



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS "Francisco García Salinas"

Unidad Académica de Ingeniería Eléctrica
y
Unidad Académica de Ciencias Químicas

"Caracterización de Transistores de efecto de campo de compuerta extendida sobre superficies de Au para la detección electroquímica del Virus del Papiloma Humano serotipo 16, por voltamperometría de pulso diferencial"

Orientación:
Energías Renovables y Ciencias Ambientales

Presentada de acuerdo a los requerimientos de la
Universidad para obtener el título de

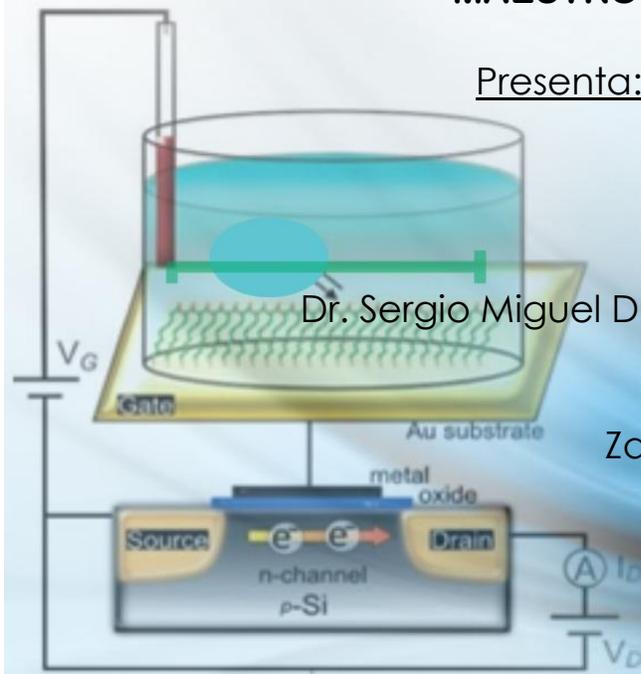
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

Presenta: Jesús Abraham Alvarado Romo

Asesores:

Dr. Sergio Miguel Durón Torres y Dra. Marisol Galván Valencia

Zacatecas, Zac. Junio 2016



A DIOS
y
a cada una de las personas que han creído y depositado su amor en
mi
para que yo tenga esta oportunidad de vida...

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Alberto y Silvia por todo su amor, por estar siempre conmigo e impulsar mis sueños, agradezco su gran esfuerzo y dedicación para hacer de mi lo que ahora soy...

A mis hermanos Aarón y Jonatan por ser gran parte de mi vida, por creer en mi y siempre brindarme su apoyo pese a cualquier circunstancia.

A mi Susi, por su apoyo incondicional, por estar a mi lado en todo momento, por ayudarme a hacer realidad mis sueños y anhelos y al mismo tiempo ser parte de ellos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de electroquímica en especial a Roberto y a Arturo por su invaluable apoyo en la realización de esta investigación, por sus conocimientos compartidos, por sus enseñanzas y regaños (Roberto), por cada sonrisa y buenos momentos vividos.

A mis asesores Dr. Sergio y Dra. Marisol por darme la oportunidad de trabajar con ellos y ser parte de su equipo de investigación, por su apoyo y consejos durante esta etapa de mi desarrollo profesional.

A la PhD. Ismailia Leilani Escalante, al Dr. en C. Jorge Luis Ayala Luján, al Dr. Pedro Daniel Alaniz Lumbreras y al Dr. en E. Carlos Guzmán por ser parte del grupo de revisores de la presente tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de posgrado otorgada en la realización de este trabajo.

A todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron en la elaboración de este trabajo y formación de mi persona y no fueron mencionados, pero sin duda si estás leyendo esto ten por seguro que te doy mi más atenta gratitud.

Investigar es como andar en bicicleta,
para aprender hay que estar acompañado
y cuando uno menos piensa anda solo...

“Me lo contaron y lo olvidé, lo vi y lo entendí, lo hice y lo aprendí”

RESUMEN

Los estudios epidemiológicos han demostrado que la infección por virus del papiloma humano (VPH) con tipos de alto riesgo, predominantemente del serotipo 16, se asocia con casi el 100% de los casos de cáncer de cuello uterino [1]. En el presente trabajo se realizaron análisis electroquímicos sobre el Transistor de Efecto de Campo (FET) comercial BSS138 de Fairchild Semiconductor® en configuración de compuerta extendida (EGFET) aplicados a la detección de sondas sintéticas inmovilizadas de ADN correspondientes al Virus del Papiloma Humano del serotipo 16 (VPH-16) sobre electrodos impresos de Au para su aplicación en un genosensor, cuya función sea la detección temprana del virus mediante métodos electroquímicos, analizados mediante voltamperometría de pulso diferencial (VPD) para evaluar los cambios de potencial. El método propuesto en este trabajo es capaz de detectar concentraciones de cadenas complementarias correspondientes al VPH-16, menores a 40nM y con un límite de detección de 3nM.

CONTENIDO GENERAL

AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	V
Lista de Figuras	VIII
Lista de Tablas	XII
CAPÍTULO 1. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Justificación	2
1.3. Hipótesis	3
1.4. Objetivos generales	4
1.5. Objetivos específicos	4
CAPÍTULO 2. Marco Téorico	6
2.1 Virus del Papiloma Humano (VPH)	6
2.1. Biosensores	11
2.2. Genosensores	18
2.3. Características del ADN y su relación en la creación de biosensores	24
2.4. Técnicas electroquímicas	30
2.4.1. Voltamperometría	30
2.4.2. Voltamperometría cíclica (VC)	31
2.4.3. Voltamperometría lineal (VL)	33
2.4.4. Voltamperometría de pulso diferencial (VPD)	33
2.4.5. Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE)	35

2.5. Transistores	38
2.5.1. Transistores de efecto de campo metal oxido semiconductor (MOSFET)	41
2.6. Implementación de Genosensores basados en FET	50
2.6.1. Transistor de efecto de campo ion sensitivo (ISFET)	50
2.6.2. Transistor de efecto de campo de compuerta extendida (EGFET)	60
CAPÍTULO 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES	65
3.1. Materiales y equipo	65
3.2. Metodología y caracterización	66
3.2.1. Modificación del electrodo con cadenas de adn	70
3.2.1.1. Inmovilización (VPH-16cs)	71
3.2.1.2. Hibridación (VPH-16cd)	74
3.2.2. Caracterización electroquímica	75
3.2.2.1. Activación del electrodo impreso de oro	75
3.2.2.2. Sensado electroquímico	78
3.2.3. Configuración electrónica	80
3.2.3.1. Selección del MOSFET	80
3.2.3.2. Caracterización electrica del MOSFET BSS138	82
3.2.3.3. Topología eléctrica EGFET	89
3.3. Resultados de la detección electroquímica del VPH-16	91
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	99
4.1. Perspectiva y Trabajo Futuro	101
REFERENCIAS	102

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 2.1 Tasas de mortalidad estandarizadas por edad de las pacientes con cáncer cervicouterino en el mundo. GLOBOCAN 2012 [19].</i>	7
<i>Figura 2.2 Filogenética del Virus del Papiloma Humano [18].</i>	8
<i>Figura 2.3 Esquema Genómico del Virus del Papiloma Humano [21]</i>	9
<i>Figura 2.4 Principio de funcionamiento de un biosensor [23].</i>	13
<i>Figura 2.5 Clasificación de los Biosensores [23].</i>	14
<i>Figura 2.6 Número de publicaciones en sensores químicos durante las dos décadas pasadas [26].</i>	17
<i>Figura 2.7 Representación de la estructura del Ácido Desoxirribonucleico ADN.</i>	25
<i>Figura 2.8 Características de una cadena de ADN.</i>	26
<i>Figura 2.9 Clasificación de los métodos de inmovilización [27].</i>	28
<i>Figura 2.10 Proceso de Hibridación.</i>	29
<i>Figura 2.11 Señal de excitación en VC.</i>	32
<i>Figura 2.12 a) Función de Onda Aplicada. b) Respuesta a la perturbación.</i>	33
<i>Figura 2.13 a) Señal de excitación aplicada en VPD, b) Respuesta en VPD.</i>	34
<i>Figura 2.14 Diagrama representativo de Nyquist aplicado a un circuito RC.</i>	37
<i>Figura 2.15 Diagrama representativo de Bode (Impedancia contra frecuencia aplicada a circuito RC)</i>	37

Figura 2.16. Esquema básico de los tipos de transistores y sus derivaciones.	39
Figura 2.17 Símbolos del MOSFET canal n. a) de enriquecimiento, a'') de depleción.	42
Figura 2.18 Símbolos del MOSFET canal p. b) de enriquecimiento, b'') de depleción.	42
Figura 2.19 Estructura física de un transistor MOSFET canal n.	43
Figura 2.20 Polarización del MOSFET (de enriquecimiento).	44
Figura 2.21 Efecto del voltaje V_{GS} en los MOSFET.	45
Figura 2.22 Característica $I_D - V_{DS}$ para una valor de V_{GS} constante.	46
Figura 2.23 Curvas características ideales de un MOSFET de acumulación canal n.	47
Figura 2.24 a) Estructura de un MOSFET: G-gate, O-óxido de compuerta, D-drenador, S-fuente, B-sustrato. b) Estructura de un ISFET: ER-electrodo de referencia, O-óxido de compuerta, R-resina epóxica, D-drenador, S-fuente, B-sustrato.	52
Figura 2.25 Circuitos básicos de un MOSFET (a) y un ISFET (b).	53
Figura 2.26 Micro-gráfico de un sensor ISFET a través de su cavidad de medición: (a) ISFET chip, (b) encapsulación, (c) cavidad de medición [55].	56
Figura 2.27 Estructura EGFET para la detección del ion H^+ sobre un sustrato de Au.	61
Figura 3.1 Circuito para activación del MOSFET.	67
Figura 3.2 Gráfica característica de respuesta en el MOSFET.	67
Figura 3.3 Analogía hidráulica para el mecanismo de control FET.	68
Figura 3.4 Respuesta del MOSFET al sumar V_{GS} con el potencial de hibridación.	69
Figura 3.5 Implementación de electrodos impresos de Au como celda electroquímica.	70

Figura 3.6 Muestra del primer tren de pulsos para el depósito de la sonda VPH-16cs. _____	71
Figura 3.7 Muestra del segundo tren de pulsos para el depósito de la sonda VPH-16cs. _____	72
Figura 3.8 VC de VPH-16cs en $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$, ciclo 1 y ciclo 30. _____	73
Figura 3.9 Hibridación de las cadenas VPH-16cs y VPH-16cc _____	74
Figura 3.10 Voltamperograma del electrodo impreso de Au por VC en H_2SO_4 0.5M. _____	76
Figura 3.11 EIE de cada evento; Au sólo, depósito de VPH-16cs, limpieza con VC sobre VPH-16cs (VPH-16final) e Hibridación (VPH-16cd). _____	77
Figura 3.12 VPD aplicada a cada evento del electrodo de Au para obtener el punto de voltaje óptimo de mayor variación de corriente. _____	79
Figura 3.13 Comparación de las curvas características de MOSFETs por VL. _____	81
Figura 3.14 MOSFET BSS138 montado en circuito impreso. _____	81
Figura 3.15 Primera gráfica de la curva característica del MOSFET generada por Excel. _____	82
Figura 3.16 Curva característica del MOSFET BSS138 generada por el potencióstato Gamry Reference 600. _____	83
Figura 3.17 Esquema de conexión para la implementación del potencióstato Gamry Reference 600. _____	84
Figura 3.18 Resistencia de carga del circuito del MOSFET. _____	86
Figura 3.19 VPD del MOSFET BSS138 a diferentes valores de resistencia de carga. _____	86
Figura 3.20 Discrepancia de las VL's de una misma prueba con el BSS138. _____	88
Figura 3.21 Similitud de las VL's en una misma prueba con el BSS138. _____	89
Figura 3.22 Esquema del EGFET con compuerta extendida de Au sobre el MOSFET BSS138. _____	90

Figura 3.23 Esquema de Conexión eléctrica utilizado para el sensado de ADN basado en EGFET. _____	91
Figura 3.24 Gráficos de Nyquist del cambio de impedancia para la relación de la transferencia electrónica en un electrodo de Au con cadena sencilla (VPH-16cs) e hibridación (VPH-16cd) en una solución $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ 2 mM. _____	92
Figura 3.25 VL de la respuesta de conducción del Transistor BSS138 en un electrodo de Au con: Cadena sencilla (VPH-16 cs) e hibridación (VPH-16 cd) y electrodo de Au. _____	93
Figura 3.26 a)VL y b)VPD del Transistor BSS138 en un electrodo de Au con: Cadena sencilla (VPH-16 cs) C. 5uM, e hibridación (VPH-16 cd) C.40nM. _	94
Figura 3.27 Comparación de los voltamperogramas de VPD a concentraciones de 40nM y 100Nm VPH-16cc _____	95
Figura 3.28 Curva de calibración del genosensor propuesto a concentraciones de VPH-16cc de 20nM a 100nM _____	96
Figura 3.29 Curva de calibración Logarítmica del genosensor propuesto a concentraciones de VPH-16cc de 20nM a 100nM _____	97

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Tabla comparativa de transductores electroquímicos empleados en los biosensores [25].	16
Tabla 2.2 Ejemplos de aplicaciones de diagnóstico de ADN en el ámbito clínico y forense [23].	23
Tabla 2.3 Ventajas e inconvenientes de las técnicas de inmovilización más comunes en la fabricación de biosensores [25].	28
Tabla 2.4 Convenio de signos en las tensiones y corrientes de un MOSFET tipo n y p.	49
Tabla 2.5 Compañías y sus dispositivos ISFET-Ph en el mercado [56]	57
Tabla 2.6 Distribución de las patentes ISFET por los solicitantes del 2003 al 2012. [56]	59
Tabla 3.1 Variaciones de corriente del MOSFET BSS138 por pequeños incrementos de Voltaje aplicados a la compuerta	85

Capítulo 1

Introducción



CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Estudios realizados en el periodo 1999-2015, determinaron cerca de 11,526 casos de cáncer cervicouterino (segundo lugar en tasas de mortalidad en mujeres a nivel Mundial), donde identificaron que los serotipos VPH-16/18 se asocian con casi el 100% de los casos detectados [1]. Existen métodos citológicos comunmente aplicados a la detección del VPH como el Papanicolaou, la citología base líquida, los diagnósticos moleculares PCR y captura de híbridos II, sin embargo la entrega de resultados a las pacientes son tardados (aprox. 3 meses en dar respuesta a la paciente) y algunos costosos como el PCR. Estudios recientes han reportado el uso de *biosensores* como via de detección y reconocimiento biológico de bajo costo, alta especificidad y tiempo reducido. La propiedad del ADN de poseer una carga eléctrica negativa debido a los grupos fosfato que lo conforman y de hibridar con sus cadenas complementarias, ha posibilitado la detección de específica de secuencias de ADN [2]. Pero con aplicaciones limitadas por el requerimiento de moléculas indicadoras de carácter tóxico [3], [4]. Asimismo se ha reportado el uso potencial de dispositivos de estado sólido como transductores para la hibridación de ADN sin etiquetas, como los Transistores de Efecto de Campo (FET), cuya respuesta de conducción de corriente es proporcional al potencial eléctrico que reciben en su terminal denominada compuerta. Los sensores que se basan en Transistores de efecto de campo sensibles a iones (ISFET, por sus siglas en inglés) fueron los primeros dispositivos de este tipo y fueron desarrollados por Piet Bergveld en 1970 [5]. Sin embargo, a pesar de los avances de las últimas décadas aún queda mucho por investigar sobre aspectos fundamentales y tecnológicos que mejorarían el funcionamiento de este tipo de sensores.

La técnica de compuerta extendida en Transistores de Efecto de Campo (EGFET, por sus siglas en inglés), resulta más eficiente y adecuada para diferentes propósitos de reconocimiento molecular a comparación del ISFET [6]. En un reporte reciente (2015), Purwidyantri et al. lograron detectar *staphylococcus epidermidis* mediante depósitos sobre electrodos de Au de secuencias de oligonucleótidos correspondientes al ADN de la bacteria relacionada con la infección, empleando la metodología del EGFET como medio de sensado [7]. Algunos artículos aplicados a la detección de moléculas mediante la técnica EGFET actualmente propuestos [8–14], abren paso a un gran número de aplicaciones de sensado molecular mediante ésta metodología de compuerta extendida sobre FET's.

1.2. Justificación

Actualmente, la implementación de biosensores ha beneficiado a muchas áreas de investigación de ámbito biológico y químico, reduciendo las limitaciones y deficiencias de los métodos comúnmente utilizados para el reconocimiento y detección, las principales ventajas de los biosensores son: su bajo costo, tiempo de respuesta reducido, alta sensibilidad, fiabilidad, detección en tiempo real, portabilidad, fácil manejo, automatizables, capacidad multifanálisis y alta selectividad. Estas características otorgan a los biosensores la oportunidad de ser utilizados en el campo biomédico, no obstante, su selectividad juega un papel muy importante para aplicaciones prácticas. Los estudios electroquímicos sobre el comportamiento y el reconocimiento de ADN en biosensores (genosensores) han favorecido la implementación de éstos en la detección de diferentes enfermedades, a través de la interpretación de la hibridación de secuencias génicas en muestras citológicas, de virus y de bacterias.

Sin embargo, en los genosensores, el evento de hibridación requiere de moléculas indicadoras de carácter tóxico como el indicador redox $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$, que limitan su aplicación. Los dispositivos EGFET como transductores de la hibridación de ADN sin etiquetas, suprimen esta limitante.

En este trabajo se propone entonces un tipo de genosensor basado en EGFET como método de detección de uno de los virus de relevancia a nivel mundial; Virus del Papiloma Humano (VPH).

Gracias a la selectividad del genosensor será posible la detección exclusiva de uno de los serotipos más agresivos del virus (VPH-16) presente en la mayoría las lesiones de cáncer cervicouterino. Esto dará pauta a un diagnóstico inmediato, permitiendo una pronta prescripción médica al paciente y ágil chequeo.

1.3. Hipótesis

El análisis electroquímico mediante voltamperometría de pulso diferencial de un sistema basado en un EGFET como medio de transducción acoplado a electrodos de oro impresos modificados con sondas sintéticas de ADN específicos para la detección del VPH-16, es adecuado para ser aplicado posteriormente en la creación de un genosensor potenciométrico portátil.

1.4. Objetivos generales

Verificar la viabilidad de los EGFET como transductores de la señal electroquímica generada como resultado del evento de hibridación de sondas de oligonucleótidos sintéticos correspondientes al VPH-16 y analizar los resultados por la técnica de voltamperometría de pulso diferencial para definir la detección electroquímica del virus.

1.5. Objetivos específicos

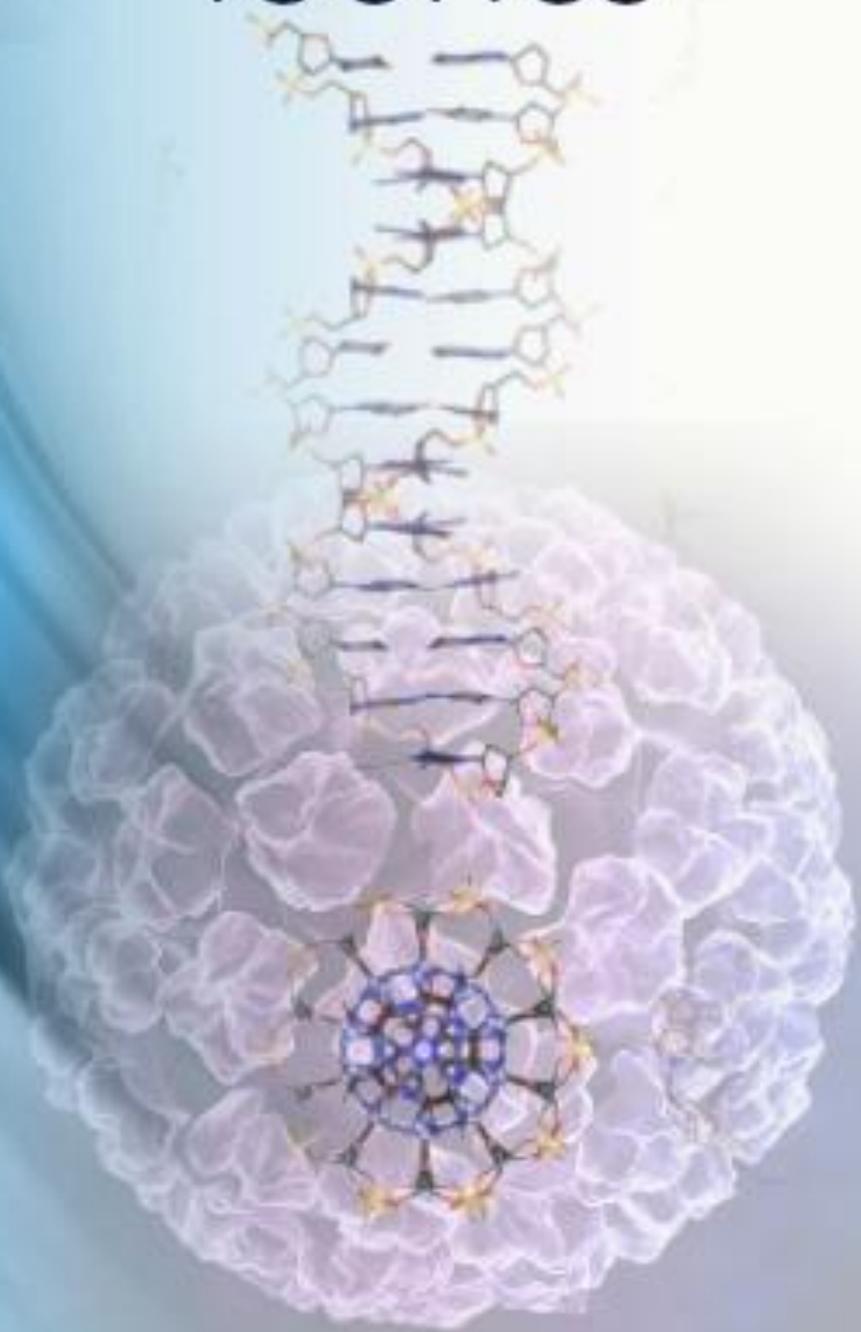
- Analizar el estado del arte de los Transistores de Efecto de Campo (FET) para conocer las diferentes estrategias que se han implementado a biosensores de ADN en función de las topologías desarrolladas en la literatura.

- Evaluar el comportamiento de operación de los transistores de efecto de campo de compuerta extendida EGFET con el empleo de depósitos biológicos de ADN como mecanismo de iniciación en la compuerta de dichos transistores.

- Proponer una topología electrónica adecuada para la transducción del evento de hibridación del VPH-16 en un genosensor.

Capítulo 2

Marco
Teórico



CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Virus del Papiloma Humano (VPH)

Actualmente vivimos en una época en donde la diversidad cultural y la falta de educación sexual han propiciado el incremento en la aparición de ETS (Enfermedades de Transmisión Sexual), dentro de las cuales, la infección por el VPH (Virus del Papiloma Humano) es de gran importancia por tres aspectos:

- Conlleva al desarrollo de consecuencias graves como cáncer, principalmente: cervicouterino, anal, vaginal e inclusive de piel, boca [15] y pene [16].
- Es la infección de ETS más frecuente a nivel mundial.
- Su incidencia va incrementado año con año.

El VPH ha sido identificado como agente causal que conduce al desarrollo de cáncer cervicouterino, siendo los dos tipos más frecuentes VPH 16 y VPH18 [17].

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una de las mayores causas de mortalidad a nivel mundial, cerca de 265,672 muertes por este cáncer ocurren al año, colocándolo en el segundo lugar de causa de muerte por cáncer en mujeres entre 15 y 44 años [18]; ocupa el tercer lugar en tasas de incidencia con aproximadamente 530,000 nuevos casos en 2008 y se estima que para el año 2020 habrá un aumento del 41% solamente en Latinoamérica [17], lo que representa un problema de salud pública de gran relevancia (datos descritos gráficamente en la Figura 2.1).

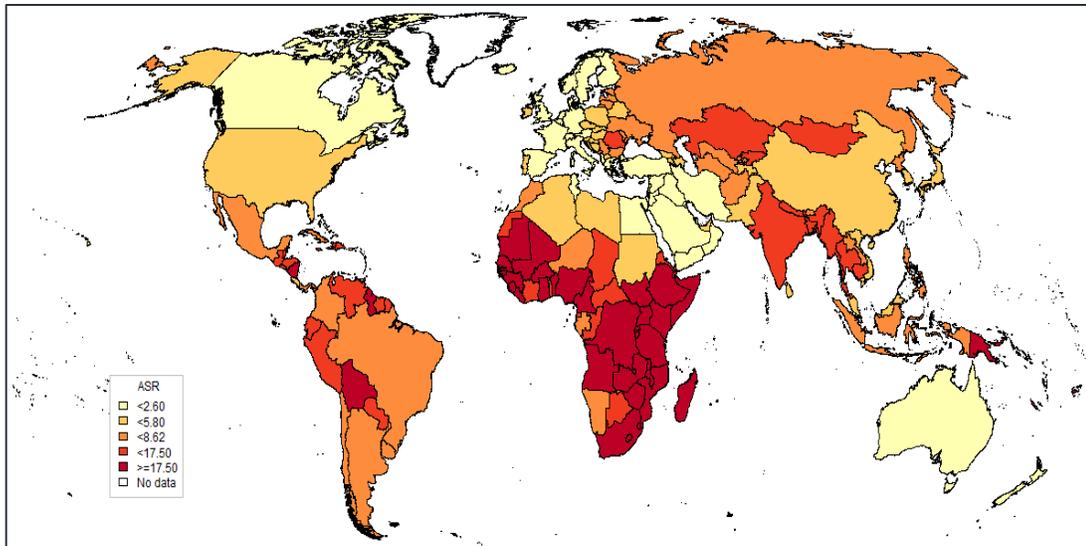


Figura 2.1 Tasas de mortalidad estandarizadas por edad de las pacientes con cáncer cervicouterino en el mundo. GLOBOCAN 2012 [19].

Entre los hechos históricos en investigaciones realizadas sobre el VPH se enlistan a continuación los de mayor relevancia [20]:

- 1949, Strauss identifica al virus como causante de lesiones genitales.
- 1960, Papanicolaou descubre la alteración de células epiteliales a causa del VPH.
- 1983, Durst identificó ADN (ácido desoxirribonucleico) del VPH en cáncer del tipo cervical.
- 1977, Gissman, Pfister y Zur Hausen fueron los primeros en tipificar cuatro tipos de VPH diferentes.

Gracias a estas investigaciones, ha sido posible clasificar, ubicar y conocer la estructura molecular del VPH.

El VPH pertenece a la familia de virus Papillomaviridae, hasta el momento han sido identificados más de 100 tipos de los cuales aproximadamente 40 son los que causan enfermedades en el humano (Figura 2.2). El VPH se divide en dos grupos dependiendo del tipo de lesión que provoca:

- VPH de bajo riesgo (principalmente VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44 y 61), comúnmente presentes en las lesiones benignas (condilomas y verrugas genitales).
- VPH de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82), los cuales bajo una infección persistente pueden conducir al cáncer, entre los cuales destaca el serotipo 16 uno de los mayormente caracterizados como parte de los causantes de las lesiones cancerígenas.

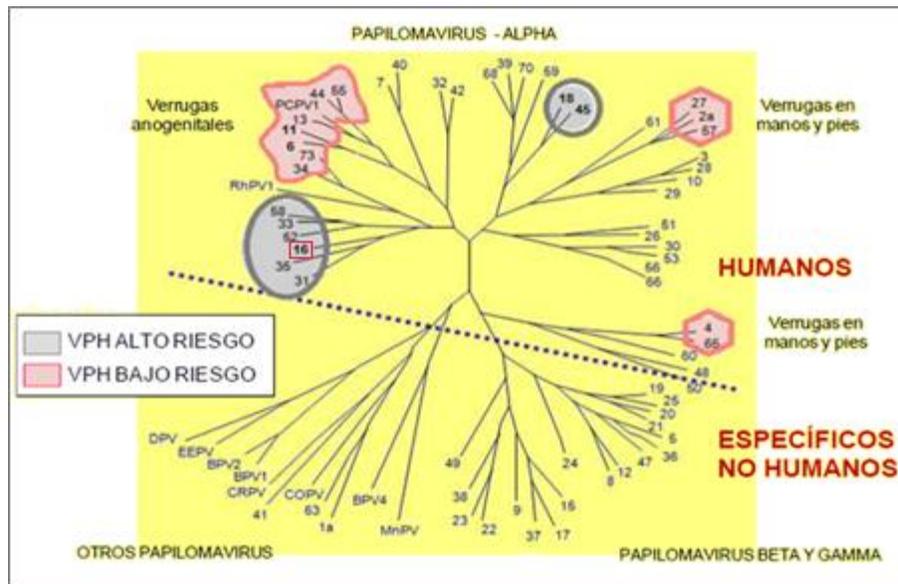


Figura 2.2 Filogenética del Virus del Papiloma Humano [18].

Los VPHs son virus que son un complejo denso de ADN empaquetado en una doble cadena, con aproximadamente 8000 pares de bases alrededor de manera circular.

Estos virus poseen entre 9 y 10 regiones codificantes, las de expresión temprana o E (“early”) que son 7 y los genes de expresión tardía o L (“late”) que son 2. Estos genes tienen un papel muy importante en la interacción con el tejido en donde se instalan, los genes de expresión temprana E6 y E7 que han sido identificados principalmente como responsables del desarrollo de cáncer cervicouterino porque inactivan a los genes supresores de tumores p53 y pRb. Una representación esquemática de la estructura molecular del VPH se puede observar en la Figura 2.3. A pesar de que se han identificado todos estos elementos en la estructura del virus, aún se siguen haciendo estudios para conocer por completo su manera de actuar y provocar las lesiones.

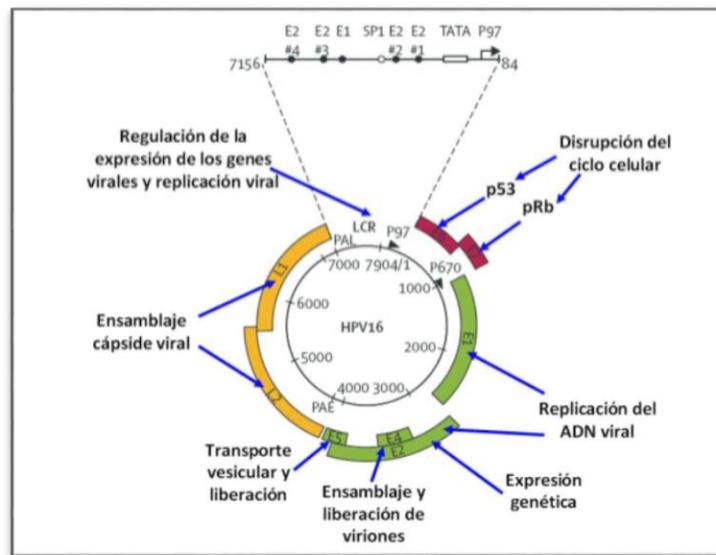


Figura 2.3 Esquema Genómico del Virus del Papiloma Humano [21]

Los VPH son virus que pueden permanecer inactivos durante años y bajo ciertas condiciones volver a activarse. Si persisten las infecciones se corre un mayor riesgo de evolucionar a cáncer cervicouterino.

Por ello, es necesario identificar la presencia de los serotipos virales en las pacientes con riesgo a desarrollar este cáncer. De esta manera, se puede tener un mejor control y pronóstico de cada caso. Por ejemplo, al identificar el ADN viral es posible realizar pronósticos de grupos específicos de población, enfocar medidas preventivas y acciones de detección temprana que evitarán la progresión de la infección a lesiones malignas.

No ha sido fácil establecer un medio totalmente específico para que se logre aislar el virus y detectarlo automáticamente. Los métodos de detección que se utilizan actualmente para el VPH son muy variados, e indirectos, que abarcan desde métodos clínicos, citológicos, histopatológicos y pruebas moleculares. Dentro de éstos, el más utilizado es la citología vaginal, conocida como prueba de Papanicolaou. Esta prueba consiste en el análisis citológico de un raspado de la pared cervical para determinar el grado de lesión. Asimismo, la colposcopia, determina la presencia de cambios en el cérvix observados a través de un instrumento óptico en tiempo real por medio de marcadores como ácido acético y lugol, para luego llevar a cabo una biopsia del tejido observado e identificar microscópicamente dichos cambios.

A pesar de que estas pruebas pueden realizarse directamente en los tejidos afectados la sensibilidad y especificidad es muy baja y requieren ser realizadas en varias ocasiones, lo que provoca que la progresión de las lesiones se incremente y en la mayoría de los casos el serotipo de virus presente se desconoce pues no es posible identificarlo por estas técnicas. Es por ello que la detección de los genes de VPH principalmente los VPH-ar (Virus del Papiloma Humano de alto riesgo) es una prioridad para aplicar estrategias farmacológicas tempranas que eviten la progresión al desarrollo de cáncer [22].

Las pruebas moleculares aportan una sensibilidad analítica mejor que las pruebas indirectas en los tejidos y debe ser imprescindible que sean incluidas en el seguimiento de las y los pacientes que presenten infección por VPH [20].

Dentro de las pruebas moleculares que se han establecido se encuentran: la detección de ADN de VPH-ar a través de la captura de híbridos, PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa), hibridación reversa, pirosecuenciación, cuantificación de la expresión del ARNm de E6/E7 de los VPH de alto riesgo (esta prueba principalmente para evaluar la progresión). La desventaja de estas pruebas es que la mayoría son de difícil acceso, altos costos y muy poca disponibilidad lo que deriva a la necesidad de nuevas técnicas de detección.

2.1. Biosensores

Estudios recientes han reportado el uso de biosensores como vía de detección basado en reconocimiento biológico, debido a sus características (miniaturización, tiempo de detección, portátiles y de bajo costo), y a que aportan una sensibilidad y especificidad muy altas, permitiendo que la detección sea confiable, rápida y con una gran accesibilidad [23].

Un biosensor es un dispositivo analítico compacto que transforma información biológica en una señal eléctrica cuantificable a través de un transductor, con la finalidad de analizar información biológica para un diagnóstico sencillo y de manera rápida [23, 24].

El primer biosensor fue realizado en 1956 por el profesor Leland C. Clark. Este biosensor consistía en un electrodo de oxígeno empleado para medir el contenido de este elemento en la sangre. Posteriormente, Guilbault y Montalvo en 1969 detallaron el primer electrodo enzimático potenciométrico basado en la inmovilización de la enzima ureasa sobre un electrodo selectivo de amonio.

En 1975, estas ideas se plasmaron en la construcción del primer biosensor comercial susceptible a medir glucosa mediante la detección amperométrica de peróxido de hidrógeno [24].

El término biosensor comenzó a utilizarse a partir de 1977 cuando se desarrolló el primer dispositivo utilizando microorganismos inmovilizados vivos en una superficie de amonio, sus creadores lo denominaron “sensor bio-selectivo” acortado “biosensor”. Este término ha permanecido desde entonces para designar la unión entre un material biológico y un transductor físico. Los biosensores constan de dos componentes:

Un sistema de reconocimiento (bio-receptor) de elementos biológicos que otorgan la selectividad del biosensor, y un transductor, que define la sensibilidad del dispositivo.

Las etapas del funcionamiento de un biosensor se ilustran en la Figura 2.4, las cuales se describen a continuación:

1. Interacción específica del analito con el material biológico inmovilizado.
2. Reconocimiento selectivo por parte del receptor para que la información biológica presente en la muestra sea convertida de tal forma que pueda ser reconocida por el transductor.
3. Detección por parte del transductor.

4. Transformación de la información de una señal primaria a una señal secundaria para que sea procesable fácilmente, medible y generalmente de tipo eléctrica u óptica.
5. Procesamiento electrónico de la señal obtenida y emisión de resultados a través de una pantalla o display [23].

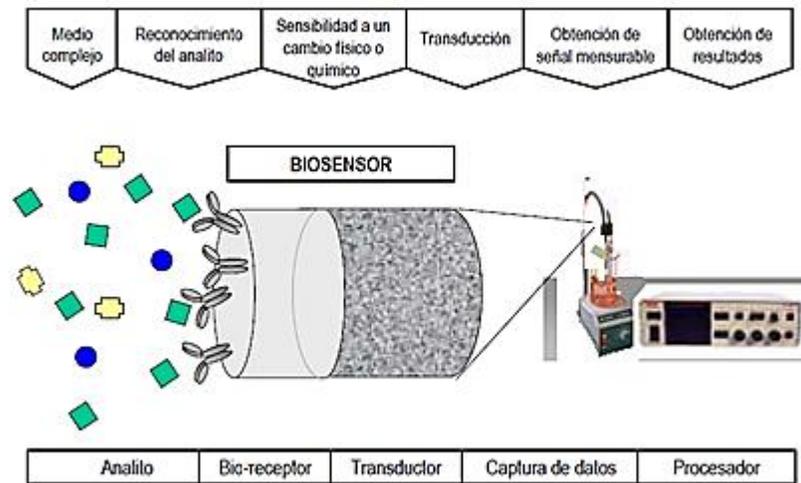


Figura 2.4 Principio de funcionamiento de un biosensor [23].

La clasificación de los biosensores se puede realizar atendiendo a diferentes criterios, como son el tipo de bio-receptor, la metodología empleada para inmovilizar este receptor y el tipo de transductor utilizado.

En la Figura 2.5 se representa la clasificación de los biosensores de acuerdo a estos criterios:

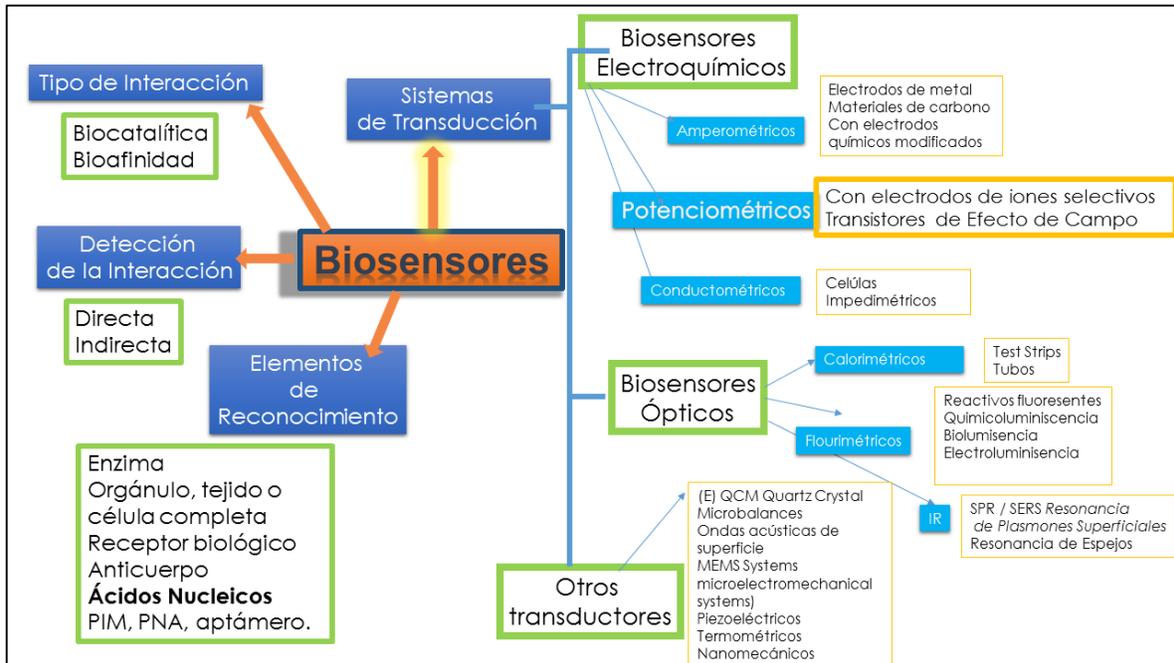


Figura 2.5 Clasificación de los Biosensores [23].

En cuanto a los elementos biológicos de reconocimiento (bio-receptores) podemos dividirlos en dos:

1) **Biocatalíticos:** Comprenden enzimas aisladas, microorganismos, células completas o tejidos, que al llevar a cabo reacciones de catálisis con el analito generan un producto detectable y medible, dando origen a los denominados biosensores catalíticos.

2) **Bioligandos:** tales como anticuerpos que junto con, ácidos nucleicos, péptidos y lectinas, los cuales se caracterizan por tener una reacción de afinidad con el analito, conformando los biosensores de afinidad. Los anticuerpos son, junto al ADN, los agentes biológicos más selectivos que existen.

El segundo componente de los biosensores: su transductor, es el elemento que transforma la señal que se produce por la interacción entre el sistema de reconocimiento y el analito a detectar en una señal eléctrica.

En base a su transductor, los biosensores electroquímicos se clasifican en cuatro tipos: los conductimétricos, potenciométricos, amperométricos e impedimétricos en función al tipo de detección que presentan; por cambios en la conductividad, en el potencial, en una corriente generada o en la impedancia. En la Tabla 2.1 podemos observar sus características:

Tabla 2.1 Tabla comparativa de transductores electroquímicos empleados en los biosensores [25].

Tipos de Transductores Electroquímicos			
Transductor Electroquímico	Tipo de medida	Ventajas	Desventajas
Conductimétrico	Variación de conductividad del medio		
Potenciométrico	Diferencia de potencial eléctrico	Simplicidad de operación, pequeño tamaño	Menor sensibilidad que amperométricos. Unión inespecífica a otros iones presentes en la muestra. Para muestras con gran cantidad de analito
Amperométrico	Corriente generada por la reducción u oxidación de especies electro activas	Pequeños y robustos Sensibles y rápidos Económicos Fácil para ensayos de campo	Pueden tener baja selectividad
Impedimétrico	Variación de conductancia, aumento de resistencia de transferencia de carga en cada evento biológico		Requiere Implementación de frecuencias de excitación circuitos adicionales mayor costo, robustos

Estudios recientes, reportan que los sensores basados en transductores electroquímicos fueron los que más publicaciones científicas generaron en las últimas dos décadas (Figura 2.6). Hecho que estaba claramente ligado a que estos dispositivos son más resistentes, su fabricación es más simple y económica que la del resto de los transductores, y además, poseen un amplio intervalo de linealidad y tiempos de respuesta muy cortos. Así mismo, los equipos necesarios para analizar y procesar la señal, tales como potenciostatos y conductímetros, cuentan con características favorables para el uso común en la mayoría de laboratorios de análisis.

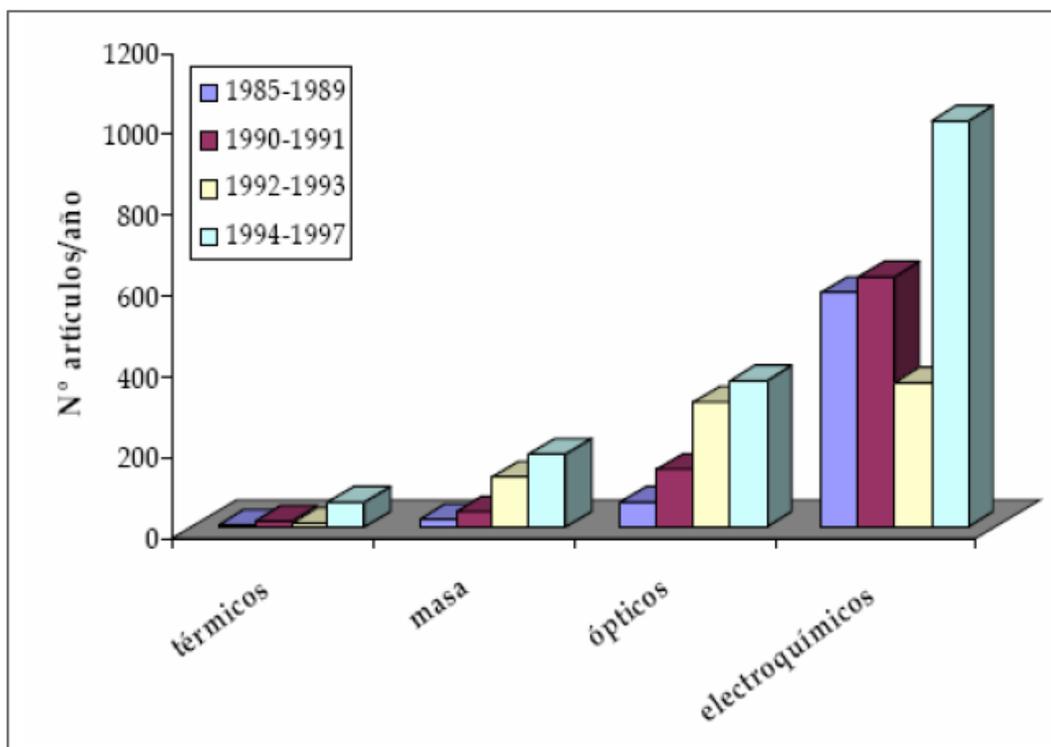


Figura 2.6 Número de publicaciones en sensores químicos durante las dos décadas pasadas [26].

Dentro de los electroquímicos, hacemos énfasis en los transductores potenciométricos en este trabajo. Los transductores potenciométricos consisten en la medición de la diferencia de potencial en condiciones de circuito abierto entre un electrodo de trabajo y uno de referencia. La diferencia de potencial medida entre los electrodos se relaciona con la concentración del analito de acuerdo con la ecuación de Nernst.

La mayor aplicación de este tipo de sensores es la fabricación de *electrodos selectivos de iones* (ISE's), donde se modifica el electrodo de trabajo con una membrana selectiva a un ion determinado. Los transistores de efecto de campo sensibles a iones (ISFET's) siguen este principio.

2.2. Genosensores

El concepto de biosensores de ADN es sostenido por la necesidad de herramientas de análisis rápido y altamente sensible para la detección genética. Su aplicación se basa en tres etapas: (i) la inmovilización del oligonucleótido de cadena sencilla (sonda) en una superficie del transductor; (ii) la hibridación con su secuencia de ADN complementaria (objetivo) con el fin de formar el dúplex de ADN llamado híbrido, y (iii) la conversión del evento de hibridación en una señal analítica por la superficie del transductor. Una amplia variedad de sistemas de medición han sido empleados [1]. Sin embargo, desde que Palecek descubrió la actividad electroquímica de los ácidos nucleicos [2], los estudios electroquímicos sobre el comportamiento y el reconocimiento de ADN han atraído una atención considerable. De esta manera, la electroquímica actualmente ha proporcionado sistemas de detección de bajo costo, rápida, simple y precisa llamados *genosensores* para el diagnóstico del paciente [3–5].

En base al elemento biológico, sus características y ventajas tenemos a los *biosensores de ADN (Genosensores)*, que son dispositivos capaces de dar una señal analítica a partir de una hibridación, es decir, combinan un agente de reconocimiento biológico (en este caso una simple hebra ADN llamada sonda de ADN).

La principal ventaja de los genosensores respecto a las técnicas clásicas de análisis de ADN se debe a la proximidad entre el material biológico y el transductor, hecho que permite detectar cambios de manera más sensible con el elemento de reconocimiento biológico. De esta manera se pueden realizar medidas con poco material genético. Los genosensores se caracterizan por su rapidez en la obtención de resultados y por la simplificación del procedimiento de análisis reduciendo el número de etapas respecto a las metodologías clásicas. Las características deseables en un genosensor son las siguientes [23]:

- Precisión y sensibilidad
- Elevada especificidad; insensibilidad frente a interferencias de la matriz de la muestra
- Amplio intervalo dinámico de trabajo
- Tiempo de respuesta breve y rapidez en las medidas
- Independencia de la temperatura
- Capacidad de autocontrol y exactitud
- Ecológico
- Largo tiempo de uso o, en su defecto, dispositivo de un solo uso
- Bajo costo de producción
- No destructivo
- Detección directa de la hibridación, de manera que no requiera adición secuencial de reactivos, ni preparación de la muestra.

- Posibilidad de uso en análisis en tiempo real y/o prolongado, permitiendo monitorización y diagnóstico clínico así como el control de procesos biofarmacéuticos.
- Reversibilidad de la reacción de hibridación o reutilización del dispositivo
- Físicamente compacto (en especial los biosensores electroquímicos), con posibilidad de miniaturización, de manera que sea viable:
 - diseñar un dispositivo compacto y portátil para medidas de campo
 - diagnóstico *in vivo*
 - medida de múltiples analitos en volúmenes pequeños de muestra

Las ventajas de la utilización de genosensores están principalmente relacionadas con la especificidad que el ADN confiere al análisis:

- A diferencia de los anticuerpos y las enzimas, las sondas de ADN se pueden obtener mediante síntesis química. Una sonda de ADN es un reactivo económico debido a que no requiere procedimientos de purificación complejos.
- Debido a la posibilidad de amplificación sintética (por PCR) de este tipo de material, se pueden obtener 1 millón de copias (marcadas o no) a partir de una sola secuencia original, en pocas horas. Esto disminuye aún más los costes de los reactivos, incluyendo el de las sondas marcadas.
- Se puede realizar la síntesis controlada de oligonucleótidos de hasta 50 bases sobre superficies de variada naturaleza.

- Los procedimientos de funcionalización y marcaje de moléculas de ADN son sencillos. El material genético modificado es económico respecto a otros reactivos biológicos, pudiéndose obtener por síntesis o mediante PCR. Esto facilita la inmovilización covalente de ADN a soportes.
- Al tener una naturaleza química diferente a las proteínas y otras moléculas de la sangre, su purificación respecto a componentes habituales de una muestra es relativamente sencilla. Esto implica menor posibilidad de interferencia en los ensayos.
- Es un material (a diferencia de las proteínas) muy resistente a los solventes orgánicos y a cambios de la fuerza iónica y de la temperatura. La conservación del ADN no constituye un problema. Se pueden esperar mayores tiempos de vida de un genosensor, respecto a un sensor enzimático o a un inmunosensor. Por este motivo estos últimos no han tenido la aceptación comercial que se esperaba durante su desarrollo.
- Los ensayos con ADN y, por lo tanto, los genosensores son de una elevada sensibilidad.
- El ADN, más aún si es sintético, presenta homogeneidad respecto a su estructura química y a sus propiedades, de manera que se pueden estandarizar procedimientos como la inmovilización, cuantificación, funcionalización y marcaje.

- La regeneración puede ser muy sencilla debido a que la reacción de hibridación, al estar basada en interacciones por puentes de hidrógeno, es reversible con la temperatura. Este hecho, sumado a la estabilidad térmica del ADN, hace que se pueda regenerar una superficie para posteriores análisis con sólo aumentar la temperatura a 95 °C.

- La mayoría de los problemas analíticos relacionados con el ADN no requieren una cuantificación exacta, sino más bien determinar si una secuencia génica está presente o no en una muestra.

El diagnóstico del ADN se ha orientado en sus comienzos hacia el diagnóstico clínico, médico y forense. La detección de secuencias génicas de humanos, virus y bacterias se ha convertido fundamental en el diagnóstico de enfermedades hereditarias, de cáncer, de infecciones virales y bacterianas, así como en la investigación forense (Tabla 2.2). Sin embargo, sus aplicaciones se han ido ampliando a áreas cada vez más diversas y fuera del ámbito hospitalario [23].

Tabla 2.2 Ejemplos de aplicaciones de diagnóstico de ADN en el ámbito clínico y forense [23].

Fuente de ADN	Aplicación
<p>Humano</p>	<p> Paternidad/Determinaciones Forenses Complejo HLA ADN mitocondrial Polimorfismos de longitud (RFLP) Oncogenes/genes de supresión c-myc, c-myb, c-abl, c-sis, c- ras, proteína G, jun, p53, genes retinoblastoma Desórdenes hereditarios Fibrosis quística Hipercolesterolemia Anemia a células falciformes Enfermedad de Huntington Distrofia muscular de Duchenne β-Talasemias Fenilcetonuria Enfermedad poliquística renal Hemocromatosis </p>

	Hemofilia A/Enfermedad de Von Willebrand
Viral	Citomegalovirus Papilomavirus humanos Virus de inmunodeficiencia humana Virus de la leucemia a células T Hepatitis B
Bacteriano	Mycobacterium tuberculosis Neisseria gonorrhoeae Clamidas Baccilus subtilis (ARN) Escherichia coli (ARN) Mycoplasma pneumoniae (ARN)

2.3. Características del ADN y su relación en la creación de biosensores

Los Ácidos Nucleicos son las biomoléculas portadoras de la información genética de acuerdo a su composición química, se clasifican en Ácido Desoxirribonucleico (ADN) que se encuentran residiendo en el núcleo celular y algunos organelos, y en Ácido Ribonucleico (ARN) contenido en el citoplasma.

Los ácidos nucleicos están formados por largas cadenas de nucleótidos, enlazados entre sí, siendo los nucleótidos las estructuras fundamentales.

Estos se componen de 3 elementos: una base nitrogenada, un azúcar y el ácido fosfórico. Una representación esquemática del ADN es presentada en la Figura 2.7.

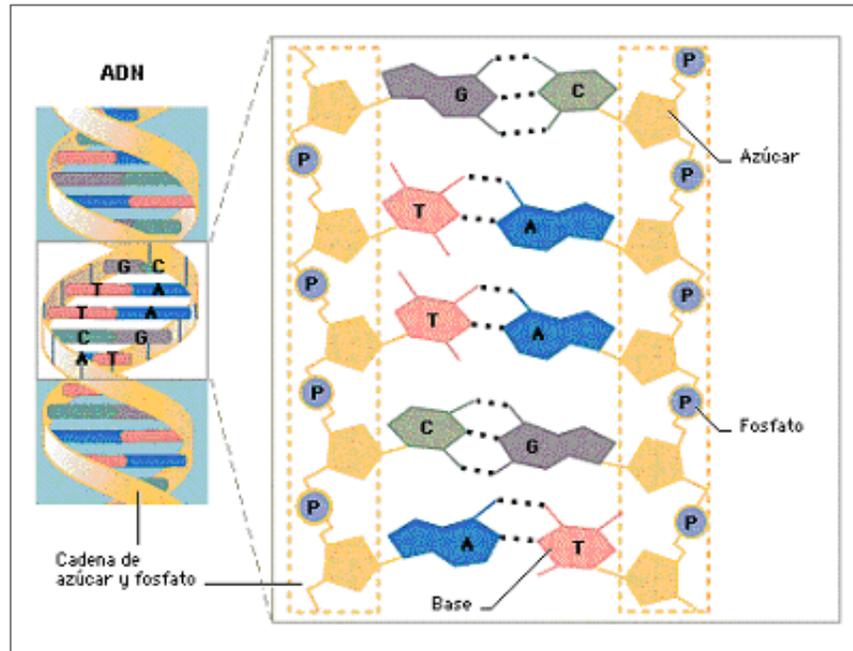


Figura 2.7 Representación de la estructura del Ácido Desoxirribonucleico ADN.

Las bases nitrogenadas son las que contienen la información genética. En el caso del ADN las bases son dos purinas y dos pirimidinas. Las purinas son A (Adenina) y G (Guanina). Las pirimidinas son T (Timina) y C (Citosina).

La alta especificidad de los pares de bases (adenina/timina y citosina/guanina) distribuidas a lo largo de la doble hélice que forma la cadena de ADN, hace este material de gran interés en la fabricación de biosensores.

Dentro de las características que conforman la estructura del ADN resaltamos el tipo de enlace entre sus bases (puentes de hidrógeno) que se pueden observar en la Figura 2.8, los cuales conforman gran parte de la electroactividad como una de sus propiedades de mayor intensidad. Esta propiedad fue descubierta hace ya 40 años [23]. Como especies electroactivas que son, los ácidos nucleicos producen picos por voltamperometría. Además, los ácidos nucleicos poseen extraordinaria habilidad para asociarse (condensación bidimensional) e interactuar con numerosas moléculas. Así, la cadena doble de ADN (ADN_{cd}) puede utilizarse como elemento de reconocimiento de analitos electroactivos que interactúan con ADN_{cd} en biosensores de afinidad.

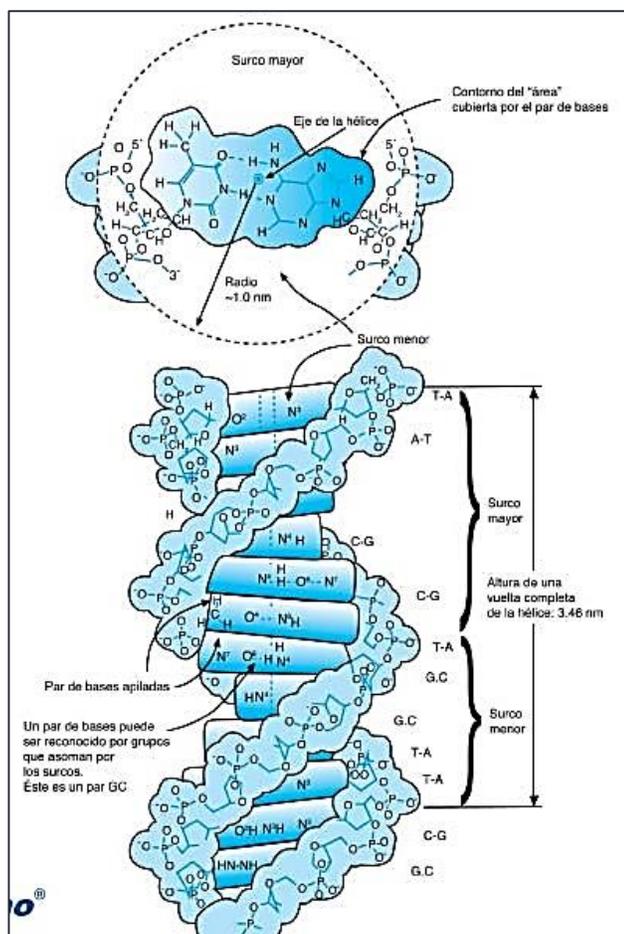


Figura 2.8 Características de una cadena de ADN.

Las ADN_{cd} pueden inmovilizarse mediante la aplicación de un potencial controlado o mediante simple adsorción física.

Las cadenas cortas de ADN u oligonucleótidos deben estar inmovilizadas sobre superficies de diferentes sustratos en forma de electrodos, chips o cristales según el tipo de transductor utilizado para que luego la hibridación de esta molécula inmovilizada con su par pueda ser detectada por el transductor de un biosensor.

La inmovilización de estas cadenas es el proceso más importante en la fabricación de un biosensor, ya que parámetros tan importantes como el tiempo de vida o la sensibilidad del biosensor, dependen en gran medida de la metodología de inmovilización utilizada. En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes grupos; retención física y unión química (Figura 2.9).

Es importante mencionar que existen algunos inconvenientes en el proceso de inmovilización del ADN que influyen significativamente en la fabricación de los biosensores, por ejemplo:

- Alteración de la conformación del material biológico respecto de su estado inicial.
- En el caso de la utilización de enzimas, pérdidas de su actividad catalítica.

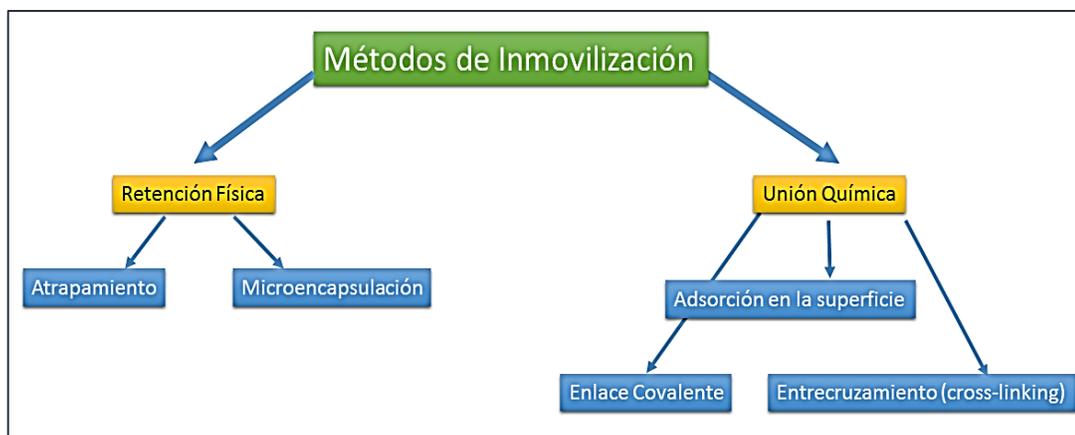
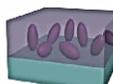
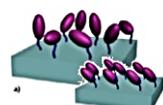


Figura 2.9 Clasificación de los métodos de inmovilización [27].

Las principales ventajas y desventajas de estas técnicas se encuentran reportadas en la Tabla 2.3:

Tabla 2.3 Ventajas e inconvenientes de las técnicas de inmovilización más comunes en la fabricación de biosensores [25].

Técnica de inmovilización	Descripción	Matriz	Ventajas	Inconvenientes
Adsorción Física 	Unión del ER a la matriz mediante interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals.	Celulosa Gel de sílice Colágeno Hidroxiapatita Acetato	Sencilla Bajo costo Matriz regenerable Sin modificaciones en ER	Unión débil: pérdida de ER por condiciones externas. Control estricto del proceso.
Atrapamiento 	Retención física del ER en las cavidades interiores de la matriz.	Geles: agar, nylon, almidón, poliacrilamida. Matrices electrónicas compositas rígidas: grafito-teflón o grafito-resina epoxi.	Sencilla Bajo costo Se necesita poca cantidad de ER Sin modificaciones en ER. Proximidad entre ER y el transductor.	Unión débil Control estricto de la polimerización de la matriz No regenerable
Entrecruzamiento (Cross-linking) 	Uniones irreversibles de los ER entre sí mediante reactivos funcionales	Reactivos: Glutaraldehído Hexametileno-diisocianato, 2,4- dinitro-benceno.	Costo moderado. Estable en condiciones extremas. Mínima pérdida de ER.	Tratamiento con sustancias químicas tóxicas. No regenerable.
Enlaces Covalentes 	Uniones covalentes del ER con grupos químicos activados de la matriz o directamente del transductor.		Manipulación sencilla. Estable en condiciones extremas.	Alteración del ER (centro activo en enzimas) Inadecuado para ERs muy sensible (pH, temperatura) No regenerable Tratamiento con sustancias tóxicas. Costo elevado.

ER* Elemento de Reconocimiento

Independientemente del fragmento de ADN inmovilizado, este puede ser evidenciado por medio de otra secuencia marcada, la complementaria, para llevar a cabo la hibridación, luego de la reacción de reconocimiento específico entre ambas, poder dar pie a la obtención de resultados.

La hibridación de ADN es un proceso por el cual se combinan dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas y con secuencias de bases complementarias en una única molécula de doble cadena, que toma la estructura de doble hélice, donde las bases nitrogenadas quedan ocultas en el interior (Figura 2.10). Definiéndose entonces como la unión complementaria de ácidos nucleicos ADN o ARN.

Los nucleótidos se unirán con sus complementarios bajo condiciones normales: A=T; A=U; C≡G; G≡C; T=A o U=A. Así que dos cadenas perfectamente complementarias se unirán la una a la otra rápidamente. Por el contrario, debido a las diferentes geometrías de los nucleótidos, una simple variación de las parejas anteriores lleva a inconsistencias entre las cadenas y dificultará la unión.

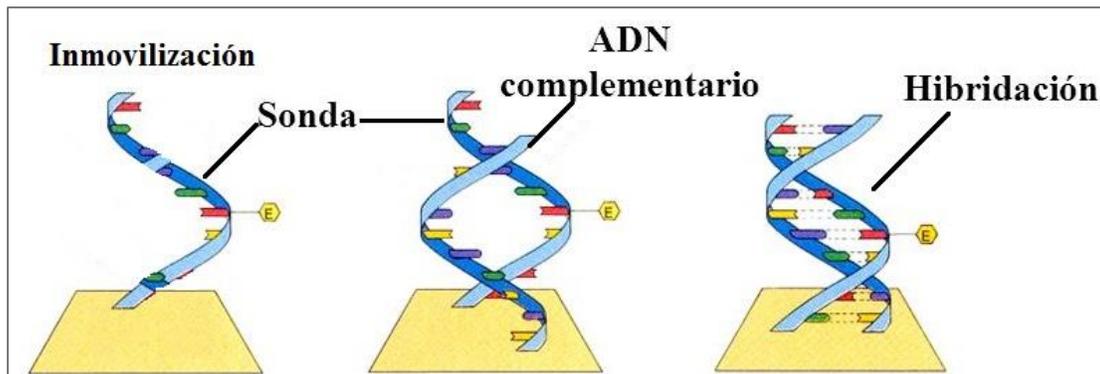


Figura 2.10 Proceso de Hibridación.

En general, los tipos de hibridación pueden dividirse en métodos libres de etiquetado y los métodos con etiquetado por el uso de indicadores redox, sondas y formación de complejos (tipo sándwich) son los mayormente utilizados [28]. En donde la EIE (Espectroscopía de Impedancia Electroquímica) es una técnica empleada para la evaluación de este proceso.

2.4. Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas miden la corriente o el voltaje generado por la actividad de especies iónicas específicas. Esto sucede cuando se introduce una señal eléctrica al sistema, se obtiene información del mismo analizando la respuesta eléctrica que genera a dicha señal mediante equipo especialmente diseñado para su análisis (potenciostato).

Gracias a las diversas técnicas disponibles, es posible caracterizar diversos sistemas como sistemas biológicos, materiales electrocatalíticos, etc. Todos aquellos que involucren la transferencia de electrones. En este trabajo se emplearon las técnicas de voltamperometría lineal, cíclica. De pulso diferencial y la espectroscopía de impedancia electroquímica, las cuales se describen a continuación en base a la bibliografía [29–32].

2.4.1. Voltamperometría

La voltamperometría es un método mediante el cual se puede obtener información sobre un determinado analito, midiendo las intensidades de corriente generadas en función de la diferencia de potencial aplicado, en ciertas condiciones, que favorecen la polarización en el electrodo de trabajo. Muchas veces, los electrodos utilizados en voltamperometría son microelectrodos, de modo de aumentar la polarización gracias a su pequeña superficie.

La técnica de voltamperometría es muy utilizada en el área de química inorgánica, bioquímica e incluso física, no tanto para analizar o investigar una determinada muestra, sino más bien para estudiar procesos de oxidación y reducción, procesos de adsorción en un electrodo, o en un electrolito con especies redox sobre la superficie de un electrodo, entre otros.

El proceso involucra la electrólisis de una o más especies electroactivas, el cual comprende: reacción de la especie electroactiva en el electrodo y mecanismo de transferencia de masa. Estos últimos pueden ser por migración (movimiento de especies por diferencia de carga), convección (movimiento de la materia por cambios físicos) y difusión (movimiento de las especies por gradiente de concentración). La voltamperometría se divide en: lineal, cíclica y diferencial.

2.4.2. Voltamperometría cíclica (VC)

En la voltamperometría cíclica, la variación de potencial en un electrodo estacionario colocado en una disolución no agitada está provocada por una señal de forma triangular, tal como se muestra en la Figura 2.11. El potencial se varía linealmente desde un potencial inicial E_0 hasta un potencial final E_f , cuando se ha alcanzado este valor el sentido de barrido se invierte y el potencial vuelve a su valor original E_0 . Este ciclo de excitación puede ser repetido cuantas veces se requiera la experiencia. Los potenciales a los que tiene lugar la inversión se llaman potenciales de cambio. El intervalo de potenciales de cambio elegido para un experimento dado, es aquel en el que tiene lugar la oxidación o reducción controlada por difusión de una o más especies. Dependiendo del tipo de estudio, la dirección del barrido inicial puede ser negativa o positiva.

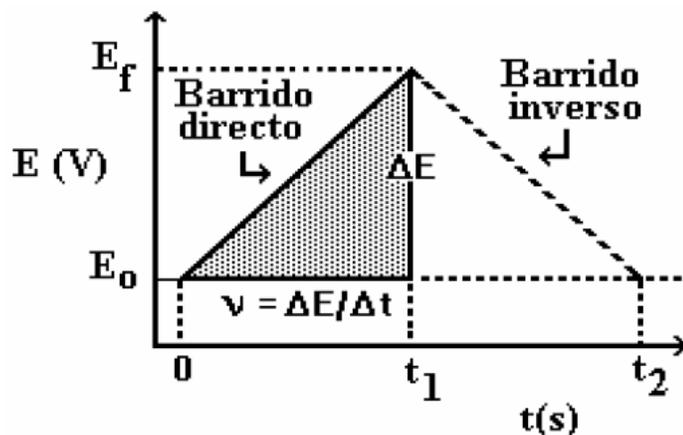


Figura 2.11 Señal de excitación en VC.

Cuando se utiliza la voltamperometría cíclica para estudiar un sistema por primera vez es usual comenzar con experimentos cualitativos con la finalidad de conocer al mismo, procediendo luego con los semi-cuantitativos y finalmente cuantitativos para poder así obtener los parámetros cinéticos de interés y los parámetros de difusión. En un estudio típico se acostumbra obtener voltamperogramas en un amplio rango de velocidades de barrido (v) e intervalos de potencial. Comúnmente, en los voltamperogramas hay una cierta cantidad de picos y por medio de la variación de las velocidades de barrido e intervalos de potencial podemos observar como estos aparecen y desaparecen, notando las diferencias que existen entre el primer y los barridos subsecuentes se determina cómo los procesos representados por los picos están relacionados, al mismo tiempo que de la dependencia de la velocidad de barrido y amplitud del pico explica el papel de la adsorción, difusión y reacciones químicas acopladas dentro del proceso en estudio.

2.4.3. Voltamperometría lineal (VL)

Es un método voltamperométrico en el que se mide la corriente en el electrodo de trabajo mientras se hace un barrido lineal en un solo sentido (ya sea anódico o catódico), del potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. La oxidación o la reducción del analito son registradas como un pico en la señal, en el potencial al cual la especie comienza a oxidarse o reducirse.

La función potencial aplicada al electrodo de trabajo es en forma de rampa Figura 2.12 a), existen estudios donde se emplean velocidades muy bajas hasta de 0.1 V/s), midiéndose la corriente resultante como una función del potencial aplicado Figura 2.12 b). El sistema es estático, siendo el transporte de masa resultado de un proceso difusional.

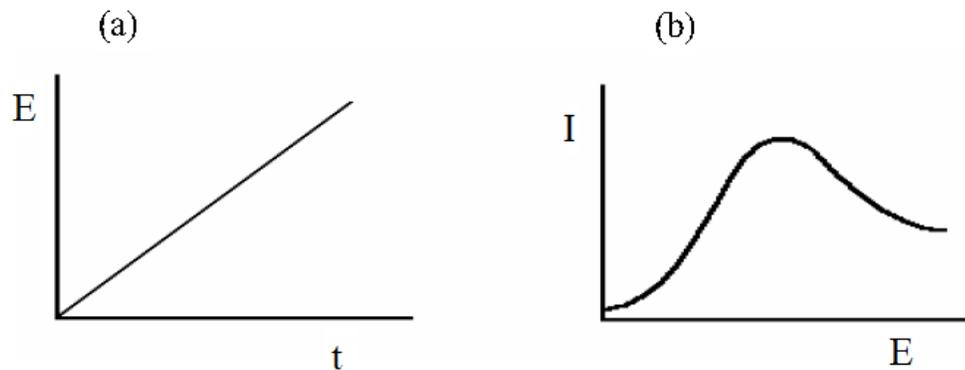


Figura 2.12 a) Función de Onda Aplicada. b) Respuesta a la perturbación.

2.4.4. Voltamperometría de pulso diferencial (VPD)

La VPD es una de las técnicas electro analíticas que alcanzó una gran popularidad a partir de 1970. En esta técnica, la forma de la onda en la señal de excitación consiste en una serie de pulsos de potencial a manera de escalera,

donde el potencial de base aumenta gradualmente en pequeños intervalos entre 10 y 100mV tradicionalmente conocido como ancho de pulso ΔE_s . La amplitud de pulso ΔE_p , se mantiene constante con respecto al potencial de base Figura 2.13 a).

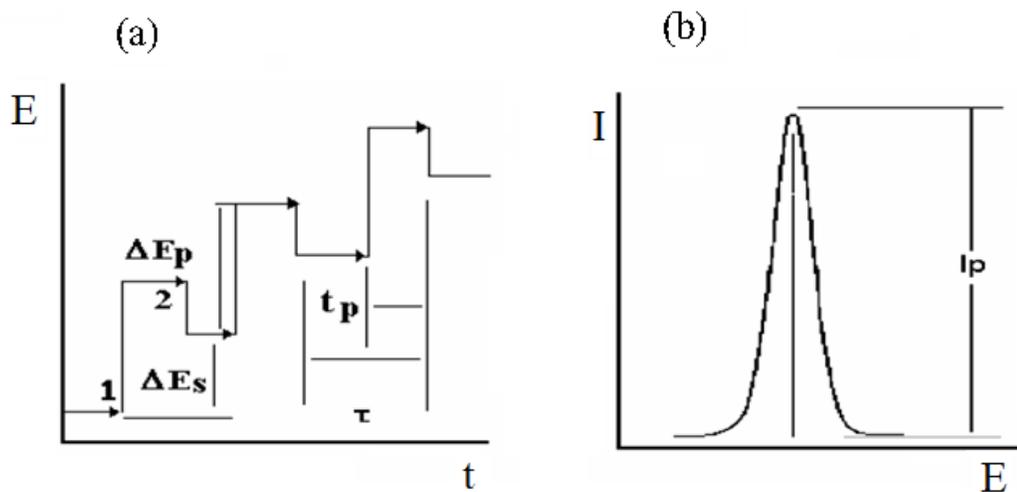


Figura 2.13 a) Señal de excitación aplicada en VPD, b) Respuesta en VPD.

La corriente resultante del proceso electroquímico se mide justo antes de la aplicación del pulso (1) y al final de la aplicación del mismo, de esta manera al graficar la diferencia de corrientes obtenidas I_1 y I_2 en función del potencial aplicado (usualmente el potencial en 1), se obtienen respuestas típicas como la mostrada en la Figura 2.13 b), donde la intensidad máxima de corriente (I_p) es proporcional a la concentración de especies reactantes, según Parry y Osteryoung:

$$I_p = \frac{nFACD^{\frac{1}{2}}(1-\theta)}{\pi^{\frac{1}{2}}(t'-t)^{\frac{1}{2}}(1+\theta)} \quad (2.1)$$

Donde n es el número de electrones transferidos, F es la constante de Faraday, A es el área del electrodo, C es la concentración de la especie electroactiva,

D es el coeficiente de difusión, t' es el primer tiempo de muestreo de corriente, t es el segundo tiempo de muestreo de corriente, θ es igual a $\exp -nF (\Delta E_p) / 2RT$, y el potencial de pico corresponde a $E_p = E_{1/2} - (\Delta E_p/2)$, donde $E_{1/2}$ corresponde al potencial de media onda de la onda en polarografía CD.

En la voltamperometría de pulso diferencia los valores de corriente solamente se miden al final del periodo, se pueden discriminar entre las corrientes de carga y las faradaicas y se elimina la mayor parte de la corriente C.D. de fondo.

2.4.5. Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE)

La EIE, se trata de una técnica particularmente sensible a pequeños cambios de resistencia de transferencia de carga en el sistema, que permite la caracterización de las propiedades conductivas de materiales y sistemas electroquímicos incluso en medios poco conductores. La técnica consiste en la aplicación de una perturbación senoidal de CA con frecuencia variable al material estudiado y el registro de la respuesta en corriente dentro de una celda electroquímica.

La impedancia se define como el cociente entre el potencial aplicado y la intensidad medida a la salida. En muchos materiales y sistemas electroquímicos la impedancia varía con la frecuencia del potencial aplicado en una forma que está relacionada con los fenómenos asociados a procesos de caídas ohmicas de dichos materiales. Esto se debe a la estructura física del material, a los procesos electroquímicos que tengan lugar, o a una combinación de ambos. Por consiguiente, si se hace una medida de impedancias en un rango de frecuencias adecuado y los resultados se representan en unos ejes acorde a los datos obtenidos es posible relacionar los resultados con las propiedades físicas y químicas de los materiales y sistemas electroquímicos.

A partir de las mediciones de desfase y de amplitud de la respuesta, es posible obtener la impedancia de transferencia electroquímica del material estudiado (Z^*).

La corriente resultante tiene la misma frecuencia que el potencial aplicado pero diferente magnitud y fase:

$$Z^* = \frac{E_0}{I_0} = \frac{E_0 \cdot \text{sen}(\omega.t)}{I_0 \cdot \text{sen}(\omega.t+\phi)} = Z_0 \cdot \frac{\text{sen}(\omega.t)}{\text{sen}(\omega.t+\phi)} \quad (2.2)$$

Donde E_0 es el potencial, I_0 es la intensidad, ω es la frecuencia y ϕ es el desfase. De este modo, la impedancia puede expresarse en función de una magnitud Z_0 y un desfase ϕ .

La admitancia, que es la inversa de la impedancia, es la función de transferencia del sistema cuando la perturbación senoidal se superpone al potencial aplicado en modo potencioestático, mientras que la impedancia representa la función de transferencia del sistema en modo galvanostático, es decir, cuando la perturbación senoidal se superpone a la intensidad aplicada.

Existen dos formas de representar gráficamente los resultados de impedancia obtenidos de un ensayo de EIE:

- Diagrama de Nyquist, donde se representa la parte imaginaria multiplicada por -1 ($-Z''$), frente a la parte real (Z'). Es el sistema de representación más utilizado y la información resistiva que se obtiene de él se basa en la forma que adoptan los espectros Figura 2.14.
- Diagramas de Bode, donde se representan el logaritmo del módulo de la impedancia ($\log |Z|$) y el desfase (ϕ) en función del logaritmo de la frecuencia ($\log \omega$).

- La información que se obtiene de este tipo de representación va encaminada sobre todo al comportamiento en función de la frecuencia Figura 2.15.

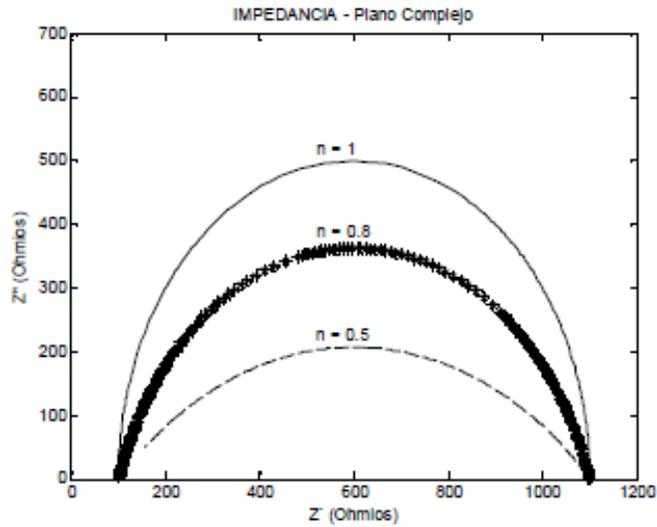


Figura 2.14 Diagrama representativo de Nyquist aplicado a un circuito RC.

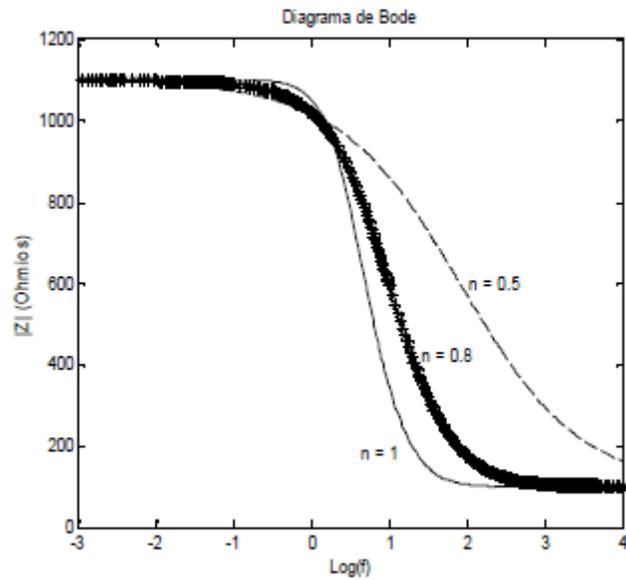


Figura 2.15 Diagrama representativo de Bode (Impedancia contra frecuencia aplicada a circuito RC)

2.5. TRANSISTORES

La verdadera revolución tecnológica de la electrónica surge con la invención de los dispositivos basados en semiconductores, y más en concreto, con la invención del transistor. Los primeros transistores fueron construidos en 1950 en Bell Laboratories, por sus investigadores Bardeen, Brattain y Shockley, quienes recibieron el premio Nobel de física por sus investigaciones y un año después, ya se fabricaban comercialmente por las empresas RCA, Westinghouse, General Electric y Western Electric. En esta época, los transistores desplazaron a las clásicas y antiguas válvulas de vacío, reduciendo al máximo las pérdidas de calor de los equipos en casi todas las aplicaciones [33]. Con el transistor vino la miniaturización de los componentes y se llegó al descubrimiento de los circuitos integrados, en los que se colocan, en pocos milímetros cuadrados, miles de transistores. Estos dispositivos constituyen el origen de los microprocesadores y , por lo tanto, de los ordenadores actuales.

El transistor es un dispositivo semiconductor conformado por acomodados de capas polarizadas muy cercanas entre sí, básicamente tiene dos funciones: deja pasar o corta señales eléctricas a partir de una pequeña señal de mando o funcionar como un elemento amplificador de señales [34].

Cabe recalcar que los transistores se consideran dispositivos activos pues requieren ser polarizados por otros elementos electrónicos para su funcionamiento y así establecer las corrientes y tensiones que van a circular por el dispositivo [33].

Existen dos tipos de transistores; Bipolares, distinguidos por el transistor BJT, transistor bipolar de unión (por sus siglas en inglés, Bipolar Junction Transistor), que amplifica la corriente de su base por un factor B o h_{FE} según la convención empleada y esta multiplicación se realizará en la corriente del colector I_C . Por otro lado, los unipolares, representados por el FET, transistor de efecto de campo (por sus siglas en inglés. Field Effect Transistor). La denominación bipolar se debe a que la conducción tiene lugar gracias al desplazamiento de portadores de dos polaridades (huecos positivos y electrones negativos), participan en el proceso de inyección hacia el material polarizado de forma opuesta. Si sólo se utiliza un portador (electrón o hueco), entonces se considera un dispositivo unipolar [35].

Para identificar los tipos de transistores se puede visualizar el esquema de la Figura 2.16:

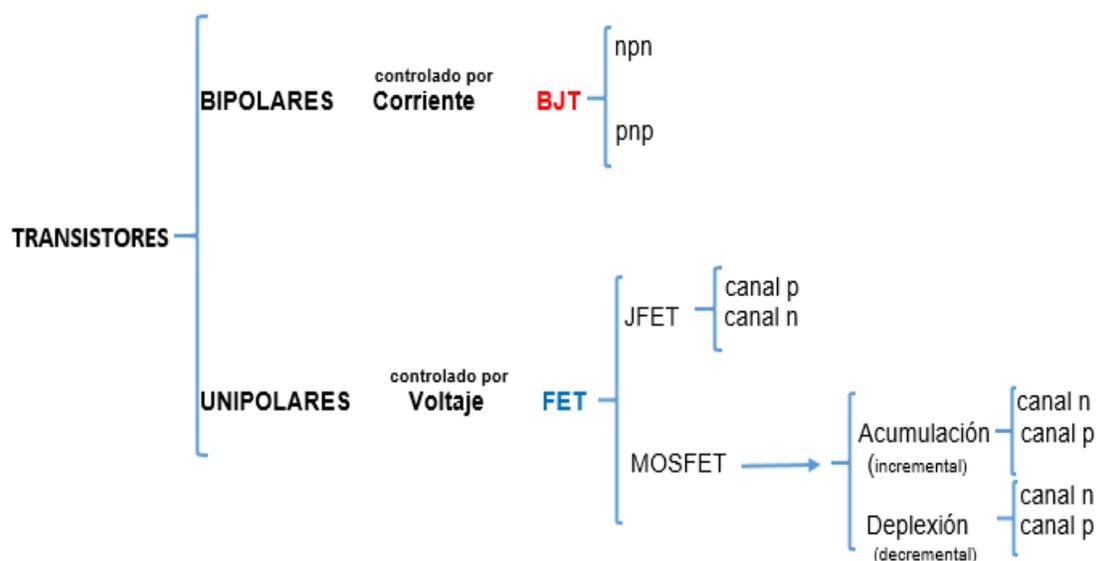


Figura 2.16. Esquema básico de los tipos de transistores y sus derivaciones.

De todos los tipos de transistores, en el presente trabajo se hace uso de los transistores MOSFET por las ventajas que promueve su utilización y pocas desventajas que lo limitan con respecto a los transistores bipolares [33]:

Ventajas sobre los transistores bipolares:

- Consumo en modo estático muy bajo.
- Tamaño muy inferior al transistor bipolar (actualmente del orden de media micra).
- Gran capacidad de integración debido a su reducido tamaño.
- Funcionamiento por tensión, son controlados por voltaje por lo que tienen una impedancia de entrada muy alta. La intensidad que circula por la compuerta es del orden de los nanoamperios.
- Un circuito realizado con MOSFET no necesita resistencias, con el ahorro de superficie que conlleva.
- La velocidad de conmutación es muy alta, siendo del orden de los nanosegundos.
- Cada vez se encuentran más en aplicaciones en los convertidores de alta frecuencias y baja potencia. Siendo un buen dispositivo para aplicaciones en Biosensores.

Desventajas:

- Los FET presentan una respuesta en frecuencia pobre debido a la alta capacidad de entrada. Por ello, típicamente, las ganancias de tensión en corriente alterna que presentan los amplificadores con BJT son mucho mayores que las correspondientes a los FET.
- Los FET presentan una linealidad muy pobre, y en general son menos lineales que los BJT.
- Los FET se pueden dañar debido a la electricidad estática.

2.5.1. TRANSISTORES DE EFECTO DE CAMPO METAL OXIDO SEMICONDUCTOR (MOSFET)

Los transistores MOSFET, son dispositivos de efecto de campo que utilizan un campo eléctrico para crear una canal de conducción[33]. Son dispositivos muy importantes ya que la mayor parte de los circuitos integrados digitales se construyen con la tecnología MOSFET, su impedancia de entrada es muy elevada.

Existen dos tipos de transistores MOSFET:

- MOSFET de canal n
- MOSFET de canal p

A su vez, estos transistores pueden ser de acumulación (enriquecimiento) o de depleción; en la actualidad los segundos están prácticamente en desuso y su característica es que se comporta totalmente inverso al de enriquecimiento, lo que quiere decir que al incrementar un voltaje de V_{GS} no se produce un flujo de corriente I_D , sino que lo disminuye, yendo del máximo flujo al nulo.

Los símbolos más habituales utilizados para la representación en circuitos de los MOSFET de acumulación son los que aparecen representados a continuación en la Figura 2.17 y Figura 2.18:

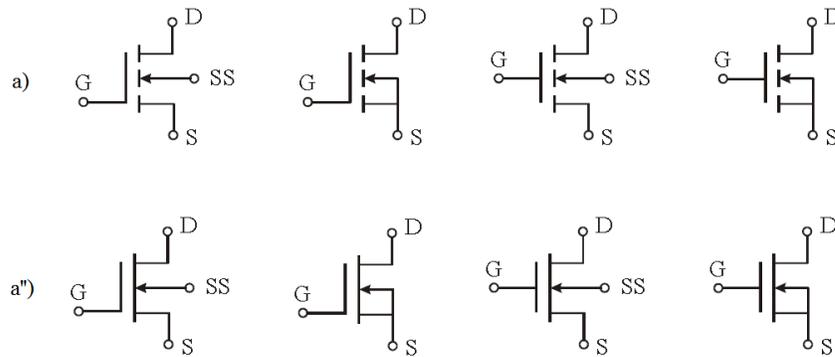


Figura 2.17 Símbolos del MOSFET canal n. a) de enriquecimiento, a'') de depleción.

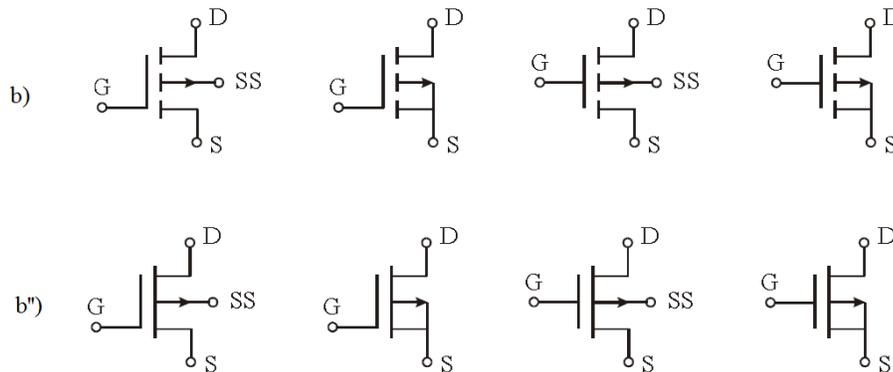


Figura 2.18 Símbolos del MOSFET canal p. b) de enriquecimiento, b'') de depleción.

En la Figura 2.19 se describe la estructura física de un MOSFET de canal N con sus cuatro terminales: compuerta (G), drenador (D), fuente (S) y sustrato (Bulk) (normalmente conectado a la fuente internamente). La compuerta, cuya dimensión es $W \cdot L$, está separada del sustrato por un dieléctrico (SiO_2) formando una estructura similar a las placas de un condensador. Al aplicar una tensión positiva en la compuerta se induce cargas negativas en la superficie del sustrato y se crea un camino de conducción entre los terminales drenador y fuente [33].

La tensión mínima para crear esa capa de inversión se denomina tensión umbral o tensión de threshold (V_{Th}) y es un parámetro característico del transistor MOSFET, que tiene el mismo significado que la tensión V_{GSoff} vista para el transistor JFET, ya que en ambos casos se trata del valor mínimo de tensión para el que existe un canal que permite la circulación de corriente. Si $V_{GS} < V_{Th}$, la corriente de drenador-fuente I_{DS} es nula; los valores típicos de esta tensión son de 0.5 V a 3 V [33], [35].

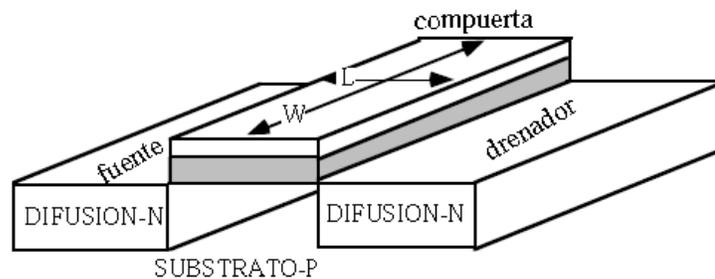


Figura 2.19 Estructura física de un transistor MOSFET canal n.

Los transistores MOSFET de enriquecimiento de canal n, se polarizan aplicando una tensión positiva entre drenador y fuente (V_{DS}) y una tensión positiva entre puerta y fuente (V_{GS}). De esta forma, la corriente circulará en el sentido de drenador a fuente. En el caso del MOSFET de acumulación de canal p la tensión V_{DS} a aplicar debe ser negativa y la tensión V_{GS} negativa, de esta forma la corriente fluirá en el sentido de la fuente hacia el drenador, dichas configuraciones se muestran en la Figura 2.20:

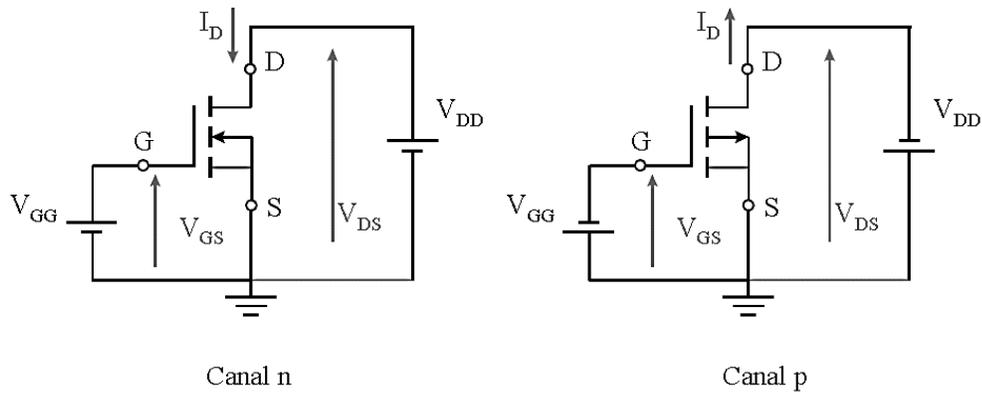


Figura 2.20 Polarización del MOSFET (de enriquecimiento).

Cuando $V_{GS} > 0$ (MOSFET de enriquecimiento de canal n), aparece un campo eléctrico que lleva a los electrones hacia la zona de la compuerta y aleja de dicha zona a los huecos, no pudiéndose establecer una corriente por estar la puerta aislada. Para valores pequeños de esta tensión V_{GS} aplicada se creará una zona de carga de espacio (sin portadores). Sin embargo, si seguimos aumentando el valor de esta tensión, la acumulación de electrones se hará lo suficientemente importante como para decir que tenemos una zona n, es decir, se formará un canal de tipo n que unirá los terminales de drenador y fuente como se aprecia en la Figura 2.21 a), de esta forma, cuanto mayor sea la tensión V_{GS} aplicada mayor será la anchura del canal formado, es decir, de nuevo tenemos un efecto de modulación de anchura del canal con la tensión V_{GS} . En Figura 2.21 b) al estar los terminales de fuente, sustrato y drenador a la misma tensión (por ser $V_{DS} = 0$) las tensiones V_{GS} y V_{GD} serán iguales, y por lo tanto el canal simétrico respecto de la puerta.

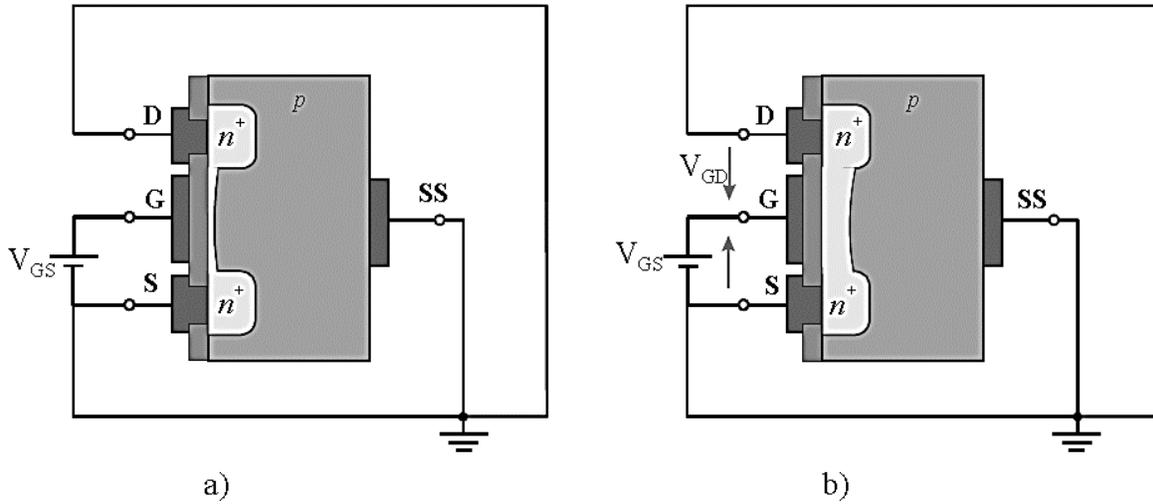


Figura 2.21 Efecto del voltaje V_{GS} en los MOSFET.

Por tanto, vemos que con la tensión V_{GS} podemos modular la anchura del canal, pero no basta con que esta tensión sea positiva, sino que deberá superar un determinado nivel de tensión (V_{Th}).

Tomando en cuenta el efecto de V_{GS} y analizando el dispositivo una vez que se ha formado el canal, si aplicamos una tensión positiva en V_{DS} , circulará una corriente I_D a través del canal en el sentido del drenador hacia la fuente. Para valores de tensión V_{DS} pequeños, el estrechamiento del canal no será importante, por lo que la relación entre la tensión aplicada y la corriente que circula será lineal tal y como establece la Ley de Ohm. A medida que el valor de V_{DS} aumente, el estrechamiento comenzará a ser importante, variando la resistencia que presenta el canal y perdiendo la linealidad de la característica. Hasta que la tensión V_{DS} alcance el valor de V_{DSsat} , momento en el cual el canal se habrá cerrado por completo.

A partir de este instante, si seguimos aumentando la tensión V_{DS} , por encima de este valor V_{DSsat} , la corriente I_D se mantiene constante toda esta analogía se puede observar en la Figura 2.22.

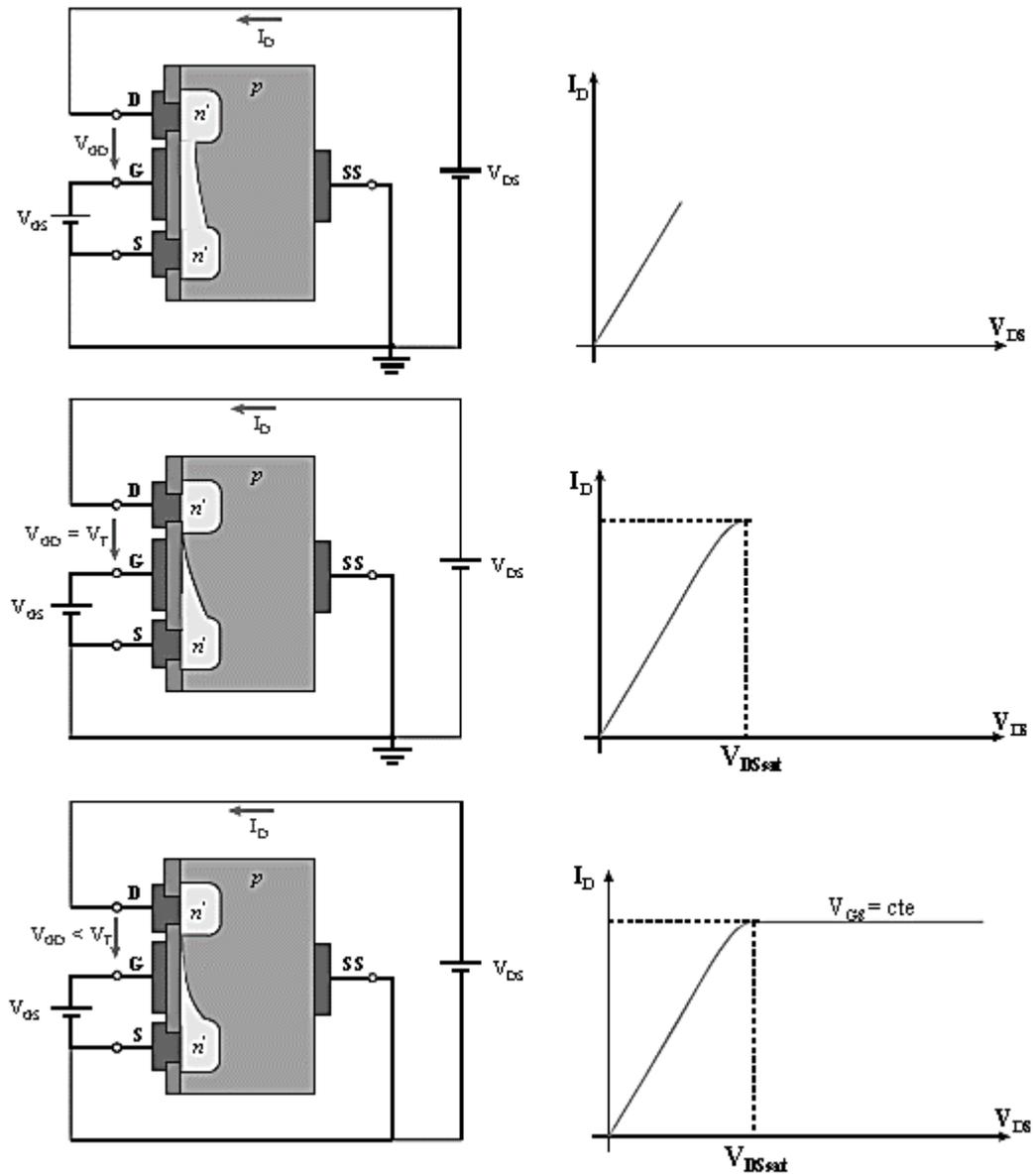


Figura 2.22 Característica $I_D - V_{DS}$ para una valor de V_{GS} constante.

En la Figura 2.23, se representan las curvas características de un transistor MOSFET de acumulación.

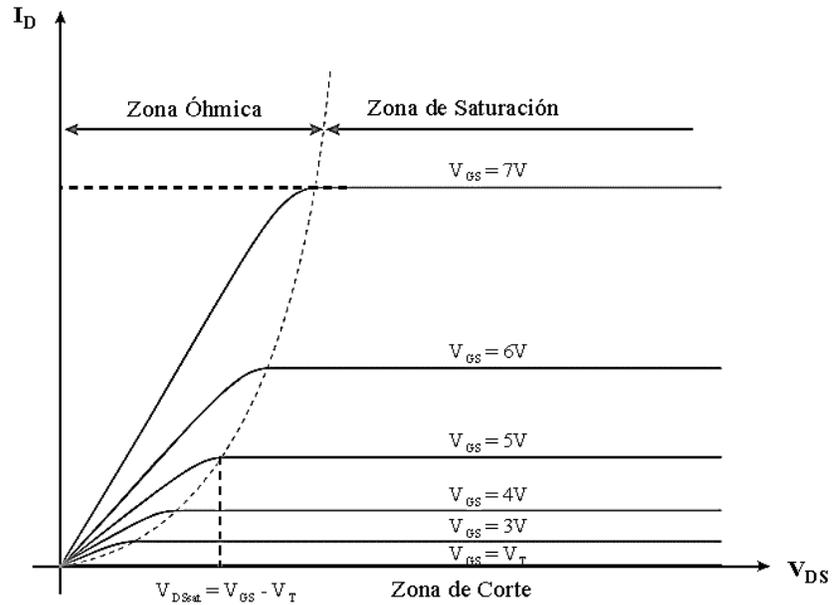


Figura 2.23 Curvas características ideales de un MOSFET de acumulación canal n.

De manera que el transistor cuenta con las siguientes zonas de trabajo:

- Zona de corte o de no conducción.

Corresponde con el eje horizontal de la gráfica. En esta zona la corriente $I_D = 0$ con independencia del valor V_{DS} . Esto se da para valores de $V_{GS} \leq V_T$, donde el canal no está completamente formado.

- Zona óhmica o de no saturación.

El transistor se comporta como un elemento resistivo no lineal controlado por tensión. Verifica las siguientes ecuaciones:

$$I_D = k \frac{W}{L} \left[(V_{GS} - V_{Th}) V_{DS} - \frac{V_{DS}^2}{2} \right] \quad (2.7)$$

$$0 < V_{DS} < V_{GS} - V_{Th} \text{ y } V_{GS} > V_{Th} \quad (2.8)$$

$$k \frac{W}{L} \quad (2.9)$$

Siendo k un parámetro característico del MOSFET que depende de la tecnología a través de la constante k y del tamaño de la compuerta del transistor (W la anchura y L la longitud).

- Zona de saturación o de corriente constante.

El transistor se comporta como una fuente de corriente controlada por la tensión V_{GS} , esta zona se da para valores $V_{DS} > V_{DSsat}$. Ahora la corriente I_D permanece invariante frente a los cambios de V_{DS} y sólo depende de la tensión V_{GS} aplicada. En esta zona el transistor se comporta como una fuente de corriente controlada por la tensión de puerta V_{GS} .

La relación entre la tensión V_{GS} aplicada y la corriente I_D que circula por el canal en esta zona viene dada por la siguiente ecuación:

$$I_D = K (V_{GS} - V_{Th})^2 \quad (2.10)$$

- Zona de ruptura.

Un transistor MOSFET puede romper por dos motivos; porque se perfora el dieléctrico cuando la tensión V_{GS} supera un determinado valor que vendrá determinado por el aislante, o bien porque en la unión pn del lado del drenador (polarizada en inversa) se supera el valor de la tensión de ruptura de dicha unión, dado que esta unión está polarizada con una tensión inversa de valor V_{DS} la ruptura se producirá cuando $V_{DS} \geq V_r$ (Voltaje de ruptura) con independencia del valor de V_{GS} , por tanto en la zona de ruptura todas las distintas curvas en función de V_{GS} se juntan en una única.

Por último, en la Tabla 2.4 se indican las diferencias en el signo y sentido de las corrientes y tensiones existentes entre transistores MOSFET de canal n y canal p (de enriquecimiento).

Tabla 2.4 Convenio de signos en las tensiones y corrientes de un MOSFET tipo n y p.

MOSFET canal n	MOSFET canal p
$V_{GS} > 0$	$V_{GS} < 0$
$V_{DS} > 0$	$V_{DS} < 0$
$I_D > 0$	$I_D < 0$
$V_{Th} > 0$	$V_{Th} < 0$

2.6. Implementación de Genosensores basados en FET

2.6.1. Transistor de efecto de campo ion sensitivo (ISFET)

En los últimos años se ha visto un gran progreso en la aplicación de los biosensores como vía de detección biológica y para la determinación de especies químicas de alta sensibilidad [36]. Entre ellos, la aplicación de los ISFET, transistor de efecto de campo sensible a iones (por sus siglas en inglés Ion Sensitive Field Effect Transistor), otorga uno de los enfoques más interesantes en la tecnología de biosensores eléctricos [37].

Los primeros dispositivos de este tipo, fueron desarrollados por Piet Bergveld en 1970, combinaban las propiedades químicamente sensibles de las membranas de vidrio con las características de conversión de impedancias de los MOSFET's [5], [38]. Este dispositivo de estado sólido capaz de medir la actividad iónica de medios ambientes biológicos y electroquímicos tal como el registro del nivel de pH de alguna solución. Fue denominado por Bergveld como ISFET. La introducción del principio ISFET por Bergveld estimuló el auge de las actividades de investigación y desarrollo en este campo [39]. En una visión retrospectiva, Bergveld resume lo que sucedió en los últimos 30 años, llegando a la conclusión que en este período la investigación y desarrollo ISFET hicieron un progreso continuo [40].

Bergveld demostró que al eliminar la compuerta metálica de un MOSFET ordinario y exponiendo el dieléctrico a un electrolito dado, las características electroquímicas del ISFET son afectadas por la actividad iónica del electrolito, generándose un potencial interfacial electrolito-dieléctrico dependiente de pH: $\psi_0 = f(\text{pH})$ [41].

Las características operacionales básicas a cumplir para estos dispositivos son 2 principalmente:

- Que el dieléctrico superficial presente en la región de compuerta del ISFET tenga la mayor sensibilidad posible con el fin de detectar rápida y confiablemente, valores mínimos del pH de las soluciones a analizar.
- Que el material dieléctrico seleccionado desarrolle la mínima cantidad posible de deriva e histéresis durante las mediciones, lo cual es importante si se desea utilizar ISFET's para mediciones de pH a largo plazo. Esta última condición los hace viables en el campo biomédico.

Un ISFET se puede considerar como una variante del transistor MOSFET, su principio de operación es similar (la generación de un canal de conducción entre fuente y drenaje para una polarización de compuerta aplicada), pero a diferencia de un transistor MOSFET, el ISFET no posee el electrodo metálico de compuerta, en lugar del metal, se deposita una membrana inorgánica sensible a los iones, como por ejemplo el nitruro de silicio (Si_3N_4) es sensible a los iones H^+ de tal manera que el dispositivo será sensible al pH.

La membrana inorgánica atrapa pues los iones H^+ y las cargas que se acumulan en ella forman un campo eléctrico que modula la corriente del canal [42]. Las estructuras del MOSFET y del ISFET se pueden observar en la Figura 2.24.

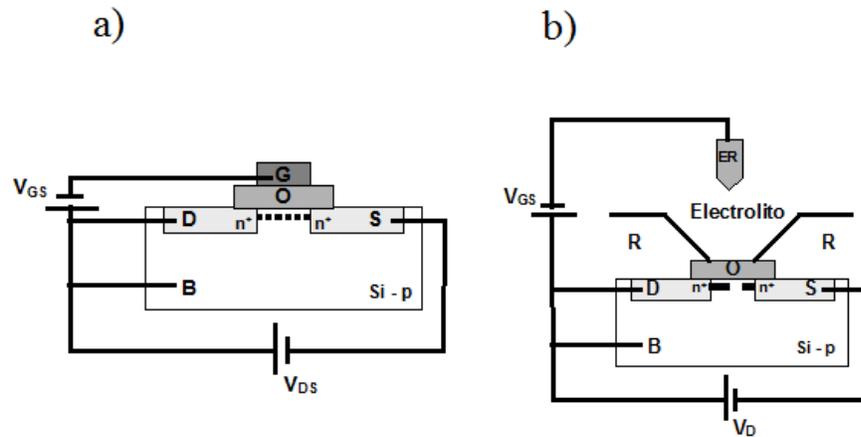


Figura 2.24 a) Estructura de un MOSFET: G-gate, O-óxido de compuerta, D-drenador, S-fuente, B-sustrato. b) Estructura de un ISFET: ER-electrodo de referencia, O-óxido de compuerta, R-resina epóxica, D-drenador, S-fuente, B-sustrato.

Un ISFET desde el punto de vista eléctrico es básicamente un transistor MOSFET (incluso un ISFET puede visualizarse como canal n o p) pero con modificaciones físicas directamente en la compuerta, por lo cual es lógico esperar un comportamiento parecido entre los dos dispositivos. En la Figura 2.25 podemos identificar los circuitos básicos para la polarización del MOSFET (a) y del ISFET (b).

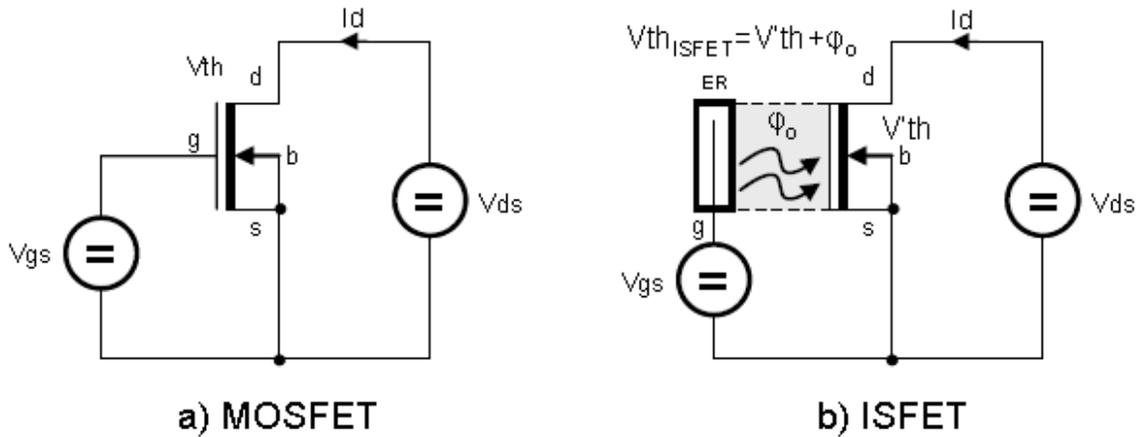


Figura 2.25 Circuitos básicos de un MOSFET (a) y un ISFET (b).

La polarización en los ISFET se hace a través de un electrodo de referencia. Donde la distribución de campo eléctrico que originan los potenciales de polarización son de diferente naturaleza que la función del trabajo del metal (Φ_M), teniendo en cuenta esta modificación, el voltaje de banda plana V_{FB} (que físicamente describe la condición en la cual no hay distribución de carga en la compuerta), estará dado por,

$$V_{FB} = V_{ref} - \psi_0 - \chi_{sol} - \frac{\Phi_s}{q} - \frac{Q_i + Q_D}{C_{ox}} \quad (2.11)$$

donde V_{ref} es el potencial generado en la interfase entre el electrodo de referencia y el electrolito, ψ_0 es el potencial generado en la interfase electrolito-óxido, χ_{sol} es el potencial originado por las moléculas polares del solvente en la superficie del dieléctrico, Φ_s es la función de trabajo del semiconductor, C_{ox} es la capacitancia de la capa de óxido cuyas dimensiones son W y L , y Q_i , Q_D son las cargas en las zonas de inversión y agotamiento.

Podemos pues decir que un ISFET es un transistor de efecto de campo cuyo voltaje umbral es dependiente de la concentración de iones de la solución que está en contacto con la compuerta.

El ISFET, fue denominado convencionalmente como un sensor de pH, para medir las concentraciones de iones (H^+ o OH^-) en una solución, causando un potencial de interfaz en el aislador de la compuerta [43]. La membrana inorgánica de nitruro de silicio (Si_3N_4) sensible a los iones H^+ , permite que el dispositivo sea capaz de sensar el pH.

Los modelos propuestos inicialmente para el sensado de pH consideraban que las distribuciones de carga y el potencial generado en la interfase óxido-electrolito eran consecuencias de procesos de difusión en analogía al comportamiento de los electrodos de vidrio [44]. Estudios posteriores comprobaron que la respuesta de los ISFET's era mucho más rápida que la esperada según los procesos de difusión a través de un aislante, y además el espesor de la capa de óxido no influía en el tiempo de respuesta. Asimismo, para ISFET's con puertas de materiales con coeficientes de difusión menores que el del óxido de silicio la sensibilidad al pH observada era mayor. Por ejemplo, el máximo teórico de la sensibilidad de un sensor de pH mediante ISFET es de 59 mV por unidad de pH, y la resolución es de 0,1 unidades de pH, estando restringida por el ruido rosa ($1/f$) en los FET [44]. Durante varias décadas, se ha prestado mucha atención a los biosensores basados en silicio en el campo de las aplicaciones bio-analítico debido a sus características favorables, que incluyen la sensibilidad, velocidad, la miniaturización, y bajo costo [45–47].

En la actualidad, los ISFETs se emplean como dispositivos capaces de detectar iones de diferentes elementos e inclusive arreglos atómicos y/o moleculares más complejos convirtiéndose así en un dispositivo sensitivo y selectivo a una especie en particular y esto aumentó su empleo en muchos

campos de interés siendo el más importante el de la biomedicina debido al reducido tamaño del elemento transductor [37]. Por ejemplo, recientemente se han producido avances en el campo de los biosensores ISFET, incluyendo el progreso de la inmovilización de enzimas [48], detección del ADN (ácido desoxirribonucleico) por hibridaciones de sus oligonucleótidos [49–51] , y detecciones basadas en el metabolismo celular y potencial extracelular [52], [53].

Sin embargo, a pesar de los avances de las últimas décadas aún queda mucho por investigar sobre aspectos fundamentales y tecnológicos que mejorarían el funcionamiento de este tipo de sensores, pues presentan algunos inconvenientes para aplicaciones in vivo, principalmente los siguientes:

- Los sensores ISFET son sensibles a la luz.
- No cuentan con la aplicación de todos los electrodos de referencia de estado sólido.
- Dificultades con la integridad del encapsulado fiable de estos sensores, lo que deriva en una alta dificultad en su fabricación.

El más importante de los problemas es el de la encapsulación, ya que resulta difícil separar los componentes metálicos del chip y el cableado del líquido cuyo pH se desea medir, lo que acarrea problemas de funcionamiento y seguridad, ésto ha obstaculizado la producción a gran escala y la aplicación industrial de sensores ISFET por más de tres décadas [54]. Actualmente, se están investigando nuevas formas de encapsular los transistores en un catéter para uso in vivo (encapsulados plainchip o flipchip), en busca de una mejor separación entre el líquido a medir y los componentes del dispositivo.

Para comprender la dificultad del problema del encapsulado, como se ha dicho más arriba, es la membrana de nitruro de silicio la que atrapa las cargas del ión H^+ y crea el campo eléctrico que modula el canal. Será pues necesario poner en contacto el fluido a medir con esta membrana, que es solo una pequeña parte de la superficie del dado de silicio (aprox 0.2 mm^2), sin que el resto del mismo esté en contacto con el fluido. Para los sensores de iones distintos del H^+ será además necesario cubrir esta superficie con una membrana de unos 0.3 mm de espesor selectiva al ión correspondiente. El proceso de aislar el dado de silicio del fluido, excepto la superficie electroactiva y cubrir ésta con la membrana selectiva es el proceso de encapsulado como se muestra en la Figura 2.26.

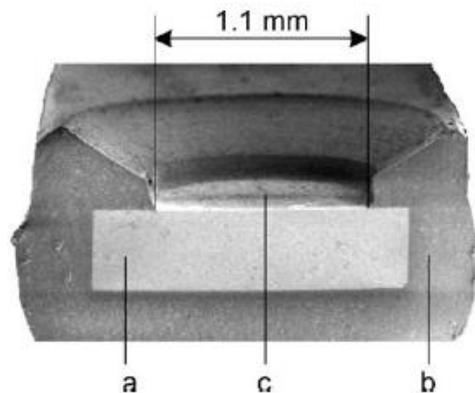


Figura 2.26 Micro-gráfico de un sensor ISFET a través de su cavidad de medición: (a) ISFET chip, (b) encapsulación, (c) cavidad de medición [55].

Debido a estas limitaciones y al requerimiento de infraestructura de tecnología de punta necesaria para su construcción (cuartos blancos) son muy pocas las compañías que fabrican sensores basados en ISFET [56]. Entre las compañías que se distinguen en el diseño y producción de tecnología ISFET se encuentran las siguientes: SENTRON que es una empresa bien establecida fundada en la década de los noventa, esta empresa vende

diferentes diseños de la aplicación y tienen también varios distribuidores principalmente en Europa y los Estados Unidos. MICROSENS SA, originalmente de CSEM, venden ISFET personalizados. Honeywell es la mayor empresa de venta de los ISFET, tienen varios distribuidores de su producto principal DuraFET, dirigido a aplicaciones alimentarias. Satlantic (Sea-Bird grupo científico) comercializa una aplicación especial para la vigilancia oceánica basada en ISFET. Horiba (JP) vende el diseño de ISFET para mediciones discretas (como termómetros digitales). Endress + Hauser (CH) es una gran empresa que vende todo tipo de aplicaciones para el control industrial y dentro de sus productos tienen algunas basadas ISFET. La información anterior se resume en la Tabla 2.5:

Tabla 2.5 Compañías y sus dispositivos ISFET-Ph en el mercado [56]

COMPAÑIA	PAÍS	PRODUCTO
Sentron	NL	ConeFET, LanceFET,CupFET, miniFET
Honeywell	US	DuraFET
Microsens	SH	MSFET
Mettler Toledo	US	InPro 3300
Horiba	JP	Flat ISFet pH electrode
Rosemont analytical	US	TUpHFET
Satlantic	CA	SeaFET
Endress + hauser	SH	Tophit CPS ₄₄₁ y CPS _{441D}

Existe una gran cantidad de patentes relacionadas con microsensores y los ISFET. Pero sólo algunos de ellos han sido autorizados para la producción industrial, las patentes relacionadas con los ISFET y mediciones con ellos eran numerosas en los años ochenta y noventa, pero la mayoría de ellas ya han caducado. Los más interesantes eran aquellos basados en el uso de un electrodo de referencia integrado y el uso de algún proceso de corrección de la deriva y el efecto de la temperatura, propiedades que aún están en estudio [57] .

El número de patentes desde los últimos 10 años (2003-2013) con el tema de consulta de búsqueda "ISFET" fue de 102. Las patentes relacionadas con membranas para la modificación de la selectividad del sensor, biosensores, ADN o ácidos nucleicos para aplicaciones biomédicas fueron 37 patentes.

Si tenemos en cuenta sólo entre ellos los que han tenido continuidad, obtenemos un total de 80 patentes. La Tabla 2.6 muestra estas patentes y su distribución a lo largo de 10 años, donde se puede observar que entre estos, la empresa Endress + Hauser y el Centro tecnológico MIMOS son los más destacados.

También algunas compañías bien conocidas como Life Technologies, Horiba, Rosemont analítica Mettler Toledo y tienen como mínimo una patente relacionada con los ISFET. La mayoría de estas patentes están relacionadas con el encapsulado del ISFET comercialmente, el circuito usado para la lectura de la señal, y algunos diseños especiales del ISFET tal como los transistores de efecto de campo de compuerta extendida (EGFET) y el dieléctrico utilizado[56].

Tabla 2.6 Distribución de las patentes ISFET por los solicitantes del 2003 al 2012. [56]

SOLICITANTES	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Total
ENDRESS + HAUSER	6		2					1	3		16
MIMOS BERHAD (MIMO-Non-standard)					3	2	1	4			10
UNIV NAT YUNLIN SCI & TECHNOLOGY (UYNA-Non-standard)		7									7
UNIV CHUNG YUA CHRISTIAN (UYCH-Non-standard)	1		1		1					2	3
JOHNSON F Q (JOHN - individual)											2
CHUNG W (CHUN- individual)	1		1								2
LIFE TECHNOLOGIES CORP (LIFE-Non-standard)									1	1	2
CHOU J (CHOU - individual)		2									2
HORIBA LTD (HORB)				1					1		2
DNA ELECTRONICS LTD (DNAE-Non-standard)					1			1			2
AU OPTRONICS LTD (DNAE-Non-standard)	1		1								2
RIETH HT (RIET - individual)							1				1
UNIV NAT SUN YAT SEN (USYS)					1						1
STMICROELECTRONICS SRL (SGSA)								1			1
IDEMITSU KOSAN CO LTD (IDEK)								1			1
X-FAM SEMICONDUCTOR FOUNDRIES GMBH (XSEM-Non-standard)									1		1
IND TECHNOLOGY RES INST (ITRI)					1						1
ROSEMOUNT ANALYTICAL INC (ROEC)			1								1
INST ELECTRONIC CAS (ELCA-Non-standard)		1									1
TOUMAZ TECHNOLOGY LTD (TOUM-Non-standard)			1								1
ITO Y (ITOY- individual)				1							1
HONEYWELL INT INC (HONE)									1		1
BAIN M (BAIN- individual)										1	1
CHINESE ACAD SCI ELECTRONICS INST (CHSC-Non-standard)		1									1
LEVON K (LEVO- individual)			1								1
ROHM CO LTD (ROHL)									1		1
FREESCALE SEMICONDUCTOR INC (FRSE)								1			1
SEIKO EPSON CORP (SHIH)								1			1
METTLER TOLEDO AG (METM)			1								1
TECHNION RES&DEV FOUND LTD (TECR)										1	1
YEH J A (YEHJ- individual)							1				1
FREEWILL (FREE-Non-standard)					1						1
BURDETT A (BURD- individual)			1								1
UNIV NAT TSING-HUA (UNTH)							1				1
NANOSELECT INC (NANO-Non-standard)										1	1
UNIV POLYTECHNIC (UYPO-Non-standard)			1								1
NIPPON TELEGRAPH&TELEPHONE CORP (NITE)						1					1
YANG C (YANG- individual)	1										1
PH DIAGNOSTICS INC (PHDI-Non-standard)							1				1
PICKARDT R (PICK- individual)								1			1
MOHAERZADEH S (MOHA- individual)									1		1
Total	10	11	11	2	8	3	9	11	9	6	80

2.6.2. TRANSISTOR DE EFECTO DE CAMPO DE COMPUERTA EXTENDIDA (EGFET)

En 1983, J Van De Spiegel y sus colaboradores reportaron el funcionamiento del primer transistor de efecto de campo de compuerta extendida (EGFET), basado en el mismo principio de funcionamiento del ISFET, excepto a su estructura, en el EGFET el sensado de iones no se hacía directamente en la compuerta del FET [58].

El EGFET fue propuesto inicialmente como una alternativa al ISFET con la finalidad de disminuir las limitaciones que poseen los ISFET, incluso formulado para buscar la manera de detectar múltiples sustancias en un único dispositivo, al mismo tiempo [59].

Después de 17 años, Li Yin-Te y sus colegas presentaron a la comunidad científica con una nueva alternativa a la aplicación del EGFET. A diferencia de J Van Der Spiegel, desarrollaron un EGFET con la conexión entre una membrana sensible a los iones de hidrógeno y un MOSFET comercial (CD4007UB) [60], [61]. Desde esas publicaciones, varios trabajos han sido publicados explorando tanto en la optimización de los dispositivos EGFET, como sensores de pH y aplicaciones que implican biosensores [11], [62–66]. Además de eso, vale la pena mencionar el desarrollo científico y tecnológico obtenida con los instrumentos relacionados con estos dispositivos [67–75].

Los EGFETs son esencialmente MOSFETs, su principal característica es el enlace entre la compuerta de metal del MOSFET y la membrana ion sensitiva de un sustrato independiente al dispositivo [76],[77].

El electrodo de compuerta de óxido metálico del MOSFET se separa del sustrato analítico (previamente inmovilizado), la compuerta y el sustrato se conectan mediante un material conductor que transmite el potencial generado en el sustrato al momento de hibridar, hacia la compuerta del MOSFET [78], el potencial transmitido influirá en la respuesta del flujo de corriente del MOSFET. De manera que el EGFET por su metodología y respuesta se puede considerar un sensor de iones en estado sólido [79]. Por lo tanto, el EGFET tiene la estructura adecuada para el acoplamiento a los tratamientos de superficies deseadas y los objetivos de detección [24], [26]. Un ejemplo de la estructura del EGFET se presenta en la Figura 2.27, donde se puede ver la separación entre el sustrato caracterizado para la detección de iones H^+ y el MOSFET, así como la conexión entre ellos, generando así la compuerta extendida que caracteriza al EGFET.

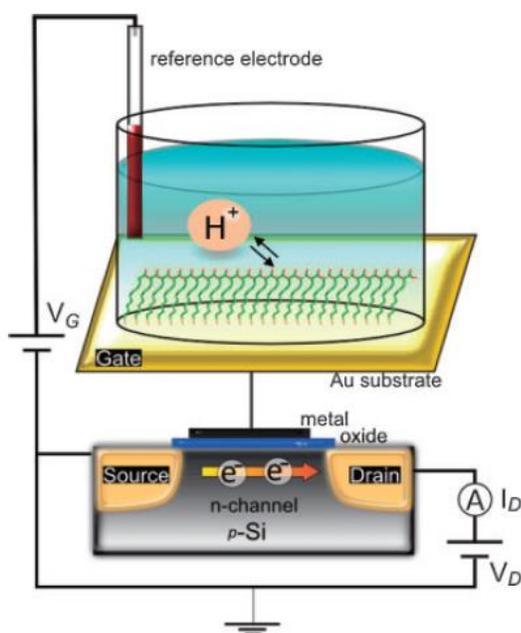


Figura 2.27 Estructura EGFET para la detección del ion H^+ sobre un sustrato de Au.

Entre los sustratos reportados en los trabajos de tipo EGFET se encuentran diferentes materiales aislados a la compuerta, como lo son SnO₂ [11], SiO₂ [75], ZnO [65], [80], [81], Au [82–84], o TiO₂ y ZnOTa [85] , con aplicaciones variadas [86].

Los EGFETs ofrecen las siguientes ventajas sobre los ISFETs:

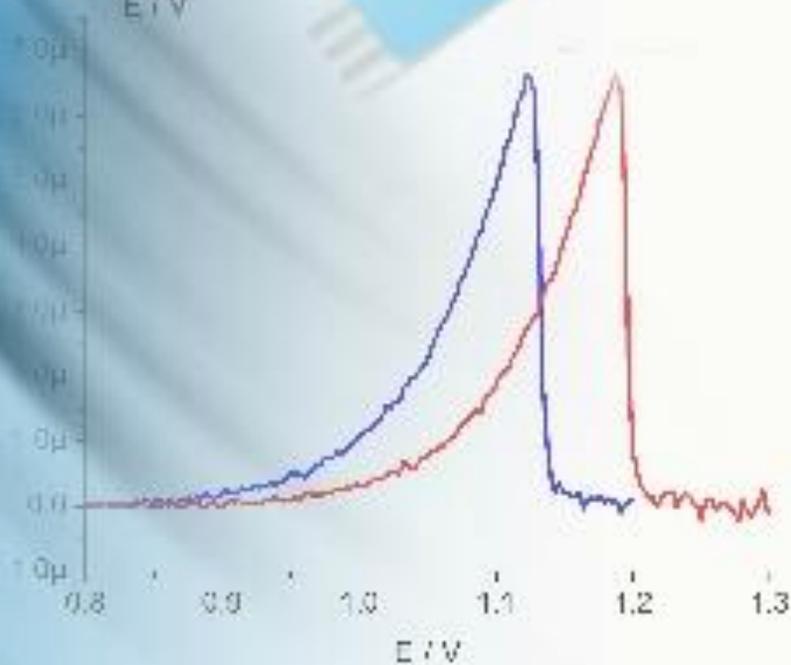
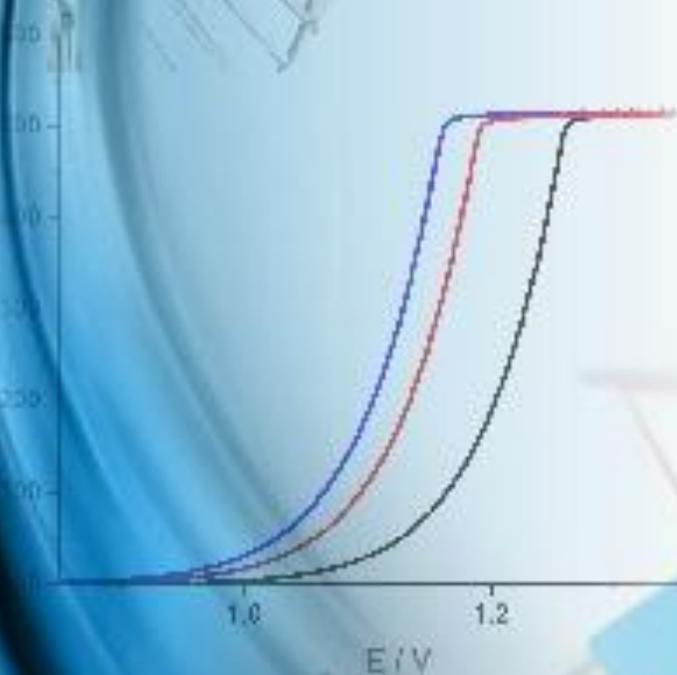
- Protección del dieléctrico de la compuerta a partir de soluciones iónicas potencialmente dañinos, especialmente en el tiempo donde los iones de la solución se pueden incorporar en el dieléctrico de compuerta.
- Facilidad de integración con circuitos MOSFET, donde la compuerta extendida es un paso importante del eliminar el problema del encapsulado en ISFET manera escalable.
- Oportunidad de detectar diferentes analitos con un solo dispositivo, ésto debido a la facilidad que brinda la compuerta extendida, al no estar directamente instalado el sustrato sobre el dispositivo se puede intercalar la conexión con otro sustrato en análisis.
- La compuerta extendida también pueden permitir la posibilidad de integración con geometrías que no son normalmente FET. Por ejemplo, la compuerta extendida se puede colocar en un canal microfluídico grabado eliminado del propio transistor[87]. Con el uso de tal estructura, se ha detectado el complejo proteico biotina-estreptavidina a través de un cambio en la constante dieléctrica [87].

La demostración más prominente de la utilización de EGFETs ha sido el trabajo de Ion Torren en Nature en 2012, un ejemplo de un instrumento de secuenciación de próxima generación que utiliza la tecnología FET [88]. Este trabajo presenta la importancia fundamental de la secuenciación del ADN para las ciencias de la vida, se describió una tecnología de secuenciación de ADN en el que, las técnicas de fabricación de semiconductores escalables de bajo coste se utilizan para hacer un circuito integrado capaz de realizar directamente la secuenciación del ADN no óptica de los genomas. Los datos de la secuencia de ADN se obtuvieron mediante la detección directa de los iones producidos por la síntesis en este sensor basado en FET.

Diferentes trabajos sobre detecciones de secuencias de ADN sobre sustratos de Au [7], [82–84] en EGFET, respaldan la realización de nuestro trabajo. Por estos motivos, consideramos la elección del EGFET como el dispositivo de transducción que por medio del reconocimiento de las secuencias de ADN, conforman la tecnología idónea para ser implementada en la detección del VPH-16.

Capítulo 3

Resultados Experimentales



CAPÍTULO 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

A continuación se presenta la metodología empleada y un análisis de la misma para el desarrollo de una técnica de detección electroquímica para la detección del VPH-16 por VPD.

3.1. Materiales y equipo

Todas las mediciones electroquímicas se llevaron a cabo en un potenciostato Gamry Reference 600, controlado por medio de una PC a través del software propio Framework. El transistor utilizado para la modalidad EGFET fue el FET comercial BSS138 de Fairchild Semiconductor. Como celda electroquímica se trabajó sobre electrodos USB Impresos de Au, con electrodo de referencia de Ag/AgCl y contraelectrodo de grafito, acoplado al potenciostato a través de un adaptador diseñado con un cable USB tipo A macho. Los valores de potencial de este trabajo se refieren al electrodo de Ag/AgCl, excepto donde se indique lo contrario. Para la limpieza del electrodo de Au se empleó H_2SO_4 0.5M (Merck), las sondas sintéticas de ADN utilizadas para el depósito e hibridación del VPH-16 fueron: Cadena sencilla (Biosearch Technologies, INC.) con secuencia: 5' d HSS-6C-GTC ATT ATG TGC TGC CAT ATC TAC TTC AGA (VPH-16cs) y para cadena complementaria (Invitrogen™) del tipo: 5' TCT GAA GTA GAT ATG GCA GCA CAT AAT GAC 3' (VPH-16cc). En la preparación de las soluciones amortiguadoras para la inmovilización como en las mediciones electroquímicas se empleó: fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico (BIO BASIC INC), fosfato de Potasio (Sigma-Aldrich), cloruro de Sodio (BIO BASIC INC), cloruro de Magnesio (Fluka),

ácido etilendiaminotetraacético EDTA (Sigma-Aldrich) y como marcador redox se utilizó el par $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ 2 mM de cada sal (Merck).

Durante la inmovilización y todas las mediciones electroquímicas fue empleada agua desionizada obtenida de un sistema Milli-Q de tres módulos además de agua ultra pura obtenida del mismo sistema con filtros Millipore y nitrógeno de alta pureza para secar la superficie de Au después de cada medición.

3.2. Metodología y caracterización

Como se ha visto en el marco teórico, el MOSFET, es un dispositivo electrónico controlado por voltaje, su función es la de controlar un flujo de corriente entre sus dos terminales llamadas drenador (D) y surtidor (S), este flujo será directamente proporcional al potencial aplicado a su terminal llamada Compuerta (G), el circuito para el funcionamiento del MOSFET se puede visualizar en la Figura 3.1.

Las propiedades de los MOSFET son bastante útiles para la realización de este trabajo, pues, podemos mediante este dispositivo detectar variaciones de potencial aplicados a su compuerta (en nuestro caso aumento de potencial por la hibridación de cadenas de ADN), reflejados en la respuesta de corriente entre drenador y surtidor.

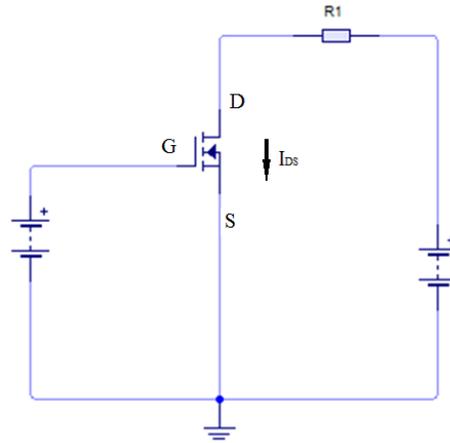


Figura 3.1 Circuito para activación del MOSFET.

Como se puede apreciar en el circuito, el MOSFET, mediante el voltaje aplicado V_{GS} será capaz de controlar el flujo de corriente I_{DS} , la gráfica característica del MOSFET a esta respuesta, se muestra en la Figura 3.2:

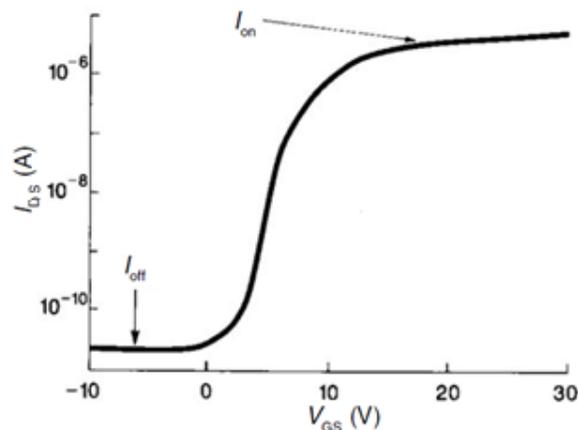


Figura 3.2 Gráfica característica de respuesta en el MOSFET.

Esta gráfica indica el comportamiento del MOSFET al ser aplicado un potencial V_{GS} , la corriente I_{DS} comienza en cero I_{off} , el voltaje V_{GS} crece hasta llegar a un punto en el que la corriente aumenta exponencialmente, el voltaje en el cual la corriente "se dispara" es conocido como el voltaje de umbral (V_{Th}), posteriormente se puede visualizar como la corriente I_{DS} llega a un límite el cual por más que se aumente el voltaje V_{GS} , la corriente I_{DS} ya no aumenta, siendo así la saturación del MOSFET.

Una buena analogía para entender este comportamiento del transistor es la del flujo de agua por una llave (Figura 3.3). La presión del agua a través de la llave (fuente) representa al voltaje aplicado desde la fuente al drenaje que se encuentran en los extremos opuestos, que establecerá un flujo de agua (electrones). La perilla (terminal de compuerta), mediante una señal aplicada (potencial), controlará el flujo de agua (corriente) hacia el "drenaje".

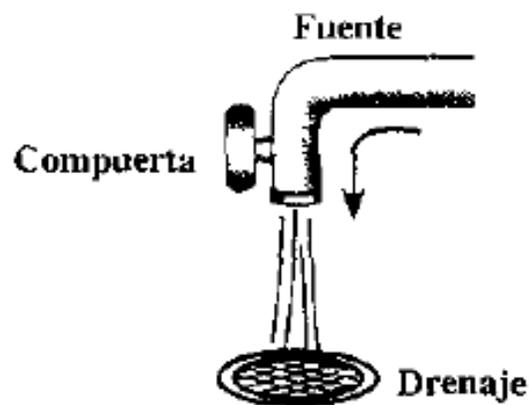


Figura 3.3 Analogía hidráulica para el mecanismo de control FET.

Para la detección del VPH-16 utilizando el principio de operación de los MOSFET es necesario evaluar el cambio de respuesta en la gráfica del transistor, así la presencia de VPH-16 se observará en la gráfica como un desfase de adelanto en la diferencia de potencial producida por el aumento de potencial de la hibridación de las cadenas de ADN, este potencial es sumado al potencial de VGS, lo que ocasiona que el MOSFET tenga una respuesta anticipada como se muestra en la Figura 3.4

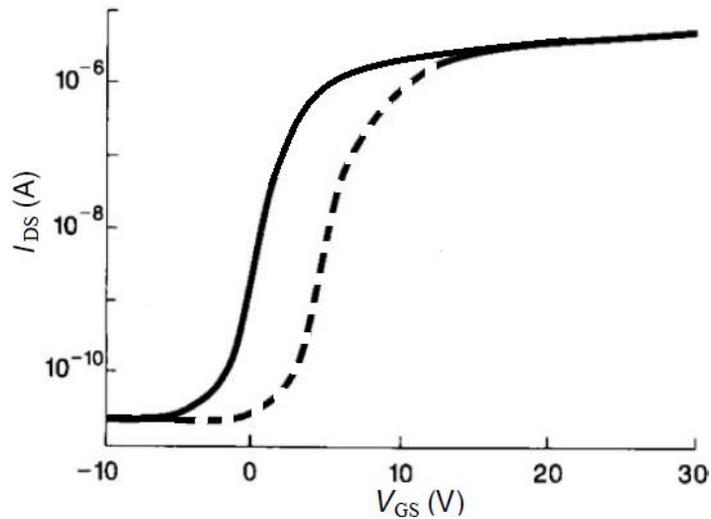


Figura 3.4 Respuesta del MOSFET al sumar V_{GS} con el potencial de hibridación.

Para poder hacer que el potencial de la hibridación de ADN de las cadenas de VPH-16 sea percibido por el MOSFET, es necesario un dispositivo que tenga la capacidad de proporcionar información eléctrica a partir de información biológica. Así transmitir y utilizar esos potenciales producidos aplicándolos al MOSFET, este dispositivo de acuerdo a las características mencionadas es el Biosensor basado en EGFET. Que implica la conexión electrónica (entre el electrodo de Au donde se realizará todo el proceso biológico, el MOSFET y el potencióstato), la etapa de transducción (configuración EGFET), los depósitos de la VPH-16cs, la correcta y selectiva hibridación del VPH-16cs con VPH-16cc y el análisis electroquímico en conjunto con sistemas electrónicos para determinar los resultados.

Para los procesos electroquímicos se ha implementado la utilización de electrodos impresos de Au, esta implementación resulta ser bastante práctica, ahorradora y compacta, pues se redujo la cantidad de soluciones que se utilizaban anteriormente en el grupo de trabajo con las celdas electroquímicas tradicionales,

utilizando ahora sólo una gota de la solución (Figura 3.5), también se ahorra el tiempo de pulido de los electrodos de alambre de Au, además de que el cableado es más sencillo pues el electrodo impreso se acopla a una terminal USB haciendo las pruebas más ágiles y prácticas.

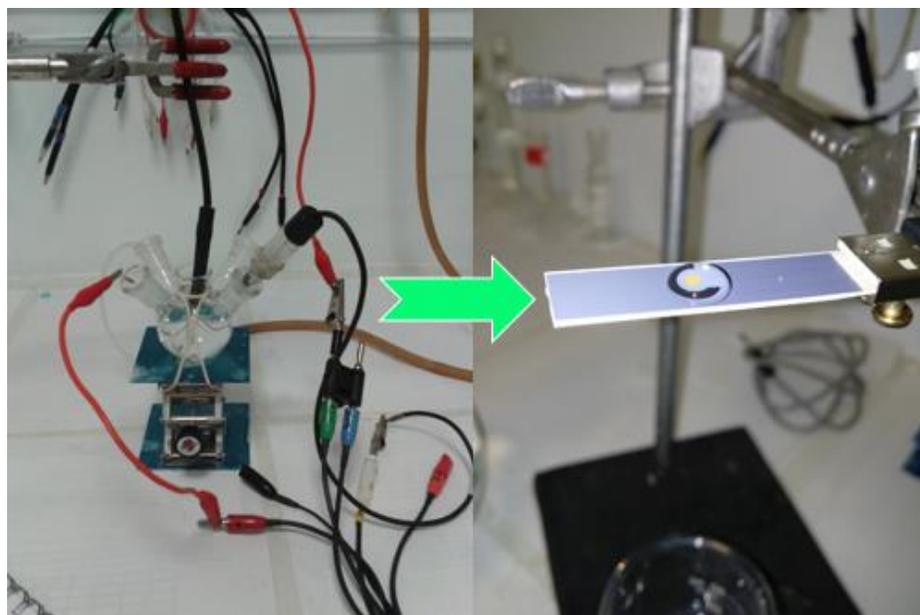


Figura 3.5 Implementación de electrodos impresos de Au como celda electroquímica.

3.2.1. MODIFICACIÓN DEL ELECTRODO CON CADENAS DE ADN

El método de depósito e hibridación utilizado en este trabajo fue diferente al método que se utilizaba anteriormente por el equipo de investigación sobre electrodos de alambre de Au (adsorción física), en este trabajo se empleó además el uso de trenes de pulsos eléctricos directamente sobre las cadenas de ADN en el Au para de esta forma hacer un depósito e hibridación de manera electrostática fundamentado por las propiedades eléctricas del ADN como se menciona en los siguientes apartados.

3.2.1.1. INMOVILIZACIÓN (VPH-16CS)

Para realizar la inmovilización, la superficie de Au fue modificada con una solución de VPH-16cs 5 μ M. El pegado electrostático consta de dos trenes de pulsos. El primer tren de pulsos es aplicado entre 0.03 y -0.03V (con respecto al potencial de circuito abierto) para propiciar el pegado atrayendo eléctricamente a la cadena y y reducir el pegado inespecífico de la cadena de ADN. Ya que, el ADN al tener una densidad de cargas negativas debidas a sus grupos fosfato, al aplicar un pulso positivo de 0.03V se atraen las cadenas hacia la superficie del electrodo de Au, mientras que, con el pulso negativo (-0.03V) corto aquellas cadenas que no fueron adsorbidas en la posición correcta serán eliminadas de la superficie (Figura 3.6).

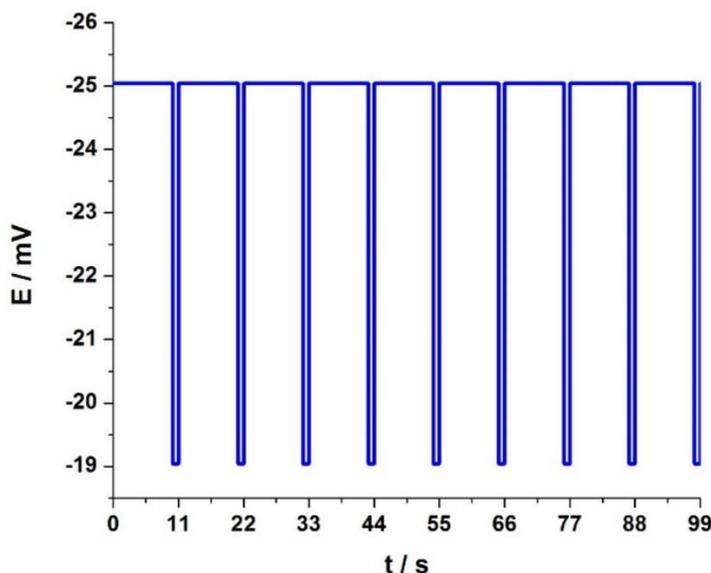


Figura 3.6 Muestra del primer tren de pulsos para el depósito de la sonda VPH-16cs.

El segundo tren de pulsos es aplicado entre 0.08 y 0 V (con respecto al potencial de circuito abierto) con la finalidad de atraer más eléctricamente y estabilizar, el pulso positivo es aumentado a 0.08V y después un tiempo de estabilización (reposo 0V) de 10s para repetir el ciclo, la secuencia de este segundo pulso se muestra en la Figura 3.7.

Concluidas las secuencias de pulsos, colocamos EDTA 10mM por 10 min para eliminar el exceso de iones Mg^{2+} provenientes de la solución amortiguadora empleada para la inmovilización.

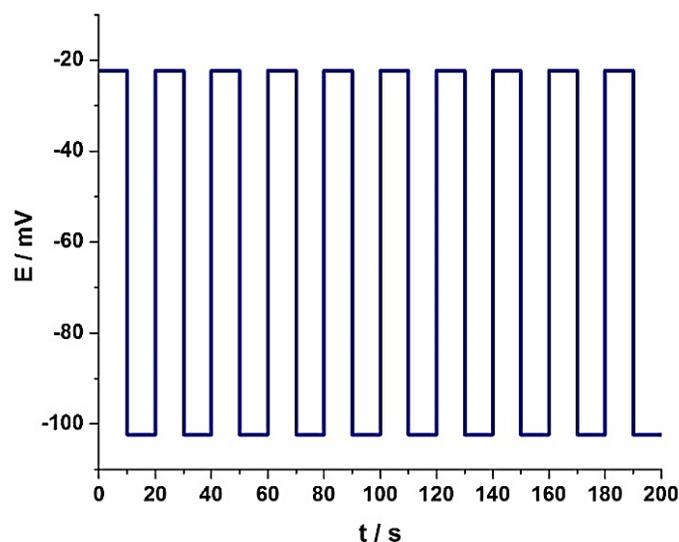


Figura 3.7 Muestra del segundo tren de pulsos para el depósito de la sonda VPH-16cs.

Para concluir el pegado de VPH-16cs realizamos voltamperometría cíclica empleando el indicador redox $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ en una región de potencial de -0.4 V a 0.4 V respecto al potencial de circuito abierto, a una velocidad de barrido de 0.1 V/s hasta obtener voltamperogramas sin cambio como se muestra en la Figura 3.8.

Esta voltamperometría se realiza para continuar eliminando de la superficie del electrodo aquellas cadenas de ADN débilmente adsorbidas o mal orientadas y, al mismo tiempo, para corroborar el pegado de la cadena VPH-16cs. En el voltamperograma reportado en la Figura 3.8, se puede visualizar que la señal se ve afectada para los procesos de oxidación y reducción conforme se realiza el ciclado del electrodo. Por ejemplo, se puede observar que en el ciclo final hay una disminución de corriente tanto en el proceso de oxidación como de reducción además de que es posible apreciar una separación de potencial de pico mayor con respecto al VC inicial. Esto es debido al aumento de la resistencia de transferencia de carga que produce el ADN depositado sobre el Au, lo que nos indica que se ha depositado ADN sobre la superficie del electrodo.

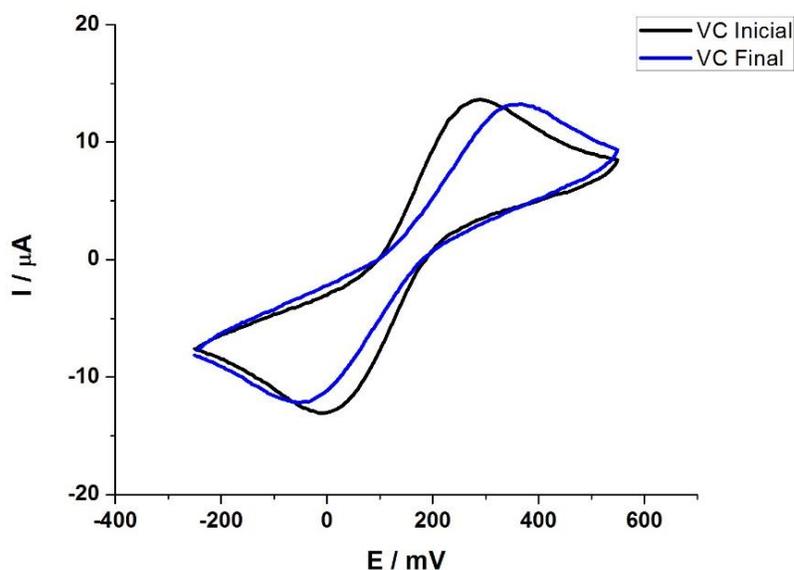


Figura 3.8 VC de VPH-16cs en $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$, ciclo 1 y ciclo 30.

3.2.1.2. HIBRIDACIÓN (VPH-16CD)

La hibridación de las cadenas del VPH-16cs y VPH-16cc es el proceso por el cual las dos cadenas de ADN se combinan para formar una doble cadena que toma la estructura de doble hélice. Esta combinación sólo puede ser realizada por la unión complementaria de ADN. Si las dos cadenas son perfectamente complementarias se unirán la una a la otra a menos que presenten diferentes geometrías de los nucleótidos (que sea diferente serotipo en este caso). Una simple variación de las parejas anteriores lleva a inconsistencias entre las cadenas y dificultará la unión. Esta característica define la selectividad del método, lo que garantiza la detección específica del serotipo VPH-16 pues ningún otro tipo de cadena complementaria de algún serotipo diferente del VPH hibridará con la cadena sencilla VPH-16cs. El proceso de hibridación de manera esquemática de VPH-16cs con su complementaria VPH-16cc se muestra en la Figura 3.9. Una vez inmobilizado el ADN (Figura 3.9- izquierda), se realizó el proceso de hibridación (Figura 3.9 - centro). Para ello, se agregaron 10 ml de la cadena complementaria VPH-16cc variando su concentración desde 20 nM a 100 nM en intervalos de 20 nM. Finalmente, la hibridación (Figura 3.9- derecha) se evaluó al detectar la cadena doble VPH16 cd a través de un cambio de potencial mediante el uso de EGFETs.

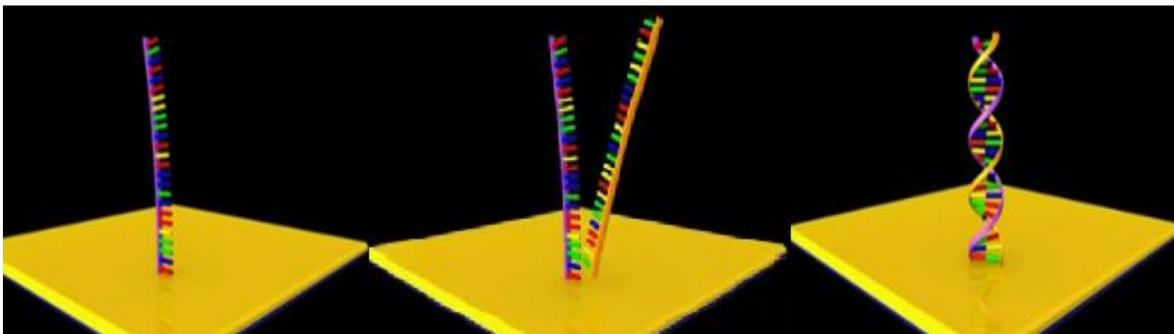


Figura 3.9 Hibridación de las cadenas VPH-16cs y VPH-16cc

Para concluir la etapa de hibridación, se aplican los mismos dos trenes de pulsos que en el depósito de VPH-16cs (el primer tren de pulsos es aplicado de entre 0.03 y -0.03V para propiciar el pegado atrayendo eléctricamente a la cadena doble y para evitar el pegado inespecífico, esto es porque el ADN por sus grupos fosfatos tiene una carga negativa, de manera que aplicar un pulso positivo de 0.03V atraerá la VPH-16cd hacia el Au y el pulso negativo -0.03V es aplicado a un tiempo muy corto para que expulse residuos no deseados. El segundo tren de pulsos es aplicado de entre 0.08 y 0 V con la finalidad de atraer electricamente y estabilizar la cadena doble. El pulso positivo es aumentado a 0.08V y después un tiempo de estabilización de 10s para repetir el ciclo). Terminando los ciclos de los trenes de pulsos la hibridación estará concluida.

3.2.2. CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA

3.2.2.1. ACTIVACIÓN DEL ELECTRODO IMPRESO DE ORO

Para la activación y limpieza del electrodo de trabajo de Au aplicamos la técnica de voltamperometría cíclica (VC) en un rango de potencial de 0.25 V hasta 1.4 V vs Ref. Ag/AgCl, a una velocidad de barrido de 0.1 V/s en una solución de ácido sulfúrico. El electrodo fue activado hasta obtener un voltamperograma con una señal sin cambios (constante). En nuestros experimentos, esta característica se alcanzó generalmente después de los 50 ciclos, donde la corriente aproximadamente se encontró en el rango de entre -60 μ A a 40 μ A como se muestra en la Figura 3.10.

En el voltamperograma podemos visualizar el aumento del pico de reducción una vez concluidos los ciclos, lo cual refleja el aumento del área de la región activa del Au.

El incremento de corriente indica una disminución de resistencia, esto es porque se expulsan residuos que estaban adheridos al Au y que no son deseables para las mediciones, de manera que con esta voltamperometría se relaciona con la limpieza de la superficie del electrodo de Au mediante la eliminación de impurezas.

Es necesario tener una superficie activa y limpia de Au para poder asegurar el depósito de la cadena VPH-16cs sobre Au y de esta manera mejorar la veracidad y reproducibilidad de los resultados.

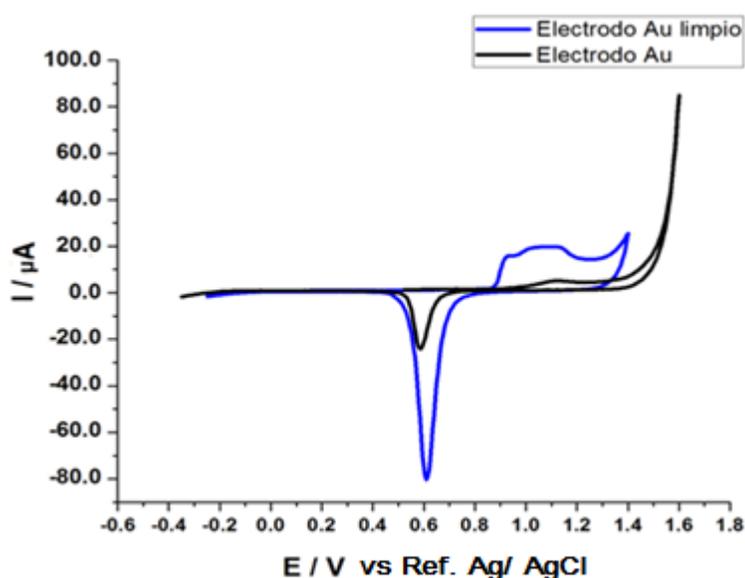


Figura 3.10 Voltamperograma del electrodo impreso de Au por VC en H_2SO_4 0.5M.

Una de las técnicas en que nos apoyamos para detectar tanto el depósito como la hibridación de las cadenas de VPH16 fue la Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIE), al aplicar esta técnica se emplearon soluciones de VPH16cs 5 micromolar mientras que la concentración de la cadena de VPH16cc se varió desde 20 a 100 nM. Se obtuvieron los diagramas de Nyquist antes de realizar el depósito,

luego al realizar el depósito y finalmente después de que ocurriera la hibridación Figura 3.11, de manera que se cuenta con una gráfica para el electrodo de Au sólo, una más después del depósito de la cadena sencilla (VPH-16cs), otra después de la limpieza con el par redox $K_3[Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6]$ sobre el mismo depósito de VPH-16cs (a la que llamaremos VPH-16 final) y una última curva al finalizar el proceso de hibridación (VPD-16cd). De manera que la EIE se estableció como técnica de comprobación del método de detección de ADN mediante el uso de EGFET. En los experimentos de EIE se utilizó el par redox $K_3[Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6]$ a una concentración 2 mM aplicando un potencial de corriente directa (CD) de 30 mV, sobreponiendo una señal de corriente alterna (CA) de 5 mV de amplitud en un rango de frecuencias de 100KHz a 1Hz.

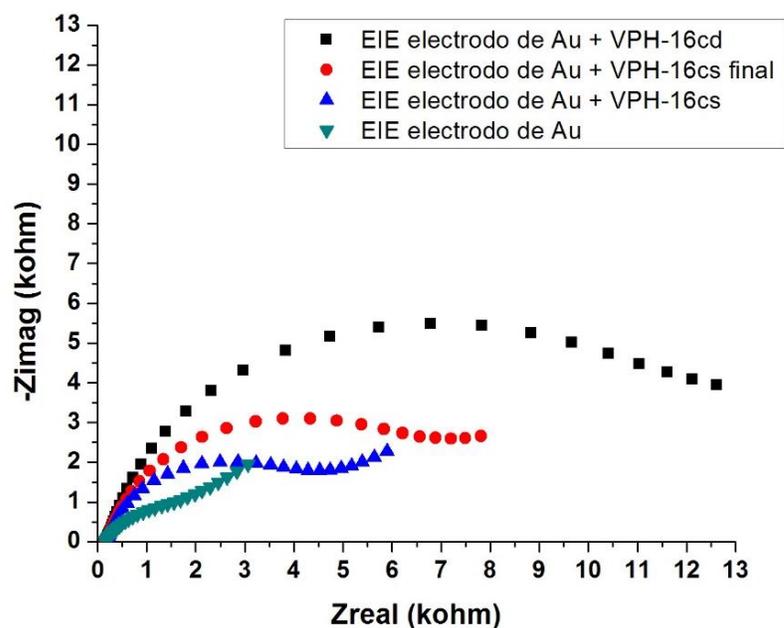


Figura 3.11 EIE de cada evento; Au sólo, depósito de VPH-16cs, limpieza con VC sobre VPH-16cs (VPH-16final) e Hibridación (VPH-16cd).

3.2.2.2. SENSADO ELECTROQUÍMICO

Como se mencionó anteriormente la detección del VH-16cd se realiza de manera electroquímica sensando las variaciones de corriente de la transducción del EGFET.

El método anteriormente mencionado por análisis de las curvas características del MOSFET mediante VL es el más empleado en sistemas de sensado basados en el uso de FET. Se examina la anticipación de respuesta del MOSFET teniendo como gráfica patrón la del transistor. Sin embargo, el método puede sufrir variación en los resultados pues la forma de determinar el cambio de potencial entre una gráfica y otra la determinación del punto de análisis es muy variada porque la gráfica tiene muchos puntos a elegir respecto a la corriente. De manera que si una persona realiza el análisis de la diferencia de potenciales entre las gráficas del MOSFET respecto a una determinada corriente, el resultado será diferente para otra persona si lo hace respecto a otro valor de corriente.

Para evitar discrepancias en los resultados, en este trabajo promovemos la detección del VPH-16 mediante voltamperometría de pulso diferencial (VPD), porque al aplicar VPD a cada evento o estado en el que se somete el electrodo impreso se puede obtener específicamente el voltaje donde ocurre la máxima variación de corriente, como se muestra en la Figura 3.12. El punto marcado con rojo muestra el pico de corriente de la VPD. El potencial del pico de corriente que se obtenía por VPD permitió evaluar las diferencias de potencial entre el electrodo de Au, modificado con el depósito de VPH16cs y después de la hibridación (VPH16cd). De esta forma mayor reproducibilidad de los resultados fue obtenido.

Estos resultados no tendrán variaciones tan grandes como en el caso del análisis por VL.

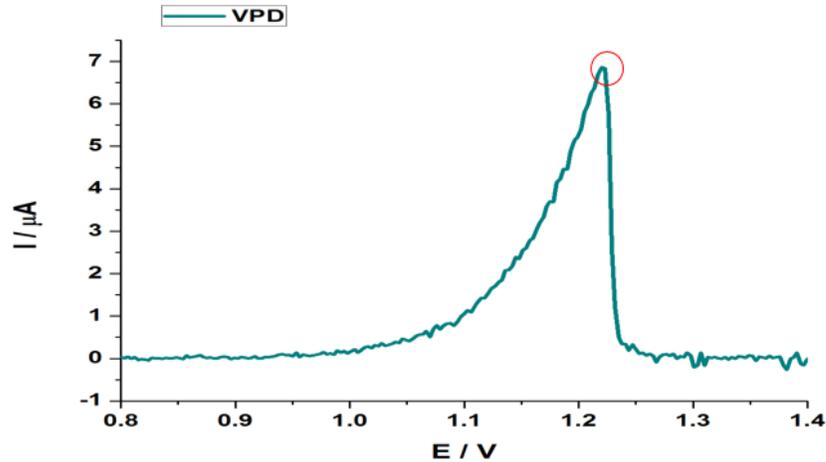


Figura 3.12 VPD aplicada a cada evento del electrodo de Au para obtener el punto de voltaje óptimo de mayor variación de corriente.

Las VPD fueron aplicadas a cada evento en el intervalo de potencial de 0.8 V a 1.35 V, estos potenciales se establecieron tomando como base los potenciales donde el FET entra en conducción. Fue empleado un tamaño de pulso de 0.010 V, un tiempo de pulso de 0.0005 s y un periodo de muestreo de 0.001 s. Por otra parte, la voltamperometría lineales (VL) fue empleada para obtener las curvas características del transistor en cada evento de modificación del electrodo, empleando un rango desde un potencial inicial de 0 V, hasta un potencial final de -1.35 V, con una velocidad de barrido de 1 V/s. En ambas técnicas fue empleado como electrolito soporte una solución de Buffer Tris-HCl 10 mM. pH 7.4

3.2.3. CONFIGURACIÓN ELECTRÓNICA

3.2.3.1. SELECCIÓN DEL MOSFET

Para seleccionar el transistor MOSFET que se utilizó en este trabajo, se realizó un análisis comparativo en respuesta de corriente entre cuatro diferentes transistores por medio del potenciómetro; IRF3205, K2182, el MOSFET CD4007UB muy frecuentemente mencionado en la literatura como transistor utilizado para aplicaciones EGFET [11, 60, 61, 65, 80, 81, 89–91] y el MOSFET BSS138 de Fairchild Semiconductor. Se puede observar en la Figura 3.13. Las gráficas características de respuesta de los MOSFET obtenidas por VL, el voltamperograma indica los V_{th} de cada MOSFET, donde para el transistor BSS138 su V_{th} es menor que el de los otros transistores (requiere menos potencial para ponerse en conducción), se puede observar incluso que la pendiente de la corriente para el BSS138 es más pronunciada en su zona óhmica, indicando mayor cambio de corriente a menor incremento de potencial, a diferencia que el MOSFET CD4007UB donde su zona óhmica se puede observar con una pendiente menos pronunciada, lo que indica que para obtener un cambio de corriente requiere mayores incrementos de potencial, los MOSFET IRF2205Z y K2182 no son convenientes para nuestras necesidades pues requieren más voltaje para poder activarse.

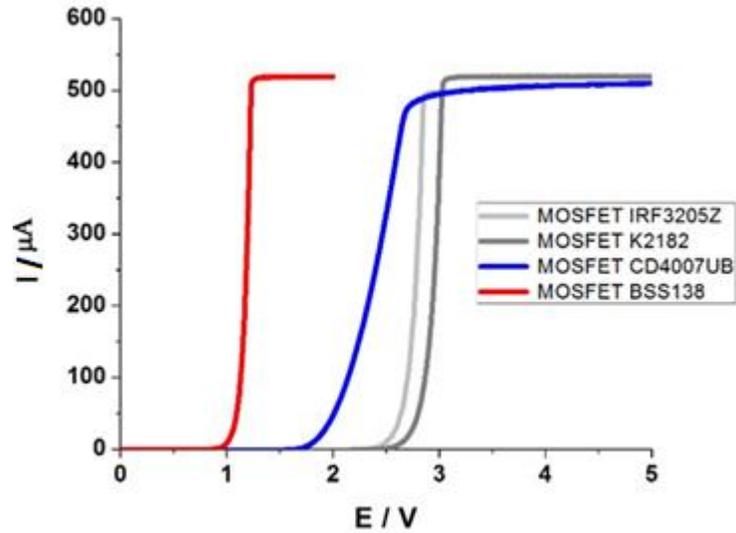


Figura 3.13 Comparación de las curvas características de MOSFETs por VL.

De acuerdo a las características presentadas por los MOSFET, el transistor más adecuado para nuestra aplicación fué el MOSFET BSS138 (Figura 3.14) que resulta aún mas conveniente que el empleo del MOSFET CD4007UB a pesar de su amplia aplicación en trabajos con EGFET.

Cabe mencionar además el compacto diseño del transistor BSS138 que contribuirá para la generación de diseños menos ostentosos de un futuro genosensor EGFET.



Figura 3.14 MOSFET BSS138 montado en circuito impreso.

3.2.3.2. CARACTERIZACIÓN ELÉCTRICA DEL MOSFET BSS138

La caracterización eléctrica define el comportamiento de respuesta de un dispositivo sometido a diferentes pruebas eléctricas para comprender su total funcionamiento, para caracterizar eléctricamente el MOSFET BSS138 se hicieron las siguientes pruebas:

- **Caracterización del MOSFET BSS138 con el potenciómetro Gamry Reference 600:**

Inicialmente las primeras pruebas con el transistor BSS138 fueron mediante la conexión básica del MOSFET (Figura 3.1) se incrementaba mediante una fuente variable de tensión el voltaje V_{GS} en el MOSFET y se registraban los valores de corriente I_{DS} , para después graficarlos mediante el programas computacionales y así obtener las gráficas características del MOSFET (Figura 3.15). Este método resultaba muy poco eficiente pues se podían obtener muy pocos puntos de la gráfica una vez que se llegaba al V_{Th} y de manera muy lenta.

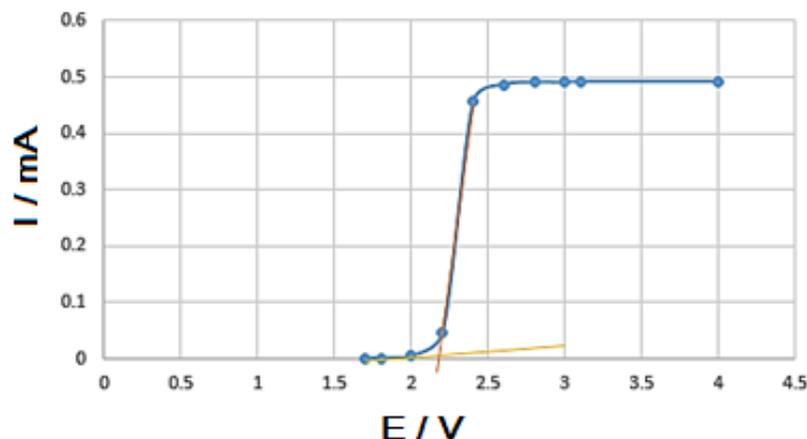


Figura 3.15 Primera gráfica de la curva característica del MOSFET generada por Excel.

La implementación del potenciostato para caracterizar la respuesta del MOSFET fue uno de los procesos más efectivos para la realización de este trabajo pues se pudieron obtener de manera muy práctica las gráficas de las curvas características del MOSFET con una exactitud y totalidad de los puntos requeridos (Figura 3.16), además de que se puede obtener la respuesta a cualquier parámetro que se le indique al equipo.

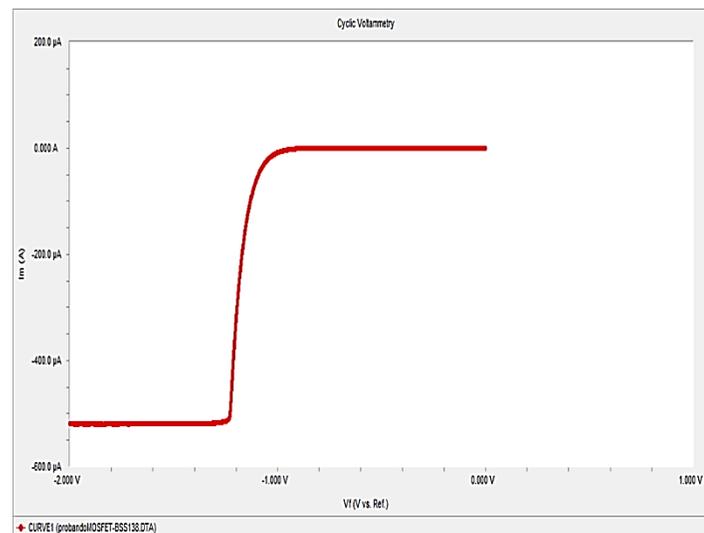


Figura 3.16 Curva característica del MOSFET BSS138 generada por el potenciostato Gamry Reference 600.

La configuración aplicada para implementar el uso del potenciostato inicialmente fue como se muestra en la Figura 3.17. Donde como se puede apreciar que la terminal del potenciostato para la conexión al electrodo de trabajo está conectada al surtidor del MOSFET registrando así las variaciones de corriente, los electrodos de contra y referencia del potenciostato están conectados entre sí para hacer la función de una fuente regulable de voltaje, ahorrándose así ese elemento eléctrico.

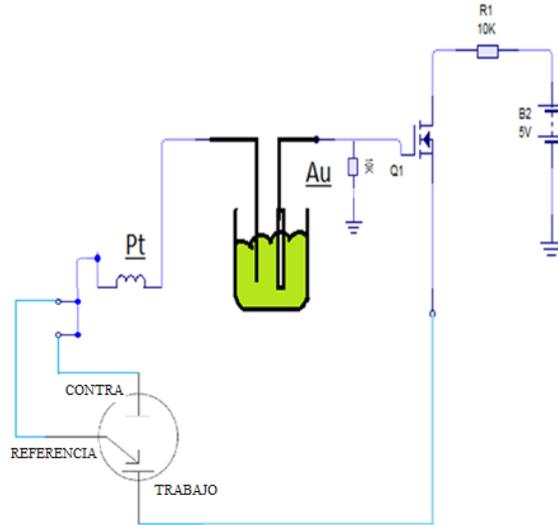


Figura 3.17 Esquema de conexión para la implementación del potenciostato Gamry Reference 600.

A partir de esta configuración fue posible el análisis de los resultados electroquímicos obtenidos en este trabajo. Nota: en esos primeros experimentos se utilizaba electrodos de alambre de Au.

- **Caracterización del MOSFET BSS138 por voltaje en compuerta VGS**

Para definir el comportamiento del MOSFET BSS138 se realizaron análisis de la respuesta en corriente aplicando diferentes tamaños de pulsos de corriente alterna con diferente valor de pico a pico, se pudieron observar los siguientes resultados de la Tabla 3.1:

Tabla 3.1 Variaciones de corriente del MOSFET BSS138 por pequeños incrementos de Voltaje aplicados a la compuerta

Vpp / mV	I / μA
8	50.6
6	35
3	18.8
2	9.1
1	3.9
0.25	2.1

Estos valores reflejan grandes cambios en corriente a partir de pequeños incrementos de voltaje, de esta manera se obtuvo un incremento de $4.55\mu\text{A}$ por mV, el cambio en corriente es suficiente para amplificarse, lo que lo hace adecuado en el diseño de un genosensor con el transductor MOSFET BSS138.

- **Caracterización del MOSFET BSS138 por la resistencia de carga**

Otro tipo de caracterización que se realizó en el MOSFET fue aplicar VPD al transistor variando los valores de la resistencia de carga (Figura 3.18), ésto con la finalidad de observar su comportamiento respecto a la variación de corriente I_{DS} al modificar esa resistencia con valores de: $1\text{k}\Omega$, $2\text{k}\Omega$, $5\text{k}\Omega$, $10\text{k}\Omega$ Y $20\text{k}\Omega$. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.19 donde el parámetro de voltaje V_{GS} fue de 0V a 1.40V y el voltaje V_{DD} se mantuvo constante (5V).

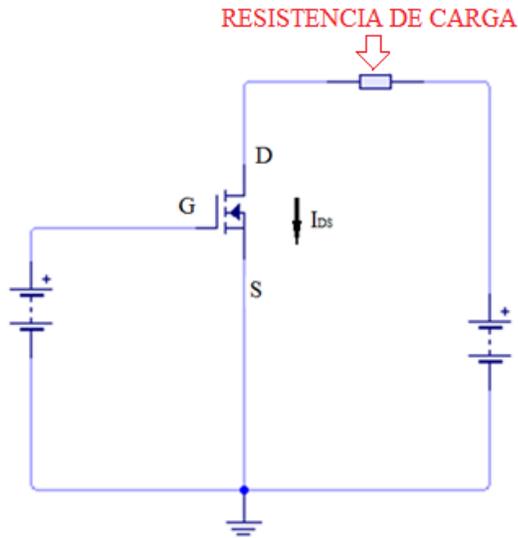


Figura 3.18 Resistencia de carga del circuito del MOSFET.

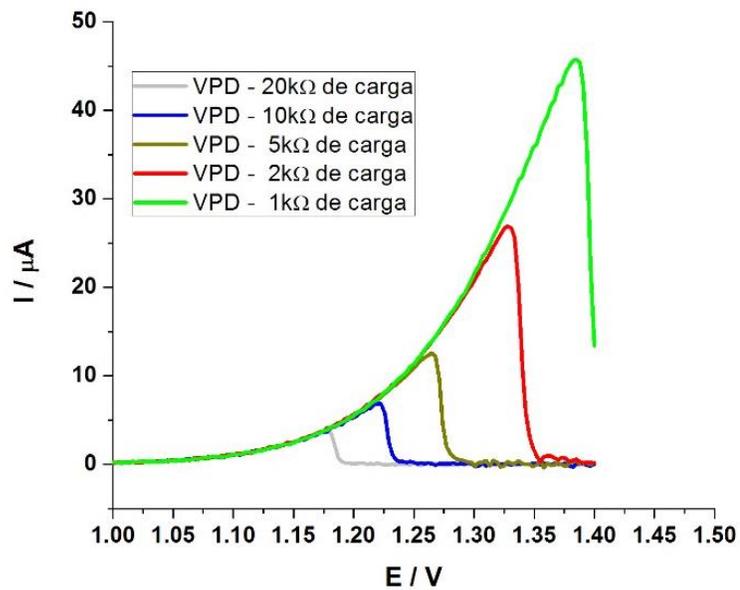


Figura 3.19 VPD del MOSFET BSS138 a diferentes valores de resistencia de carga.

En la Figura 3.19 se puede observar que el MOSFET también tiene una respuesta diferente para cada valor de resistencia de carga.

Asimismo, se observa que la respuesta del transistor requiere menor potencial para obtener su pico máximo de variación de corriente, pero limitando el flujo de corriente (pico más pequeño). De igual forma se puede visualizar que para valores de resistencia de carga más pequeño el pico de corriente es mayor, pero se requeriría de mayor cantidad de potencial para activarse. De esta manera se concluyó que el valor de resistencia de carga para este trabajo no debe ser menor a $10k\Omega$, pues resulta ser una resistencia que aparte de brindar una buena corriente, es un valor estándar en la electrónica para varios circuitos electrónicos, esto porque no es un valor tan grande como para asimilar un circuito abierto, ni tampoco es un valor muy pequeño para asimilar un corto circuito. De manera que así, la resistencia de carga que se definió para ser aplicada en este trabajo fue de $10k\Omega$.

- **Caracterización del MOSFET BSS138 para estabilización de potencial**

Una de las caracterizaciones más importantes sobre el MOSFET para este trabajo es la asociada con la estabilización de potencial, el cual se describe a continuación; el detalle de la estabilización de potencial. Este es punto importante para el sensado electroquímico del VPH-16cd ya que por VL o VPD, se obtenían valores diferentes en cada prueba (Figura 3.20), al realizar una serie de pruebas los resultados eran muy variables (baja reproducibilidad) a pesar de ser la misma.

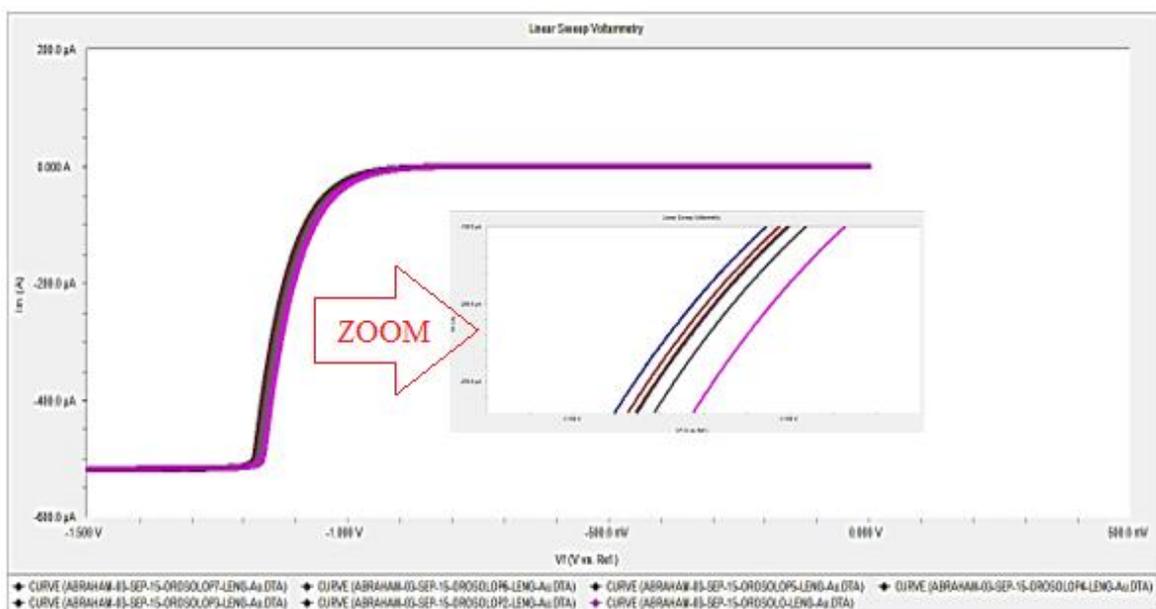


Figura 3.20 Discrepancia de las VL's de una misma prueba con el BSS138.

Este tipo de resultados al tener tantas variaciones para cada prueba dificultaba la posibilidad de definir la diferencia de potencial para cada evento al que se somete al electrodo impreso (depósito e hibridación).

Para solucionar este problema, el MOSFET, tanto como las soluciones químicas empleadas, fueron sometidos a diferentes experimentos de los cuales se pudo observar que la velocidad de barrido juega un papel muy importante en la caracterización del MOSFET. Aquí, se debe recordar que el ADN se adsorbe físicamente sobre la superficie de Au por lo que este fenómeno puede comportarse de forma similar al de un capacitor eléctrico, es decir, como un elemento de almacenamiento de potencial. De esta manera, el potencial va disminuyendo con el paso del tiempo y, en consecuencia, se propicia un desplazamiento del potencial como se observa en las curvas de la Figura 3.20.

No obstante, el aumento de la velocidad de barrido en las VL y VPD prácticamente disipó este fenómeno (Figura 3.21).

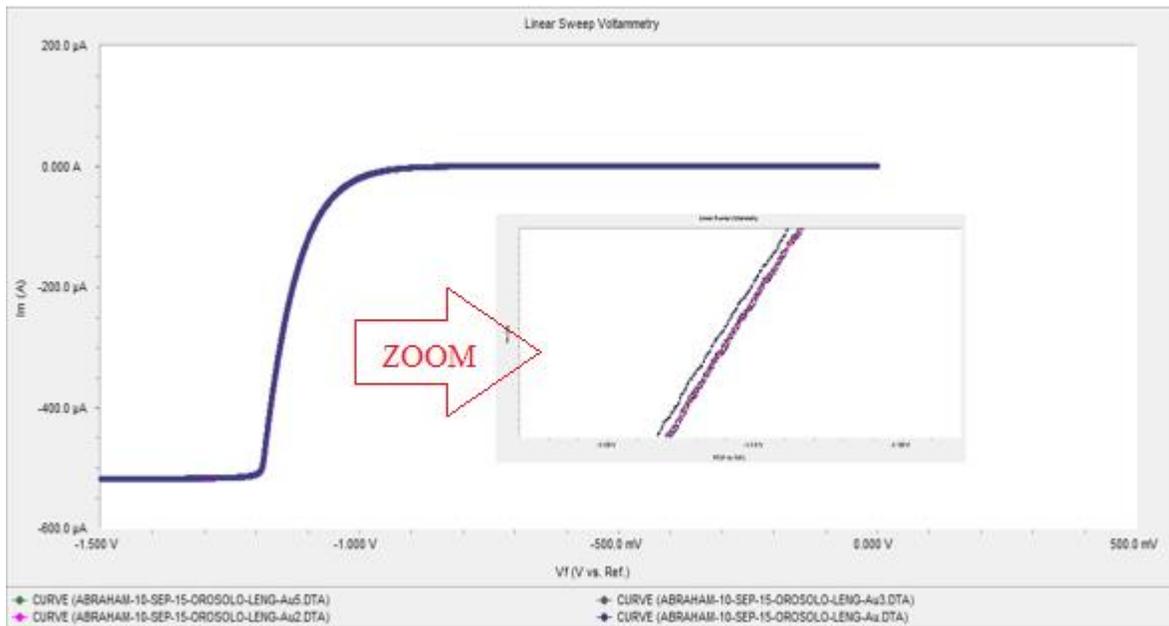


Figura 3.21 Similitud de las VL's en una misma prueba con el BSS138.

3.2.3.3. TOPOLOGÍA ELÉCTRICA EGFET

La etapa de transducción de la información biológica (en este caso potencial del ADN) a una información eléctrica cuantificable se realizó mediante el uso de EGFET. El esquema del EGFET aplicado en este trabajo se puede ver en la Figura 3.22. Donde podemos observar que la compuerta del MOSFET BSS138 está conectada mediante un cable a la superficie de Au modificado con VPH-16 (siendo así esta su compuerta extendida), de manera que la hibridación no se realizó directamente en la compuerta del dispositivo, a diferencia del ISFET.

Este método de transducción EGFET nos brindó ventajas en la realización de este trabajo, como realizar la detección electroquímica sobre una superficie de Au en la que el grupo de trabajo tiene experiencia para la inmovilización de ADN, de esta forma se ahorró tiempo. Por otro lado, el costo, un MOSFET BSS138 tiene un precio cercano a los \$3.00 pesos en tanto un ISFET tiene un precio superior a los \$4,000.00 pesos.

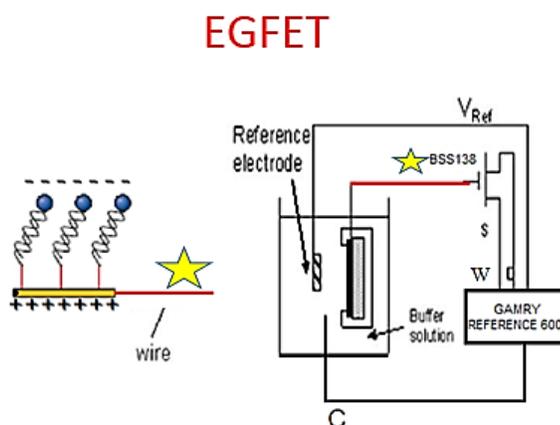


Figura 3.22 Esquema del EGFET con compuerta extendida de Au sobre el MOSFET BSS138.

La topología eléctrica empleada para el sensado a partir del esquema anterior del EGFET, involucra al electrodo impreso de Au modificado con la sonda VPH-16cs conectado en serie a una fuente de voltaje controlada, el transistor BSS138 como medio de transducción EGFET; cuya finalidad sea la de transmitir el cambio de potencial generado a partir de la hibridación entre VPH-16cs y VPH-16cc, el flujo de corriente I_{DS} entre las terminales drenador y surtidor producido por el aumento de potencial de la hibridación, es analizado por medio del potencióstato (nuestro sistema electrónico). El adaptador USB lo utilizamos como conector entre el electrodo impreso y los demás elementos eléctricos.

El circuito se muestra en la Figura 3.23. siendo este el circuito final empleado para el análisis electroquímico utilizado en este trabajo.

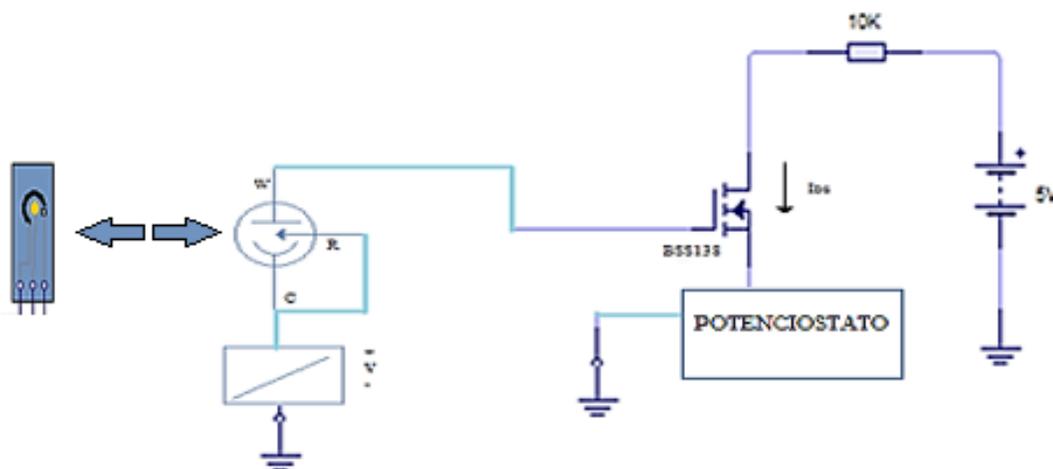


Figura 3.23 Esquema de Conexión eléctrica utilizado para el sensado de ADN basado en EGFET.

3.3. RESULTADOS DE LA DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DEL VPH-16

Las siguientes gráficas corresponden a todos los resultados obtenidos mediante la metodología anteriormente expuesta para la detección electroquímica por VPD del VPH-16.

En la Figura 3.24 se presentan las curvas de Nyquist de la técnica EIE, que se obtienen mediante la técnica EIE y que hemos utilizado en este trabajo para comprobar los eventos de depósito e hibridación de las sondas VPH16cs y VPH16cd, respectivamente sobre el electrodo impreso de Au. Las curvas indican un aumento de resistencia de transferencia de carga R_{TC} al modificar el electrodo de Au con VPH-16cs y su hibridación.

Aquí, se puede apreciar que efectivamente cuando el electrodo se encuentra en la etapa de hibridación se presenta una R_{TC} mayor en comparación con el electrodo correspondiente a la inmovilización del VPH-16 o al electrodo de Au sólo, pues la hibridación es el evento donde se refleja más ese aumento de resistencia por la doble cadena de ADN. Este resultado sustenta que los demás análisis de detección serán efectivamente sobre la hibridación de ADN del VPH-16.

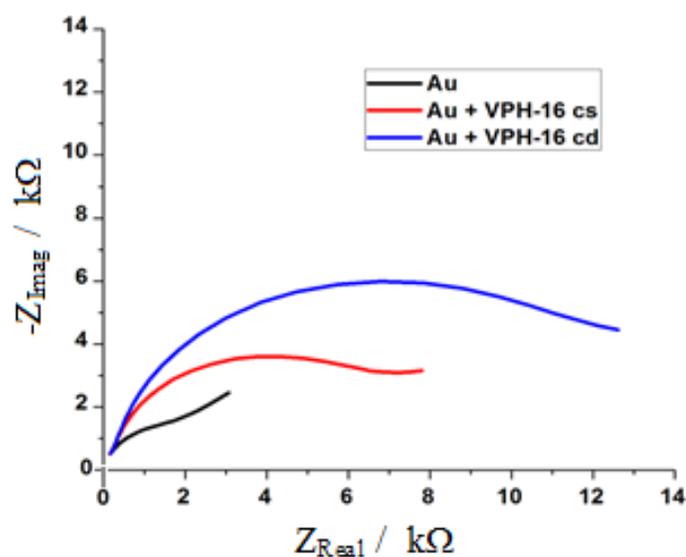


Figura 3.24 Gráficos de Nyquist del cambio de impedancia para la relación de la transferencia electrónica en un electrodo de Au con cadena sencilla (VPH-16cs) e hibridación (VPH-16cd) en una solución $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ 2 mM.

La detección tradicional utilizando EGFET consiste en la identificación de las variaciones de respuesta del FET en su estado de conducción, empleando voltamperometría lineal (VL).

El aumento de carga electrostática del electrodo de oro modificado con ADN produce un desplazamiento en la respuesta de conducción del FET en las VL, lo que se puede traducir como la presencia y detección de las sondas de VPH-16, se realizaron los experimentos por VL y se obtuvieron los siguientes resultados que se presentan en la Figura 3.25. Así fue posible desde este punto obtener un resultado favorable de nuestro método de detección como los comúnmente obtenidos mediante EGFET con VL.

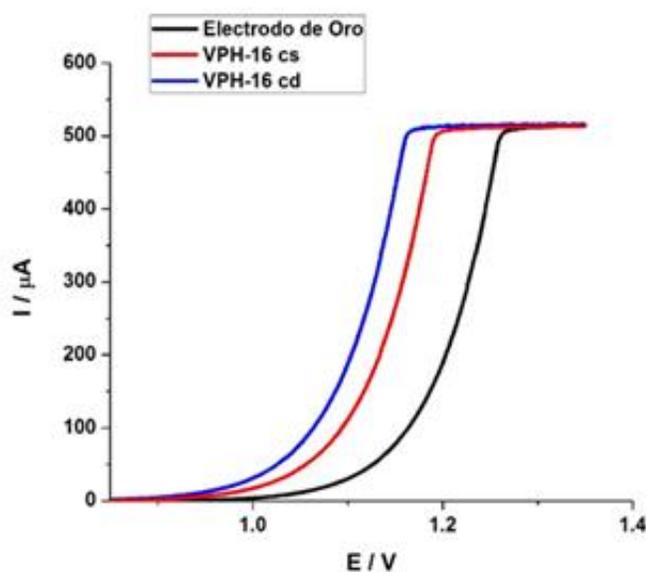


Figura 3.25 VL de la respuesta de conducción del Transistor BSS138 en un electrodo de Au con: Cadena sencilla (VPH-16 cs) e hibridación (VPH-16 cd) y electrodo de Au.

En el análisis por VL, se fija una corriente arbitraria y se miden los potenciales correspondientes a esa corriente en cada voltamperograma para posteriormente evaluar las diferencias de potencial entre los voltamperogramas. Sin embargo, las diferencias de potencial obtenidas dependen de la corriente seleccionada.

En este trabajo con el fin de obtener una diferencia máxima entre los potenciales de los voltamperogramas, se empleó VPD para calcular las diferencias de potencial a partir de los picos de los voltamperogramas diferenciales, lo que permite una manera adecuada y no arbitraria de sensor el evento de hibridación del ADN de VPH-16. La comparación de estos dos métodos de análisis se puede observar en la Figura 3.26 para un electrodo de Au con VPH-16cs inmobilizado a partir de una solución 5 μ M y una concentración de VPH-16cc 40nM. La curva VPD muestra una diferencia de potencial de 65 mV correspondiente a la hibridación de VPH-16 obtenida a partir de los picos de corriente máxima.

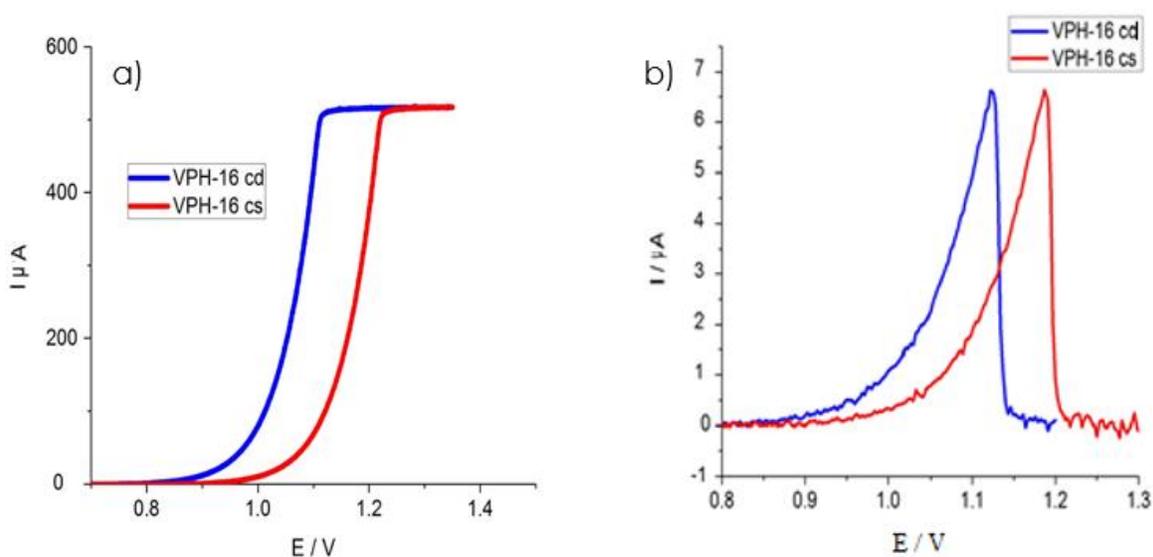


Figura 3.26 a)VL y b)VPD del Transistor BSS138 en un electrodo de Au con: Cadena sencilla (VPH-16 cs) C. 5 μ M, e hibridación (VPH-16 cd) C.40nM.

Se puede observar que al aplicar VPD a cada evento en el que se somete el electrodo, ya sea inmovilización o hibridación, se puede obtener específicamente y de manera más precisa el voltaje donde ocurre la máxima variación de corriente,

identificando sólo los picos de corriente de cada VPD, y realizando la resta de los potenciales correspondientes para así obtener la diferencia de potencial resultante. A diferencia de las gráficas de VL donde no se puede definir fácilmente un punto en común entre las VLs de depósito e hibridación para determinar la diferencia de potencial a menos que a un criterio personal defina una corriente constante y así obtenga la diferencia de los potenciales correspondientes a dicha corriente. Cabe resaltar que las VPD y VL son aplicadas exactamente al mismo depósito e hibridación.

Para determinar el límite de detección de VPH-16 con la técnica EGFET, se analizaron los cambios de potencial entre la respuesta de oligonucleotido VPH-16cs y su hibridación, variando la concentración de VPH-16cc de 20 nM a 100 nM, con incrementos de 2 nM. La Figura 3.27 muestra la respuesta del cambio de potencial en los máximos de las curvas VPD para dos diferentes concentraciones de VPH-16cc.

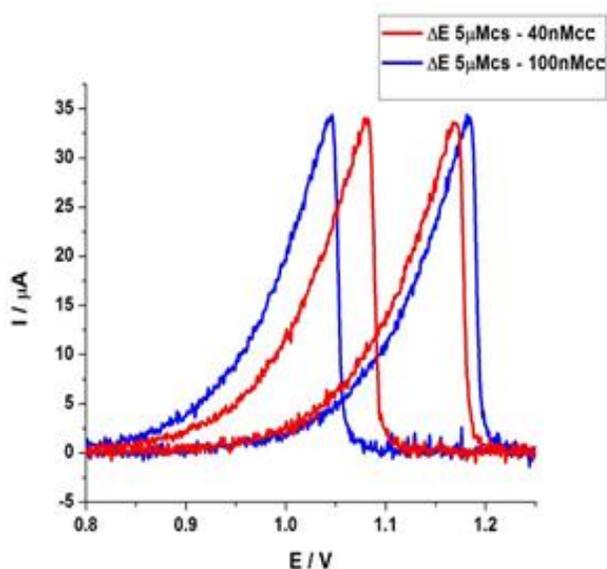


Figura 3.27 Comparación de los voltamperogramas de VPD a concentraciones de 40nM y 100Nm VPH-16cc

Se puede observar que el método es sensible a cambios de concentración de la cadena complementaria. Variando la concentración de VPH-16cc, fue posible obtener la curva de calibración que se presenta en la Figura 3.28. En esta gráfica, es posible observar un incremento en los cambios de potencial al incrementar la concentración de VPH-16cc desde 20nM hasta 60nM, y se identifica una saturación en la detección del ADN complementario a concentraciones mayores a 60nM. A partir de estos datos pudo determinarse teóricamente mediante métodos estadísticos un límite de detección de 3nM con el genosensor propuesto.

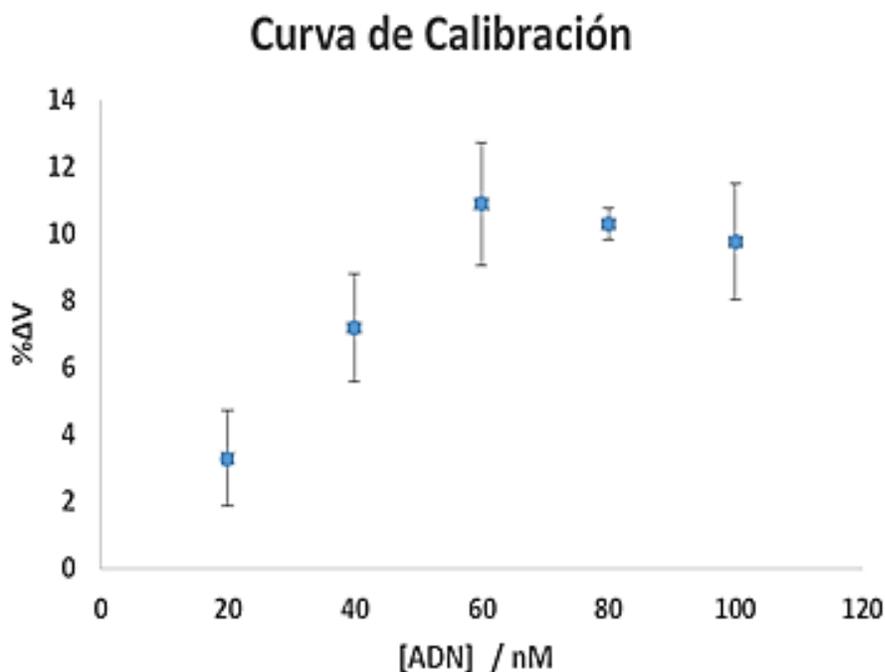


Figura 3.28 Curva de calibración del genosensor propuesto a concentraciones de VPH-16cc de 20nM a 100nM

Así mismo se presenta en la Figura 3.29, la curva de calibración logarítmica del genosensor propuesto, para observar en un rango más amplio la linealidad de los resultados entre la concentración de VPH-16cc y el cambio en voltaje relativo.

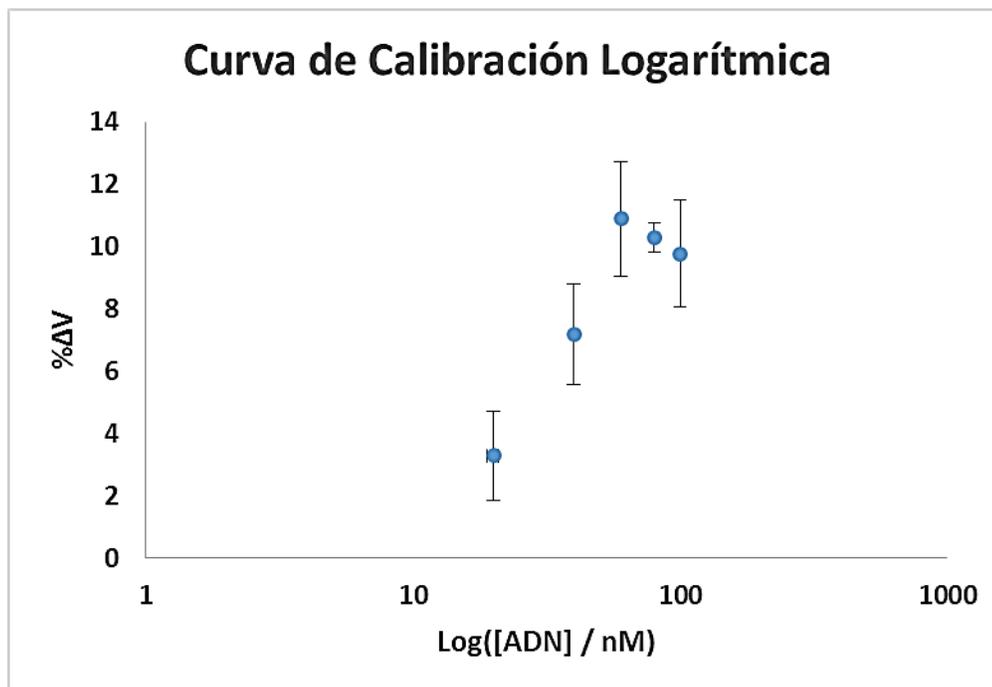


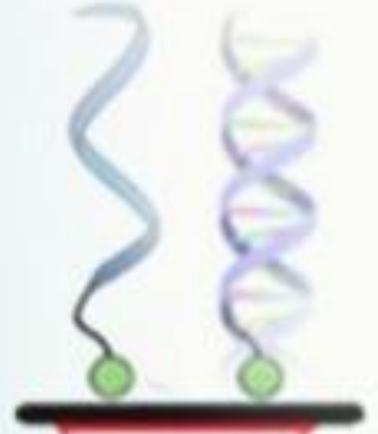
Figura 3.29 Curva de calibración Logarítmica del genosensor propuesto a concentraciones de VPH-16cc de 20nM a 100nM

Desde el punto de vista analítico este límite de detección se puede considerar relativamente sensible, pues el límite de detección obtenido por los métodos con etiquetado fue de 280 pM. Sin embargo, se considera que el método de sensado por EGFETs puede ser optimizado para obtener límites de detección más bajos que los reportados en este trabajo.

En su conjunto estos resultados son la base para proponer una arquitectura electrónica más simple y sin etiquetado a diferencia de las ya investigadas por el equipo de trabajo.

Capítulo 4

Conclusiones



CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, la hipótesis generada para este trabajo se acepta. Pues el análisis electroquímico mediante VPD del sistema basado en un EGFET como medio de transducción acoplado a un electrodo impreso de Au modificado con una sonda de oligonucleótidos específica para la detección del VPH16 mostró un desempeño adecuado que permitió la detección del evento de hibridación bajo condiciones ideales.

Así mismo se cubrieron todos los objetivos planteados en este trabajo. Se verificó la viabilidad de los EGFET en la detección electroquímica del VPH-16 por la hibridación de sus sondas sintéticas de ADN analizadas por la técnica VPD. Se analizó el estado del arte de los Transistores de Efecto de Campo (FET) y se conocieron las diferentes estrategias que se han implementado a biosensores de ADN y se evaluó el comportamiento de operación de los transistores de efecto de campo de compuerta extendida EGFET con el empleo de depósitos biológicos de ADN como mecanismo de iniciación en la compuerta de dichos transistores.

Además se llegaron a las siguientes conclusiones:

Se comprobó que la técnica de VPD resulta ser más conveniente que la VL comunmente usada en sensores basados en FET para obtener la diferencia entre los potenciales correspondientes a las corrientes máximas de VPH-16cs y VPH-16cd a partir de las curvas características del EGFET.

Se utilizó y corroboró el método de depósito e hibridación de las sondas VPH-16cs y VPH-16cc mediante trenes de pulsos eléctricos, el cual reduce el tiempo de depósito e hibridación anteriormente utilizado en nuestro equipo de trabajo.

Para el transductor EGFET se seleccionó un transistor MOSFET de canal N por su mejor respuesta en conducción respecto del transistor más empleado en publicaciones de este tipo, el CD4007UB.

La utilización de electrodos impresos de Au redujo la cantidad de soluciones empleadas así como el tiempo que se llevaba en el pulido de los electrodos de alambre de Au utilizados anteriormente en nuestro equipo de trabajo y aportan a un diseño futuro de genosensor portátil.

Bajo las condiciones empleadas, el sistema propuesto es adecuado para la detección electroquímica de ADN del VPH-16 mediante la hibridación de cadenas sintéticas del virus con el uso de EGFET como transductor. El límite de detección obtenido fue de 3 nM de VPH-16cc, lo que significa la viabilidad de construcción de un genosensor electroquímico para la detección de VPH-16 basado en transistores de efecto de campo con compuerta extendida.

4.1. PERSPECTIVA Y TRABAJO FUTURO

A pesar de la viabilidad del método propuesto, aún falta optimizarlo, pues el empleo del marcador redox, el par $K_3[Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6]$, en la fase de verificación por EIE de cada evento biológico sobre el Au, causaba efectos eléctricos en el MOSFET, pues modificaba la polaridad del electrodo, cambiando la dirección de las VPD y VL.

Se puede además implementar un transistor MOSFET aún mejor, tanto en respuesta como en diseño, pues el MOSFET BSS138 resultó ser demasiado delicado a temperatura (con el simple hecho de soldarlo) o por efectos eléctricos se dañaba y dejaba de funcionar correctamente.

Hay que buscar la manera de reutilizar los electrodos impresos pues sólo se realizó una prueba por cada electrodo, debido a que no se pueden pulir. La desnaturalización del ADN podría ser una opción viable a este problema pero falta investigar y experimentar más sobre ello.

El mejoramiento a estos puntos beneficiará directamente en la continuación del proyecto de este trabajo; el diseño y construcción del genosensor potenciométrico para la detección de VPH-16.

Con los resultados obtenidos se puede proponer la construcción de ISFET con configuraciones más accesibles como por ejemplo ISFETs basados en materiales orgánicos podría ser una opción para futuras investigaciones que enriquezcan este trabajo.

Valdría la pena incluir más tipos de caracterizaciones no sólo electrónicas, sino también fisicoquímicas, microscópicas, espectroscópicas, etc. para tener un conocimiento más claro de los que ocurren en la inmovilización.

REFERENCIAS

- [1] A. Hammer, A. Rositch, F. Qeadan, P. E. Gravitt, y J. Blaakaer, «Age-specific prevalence of HPV16/18 genotypes in cervical cancer: A systematic review and meta-analysis: Age-Specific HPV in Cervical Cancer», *Int. J. Cancer*, vol. 138, n.º 12, pp. 2795-2803, jun. 2016.
- [2] P. Gahan, «Molecular biology of the cell», *Cell Biochem. Funct.*, vol. 23, n.º 2, pp. 150-150, mar. 2005.
- [3] C. Stagni, C. Guiducci, L. Benini, B. Ricco, S. Carrara, B. Samori, C. Paulus, M. Schienle, M. Augustyniak, y R. Thewes, «CMOS DNA Sensor Array With Integrated A/D Conversion Based on Label-Free Capacitance Measurement», *IEEE J. Solid-State Circuits*, vol. 41, n.º 12, pp. 2956-2964, dic. 2006.
- [4] P. Levine, P. Gong, K. Shepard, y R. Levicky, «Active CMOS Array for Electrochemical Sensing of Biomolecules», 2007, pp. 825-828.
- [5] P. Bergveld, «Development of an Ion-Sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements», *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. BME-17, n.º 1, pp. 70-71, ene. 1970.
- [6] H. Nakamura y I. Karube, «Current research activity in biosensors», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 377, n.º 3, pp. 446-468, oct. 2003.
- [7] A. Purwidyantri, H.-C. Lai, S.-H. Tsai, J.-D. Luo, C.-C. Chiou, Y.-C. Tian, C.-H. Cheng, Y.-T. Lin, y C.-S. Lai, «Sensing performance of fibronectin-functionalized Au-EGFET on the detection of *S. epidermidis* biofilm and 16S rRNA of infection-related bacteria in peritoneal dialysis», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 217, pp. 92-99, oct. 2015.
- [8] H. Li, C. Yang, C. Kei, C. Su, W. Dai, J. Tseng, P. Yang, J. Chou, y H. Cheng, «Coaxial-structured ZnO/silicon nanowires extended-gate field-effect transistor as pH sensor», *Thin Solid Films*, vol. 529, pp. 173-176, feb. 2013.

- [9] E. Guerra, G. Silva, y M. Mulato, «Extended gate field effect transistor using V2O5 xerogel sensing membrane by sol-gel method», *Solid State Sci.*, vol. 11, n.º 2, pp. 456-460, feb. 2009.
- [10] J. Lin, B. Huang, y Y. Yang, «IGZO nanoparticle-modified silicon nanowires as extended-gate field-effect transistor pH sensors», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 184, pp. 27-32, jul. 2013.
- [11] P. Batista, M. Mulato, C. Graeff, F. Fernandez, y F. Marques, «SnO2 extended gate field-effect transistor as pH sensor», *Braz. J. Phys.*, vol. 36, n.º 2a, pp. 478-481, jun. 2006.
- [12] Y. Chiu, C. Lee, L. Lou, S. Ho, y C. Chuang, «Wide linear sensing sensors using ZnO:Ta extended-gate field-effect-transistors», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 188, pp. 944-948, nov. 2013.
- [13] P. Batista y M. Mulato, «ZnO extended-gate field-effect transistors as pH sensors», *Appl. Phys. Lett.*, vol. 87, n.º 14, p. 143508, 2005.
- [14] B. Huang, J. Lin, y Y. Yang, «ZnO/Silicon Nanowire Hybrids Extended-Gate Field-Effect Transistors as pH Sensors», *J. Electrochem. Soc.*, vol. 160, n.º 6, pp. B78-B82, abr. 2013.
- [15] J. Schorge y J. Williams, *Williams. «Ginecología»*. Vol 3, pp.934-1005 México, D.F.: McGraw-Hill, 2009.
- [16] G. O. Mex, «Infección por el virus del papiloma humano en varones», *Ginecol Obstet Mex*, vol. 83, pp. 697-706, 2015.
- [17] F. Carrillo, G. Sánchez, y A. Albuo, «Publicación Oficial de la Sociedad Mexicana de Oncología», 2012.
- [18] E. Osorio, «Lineamientos técnicos y operativos para la vacunación contra el virus del papiloma humano (VPH)». jul-2012.
- [19] D. Forman, C. de Martel, C. Lacey, I. Soerjomataram, J. Lortet-Tieulent, L. Bruni, J. Vignat, J. Ferlay, F. Bray, M. Plummer, y others, «Global burden of human papillomavirus and related diseases», *Vaccine*, vol. 30, pp. F12-F23, 2012.

- [20] G. Vega, J. Ávila, P. García, N. Camacho, A. Becerril, A. Vega, y G. Amador, «3.Infección por VPH Biología Molecular», *European Scientific Journal*, vol. 10, jun. 2014.
- [21] M. Schiffman, P. Castle, J. Jeronimo, A. Rodriguez, S. Wacholder, «Human papillomavirus and cervical cancer», *The Lancet*, vol. 370, sep. 2007.
- [22] V. Vargas, V. Aguilar, y J. Tovar, «Detección primaria del cáncer cervicouterino», *Cir. Cir.*, vol. 83, n.º 5, pp. 448-453, sep. 2015.
- [23] M. Pividori, «Genosensores», Tesis Doctoral, 2002.
- [24] L. Castro, V. Luna, y R. Villalobos, «Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México», *Rev. Int. Contam. Ambient.*, vol. 23, n.º 1, pp. 35–45, 2007.
- [25] V. Rumayor, E. Iglesias, O. Galán, y L. Cabezas, «Aplicación de biosensores en la industria agroalimentaria», Informe de vigilancia tecnológica, 2005.
- [26] M. Cano, «Diseño y aplicación de sensores electroquímicos basados en moléculas orgánicas conductoras», Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, Córdoba, 2009.
- [27] M. Arroyo, «Inmovilización de enzimas, fundamentos, métodos y aplicaciones.», *Ars Pharmaceutica*, vol. 39.
- [28] X. Zhang, H. Ju, y J. Wang, «*Electrochemical sensors, biosensors, and their biomedical applications*». Academic Press, 2008.
- [29] A. Bard y L. Faulkner, «*Electrochemical methods: fundamentals and applications*», 2nd ed., pp. 448-453, New York: Wiley, 2001.
- [30] T. Eichler, «Corrosion Books: Electrochemical Techniques in Corrosion Science and Engineering. By: R. G. Kelly, J.R. Scully, D.W. Shoesmith, R.G. Buchheit.», *Mater. Corros.*, vol. 57, n.º 3, pp. 284-285, mar. 2006.
- [31] F. Mansfeld y M. Kendig, «Electrochemical Impedance Spectroscopy of protective coatings», *Mater. Corros. Korros.*, vol. 36, n.º 11, pp. 473-483, nov. 1985.

- [32] J. Macdonald y W. Johnson, «Fundamentals of Impedance Spectroscopy», en *Impedance Spectroscopy*, E. Barsoukov y J. R. Macdonald, Eds. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005, pp. 1-26.
- [33] G. Ruiz, «*Electrónica básica para ingenieros*». Vol 1, pp. 8-138, 2001.
- [34] E. Gates, «Introduction to electronics», 6th ed., pp. 137-240 Clifton Park, NY: Delmar Cengage Learning, 2012.
- [35] R. Boylestad, L. Nashelsky, J. Purón, S. Ruiz, y A. Suárez, «*Electrónica: teoría de circuitos*», 6th ed., pp. 114-294, Prentice_Hall Hispanoamericana, México, 1997.
- [36] S. Middelhoek, «*Celebration of the tenth transducers conference*», *Sens. Actuators Phys.*, vol. 82, n.º 1-3, pp. 2-23, may 2000.
- [37] C. Lee, S. Kim, y M. Kim, «Ion-Sensitive Field-Effect Transistor for Biological Sensing», *Sensors*, vol. 9, n.º 9, pp. 7111-7131, sep. 2009.
- [38] A. Morgenshtein, «*Design and methodology of isfet*». Thesis of master of science in bio-medical engineering, The technion - israel institute of technology, Abril, 2003.
- [39] P. Bergveld, «Future applications of ISFETs», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 4, n.º 1-2, pp. 125-133, may 1991.
- [40] P. Bergveld, «Thirty years of ISFETOLOGY», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 88, n.º 1, pp. 1-20, ene. 2003.
- [41] J. Molina, W. Calleja, M. Landa, y P. Alarcón, «Fabricación y Caracterización Electroquímica de ISFETs: Progreso hacia el Desarrollo de la Bio-Electrónica», Presentación en el segundo congreso nacional de electronica, PUEBLA, MEXICO, 2002, p. 3.
- [42] A. Miró, «Diseño y desarrollo de un equipo de caracterización de ISFET para la medida de analitos iónicos», Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, 2010.

- [43] J. Pérez, M. Velasco, M. Rosas, y H. Reyes, «ISFET sensor characterization», *Procedia Eng.*, vol. 35, pp. 270-275, 2012.
- [44] W. Siu y R. Cobbold, «Basic properties of the electrolyte-SiO₂-Si system: Physical and theoretical aspects», *IEEE Trans. Electron Devices*, vol. 26, n.º 11, pp. 1805-1815, nov. 1979.
- [45] J. Oreggioni, «Métodos de medida del pH para estudios invasivos prolongados: ISFET y fibra óptica.», *XV Semin. Ing. Bioméd. Med. E Ing.-Univ. Republica Orient. Urug.*, pp. 1-5, 2006.
- [46] J. Kimura, «A Novel Blood Glucose Monitoring Method an ISFET Biosensor Applied to Transcutaneous Effusion Fluid», *J. Electrochem. Soc.*, vol. 136, n.º 6, p. 1744, 1989.
- [47] M. Schöning y A. Poghossian, «Recent advances in biologically sensitive field-effect transistors (BioFETs)», *The Analyst*, vol. 127, n.º 9, pp. 1137-1151, 2002.
- [48] S. Dzyadevych, A. Soldatkin, A. El'skaya, C. Martelet, y N. Jaffrezic-Renault, «Enzyme biosensors based on ion-selective field-effect transistors», *Anal. Chim. Acta*, vol. 568, n.º 1-2, pp. 248-258, may 2006.
- [49] T. Ohtake, C. Hamai, T. Uno, H. Tabata, y T. Kawai, «Immobilization of probe DNA on Ta₂O₅ thin film and detection of hybridized helix DNA using IS-FET», *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 43, n.º 9A, p. L1137, 2004.
- [50] D. Gonçalves, D. Prazeres, V. Chu, y J. Conde, «Detection of DNA and proteins using amorphous silicon ion-sensitive thin-film field effect transistors», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, n.º 4, pp. 545-551, dic. 2008.
- [51] M. Kalofonou, P. Georgiou, C. Ou, y C. Tournazou, «An ISFET based translinear sensor for DNA methylation detection», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 161, n.º 1, pp. 156-162, ene. 2012.
- [52] M. Castellarnau, N. Zine, J. Bausells, C. Madrid, A. Juárez, J. Samitier, y A. Errachid, «Integrated cell positioning and cell-based ISFET biosensors», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 120, n.º 2, pp. 615-620, ene. 2007.

- [53] H. Lau, I. Lee, P. Ko, H. Lee, J. Huh, W. Cho, y J. Lim, «Non-Invasive Screening for Alzheimer's Disease by Sensing Salivary Sugar Using *Drosophila* Cells Expressing Gustatory Receptor (Gr5a) Immobilized on an Extended Gate Ion-Sensitive Field-Effect Transistor (EG-ISFET) Biosensor», *PLOS ONE*, vol. 10, n.º 2, p. e0117810, feb. 2015.
- [54] W. Oelßner, J. Zosel, U. Guth, T. Pechstein, W. Babel, J. G. Connery, C. Demuth, M. Grote Gansey, y J. B. Verburg, «Encapsulation of ISFET sensor chips», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 105, n.º 1, pp. 104-117, feb. 2005.
- [55] W. Oelßner, J. Zosel, U. Guth, T. Pechstein, W. Babel, J. G. Connery, C. Demuth, M. Grote Gansey, y J. B. Verburg, «Encapsulation of ISFET sensor chips», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 105, n.º 1, pp. 104-117, feb. 2005.
- [56] A. Chaparro, C. Jimenez, y D. Badea, «Water Network Sensors for Widespread Use; D2.1: MARKET ANALYSIS», Reporte técnico del proyecto Wellness Telecom, Spain, Públíc FP7-SME-2013 Activity 2.1, 2013.
- [57] W. Chung, Y. Lin, D. Pijanowska, C. Yang, M. Wang, A. Krzyskow, y W. Torbicz, «New ISFET interface circuit design with temperature compensation», *Microelectron. J.*, vol. 37, n.º 10, pp. 1105-1114, oct. 2006.
- [58] B. Reddy, «Nanoscale BioFETs for ultrasensitive pH and biomolecular detection», Tesis, University of Illinois at Urbana-Champaign, 2012.
- [59] J. van der spiegel, I. Lauks, P. Chan, y D. Babic, «The extended gate chemically sensitive field effect transistor as multi-species microprobe», *Sens. Actuators*, vol. 4, pp. 291-298, ene. 1983.
- [60] L. Yin, J. Chou, W. Chung, T. Sun, y S. Hsiung, «Separate structure extended gate H⁺-ion sensitive field effect transistor on a glass substrate», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 71, n.º 1-2, pp. 106-111, nov. 2000.

- [61] L. Chi, J. Chou, W. Chung, T. Sun, y S. Hsiung, «Study on extended gate field effect transistor with tin oxide sensing membrane», *Mater. Chem. Phys.*, vol. 63, n.º 1, pp. 19-23, feb. 2000.
- [62] L. Chi, L. Yin, J. Chou, W. Chung, T. Sun, K.-P. Hsiung, y S. Hsiung, «Study on separative structure of EnFET to detect acetylcholine», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 71, n.º 1-2, pp. 68-72, nov. 2000.
- [63] J. Chen, J. Chou, T. Sun, y S. Hsiung, «Portable urea biosensor based on the extended-gate field effect transistor», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 91, n.º 1-3, pp. 180-186, jun. 2003.
- [64] J. Chou, P. Kwan, y Z. Chen, «SnO₂ Separative Structure Extended Gate H⁺-Ion Sensitive Field Effect Transistor by the Sol–Gel Technology and the Readout Circuit Developed by Source Followen», *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 42, n.º Part 1, No. 11, pp. 6790-6794, nov. 2003.
- [65] P. Batista y M. Mulato, «ZnO extended-gate field-effect transistors as pH sensors», *Appl. Phys. Lett.*, vol. 87, n.º 14, p. 143508, 2005.
- [66] P. Batista y M. Mulato, «Polycrystalline fluorine-doped tin oxide as sensing thin film in EGFET pH sensor», *J. Mater. Sci.*, vol. 45, n.º 20, pp. 5478-5481, oct. 2010.
- [67] W. Chung, C. Yang, D. Pijanowska, A. Krzyskow, y W. Torbicz, «ISFET interface circuit embedded with noise rejection capability», *Electron. Lett.*, vol. 40, n.º 18, p. 1115, 2004.
- [68] W. Chung, C. Yang, D. Pijanowska, P. B. Grabiec, y W. Torbicz, «ISFET performance enhancement by using the improved circuit techniques», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 113, n.º 1, pp. 555-562, ene. 2006.
- [69] W. Chung, Y. Lin, D. Pijanowska, C. Yang, M. Wang, A. Krzyskow, y W. Torbicz, «New ISFET interface circuit design with temperature compensation», *Microelectron. J.*, vol. 37, n.º 10, pp. 1105-1114, oct. 2006.

- [70] D. Chen y P. Chan, «An Intelligent ISFET Sensory System With Temperature and Drift Compensation for Long-Term Monitoring», *IEEE Sens. J.*, vol. 8, n.º 12, pp. 1948-1959, dic. 2008.
- [71] P. Batista, «An embedded measurement system for the electrical characterization of EGFET as a pH sensor», *Meas. Sci. Technol.*, vol. 25, n.º 2, p. 27001, feb. 2014.
- [72] H. Jang, J. Gu, y W. Cho, «Sensitivity enhancement of amorphous InGaZnO thin film transistor based extended gate field-effect transistors with dual-gate operation», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 181, pp. 880-884, may 2013.
- [73] T. Minamiki, T. Minami, D. Yokoyama, K. Fukuda, D. Kumaki, y S. Tokito, «Extended-gate organic field-effect transistor for the detection of histamine in water», *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 54, n.º 4S, p. 04DK02, abr. 2015.
- [74] T. Minami, T. Minamiki, K. Fukuda, D. Kumaki, y S. Tokito, «Cysteine detection in water using an organic field-effect transistor with a gold extended-gate electrode», *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 54, n.º 4S, p. 04DK01, abr. 2015.
- [75] T. Goda y Y. Miyahara, «Label-free and reagent-less protein biosensing using aptamer-modified extended-gate field-effect transistors», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 45, pp. 89-94, jul. 2013.
- [76] D. Kim, Y. Jeong, H. Park, J. Shin, P. Choi, J. Lee, y G. Lim, «An FET-type charge sensor for highly sensitive detection of DNA sequence», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, n.º 1, pp. 69-74, jul. 2004.
- [77] D. Kim, H. Park, H. Jung, J. Shin, P. Choi, J. Lee, y G. Lim, «Field Effect Transistor-based Bimolecular Sensor Employing a Pt Reference Electrode for the Detection of Deoxyribonucleic Acid Sequence», *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 43, n.º 6B, pp. 3855-3859, jun. 2004.

- [78] J. Janata, «Chemically-sensitive field-effect transistors», *Anal. Chim. Acta*, vol. 180, pp. 323-325, 1986.
- [79] T. Kajisa y T. Sakata, «Characterization of ion-sensitive extended-gate field effect transistor coated with functional self-assembled monolayer», *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 54, n.º 4S, p. 04DL06, abr. 2015.
- [80] H. Li, C. Yang, C. Kei, C. Su, W. Dai, J. Tseng, P. Yang, J. Chou, y H. Cheng, «Coaxial-structured ZnO/silicon nanowires extended-gate field-effect transistor as pH sensor», *Thin Solid Films*, vol. 529, pp. 173-176, feb. 2013.
- [81] B. Huang, J. Lin, y Y. Yang, «ZnO/Silicon Nanowire Hybrids Extended-Gate Field-Effect Transistors as pH Sensors», *J. Electrochem. Soc.*, vol. 160, n.º 6, pp. B78-B82, abr. 2013.
- [82] Z. Cao, Z. Xiao, L. Zhang, D. Luo, M. Kamahori, y M. Shimoda, «Molecule counting with alkanethiol and DNA immobilized on gold microplates for extended gate FET», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, n.º 3, pp. 1481-1490, abr. 2013.
- [83] Y. Ishige, M. Shimoda, y M. Kamahori, «Immobilization of DNA Probes onto Gold Surface and its Application to Fully Electric Detection of DNA Hybridization using Field-Effect Transistor Sensor», *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 45, n.º 4B, pp. 3776-3783, abr. 2006.
- [84] M. Kamahori, Y. Ishige, y M. Shimoda, «Detection of DNA hybridization and extension reactions by an extended-gate field-effect transistor: Characterizations of immobilized DNA-probes and role of applying a superimposed high-frequency voltage onto a reference electrode», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, n.º 7, pp. 1046-1054, feb. 2008.
- [85] Y. Chiu, C. Lee, L. Lou, S. Ho, y C. Chuang, «Wide linear sensing sensors using ZnO:Ta extended-gate field-effect-transistors», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 188, pp. 944-948, nov. 2013.

- [86] C. Perréard, A. Blin, y U. Bockelmann, «Threshold voltage drift of FET sensor arrays with different gate insulators», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 185, pp. 282-286, ago. 2013.
- [87] D. Kim, J. Park, J. Shin, P. Kim, G. Lim, y S. Shoji, «An extended gate FET-based biosensor integrated with a Si microfluidic channel for detection of protein complexes», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 117, n.º 2, pp. 488-494, oct. 2006.
- [88] J. Rothberg, W. Hinz, T. Rearick, J. Schultz, W. Mileski, M. Davey, J. Leamon, K. Johnson, M. Milgrew, M. Edwards, J. Hoon, J. Simons, D. Marran, J. Myers, J. Davidson, A. Branting, J. Nobile, B. Puc, D. Light, T. Clark, M. Huber, J. Branciforte, I. Stoner, S. Cawley, M. Lyons, Y. Fu, N. Homer, M. Sedova, X. Miao, B. Reed, J. Sabina, E. Feierstein, M. Schorn, M. Alanjary, E. Dimalanta, D. Dressman, R. Kasinskas, T. Sokolsky, J. Fidanza, E. Namsaraev, K. McKernan, A. Williams, G. Roth, y J. Bustillo, «An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing», *Nature*, vol. 475, n.º 7356, pp. 348-352, jul. 2011.
- [89] E. Guerra, G. Silva, y M. Mulato, «Extended gate field effect transistor using V₂O₅ xerogel sensing membrane by sol-gel method», *Solid State Sci.*, vol. 11, n.º 2, pp. 456-460, feb. 2009.
- [90] J. Lin, B. Huang, y Y. Yang, «IGZO nanoparticle-modified silicon nanowires as extended-gate field-effect transistor pH sensors», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 184, pp. 27-32, jul. 2013.
- [91] Y. Chiu, C. Lee, L. Lou, S. Ho, y C. Chuang, «Wide linear sensing sensors using ZnO:Ta extended-gate field-effect-transistors», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 188, pp. 944-948, nov. 2013.

