta óptica de materiales. Se considera la red cristalina del metal donde los electrones se comportan como partículas cargadas. Una característica importante de este modelo es la omisión de fuerzas restauradoras sobre los electrones en los materiales conductores, permitiendo que estos se muevan libremente bajo la influencia de un campo eléctrico externo. La función dieléctrica, despreciando el término ω_0 de la fuerza restauradora, se puede expresar por medio de las siguientes expresiones:

$$\epsilon'(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma^2} \quad (\text{ec. 17})$$

$$\epsilon''(\omega) = \frac{\omega_p^2\gamma}{\omega(\omega^2 + \gamma^2)} \quad (\text{ec. 18})$$

De tal manera que, la frecuencia de plasma es fundamental para comprender la respuesta óptica de un metal ante el estímulo de una onda electromagnética debido a su implicación en la función dieléctrica. Específicamente, ω_p representa la frecuencia angular en la que los electrones dentro del metal responden a los campos eléctricos oscilantes.

Se obtienen diferentes comportamientos del metal en función de la frecuencia, ver **Figura 2.4.**

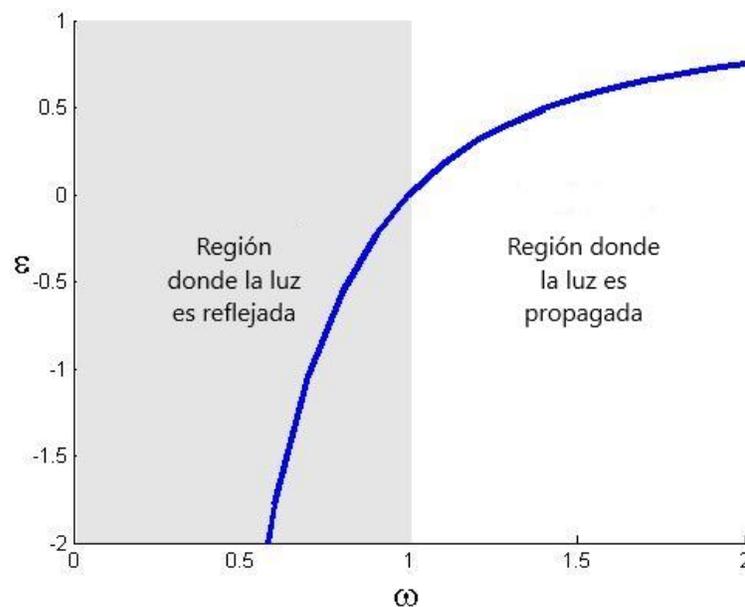


Figura 2.4. Respuesta de la parte real de la función dieléctrica en términos de la frecuencia.

En la figura anterior, se ejemplifica el caso de un metal cuya frecuencia de plasma es $\omega_p = 1$. Antes de la frecuencia de plasma, la permitividad es negativa debido a la respuesta colectiva de los electrones libres en el plasma. Después de la frecuencia de plasma, la permitividad cambia de signo y se aproxima a 1.

En términos generales, se presentan los siguientes casos:

- $\omega \ll \omega_p$: En este escenario, la parte imaginaria de la función dieléctrica es prácticamente nula, por lo que, la constante dieléctrica del metal es real y de signo negativo. Esto impide que las ondas electromagnéticas penetren profundamente en el metal, experimentando un decaimiento exponencial a medida que atraviesan el material, esto ocurre debido a que el vector de propagación $k = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon}$ se vuelve imaginario. Esto conduce a una reflexión efectiva de la radiación electromagnética.
- $\omega \approx \omega_p$: Al excitar un metal con una frecuencia cercana a ω_p , los electrones colectivamente tienden a oscilar a esta frecuencia, dando lugar a una resonancia. Estas oscilaciones resonantes, pueden manifestarse en la superficie o en el volumen del metal. A medida que la frecuencia de excitación ω se acerca a la ω_p , la parte real de $\epsilon(\omega)$ tiende hacia cero y posteriormente cambia de signo, a esta condición se le denomina índice de refracción cercano a cero (*near zero refractive index*). Esta transición es crítica para el comportamiento resonante observado cerca de la frecuencia de plasma [30].
- $\omega \gg \omega_p$: En este rango de frecuencias, la parte real e imaginaria de la función dieléctrica son positivas, $\epsilon' \gg \epsilon''$ y $\epsilon' \approx 1$. Esto implica que las ondas electromagnéticas se propagan a través del metal. Si la frecuencia es lo suficientemente alta, el metal puede incluso volverse transparente a esa radiación.

2.1.2 Plasmones de superficie resonantes

Cuando un haz de luz incide sobre una interfaz metal-dieléctrico y si la frecuencia de la luz incidente se aproxima a la frecuencia de plasma del metal $\omega \approx \omega_p$, los electrones en el metal pueden ser excitados y oscilar colectivamente. En la mayoría de los metales, la frecuencia del plasma está en el régimen ultravioleta, con energías dentro de los 5 a 15 eV, dependiendo de la estructura de bandas del metal [29].

Estas oscilaciones son denominadas **plasmones de superficie**, usualmente abreviado como SPP, son ondas electromagnéticas superficiales que se propagan, en el caso más simple, a lo largo de la interfaz que separa un metal de un medio dieléctrico. Esto implica que el campo EM se propaga a lo largo del eje Z, asimismo, depende del tiempo en forma de una onda plana.

$$|\vec{E}|, |\vec{H}| \sim e^{-i\omega t + ik_z Z} \quad (\text{ec. 19})$$

De manera general, un polaritón es una onda híbrida cuya energía proviene de dos partes: una es la energía electromagnética acumulada en los campos eléctricos y magnéticos, y la otra es la energía del estado sólido. En este caso, la luz se acopla con las oscilaciones de electrones con oscilación de plasma en el metal. La energía de la onda resultante del plasmón polaritón de superficie está dada por la contribución de la energía del campo EM y la energía cinética de los electrones libres.

La palabra "superficial" hace referencia a que la onda está confinada a una interfaz metal-dieléctrico y decae al alejarse de ella, los campos $|\vec{E}|, |\vec{H}| \rightarrow 0$ debido a que $X \rightarrow \pm\infty$, véase la **Figura 2.5**.

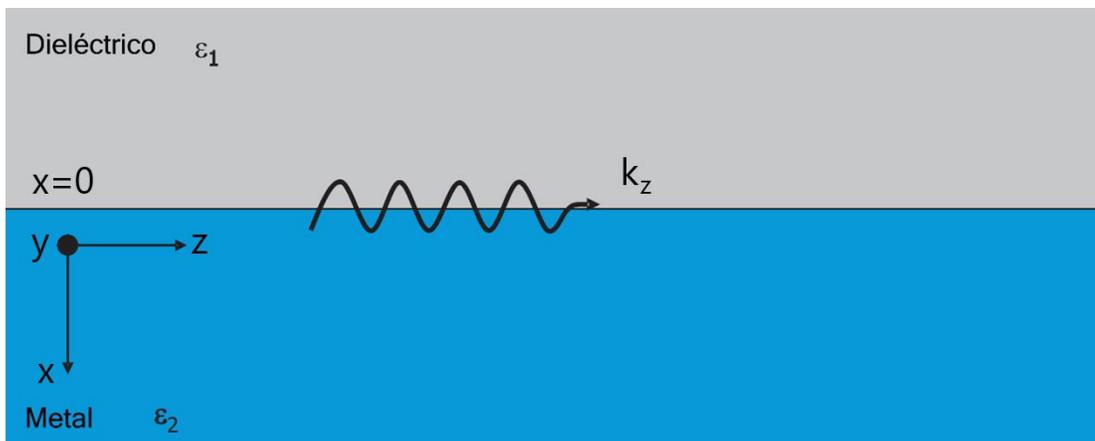


Figura 2.5. Esquema de la interfaz a lo largo del plano y-z entre un dieléctrico (parte superior) y un metal (parte inferior). Figura adaptada de [31].

Sabemos que tanto el campo eléctrico \vec{E} , como el campo magnético \vec{H} del SPP dependen de la coordenada espacial en el tiempo de la siguiente forma:

$$\vec{E}(x, y, z, t) = \vec{E}_0(x)e^{-i\omega t + ik_z z} \quad \vec{H}(x, y, z, t) = \vec{H}_0(x)e^{-i\omega t + ik_z z}$$

Es necesario resolver las siguientes ecuaciones:

$$\nabla \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (\text{ec. 20})$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (\text{ec. 21})$$

Las ecuaciones anteriores equivalen a seis ecuaciones escalares:

$$\begin{aligned} \frac{\partial E_z}{\partial y} - \frac{\partial E_y}{\partial z} &= i\mu\mu_0\omega H_x & \frac{\partial H_z}{\partial y} - \frac{\partial H_y}{\partial z} &= -i\epsilon\epsilon_0\omega E_x \\ \frac{\partial E_x}{\partial z} - \frac{\partial E_z}{\partial x} &= i\mu\mu_0\omega H_y & \frac{\partial H_x}{\partial z} - \frac{\partial H_z}{\partial x} &= -i\epsilon\epsilon_0\omega E_y \\ \frac{\partial E_y}{\partial x} - \frac{\partial E_x}{\partial y} &= i\mu\mu_0\omega H_z & \frac{\partial H_y}{\partial x} - \frac{\partial H_x}{\partial y} &= -i\epsilon\epsilon_0\omega E_z \end{aligned}$$

Debido a que no hay dependencia en la variable y , es posible simplificar las derivadas parciales de la siguiente manera:

$$\frac{\partial}{\partial t} = -i\omega \quad \frac{\partial}{\partial y} = 0 \quad \frac{\partial}{\partial z} = ik_z$$

Para el acoplamiento eficiente de la energía de la luz incidente con las oscilaciones de los plasmones, se requiere polarización transversal magnética (TM) [31, 7, 32] donde el vector del campo eléctrico tiene componentes tanto en la dirección perpendicular como paralela a la interfaz metal-dieléctrico, mientras que el vector del campo magnético es paralelo a la interfaz. Cuando la luz incidente está polarizada en la configuración transversal eléctrica (TE), el vector del campo eléctrico es paralelo a la interfaz metal-dieléctrico.

Las seis ecuaciones escalares, pueden separarse en dos grupos: el primer grupo, corresponde a la polarización TE que relaciona los componentes E_y , H_x y H_z del campo EM:

$$-ik_z E_y = i\mu\mu_0 \omega H_x \quad (\text{ec. 22})$$

$$ik_z H_x - \frac{\partial H_z}{\partial x} = -i\epsilon\epsilon_0 \omega E_y \quad (\text{ec. 23})$$

$$\frac{\partial E_y}{\partial x} = i\mu\mu_0 \omega H_z \quad (\text{ec. 24})$$

Mientras que el segundo grupo corresponde a la polarización TM que relaciona las componentes H_y , E_x y E_z :

$$-ik_z H_y = -i\epsilon\epsilon_0 \omega E_x \quad (\text{ec. 25})$$

$$ik_z E_x - \frac{\partial E_z}{\partial x} = i\mu\mu_0 \omega H_y \quad (\text{ec. 26})$$

$$\frac{\partial H_y}{\partial x} = -i\epsilon\epsilon_0 \omega E_z \quad (\text{ec. 27})$$

Debido a que, en el caso de medios no magnéticos, se obtiene una solución trivial para la polarización TE. En estas condiciones, no hay oscilación de carga inducida en la superficie, y como resultado, no hay un acoplamiento para producir plasmones de superficie [7].

Entonces, para la polarización TM, sustituyendo las componentes del campo eléctrico E_z de la (ec. 27) y E_x de la (ec. 25) en la (ec. 26), se obtiene la ecuación de Helmholtz para la componente H_y del campo magnético:

$$\frac{\partial^2 H_y}{\partial x^2} - \underbrace{\left(k_z^2 - \mu \epsilon \frac{\omega^2}{c^2} \right)}_{\delta} H_y = 0 \quad (\text{ec. 28})$$

De la (ec. 25) y la (ec. 27) podemos expresar las componentes del campo eléctrico, E_x y E_z en términos del campo magnético:

$$E_x = \frac{k_z}{\epsilon \epsilon_0 \omega} H_y \quad (\text{ec. 29})$$

$$E_z = \frac{i}{\epsilon \epsilon_0 \omega} \frac{\partial H_y}{\partial x} \quad (\text{ec. 30})$$

La solución general de la ecuación de Helmholtz en el medio superior e inferior puede denotarse de la siguiente manera:

Para el medio superior:

$$\begin{aligned} H_{1,y}(x) &= H_1 e^{-\delta_1 x} \\ E_{1,z}(x) &= -\frac{i\delta_1}{\epsilon_1 \epsilon_0 \omega} H_1 e^{-\delta_1 x} \\ E_{1,x}(x) &= \frac{k_z}{\epsilon_1 \epsilon_0 \omega} H_1 e^{-\delta_1 x} \end{aligned}$$

Para el medio inferior:

$$\begin{aligned} H_{2,y}(x) &= H_2 e^{+\delta_2 x} \\ E_{2,z}(x) &= +\frac{i\delta_2}{\epsilon_2 \epsilon_0 \omega} H_2 e^{+\delta_2 x} \\ E_{2,x}(x) &= \frac{k_z}{\epsilon_2 \epsilon_0 \omega} H_2 e^{+\delta_2 x} \end{aligned}$$

La principal diferencia entre ambos medios radica en el signo de la función exponencial. Aplicando la condición de frontera en la interfaz ($x = 0$) y considerando $\mu_1 = \mu_2 = 1$, se obtiene lo siguiente:

$$\begin{aligned} H_{1,y}(0) &= H_{2,y}(0) \\ E_{1,z}(0) &= E_{2,z}(0) \end{aligned}$$

Reduciendo términos, podemos obtener la siguiente expresión:

$$\frac{\delta_1}{\epsilon_1} + \frac{\delta_2}{\epsilon_1} = 0 \quad (\text{ec. 31})$$

donde, δ_1 y δ_2 representan el inverso de la profundidad de penetración en el medio dieléctrico y el metal, respectivamente, ambos con valores positivos.

Esto implica que la solución a la ecuación anterior existe solo si una de las constantes dieléctricas ϵ_1 , o bien ϵ_2 , es negativa ($\epsilon_1 \epsilon_2 < 0$). Entonces, los plasmones de superficie pueden existir únicamente en la interfaz entre un medio dieléctrico ($\epsilon_1 > 0$) y un metal ($\epsilon_2 < 0$).

Sustituyendo, δ_1 y δ_2 en la (ec. 31) se obtiene:

$$\frac{\sqrt{k_z^2 - \epsilon_1 \frac{\omega^2}{c^2}}}{\epsilon_1} + \frac{\sqrt{k_z^2 - \epsilon_2 \frac{\omega^2}{c^2}}}{\epsilon_2} = 0 \quad (\text{ec. 32})$$

Finalmente, despejando k_z , se obtiene la siguiente ecuación:

$$k_z = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} \quad (\text{ec. 33})$$

O bien, en términos de la permitividad del medio dieléctrico ϵ_d y del metal ϵ_m :

$$k_{spp}(\omega) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad (\text{ec. 34})$$

Esta ecuación es conocida como la **ecuación de dispersión**, la cual denota que el vector de onda k_{spp} es dependiente de la frecuencia ω . La resonancia de

plasmón superficial ocurre cuando la parte real de la función dieléctrica del metal, ϵ'_m , satisface la siguiente relación:

$$\epsilon'_m(\omega) + \epsilon_d = 0 \quad (\text{ec. 35})$$

Una característica del acoplamiento de plasmones de superficie es la generación de un campo que se propaga en la interfaz metal-dieléctrico. Este **campo evanescente** es una onda viajera, que decae exponencialmente con la distancia desde la interfaz. Su profundidad de penetración es del orden de nanómetros, típicamente $\frac{\lambda}{2}$ de la longitud de onda en el medio.

La SPR es el fenómeno atribuido al acoplamiento resonante del campo evanescente de la luz polarizada TM con los plasmones de superficie en la interfaz metal-dieléctrico.

2.1.4 Transductor óptico basado en SPR

La sensibilidad basada en SPR ha atraído un considerable interés en las últimas décadas y es una técnica que permite la detección sin etiquetas de diversas sustancias y el monitoreo en tiempo real de eventos moleculares. Se han realizado esfuerzos continuos para desarrollar biomarcadores de enfermedades a partir de ácidos nucleicos, proteínas, anticuerpos, bacterias, células, entre otros [33, 34].

El método SPR requiere que un componente se inmovilice en un chip plasmónico (receptor), mientras que el componente de interés está presente en una disolución acuosa se coloca sobre la superficie del sensor [10, 20].

Existen varias configuraciones experimentales para medir la señal generada por SPR debido a la interacción entre la luz incidente y las ondas viajeras en la superficie de un metal, ver **Figura 2.6**.

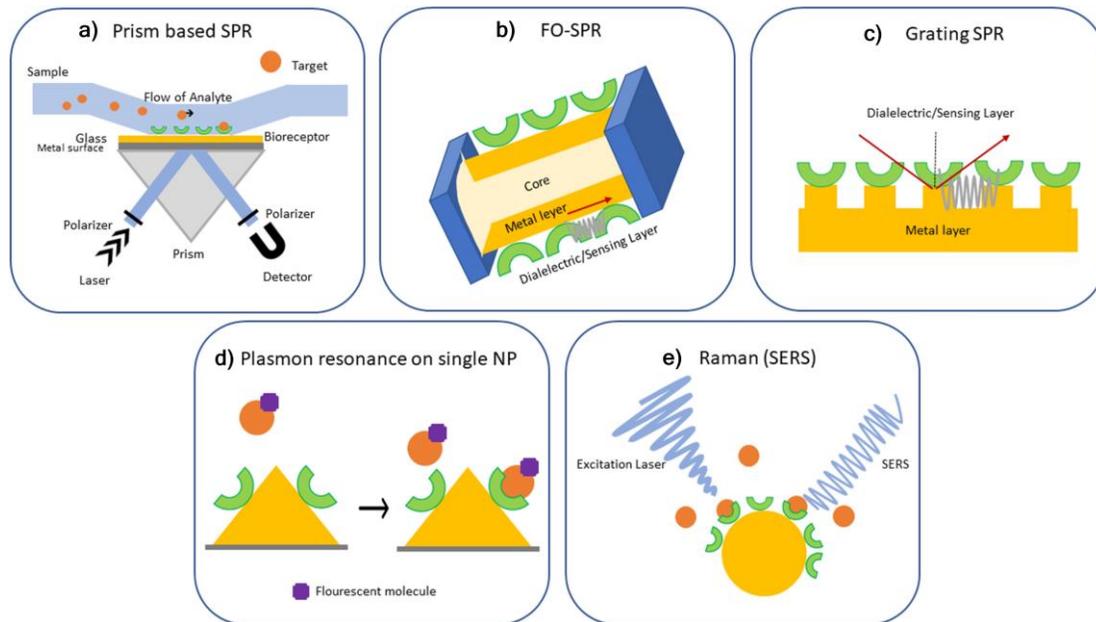


Figura 2.6. Configuraciones de biosensores basados en SPR: a) Acoplamiento basado en prisma | b) Acoplamiento basado en fibra óptica | c) Acoplamiento basado en rejilla | d) Representación de SEF | e) Representación de SERS. Figura adaptada de [18].

En óptica y nanofotónica, se estudia con interés la excitación SPP a través del método de reflexión interna total frustrada. Se parte del principio de que el fotón en

el espacio libre posee un momento relativamente bajo, insuficiente para excitar el SPP. Sin embargo, este obstáculo se supera utilizando un prisma con un índice de refracción alto.

El término, "reflexión interna total frustrada", se debe a la observación de un fenómeno peculiar cuando se introduce un prisma con un alto índice de refracción, en un sistema prisma-aire sin metal. En condiciones normales, si el ángulo de incidencia supera el ángulo crítico, se produce una reflexión interna total [30]. Sin embargo, al reducir la brecha entre el prisma y el metal, aparece una caída pronunciada en la región de reflexión interna total, indicando la excitación del SPP.

Los dos enfoques más comunes para inducir la resonancia plasmónica basados en prismas son la configuración de Otto y la configuración de Kretschmann, ver **Figura 2.7**.

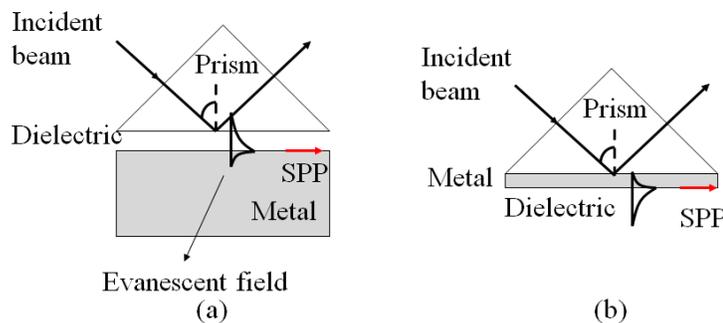


Figura 2.7. Configuraciones de sensores basados en SPR acoplados con prisma: a) configuración de Otto, b) configuración de Kretschmann. Figura reproducida de la referencia [35].

Configuración de Otto

Este método fue introducido en 1968 por Andreas Otto, en esta configuración, se considera una capa de aire entre el prisma y la película metálica, ver **Figura 2.7a**; esta brecha de aire es un factor crítico, ya que define la fuerza de acoplamiento entre la luz incidente y el SPP.

La luz incidente en el prisma experimenta reflexión total interna (TIR) en la interfaz prisma-aire. Esta configuración requiere que el espesor del medio de bajo índice sea inferior a la longitud de penetración del campo evanescente para que se produzca un acoplamiento efectivo. A pesar de que esta disposición ofrece la ventaja de permitir un control directo sobre la distancia entre el prisma y la película metálica, debido a que la capa de aire es del orden de la longitud de onda, el control en el manejo del prisma es poco preciso [7].

Debido a que la configuración de Kretschmann es el método de acoplamiento de SPR en el biosensor plasmónico utilizado en la parte experimental de este trabajo, se destinará una sección para detallar su funcionamiento.

2.1.4.1 Configuración de Kretschmann

La configuración de Kretschmann, propuesta por Kretschman y Raether en 1968, difiere de la configuración de Otto principalmente en que no existe una brecha de aire entre el metal y el prisma, ver **Figura 2.7**; Error! No se encuentra el origen de la referencia.**b**.

Las principales diferencias entre las configuraciones de Otto y Kretschmann, radican en que, en esta configuración la luz incidente se acopla al SPP a través de la película metálica, en lugar de hacerlo a través de la brecha de aire, excitando el SPP en la interfaz inferior de la película delgada depositada en el prisma [32].

La fuerza de acoplamiento depende del espesor de la película, mientras que la profundidad de penetración del SPP en el metal es casi independiente de la frecuencia, lo que sugiere que un acoplamiento óptimo podría lograrse con el mismo espesor de película metálica para diferentes longitudes de onda de la onda incidente. Al incidir una onda plana sobre un prisma, el momento del fotón, inicialmente k_0 , se incrementa en el prisma por un factor n , siendo n_p el índice de refracción del prisma:

$$k = k_0 n_p \quad (\text{ec. 36})$$

En la configuración de Kretschmann, el vector de onda de la luz incidente se modifica debido al prisma acoplado, entonces, para la componente en la interfaz ($x = 0$) siendo:

$$k_z = \frac{2\pi}{\lambda} n_p \sin \theta \quad (\text{ec. 37})$$

donde, n_p corresponde al índice de refracción del prisma y θ es el ángulo de incidencia, ajustando este ángulo, se logra la coincidencia del momento en el plano de la luz con el del SPP, facilitando así su excitación. En la interfaz, el vector de onda de la luz incidente en la componente del eje Z será el vector de onda asociado al SPP [16, 30]. De modo que:

$$k_z = \frac{2\pi}{\lambda} n_p \sin \theta_r = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{\epsilon'_m n_d^2}{\epsilon'_m + n_d^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{ec. 38})$$

$$\theta_r = \sin^{-1} \left[\left(\frac{1}{n_p} \right) \left(\frac{\epsilon'_m n_d^2}{\epsilon'_m + n_d^2} \right)^{\frac{1}{2}} \right] \quad (\text{ec. 39})$$

donde, θ_r es el ángulo de acoplamiento al cual se satisface la condición de resonancia [36]. En dicha condición, la mayor parte de la energía de la luz incidente se acopla en el modo SPP resultando en una disminución en la cantidad de luz reflejada. Adicionalmente, en la configuración de Kretschmann, el metal está situado en la interfaz entre dos dieléctricos, el prisma con un alto índice de refracción n_p y un medio circundante que puede ser aire, agua o una disolución (n_s) con un bajo índice de refracción, $n_p > n_s$.

Cuando un haz incidente se propaga desde el prisma hacia el medio, ocurrirá el fenómeno de reflexión total interna (TIR), esto ocurre siempre que el ángulo incidente θ_i sea mayor que el ángulo crítico, dado por:

$$\theta_c = \sin^{-1} \left(\frac{n_p}{n_s} \right) \quad (\text{ec. 40})$$

Bajo la condición $\theta_i > \theta_c$, pueden formarse ondas evanescentes que se propagan al medio de índice de refracción más bajo n_s y cuya amplitud decae exponencialmente con la distancia desde la interfaz. La condición de resonancia ocurre en la interfaz metal-dieléctrico y es susceptible a cualquier cambio en las propiedades ópticas del dieléctrico debido a los eventos de enlace entre los receptores inmovilizados en el metal y la sustancia de interés [15]. Adicionalmente, la velocidad de cambio de resonancia o unidades de respuesta (RIU) indican un aumento o disminución en la señal, estas variaciones pueden detectarse y medirse por medio de un procesamiento digital.

Esto permite la cuantificación de la concentración de las moléculas de la sustancia a detectar en la superficie y el estudio de eventos de enlace a través de la afinidad de unión. Esta configuración es ampliamente utilizada debido a su alta sensibilidad y facilidad de manejo. Estas características hacen indispensable el uso de la configuración de Kretschmann en biosensores para detección molecular en tiempo real.

2.1.5 Resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPR)

En el caso de las nanoestructuras metálicas, el campo resonante asociado con plasmones de superficie está localizado; entonces, la SPR se denomina SPR localizada (LSPR) [37]. La longitud de onda de resonancia depende de la forma y tamaño de la nanoestructura y del medio que la rodea. El fenómeno LSPR ocurre cuando se trabaja con nanopartículas metálicas cuyo tamaño es menor que la longitud de onda de la luz incidente [38].

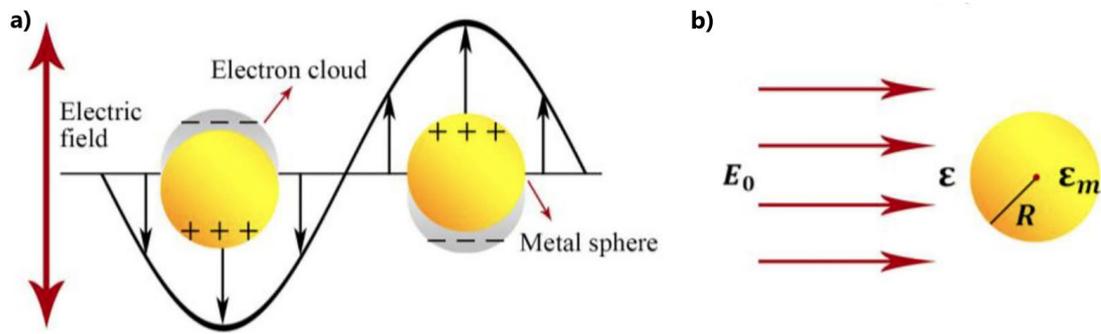


Figura 2.8. a) Representación esquemática del fenómeno de LSPR en una interfaz metal-dieléctrico. | b) Representación de una nanopartícula metálica de radio R en un campo eléctrico. Figura tomada de [39].

Otras diferencias importantes en relación con SPR son que el campo evanescente en LSPR es usualmente menor [40] y que, en resonancia, las nanopartículas metálicas exhiben un aumento mayor en el campo eléctrico. Este campo mejorado contribuye a incrementos en la señal Raman, permitiendo la detección de concentraciones bajas de sustancias químicas y biológicas [41]. Las propiedades plasmónicas de una sola nanopartícula pueden ser analizadas y monitoreadas utilizando microscopía de campo oscuro [42].

Los biosensores basados en LSPR utilizan receptores funcionalizados en el material plasmónico nanoestructurado [43]. En la **Figura 2.8a** se muestra el esquema de una interacción electromagnética de la luz en nanopartículas metálicas. Debido al uso de nanoestructuras en lugar de superficies plasmónicas semi-infinitas, LSPR posee una alta relación superficie-volumen para detectar interacciones en la superficie, lo cual puede integrarse en dispositivos más compactos y miniaturizados. La principal desventaja de la LSPR es su menor sensibilidad al cambio en el índice de refracción en comparación con la SPR convencional [44].

La mayoría de los metales exhiben condiciones de LSPR en la región visible e infrarrojo cercano (NIR) donde se tiene que $\gamma \ll \omega_p$ [45]. Entonces, a partir del modelo de Drude, el factor de amortiguamiento en la (ec. 17) puede despreciarse,

obteniendo valores reales de la constante dieléctrica del metal expresada por la siguiente aproximación:

$$\epsilon'_m(\omega) \cong 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad (\text{ec. 41})$$

En la condición de resonancia, se pueden considerar las siguientes expresiones:

$$\epsilon'_m \approx -2\epsilon_s \quad (\text{ec. 42})$$

$$\epsilon_s = n_s^2 \quad (\text{ec. 43})$$

donde, ϵ_s y n_s representan la constante dieléctrica y el índice de refracción del medio circundante. Sustituyendo la (ec. 42) en la (ec. 41) se obtiene:

$$\omega_{\max} \cong \frac{\omega_p}{\sqrt{2\epsilon_s + 1}} \quad (\text{ec. 44})$$

donde, ω_{\max} es la frecuencia máxima a la que ocurre el fenómeno LSPR. O bien, en términos de longitud de onda sustituyendo $\lambda = \frac{2\pi c}{\omega}$, y haciendo uso de la relación de la (ec. 43), se obtiene la siguiente expresión:

$$\lambda_{\max} \cong \lambda_p \sqrt{2n_s^2 + 1} \quad (\text{ec. 45})$$

siendo, λ_{\max} , la longitud de onda del pico de LSPR y λ_p , la longitud de onda que corresponde a la frecuencia de plasma del metal ω_p . Esta última ecuación, permite entender analíticamente que cualquier cambio en el índice de refracción del medio circundante resultará en un cambio en el pico del LSPR en la longitud de onda de resonancia, implicando que son aproximadamente lineales en la banda óptica [46].

2.1.5.2 Efecto termoplasmónico

Durante el fenómeno de LSPR, se observan varias respuestas ópticas en la superficie de las nanopartículas metálicas, entre ellas, el efecto termoplasmónico. Las propiedades ópticas de las nanoestructuras metálicas se expresan a menudo como la suma del coeficiente de absorción σ_{abs} y el coeficiente de esparcimiento σ_{sca} de la luz incidente. Esto da lugar al coeficiente extinción, dado por la siguiente expresión:

$$\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{sca} \quad (\text{ec. 46})$$

Desde un punto de vista temporal, estos fenómenos se describen en la **Figura 2.9**, después de la excitación del plasmón, la generación de portadores ocurre en tiempos muy cortos (de 1 a 100 fs). Luego, el aumento de temperatura en la NP ocurre en una escala de tiempo de 100 fs a 1 ps para el esparcimiento electrón-electrón y en 1-10 ps para el esparcimiento electrón-fonón. Por último, comienza el intercambio de energía en forma de calor por medio de una disipación térmica de la NP hacia el medio circundante [47].

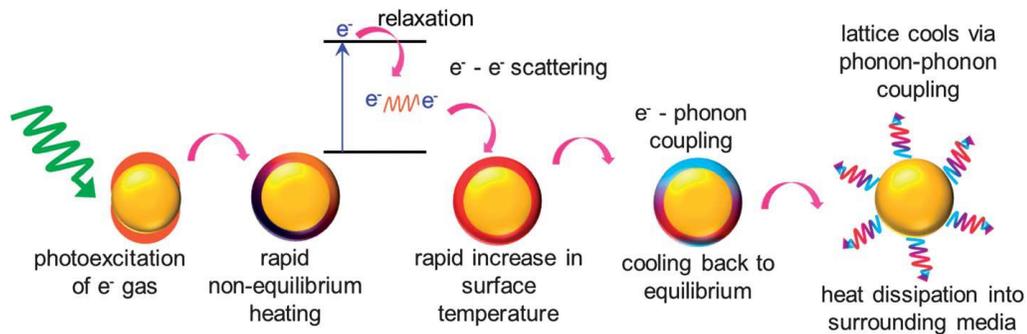


Figura 2.9. Esquema que describe el principio de conversión de luz fototérmica a calor mediante nanoestructuras plasmónicas. Figura reproducida de [48].

Las nanopartículas metálicas generan calor por el efecto Joule. El cambio de temperatura en una nanopartícula sigue la ecuación de transferencia de calor:

$$\rho C_p \frac{\partial T(\mathbf{r})}{\partial t} = \nabla \cdot [\kappa \nabla T(\mathbf{r})] + q \quad (\text{ec. 47})$$

donde, ρ representa la densidad, C_p es la capacidad calorífica a presión constante, $T(\mathbf{r})$ es la temperatura dependiente del radio, t es el tiempo, κ es la conductividad térmica del medio y q representa la densidad de potencia de calor. En estado estacionario, la (ec. 47) se modifica de la siguiente manera:

$$\nabla \cdot [\kappa \nabla T(\mathbf{r})] = -q \quad (\text{ec. 48})$$

La energía generada en forma de calor por la NP puede expresarse como la densidad de potencia de calor en la NP integrada sobre su volumen por medio del teorema de Poynting:

$$Q = \iiint q \, dV \quad (\text{ec. 49})$$

donde, Q es la energía térmica generada por la nanoestructura plasmónica. De manera general, q se puede expresar mediante:

$$q = \frac{1}{2} \text{Re}(\vec{J}^* \cdot \vec{E}) \quad (\text{ec. 50})$$

siendo, $\vec{J} = \kappa \vec{E}$ la densidad de corriente y \vec{E} es el campo eléctrico dentro de la nanoestructura. Sustituyendo la (ec. 50) en la (ec. 49), se obtiene:

$$Q = \iiint \frac{1}{2} \text{Re}(\vec{J}^* \cdot \vec{E}) \, dV = \frac{\omega}{2} \epsilon_0 \text{Im}(\epsilon_\omega) \iiint |\vec{E}|^2 \, dV \quad (\text{ec. 51})$$

Debido a que la energía térmica es diferente de cero únicamente dentro de la NP, es posible también expresarla en términos del coeficiente de absorción [49] por medio de:

$$Q = \sigma_{\text{abs}} I \quad (\text{ec. 52})$$

siendo, σ_{abs} el coeficiente de absorción de la sección transversal de la NP e I la irradiancia del haz incidente. La absorción efectiva depende de varios factores, tales como la forma y el volumen de las NPs, su composición y la longitud de onda empleada para generar el plasmón. Se debe considerar la temperatura de fusión del metal utilizado y la estabilidad térmica para evitar cambios en su forma y la alteración de sus propiedades. Es posible definir un parámetro adimensional que cuantifica la capacidad de una NP para mejorar la intensidad del campo eléctrico, específicamente el número de Joule, ver **Figura 2.10**.

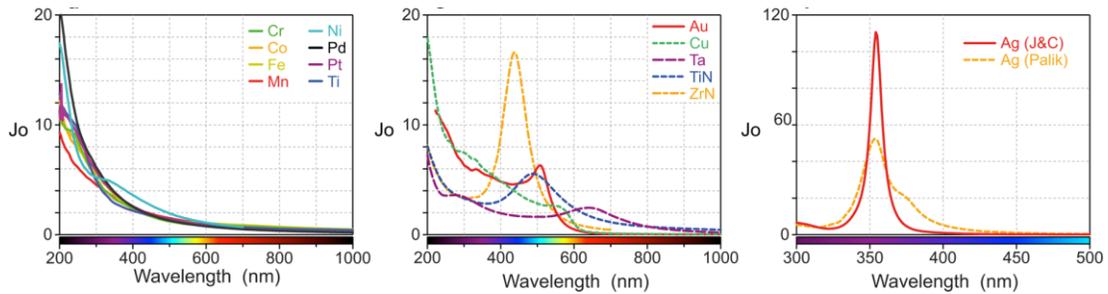


Figura 2.10. Espectros del número de Joule, que representa la capacidad de una NP para producir calor, para diferentes materiales. Figura adaptada de [50].

El número de Joule es un número adimensional que permite cuantificar la capacidad de una NP para generar energía en forma de calor [50], su valor puede obtenerse por medio de la siguiente expresión:

$$J_0 = \frac{e\epsilon''_m}{n_s} \left| \frac{\vec{E}}{E_0} \right|^2 = 9 \frac{e\epsilon''_m}{n_s} \left| \frac{\epsilon_d}{\epsilon_m(\omega) + \epsilon_d} \right|^2 = \frac{\lambda_{\text{res}} \sigma_{\text{abs}}}{2\pi V} \quad (\text{ec. 53})$$

donde, $e = \frac{\hbar\omega}{\hbar\omega_0} = \frac{\lambda_{\text{ref}}}{\lambda}$ con $\hbar\omega_0 = 1$ eV, λ_{res} es la longitud de onda de resonancia, ϵ''_m es la parte imaginaria de la constante dieléctrica del metal, n_s es el índice de refracción del medio circundante, ϵ_d es la permitividad del dieléctrico y V es el volumen de la nanoestructura.

Esta medida es relevante en la evaluación de la absorción y disipación de energía en nanoestructuras metálicas, donde las oscilaciones resonantes de los electrones en la superficie (plasmones de superficie) pueden inducir efectos significativos de calentamiento. En la **Figura 2.10**, puede observarse que los metales que tienen la mejor capacidad de disipar calor son el oro, la plata, el cobre y las aleaciones de TiN y ZrN. A continuación, se presenta una tabla con los datos más relevantes de varios metales para el efecto termoplasmónico:

Tabla 1. Capacidad de un material para generar calor (J_0) a sus correspondientes λ de resonancia (geometría esférica). Datos tomados de [50].

Material	Símbolo	λ_{res} (nm)	J_0	T_{fus} (°C)
Oro	Au	528	6.32	1064
Plata (Palik)	Ag	357	52.0	961
Plata (J&C)	Ag	355	111	961
Cobre	Cu	585	2.65	1085
Cobalto	Co	366	>12	1495
Cromo	Cr	289	>11	1907
Hierro	Fe	337	>11	1538
Manganeso	Mn	380	>9.2	1246
Níquel	Ni	218	21.4	1455
Paladio	Pd	223	>21	1555
Platino	Pt	323	12.0	1768
Tántalo	Ta	735	2.45	3017
Titanio	Ti	274	>13	1668
Nitruro de titanio	TiN	566	5.55	2930
Nitruro de zirconio	ZrN	467	16.6	2952

Se destaca que la plata tiene el mayor número de Joule, lo cual implica que la plata es metal con la mayor capacidad para disipar energía en forma de calor; sin embargo, esa capacidad está limitada por su temperatura de fusión. Pese a que hay metales con números de Joule más altos.

Las nanopartículas de oro (Au) como material plasmónico poseen una variedad de aplicaciones que incluyen uso biomédico en detección, imagen, entrega de fármacos, terapia contra el cáncer, así como en catálisis, óptica y electrónica [51, 52].

Adicionalmente, es ampliamente utilizado en termoplasmónica debido a que presenta su longitud de onda de resonancia en el rango visible, sin mencionar su mayor biocompatibilidad en relación con los demás metales.

En los últimos años, se han probado nuevos materiales, teniendo el TiB y ZrN potenciales aplicaciones como nanofuentes de calor [53], de manera ideal, estos compuestos son más eficaces que el oro para emitir calor en el espectro visible.

En estado estacionario, a partir de la (ec. 47), una NP esférica bajo iluminación continua genera un gradiente de temperatura definido por:

$$\Delta T = \frac{Q}{4\pi\kappa R} = \frac{\sigma_{\text{abs}} I}{4\pi\kappa R} \quad (\text{ec. 54})$$

donde, R es el radio de la nanopartícula esférica. Si varias NPs son irradiadas al mismo tiempo, el aumento de temperatura se deberá a un efecto de calentamiento colectivo [52]. Considerando un conjunto de nanopartículas esféricas de radio R, ubicadas a distancias r_i , la temperatura de una NP específica está definida por la siguiente ecuación:

$$\Delta T_j = \Delta T_j^s + \Delta T_j^{\text{ext}} = \frac{Q}{4\pi\kappa R} + \sum_{i \neq j} \frac{Q_i}{4\pi\kappa |r_i - r_j|} \quad (\text{ec. 55})$$

Para determinar si es necesario considerar el impacto del efecto de calentamiento colectivo de las NPs, se puede utilizar la constante ζ definida como la relación entre el aumento de temperatura de una NP (ΔT_j^s) y el aumento de temperatura de las NPs circundantes (ΔT_j^{ext}) dado por:

$$\zeta = \frac{\Delta T_j^s}{\Delta T_j^{ext}} = \frac{p^2}{3RD} \quad (\text{ec. 56})$$

donde p es la distancia promedio entre dos NPs, R es el radio de las NPs y D es el diámetro del láser. Los efectos de calentamiento deben tomarse en cuenta cuando $\zeta \ll 1$.

En el caso del calentamiento empleando un láser pulsado, como el utilizado en este trabajo, el cambio de temperatura alcanzada por una NP después de una iluminación con pulsos de femtosegundos ΔT^0 en términos de la densidad de energía del láser F (fluencia), está dada por [54]:

$$\Delta T^0 = \frac{\sigma_{abs} F}{V \rho C_p} \quad (\text{ec. 57})$$

De manera particular, las AuNPs esféricas presentan típicamente el fenómeno de LSPR a una longitud de onda de resonancia ~ 530 nm dependiendo de su radio. Cuando se incide un láser verde ($\lambda = 532$ nm) en las nanopartículas de oro, se produce la condición de resonancia máxima, produciendo la adsorción de la luz y la generación de calor.

Esto es característico de la geometría esférica de las nanopartículas de oro y no ocurre en otras geometrías a la misma longitud de onda. Si se modifica la geometría, pueden aparecer más modos de vibración. En el caso de nanopartículas elipsoidales, dependiendo del grado de elipticidad podría aparecer una segunda resonancia [24].

2.1.6 Rendimiento de un biosensor basado en SPR

El rendimiento de cualquier sensor puede medirse en términos de selectividad, sensibilidad, resolución, límite de detección, rango dinámico y linealidad [55], en el caso de biosensores basados en SPR, los principales parámetros suelen ser sensibilidad, resolución y límite de detección.

Es posible tener valores de sensibilidad en función de las variaciones detectables de las magnitudes en los parámetros de interés, en este caso, ángulo, longitud de onda de resonancia e intensidad debido a los cambios en el índice de refracción. Entre más grande sea el cambio, es mayor la sensibilidad del sensor. y puede obtenerse a partir de las siguientes ecuaciones [56].

La sensibilidad en términos del ángulo de resonancia se puede obtener por medio de la siguiente expresión:

$$S_{p,\theta_r} = \frac{d\theta_r}{dn_d} = \frac{\epsilon'_m \sqrt{-\epsilon'_m}}{(\epsilon'_m + n_d^2) \sqrt{\epsilon'_m (n_d^2 - n_p^2) - n_d^2 n_p^2}} \quad (\text{ec. 58})$$

donde, ϵ'_m es la parte real de la función dieléctrica del metal, n_d y n_p representan el índice de refracción del material dieléctrico y el prisma, respectivamente. De manera análoga, la sensibilidad en relación con los cambios de longitud de onda:

$$S_{p,\lambda} = \frac{d\lambda}{dn_d} = \frac{(\epsilon'_m)^2}{\frac{n_d^2}{2} \left| \frac{d\epsilon'_m}{d\lambda} \right| + (\epsilon'_m + n_d^2) \epsilon'_m \left| \frac{dn_p}{d\lambda} \right| \frac{n_d}{n_p}} \quad (\text{ec. 59})$$

La resolución se refiere al cambio mínimo detectable en las magnitudes de los parámetros de interés, es dependiente de la desviación estándar de la señal de salida σ_{S_0} y de la sensibilidad en unidades de índice de refracción S_{RI} en términos de la modulación. Puede obtenerse a partir de las siguientes expresiones [57, 45]:

$$\sigma_{RI} = \frac{\sigma_{SO}}{S_{RI}} \quad (\text{ec. 60})$$

siendo para modulación angular la (ec. 61) y para modulación de longitud de onda (ec. 62):

$$S_{RI} = \left| \frac{\delta\theta_r}{\delta n_{\text{eff}}} \right| \frac{\delta n_{\text{eff}}}{\delta n} \quad (\text{ec. 61})$$

$$S_{RI} = \frac{\delta\lambda_r}{\delta n_{\text{eff}}} \frac{\delta n_{\text{eff}}}{\delta n} \quad (\text{ec. 62})$$

donde n_{eff} es el índice efectivo, y $\frac{\delta n_{\text{eff}}}{\delta n}$ representa la sensibilidad del índice efectivo del plasmón de superficie:

$$n_{\text{eff}} = \frac{k_{\text{spp}}}{k_0} \quad \frac{\delta n_{\text{eff}}}{\delta n} = \left(\frac{\epsilon'_m}{\epsilon'_m + n_d^2} \right)^{\frac{3}{2}}$$

Finalmente, el **límite de detección** (LOD) por sus siglas en inglés, se define como la concentración más baja de una sustancia que se puede detectar de manera confiable en una muestra, produciendo un cambio resoluble en el parámetro medido, con certeza y reproducibilidad [2].

$$\text{LOD} = \chi \cdot \frac{\sigma_{\text{ref}}}{S_{p,\lambda}} \quad (\text{ec. 63})$$

Siendo χ el límite de confianza. La desviación estándar de la referencia σ_{ref} es aquella que contempla los valores sin la sustancia de interés, a esta sustancia también se le denomina solución blanco o de referencia.

2.2 Aplicaciones de los biosensores plasmónicos

Los biosensores plasmónicos están entre los dispositivos más estudiados debido a su versatilidad, costo relativamente bajo, fácil utilización, alta sensibilidad, monitoreo sin etiquetas, límites de detección ultra bajos, detección en tiempo real y su posibilidad de ser reutilizables [58, 59, 36, 60].

Están compuestos por una capa de biodetección (que contiene anticuerpos, aptámeros, sondas de DNA u otras moléculas biológicas) destinada a reconocer el objetivo, ver **Figura 2.11**; y un transductor óptico que convierte el evento de enlace (reconocimiento) en una señal medible.

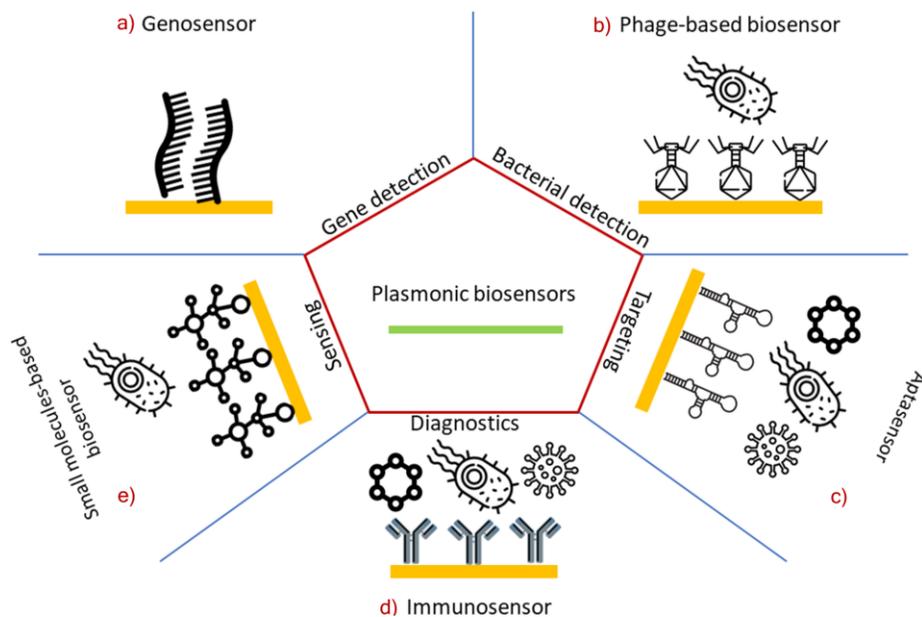


Figura 2.11. Elementos de reconocimiento en biosensores plasmónicos. a) Detección entre cadenas de DNA/RNA | b) Detección de bacterias usando bacteriófagos. | c) Reconocimiento de compuestos orgánicos hasta proteínas complejas usando aptámeros | d) Diagnóstico molecular entre anticuerpos y diferentes biomoléculas | e) Detección bacteriana usando moléculas pequeñas. Figura adaptada de [18].

Se destaca que cada interacción para el bioreconocimiento es específica, esto implica que los biosensores plasmónicos en general tienen una alta selectividad en función del ligando.

2.2.1 Detección de analitos

El fenómeno de SPR se identifica como un mínimo pronunciado en la curva de reflectividad y un incremento correspondiente en la absorción de la luz, cuando la frecuencia de la luz incidente es próxima a la frecuencia de resonancia plasmónica del metal. En un gráfico de reflectividad (%) vs longitud de onda, el punto mínimo de la gráfica indica la longitud de onda específica donde ocurre el fenómeno de SPR, ver **Figura 2.12**. Adicionalmente, el campo evanescente generado en este proceso es sensible a las propiedades ópticas del medio dieléctrico adyacente a la interfaz metal-dieléctrico [32].

Un cambio en el medio cercano a la superficie del metal afecta la resonancia de plasmón y, por lo tanto, desplaza la posición del mínimo en el gráfico. Si la posición del mínimo cambia al añadir un componente al medio cercano a la interfaz, implica un cambio en el índice de refracción. Este desplazamiento es el fundamento para detectar la presencia y concentración de una sustancia específica en una muestra.

Dicha sustancia específica, recibe el nombre de **analito**, definido por la IUPAC como: “El componente de un sistema a ser analizado” [2].

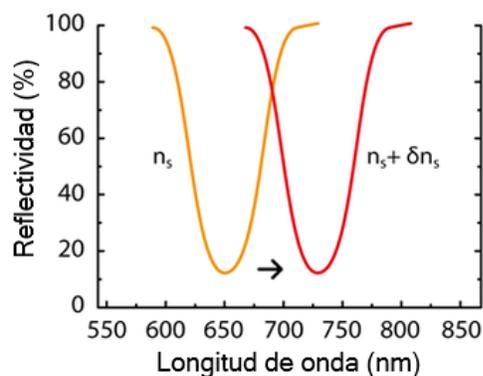


Figura 2.12. Desplazamiento de la longitud de onda resonante en SPR debido a un cambio en la reflectividad observado en función del índice de refracción. Figura adaptada de [61].

Durante la pandemia de COVID-19, se han desarrollado biosensores plasmónicos basados en SPR para la detección rápida de SARS-CoV-2 (Qiu, et al., 2020; Raziq, et al., 2021). Sin embargo, estos biosensores presentan inconvenientes, como una baja sensibilidad de detección o requieren de tratamientos previos de las muestras (Cennamo, et al., 2021; Tian, et al., 2020), limitando su aplicación como alternativas confiables. Por otra parte, ya se han desarrollado varios biosensores LSPR relacionados con la COVID-19, incluyendo métodos por ácidos nucleicos, anticuerpos, proteínas y partículas virales completas (Huang et al., 2021; Lewis et al., 2021; Qiu et al., 2020).

Aunque estos métodos basados en LSPR han demostrado buenos rendimientos de detección, todavía es necesario mejorar aún más la sensibilidad de estos biosensores para acercarse a la lograda por los métodos basados en PCR. La detección de interacciones moleculares es el principio de los biosensores. Para una mejor comprensión del funcionamiento de los biosensores es indispensable considerar las fuerzas intermoleculares e intramoleculares presentes las interacciones moleculares en un sistema bioquímico.

En este trabajo, se hará la detección basada en SPR al utilizar AuNFs y en LSPR al utilizar AuNPs.

2.2.2 Interacciones moleculares

Las propiedades fisicoquímicas de sustancias como el agua, DNA/RNA, macromoléculas sintéticas, polímeros, entre otros; son el resultado de las interacciones dadas por fuerzas moleculares. En esta sección, se abordará su importancia para este trabajo.

2.2.2.1 Fuerzas intermoleculares

Las fuerzas intermoleculares mantienen unidas a las moléculas de las sustancias dando lugar a los estados de agregación: sólido, líquido y gaseoso [62]. Se describirán brevemente dichas interacciones:

Fuerzas de Van der Waals

Son un conjunto de fuerzas débiles producidas debido a la atracción entre moléculas que poseen momentos dipolares, ya sean moléculas polares o apolares. Aunque son más débiles que las fuerzas covalentes o iónicas, pueden ser significativas en sistemas moleculares a corta distancia. Las fuerzas de Van der Waals pueden dividirse en varios tipos:

- **Fuerzas de dispersión (London):** Se generan debido a la asimetría instantánea de la nube electrónica de las moléculas, lo que induce momentos dipolares temporales [62]. Estas fluctuaciones pueden inducir momentos dipolares en moléculas cercanas, ocasionando una atracción entre ellas. Estas fuerzas aumentan con el tamaño de las moléculas, ya que moléculas más grandes poseen más electrones y, por lo tanto, mayores fluctuaciones en sus nubes electrónicas.
- **Fuerzas de dipolo-dipolo:** Estas actúan entre moléculas polares. En una molécula polar, la distribución electrónica es asimétrica, lo que implica una separación permanente de cargas y la formación de un momento dipolar. Las moléculas con momentos dipolares pueden

atraerse mutuamente debido a la interacción entre sus cargas parciales positivas y negativas.

- **Fuerzas de dipolo inducido-dipolo (Debye):** En este caso, una molécula polar puede inducir un momento dipolar en una molécula no polar al acercarse a ella. Aunque la molécula no polar originalmente no tiene un momento dipolar, la presencia de la molécula polar puede causar una redistribución temporal de los electrones, resultando en una atracción entre las dos moléculas.

Puentes de hidrógeno

Es un tipo de enlace dipolo-dipolo muy fuerte que ocurre específicamente entre un átomo de hidrógeno, enlazado a un átomo de oxígeno, nitrógeno o flúor [62]. El enlace biotina-estreptavidina presenta estas interacciones y es responsable de su alta afinidad intermolecular [63], Asimismo, estas fuerzas permiten la unión entre nucleótidos complementarios.

Fuerzas ion-dipolo

Es una fuerza electrostática donde un ion y una molécula polar se atraen entre sí, esto ocurre en los electrolitos. La magnitud de la fuerza de interacción depende del momento dipolar de la molécula, así como del tamaño y carga del ion [62].

2.2.2.2 Fuerzas intramoleculares

Las fuerzas intramoleculares son aquellas que mantienen unidos a los átomos dentro de una molécula, dando lugar a la formación de enlaces químicos. Los átomos forman enlaces para alcanzar la configuración electrónica estable de un gas noble (ocho electrones en su último nivel de energía), a esto se le conoce como regla del octeto. Esta regla puede ser satisfecha a partir de la transferencia o compartición de electrones por medio de:

Fuerzas ion-ion

Es la fuerza de atracción electrostática entre iones de carga opuesta (aniones y cationes) en una red cristalina debido a la formación de un compuesto mediante transferencia de electrones (enlace iónico) [62].

Enlace covalente

Es la fuerza en la que dos átomos comparten al menos un par de electrones. El número de pares de electrones compartidos da lugar a los enlaces covalentes: simples, dobles y triples. Los electrones compartidos se encuentran en una región de solapamiento entre los átomos involucrados, lo que genera una nube electrónica donde se unen los átomos. esta fuerza está relacionada con la entalpía de enlace [62].

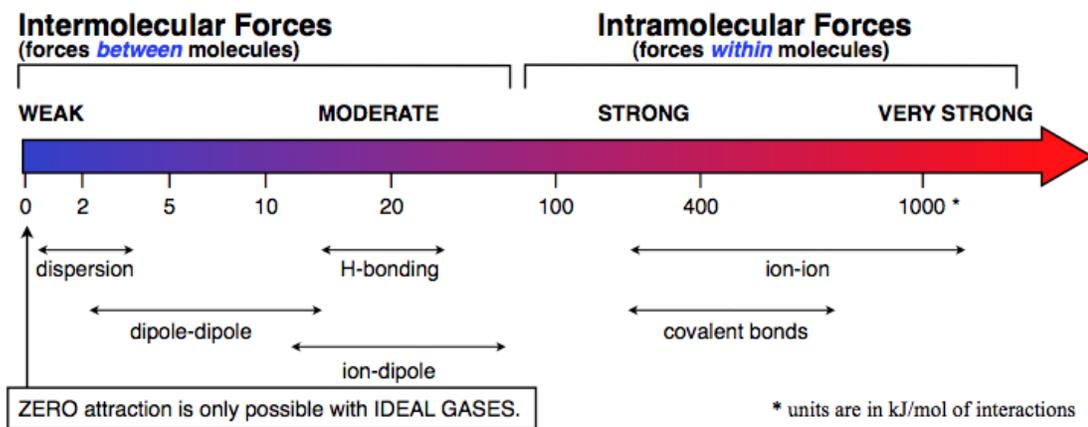


Figura 2.13. Representación esquemática de la magnitud de las fuerzas intermoleculares e intramoleculares. Figura reproducida de [64].

2.2.2.3 Ácidos nucleicos

Un nucleótido representa la estructura fundamental de los ácidos nucleicos. Consiste en la unión de una molécula de azúcar (ribosa en el RNA o desoxirribosa en el DNA), un grupo fosfato y una base nitrogenada, ver **Figura 2.14**. Las bases nitrogenadas son compuestos aromáticos heterocíclicos que se clasifican en relación con su cantidad de anillos carbono-hidrógeno: las purinas (dos anillos), como la adenina y la guanina; y las pirimidinas (un anillo), como la citosina, la timina y el uracilo [65].

En el DNA, las bases utilizadas son la adenina «A», citosina «C», guanina «G» y timina «T», mientras que, en el RNA, la base uracilo «U» reemplaza a la timina. Los ácidos nucleicos son polímeros debido a las largas cadenas de nucleótidos que están unidos entre sí mediante un tipo de enlace covalente conocido como enlace fosfodiéster [66]; este enlace ocurre entre el 5'-fosfato de un nucleótido y el grupo 3'-hidroxilo de la pentosa de otro nucleótido [65].

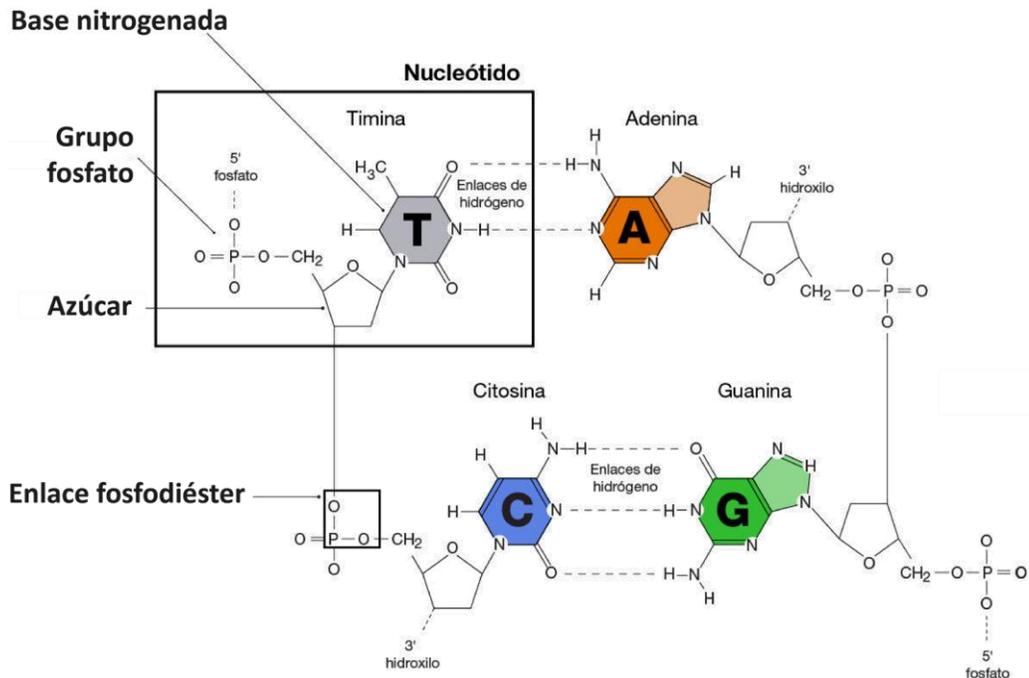


Figura 2.14. Interacción y forma estructural de las bases nitrogenadas en el DNA. Figura adaptada de [67].

Los ácidos nucleicos son biomoléculas de gran tamaño que desempeñan funciones esenciales tanto en las células como en los virus. Una de sus funciones primordiales es el almacenamiento y la expresión de información genómica. El DNA tiene un papel fundamental en la codificación de la información necesaria para la producción de proteínas en las células. Presenta una estructura bicatenaria (dos cadenas) característica de doble hélice. La interacción entre las dos cadenas ocurre a través de puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, ver **Figura 2.14a**. Específicamente, se forman enlaces de adenina con timina (A-T) y de citosina con guanina (C-G), manteniendo su estabilidad e integridad [66, 65].

El RNA cumple múltiples funciones celulares, incluyendo la síntesis proteica. A diferencia del DNA, es común que el RNA esté compuesto por una única cadena (monocatenario), ver **Figura 2.15b**. En las células, se pueden identificar diferentes tipos, el RNA mensajero (mRNA), el RNA ribosomal (rRNA) y el RNA de transferencia (tRNA) [66].

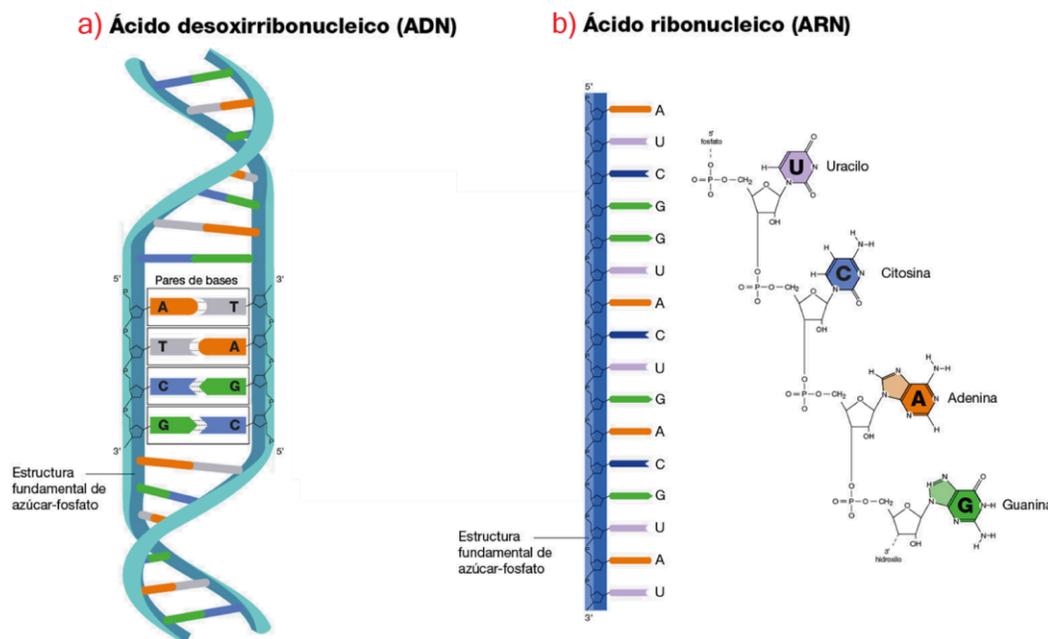


Figura 2.15. Forma estructural característica las cadenas de nucleótidos: a) DNA | b) RNA. Figura adaptada de [67].

2.2.3 SARS-CoV-2

Existen virus de DNA y RNA, en el caso del virus SARS-CoV-2 descubierto en Wuhan, China a finales del 2019; es un virus de RNA monocatenario de cadena positiva, tiene 80-220 nm de diámetro y picos vesiculares de 12-24 nm [11]. Pertenece a la familia *Coronaviridae* del género *Betacoronavirus* dado por su cápsula característica de corona radiada, ver **Figura 2.16**.

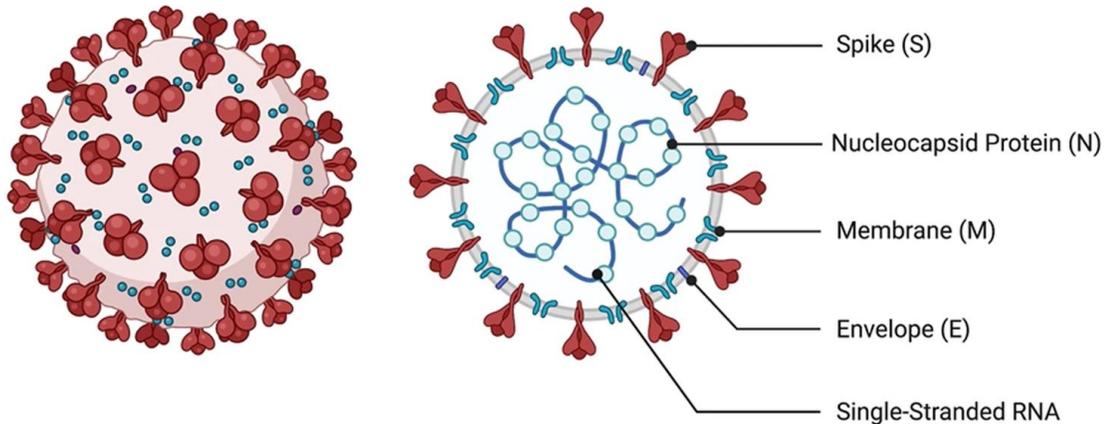


Figura 2.16. Elementos estructurales del SARS-CoV-2 señalando las proteínas *Spike*, *nucleocapsid*, *membrane*, *envelope* y componentes internos como el RNA monocatenario. Figura adaptada de [68].

La detección de SARS-CoV-2, se basa en identificar secuencias únicas del RNA del virus mediante Prueba de Amplificación de Ácidos Nucleicos (NAAT, por sus siglas en inglés), como la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR). Los genes del virus que se han utilizado hasta ahora incluyen las proteínas N, E, S y la enzima RdRp (RNA polimerasa dependiente del RNA) perteneciente al gen Orf1ab [69], ver **Figura 2.17**.



Figura 2.17. Ubicación de los genes y conjuntos de posiciones de los cebadores y sondas en el genoma del SARS-CoV-2. Figura adaptada de [70].

Para la detección del material genético del virus se utilizan conjuntos de cebadores (fragmento corto de DNA monocatenario) y sondas (secuencia de DNA/RNA con un identificador que se utiliza para encontrar su secuencia complementaria en una muestra) los cuales fueron introducidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el documento “*Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases*” [69].

La característica más importante del virus, que hace posible su entrada al organismo, radica en la proteína *Spike*. Esta proteína, es responsable del reconocimiento del objetivo, la unión y la entrada celular; siendo las subunidades S1 y S2 las que desempeñan roles distintos durante este proceso [32]. La subunidad S1 es responsable del reconocimiento y la unión al objetivo, mientras que la subunidad S2 está involucrada en la fusión de la membrana y el escape del endosoma [33]. El SARS-CoV-2 ha presentado variantes genéticas a través del tiempo como lo fue la variante Alpha (B.1.1.7), Delta (B.1.617.2) y Ómicron (B.1.1.529), por mencionar algunas de las más destacadas. En todas estas variantes, las mutaciones más importantes han ocurrido en la proteína S [12]. Con el propósito de investigación y desarrollo de nuevas tecnologías, se emplea un esquema de oligonucleótidos que codifiquen para SARS-CoV-2, basados específicamente en el gen de la enzima RdRp. Esto asegura la detección de este virus independiente de la variante, ya que no se han registrado mutaciones en dicho gen [11, 12].

El término **oligonucleótido**, deriva del griego *oligo* que significa poco o pequeño, en este caso implica una porción pequeña de nucleótidos. Por lo tanto, los oligonucleótidos son cadenas cortas sintéticas de DNA o RNA que normalmente constan de 50 pares de bases o menos. La síntesis de los oligonucleótidos se lleva a cabo mediante un proceso químico en fase sólida. En este proceso, las bases nitrogenadas «A», «C», «T», «G» se añaden de manera específica y secuencial. Durante la síntesis, los oligonucleótidos pueden formar cadenas o secuencias defectuosas. Esto ocurre debido a que, cada vez que se agrega una base, existe

la posibilidad de que no se adhiera correctamente dando lugar a la formación de cadenas laterales. Dichas cadenas pueden competir con la secuencia completa y provocar un impacto en los resultados. Cuando es necesario utilizar la secuencia completa de un oligonucleótido, es imprescindible recurrir a métodos de purificación [70] como el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), *Cartridge* y Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE). La diferencia entre estos tres métodos radica en una relación pureza-rendimiento siendo, HPLC: mayor rendimiento, PAGE: mayor pureza y *Cartridge*: mayor pureza y mejor rendimiento, pero limitado a ciertos oligonucleótidos [71].

Para desarrollar este trabajo, se solicitó la síntesis de dos oligonucleótidos que codifican para el gen RdRp de SARS-CoV-2. Uno de ellos posee una modificación en 5' insertando un grupo tiol el cual será el ligando del oro y permitirá el proceso de funcionalización, ver **Figura 2.18a**. La otra secuencia, corresponde a la parte complementaria permitiendo la detección del evento de enlace, ver **Figura 2.18b**.

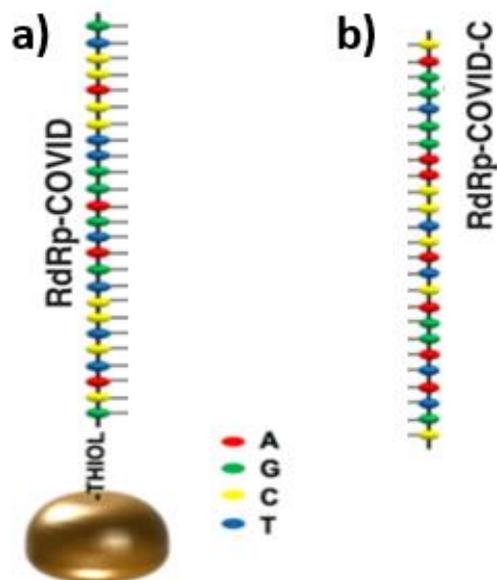


Figura 2.18. Representación esquemática de los oligonucleótidos. a) Secuencia del gen RdRp de SARS-CoV-2 modificada con el grupo tiol funcionalizado al oro. b) Secuencia complementaria del gen RdRp de SARS-CoV-2. Figura adaptada de [72].

2.2.4 Funcionalización y eventos de enlace

La **funcionalización** es un proceso perteneciente a la ciencia de materiales en el que se insertan grupos funcionales en una superficie para modificar sus propiedades con el objetivo de facilitar la unión de otras moléculas [73, 74], a esas moléculas las llamaremos **ligandos**.

Este proceso implica dos fenómenos principales: la **fisisorción**, donde las moléculas se adhieren a una superficie a través de interacciones débiles, como fuerzas de Van der Waals; es reversible y predomina a temperaturas bajas. En contraste, la **quimisorción** involucra la formación de enlaces químicos entre las moléculas y la superficie, produciendo una adhesión más fuerte; suele requerir temperaturas altas para desorber la molécula de la superficie. Es posible clasificar el proceso de funcionalización como:

Funcionalización covalente

Se forma un enlace covalente entre la superficie y la molécula. Debido a la fuerza de enlace, la superficie no se puede desfuncionalizar fácilmente. Esto resulta útil para aplicaciones donde no es necesario reutilizar los sustratos o bien se necesita una señal continua y estable a largo plazo.

Funcionalización no-covalente

Esta interacción que ocurre entre la molécula y la superficie se debe a fuerzas intermoleculares. Su estabilidad depende de las condiciones como el pH, y es posible desfuncionalizar y reutilizar fácilmente el sustrato ya que es una interacción de tipo fisisorción.

Funcionalización híbrida

Agrupar ambos tipos de funcionalización mencionados antes e implica dos moléculas diferentes. La primera molécula se enlaza a la superficie mediante un enlace covalente, y se enlaza a la segunda molécula mediante

fuerzas intermoleculares; de esta forma la primera actúa como vínculo (ligando) y la segunda es aquella de interés para el biosensor (analito).

Adicionalmente, se puede hacer una separación en dos modalidades dependiendo de cómo se colocan las moléculas en la superficie:

Orientación aleatoria

La molécula contiene varios sitios con los que se puede adsorber a la superficie, y no es relevante la posición en la que se enlace.

Orientación determinada

Se controla el sitio reactivo de la molécula, para que se enlace de una posición específica sobre la superficie.

Actualmente, los bioreceptores predominantes para la funcionalización de superficies metálicas nanoestructuradas, en especial de oro, son aquellos basados en proteínas y oligonucleótidos tiolados [51, 74].

2.2.4.1 Grupo tiol

Los metales nobles poseen una alta afinidad por el grupo tiol (-SH) debido al enlace covalente formado entre el azufre (S) y el metal. La naturaleza inerte del oro ha permitido el uso de cadenas de alcanos con varios sustituyentes terminales y la formación de una amplia gama de grupos funcionales en la superficie de oro; estas biomoléculas tienen una alta selectividad hacia analitos específicos para aplicaciones en detección molecular, donde es necesario que reconozcan y puedan unirse a moléculas específicas, ver **Figura 2.19**.

La fuerza de un enlace tiol-oro se ve afectada por factores como el pH de la disolución, el tiempo de interacción, la pureza del compuesto tiolado y las propiedades de la superficie del oro. El depósito de receptores que contengan grupos tiol en una superficie de oro precede la formación de *self-assembled monolayers* (SAMs). Estas monocapas son el resultado de la orientación aleatoria

de las biomoléculas funcionalizadas o del procedimiento para obtener una orientación determinada [60].

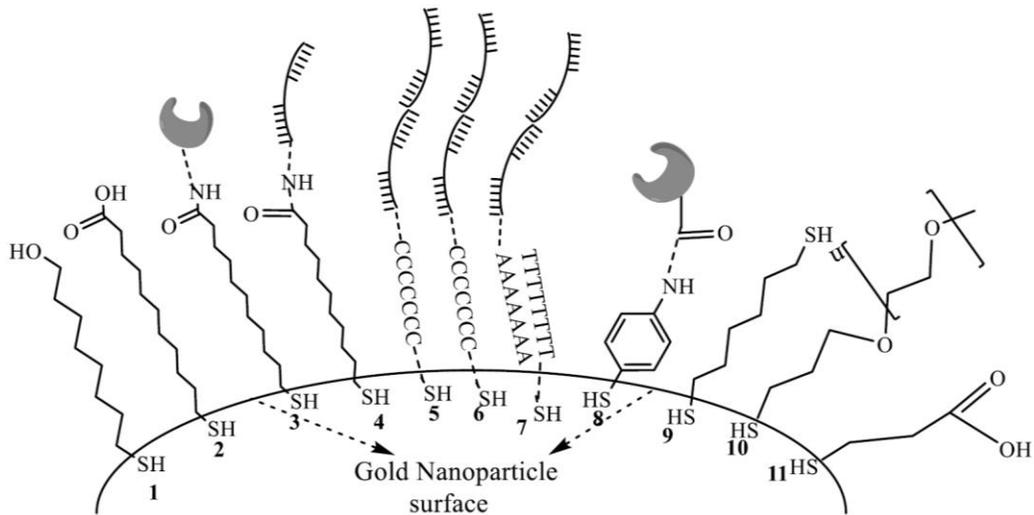


Figura 2.19. Representación esquemática de la funcionalización de una nanopartícula de oro con diferentes bioreceptores tiolados. 1: 11-Mercapto-1-undecanol | 2: Ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) | 3: Proteína unida al MUA con un enlace amida | 4: ADN unido al MUA con un enlace amida | 5: ADN directamente unido a la superficie de oro a través de un espaciador de carbono | 6: ADN directamente unido a la superficie a través de una cadena modificada con un grupo tiol | 7: ADN unido a la superficie de oro a través de una cadena de ADN complementaria con modificación de tiol | 8. proteína unida a la superficie de oro a través de un enlace amida con 4-aminotiofenol | 9. Molécula ditiol | 10. PEG tiolado | 11. Ácido mercaptopropiónico. Figura reproducida de [51].

2.2.4.2 Eventos de enlace

Un **evento de enlace** se refiere a la interacción selectiva entre ligandos y analitos. Este proceso implica la asociación de dos entidades químicas o biológicas, unión que se establece a través de interacciones moleculares.

En este trabajo, se considerarán tres esquemas de detección de eventos de enlace denotados en la **Tabla 2**:

Tabla 2. Esquemas de detección de eventos de enlace en este trabajo de tesis como eje central de estudio.

Esquema de detección	Polielectrolitos de cargas opuestas	Oligonucleótidos del gen RdRp de SARS-CoV-2	Proteínas
Ligando	Polihidrocloruro de alilamina (PAH)	Oligonucleótido tiolado	Estreptavidina
Analito	Sulfonato de poliestireno (PSS)	Oligonucleótido complementario	Biotina
Funcionalización	Fisorción por fuerzas de Van der Waals	Quimisorción por enlace covalente	Fisorción por fuerzas de Van der Waals
Interacción intramolecular	Electrostática por fuerzas ion-ion	Puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals

El evento de enlace entre cadenas de oligonucleótidos se denomina **hibridación**, implica la unión específica entre secuencias de ácidos nucleicos complementarias, ver **Figura 2.20**.

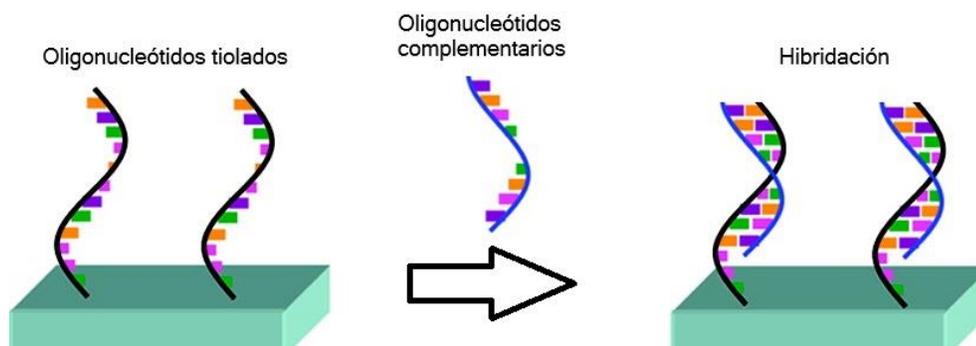


Figura 2.20. Representación esquemática del evento de hibridación. Figura adaptada de [75].

Capítulo 3

Metodología

3.1 Fabricación del chip plasmónico

A continuación, se describen los componentes y el proceso de fabricación de cada uno de los componentes que conforman la estructura de un chip plasmónico desarrollado por el grupo de Optoelectrónica orgánica y que posteriormente fue utilizado para el estudio de funcionalización por el grupo de Biofotónica.

3.1.1 Fabricación del sustrato

Para lograr la formación de la interfaz dieléctrico/metal, se requería de un procedimiento para depositar una película delgada. En este sentido, existen diversos métodos posibles entre los que destacan: la evaporación térmica y la pulverización catódica conocida como *sputtering*. Debido al nivel de calidad requerido en los sustratos para la detección de agentes biológicos, se optó por la técnica de *sputtering*.

En el proceso de *sputtering*, se utiliza una partícula energética para bombardear la superficie del material objetivo con la suficiente energía para expulsar uno o más átomos. Este proceso implica la interacción de diversas partículas, siendo las más comunes los iones generados a partir de gases inertes. Dentro de la cámara principal, los iones son sometidos a un campo magnético, lo cual provoca su aceleración hacia el sustrato y la ocurrencia de colisiones que resultan en una transferencia de momento. Estas colisiones permiten que, al impactar con el material a evaporar, desprendan átomos del material objetivo. El equipo utilizado puede observarse en la **Figura 3.1**.

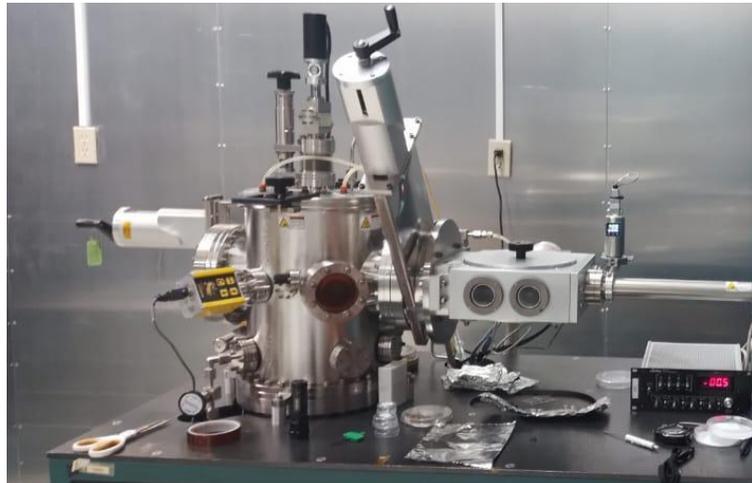


Figura 3.1. Equipo de *sputtering* modelo DCXS-750-4 AJA International. Figura reproducida de [76].

El proceso de fabricación comenzó con una muestra de vidrio (Corning® 2947N). El vidrio fue recortado en cuadrados de 2.5 cm x 2.5 cm y se limpiaron meticulosamente en un baño ultrasónico con soluciones de acetona, 2-propanol y agua desionizada. Luego, se realizó un secado usando una centrifuga a 800 rpm por 5 minutos, seguido de una evaporación de 20 minutos en una platina. Un flujo de nitrógeno se aplicó por 15 segundos para asegurar un secado completo. Posteriormente, se realizó un depósito de una nanopelícula de titanio (TiNF) de 2 nm de espesor para facilitar la adherencia de un posterior depósito de oro en la superficie de los sustratos, ver **Figura 3.2**.



Figura 3.2. Muestras de Corning® 2947N colocadas en la cámara principal del equipo de *sputtering*. Figura reproducida de [76].

En términos generales, se utilizaron nanopelículas de oro (AuNFs) de 50 nm de espesor y nanopartículas de oro (AuNPs) de 5 a 17 nm de radio. Tras haber depositado el oro en los sustratos, estos fueron sometidos a un tratamiento térmico conocido como deshumectación (*dewetting*). El proceso se llevó a cabo en una mufla CAISA, modelo DTT434.

La fabricación y caracterización de los sustratos fue realizado por el M. C. Irving Gazga con el asesoramiento del Dr. Ismael Cosme, para más detalles acerca de su trabajo, consulte la referencia [76].

3.1.2 Conformación del chip plasmónico

En general, un chip plasmónico se compone de una interfaz formada por un dieléctrico y un metal, que permite la generación de una señal y detección de un material asociado a su comportamiento plasmónico. En este chip el evento de unión de un analito de interés a su superficie debe poder ser medido, además de que es indispensable tener una curva de calibración y una relación ruido señal adecuada. Para el funcionamiento de un biosensor, resulta fundamental el desarrollo de un chip que tenga la capacidad de ser selectivo al analito de interés. Además, es necesario tomar en consideración el régimen de reconocimiento molecular, transitorio o estacionario. Asimismo, es fundamental determinar si se analizará la cinética, afinidad o concentración del analito en la superficie funcionalizada.

El estado estacionario o régimen permanente, ocurre en un sistema cuando se cumple que el flujo volumétrico de entrada es igual al flujo volumétrico de salida: $\dot{V}_{ent} = \dot{V}_{sal}$ obteniendo un volumen constante dentro de un sistema. En este trabajo se obtiene este régimen al inyectar con flujo continuo mediante una bomba de infusión. El estado estacionario nunca ocurre al inicio del proceso debido a que el sistema requiere estabilizarse.

El estado transitorio o por lotes, ocurre cuando las propiedades de un sistema varían con respecto al tiempo hasta alcanzar un estado estable (estacionario),

ocurre en nuestros experimentos mediante inyección por micropipeta. El estado transitorio se obtiene usando la bomba de infusión al interrumpir la inyección de flujo. En la **Figura 3.3** se muestra la distribución de las capas que conforman los chips utilizados para su empleo mediante inyecciones con micropipeta.

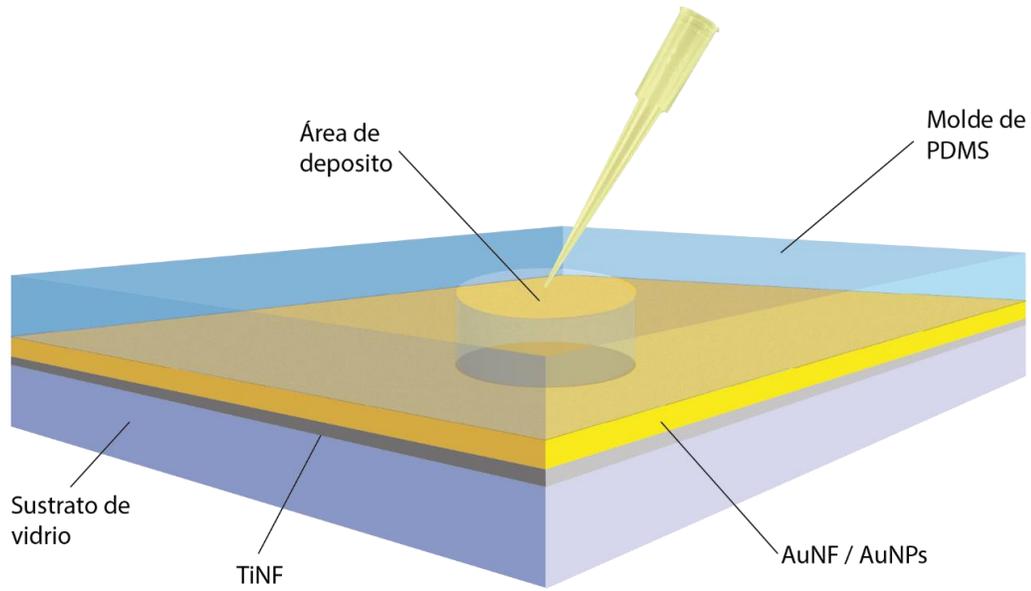


Figura 3.3. Conformación estructural de un chip plasmónico (sistema abierto).

En la figura anterior, se observa que el proceso de inyección se lleva a cabo en un sistema abierto; el uso de una micropipeta puede generar un flujo turbulento en el área de depósito capaz de afectar la funcionalización de la superficie, esto ocurre principalmente en las interacciones por fuerzas de Van der Waals y en puentes de London [73]; por otra parte, en el caso de la interacción por enlace covalente es menos probable que se separe el ligando del oro [77]. Es por ello, por lo que el estado transitorio se utiliza inicialmente para validar los procesos de calibración donde no se requiere de una dinámica controlada o para realizar experimentos de funcionalización previos al ensayo. Es importante aclarar que, para obtener una señal estable, se requiere de un volumen constante de analito.

Para los ensayos *in situ*, se recurre a la inyección del ligando y analito por medio de un flujo laminar mediante una bomba de infusión. Para este objetivo, el grupo de Biofotónica del INAOE propuso un sistema cerrado por medio de un dispositivo

microfluídico con canales de entrada y salida, lo que permite la acumulación del analito en un espacio confinado dentro del dispositivo. Este dispositivo fue el recurso utilizado para probar la eficiencia de la funcionalización y los eventos de unión de los diferentes sistemas de estudio propuestos. Esta configuración permite el contacto del fluido con el oro y promueve una dinámica más controlada a través de un flujo continuo.

En la **Figura 3.4** se muestra la distribución de las capas que conforman los chips utilizados para su empleo mediante inyección de flujo continuo.

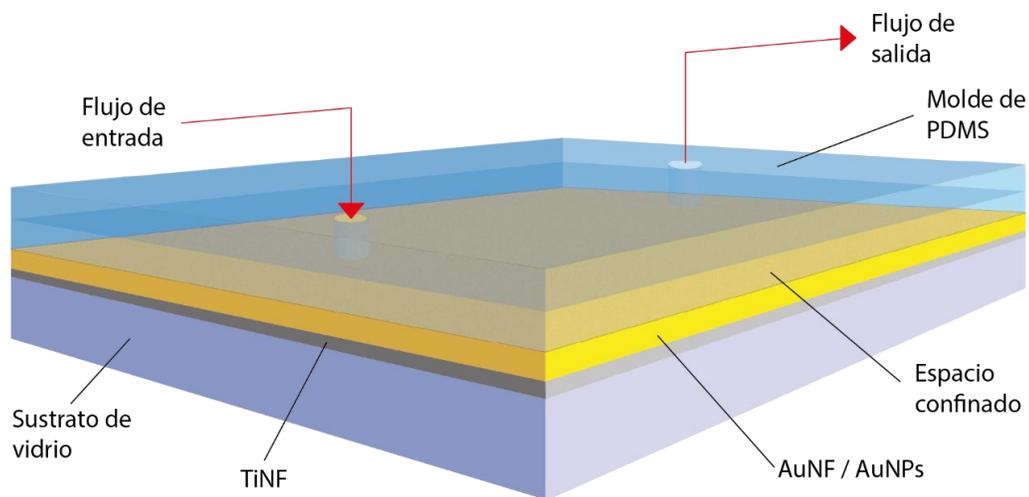


Figura 3.4. Conformación estructural de un chip plasmónico (sistema cerrado).

3.1.3 Preparación y acoplamiento del molde de PDMS

El material base del PDMS es fluido a temperatura ambiente, al agregar un agente de curado, las moléculas sufren una reacción de polimerización cuyo producto es un elastómero sólido. Debido a su composición química inerte y biocompatibilidad, se minimizan interferencias, facilitando la evaluación de la selectividad y sensibilidad frente a diferentes analitos [78].

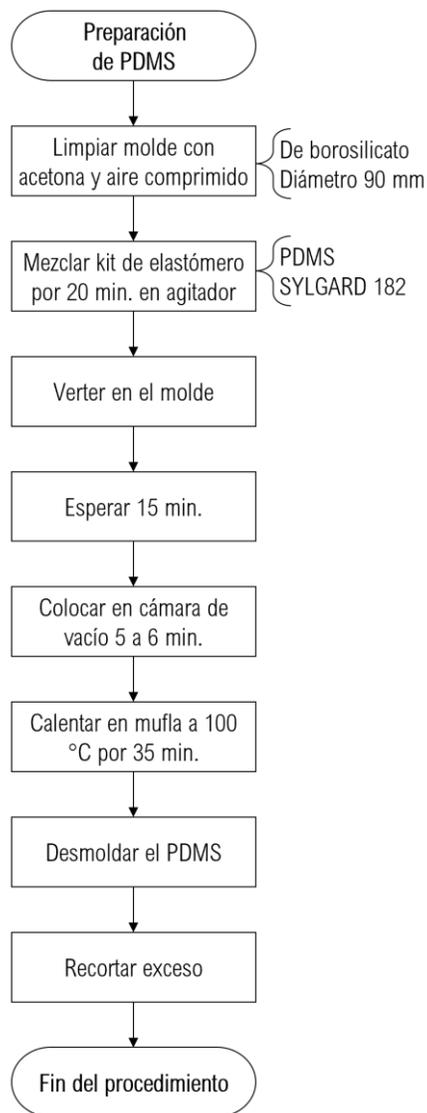


Figura 3.5. Diagrama de flujo del procedimiento para la preparación de moldes de PDMS.

De manera detallada, se describe cada paso del procedimiento de fabricación observado en la **Figura 3.5**:

Paso 1) El molde con la plantilla fue limpiado utilizando acetona y aire comprimido con el fin de evitar la adherencia del PDMS y eliminar posibles impurezas. Además, se requiere que el molde tuviera la capacidad de soportar temperaturas próximas a los 100°C. Para ello, se utilizó un plato de Petri de borosilicato con un diámetro de 90 mm.

Paso 2) El kit de elastómero PDMS SYLGARD™ 182 consiste en una base y un agente de curado, los cuales fueron mezclados en una proporción de 10:1 (es decir, diez partes de base por una parte de agente de curado). Para garantizar una precisión en la medición, se empleó una báscula analítica para pesar los componentes.

Paso 3) Posteriormente, el polímero fue mezclado minuciosamente durante 20 min usando un agitador. La mezcla fue cuidadosamente vertida en el molde preparado en el primer paso. Se consideró un tiempo de espera de 15 min, durante el cual el PDMS se expandió gradualmente y ocupó la totalidad de la superficie del molde.

Paso 4) Se colocó el molde en una cámara de vacío durante un período de 5-6 min. La aplicación del vacío permitió que cualquier burbuja de aire presente en la mezcla se desplazara hacia la superficie. Esta etapa resultó crucial para asegurar la homogeneidad y la calidad del PDMS, evitando la formación de defectos en el material final.

Paso 5) Para realizar el proceso de curado, el molde debe pasar por un proceso de horneado. Específicamente, el PDMS SYLGARD™ 182, requería una temperatura de 100°C durante 35 min para un curado adecuado. El proceso se realizó en una mufla eléctrica marca CAISA®, modelo DTT434.

Paso 6) Se procede a retirar el PDMS del molde con precaución. Se empleó un cortador para recortar cualquier exceso de material y obtener la forma deseada del molde que se acoplará al chip plasmónico.

Finalmente, para el proceso de acoplamiento se empleó un tratamiento de plasma durante 60 segundos para fijar el molde a la superficie del chip, evitando así la necesidad de utilizar adhesivos y agentes químicos que pudieran disolverse al entrar en contacto con el medio de los analitos y generar interferencias en los experimentos.

3.1.4 Puesta a punto del chip plasmónico

Una vez que se ha completado el proceso de acoplamiento del dispositivo microfluídico en el sustrato, se procede a realizar la preparación del chip plasmónico para su uso siguiendo el siguiente procedimiento:

Paso 1) Lavar la superficie del chip con agua tridestilada para eliminar partículas de polvo en la superficie.

Paso 2) Eliminar los residuos del agua en la superficie.

Paso 3) Colocar el sustrato en un portaobjetos limpio.

Paso 4) Agitar brevemente el portaobjetos en un agitador tipo vórtex procurando desplazar las gotas formadas en la superficie a los bordes del sustrato.

Paso 5) Esterilizar por 5 minutos el sustrato en el portaobjetos cubierto mediante el uso de una cámara UV-C para eliminar cualquier contaminación bacteriana.

Paso 6) Asegurarse de que la superficie del sustrato esté seca e impoluta, de lo contrario, repetir los pasos 3 y 4.

Paso 7) Almacenar el chip plasmónico en un portaobjetos sellado para su uso posterior.

3.2 Prototipo de biosensor plasmónico

El prototipo del biosensor se basa en la configuración de Kretschmann, para más detalles revisar la [Sección 2.1.4.1](#). En este trabajo, al ocurrir un evento de enlace en la superficie del oro, ocurre un cambio en la función dieléctrica del medio que la rodea. Esto provoca un cambio en el índice de refracción del material dieléctrico (la superficie de detección) mientras que el índice de refracción del prisma permanece constante [15].

Para satisfacer la condición de resonancia, se propone un prototipo para la generación de SPR, ver **Figura 3.6**.

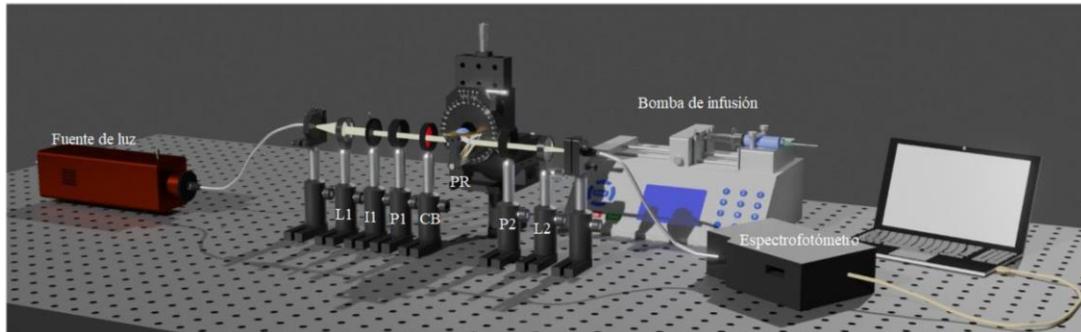


Figura 3.6. Modelo en 3D (vista frontal) del prototipo de arreglo óptico para el biosensor. L1: Lente colimadora | I1: Iris o diafragma | P1: Polarizador 1 | CB: Cristal birrefringente | PR: Prisma acoplado en la configuración de Kretschmann | P2: Polarizador 2 | L2: Lente. Figura reproducida de [79].

El prototipo de la **Figura 3.6** contempla la necesidad de trabajar en un esquema de inyección por flujo continuo mediante una bomba de infusión. Esto tiene como finalidad controlar la dinámica de unión oro-ligando y, análogamente, ligando-analito por medio de un flujo laminar.

3.2.1 Arreglo óptico

Posterior al diseño del prototipo, se recurrió al montaje del arreglo experimental adicionando los componentes ópticos necesarios para mejorar la señal analógica detectada. El arreglo óptico obtenido con todas las consideraciones pertinentes puede verse en la **Figura 3.7**.

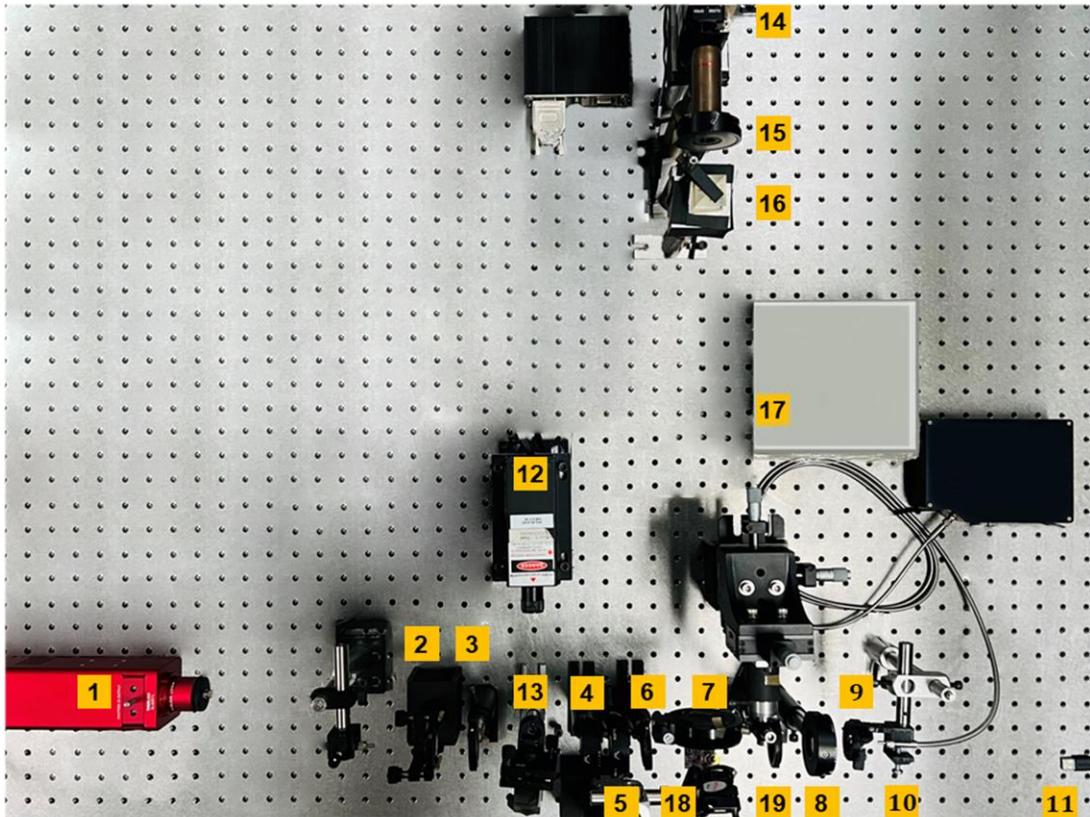


Figura 3.7. Vista superior del arreglo óptico del biosensor con componentes numerados. 1: Fuente de luz blanca | 2: Lente | 3: Diafragma | 4: Polarizador | 5: Cristal birrefringente | 6: Diafragma | 7: Prisma | 8: Polarizador | 9: Lente | 10: Detector | 11: Conector USB | 12: Láser $\lambda=650$ nm | 13: Divisor de haz | 14: Láser $\lambda=532$ nm | 15: Placa retardadora | 16: Divisor de haz | 17: Obturador | 18: Espejo | 19: Diafragma.

A continuación, se describe el camino óptico en relación con la numeración de la **Figura 3.7**: Partiendo de una fuente de luz blanca acoplada con fibra óptica «1», el haz emitido pasa a través de una lente colimadora «2» que dirige los rayos en una sola dirección (paralelos entre sí) para posteriormente pasar por un diafragma o iris «3» el cual limita la cantidad de luz y mejora la colimación.

La luz pasa por un polarizador con su eje de transmisión a 45° «4» con el cual se van a obtener las componentes de la onda paralela y perpendicular al plano de incidencia, estas componentes serán las que interfieran y den lugar a un interferograma que se verá reflejado en la interfaz gráfica del software. Estas dos componentes continúan su trayectoria a través de un cristal birrefringente «5» que

produce un retraso de la luz siempre que el eje de transmisión de fase sea diferente al del polarizador, esto genera una diferencia de camino óptico entre las dos componentes.

Posteriormente el haz pasa por un segundo diafragma «6» e incide en un prisma acoplado en la configuración de Kretschmann «7» incidiendo contra la interfaz metal-dieléctrico con índices de refracción diferentes generando el SPP, ver **Figura 3.8**.

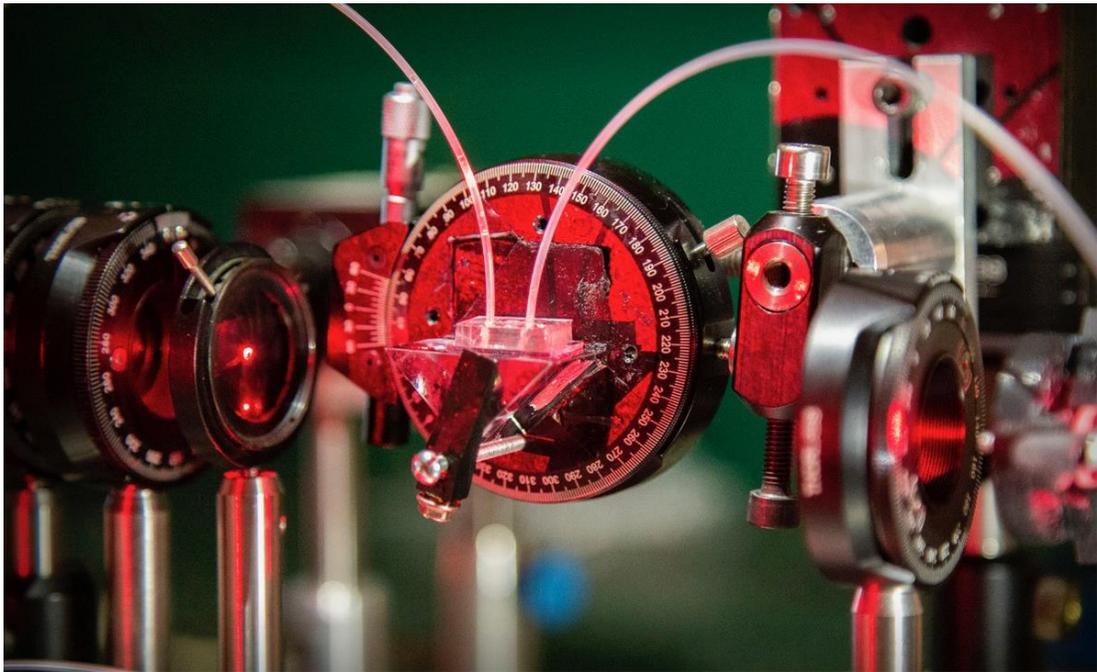


Figura 3.8. Chip plasmónico montado en el prisma acoplado en la configuración de Kretschmann. Figura reproducida de [80].

El haz que abandona el prisma pasa por un segundo polarizador «8» cuyo eje está cruzado con respecto al primero, permitiendo la interferencia entre las dos componentes. Finalmente, la luz polarizada pasa por una segunda lente «9» que enfoca los rayos hacia una fibra óptica acoplada a un espectrofotómetro «10» donde se mide la reflectancia obtenida en el proceso, esto convierte la señal analógica en una señal digital enviada a través de un cable USB «11» para el procesamiento por computadora.

Debido a la dificultad que implica alinear todos los componentes usando luz blanca, la alineación se realiza mediante el uso de un láser rojo «12» que emite a una longitud de onda $\lambda=650$ nm y que es paralelo al recorrido de la luz blanca. Por medio de un divisor de haz «13», la emisión del láser recorre el mismo camino óptico que la luz blanca permitiendo la alineación de los componentes del sistema al poder visualizar el láser en la mesa óptica.

Por último, para los experimentos de calentamiento nanolocalizado mediante el efecto termoplasmónico; se empleó un láser verde «14» de potencia fija que emite a una longitud de onda $\lambda=532$ nm cuyo haz pasa por una placa retardadora $\lambda/2$ «15» y por un divisor de haz polarizado «16» con la finalidad de regular la intensidad de salida del láser.

Para controlar el paso del haz se utiliza un obturador mecánico¹ «17» y finalmente, por medio de un espejo «18», se hace incidir perpendicularmente en el espacio confinado dentro del chip plasmónico. A fin de evitar la generación de ruido en la señal debido a los rayos refractados por el láser verde, se incorporó un tercer diafragma «19» para filtrar dichos rayos. El desarrollo de este dispositivo óptico fue parte de la tesis de doctorado del M.C. Juan Pablo Cuanalo.

¹ En la **Figura 3.7**, no se aprecia el obturador mecánico «17» debido a que fue retirado al momento de tomar la fotografía, en su lugar se señala el controlador del obturador.

3.2.2 Interfaz del programa en LabVIEW®

Mediante el procesamiento de la señal en LabVIEW® a través de una interfaz, desarrollada en el Instituto por el M. C. Juan Pablo Cuanalo y la Dra. Svetlana Mansurova, se obtienen valores de longitud de onda (nm), derivada (rad/min) y fase (rad). Los gráficos generados por el software que representa dichos valores en función del tiempo se denominan **sensogramas**, para más información revisar la [Sección 4.1](#). Estos sensogramas se visualizan en la interfaz del programa del biosensor, como se muestra en la **Figura 3.9**.

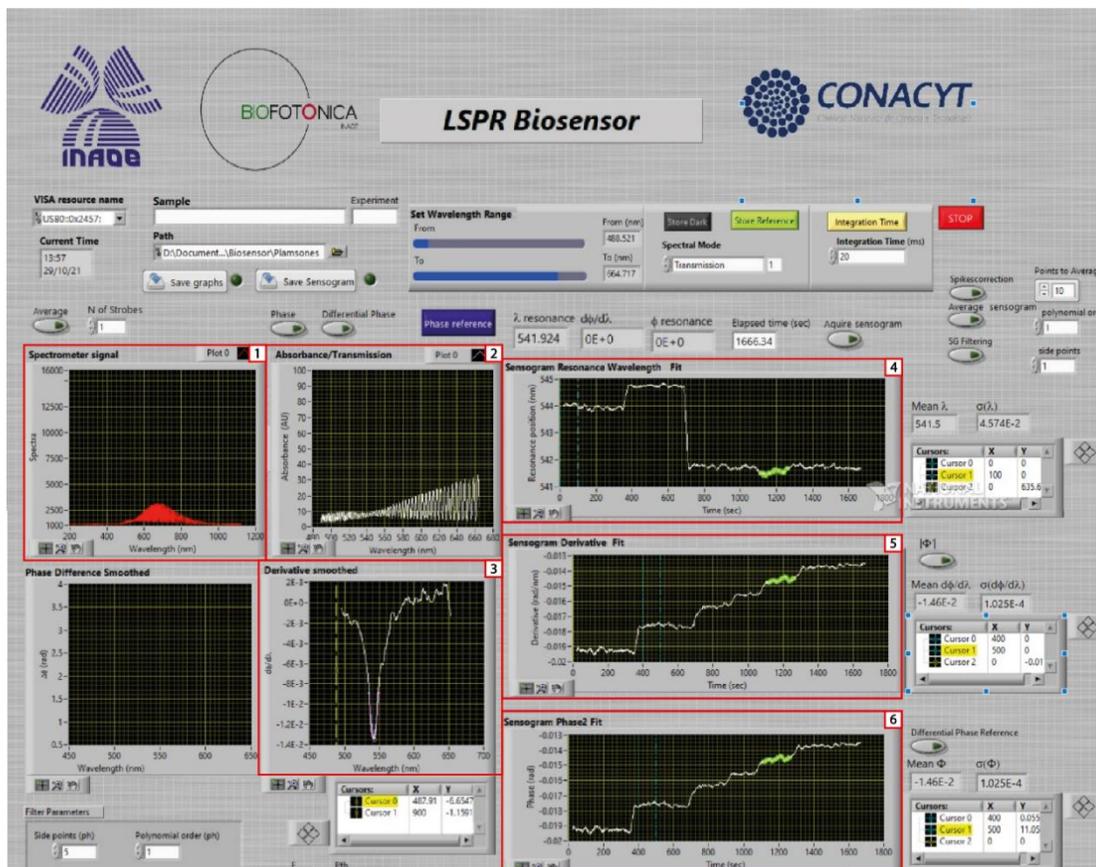


Figura 3.9. Interfaz del software en LabVIEW® del biosensor plasmónico. 1: Gráfico generado a partir de la intensidad del espectro con respecto a la longitud de onda | 2: Gráfico generado a partir de la absorbancia con respecto a la longitud de onda | 3: Sensograma de la longitud de onda de resonancia | 4: Sensograma de los valores de derivada | 5: Sensograma de los valores de la fase. Figura perteneciente al grupo de Biofotónica del INAOE.

3.2.3 Calibración de sustratos

Dadas las variadas condiciones en las que se fabrican los sustratos, es necesario verificar la respuesta de cada sustrato. La **Figura 3.10** hace referencia a la **Figura 2.12** donde se observa el punto mínimo de un gráfico de reflectividad (%) vs longitud de onda, donde ocurre el fenómeno de SPR.

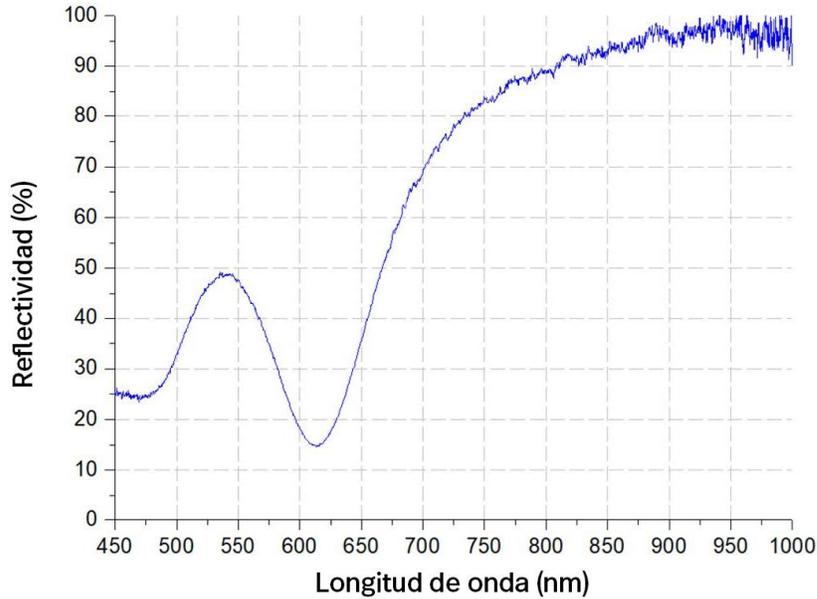


Figura 3.10. Gráfica de la reflectividad típica de una AuNF de 50 nm observada en el prototipo del biosensor. Figura adaptada de [81].

Al añadir un componente al medio cercano a la interfaz, es posible observar un cambio en la posición del punto mínimo de la curva de reflectividad (desplazamiento en longitud de onda), esto implica un cambio en el índice de refracción.

Este desplazamiento es el fundamento para detectar la presencia y concentración de una sustancia específica en una muestra, para verificar la capacidad del sustrato, se utilizaron disoluciones salinas de diferentes concentraciones (2%, 4%, 6%, 8% y 10%), tal como se muestra a continuación en la **Figura 3.11**.

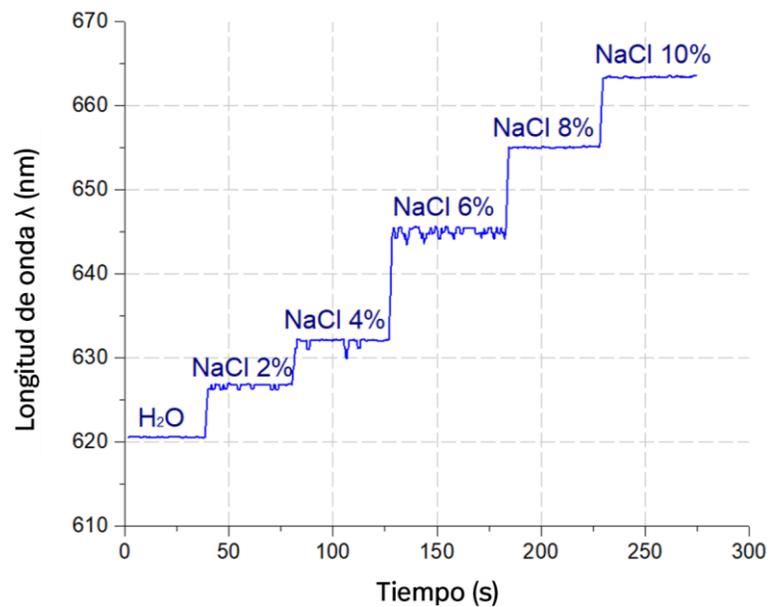


Figura 3.11. Sensograma obtenido mediante la inyección con micropipeta de diferentes concentraciones de solución salina. Figura adaptada de [81].

La calibración implica la inyección de agua desionizada en la superficie del sustrato mediante una micropipeta, sirviendo como referencia para medir la longitud de onda de resonancia. Posteriormente, se deposita sobre el sustrato una disolución de concentración conocida, esperando un periodo de tiempo hasta que la señal se estabilice.

Esta medición nos permite comprobar que el arreglo experimental del biosensor plasmónico y el sustrato acoplado operen adecuadamente. Adicionalmente, este sensograma de calibración servirá como referencia para la futura funcionalización de ese mismo chip.

A partir de un ajuste lineal al graficar la longitud de onda de resonancia vs las unidades de índice de refracción (RIU) de los datos de la **Figura 3.11**, se pueden obtener valores de sensibilidad y el límite de detección (LOD). Para más detalles, revisar la [Sección 2.1.6](#).

3.3 Funcionalización del chip plasmónico

El proceso de funcionalización es el eje central de este trabajo, por lo cual, a partir de este apartado entraremos en detalle sobre las distintas configuraciones y variables que se probaron hasta lograr un método efectivo y sintetizarlos en la forma de un protocolo. En esta tesis se estudiaron tres sistemas de interés para este tipo de biosensores plasmónicos: oligonucleótidos, polímeros iónicos y el sistema de proteínas biotina-estreptavidina.

3.3.1 Reactivos, analitos y bioreceptores

A continuación, se hará una descripción de todos los reactivos utilizados en la [Sección 3.3.1](#).

3.3.1.1 Agua de calidad reactivo

A pesar de su abundancia en el planeta, no toda el agua cuenta con la misma composición debido a la presencia de impurezas. Dichas impurezas son principalmente iones y material biológico que modifican sus propiedades (turbidez, color, densidad, punto de ebullición, punto de congelación, pH) haciendo poco viable su uso sin un adecuado tratamiento de purificación, por ejemplo: filtración, destilación, ósmosis inversa, entre otros.

Existe una clasificación para los tipos de agua propuesta por la *American Society for Testing and Materials* con la norma ASTM D1193:2011 la cual establece valores de referencia para el agua en calidad de reactivo [82].

Para el desarrollo de este trabajo experimental se emplean dos tipos de agua principalmente:

- Agua desionizada (DIW): Como su nombre lo dice, por medio de un proceso de desionización se purifica eliminando los electrolitos presentes en el agua. Es un disolvente ideal para reactivos con carga como los polielectrolitos evitando la

formación de sales y productos no deseados. Este disolvente se utiliza para la preparación de disoluciones iónicas.

Agua libre de nucleasas (NFW): Tiene como precursor agua desionizada a la cual, por medio de un proceso de doble destilación y ultrafiltración a través de membrana, se logra retirar la endonucleasa, ADN genómico, ADNasa, ARNasa, proteasa y exonucleasa haciéndola idónea para su uso en biología celular. Este disolvente será el indicado en el caso de la dilución de oligonucleótidos y proteínas evitando su degradación y contaminación. Este reactivo fue adquirido en Sigma-Aldrich® Lab.

A continuación, se listan algunas de las propiedades más relevantes del agua haciendo una diferenciación en el pH para el agua desionizada (DIW) y el agua libre de nucleasas (NFW):

- $M_w = 18.02 \text{ g/mol}$
- $\rho = 1.0 \text{ g/mL}$
- $\text{pH}_{\text{DIW}} = 5.0-7.0$
- $\text{pH}_{\text{NFW}} = 7.0-8.0$

3.3.1.2 Cloruro de sodio

El cloruro de sodio (NaCl), también conocido simplemente como sal en términos químicos, está compuesto por iones de sodio Na^+ y cloruro Cl^- . Se presenta en forma de cubos cristalinos, se considera un electrolito fuerte ya que se disocia completamente en los dos elementos que lo componen y es soluble en agua [62]. Es un reactivo ampliamente utilizado en aplicaciones bioquímicas y de biología molecular debido a que, en el ser humano, el sodio y el cloruro son los principales iones presentes en el espacio extracelular [83].

En sensores es frecuente su uso para calibración por medio de diferentes soluciones salinas de concentraciones conocidas. Se han empleado diversas técnicas para medir la concentración de NaCl usando fibra óptica, algunas de ellas

en, rejilla de fibra de período largo (LPFG) [84], resonancia de plasmón de superficie (SPR) [85] y plástico multimodo cónico (PMM) [86]. Tiene un peso molecular de $M_w = 58.44$ g/mol.

3.3.1.3 Polihidrocloruro de alilamina

Usualmente conocido como PAH, por sus siglas en inglés *Poly(allylamine hydrochloride)*, ver **Figura 3.12**. Es un polímero sintético altamente soluble en agua y contiene grupos amino en su estructura ($-NH_2$). En una disolución acuosa se forma un polielectrolito débil y el grupo amino adquiere carga positiva ($-NH_3^+$) formándose sal de amonio [87, 88]. Su fórmula química es $[CH_2CH(CH_2NH_2 \cdot HCl)]_n$ y tiene un peso molecular promedio (\bar{M}_w) de 50,000 g/mol.

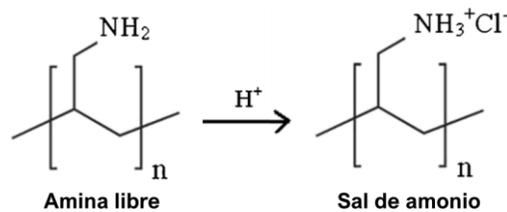


Figura 3.12. Representación esquemática del grupo amino en PAH. Figura reproducida de [87].

3.3.1.4 Sulfonato de poliestireno

Comúnmente conocido como PSS, por sus siglas en inglés *Poly(Styrene Sulfonate)*, ver **Figura 3.13**. Es un polielectrolito aniónico fuerte [89] utilizado ampliamente para la fabricación de materiales compuestos sobre diferentes sustratos a partir del método capa por capa [90], diferentes autores lo han utilizado en combinación con PAH [91, 92]. Su fórmula química es $(C_8H_7NaO_3S)_n$ y tiene un peso molecular promedio (\bar{M}_w) de 70,000 g/mol.

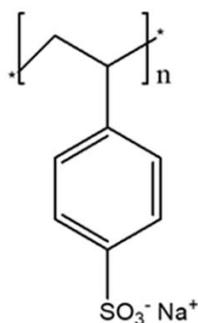


Figura 3.13. Representación esquemática de la estructura del PSS. Figura reproducida de [89].

3.3.1.5 Oligonucleótidos sintéticos de SARS-CoV-2

En la **Tabla 3**, se denota información de los oligonucleótidos mencionando el fabricante, la secuencia sintetizada, el método de purificación y la modificación realizada para llevar a cabo el trabajo experimental.

Tabla 3. Información relevante de los oligonucleótidos sintéticos (gen RdRp de SARS-CoV-2).

Nombre del oligo	Fabricante	Secuencia 5'-> 3'	Cantidad	Peso molecular	Purificación	Modificación
RdRp-COVID	Microsynth (Alemania)	GCATCTCCTG ATGAGGTTCC ACCTG	1.0 μmol	7805 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$	HPLC	5'-Thiol
RdRp-COVID-C	T4 Oligo (México)	CAGGTGGAAC CTCATCAGGA GATGC	347.9 nmol	7716.1 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$	HPLC	-

Estos oligonucleótidos tienen un punto de fusión a una temperatura $T_{\text{fus}} = 59.78$ °C. Para más información acerca del motivo para la elección de estos oligonucleótidos, revisar la [Sección 2.2.3](#).

3.3.1.6 Ditioneitol

También conocido como reactivo de Celando o simplemente como DTT, el 1,4-ditioneitol con fórmula molecular $C_4H_{10}O_2S_2$, ver **Figura 3.14**, es una sustancia empleada regularmente como estabilizador de enzimas y proteínas con grupos sulfhidrilo libres. El efecto estabilizador se debe a que en presencia de DTT, se reducen los enlaces disulfuro evitando el intercambio la degradación de los grupos tiol presentes en una disolución.

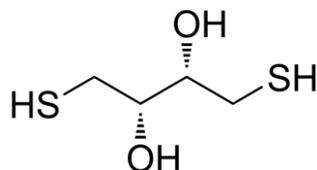


Figura 3.14. Representación esquemática de la estructura del DTT. Figura reproducida de [93].

Sin embargo, en presencia de un exceso de DTT, los sustituyentes funcionales de una proteína podrían estar recubiertos con moléculas de DTT que podrían dificultar estéricamente la unión del ligando [94].

3.3.1.7 Biotina-estreptavidina

La biotina es una vitamina con peso molecular de 244 Da [77], es una molécula pequeña estable al calor, soluble en agua y alcohol; es susceptible a la oxidación que interviene en el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas, aminoácidos y purinas. Es capaz de enlazarse fuertemente a la estreptavidina, se dice que es uno de los enlaces no-covalentes más fuertes. El complejo biotina-estreptavidina, ver **Figura 3.15**, presenta una constante de disociación (K_d) de alrededor de 10^{-14} M [95], la formación de puentes de hidrogeno es esencial para esta afinidad de unión [63].

La estreptavidina es una proteína con peso molecular aproximado de 56 kDa obtenida de la bacteria *Streptomyces avidinii* [95], se caracteriza por su elevada afinidad con la biotina, comparable con la avidina. Su estructura es homotetramérica simétrica [96], esto quiere decir que se compone de cuatro

subunidades iguales, por lo tanto, cada molécula de estreptavidina se puede enlazar a cuatro moléculas de biotina.

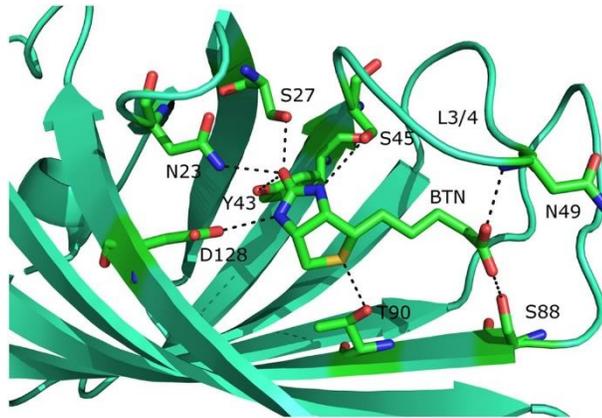


Figura 3.15. Representación esquemática del enlace de biotina-estreptavidina señalando los puentes de hidrogeno formados en la interacción (líneas punteadas), la estreptavidina es la estructura más grande y la biotina es la molécula lineal. Figura reproducida de [63].

3.3.1.8 Polidimetilsiloxano

El SYLGARD™ 182 es un elastómero de silicona comercial de alto rendimiento que consiste en una mezcla de polidimetilsiloxano (PDMS) y otros compuestos a base de silicio, originalmente desarrollado por la empresa Dow Corning Corporation®.

Debido a sus características de transparencia óptica, estabilidad térmica, propiedades mecánicas y resistencia a la oxidación e hidrólisis, el SYLGARD™ 182 ha sido ampliamente utilizado como material encapsulante en diversas aplicaciones, que incluyen sistemas microelectromecánicos (MEMS), dispositivos electrónicos y microfluídicos [97].

3.3.3 Preparación de analitos y bioreceptores

Antes de proceder a matrices biológicas fue necesario comenzar con la validación de la detección del proceso de funcionalización eventos de enlace; para ello ese

empleo un esquema de polielectrolitos antes de proceder con el uso de oligonucleótidos sintéticos específicos para SARS-CoV-2 y el sistema biotina-estreptavidina.

En esta sección se mencionarán los protocolos que se estandarizaron y se llevaron a cabo durante los experimentos de este trabajo.

3.4.3.1 Indicaciones generales y medidas de seguridad

Todos los procedimientos deben llevarse a cabo en una campana de flujo laminar, a menos que se requiera el uso de otros equipos. Los materiales se deben esterilizar en una cámara de luz ultravioleta durante al menos 5 minutos, y se recomienda utilizar material nuevo para evitar la contaminación cruzada. Es importante evitar la exposición a la radiación UV de las diluciones de oligonucleótidos.

Los tubos Eppendorf™, los tubos Falcon®, las puntas para micropipeta, las pipetas volumétricas y los frascos de color ámbar se pueden esterilizar mediante autoclave y luego se deben colocar en una cámara de luz ultravioleta durante 5 minutos para reducir los riesgos de contaminación durante las diluciones.

En todo momento, se debe utilizar el equipo de protección personal adecuado, como guantes de nitrilo, gafas de seguridad, cubrebocas, bata de algodón y calzado industrial. Además, es necesario tener capacitación en el uso y manejo de los equipos, y verificar su calibración antes de utilizarlos. Antes de manipular los reactivos químicos, se recomienda revisar las hojas de datos de seguridad y familiarizarse con los protocolos de seguridad del laboratorio. Es fundamental conocer la ubicación de las regaderas y los lavaojos, así como identificar claramente las salidas de emergencia en caso de algún incidente.

3.4.3.2 Protocolo para la preparación de polielectrolitos: PAH / PSS

Equipo de laboratorio necesario: Campana de flujo laminar, agitador de tipo vórtex, balanza analítica de precisión.

Material necesario: Pipetas graduadas de 1 mL y 10 mL, tubos tipo Falcon® de fondo cónico de 15 mL y 50 mL, gradilla para tubos Falcon® y papel Parafilm M®.

Reactivos necesarios: Polihidrocloreuro de alilamina, sulfonato de poliestireno, cloruro de sodio, agua desionizada.

Paso 1) Preparación de 50 mL de una disolución de NaCl 0.3 M.

- a) Pesar 876.645 mg de cloruro de sodio en una balanza analítica de precisión. Se empleó una balanza analítica OHAUS® de la serie PX modelo Pioneer™.
- b) Depositar la cantidad pesada de NaCl en un tubo tipo Falcon® de fondo cónico de 50 mL y aforar a 45 mL con agua desionizada.
- c) Agitar brevemente en un agitador tipo vórtex. Se empleó un vórtex de la marca CScientific® modelo VTX-5.

Paso 2) Preparación de 12 mL de una disolución de PAH en una relación de 1 mg/mL de solución salina.

- a) Pesar 12 mg de PAH en una balanza analítica de precisión.
- b) Depositar la cantidad pesada en un tubo tipo Falcon® de fondo cónico de 15 mL y aforar a 12 mL con la disolución de NaCl preparada en el Paso 1.
- c) Agitar brevemente en un agitador tipo vórtex.

Paso 3) Preparación de 12 mL de una disolución de PSS en una relación de 1 mg/mL de solución salina.

- a) Pesar 12 mg de PSS en una balanza analítica de precisión.
- b) Depositar la cantidad pesada en un tubo tipo Falcon® de fondo cónico de 15 mL y aforar a 12 mL con la disolución de NaCl preparada en el Paso 1.

c) Agitar brevemente en un agitador tipo vórtex ².

Paso 4) Etiquetar los dos tubos de 15 mL y el tubo de 50 mL indicando el contenido, la concentración y la fecha. Sellar los tubos empleando papel Parafilm M® y almacenar a 4°C, o bien, disponerlos para su uso inmediato.

De manera esquemática, se representan los pasos de este protocolo en un diagrama de flujo, ver **Figura 3.16**.

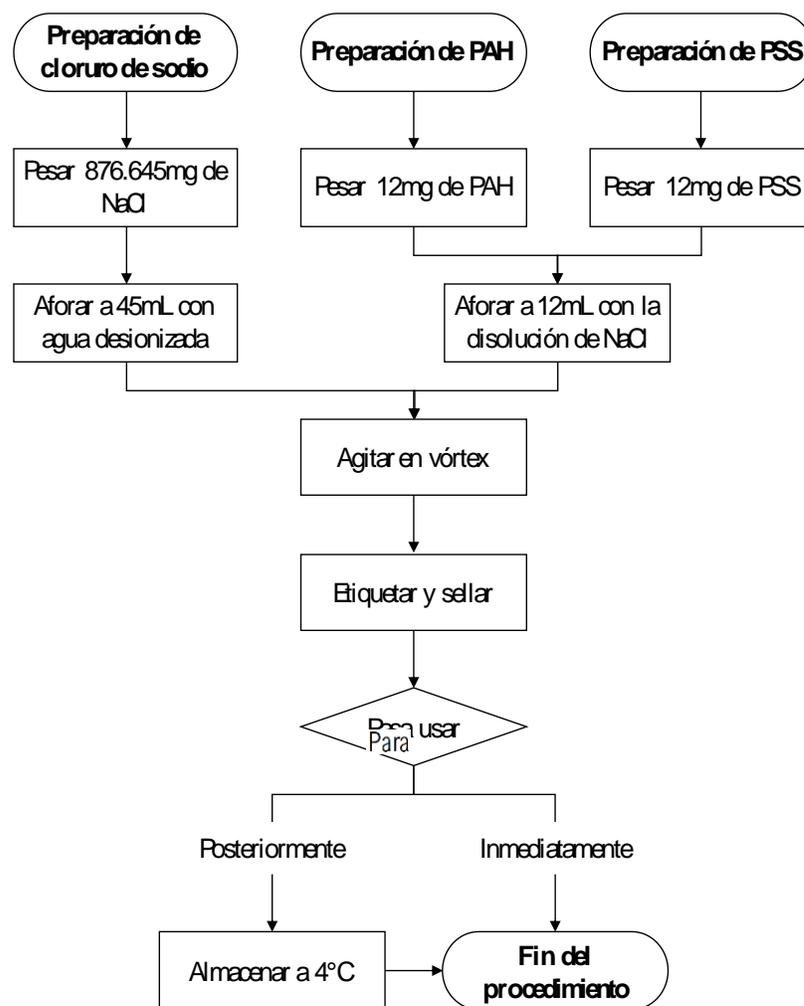


Figura 3.16. Diagrama de flujo del protocolo para la preparación de polielectrolitos.

² Es posible experimentar dificultades en el proceso de pesaje. En caso de presentarse estas complicaciones, se sugiere preparar un mayor volumen de la disolución respetando la relación de 1 mg de polielectrolito por cada 1 mL de disolución 0.3 M de NaCl.

3.4.3.3 Protocolo para la preparación de oligonucleótidos: tiolados / complementarios de SARS-CoV-2

Equipo de laboratorio necesario: Campana de flujo laminar, cámara de luz UV-C, agitador de tipo vórtex, incubadora, microcentrífuga y baño termostático.

Material necesario: Micropipetas monocanal de volumen variable de 0.5 a 10 μL y de 20 a 200 μL , puntas de polipropileno para micropipeta de 10 y 200 μL , tubos con tapón tipo Eppendorf™ para centrifuga de 1.5 mL, tubos tipo Falcon® de fondo cónico de 15 y 50 mL, gradilla para tubos Eppendorf™, gradilla para tubos Falcon® y papel Parafilm M®.

Reactivos necesarios: Oligonucleótidos liofilizados, agua libre de nucleasas, 1,4-ditiotreitol.

Paso 1) Primera dilución del *primer* liofilizado y preparación de alícuotas para su almacenamiento a largo plazo³.

- a) Disolver el *primer* de oligonucleótidos en estado liofilizado en una cantidad adecuada del buffer sugerido por el fabricante. En este caso, el *primer* de oligonucleótidos tiolados fue adquirido en Microsynth® y contenía 1 μmol por lo que se realizó la dilución en 1 mL de agua libre de nucleasas, adquirida en Sigma Aldrich® con el fin de obtener una concentración de 1 mM ⁴.
- b) Realizar una breve centrifugación del *primer* diluido con el fin de concentrar el *pellet* en el fondo del tubo. Se utilizó una microcentrífuga de Labnet® International Inc. modelo Spectrafuge™24D a 13000 RPM durante 30 segundos.

³ Se realiza el Paso 1 únicamente una vez por primer, si ya se realizó este paso continuar al Paso 2.

⁴ No es recomendable el uso de buffer Tris-HCl 10 mM pH 7.5-8.0 debido a que las curvas de calibración se realizaron inicialmente con agua como disolvente. Adicionalmente, existe una incompatibilidad en el uso de dicho reactivo con el biosensor debido a que genera un cambio en la tensión superficial de la disolución final.

- c) Calentar el *primer* centrifugado durante 5 min con la finalidad de aumentar la disponibilidad de los oligonucleótidos. Se realizó el calentamiento usando un equipo de baño termostático CIVEQ® HH-2 a 65°C.
- d) Agitar brevemente en un agitador tipo vórtex, se empleó un vórtex de la marca CScientific® modelo VTX-5.
- e) Resuspender vigorosamente con una micropipeta arriba y abajo para obtener una disolución homogénea.
- f) Dividir la primera dilución resultante en alícuotas para su almacenamiento a largo plazo. Tomar 20 alícuotas de 50 µL a 1 mM y colocarlas en tubos Eppendorf™; etiquetar indicando el contenido, la cantidad, la concentración, la fecha y el número de alícuota, sellar empleando papel Parafilm® y almacenar a una temperatura de entre -25°C y -15°C garantizando un tiempo de vida, de acuerdo con el fabricante, de entre 6 meses hasta 2 años en estado líquido.

Paso 2) Segunda dilución de los oligonucleótidos para su almacenamiento a largo o mediano plazo.

- a) Calentar una alícuota resultante del Paso 1 empleando una gradilla y colocarla en una incubadora a una temperatura constante de 25°C y esperar a que la temperatura se estabilice. Este proceso puede tomar hasta una hora ⁵.
- b) Agitar brevemente en un agitador tipo vórtex.
- c) Realizar una breve centrifugación a máxima velocidad con el fin de concentrar el volumen en el fondo.
- d) Resuspender vigorosamente con una micropipeta arriba y abajo para obtener una disolución homogénea.
- e) Dividir los 50 µL del tubo de la primera dilución en 10 nuevas alícuotas de 5 µL.

⁵ Para prevenir la volatilización de agua y la formación de gotas en la superficie de la tapa del Eppendorf™, se recomienda no utilizar temperaturas mayores a 28°C.

- f) Aforar cada Eppendorf™ a 1000 µL con agua libre de nucleasas para obtener la segunda dilución con una concentración de 5 µM, etiquetar indicando el contenido, la cantidad, la concentración, la fecha y el número de alícuota, sellar empleando papel Parafilm® y almacenar a -20°C ⁶.

Paso 3) Preparación de las disoluciones de DTT para su uso en la dilución de oligonucleótidos con un grupo funcional sulfhidrilo (tiol) ⁷.

- a) Pesar 154.253 mg de DTT y diluir en 50 mL de agua libre de nucleasas para obtener una disolución 20 mM.
- b) Diluir la disolución tomando una alícuota de 25 µL y aforar a 50 mL usando agua libre de nucleasas obteniendo una disolución de DTT 10 µM.
- c) Dependiendo del chip plasmónico donde se realizará el experimento:
 - I) Para AuNFs: Diluir la disolución del inciso b) tomando una alícuota de 100 µL y aforar a 10 mL obteniendo una disolución de DTT 100 nM.
 - II) Para AuNPs: Diluir la disolución del inciso b) tomando una alícuota de 20 µL y aforar a 10 mL obteniendo una disolución de DTT 20nM.

Paso 4) Última dilución de los oligonucleótidos para su uso inmediato.

- a) Calentar una alícuota resultante del Paso 2 empleando una gradilla y colocarla en una incubadora a una temperatura constante de 25°C y esperar a que la temperatura se estabilice. Este proceso puede tomar hasta una hora debido a la baja temperatura de la alícuota.
- b) Agitar brevemente en un agitador tipo vórtex.
- c) Realizar una breve centrifugación a máxima velocidad con el fin de concentrar el volumen en el fondo.

⁶ Se recomienda que uno de los tubos Eppendorf™ que contienen la segunda dilución de los oligonucleótidos se almacene a una temperatura de entre 2°C y 8°C, a fin de prevenir la degradación de estos debido a procesos de congelación y descongelación. Esto permitiría mantener un tiempo de vida de los oligonucleótidos, de acuerdo con las especificaciones del fabricante, de entre 2 meses y hasta 1 año.

⁷ Es importante destacar que este paso debe realizarse únicamente si el experimento se llevará a cabo después de 1 día y hasta un máximo de 5 días después de preparar los oligos. Según la ficha técnica del fabricante, el DTT no es estable en solución acuosa, por lo que su uso solo es factible mediante disoluciones recién preparadas. Si el experimento está programado para las próximas 24 horas, se recomienda continuar con el Paso 4 sin agregar DTT.

- d) Resuspender vigorosamente con una micropipeta arriba y abajo para obtener una disolución homogénea.
- e) Tomar una nueva alícuota de 5 μL y depositarla en un nuevo Eppendorf™.
- f) Aforar a 500 μL usando DTT o agua libre de nucleasas en función del Paso 3 para obtener una concentración final de 10 nM de oligonucleótidos.
- g) Etiquetar nuevamente el tubo Eppendorf™ de la segunda dilución indicando el contenido, la cantidad restante, la concentración, la fecha y el número de alícuota, sellar empleando papel Parafilm® y almacenar a 4°C.
- h) Etiquetar el tubo con la última dilución indicando el contenido, la cantidad, la concentración y la fecha, sellar empleando papel Parafilm® y almacenar a 4°C, o bien, disponerla para su uso inmediato.

De manera esquemática, se representan los pasos de este protocolo en un diagrama de flujo, ver **Figura 3.17**.

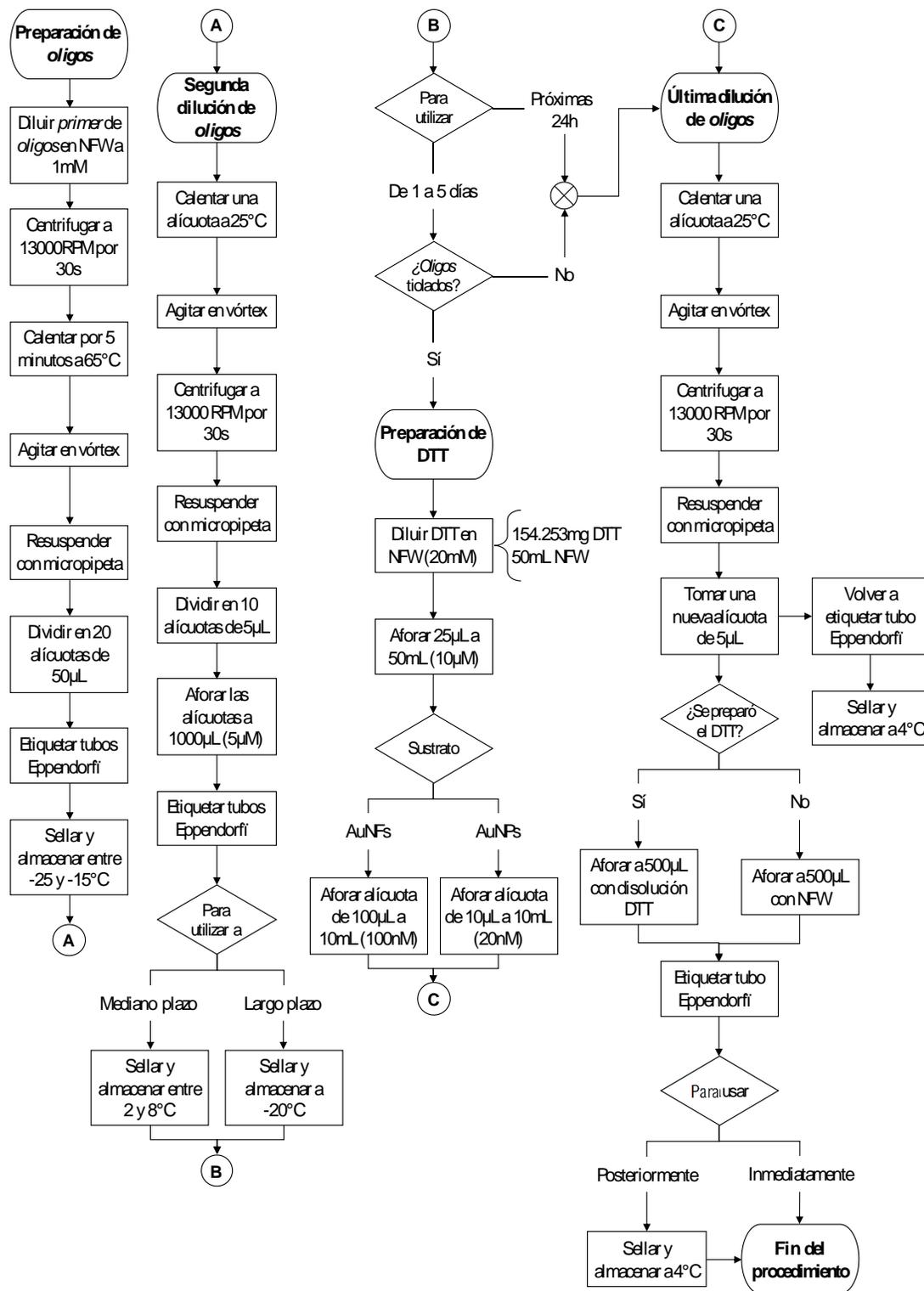


Figura 3.17. Diagrama de flujo del protocolo para la preparación de oligonucleótidos.

3.4.3.4 Protocolo para la preparación de proteínas: biotina / estreptavidina

Equipo de laboratorio necesario: Campana de flujo laminar, agitador de tipo vórtex y balanza analítica.

Material necesario: Micropipetas monocanal de volumen variable de 0.5 a 10 μL y de 20 a 200 μL , puntas de polipropileno para micropipeta de 10 y 200 μL , pipetas volumétricas graduadas de 1 y 10 mL, frascos de vidrio ámbar de 50 mL y papel Parafilm M®.

Reactivos necesarios: Biotina liofilizada, estreptavidina liofilizada y agua libre de nucleasas.

Paso 1) Preparación de una disolución de biotina 1 mM.

- a) Pesar 12.2155 mg de biotina en una balanza analítica de precisión.
- b) Depositar la cantidad pesada en un frasco de vidrio ámbar de 50 mL y aforar a 50 mL con agua libre de nucleasas.
- c) Agitar brevemente en un agitador tipo vórtex.
- d) Tomar una alícuota de 5 μL de la disolución preparada en el inciso b), depositar la gota en otro frasco de vidrio ámbar de 50 mL y aforar a 50 mL con agua libre de nucleasas.
- e) Etiquetar los frascos indicando el contenido, la cantidad, la concentración y la fecha. Sellar ambos frascos empleando papel Parafilm®. Almacenar a -20°C la disolución 1 mM. Almacenar a 4°C la disolución 100 nM, o bien, disponerla para su uso inmediato.

Paso 2) Preparación de una disolución de estreptavidina 10 μM .

- a) Pesar 37.5 mg de estreptavidina en una balanza analítica de precisión. Se empleó una balanza analítica OHAUS® de la serie PX modelo Pioneer™.
- b) Depositar la cantidad pesada en un frasco de vidrio ámbar de 50 mL y aforar a 50 mL con agua libre de nucleasas.

- c) Agitar brevemente en un agitador tipo vórtex. Se empleó un vórtex de la marca CScientific® modelo VTX-5.
- d) Etiquetar el frasco indicando el contenido, la cantidad, la concentración y la fecha, sellar empleando papel Parafilm® y almacenar a 4°C, o bien, disponerla para su uso inmediato.

De manera esquemática, se representan los pasos de este protocolo en un diagrama de flujo, ver **Figura 3.18**.

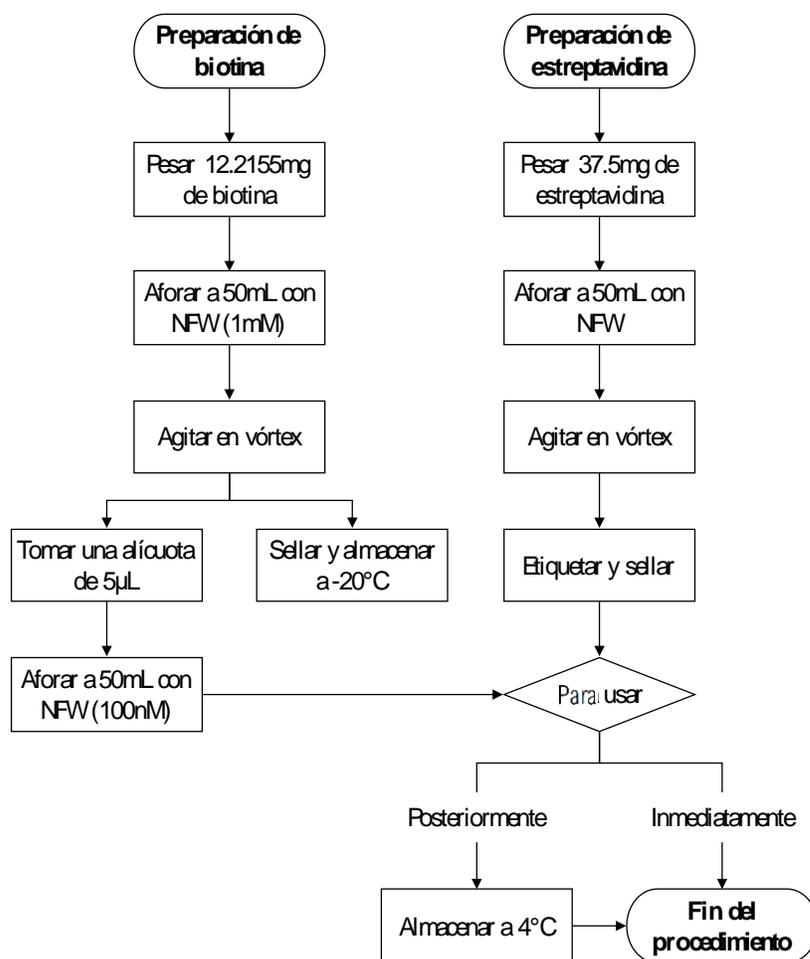


Figura 3.18. Diagrama de flujo del protocolo para la preparación de proteínas.

3.3.4 Funcionalización *in situ*

Una vez que el biosensor está calibrado con concentraciones conocidas de solución salina, se procede a preparar el ligando y una muestra del medio que se usó para la dilución ⁸. Si se desea realizar el proceso de funcionalización y la detección de analitos consecutivamente, adicionalmente se recomienda revisar la Sección 3.4.7.

3.3.4.1 Funcionalización en estado transitorio

El procedimiento general empleado para realizar el proceso de funcionalización de los chips plasmónicos para su estudio en estado transitorio es el siguiente:

- Paso 1)** Resuspender la solución de referencia dentro del tubo Eppendorf™, este paso siempre se debe realizar antes de cualquier depósito.
- Paso 2)** Inyectar una gota de 55 μL de la solución blanco con una micropipeta sobre la superficie del chip y esperar a que se establezca la señal.
- Paso 3)** Retirar la gota minuciosamente evitando el contacto de la superficie del chip con la punta de la micropipeta. Esto es necesario para prevenir rayaduras en la AuNF/AuNPs o movimientos que causen un cambio en la posición del chip con respecto al haz incidente.
- Paso 4)** Estandarizar la longitud de onda de referencia del experimento ⁹.
- Paso 5)** Resuspender la solución con el ligando dentro del tubo Eppendorf™, este paso siempre se debe realizar antes de cualquier depósito.
- Paso 6)** Depositar la primera gota de 55 μL del ligando y esperar a que se establezca la señal.

⁸ Se debe considerar una cantidad en volumen de la solución de referencia (agua libre de nucleasas, agua desionizada o DTT) equivalente a 3 veces el volumen de la cantidad preparada del ligando. Esta consideración es importante debido a que, en ocasiones, no es posible estabilizar la referencia generando pérdidas de material.

⁹ Se considera que la longitud de onda está estable cuando no se observan variaciones considerables en la longitud de onda de resonancia después de realizar tres inyecciones consecutivas.

- Paso 7)** Retirar la gota minuciosamente evitando el contacto de la superficie del chip con la punta de la micropipeta.
- Paso 8)** Realizar más depósitos con el ligando hasta que no se observen variaciones considerables en la longitud de onda después de realizar tres inyecciones consecutivas.
- Paso 9)** Depositar y retirar una última gota de la solución blanco para enjuagar la superficie del chip ¹⁰.

3.3.4.2 Funcionalización con flujo continuo

El procedimiento general empleado para realizar el proceso de funcionalización de los chips plasmónicos para su estudio en estado estacionario es el siguiente:

- Paso 1)** Resuspender la solución de referencia dentro del tubo Eppendorf™.
- Paso 2)** Inyectar un flujo constante de la solución de referencia a una tasa de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ empleando la bomba de infusión y esperar a que se establezca la señal. Para la inyección se utilizan jeringas para insulina de 100 unidades internacionales UI-100 (0.5 mL).
- Paso 3)** Estandarizar la longitud de onda de referencia del experimento.
- Paso 4)** Resuspender la solución con el ligando dentro del tubo Eppendorf™, este paso siempre se debe realizar antes de cualquier inyección.
- Paso 5)** Inyectar un flujo constante de la solución con el ligando a 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ y esperar a que se establezca la señal.
- Paso 6)** Realizar más inyecciones con el ligando hasta que no se observen variaciones considerables en la longitud de onda de resonancia con respecto al tiempo.

¹⁰ Es posible generar un cambio en la longitud de onda con respecto a la última gota del ligando durante el proceso de enjuague.

Paso 7) Inyectar nuevamente la solución de referencia para enjuagar la superficie del chip.

3.4 Detección de eventos de enlace

Posterior al proceso de funcionalización, se puede comenzar el depósito de analitos para la detección de eventos de enlace en tiempo real, para ello se debe preparar el analito correspondiente para cada experimento.

Se debe preparar el analito con el mismo disolvente empleado en el proceso de funcionalización, esto es fundamental debido a que es la referencia de todo el experimento.

3.4.1 Eventos de enlace en estado transitorio

El procedimiento general empleado para realizar el proceso de detección de eventos de enlace en los chips plasmónicos para su estudio en estado transitorio es el siguiente:

Paso 1) Resuspender la solución con el analito dentro del tubo Eppendorf™, este paso siempre se debe realizar antes de cualquier depósito.

Paso 2) Depositar la primera gota de 55 μL del analito y esperar a que se establezca la señal (longitud de onda de resonancia).

Paso 3) Retirar la gota minuciosamente evitando el contacto de la superficie del chip con la punta de la micropipeta.

Paso 4) Realizar más depósitos con el analito hasta que no se observen variaciones considerables en la longitud de onda después de realizar 3 inyecciones consecutivas.

Paso 5) Depositar y retirar una última gota de la solución de referencia para enjuagar la superficie del chip.

3.4.2 Eventos de enlace con flujo continuo

El procedimiento general empleado para realizar el proceso de detección de eventos de enlace en los chips plasmónicos para su estudio en estado estacionario es el siguiente:

- Paso 1)** Resuspender la solución con el analito dentro del tubo Eppendorf™, este paso siempre se debe realizar antes de cualquier inyección.
- Paso 2)** Inyectar un flujo constante de la solución con el analito a 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ y esperar a que se establezca la señal (longitud de onda de resonancia). Para la inyección se utilizan jeringas para insulina de 100 unidades internacionales UI-100 (0.5 mL).
- Paso 3)** Realizar más inyecciones con el analito hasta que no se observan variaciones considerables en la longitud de onda de resonancia con respecto al tiempo.
- Paso 4)** Inyectar nuevamente la solución de referencia para enjuagar la superficie del chip.

3.5 Calentamiento localizado en AuNPs

Tal y como se mencionó en la [Sección 2.1.5.2](#), las AuNPs esféricas presentan típicamente el fenómeno de LSPR a una longitud de onda ~ 530 nm. Cuando se incide un láser verde ($\lambda \approx 532$ nm) en las nanopartículas de oro, se produce la condición de absorción máxima de la luz y la generación de calor.

Esto ocurre debido a que las nanopartículas disipan energía en forma de calor generando el desdoblamiento de los oligonucleótidos funcionalizados favoreciendo la hibridación, ver **Figura 3.19**.

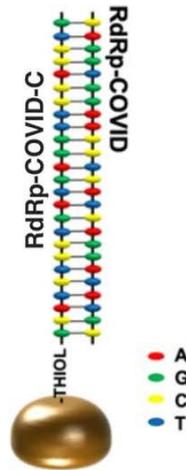


Figura 3.19. Representación esquemática de la hibridación entre el oligonucleótido tiodado funcionalizado al oro y el oligonucleótido complementario de SARS-CoV-2. Figura reproducida de [72].

Durante el trabajo experimental se utilizó un láser *diode-pumped solid-state* (DPSS) modelo LCX-532 de la marca OXXIUS S.A. que emite en el verde a una potencia fija a 500 mW. Para regular la potencia de salida, se utilizó una placa retardadora $\lambda/2$ y un divisor de haz polarizado.

Se procedió a caracterizar la potencia de salida del láser en relación con el ángulo de la placa retardadora mediante el uso de un sensor conectado a una consola compacta de medición de potencia y energía de la marca Thorlabs, modelo PM100D.

El gráfico correspondiente a esta caracterización se muestra en la **Figura 3.20**.

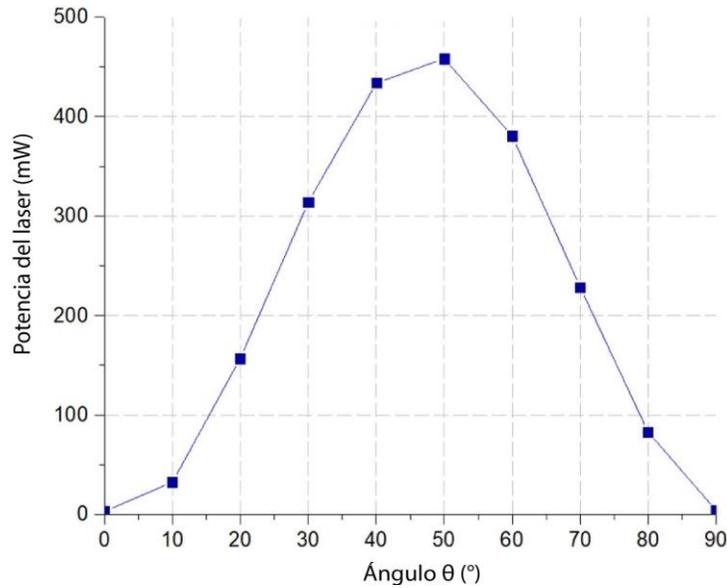


Figura 3.20. Gráfico de la potencia del láser verde en función del ángulo de la placa retardadora $\lambda/2$.

La potencia utilizada en los experimentos de hibridación con AuNPs fue de 200 mW. A partir de dicha potencia láser, se logró obtener una temperatura local de las nanopartículas menor 60°C. Mantener esta temperatura por debajo de dicho umbral resulta de vital importancia, debido a que los oligonucleótidos tienen su temperatura de fusión a 59.78°C.

La evaluación de la temperatura se llevó a cabo mediante la normalización de imágenes capturadas mediante el uso de una cámara térmica FLIR ONE® Pro de 3.^a generación.

Capítulo 4

Discusión y análisis de resultados

En este capítulo se presentan los sensogramas obtenidos mediante la implementación de los protocolos desarrollados en la [Sección 3.3.3](#). Se proporcionan detalles sobre las condiciones específicas de cada experimento, así como la interpretación, análisis y discusión de los resultados obtenidos. Los experimentos se presentan en un orden secuencial, de manera que cada experimento posterior contempla las consideraciones y resultados de un experimento anterior.

4.1 Análisis de sensogramas

Se ha llevado a cabo la estandarización de los sensogramas mediante la representación del tiempo del experimento en el eje X, en segundos, y los valores adquiridos por el biosensor en el eje Y, en términos de la longitud de onda de resonancia (λ), en nanómetros. En la parte superior de cada gráfica se han incluido los datos físicos más relevantes del sustrato, como la modalidad del experimento (AuNF/AuNPs), el espesor de la nanopelícula de oro o el radio de las nanopartículas, el espesor de la nanopelícula de titanio (según corresponda) y el ángulo de incidencia del haz de luz blanca en el prisma. En la línea inferior se proporciona la información química más relevante del esquema a estudiar, como el ligando, el analito, las concentraciones molares y el medio utilizado para preparar las disoluciones. Adicionalmente, se han agregado leyendas y etiquetas de color en los sensogramas. Estos elementos permiten identificar el proceso que se lleva a cabo durante un intervalo de tiempo específico. Se estandarizaron todos los experimentos de inyección mediante micropipeta, con depósitos de gotas de un volumen de 55 μL . Para todos los experimentos de inyección utilizando una bomba de infusión, se ha establecido un flujo volumétrico de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

4.1.1 Funcionalización y eventos de enlace en AuNF con el esquema PAH/PSS en sistema abierto

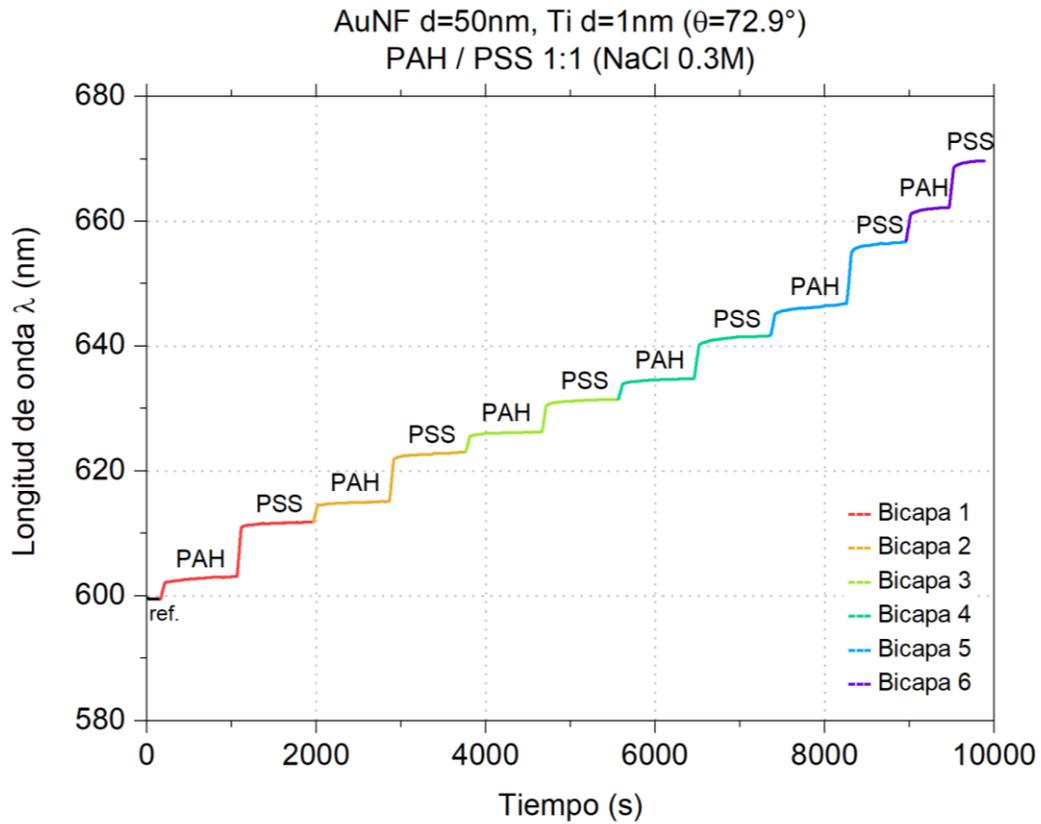


Figura 4.1. Sensograma obtenido mediante la inyección con micropipeta de bicapas de PAH/PSS en AuNF.

Se muestra el comportamiento de la longitud de onda de resonancia en una nanopelícula de oro de 50 nm depositada sobre una nanopelícula de titanio de 2 nm de espesor con un ángulo de incidencia de 72.9° , ver **Figura 4.1**. La dinámica comienza con una longitud de onda de resonancia $\lambda_{res}= 599$ nm adquirida a partir de la referencia estandarizada utilizando una solución salina de NaCl 0.3 M con agua desionizada como disolvente.

Para validar el proceso de detección y funcionalización, se inyectó una primera gota de PAH (debido a que el sustrato con la película delgada de oro tiene carga negativa) y se observó un corrimiento hacia el rojo, en términos de longitud de onda

$\Delta\lambda = 4$ nm, lo que indica un cambio en el índice de refracción en relación con la referencia. Después de retirar la gota del espacio confinado en el sustrato, la longitud de onda permaneció constante, lo que sugiere que la superficie del chip quedó parcialmente funcionalizada debido a la interacción electrostática entre el oro y el polielectrolito.

Posteriormente, se inyectó una primera gota de PSS (con carga negativa) a la misma concentración del PAH. La interacción del PSS con la capa de carga positiva resultó en la formación de un complejo de carga parcial negativa (bicapa 1). Este complejo presentó un aumento en longitud de onda de $\Delta\lambda = 7$ nm con respecto a la primera gota y un aumento de $\Delta\lambda = 11$ nm con respecto a la referencia.

La detección en tiempo real de un cambio en longitud de onda al momento de la inyección de PSS demostró la capacidad del biosensor plasmónico para detectar eventos de enlace, en este caso, la interacción y formación de un complejo por el enlace químico entre los polielectrolitos de cargas opuestas.

Para verificar el límite de detección del biosensor debido al campo evanescente en SPR, se llevó a cabo otro experimento. Cada bicapa de polielectrolitos (PAH/PSS) tiene un espesor aproximado de 4 nm, y según la literatura, el campo evanescente para una AuNF de 50 nm de espesor es cercano a 300 nm. Esto significa que se necesitan aproximadamente setenta y cinco bicapas para alcanzar un punto de saturación donde no se pueden adquirir datos debido a la limitación del campo evanescente. En el experimento realizado, se depositaron seis bicapas en un tiempo experimental de 10000 segundos (2 horas y 45 minutos), y no se observaron cambios significativos en la dinámica. La tendencia de los aumentos en longitud de onda presentó algunas variaciones entre bicapas (± 5 nm), posiblemente debido a la diferencia en la cantidad de polielectrolitos presentes en cada inyección, los polielectrolitos removidos al retirar cada gota y la disponibilidad de sitios de reacción en el complejo.

Aunque no se completó el depósito de las setenta y cinco bicapas debido al tiempo que requeriría el experimento, la prueba con seis bicapas demostró que, es posible detectar analitos con un espesor menor o igual a 24 nm en el biosensor utilizando AuNFs.

4.1.2 Funcionalización e hibridación en AuNF con oligonucleótidos en NFW en sistema abierto

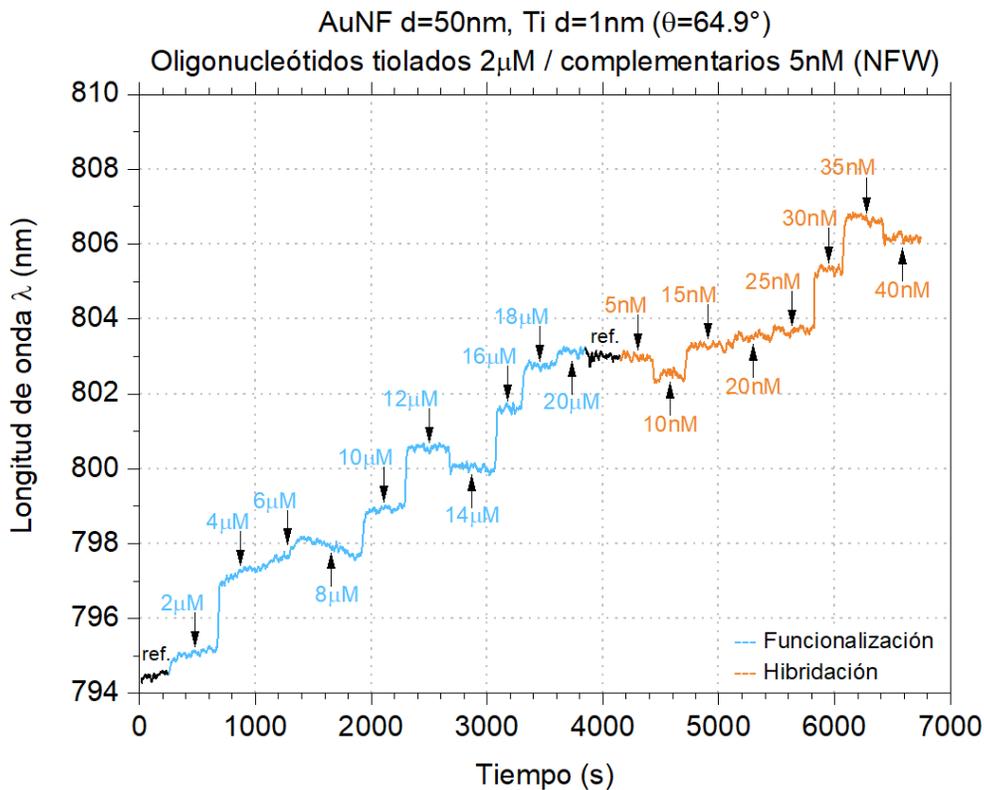


Figura 4.2. Sensograma obtenido mediante la inyección con micropipeta de oligonucleótidos en AuNF usando NFW.

Se observa el comportamiento de la longitud de onda de resonancia en una nanopelícula de oro de 50 nm depositada sobre una nanopelícula de titanio de 2 nm de espesor, con un ángulo de incidencia de 64.9° , ver **Figura 4.2**. La dinámica se inicia con una longitud de onda de resonancia (λ_{res}) de 794.6 nm (línea negra),

que se adquirió a partir de la referencia estandarizada mediante el uso de agua libre de nucleasas (NFW).

Para validar el proceso de detección y funcionalización del sustrato, se colocó una primera gota de oligonucleótidos tiolados con una concentración de 2 μM . Esto provocó un desplazamiento inmediato en la longitud de onda hacia el rojo, indicando un cambio en el índice de refracción en comparación con la referencia. Tras retirar la gota, se observó que la longitud de onda se mantuvo constante, lo que sugiere que la superficie del chip quedó parcialmente funcionalizada debido a la interacción entre el oro y el azufre del grupo sulfhidrilo.

Posteriormente, se inyectó una segunda gota del ligando, lo que aumentó aún más la longitud de onda ($\Delta\lambda = 2 \text{ nm}$) a medida que se incrementó la cantidad de oligonucleótidos que funcionalizan la nanopelícula. Se inyectaron 10 gotas en total, alcanzando una concentración final de 20 μM de oligonucleótidos tiolados. Se observó que en los últimos dos depósitos del proceso de funcionalización (línea azul).

Desde la referencia, el proceso de funcionalización alcanzó un aumento en longitud de onda $\Delta\lambda = 9 \text{ nm}$. En el caso del depósito en 8 μM y 14 μM , se observó una disminución en la longitud de onda (hacia el azul). Esto se puede explicar debido a que, en algunas ocasiones, al depositar las gotas, se puede generar un flujo turbulento que podría romper el enlace entre el oro y el azufre.

Se llevó a cabo un enjuague de la superficie de la nanopelícula al colocar y retirar una gota de agua libre de nucleasas. Se observó que no hubo una disminución en la longitud de onda de resonancia, lo que indicó que la superficie estaba funcionalizada. Se continuó con el proceso de hibridación inyectando una primera gota de oligonucleótidos complementarios con una concentración de 5 nM.

No se observó ningún cambio en la longitud de onda, lo que sugiere que la cantidad de analito no era suficiente para ser detectada. Se procedió a colocar una segunda gota, y en esta ocasión se observó una disminución en la longitud de onda ($\Delta\lambda =$

0.8 nm) indicando que una parte de los oligonucleótidos tiolados había sido removida al retirar la primera gota. A partir del tercer depósito, se empezó a apreciar una tendencia hacia el rojo en la longitud de onda, hasta obtener una concentración equivalente a 40 nM de los oligonucleótidos complementarios. A partir de la segunda referencia, el proceso de hibridación alcanzó un aumento en longitud de onda $\Delta\lambda = 3$ nm.

A partir de este experimento, se concluyó que fue posible funcionalizar una AuNF de 50 nm de espesor con una cantidad de 20 μ M de oligonucleótidos tiolados. De este resultado se calculó analíticamente que el límite de detección del biosensor es aproximadamente 4.5 pM. Se observó que la disponibilidad de los oligonucleótidos tiolados disminuyó al depositar aproximadamente 15 nM de oligonucleótidos complementarios suponiendo que se agotaron los ligandos disponibles.

Estos resultados proporcionaron una referencia para la preparación de ligandos y analitos en futuros experimentos, y se exploró la optimización de los procesos de funcionalización e hibridación mediante la prueba de diferentes disolventes y *buffers*.

4.1.3 Funcionalización e hibridación en AuNF con oligonucleótidos en DTT en sistema abierto

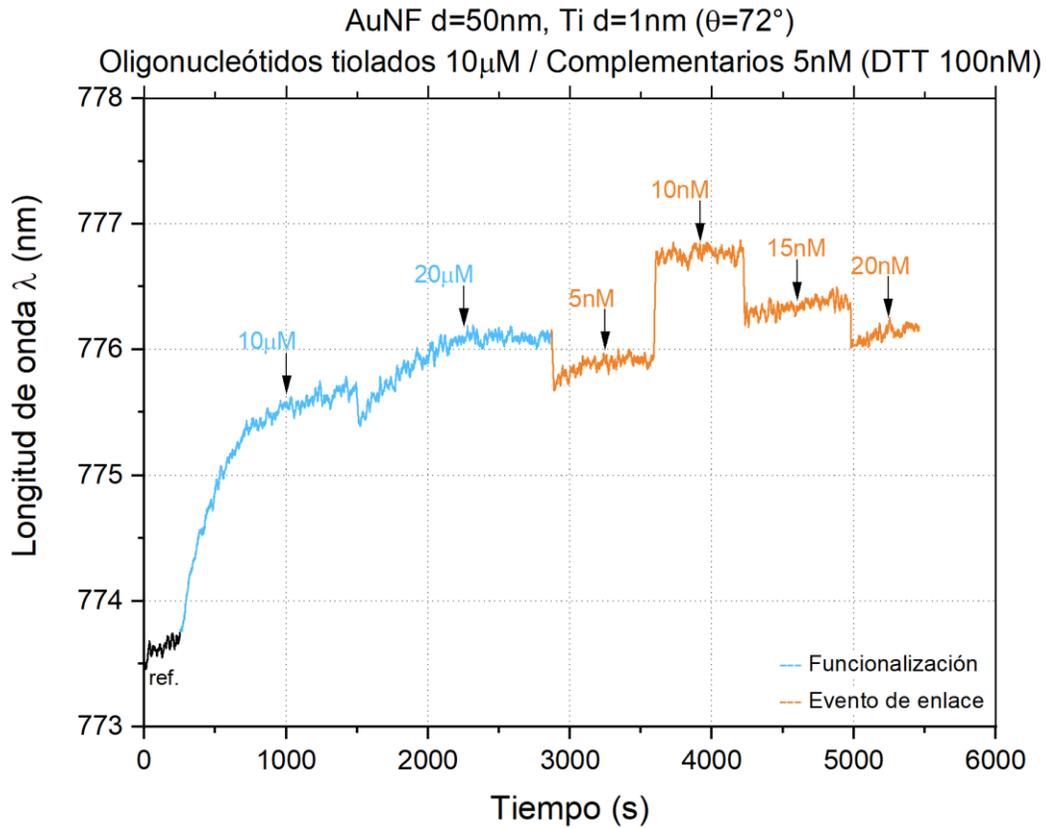


Figura 4.3. Sensograma obtenido mediante la inyección con micropipeta de oligonucleótidos en AuNF usando DTT.

Se denota el comportamiento de la longitud de onda de resonancia en una nanopelícula de oro de 50 nm depositada sobre una nanopelícula de titanio de 1 nm de espesor, a un ángulo de incidencia de 67.3° , ver **Figura 4.3**. La dinámica comenzó con una λ_{res} de 773.5 nm, adquirida a partir de una referencia estandarizada empleando una disolución de DTT 100 nM en agua libre de nucleasas (NFW). Se observó un aumento en la longitud de onda de la referencia, aunque no se obtuvo un valor constante. A pesar de ello, se llevó a cabo el experimento debido a que el incremento era gradual.

Para validar el proceso de funcionalización del sustrato, se inyectó una primera gota de oligonucleótidos tiolados con una concentración de 10 μM (se sabía del experimento anterior que se saturaría con 20 μM), lo que produjo un corrimiento inmediato hacia el rojo en términos de λ . Se observó cierta dinámica en el proceso de funcionalización, ya que el incremento no fue lineal y requirió de cierto tiempo para estabilizarse. Al retirar la gota, la λ permaneció constante, lo que indicó que la superficie del chip quedó parcialmente funcionalizada debido a la interacción electrostática entre el oro y el azufre del grupo tiol. Al colocar más ligando (hasta 20 μM), se observó una ligera disminución en λ , sugiriendo que parte de los oligonucleótidos tiolados fueron removidos de la superficie por el flujo turbulento generado por la inyección de la segunda gota. Desde la referencia, el proceso de funcionalización alcanzó un aumento en longitud de onda $\Delta\lambda = 2.5 \text{ nm}$.

Del experimento anterior, se sabía que la longitud de onda no cambiaría significativamente al realizar un enjuague. se procedió directamente con la primera inyección de los oligonucleótidos complementarios a una concentración de 5nM para el proceso de hibridación. Se observó una disminución en λ y una dinámica de aumento no lineal. Al realizar el segundo depósito, se apreció un aumento en la longitud de onda $\Delta\lambda = 1 \text{ nm}$ y una dinámica lineal. No obstante, la tercera y cuarta inyección provocaron un decremento en la longitud de onda. El proceso de hibridación logró solamente un aumento en la longitud de onda $\Delta\lambda = 0.6 \text{ nm}$.

Del experimento se concluyó que el DTT, generaba interferencias con el azufre de los oligonucleótidos tiolados, reduciendo la selectividad de los oligonucleótidos por una inhibición competitiva, lo que dificultaba determinar si lo que se unía al oro era el ligando o el DTT. En la referencia se observa una dinámica que sugiere la saturación de la superficie únicamente con la solución blanco. Estos resultados llevaron a descartar el uso del DTT como agente reductor en experimentos posteriores.

4.1.4 Funcionalización e hibridación en AuNPs con oligonucleótidos en NFW en sistema cerrado

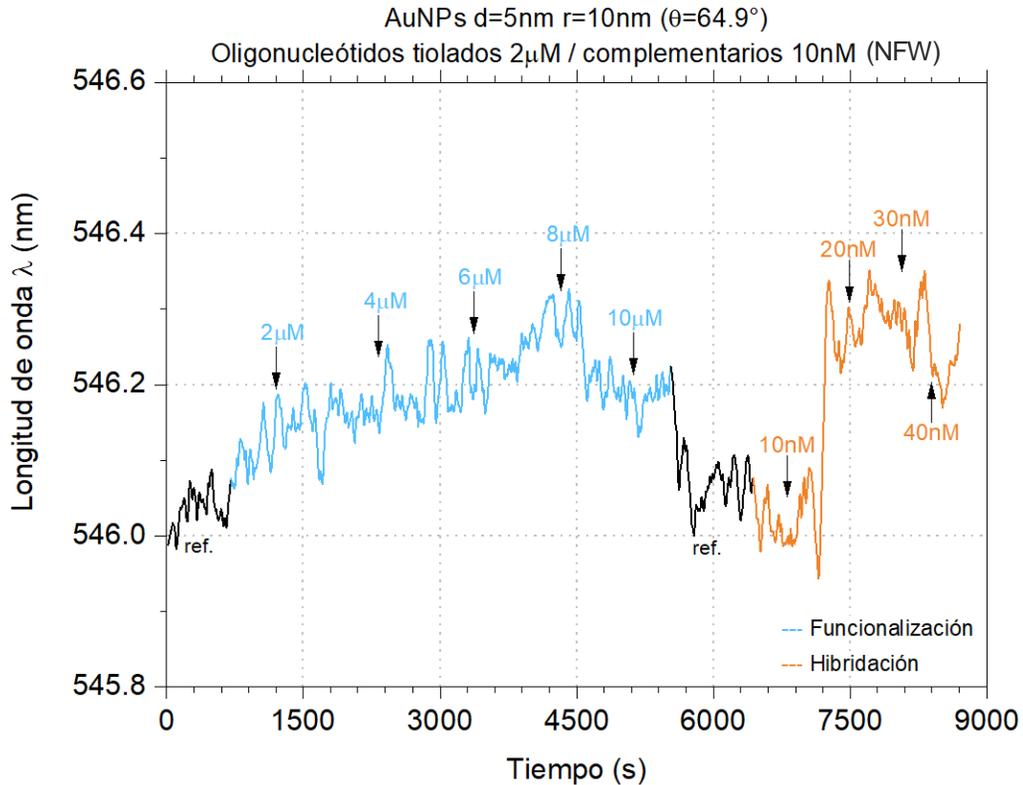


Figura 4.4. Sensograma obtenido mediante la inyección por flujo de oligonucleótidos en AuNPs.

Se mostró el comportamiento de la longitud de onda de resonancia en AuNPs de 10 nm de radio con un ángulo de incidencia de 64.9° , ver **Figura 4.4**. La dinámica se inició con una longitud de onda de resonancia $\lambda_{\text{res}} = 546.07$ nm (línea negra) adquirida a partir de la referencia estandarizada utilizando agua libre de nucleasas (NFW).

Para validar el proceso de funcionalización del sustrato, se inyectó una disolución de oligonucleótidos tiolados con una concentración de 2 μ M, lo que produjo un incremento inmediato hacia el rojo en términos de longitud de onda de resonancia (λ). Al interrumpir el flujo, λ se mantuvo constante, lo que indica que la superficie

del chip quedó parcialmente funcionalizada debido a la interacción entre el oro y el grupo tiol.

Es importante destacar que se trata de un esquema de nanopartículas, cada una con una superficie disponible diferente. De acuerdo con resultados obtenidos en un trabajo de investigación paralelo en el grupo del INAOE, el factor de llenado es de aproximadamente 0.2 [76], este valor representa cuántas nanopartículas hay por unidad de área, y es dependiente de la geometría de las nanopartículas y de la incrustación de estas en el sustrato lo que limita el área expuesta para la funcionalización.

Posteriormente, se realizó una segunda inyección del ligando, lo que resultó en un aumento adicional en la longitud de onda a medida que se incrementaba la cantidad de oligonucleótidos que funcionalizaban la nanopelícula. Se realizaron otras cuatro inyecciones, llegando a una concentración final de 10 μM de oligonucleótidos tiolados. Se observó que en los dos últimos depósitos del proceso de funcionalización (línea azul), la variación en la longitud de onda no fue tan significativa.

No se observó un aumento considerable en la longitud de onda durante el proceso de funcionalización con 10 μM de material, ya que únicamente se apreció un aumento de $\Delta\lambda = 0.18 \text{ nM}$. Al enjuagar la superficie mediante la deposición y retirada de una gota de agua libre de nucleasas, se observó que la longitud de onda de resonancia regresó al valor de referencia, lo que sugiere que la mayoría de los oligonucleótidos tiolados se removieron del chip.

Durante el proceso de hibridación, se agregó una primera gota de oligonucleótidos complementarios a una concentración de 10 nM, pero no se observó un cambio apreciable en la longitud de onda. En el segundo y tercer depósito, se observó un aumento considerable en los valores de λ , alcanzando los valores observados durante el proceso de funcionalización. Esto llevó a suponer que las nanopartículas estaban parcialmente funcionalizadas, aunque no era evidente debido a la

presencia de material en la superficie del sustrato que modificaba su índice de refracción.

A partir de ese experimento, se llegó a la conclusión de que, debido a la baja disponibilidad de oro en las nanopartículas, era difícil apreciar el proceso de funcionalización con oligonucleótidos tiolados. Se observó una baja disposición para que los oligonucleótidos complementarios se enlazaran, lo que resultó en un proceso de hibridación ineficiente. La limitación en el proceso de hibridación puede deberse por la disposición esférica de la superficie a funcionalizar, al campo eléctrico confinado propio de modalidad de LSPR y por el enrollamiento de las cadenas de oligonucleótidos.

Se realizaron diversos experimentos para favorecer el desdoblamiento de los oligonucleótidos mediante el aumento de temperatura; entre ellos, se utilizó una parrilla para el calentamiento por conducción de la disolución, pero se descartó ya que se obtuvo otra dinámica debido a un proceso de enfriamiento en la superficie del chip. Se probó el uso de una lámpara de cerámica para la transferencia de calor por radiación, pero se descartó debido a que provocaba cambios en el volumen de la muestra por la volatilización del agua.

Se propuso repetir el experimento utilizando un láser verde para generar un efecto termoplasmónico en las nanopartículas de oro.

4.1.5 Funcionalización e hibridación en AuNPs con oligonucleótidos en NFW empleando calentamiento localizado en sistema cerrado

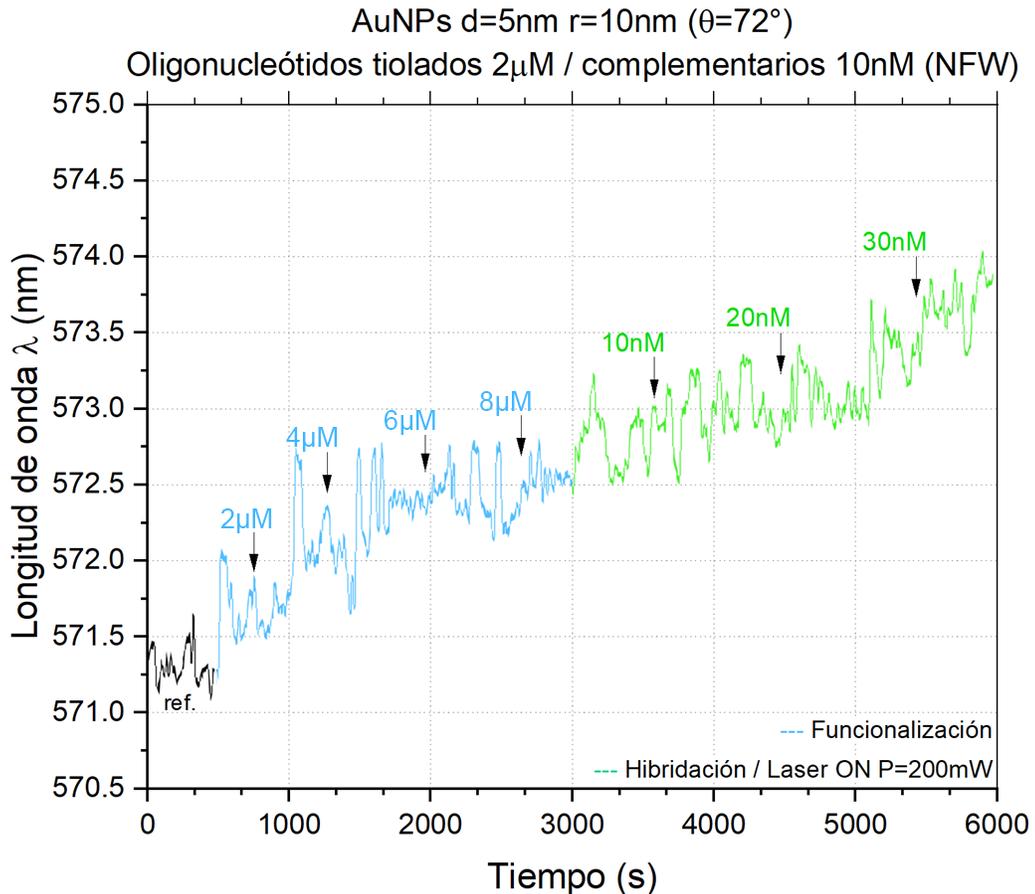


Figura 4.5. Sensograma obtenido mediante la inyección por flujo de oligonucleótidos en AuNPs empleando calentamiento localizado.

Se muestra el comportamiento de la longitud de onda de resonancia en función del tiempo en AuNPs a un ángulo de incidencia de 72° , ver **Figura 4.5**. La dinámica comenzó con una longitud de onda de resonancia $\lambda_{res} = 571.3$ nm (línea negra), adquirida a partir de la referencia estandarizada empleando agua libre de nucleasas (NFW).

Para validar el proceso de detección y funcionalización del sustrato, se inyectó una disolución de oligonucleótidos tiolados con una concentración de 2 μM mediante flujo laminar con bomba de infusión. Se observó un desplazamiento hacia el rojo en términos de longitud de onda. Al interrumpir el flujo, la longitud de onda se mantuvo constante, lo que indica que la superficie del chip quedó funcionalizada.

Posteriormente, se realizó una segunda inyección del ligando, lo que resultó en un aumento adicional en la longitud de onda a medida que se incrementaba la cantidad de oligonucleótidos que funcionalizaban la superficie del sustrato. Se realizaron otras tres inyecciones, llegando a una concentración final de 8 μM de oligonucleótidos tiolados. Se observó que en los dos últimos depósitos del proceso de funcionalización (línea azul).

Desde la referencia, el proceso de funcionalización observó un aumento en longitud de onda $\Delta\lambda = 1.2 \text{ nm}$.

En esta ocasión, debido a la inyección por flujo laminar, no se observaron decrementos en la longitud de onda, lo que sugiere que en los experimentos por inyección con micropipeta se produce un proceso de desfuncionalización.

Del experimento anterior, en la **Figura 4.4** se observó que la longitud de onda de resonancia disminuyó después de realizar un enjuague. Por lo tanto, se procedió directamente con la inyección de oligonucleótidos complementarios en una concentración de 10 nM.

Se utilizó un láser verde de $\lambda = 532 \text{ nm}$ para estimular el efecto termoplasmónico y generar una fuente de calor localizado. Se observó una dinámica lenta y gradual de desplazamiento de la longitud de onda medida hacia el rojo, y al inyectar en una segunda y tercera ocasión, se apreció un aumento constante, lo cual indicó que estaba ocurriendo el proceso de hibridación.

Se concluyó que se obtienen mejores resultados en un sistema cerrado mediante la inyección de flujo laminar. Se observó una dinámica constante de aumento en la longitud de onda. El proceso de hibridación se apreció mejor debido al

calentamiento localizado por el uso del láser a una potencia de 200 mW. Se realizaron experimentos análogos y se determinó que potencias menores no facilitaban la hibridación de los oligonucleótidos y que potencias más altas generaban ruido por la señal parasita que detectaba el biosensor.

También se concluyó que era posible que el aumento gradual en la longitud de onda se debiera a un gradiente de temperatura causado por el uso del láser, ver **Figura 4.6**.

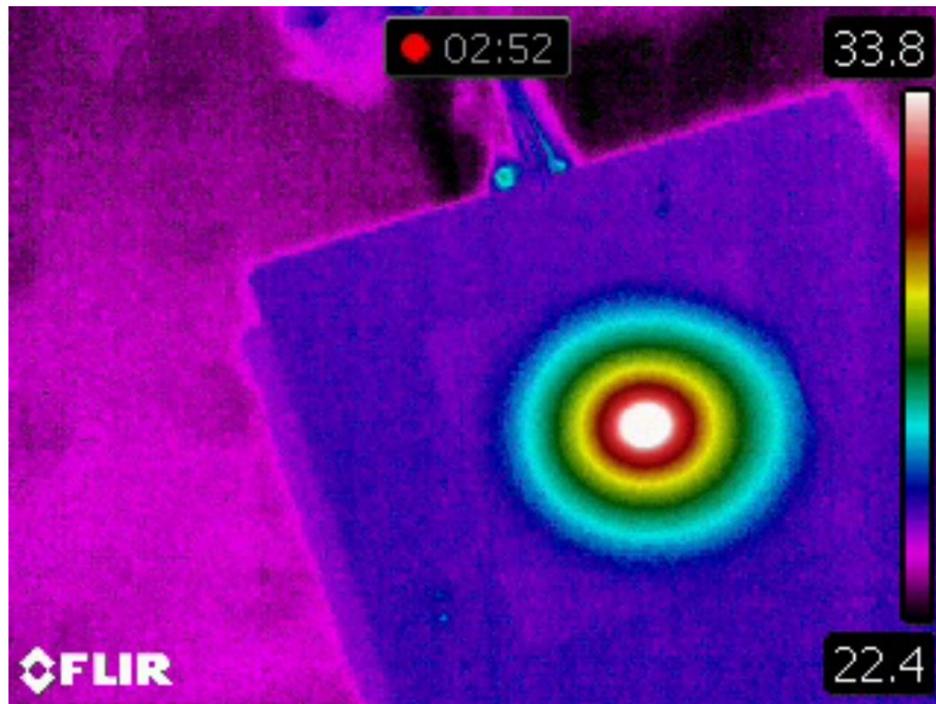


Figura 4.6. Fotografía térmica del aumento localizado de la temperatura en el chip plasmónico debido al uso del láser verde.

Dicho aumento de temperatura pudo provocar cambios en la densidad del medio debido a la volatilización del agua. Se requieren más ensayos para optimizar la potencia a emplear en estos experimentos.

4.1.6 Funcionalización y detección de eventos de enlace en AuNF con biotina/estreptavidina en sistema abierto

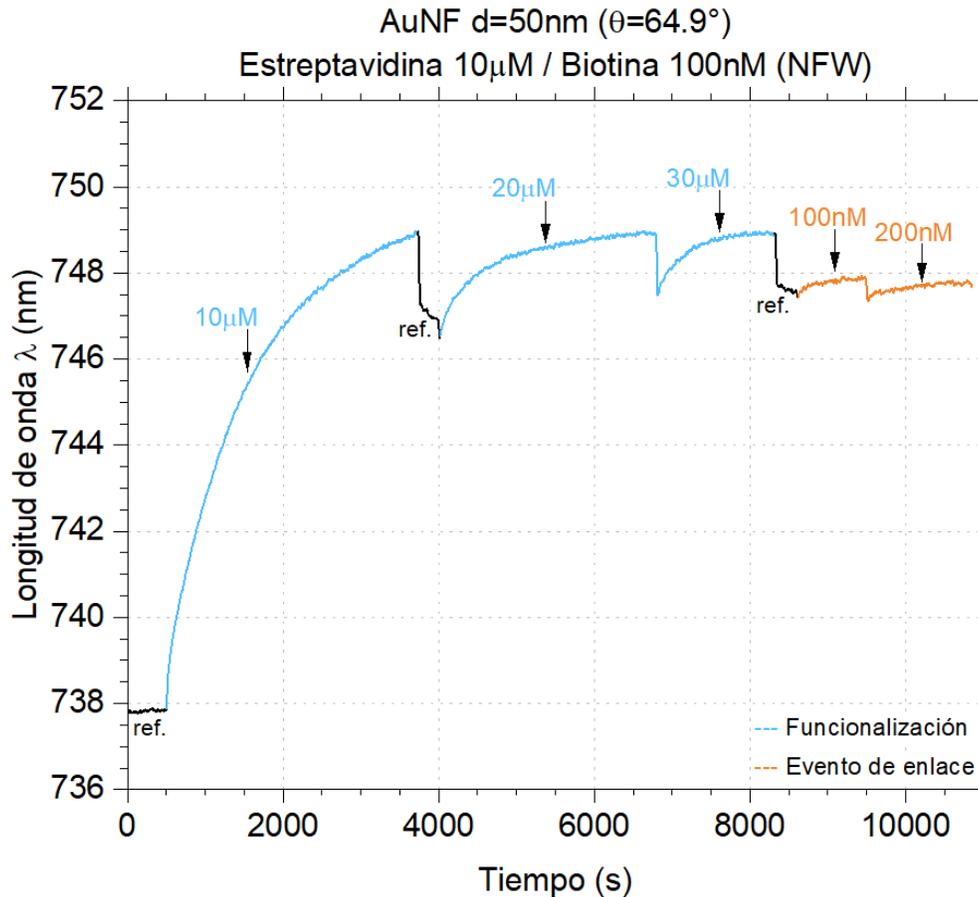


Figura 4.7. Sensograma obtenido mediante la inyección con micropipeta de estreptavidina/biotina en AuNF.

Se muestra el comportamiento de la longitud de onda de resonancia con respecto al tiempo en una AuNF de 50 nm de espesor con un ángulo de incidencia de 64.9° , ver **Figura 4.7**. La dinámica se inició con una $\lambda_{res} = 738$ nm (línea negra), que se adquirió a partir de la referencia estandarizada utilizando agua libre de nucleasas (NFW) en un régimen por lotes.

Para validar el proceso de funcionalización, se inyectó una gota de estreptavidina a una concentración de 10 μM , observando un desplazamiento constante hacia el rojo en longitud de onda. Estos experimentos exhiben una dinámica similar a la del experimento con DTT, ver **Figura 4.3**.

El desplazamiento observado fue de 11 nm con respecto a la referencia. Esto sugiere que la nanopelícula de oro se estaba funcionalizando, aunque de manera lenta, debido al tiempo que tomó para comenzar a estabilizarse, aproximadamente 3500 segundos. Al remover la gota, la longitud de onda permaneció constante, lo cual indicó que la superficie del chip había quedado parcialmente funcionalizada mediante la interacción electrostática entre el oro y el azufre presente en la molécula de estreptavidina.

Se procedió a enjuagar la superficie de la nanopelícula y se observó una disminución de 2.5 nm, lo que indicó que parte de la estreptavidina se removió de la superficie.

Después del enjuague, se colocó una segunda gota alcanzando una concentración de 20 μM . Se observó que al principio la longitud de onda disminuyó, pero luego se produjo una dinámica hacia el rojo y la longitud de onda volvió a alcanzar el mismo valor que en la primera gota. Esto sugirió que la superficie de la nanopelícula estaba funcionalizada a esa longitud de onda. Se inyectó una tercera gota observando la misma dinámica. Se observó que la señal se estabilizó nuevamente a una longitud de onda de 749 nm.

Antes de continuar con el experimento, se realizó un enjuague de la superficie, provocando una disminución en la longitud de onda indicando que la superficie estaba parcialmente funcionalizada.

El proceso para la detección de eventos de enlace se inició inyectando una primera gota de biotina con una concentración de 100 nM. Se observó una dinámica de aumento con una pendiente menos pronunciada. Al inyectar una segunda gota, se apreció una ligera disminución y una dinámica de aumento similar a la de la primera

gota. A partir de la segunda referencia, se alcanzó un aumento en la longitud de onda $\Delta\lambda=0.5$ nm en el proceso de detección de eventos de enlace.

Se concluyó que la dinámica de funcionalización con estreptavidina era lenta. Esto puede deberse a que no tiene radicales libres en el azufre, lo que hacía que la interacción electrostática entre el oro y el azufre dependiera de la orientación del ligando. Se puede suponer que a medida que la estreptavidina se precipita, la superficie se funcionaliza debido al peso de las proteínas en comparación a los oligonucleótidos [96].

Debido al método de inyección con micropipeta utilizado, se obtuvieron resultados inconstantes, ya que las inyecciones removían el ligando de la superficie.

4.1.7 Funcionalización y detección de eventos de enlace en AuNPs con biotina/estreptavidina en sistema cerrado

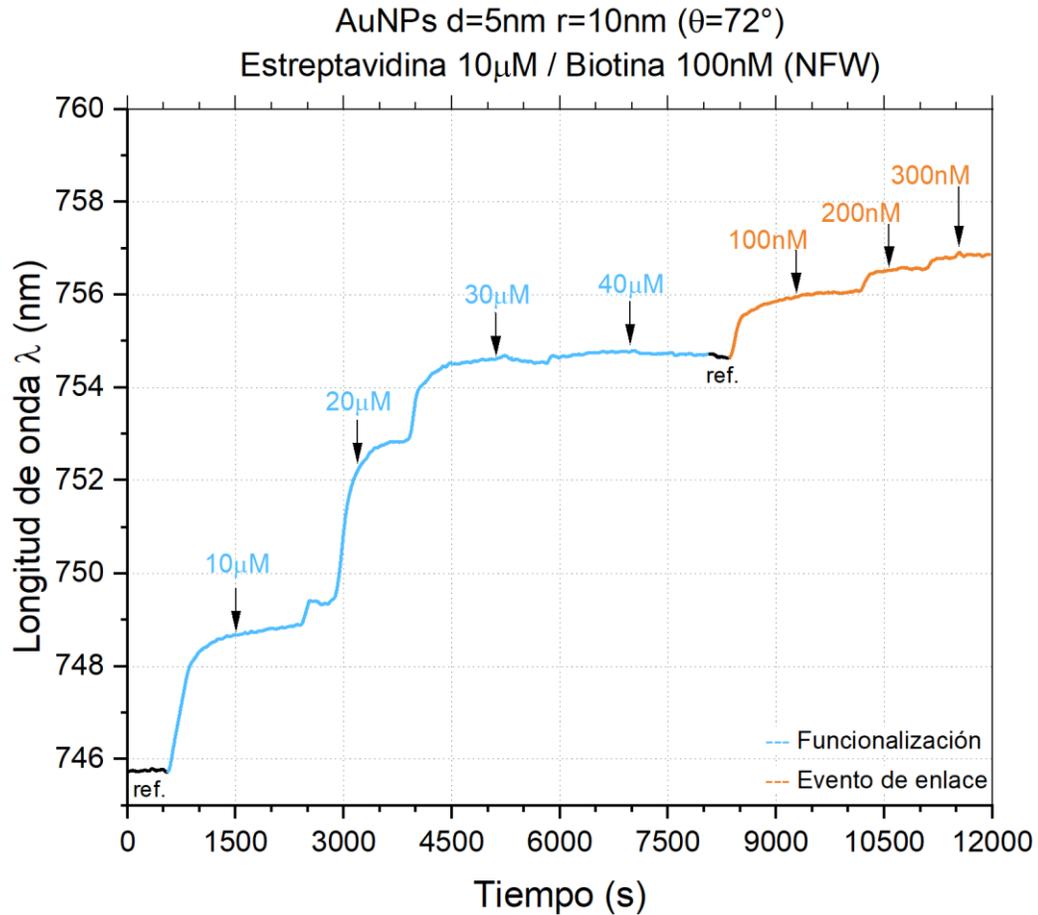


Figura 4.8. Sensograma obtenido mediante la inyección de flujo con bomba de infusión de estreptavidina/biotina en AuNPs.

Se observó el comportamiento de la longitud de onda de resonancia en AuNPs a un ángulo de incidencia de 72° , ver **Figura 4.8**. La dinámica comenzó con una $\lambda_{res}=745.8$ nm (línea negra), adquirida a partir de la referencia estandarizada empleando agua libre de nucleasas (NFW) con flujo continuo.

Para validar el proceso de funcionalización del sustrato, se inyectó una primera disolución de estreptavidina a una concentración de 10 μM con flujo laminar. Se observó un desplazamiento hacia el rojo en longitud de onda.

En contraste con el experimento anterior, se observó una dinámica más rápida y estable. Se estabilizó debido a que la cantidad de estreptavidina presente en la disolución se fue agotando, lo que requirió de la inyección de más reactivo, generando otro aumento en la longitud de onda. Este procedimiento se repitió cuatro veces, alcanzando una concentración final de reactivo de 40 μM en un tiempo de 8000 segundos. No se observó un cambio considerable entre la tercera y cuarta inyección. Durante el proceso de funcionalización, se observó un aumento en la longitud de onda de $\Delta\lambda = 8.5 \text{ nm}$ desde la referencia.

Se inyectó nuevamente la solución de referencia y no se observaron cambios aparentes en la longitud de onda, lo que sugiere que la superficie estaba funcionalizada.

Se comenzó el proceso de inyección de biotina a una concentración de 100 nM, lo que resultó en un rápido incremento en la longitud de onda. Esto indicó que estaba ocurriendo una interacción entre la estreptavidina y la biotina. El esquema de inyección por flujo permitió evitar que la superficie se desfuncionalice debido al flujo turbulento, como se observó en un experimento anterior. La inyección se realizó dos veces más hasta alcanzar una concentración de 300 nM de biotina.

Se llegó a la conclusión de que era posible observar una dinámica mucho más controlada en un régimen estacionario mediante la inyección por flujo laminar del ligando, lo que facilitó la interacción del evento de enlace.

4.2 Comparación del biosensor plasmónico con sistemas comerciales

Las técnicas de diagnóstico tradicionales para la detección de SARS-CoV-2 incluyen la prueba en tiempo real RT-PCR, la prueba PCR convencional, la prueba de antígenos y la prueba de anticuerpos. Cada una tiene sus ventajas y desventajas. se compararán estas técnicas con los resultados obtenidos con el uso de un biosensor plasmónico para la detección del mismo virus utilizando oligonucleótidos y el esquema de biotina-estreptavidina.

4.2.1 Límite de resolución

El biosensor plasmónico desarrollado en el grupo de biofotónica del INAOE tiene la capacidad de detectar cambios en la longitud de onda de resonancia en escalas de nanómetros usando concentraciones de 4.5 pM por cada microlitro. Al compararlo con la RT-PCR y la PCR convencional, que son consideradas las técnicas estándar de oro para la detección de material genético del SARS-CoV-2, el biosensor tiene una sensibilidad comparable, debido a que estas pruebas tienen un límite de detección LOD de 1 o 2 copias virales por cada microlitro [17].

En particular, la capacidad del biosensor de detectar cambios sutiles y de monitorear en tiempo real supera la capacidad de las pruebas de antígeno y anticuerpo, que dependen de la presencia de proteínas virales o respuestas inmunitarias del paciente, respectivamente.

4.2.2 Rapidez, costo y especificidad

El biosensor plasmónico tiene el potencial de ser más rápido que las técnicas tradicionales, especialmente si consideramos su capacidad de monitorear eventos de enlace en tiempo real, lo cual resulta prometedor para un diagnóstico rápido. La

PCR, a pesar de su precisión, puede tardar varias horas e incluso un día completo, dependiendo del protocolo y del patógeno o gen que se esté detectando. Las pruebas de antígenos y anticuerpos son rápidas, a menudo proporcionando resultados en minutos.

En términos de costo, aunque la infraestructura inicial para el biosensor puede ser alta, la posibilidad de reutilización de sustratos y el hecho de que no se requieran reactivos costosos para la detección, lo hace una opción viable a largo plazo. Por su parte el equipo necesario para realizar RT-PCR en tiempo real y PCR puede ser costoso por los reactivos, especialmente si se realizan muchas pruebas.

La especificidad del biosensor, basada en la longitud de onda de resonancia, parece ser alta, aunque se necesitarían más estudios para confirmarlo, asimismo depende del diseño del biosensor y de los ligandos utilizados para la detección. Sin embargo, hay posibilidad de interferencias con otras sustancias presentes en la muestra como ocurrió con el uso de DTT. Las pruebas basadas en RT-PCR y PCR tienen una especificidad extremadamente alta ya que se basan en la detección de secuencias genéticas específicas. La especificidad depende en gran medida del diseño de los *primers* y sondas, y es menos susceptible a interferencias, mientras que las pruebas de antígenos y anticuerpos pueden ser susceptibles a falsos positivos o falsos negativos.

4.2.3 Versatilidad de aplicaciones

Usando nanoestructuras de oro para la detección de patógenos mediante la interacción Au-S en biosensores plasmónicos, es posible extrapolar la implementación del biosensor más allá de la detección de SARS-CoV-2. A continuación, se presenta el posible potencial de aplicaciones en los esquemas de oligonucleótidos y biotina-estreptavidina en comparación con otras técnicas de detección.

La hibridación es esencial para la detección basada en oligonucleótidos. La capacidad del biosensor para detectar eventos de hibridación en tiempo real tiene un potencial significativo para ser aplicado en la detección de otros patógenos basados en RNA o DNA. A diferencia de la RT-PCR y la PCR convencional, que también se basan en la hibridación al amplificar el material genético, el biosensor no requiere ciclos de calentamiento y enfriamiento ni reactivos adicionales, lo que podría reducir el tiempo y el costo de los ensayos.

La biotina y la estreptavidina son conocidas por su fuerte interacción, que es ampliamente utilizada en pruebas inmunológicas mediante ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). La incorporación de este esquema en el biosensor plasmónico sugiere que el dispositivo puede ser adaptado para una amplia variedad de aplicaciones, no sólo para la detección de SARS-CoV-2 debido a la diversidad de kits de anticuerpos biotinilados para una determinación específica. Comparativamente, las pruebas basadas en RT-PCR y PCR no utilizan este esquema, mientras que las pruebas de antígeno y anticuerpo pueden hacerlo, pero con menos especificidad.

Capítulo 5

Conclusiones

Basado en la metodología propuesta en este trabajo, se destaca que se logró detectar analitos con un espesor ≤ 24 nm en el biosensor utilizando AuNFs. También, se determinó que el límite de detección del biosensor ronda un valor LOD cercano a 4.5 μ M.

Este estudio encontró que para funcionalizar completamente un sustrato con AuNFs de 50 nm de espesor, se requiere una concentración acumulada aproximada de 20 μ M de oligonucleótidos tiolados; mientras que, para las AuNPs de 13 nm, la concentración requerida fue aproximadamente de 8 μ M. No obstante, se destaca que el uso de DTT como agente estabilizador genera inhibición competitiva en el proceso de funcionalización, por lo que no se aconseja su uso en concentraciones mayores o iguales a 100 nM.

Adicionalmente, se pudo observar una funcionalización completa de la superficie de un sustrato con AuNFs de 50nm con una concentración acumulada cercana a los 10 μ M de estreptavidina; de manera análoga, para los sustratos con AuNPs de 13 nm, fue necesario emplear una concentración acumulada aproximada de 30 μ M. Es relevante señalar que el proceso de tiolado no es esencial para funcionalizar la estreptavidina en el oro, ya que la interacción electrostática facilita la funcionalización.

Se identificó un proceso inverso a la funcionalización al inyectar analitos con una micropipeta. Aunque la causa precisa no es tan clara, podría estar relacionada con la interrupción de la interacción electrostática entre el oro y el azufre durante la funcionalización con estreptavidina debido al flujo turbulento generado tras la inyección.

Durante la hibridación, se observó una dinámica constante en las AuNFs de 50 nm con una concentración inicial de 5 nM de oligonucleótidos complementarios. Para

identificar la hibridación en AuNPs de 13 nm, es necesario emplear una concentración inicial de 2 nM. Empleando el efecto termoplasmónico en las nanopartículas de oro con una potencia de láser de 200 mW se facilita el desdoblamiento de los oligonucleótidos, optimizando su orientación y, por ende, mejorando su disponibilidad.

Finalmente, se pudo detectar el evento de enlace estreptavidina-biotina tanto en AuNFs de 50 nm como en AuNPs utilizando una concentración de 100 nM de biotina. Es relevante destacar que el enlace estreptavidina-biotina es altamente detectable por el biosensor en comparación con el esquema de oligonucleótidos.

Se concluyó que el sistema basado en AuNPs brinda una detección más sensible al requerir una menor concentración de oligonucleótidos en comparación con las AuNFs. No obstante, es pertinente reconocer que esta conclusión se apoya en un solo criterio. En aplicaciones reales, otros aspectos como la estabilidad y reproducibilidad serían determinantes. En comparación con alternativas comerciales, el uso de un biosensor plasmónico para la detección de analitos se presenta como una opción rápida, más sensible y económicamente viable frente a técnicas como PCR, pruebas de antígenos y anticuerpos.

Trabajo a futuro

Es esencial optimizar el método de fabricación de sustratos y estandarizar el tamaño de las AuNFs y AuNPs. Rediseñar el dispositivo microfluídico para la realización de estudios de AFM, SEM y UV-Vis con la finalidad de caracterizar las superficies funcionalizadas.

Además, es fundamental diseñar protocolos que permitan tanto el almacenamiento de sustratos funcionalizados como su reutilización. El buffer Tris-EDTA puede considerarse para la primera dilución de nuevos oligonucleótidos tiolados. Debido a que se demostró la alta sensibilidad en el esquema de biotina-estreptavidina, se propone realizar el mismo estudio utilizando biotina modificada con un “*spike*” de SARS-CoV-2 como una aplicación directa para la detección del virus. Adicionalmente, se propone explorar más posibilidades para el biosensor mediante ensayos con nuevos analitos y considerar la miniaturización del mismo mediante optoelectrónica. Es importante controlar factores ambientales y estandarizar todos los protocolos para garantizar la precisión y reproducibilidad de los resultados.

Se recomienda llevar a cabo un estudio detallado sobre el proceso de hibridación utilizando el efecto termoplasmónico en las nanopartículas de oro. Aunque el uso de una potencia de láser iguales o mayores a 200 mW podría favorecer el proceso de hibridación, existe la posibilidad de generar la volatilización del agua presente en la muestra cambiando la composición y puede ocurrir la formación de corrientes de convección debido al calentamiento localizado. Por lo tanto, se considera necesario estandarizar la potencia del haz incidente para garantizar resultados consistentes y controlados. La estandarización de la potencia del láser es fundamental para aplicaciones futuras orientadas a la detección de analitos que son sensibles a variaciones de temperatura. Aunque el calentamiento puede favorecer la disponibilidad de los analitos, en el caso de los oligonucleótidos, es importante considerar que estos alcanzan su temperatura de fusión cerca de los 60 °C. De manera similar, al trabajar con proteínas, un incremento en la

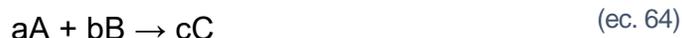
temperatura podría desnaturalizar esas moléculas, volviéndolas inviables. Por ello, resulta indispensable ajustar la potencia del láser para cada esquema de interés garantizando resultados significativos.

En términos generales, el biosensor plasmónico presenta una herramienta innovadora con potencial para la detección de SARS-CoV-2 y otros antígenos, ofreciendo una alta sensibilidad y especificidad. Aunque enfrenta desafíos, como la optimización del proceso de hibridación, su capacidad para proporcionar resultados en tiempo real y su versatilidad de aplicaciones lo convierte en una técnica prometedora en biomedicina, aunque se requieren más investigaciones para determinar su viabilidad en aplicaciones clínicas.

Apéndice 1

A1.1 Estequiometría

La estequiometría hace referencia a la proporción de las sustancias que participan en una reacción química para que esta se lleve a cabo. Los coeficientes de cada especie en una ecuación química son equivalentes a la cantidad de sustancia, medida en mol, necesaria para que todas las especies reaccionen completamente, es decir que la reacción está estequiométricamente balanceada.



Esta ecuación hace referencia a una reacción simple de formación irreversible, dada por la dirección de la flecha, donde A y B son reactivos y C es el producto. Asimismo, «a, b, c» representan los coeficientes estequiométricos de las especies químicas que participan en la reacción.

En la práctica, difícilmente se poseen las cantidades estequiométricamente balanceadas; aquel reactivo que por proporción se pueda consumir completamente se denomina reactivo en limitante, aquellos que no reaccionan en su totalidad se llaman reactivos en exceso [62].

A1.2 Preparación de disoluciones

Una disolución se refiere a un tipo de mezcla homogénea que consiste en uno o más compuestos disueltos en un medio, generalmente líquido. El componente presente en menor cantidad se denomina soluto, mientras que el medio se denomina disolvente. Al preparar una disolución, se debe conocer inicialmente la concentración y volumen deseados, a partir de estos datos se calcula la cantidad necesaria de soluto y disolvente. De ser necesario, se puede utilizar la densidad de una sustancia líquida para convertir unidades de masa a volumen y viceversa.

Cuando se tiene una disolución inicial, con la cual se debe preparar otra a menor concentración, se puede utilizar la ecuación de dilución, para determinar la cantidad de volumen de disolvente que se debe agregar para obtenerla (aforar). Los subíndices 1 y 2 se refieren a la disolución original y resultante respectivamente; C es la concentración y V es el volumen [62].

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (\text{ec. 65})$$

Para realizar el análisis de una muestra se debe tomar una fracción o porción de una disolución homogénea a la que se denomina alícuota.

A1.3 Concentración molar y porcentaje en masa

El mol de una sustancia se define como 6.022×10^{23} unidades de esa sustancia, como átomos, moléculas o iones. Este valor es comúnmente conocido como el número de Avogadro. El concepto de mol se emplea para realizar conversiones entre la masa y el número de partículas en una muestra [62].

Para determinar el número de mol (n) presentes en una cantidad conocida de masa (m) de un soluto, utilizado para preparar disoluciones, se utiliza el peso molecular (M_w) del compuesto dado por la suma de los pesos atómicos medidos en unidades de masa atómica (UMA) y se aplica la siguiente relación:

$$n_{\text{solute}} = \frac{m_{\text{solute}}}{M_{w\text{solute}}} \quad (\text{ec. 66})$$

La fórmula para calcular la concentración molar [M] relaciona la cantidad del número de mol del soluto con el volumen de la disolución, que está dado a su vez por la suma del volumen molar parcial del soluto y del disolvente en una mezcla binaria [98].

$$[M] = \frac{n_{\text{soluta}}}{V_{\text{disolución}}} \quad (\text{ec. 67})$$

$$V_{\text{disolución}} = n_{\text{soluta}} \bar{V}_{\text{soluta}} + n_{\text{disolvente}} \bar{V}_{\text{disolvente}} \quad (\text{ec. 68})$$

De manera formal, en disoluciones reales se debe considerar el volumen molar parcial de un componente determinado en una mezcla, es decir, la contribución que realiza un mol de dicho componente al volumen de la disolución, esto es necesario debido a que el volumen es una propiedad extensiva que depende de la cantidad de materia. Sin embargo, para cantidades mínimas de sustancia, como en este trabajo, la contribución molar se puede despreciar obteniendo idealmente:

$$V_{\text{disolución}} = V_{\text{soluta}} + V_{\text{disolvente}} \quad (\text{ec. 69})$$

Otra forma de calcular concentración es en porcentaje, donde se considera la masa del soluto y la masa total de la disolución, es decir la suma de la masa del soluto y del disolvente.

$$\%_{\text{masa}} = \frac{m_{\text{soluta}}}{m_{\text{disolución}}} \times 100 = \frac{m_{\text{soluta}}}{m_{\text{soluta}} + m_{\text{disolvente}}} \times 100 \quad (\text{ec. 70})$$

A1.4 Cálculos para la preparación de soluciones salinas

Para realizar los cálculos necesarios para la preparación de soluciones salinas, se requiere conocer el peso molecular del cloruro de sodio, la cantidad de disolución que se va a preparar y la densidad del agua. En este trabajo, se prepararon dos tipos de disoluciones en función de diferentes unidades de concentración:

- **Porcentaje masa/masa**

Debido a que se pretende preparar una disolución de un determinado porcentaje en masa, es necesario calcular la masa de NaCl que debe pesarse para preparar cierta cantidad de agua en gramos. A partir de la (ec.

70), y asumiendo la densidad $\rho_{\text{Agua}} = 1 \text{ mg/mL}$ se obtiene la siguiente expresión:

$$m_{\text{NaCl en gramos}} = \frac{\%_{\text{masa}} \cdot V_{\text{Agua en mililitros}}}{100 - \%_{\text{masa}}} \quad (\text{ec. 71})$$

- **Concentración molar**

Debido a que se pretende preparar una disolución de una determinada concentración molar, es necesario calcular la masa de NaCl que debe pesarse para preparar cierto volumen de disolución. Siendo esta ecuación específica para cloruro de sodio, al sustituir el peso molecular y despejando de la (ec. 67), se obtiene la siguiente expresión ¹¹:

$$m_{\text{NaCl en gramos}} = [M] \cdot V_{\text{Agua en mililitros}} \cdot 0.05844 \quad (\text{ec. 72})$$

3.3.2.5 Cálculos para la preparación de polielectrolitos

El depósito de capas moleculares de polielectrolitos se basó en un arreglo alternado de polímeros con cargas eléctricas opuestas.

El procedimiento para la preparación de PAH y PSS se basa en un protocolo publicado por investigadores del *Leibniz Institute of Photonic Technology* en Alemania [59], al cual se le hizo una modificación en la concentración de cloruro de sodio para trabajar con una concentración molar de NaCl de 0.3M, de tal manera que corresponda a un porcentaje de sal óptimo para su uso en las AuNFs de 50nm usadas en los experimentos. La relación masa/volumen para cada polielectrolito es de:

$$\frac{1 \text{ mg de PAH/PSS}}{1 \text{ mL de solución salina 0.3M}}$$

¹¹ Esta fórmula no considera las contribuciones del volumen parcial molar del NaCl, entonces se asume que $V_{\text{disolución}} \approx V_{\text{Agua}}$ en mililitros.

Los cálculos para la preparación de soluciones salinas en concentraciones molares obedecen el mismo procedimiento comentado en la [Sección 3.3.2.4](#).

3.3.2.6 Cálculos para la preparación de oligonucleótidos

El oligonucleótido para funcionalizar la superficie posee en un extremo un grupo funcional tiol, que exhibe una gran afinidad por la superficie del oro, y su complemento tiene una secuencia relacionada con parte de la composición de RNA del virus SARS-CoV-2.

Los oligonucleótidos sintéticos fueron adquiridos en forma de un *primer* liofilizado y deberán resuspenderse en NFW o *buffer* TE (10mM Tris-HCl 0.1mM EDTA, pH 8.0) dependiendo del tiempo de almacenamiento. El protocolo para la preparación de oligonucleótidos se describe en la [Sección 3.4.3.3](#).

Para lograr concentraciones más bajas de oligonucleótidos desde la primera dilución, se toma una alícuota y se ajusta el volumen con agua libre de nucleasas para obtener una nueva disolución con menor concentración. Este procedimiento puede repetirse varias veces hasta alcanzar la concentración deseada.

Para determinar el volumen de la alícuota, se deben sustituir los valores de la concentración molar inicial, la concentración molar deseada y el volumen de la disolución a preparar sustituyendo en la (ec. 65), obteniendo la siguiente expresión:

$$V_{\text{disolución inicial}} = \frac{[M]_{\text{Final de oligos}} \cdot V_{\text{disolución final}}}{[M]_{\text{Inicial de oligos}}} \quad (\text{ec. 73})$$

Es importante destacar que la cantidad de disolvente necesaria para aforar la alícuota será igual a la diferencia entre el volumen de la disolución final y el volumen de disolución inicial.

$$V_{\text{disolvente}} = V_{\text{disolución final}} - V_{\text{disolución inicial}} \quad (\text{ec. 74})$$

Lista de figuras

Capítulo 1

Figura 1.1. Probabilidad de detección de SARS-CoV-2 en función del tiempo desde la aparición de los síntomas	6
---	---

Capítulo 2

Figura 2.1. Clasificación de los biosensores ópticos en función del elemento biológico y el transductor	13
Figura 2.2. Representación esquemática de los elementos requeridos para la operación básica de un biosensor	14
Figura 2.3. Color exhibido en la copa de Licurgo.....	16
Figura 2.4. Respuesta de la parte real de la función dieléctrica.....	21
Figura 2.5. Esquema de la interfaz a lo largo del plano y–z entre un dieléctrico	23
Figura 2.6. Configuraciones de biosensores basados en SPR	29
Figura 2.7. Configuraciones de sensores basados en SPR acoplados con prisma.....	30
Figura 2.8. Representación esquemática del fenómeno de LSPR en una interfaz metal-dieléctrico	34
Figura 2.9. Esquema que describe el principio de conversión de luz fototérmica a calor mediante nanoestructuras plasmónicas	36
Figura 2.10. Espectros del número de Joule, que representa la capacidad de una NP para producir calor, para diferentes materiales	38
Figura 2.11. Elementos de reconocimiento en biosensores plasmónicos.....	44
Figura 2.12. Desplazamiento de la longitud de onda resonante en SPR debido a un cambio en la reflectividad observado en función del índice de refracción	45
Figura 2.13. Representación esquemática de la magnitud de las fuerzas intermoleculares e intramoleculares.....	49
Figura 2.14. Interacción y forma estructural de las bases nitrogenadas en el DNA.....	50
Figura 2.15. Forma estructural característica las cadenas de nucleótidos	51
Figura 2.16. Elementos estructurales del SARS-CoV-2	52
Figura 2.17. Ubicación de los genes y conjuntos de posiciones de los cebadores y sondas en el genoma del SARS-CoV-2	52
Figura 2.18. Representación esquemática de los oligonucleótidos.....	54

Figura 2.19. Representación esquemática de la funcionalización de una nanopartícula de oro con diferentes bioreceptores tiolados	57
Figura 2.20. Representación esquemática del evento de hibridación.....	58

Capítulo 3

Figura 3.1. Equipo de <i>sputtering</i> modelo DCXS-750-4 AJA International	60
Figura 3.2. Muestras de Corning® 2947N colocadas en la cámara principal del equipo de <i>sputtering</i>	60
Figura 3.3. Conformación estructural de un chip plasmónico (sistema abierto).	62
Figura 3.4. Conformación estructural de un chip plasmónico (sistema cerrado).	63
Figura 3.5. Diagrama de flujo del procedimiento para la preparación de moldes de PDMS.....	64
Figura 3.6. Modelo en 3D (vista frontal) del prototipo de arreglo óptico para el biosensor	67
Figura 3.7. Vista superior del arreglo óptico del biosensor con componentes numerados	68
Figura 3.8. Chip plasmónico montado en el prisma acoplado en la configuración de Kretschmann	69
Figura 3.9. Interfaz del software en LabVIEW® del biosensor plasmónico.....	71
Figura 3.10. Gráfica de la reflectividad típica de una AuNF de 50 nm observada en el prototipo del biosensor	72
Figura 3.11. Sensograma obtenido mediante la inyección con micropipeta de diferentes concentraciones de solución salina	73
Figura 3.12. Representación esquemática del grupo amino en PAH	76
Figura 3.13. Representación esquemática de la estructura del PSS.....	77
Figura 3.14. Representación esquemática de la estructura del DTT	78
Figura 3.15. Representación esquemática del enlace de biotina-estreptavidina.....	79
Figura 3.16. Diagrama de flujo del protocolo para la preparación de polielectrolitos.	82
Figura 3.17. Diagrama de flujo del protocolo para la preparación de oligonucleótidos.....	87
Figura 3.18. Diagrama de flujo del protocolo para la preparación de proteínas.	89
Figura 3.19. Representación esquemática de la hibridación entre el oligonucleótido tiolado funcionalizado al oro y el oligonucleótido complementario de SARS-CoV-2	94
Figura 3.20. Gráfico de la potencia del láser verde en función del ángulo de la placa retardadora $\lambda/2$	95

Capítulo 4

Figura 4.1. Sensograma obtenido mediante la inyección con micropipeta de bicapas de PAH/PSS en AuNF.....	97
---	----

Figura 4.2. Sensograma obtenido mediante la inyección con micropipeta de oligonucleótidos en AuNF usando NFW.....	99
Figura 4.3. Sensograma obtenido mediante la inyección con micropipeta de oligonucleótidos en AuNF usando DTT.	102
Figura 4.4. Sensograma obtenido mediante la inyección por flujo de oligonucleótidos en AuNPs.	104
Figura 4.5. Sensograma obtenido mediante la inyección por flujo de oligonucleótidos en AuNPs empleando calentamiento localizado.	107
Figura 4.6. Fotografía térmica del aumento localizado de la temperatura en el chip plasmónico debido al uso del láser verde.....	109
Figura 4.7. Sensograma obtenido mediante la inyección con micropipeta de estreptavidina/biotina en AuNF.....	110
Figura 4.8. Sensograma obtenido mediante la inyección de flujo con bomba de infusión de estreptavidina/biotina en AuNPs.....	113

Referencias

- [1] B. Nagel, H. Dellweg y L. M. Gierasch, «Glossary for chemists of terms used in biotechnology,» *Pure & Appl. Chem.*, vol. 64, nº 1, pp. 143-168, 1992.
- [2] IUPAC;, Compendium of Chemical Terminology—The Gold Book (Compiled by A.D. McNaught and A. Wilkinson), 2nd ed., Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.
- [3] S. Oskan, B. Uslu y M. Sezgintürk, *Biosensors: Fundamentals, Emerging Technologies, and Applications*, CRC Press, 2022.
- [4] P. Damborský, J. Švitel y J. Katrlík, «Optical biosensors,» *Essays Biochem*, vol. 60, nº 1, pp. 91-100, 2016.
- [5] T. Gogoi, S. Chettri, P. Borgohain y R. Sarmah, «Theory of Plasmonic Probes,» de *Recent Advances in Plasmonic Probes*, Switzerland, Springer, 2022, pp. 15-40.
- [6] J. Homola, «Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species,» *Chem. Rev.*, vol. 108, pp. 462-493, 2008.
- [7] S. A. Maier, *Plasmonics: Fundamentals and Applications*, New York: Springer Science & Business Media, 2007.

- [8] K. A. Willets y R. P. Van Duyne, «Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing,» *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 58, n° 1, pp. 267-297, 2007.
- [9] O. Stranik, H. McEvoy, C. McDonagh y B. MacCraith, «Plasmonic enhancement of fluorescence for sensor applications,» *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 107, pp. 148-153, 2005.
- [10] M. Boulade, J. Moreau y T. Livache, «Surface plasmon resonance imaging: application in microbiology,» *Photoniques*, n° March-April, pp. 27-31, 2017.
- [11] Y. Huang, G. D. Liu y X. J. Zhang, «Detection and Diagnosis of COVID-19,» *Prog. Chem*, vol. 32, n° 9, pp. 1241-1251, 2020.
- [12] N. Magazine, T. Zhang, Y. Wu y M. McGee, «Mutations and Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein,» *Viruses*, vol. 14, n° 3, p. 640, 2022.
- [13] G. Guglielmi, «Fast coronavirus tests: what they can and can't do,» *Springer Nature*, vol. 585, pp. 496-498, 2020.
- [14] J. Schultz, M. Mrksich, S. N. Bhatia, D. J. Brady, A. J. Ricco, D. R. Walt y C. L. Wilkins, *Biosensing. International Research and Development*, Dordrecht: Springer, 2006.
- [15] A. Kabashin, S. Patskovsky y A. Grigorenko, «Phase and amplitude sensitivities in surface plasmon resonance bio and chemical sensing,» *Opt. Express*, vol. 17, n° 23, pp. 21191-21204, 2009.
- [16] J. Homola, I. Koudela y S. S. Yee, «Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: Sensivity comparison,» *Chem. Sensors Actuators*, vol. B, n° 54, pp. 16-24, 1999.
- [17] A. Tastanova, C. I. Stoffer, A. Dzung y P. Cheng, «A Comparative Study of Real-Time RT-PCR–Based SARS-CoV-2 Detection Methods and Its Application to Human-Derived and Surface Swabbed Material,» *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 23, n° 7, pp. 796-804, 2021.
- [18] S. Balbinot, A. M. Srivastav, J. Vidic, I. Abdulhalim y M. Manzano, «Plasmonic biosensors for food control,» *Trends in Food Science & Technology*, vol. 111, pp. 128-140, 2021.
- [19] D. Thevenot, K. Toth y R. Durst, «Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications,» *Biosens Bioelectron*, vol. 16, pp. 121-131, 2001.

- [20] B. Gupta, A. Shrivastav y S. Usha, «Surface plasmon resonance-based fiber optic sensors utilizing molecular imprinting,» *Sensors*, vol. 16, nº 9, p. 1381, 2016.
- [21] L. Carrascosa, C. Huertas y L. Lechuga, «Prospects of optical biosensors for emerging label-free RNA analysis,» *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 80, pp. 177-189, 2016.
- [22] M. Manzano, F. Cecchini, M. Fontanot y L. Iacumin, «OLED-based DNA biochip for *Campylobacter* spp. detection in poultry meat samples,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 66, pp. 271-276, 2015.
- [23] M. Born y E. Wolf, *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*, New York: Cambridge University Press, 2013.
- [24] A. Shalabney y I. Abdulhalim, «Sensitivity-enhancement methods for surface plasmon sensors,» *Laser & Photonics Reviews*, vol. 5, nº 4, pp. 571-606, 2011.
- [25] R. Biswas y N. Mazumder, «Theory of Plasmonic Probes,» de *Recent Advances in Plasmonic Probes: Theory and Practice*, Tezpur, Springer Cham, 2022, p. 15.
- [26] D. J. Barber y I. C. Freestone, «An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus cup by analytical transmission electron microscopy,» *Archaeometry*, vol. 32, nº 1, pp. 33-45, 1990.
- [27] J. D. Jackson, *Classical Electrodynamics*, 3rd ed., New York: Wiley, 2007.
- [28] J. A. Bittencourt, *Fundamentals of Plasma Physics*, 3rd ed., New York: Springer, 2004.
- [29] F. Chen, *Introduction to Plasma Physics and Controlled Fusion*, Cham: Springer International Publishing, 2016.
- [30] B. Prabowo, A. Purwidyantri y K. Liu, «Surface plasmon resonance optical sensor: A review on light source technology,» *Biosensors*, vol. 8, nº 3, p. 80, 2018.
- [31] H. Raether, «Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings,» *Springer Tracts in Modern Physics*, vol. 111, pp. 1-3, 1988.
- [32] E. Kretschmann y H. Raether, «Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light,» *Zeitschrift für Naturforschung A*, vol. 23, nº 12, pp. 2135-2136, 1968.
- [33] J. H. Park, Y. W. Cho y T. H. Kim, «Recent Advances in Surface Plasmon Resonance Sensors for Sensitive Optical Detection of Pathogens,» *Biosensors*, vol. 12, nº 1, p. 180, 2022.

- [34] M. Soler y C. Huertas, «Label-free plasmonic biosensors for point-of-care diagnostics: a review,» *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 19, pp. 71-81, 2019.
- [35] V. Yesudasu, H. Pradhan y R. Pandya, «Recent progress in surface plasmon resonance based sensors: A comprehensive review,» *Heliyon*, vol. 7, nº 3, p. e06321, 2021.
- [36] Y. Yanase, T. Hiragun, K. Ishii y T. Kaguchi, «Surface Plasmon Resonance for Cell-Based Clinical Diagnosis,» *Sensors*, vol. 14, nº 3, pp. 4948-4959, 2014.
- [37] K. M. Mayer y J. H. Hafner, «Localized surface plasmon resonance sensors,» *Chemical Reviews*, vol. 111, pp. 3828-3857, 2011.
- [38] P. Strobbia, E. R. Languirand y B. M. Cullum, «Recent advances in plasmonic nanostructures for sensing: a review,» *Optical Engineering*, vol. 54, nº 10, p. 100902, 2015.
- [39] Y. Liu y Y. Ma, «One-Dimensional Plasmonic Sensors,» *Front. Phys.*, vol. 8, nº 312, 2020.
- [40] S. Zahra, L. Ma y W. Wang, «Electromagnetic Metasurfaces and Reconfigurable Metasurfaces: A Review,» *Front. Phys.*, vol. 8, nº 593411, 2021.
- [41] T. Bora, *Noble and Precious Metals: Properties, Nanoscale Effects and Applications*, London: IntechOpen, 2018.
- [42] M. Sriram, B. Markhali, P. Nicovich y D. Bennett, «A rapid readout for many single plasmonic nanoparticles using dark-field microscopy and digital color analysis,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 117, pp. 530-536, 2018.
- [43] C. L. Nehl y J. H. Hafner, «Shape-dependent plasmon resonances of gold nanoparticles,» *Journal of Materials Chemistry*, vol. 18, nº 21, pp. 2415-2419, 2008.
- [44] J. Cao, E. Galbraith, T. Sun y K. Grattan, «Comparison of surface plasmon resonance and localized surface plasmon resonance-based optical fibre sensors,» *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 307, nº 1, p. 012050, 2011.
- [45] M. Piliarik y J. Homola, «Surface plasmon resonance (SPR) sensors: Approaching their limits?,» *Opt. Express*, vol. 17, nº 19, pp. 16505-16517, 2009.

- [46] H. Liu, C. Chen y Y. Zhang, «A High-Sensitivity Methane Sensor with Localized Surface Plasmon Resonance Behavior in an Improved Hexagonal Gold Nanoring Array,» *Sensors*, vol. 19, n° 21, p. 4803, 2019.
- [47] C. Molinaro, A. Khitous, L. Noel y O. Soppera, «Nanochemistry by Thermoplasmonic Effects,» de *Progress in Nanophotonics*, Switzerland, Springer, 2022, pp. 71-91.
- [48] J. A. Webb y R. Bardhan, «Emerging advances in nanomedicine with engineered gold nanostructures,» *Nanoscale*, vol. 6, n° 1, pp. 2502-2530, 2014.
- [49] G. Baffou y R. Quidant, «Thermo-plasmonics: using metallic nanostructures as nano-sources of heat,» *Laser Photonics Rev*, vol. 7, n° 2, pp. 171-187, 2013.
- [50] A. Lalissee, G. Tessier, J. Plain y G. Baffou, «Quantifying the Efficiency of Plasmonic Materials for Near-Field Enhancement and Photothermal Conversion,» *J. Phys. Chem. C*, vol. 119, n° 45, pp. 25518-25528, 2015.
- [51] P. Malik, R. Gupta, V. Malik y R. Kumar, «Emerging nanomaterials for improved biosensing,» *Measurement: Sensors*, vol. 16, n° 100050, 2021.
- [52] B. Bhagat, K. Mehta, T. Sinha y P. Baruah, «Recent Advances and Opportunities of Plasmonic Sensors,» de *Lecture Notes in Nanoscale Science and Technology*, Switzerland, Springer, 2022, pp. 297-330.
- [53] H. Robert, F. Kundrat, E. Bermúdez-Ureña y H. Rigneault, «Light-Assisted Solvothermal Chemistry Using Plasmonic Nanoparticles,» *ACS Omega*, vol. 1, n° 1, pp. 2-8, 2016.
- [54] G. Baffou y H. Rigneault, «Femtosecond-pulsed optical heating of gold nanoparticles,» *Phys. Rev. B*, vol. 84, n° 3, 2011.
- [55] A. Srivastava y Y. Prajapati, «Effect of sulfosalt and polymers on performance parameter of SPR biosensor,» *Opt. Quant. Electron*, vol. 52, n° 10, pp. 1-14, 2020.
- [56] H. Ahn, H. Song, J. Choi y K. Kim, «A localized surface plasmon resonance sensor using double-metal-complex nanostructures and a review of recent approaches,» *Sensors*, vol. 18, n° 1, p. 98, 2018.
- [57] J. Homola y M. Piliarik, «Surface plasmon resonance (SPR) sensors,» de *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Berlin, Springer, 2006, pp. 45-67.

- [58] S. H. Kim, J. Lee, B. H. Lee y C.-S. Song, «Specific detection of avian influenza H5N2 whole virus particles on lateral flow strips using a pair of sandwich-type aptamers,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 134, pp. 123-129, 2019.
- [59] J. Jatshka, A. Dathe, A. Csáki, W. Fritzche y O. Stranik, «Propagating and localized surface plasmon resonance sensing - A critical comparison based on measurements and theory,» *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 7, nº 2016, pp. 62-70, 2016.
- [60] C. Topor, M. Puiu y C. Bala, «Strategies for Surface Design in Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensing,» *Biosensors*, vol. 13, nº 465, pp. 1-23, 2023.
- [61] R. Hasler, C. Reiner-Rozman, S. Fossati y P. Aspermair, «Field-Effect Transistor with a Plasmonic Fiber Optic Gate Electrode as a Multivariable Biosensor Device,» *ACS Sens.*, vol. 7, nº 2, pp. 504-512, 2022.
- [62] R. Chang y J. Overby, *Chemistry*, 14th ed., New York: McGraw Hill LLC, 2022.
- [63] F. Liu, J. Zhang y Y. Mei, «The origin of the cooperativity in the streptavidin-biotin system: A computational investigation through molecular dynamics simulations,» *Sci Rep*, vol. 6, p. 27190, 2016.
- [64] University of Texas, «gchem,» 2023. [En línea]. Available: <https://gchem.cm.utexas.edu/imfs/index.php#forces/forces-attraction-all.php>. [Último acceso: 2023 Abril 14].
- [65] D. L. Nelson, M. M. Cox y A. A. Hoskins, *Lehninger Principles of Biochemistry*, New York: Macmillan Learning, 2021.
- [66] J. W. Baynes y M. H. Dominiczak, *Bioquímica médica*, 3ra ed., Barcelona: Elsevier, 2011.
- [67] National Human Genome Research Institute, «genome.gov,» [En línea]. Available: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ácido-desoxirribonucleico>. [Último acceso: 19 Mayo 2023].
- [68] D. A. Jamison, S. A. Narayan, N. Trovão y J. Guarnieri, «A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 1: Intracellular overdrive for SARS-CoV-2 infection,» *Eur J Hum Genet*, vol. 30, pp. 889-898, 2022.

- [69] World Health Organization, «WHO,» 2020 Marzo 19. [En línea]. Available: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501>. [Último acceso: 2023 Mayo 22].
- [70] H. Abbasi, A. Tabaraei, S. Hosseini y A. Khosravi, «Real-time PCR Ct value in SARS-CoV-2 detection: RdRp or N gene?,» *Infection*, vol. 50, pp. 537-540, 2022.
- [71] A. Pinto, S. X. Chen y D. Y. Zhang, «Simultaneous and stoichiometric purification of hundreds of oligonucleotides,» *Nature Communications*, vol. 9, pp. 487-491, 2018.
- [72] G. Qiu, Z. Gai, Y. Tao, J. Schmitt, G. Kullak-Ublick y J. Wang, «Dual-Functional Plasmonic Photothermal Biosensors for Highly Accurate Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Detection,» *ACS Nano*, vol. 14, pp. 5268-5277, 2020.
- [73] S. Canossa y S. Wuttke, «Functionalization Chemistry of Porous Materials,» *Advanced Functional Materials*, vol. 30, nº 41, pp. 1-4, 2020.
- [74] B. I. Karawdeniya, A. M. Damry, K. Murugappan, S. Manjunath, Y. M. N. D. Y. Bandara, C. J. Jackson, A. Tricoli y D. Neshev, «Surface Functionalization and Texturing of Optical Metasurfaces for Sensing Applications,» *Chem. Rev.*, vol. 122, nº 19, p. 14990–15030, 2022.
- [75] A. Sassolas, B. Leca-Bouvier y L. Blum, «DNA Biosensors and Microarrays,» *Chem. Rev.*, vol. 108, nº 1, pp. 109-139, 2008.
- [76] I. Gazga Gurrión, «Desarrollo de nanoestructuras de Au para aplicaciones en biosensor plasmónico,» M.S. thesis, Optics Department, INAOE, Puebla, México, 2023.
- [77] A. V. Kabashin, P. Evans, S. Pastkovsky, W. Hendren, G. A. Wurtz, R. Atkinson, R. Pollard, P. V. A. y A. V. Zayats, «Plasmonic nanorod metamaterials for biosensing,» *Nature Mater*, vol. 8, p. 867–871, 2009.
- [78] A. Agrawal, C. Chen, J. Baxi y T. Pfefer, «Multilayer thin-film phantoms for axial contrast transfer function measurement in optical coherence tomography,» *Biomed Opt Express*, vol. 4, nº 7, pp. 66-75, 2013.
- [79] C. I. Díaz Failach, «Funcionalización de nanopelículas de oro con oligonucleótidos de SARS-CoV-2 para uso en un biosensor óptico,» M.S. thesis, Biomedical Sciences and Technologies Department, INAOE, Puebla, México, 2021.

- [80] Archivo INAOE, «Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica,» Noticias, 31 Mayo 2021. [En línea]. Available: <https://www.inaoep.mx/noticias/?noticia=838&anio=2021>. [Último acceso: 24 Marzo 2023].
- [81] J. P. Cuanalo-Fernández, S. Mansurova y R. Ramos-García, «Plasmonic biosensor for SARS-CoV-2 detection,» de *XI Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud*, CDMX, 2021.
- [82] International Organization for Standardization, «Agua para uso en análisis de laboratorio. Especificaciones y método de ensayo,» ISO 3696, International, 2004.
- [83] H. Hemmings y T. D. Egan, *Pharmacology and Physiology for Anesthesia: Foundations and Clinical Application*, 2nd ed., New York: Elsevier, 2018, pp. 814-835.
- [84] L. Coelho, J. Santos y J. Almeida, «Optical fiber sensor for early warning of corrosion of metal structures,» *Oceans*, vol. Aberdeen, pp. 1-5, 2017.
- [85] L. H. Feng, J. Zeng, D. K. Liang y H. Y. Liu, «Surface plasmon resonance spectral based fiber optic sensor for detection of total dissolved solids in water quality analysis,» *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, vol. 32, nº 29, pp. 29-34, 2012.
- [86] H. A. Rahman, S. W. Harun, M. Yasin, S. W. Phang y S. S. Damanhuri, «Tapered plastic multimode fiber sensor for salinity detection,» *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 171, nº 2, pp. 19-22, 2011.
- [87] K. A. J. & H. M. Deshmukh, «Fabrication and characterization of polymer blends consisting of cationic polyallylamine and anionic polyvinyl alcohol,» *Ionics*, vol. 20, p. 957–967, 2014.
- [88] W. Jian, S. Xu, J. Wang y S. Feng, «Layer-by-layer assembly of poly(allylamine hydrochloride)/polyurethane and its loading and release behavior for methylene orange,» *J. Appl. Polym. Sci*, vol. 129, nº 4, p. 2070–2075, 2013.
- [89] T. B. Taketa, J. B. M. Rocha Neto, D. M. dos Santos, A. Fiamingo, M. M. Beppu, S. P. Campana-Filho, R. E. Cohen y M. F. Rubner, «Tracking Sulfonated Polystyrene Diffusion in a Chitosan/Carboxymethyl Cellulose Layer-by-Layer Film: Exploring the Internal Architecture of Nanocoatings,» *Langmuir*, vol. 36, nº 18, p. 4985–4994, 2020.

- [90] C. Wu, J. Ma, J. Dai, Y. Duan, J. Xue, L. Qiang y N. Xu, «LbL Fabricated PU/PSS/{201}TiO₂ Multilayer Thin Films with Exposed High-Index {201} Facet for Environmental Applications,» *Fibers Polym*, vol. 24, p. 811–821, 2023.
- [91] D. Jeong, R. Abdur, Y. C. Joo, J. I. Jang, P. R. Cha, J. Kim, K. S. Min y J. Lee, «Effects of interfacial layer-by-layer nanolayers on the stability of the Cu TSV: Diffusion barrier, adhesion, conformal coating, and mechanical property,» *Materials Science in Semiconductor Processing*, vol. 83, nº 15, pp. 33-41, 2018.
- [92] I. Estrela-Lopis, J. J. Iturri Ramos, E. Donath y S. E. Moya, «Spectroscopic Studies on the Competitive Interaction between Polystyrene Sodium Sulfonate with Polycations and the N-Tetradecyl Trimethyl Ammonium Bromide Surfactant,» *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, nº 1, p. 84–91, 2010.
- [93] J. C. Lukesh, M. J. Palte y R. T. Raines, «A Potent, Versatile Disulfide-Reducing Agent from Aspartic Acid,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, nº 9, pp. 4057-4059, 2012.
- [94] M. C. Alliegro, «Effects of Dithiothreitol on Protein Activity Unrelated to Thiol–Disulfide Exchange: For Consideration in the Analysis of Protein Function with Cleland's Reagent,» *Analytical Biochemistry*, vol. 282, nº 1, pp. 102-106, 2000.
- [95] C. M. Dundas, D. Demonte y S. Park, «Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications.,» *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 97, p. 9343–9353, 2013.
- [96] S. P. Stayton, S. Freitag, L. A. Klumb, A. Chilkoti, V. Chu, J. E. Penzotti, R. To, D. Hyre, I. Le Trong, L. T. P. y S. R. E., «Streptavidin-biotin binding energetics,» *Biomol Eng*, vol. 16, nº 1-4, p. 39–44, 1999.
- [97] J. Baxi, W. Calhoun y Y. Sepah, «Retina-simulating phantom for optical coherence tomography,» *J Biomed Opt.*, vol. 19, nº 2, p. 0221106, 2014.
- [98] K. Timberlake y M. Orgill, *Chemistry. An Introduction to General, Organic and Biological Chemistry*, 13th ed., New York: Pearson Education Inc., 2018.