



Universidad Autónoma de Zacatecas
"Francisco García Salinas"

Unidad Académica de Ingeniería Eléctrica
Doctorado en Ciencias de la Ingeniería

Biosensores electroquímicos de ADN para la detección del Virus del Papiloma humano (VPH) basados en las metodologías: "Frecuencia característica" y "Corriente de relajación".

En cumplimiento parcial de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias

Presenta:

M. en C. José Roberto Espinosa Lumbreras

Asesores:

Dr. Sergio Miguel Durón Torres.

Dra. Marisol Galván Valencia

Zacatecas, Zac. Octubre 2016

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis asesores, el Dr. Sergio Miguel Durón Torres y la Dra. Marisol Galván Valencia, por su paciencia, el entusiasmo que tienen por la ciencia y su valiosa orientación a lo largo de esta investigación. Sin su ayuda, críticas sinceras, valiosas sugerencias y aliento constante, no habría podido llevar a cabo este trabajo.

Siento un profundo sentimiento de gratitud por mis padres y miembros de mi familia por su apoyo continuo durante toda mi vida. En lo personal, me gustaría dar las gracias a mi novia Lucero que siempre ha mostrado un amor incondicional por mí, alentándome y apoyándome en todos los aspectos.

También me gustaría dar las gracias a todos con los que he trabajado en estos últimos años en el laboratorio de Electroquímica de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la UAZ. Específicamente a Cristina, Verónica, Arturo, Christopher, Abdiel, Nicky, Abraham, Daniel, Erika y Lupita, cuya ayuda, amistad y apoyo han sido de gran valor. Tengo ahora la oportunidad para expresar mi agradecimiento a todos ellos.

Este trabajo multidisciplinario no habría sido posible sin el apoyo financiero del CONACYT a través de la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado.

Gracias a la Universidad Autónoma de Zacatecas, en especial al Doctorado en Ciencias de la Ingeniería y a la Unidad Académica de Ciencias Químicas, por permitir mi crecimiento profesional.

Dedicatoria

*A mis queridos padres,
Juan Espinosa Hernández & Antonia Lumbreras García*

Contenido

| | |
|---|-------------|
| Agradecimientos | 5 |
| Dedicatoria | 7 |
| Figuras | iv |
| Tablas | vi |
| Abstract | vii |
| Resumen | viii |
| Resumen gráfico | ix |
| Capítulo 1: Introducción | 1 |
| 1.1 Biosensores | 1 |
| 1.2 Reconocimiento biomolecular | 2 |
| 1.2.1 Enzimas..... | 3 |
| 1.2.2 Antígeno/anticuerpo | 4 |
| 1.2.3 Sensores basados en células..... | 5 |
| 1.2.4 Sensores biomiméticos. | 6 |
| 1.2.5 Sensores de ADN..... | 7 |
| 1.3 Transductores | 8 |
| 1.3.1 Sensores piezoeléctricos | 9 |
| 1.3.2 Sensores magnéticos..... | 10 |
| 1.3.3 Sensores electroquímicos..... | 11 |
| 1.4 Biosensor electroquímico de ADN y sus tipos de detección | 11 |
| 1.4.1 Detección electroquímica directa de ADN. | 13 |
| 1.4.2 Detección electroquímica de ADN indirecta | 14 |
| Capítulo 2: Justificación, hipótesis y objetivos | 19 |
| 2.1 Justificación | 19 |
| 2.2 Objetivo general | 20 |
| 2.3 Objetivos específicos | 20 |
| 2.4 Hipótesis | 21 |
| Capítulo 3: Técnicas electroquímicas | 23 |
| 3.1 Voltamperometría cíclica | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2 Cronoamperometría y cronocoulombimetría | 25 |
| 3.3 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) | 27 |
| Capítulo 4: Metodología experimental | 33 |
| 4.1 Materiales | 33 |
| 4.2 Inmovilización de la sonda de ADN e hibridación..... | 34 |
| 4.3 Densidad superficial de ADN..... | 35 |
| 4.4 Mediciones electroquímicas | 36 |
| Capítulo 5: Biosensor “Frecuencia característica” | 39 |
| 5.1 Introducción | 39 |
| 5.2 Antecedentes..... | 40 |
| 5.3 Fundamento metodológico del biosensor..... | 41 |
| 5.3.1 Frecuencia característica..... | 41 |
| 5.3.2 Extracción del valor de la Resistencia de Transferencia de Carga | 44 |
| 5.3.3 Diseño electrónico del biosensor | 45 |
| 5.4 Resultados..... | 47 |
| 5.4.1 Desempeño del sensor en celda fantasma | 47 |
| 5.4.2 Detección de la hibridación del ADN..... | 49 |
| 5.5 Conclusiones..... | 52 |
| Capítulo 6: Circuito equivalente de ssDNA y dsDNA | 53 |
| 6.1 Introducción | 53 |
| 6.2 Antecedentes..... | 54 |
| 6.3 Fundamento metodológico..... | 60 |
| 6.4 Resultados..... | 62 |
| 6.4.1 Pulso de potencial | 62 |
| 6.4.2 Modelo de circuito equivalente..... | 63 |
| 6.4.3 Desempeño analítico..... | 70 |
| 6.5 Conclusiones..... | 72 |
| Capítulo 7: Biosensor “Corriente de relajación”..... | 75 |
| 7.1 Introducción | 75 |
| 7.2 Fundamento metodológico..... | 76 |

| | |
|---|-----------|
| 7.2.1 Corriente de relajación..... | 76 |
| 7.2.2 Circuito de sensado..... | 80 |
| 7.3 Resultados..... | 81 |
| 7.3.1 Características electroquímicas de electrodos modificados | 81 |
| 7.3.2 Desempeño analítico..... | 84 |
| 7.3.3 Selectividad..... | 86 |
| 7.4 Conclusiones..... | 88 |
| Capítulo 8: Conclusiones generales..... | 89 |
| Bibliografía..... | 93 |

Figuras

| | |
|--|----|
| Fig. 1.1 Operación y componentes típicos en un biosensor..... | 2 |
| Fig. 1.2 Diferentes categorías de los biosensores..... | 2 |
| Fig. 1.3 Esquema de un biosensor enzimático para la detección de un sustrato o un inhibidor de detección [7]. | 4 |
| Fig. 1.4 Principio de detección de un inmunosensor [9]. | 5 |
| Fig. 1.5 Biosensor basado en células [12]. | 6 |
| Fig. 1.6 Biosensor basado en aptámeros [15]. | 7 |
| Fig. 1.7 Biosensor de ADN [18]. | 8 |
| Fig. 1.8 Principio general de funcionamiento de un biosensor de ADN [32]. | 12 |
| Fig. 1.9 Esquema de la estrategia “DNA stem loop” para la detección de la hibridación del ADN [33]. | 15 |
| Fig. 1.10 Representación esquemática de la oxidación de la guanina mediada por un complejo rutenio en solución [32]. | 16 |
| Fig. 1.11 Biosensor de ADN electroquímico basado en la transferencia de carga “long- range” para la detección de mismatch en el ADN [42]. | 17 |
| Fig. 3.1 Potencial vs tiempo en un experimento con voltamperometría cíclica [59]. | 23 |
| Fig. 3.2 Voltamperograma cíclico típico en un proceso redox reversible $O + ne \rightleftharpoons R$ [59]. | 24 |
| Fig. 3.3 Experimento cronoamperométrico: a) forma de onda de potencial aplicado; b) cambio de los perfiles de concentración con el tiempo; c) resultado de respuesta de corriente contra tiempo [60]. .. | 25 |
| Fig. 3.4 En la parte superior se muestra una interfaz electrificada en la que el electrodo está cargado negativamente; cationes están alineados a lo largo de la superficie electrificada. En la parte inferior se muestra los elementos del circuito eléctrico correspondientes a cada componente de la interfaz [66]. | 28 |
| Fig. 3.5 Reflexión de una onda sinusoidal de entrada sobre una curva corriente-voltaje no lineal [68]. | 29 |
| Fig. 3.6 Desfase entre corriente y voltaje en una impedancia compleja, y diagrama de impedancia Z como vector usando coordenadas rectangulares y polares [65]. | 30 |
| Fig. 3.7 a) Circuito equivalente de un sistema electroquímico con dos constantes de tiempo; b) diagrama de Nyquist de un modelo con dos constantes de tiempo simulado sobre un rango de frecuencias de 100KHz-0.01Hz ($R_0=10 \Omega$ $R_1=20 \Omega$, $C_1=0.0001$ F, $R_2=10 \Omega$, $C_2=0.1$ F); c) diagrama de bode de un modelo con dos constantes de tiempo simulado con los mismos parámetros del inciso b) [70]. | 31 |
| Fig. 5.1 Ilustración y modelo eléctrico del ADN/par redox: a) ssDNA inmovilizado y b) dsDNA. | 41 |
| Fig. 5.2 Diagrama eléctrico propuesto para determinar el tiempo de relajación. | 42 |
| Fig. 5.3 Arquitectura electrónica del biosensor de ADN. | 46 |
| Fig. 5.4 Voltaje de relajación obtenido de la celda fantasma Gamry Instruments. | 47 |
| Fig. 5.5 Diagrama de Nyquist obtenido de la celda fantasma Gamry Instruments. | 48 |
| Fig. 5.6 Curvas de carga y descarga del capacitor de doble capa en electrodo compuesto Au/ADN antes (línea azul) y después de la hibridación (línea roja) del ADN. | 49 |
| Fig. 5.7 Comparación de EIS completa (líneas) y la técnica “frecuencia característica”. Electrodo compuesto Au/ADN antes (línea azul) y después de la hibridación (línea roja segmentada) del ADN. | 50 |
| Fig. 6.1 Circuito de Randles [92]. | 55 |
| Fig. 6.2 Representación esquemática del diagrama de Nyquist [86]. | 57 |
| Fig. 6.3 Espectro de impedancia farádica-nofarádica presentado en la forma del diagrama de Nyquist [92]. | 58 |
| Fig. 6.4 Diagrama eléctrico propuesto para la determinación del circuito equivalente. | 61 |

| | |
|---|----|
| Fig. 6.5 Curvas de respuesta de corriente en un electrodo ssDNA/Au aplicando un pulso de 30mV con (línea roja) y sin diodo rectificador (línea negra). | 62 |
| Fig. 6.6 Curvas de respuesta de potencial en un electrodo ssDNA/Au aplicando un pulso de 30mV con (línea roja) y sin diodo rectificador (línea negra). | 63 |
| Fig. 6.7 Curva de decaimiento de potencial del electrodos Au/ssDNA con diodo rectificador. | 64 |
| Fig. 6.8 Curva de decaimiento de potencial del electrodos Au/dsDNA con diodo rectificador. | 65 |
| Fig. 6.9 Componentes principales de potencial: el potencial de la interfase solución/ssDNA (Etop) y el potencial de la interfase ssDNA/Au (Ebottom). | 65 |
| Fig. 6.10 Componentes principales de potencial: el potencial de la interfase solución/dsDNA (Etop) y el potencial de la interfase dsDNA/Au (Ebottom). | 67 |
| Fig. 6.11 Ilustración y modelo eléctrico de ADN/par redox: ssDNA inmovilizado y b) dsDNA. | 68 |
| Fig. 6.12 Diagrama de Nyquist de electrodo de Au/ssDNA y su ajuste con el circuito de Randles (línea azul) y el nuevo circuito equivale (línea verde). | 69 |
| Fig. 6.13 Diagrama de bode de electrodo de Au/ssDNA y su ajuste con el circuito de Randles (línea azul) y el nuevo circuito equivale (línea verde). | 69 |
| Fig. 6.14 Diagrama de Nyquist de electrodo de Au/dsDNA y su ajuste con el circuito de Randles (línea azul) y el nuevo circuito equivale (línea verde). | 70 |
| Fig. 6.15 Diagrama de bode de electrodo de Au/dsDNA y su ajuste con el circuito de Randles (línea azul) y el nuevo circuito equivale (línea verde). | 70 |
| Fig. 6.16 Cambio porcentual de Emtop a diferentes concentraciones de ADN complementario. | 71 |
| Fig. 6.17 Relación entre el cambio porcentual de ΔR_{total} EIS a diferentes concentraciones de ADN complementario. Para esta curva de calibración se empleó la técnica EIS y los datos experimentales de impedancia fueron ajustados con el nuevo circuito equivalente. | 72 |
| Fig. 7.1 Diagrama eléctrico propuesto para determinar la corriente de relajación. | 77 |
| Fig. 7.2 Inyección de carga al electrodo Au/ADN. | 78 |
| Fig. 7.3 Descarga de corriente en el electrodo de Au/ADN. | 79 |
| Fig. 7.4 Arquitectura electrónica del biosensor de ADN “Corriente de relajación”. | 80 |
| Fig. 7.5 Voltaje de relajación (sin capacitor externo Cout) en electrodos de Au/ssDNA y Au/dsDNA. | 82 |
| Fig. 7.6 Voltaje de relajación (con capacitor externo Cout) en electrodos de Au/ssDNA y Au/dsDNA. | 82 |
| Fig. 7.7 Corriente de relajación (con capacitor externo Cout) en electrodos de Au/ssDNA y Au/dsDNA. | 83 |
| Fig. 7.8 Sensibilidad del biosensor de ADN “Corriente de relajación” a diferentes concentraciones de ADN. | 85 |
| Fig. 7.9 Relación entre el cambio porcentual de ΔR_{total} EIS a diferentes concentraciones de ADN complementario. Para esta curva de calibración se empleó la técnica EIS y los datos experimentales de impedancia fueron ajustados con el nuevo circuito equivalente (ir a sección 6.4.2). | 86 |

Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 5.1 Valores experimentales de las propiedades eléctricas de la celda fantasma obtenidos por dos métodos impedimétricos. | 49 |
| Tabla 5.2 Resultados experimentales de los parámetros eléctricos del circuito equivalente en electrodos modificados con ssDNA. | 51 |
| Tabla 5.3 Resultados experimentales de los parámetros eléctricos del circuito equivalente en electrodos modificados con ds DNA. | 51 |
| Tabla 6.1 Parámetros obtenidos desde el ajuste de la Curva de decaimiento de potencial del electrodo Au/ssDNA. | 66 |
| Tabla 6.2 Parámetros obtenidos desde el ajuste de la Curva de decaimiento de potencial del electrodo Au/dsDNA. | 66 |
| Tabla 7.1 Comparación de la variación ΔR_{total} entre el biosensor “ <i>corriente de relajación</i> ” y la técnica EIS para la detección de $1\mu\text{M}$ de ADN complementario de HPV tipo 16. | 87 |
| Tabla 7.2 Comparación de la variación ΔR_{total} entre el biosensor “ <i>corriente de relajación</i> ” y la técnica EIS para la detección de $1\mu\text{M}$ de ADN complementario (1-base mismatched) de HPV tipo 16. | 87 |

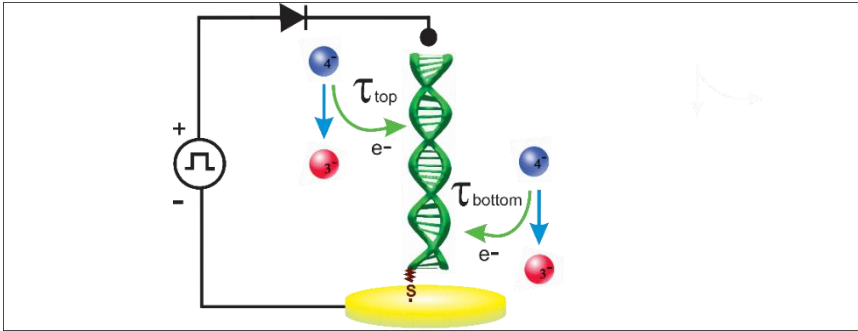
Abstract

The present thesis reports the development of two electrochemical methods for HPV-16 sensing by using a DNA modified gold electrode which is based on potential and current relaxation measurement of the electrode composed double layer. The methods used allowed us to propose an equivalent circuit of DNA/Au electrode which was corroborated by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements. The increase in the potential relaxation and charge transfer resistance were used for sensing the DNA hybridization, using $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ as an electrochemical indicator. In order to determinate the potential and current relaxation of the composed double layer, the faradic and double layer current contributions were separated by using a rectifier diode arrangement. The target HPV-16 DNA sequence was quantified in a concentration interval from 1nM to 1000nM, a detection limit of 0.3nM was obtained. The biosensor shown an effective discrimination between a single-base mismatched sequence and the fully complementary HPV-16 DNA target.

Resumen

La presente tesis reporta el desarrollo de sensores para la detección de VPH-16 fundamentados en dos métodos electroquímicos, los cuales se basan en la medición del potencial y la corriente de relajación de la doble capa en electrodos de Au modificados con ADN. Los métodos utilizados permitieron proponer un circuito equivalente del electrodo Au/ADN el cual fue corroborado con mediciones hechas por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) en los mismos electrodos. El aumento en el potencial de la relajación y la resistencia de transferencia de carga se utilizó para detectar la hibridación de ADN, usando el par $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ como indicador electroquímico redox. Con el fin de determinar el potencial y la corriente de relajación en la doble capa, las contribuciones faradaicas y no-faradaicas a la corriente fueron separadas mediante el uso de un diodo rectificador. La secuencia de ADN blanco del HPV-16 se detectó en un intervalo de concentración de 1 nM a 1000 nM, y fue obtenido un límite de detección de 0.3 nM. Los biosensores mostraron una discriminación efectiva entre una secuencia no complementaria (un solo mismatch) y el ADN totalmente complementario del VPH-16.

Resumen gráfico



Cargado eléctrico de la doble capa de un electrodo de Au modificado con ADN y el direccionamiento del flujo de corriente en la etapa de descarga únicamente sobre la superficie del electrodo.

Capítulo 1: Introducción

1.1 Biosensores

Durante la última década, los avances tecnológicos nos han proporcionado las herramientas y materiales necesarios para la construcción de biosensores. Desde la primera invención del sensor de oxígeno: Electrodo de Clark, ha habido muchas mejoras en la sensibilidad, selectividad y capacidad de conmutación en los biosensores modernos [1]. De acuerdo con la IUPAC en 1999, un biosensor es un dispositivo transductor-receptor integrado de forma independiente, que es capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semi-cuantitativa utilizando un elemento de reconocimiento biológico. Esencialmente, un biosensor es un dispositivo analítico, que incorpora un elemento de reconocimiento biológico para detectar un analito biológico o no biológico específico [2], integrado con un transductor para convertir una señal biológica en una señal eléctrica [3]. Un biosensor consta de tres elementos principales, un bioreceptor, un transductor y un sistema de procesamiento de señales. El elemento de reconocimiento o bioreceptor, puede tratarse de anticuerpos, ácidos nucleicos, enzimas e incluso células inmovilizadas. Mientras que el transductor convierte los cambios químicos o físicos debidos el reconocimiento del analito en una señal eléctrica [4]. Finalmente, la señal eléctrica es amplificada, enviada a un microcontrolador y a un procesador de datos. El transductor puede ser electroquímico, óptico, piezoeléctrico, termométrico, mecánico o magnético. La **Fig. 1.1** muestra un diagrama esquemático de los componentes típicos de un biosensor.

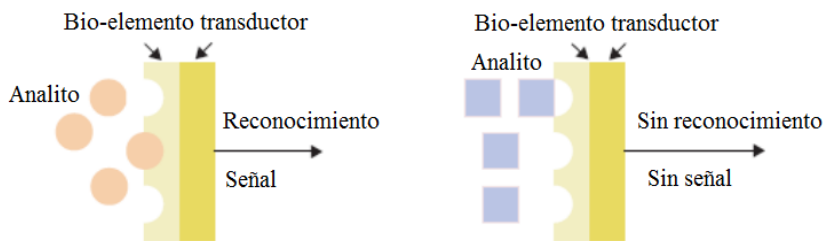


Fig. 1.1 Operación y componentes típicos en un biosensor.

Los biosensores se pueden clasificar, ya sea por el tipo de mecanismo de señalización biológica que utilizan o por el tipo de transducción de señales o, alternativamente, una combinación de los dos.

La Fig. 1.2 muestra la clasificación de los biosensores.

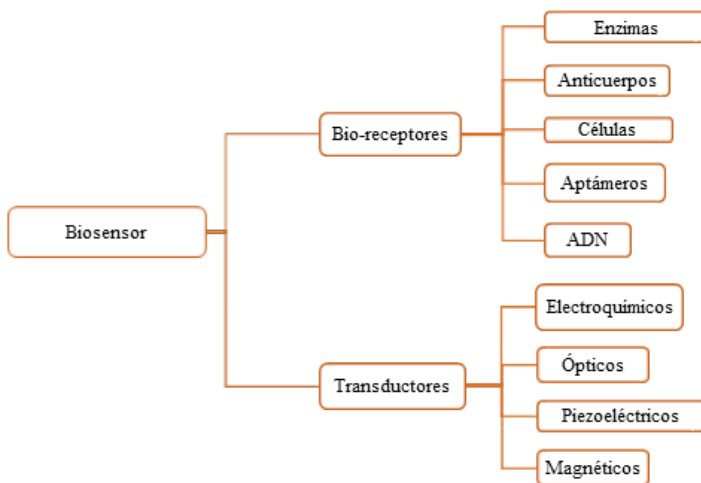


Fig. 1.2 Diferentes categorías de los biosensores.

1.2 Reconocimiento biomolecular

El reconocimiento biomolecular es el proceso por el cual las biomoléculas se unen a sus blancos moleculares, de manera altamente específica, y reversible, y es generalizable a una gama prácticamente

ilimitada de analitos en solución. En consecuencia, se ha explotado su empleo en una amplia gama de tecnologías de diagnóstico y de síntesis. El reconocimiento biomolecular se rige generalmente por muchas interacciones débiles que trabajan de manera concertada. La más importante de estas interacciones incluyen: (i) la electrostática entre cargas permanentes, dipolos, y cuadrupolos, (ii) la polarización en la distribución de carga entre moléculas interactuantes que conducen a la aparición de fuerzas de inducción y dispersión, (iii) el principio de la exclusión de Pauli derivado de la repulsión interatómica, y (iv) la fuerza de atracción que se deriva en gran medida de la entropía del disolvente denominado efecto hidrofóbico. Dado que el entorno acuoso reduce significativamente el impacto de las interacciones electrostáticas y de inducción, el efecto hidrofóbico es a menudo la fuerza dominante para la estabilización y la formación correcta de complejos biomolécula-blanco [2].

En base al mecanismo de señalización biológico empleado, los biosensores se clasifican en las categorías indicadas en la **Fig. 1.2.**, las cuales se describen a continuación.

1.2.1 Enzimas

Los biosensores basados en enzimas como elementos de reconocimiento son de los más extensamente estudiados. Desde el primer biosensor de glucosa desarrollado por Clark y Lyons en 1962, los biosensores basados en enzimas se han diversificado en sus aplicaciones. La alta especificidad de las interacciones enzima-sustrato y la rápida velocidad de regeneración del biocatalizador explican la alta sensibilidad de estos biosensores, lo que los hace potentes herramientas analíticas [5, 6]. El desempeño de un biosensor enzimático se basa en su actividad catalítica en ausencia o presencia de su sustrato o un inhibidor, así como en la fuerza de unión [7] (ver **Fig. 1.3**).

Los biosensores enzimáticos pueden acoplarse a transductores electroquímicos cuando están involucradas reacciones de óxido-reducción; u ópticos cuando hay cambios en fluorescencia, absorbancia, bio y quimioluminiscencia; adicionalmente una reacción enzimática da lugar a un cambio de entalpía que se puede registrar como una variación de temperatura por un termistor; y por otro lado durante una reacción es posible registra un cambio de masa lo que correspondería a un biosensor gravimétrico.

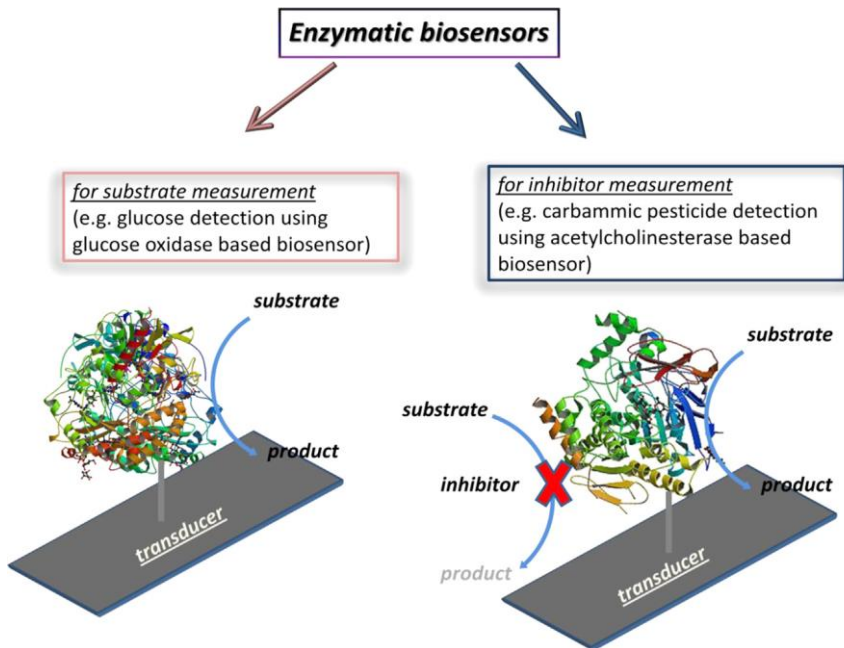


Fig. 1.3 Esquema de un biosensor enzimático para la detección de un sustrato o un inhibidor de detección [7].

1.2.2 Antígeno/anticuerpo

Con el tiempo, las tecnologías de biosensores se han vuelto cada vez más sofisticadas. Una de estas tecnologías es el sistema de reconocimiento basado en anticuerpos, cuyo pasado y usos actuales han inspirado plataformas a gran escala de biosensores conmutados [8]. Los anticuerpos (Abs) son una clase de proteínas que responden a la presencia de sustancias extrañas llamadas antígenos (Ag). La unión Ag-Ab se basa en interacciones no covalentes para formar el complejo Ag-Ab que exhiben alta selectividad y sensibilidad [9]. Los inmunosensores son sistemas de sensado basados en interacciones entre Ag y Ab acoplados a señales de transducción (ver **Fig. 1.4**) [10]. Además, dependiendo de la tecnología de la transducción los inmunosensores pueden ser clasificados en tres clases principales: electroquímico, óptico y piezoeléctrico. Generalmente los inmunocomplejos no son electroactivos y no tienen propiedades redox, por lo tanto, una etiqueta redox externa se adjunta a estos sistemas para permitir que la señal de interacción sea leída. Varias immuno-etiquetas se han

utilizado para amplificar la señal, tales como enzimas y nanomateriales, nanopartículas metálicas, quantum dots, nanopartículas magnéticas, nanotubos de carbono, nanopartículas de oro (AuNPs), etc [11].

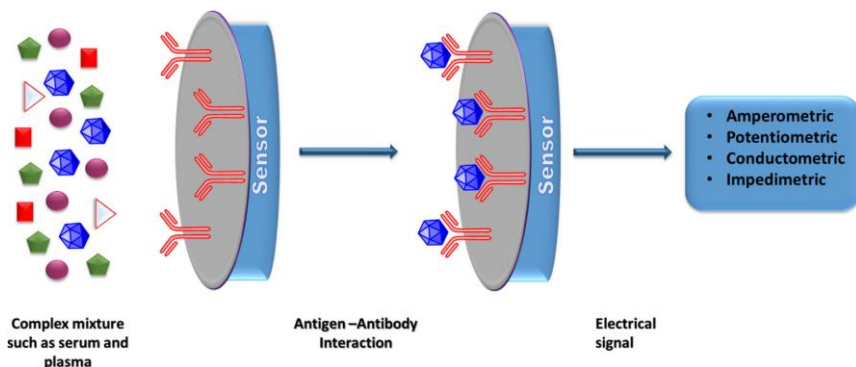


Fig. 1.4 Principio de detección de un inmunosensor [9].

1.2.3 Sensores basados en células

Los biosensores basados en células son dispositivos especiales que emplean como elementos de detección células vivas inmovilizadas, acopladas a sensores o transductores para detectar la condición intracelular y microambiente extracelular, parámetros fisiológicos, y producir respuestas a través de la interacción entre el estímulo y las células. La característica principal de estos biosensores es que emplean células vivas como los receptores, en contraste con los otros tipos de biosensores que contienen sólo materiales extraídos de los seres vivos. El esquema básico de un biosensor basado en células se muestra en la **Fig. 1.5**. En estos biosensores las células vivas se depositan e inmovilizan en la superficie del transductor, así cuando las células detectan estímulos externos de tipo eléctrico o químicos como la presencia de fármacos y ligandos responden con cambios en el metabolismo celular o en la concentración intracelular de moléculas e iones que promueven la generación de un potencial de acción. Estos procesos pueden detectarse como cambios en la impedancia, de potencial o de corriente [12]. En la actualidad la investigación en este tipo de biosensor se centra en la inmovilización de células vivas y su acoplamiento al transductor para obtener señales reproducibles y precisas [13].

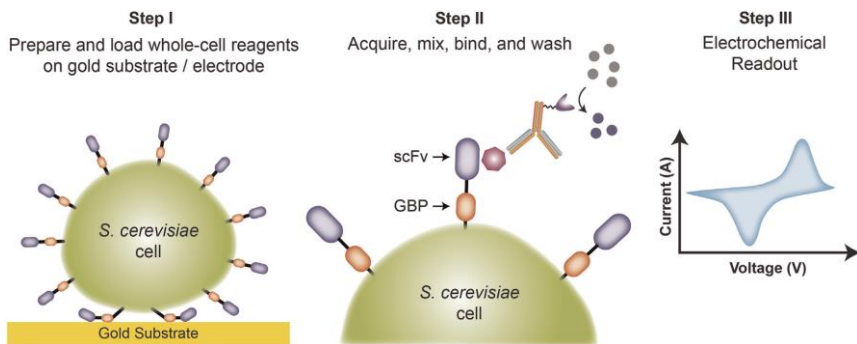


Fig. 1.5 Biosensor basado en células [12].

1.2.4 Sensores biomiméticos.

Un sensor biomimético incorpora como biocomponente a una molécula sintética que imita la función de una biomolécula natural (Ver **Fig. 1.6**) [6]. Por ejemplo, los aptámeros son moléculas sintéticas de ADN o ARN de cadena sencilla que se sintetizan por métodos químicos y se seleccionan in vitro de genotecas de oligonucleótidos mediante su unión específica y de alta afinidad a la molécula diana. El plegamiento tridimensional de la cadena del aptámero permite la unión de alta afinidad al ligando y esta propiedad se emplea para seleccionar al oligonucleótido específico desde la genoteca. Este enfoque combinatorial se conoce como SELEX (siglas en inglés para evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial). Las secuencias enlazadas son entonces amplificadas por PCR para luego repetir el ciclo de selección de 6 a 10 veces en que las condiciones de selección se van volviendo más rigurosas hasta aislar la secuencia con mayor afinidad comparable incluso a la de los anticuerpos [14]. Así el aptámero seleccionado puede ser producido con una alta pureza. Los aptámeros pueden ser fácilmente modificados con diversas etiquetas o marcadores, incluidos los indicadores electroquímicos y las sondas fluorescentes. A diferencia de los anticuerpos los aptámeros se pueden regenerar fácilmente sin pérdida de afinidad y selectividad. Sin embargo, la inmovilización del aptámero a la superficie del transductor o cambios en el entorno puede influir en su estructura y por lo tanto la facilidad de interacción con el ligando.

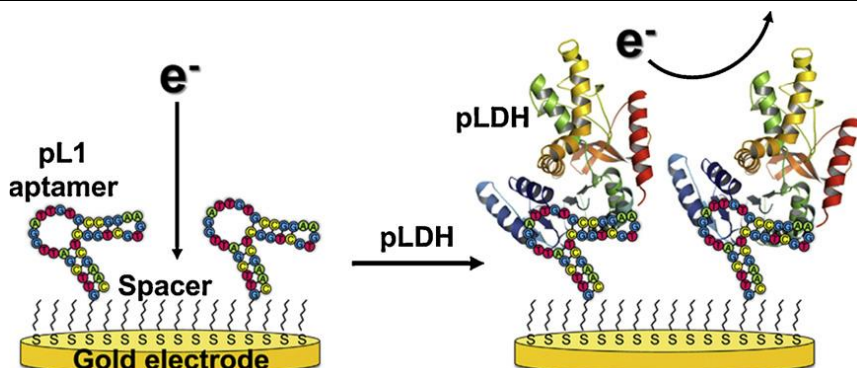


Fig. 1.6 Biosensor basado en aptameros [15].

1.2.5 Sensores de ADN

La alta afinidad específica de unión entre dos cadenas sencillas de ácido desoxirribonucleico (ADN) para formar una cadena doble es el principio utilizado en los biosensores de ADN, designando a los ácidos nucleicos como el elemento de reconocimiento biológico. Los biosensores de ADN consisten en una cadena de ADN inmovilizada para detectar la secuencia complementaria por hibridación ADN-ADN [16], como se muestra en el **Fig. 1.7**. Las relaciones de complementariedad entre los ácidos nucleicos adenosina y timina, y citosina con guanósina constituyen la base de la especificidad de los biosensores [6]. Las secuencias de ADN retienen su capacidad para hibridar incluso si algunas de las bases nucleicas no interactúan entre sí. Tal perturbación en la complementariedad total se denomina “*mismatch*”. La selectividad de la detección de la hibridación de ADN se caracteriza por la posibilidad de distinguir secuencias totalmente hibridadas y no complementarias “*mismatch*”. La reacción de hibridación de ADN es reversible. La exposición del blanco con la prueba se traduce en la hibridación de las cadenas sencillas de ADN complementarias para formar la doble cadena de ADN, dando como resultado la producción de una reacción bioquímica que permite que el transductor convierta esta modificación biológica en una señal eléctrica que puede ser medida.

Un calentamiento lento “fusión de ADN” rompe los enlaces de hidrógeno en los pares de bases, y un enfriamiento brusco evita que las moléculas de cadena sencilla de ADN se vuelvan a hibridar [17].

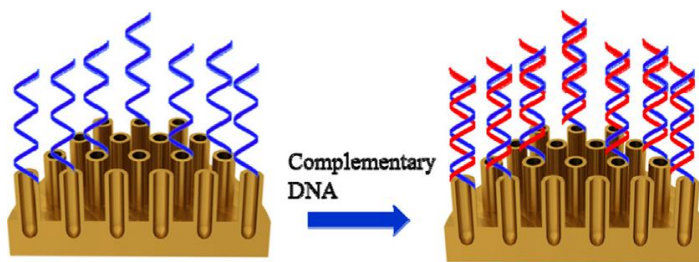


Fig. 1.7 Biosensor de ADN [18].

1.3 Transductores

Los biosensores también se pueden clasificar en base al método de transducción que emplean. El transductor es el dispositivo o componente del biosensor que convierte con alta sensibilidad y mínima perturbación una amplia gama de respuestas físicas, químicas o biológicas en una señal eléctrica de suficiente magnitud para ser detectada. Los transductores se describen a menudo en términos de su sensibilidad a las señales de entrada o la capacidad de respuesta, que es simplemente la relación de la señal salida respecto a su señal de entrada. Hay una serie de métodos de transducción que se han desarrollado en la última década, los cuáles pueden ser clasificados de acuerdo a la propiedad particular a medir, como: eléctrica, óptica, másica o térmica, y están diseñados para detectar y responder a un analito en estado de gas, líquido o sólido (**Fig. 1.2**).

Sensores ópticos

Como se ha definido anteriormente, un biosensor acopla una reacción de unión ligando-receptor con un mecanismo de transducción. En un biosensor óptico, el producto de la reacción provoca un cambio significativo en la respuesta del transductor tras ser irradiada por un haz de luz incidente o la reacción emite una señal óptica que es detectada por el transductor[19]. En general, existen dos protocolos de detección que se pueden implementar en biosensores ópticos: detección basada en fluorescencia y detección “*Label-free*”. En la detección basada en fluorescencia, las moléculas blanco o las moléculas de reconocimiento son etiquetadas con marcadores fluorescentes, tales como los fluorocromos; la intensidad de la fluorescencia indica la presencia de la molécula blanco y la fuerza de interacción entre el analito y las moléculas de reconocimiento. Por el contrario, en la detección “*Label-free*”, se refiere a moléculas que no

están etiquetadas o alteradas ópticamente, y se detectan en sus formas naturales. Este tipo de detección es relativamente fácil y barata de realizar, y permite la medición cuantitativa y cinética de las interacciones moleculares. Además, algunos mecanismos de detección “*Label-free*” miden el cambio en el índice de refracción (RI) inducido por las interacciones moleculares, que se relaciona con la concentración de la muestra o la densidad en la superficie, en lugar de la masa total de la muestra.

A pesar de todas estas diferencias entre la detección “*Label-free*” y la fluorescencia, ambos protocolos están siendo ampliamente utilizados en sensores ópticos y proporcionan información vital y complementaria con respecto a las interacciones entre biomoléculas, lo que hace que los sensores ópticos sean más versátiles que otros tipos de tecnologías de detección, tales como la onda acústica superficial y la microbalanza de cristal de cuarzo en donde sólo la detección “*Label-Free*” puede ser implementada [20]. Este método de transducción ha sido empleado en muchas clases de biosensores debido a los diferentes tipos de espectroscopías, tales como los de absorbancia, fluorescencia, fosforescencia, Raman, refracción SERS y espectroscopía de dispersión [19].

1.3.1 Sensores piezoeléctricos

En un biosensor piezoeléctrico el transductor está construido de un cristal sintético o natural. Cualquier tipo de transductor acústico, como la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) o un dispositivo de onda acústica superficial (SAW), se basan fundamentalmente en el efecto piezoeléctrico. Cuando un material piezoeléctrico es sometido a estrés físico, una diferencia de potencial eléctrico se produce en la superficie del cristal. Naturalmente, también se puede observar el efecto contrario, es decir, la aplicación de una carga eléctrica en un material piezoeléctrico conduce a la distorsión mecánica, el llamado efecto piezoeléctrico inverso. Estos fenómenos se pueden utilizar para transformar una señal eléctrica en una mecánica. Diferentes materiales se aplican para la fabricación de dispositivos, tales como cuarzo, tantalato de litio o titanato de litio. El cuarzo, es el más popular, ya que es inherentemente barato, puede ser procesado para producir monocristales con bastante facilidad y puede soportar ambientes químicos habituales, estrés térmico y mecánico [21]. Esencialmente, el biosensor piezoeléctrico trabaja sobre el principio de que

un cristal oscilante resuena a una frecuencia de resonancia natural. La frecuencia está controlada por una señal eléctrica externa que produce un cierto valor de corriente eléctrica, cuando el analito problema está expuesto al material de detección su unión o reacción con la biomolécula de sensado provocará un desplazamiento de la frecuencia de vibración natural que producirá cambios en la lectura de la corriente eléctrica directamente relacionados con la masa del analito de interés.

1.3.2 Sensores magnéticos.

Los biosensores magnéticos basan su funcionamiento en el enlace específico entre la superficie biológicamente funcionalizada con la molécula de reconocimiento y la biomolécula blanco magnéticamente etiquetada [22]. El momentum magnético de los marcadores unidos al sensor será proporcional a la cantidad de analito a medir [23].

Debido a su pequeño volumen, las Nanopartículas magnéticas (MNPs) son generalmente superparamagnéticas, lo que significa que no tienen dipolo magnético neto. Por lo tanto, las fluctuaciones térmicas causan orientación aleatoria de los espines (es decir, la energía térmica puede ser suficiente para causar el cambio espontáneo en la magnetización de cada MNP). Por lo tanto, en ausencia de un campo electromagnético, el momento magnético neto de una MNP será cero a temperaturas suficientemente altas, pero, cuando un campo magnético se aplica a la NP, se induce un dipolo magnético y habrá una alineación neta de los momentos magnéticos. Después de que el campo magnético externo se retira, las MNP se orientan al azar y vuelven a su estado no magnético nativo [24].

El magnetismo es un excelente medio para interactuar con sistemas biológicos de interés, debido a que los campos magnéticos no interferirán con la bioquímica en cuestión. Las etiquetas magnéticas tienen propiedades muy estables en el tiempo, ya que no se ven afectadas por ningún reactivo químico y no sufren "*photo-bleaching*". Además, son fáciles de detectar, ya que es insignificante la señal de fondo magnético en muestras biológicas de interés. El uso de etiquetado magnético de los objetos biológicos (por ejemplo, ADN, proteínas, o bacterias) con microesferas que contienen materiales magnéticos ha encontrado varios usos: por ejemplo, en la separación de células; para ordenar, detectar y eliminar las células cancerosas; o separar y recoger moléculas particulares de interés [23].

1.3.3 Sensores electroquímicos

Se reconoce que la electroquímica juega un papel importante en la investigación y desarrollo de los biosensores. Es una rama de la ciencia, que estudia los procesos químicos y físicos que implican una transferencia de carga. La electroquímica se utiliza para estudiar las reacciones que involucran pérdida de electrones (oxidación) o ganancia de electrones (reducción) en diversos materiales. Las reacciones de reducción y oxidación se conocen comúnmente como reacciones redox y pueden proporcionar información sobre la concentración, la cinética, los mecanismos de reacción, estado químico y otros comportamientos de una especie química en solución o que está formando parte de un electrodo [25]. A medida que ciertas moléculas se oxidan o se reducen en electrodos metálicos inertes, los electrones se transfieren desde el analito al electrodo de trabajo o para el analito desde el electrodo [26]. Un electrodo denominado el contraelectrodo se usa comúnmente para ayudar a medir el flujo de corriente.

Hay tres generaciones de biosensores electroquímicos: en la primera generación el producto normal de la reacción difunde al transductor y causa una respuesta eléctrica; en los de segunda generación se incorporan mediadores específicos entre el sistema de reacción y el transductor con el fin de generar una respuesta mejorada, y los biosensores de tercera generación en donde la reacción por sí misma causa la respuesta y ningún producto, mediador o difusión es directamente involucrado [27]. Los biosensores electroquímico tienen ventajas tales como la velocidad, simplicidad, bajo costo, alta sensibilidad, y una instrumentación relativamente simple [28], y dependiendo de la naturaleza de los cambios electroquímicos detectados durante el evento de bio-reconocimiento se ubican en cuatro principales categorías: amperométrica, potenciométrica, impedimétrica y conductimétrica.

1.4 Biosensor electroquímico de ADN y sus tipos de detección

Desde que Watson y Crick propusieron la estructura de doble hélice del ADN en 1953 [29, 30], la identificación y secuenciación de cadenas de

ADN ha recibido mucha atención. El ADN es el portador de la información genética y el material base de la herencia biológica. Las secuencias de ácido nucleico, que son distintas en cualquier organismo vivo, virus o patógeno, proporcionan medios prácticos para identificar y diagnosticar diversas enfermedades. La hibridación de una secuencia de ADN específica con su cadena complementaria es la base de todos los tipos de tecnologías para la determinación de ADN.

El diseño de un biosensor electroquímico de ADN se basa en la detección bajo condiciones controladas de la hibridación del ADN mediante el seguimiento, por lo general, de un cambio de corriente eléctrica. Cuando un electrodo previamente modificado con una sonda de oligonucleótido de secuencia conocida y de interés, se sumerge en una solución problema que contenga a la cadena complementaria al oligonucleótido inmovilizado en la superficie del electrodo, se forma la cadena doble de ADN híbrido (**Fig. 1.8**). Así el evento de hibridación puede ser detectado por cambios en la corriente eléctrica, de forma indirecta si se emplean indicadores electroactivos que se unen preferentemente a la cadena doble, o bien de forma directa mediante cambios en la conductividad o capacitancia del electrodo. El reto en la preparación de electrodos eficaces modificados con ADN está en el diseño y ensamble de la sonda al electrodo [31].

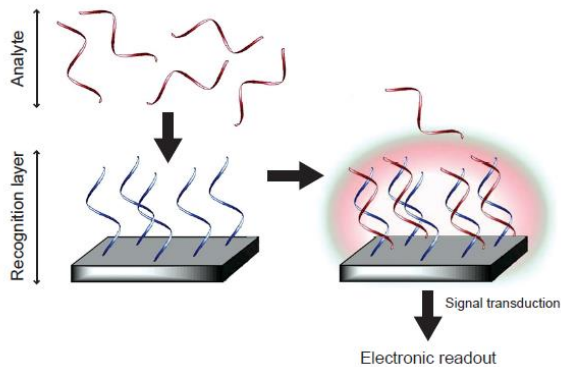


Fig. 1.8 Principio general de funcionamiento de un biosensor de ADN [32].

1.4.1 Detección electroquímica directa de ADN.

Los métodos directos o “*Label-free*” para la detección de la hibridación del ADN se basan en diferenciar cambios de la estructura flexible del ssDNA a la estructura más rígida dsDNA o en la detección directa de la oxidación electroquímica de las bases de guanina [33].

La primera estrategia para cuantificar electroquímicamente el ADN depositado, se basó en la detección directa de la oxidación y reducción del ADN empleando un electrodo de mercurio. Cabe señalar que estos biosensores no podían ser regenerados para llevar a cabo posteriores hibridaciones, debido a que la oxidación de las bases de guanina es irreversible [34]. Hace más de 55 años, Palecek y colaboradores desarrollaron métodos para discriminar una sola cadena de ADN contra una doble mediante su reducción directa [35]. Recientemente, la oxidación del ADN se ha llevado a cabo a través de voltamperometría de redisolución por adsorción (ASV).

Palecek y colegas [36] y Wang y Kawde [37] han reportado por separado una estrategia de dos pasos para la captura de secuencias blanco o problema utilizando sondas de ADN inmovilizadas sobre esferas magnéticas. Después de la hibridación, las esferas se separan magnéticamente de la solución del analito. El ADN capturado se redissuelve en solución ácida, y las guaninas y adeninas se analizan mediante ASV [32].

Los métodos “*Label-free*” se pueden extender a la utilización de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Este método mide el cambio en la impedancia farádica, en presencia de una especie redox indicadora tal como el par ferricianuro/ferrocianuro, desde un electrodo modificado con ssDNA-antes y después de su hibridación. Debido al aumento en la repulsión del ion ferricianuro por la carga negativa de la doble cadena de ADN, se observa un aumento en la resistencia de transferencia de carga después del evento de hibridación. Recientemente, el uso de la técnica de EIS se ha empleado con sensores ADN, sensores basados en nanopartículas de oro y polímeros conductores. Este último método implica la unión de nanopartículas de oro en una bicapa de un silano que contiene grupos tiol inmovilizados en un electrodo de oro [33].

1.4.2 Detección electroquímica de ADN indirecta

Los métodos indirectos o etiquetados son significativamente más populares que los “*Label-free*”, debido a que proporcionan más alternativas en las que la transducción se puede configurar con una alta sensibilidad y selectividad. En biosensores de ADN electroquímicas las etiquetas son típicamente moléculas redox activas que se intercalan entre los pares de bases del ADN de doble hélice, y por lo tanto no interactúan significativamente con el ssDNA, o bien son moléculas que se unen preferentemente a cualquiera forma ya sea de ssDNA o dsDNA [33].

Indicador redox específico de ADN.

Por analogía a los métodos basados en fluorescencia, varias estrategias se han propuesto en las que secuencias de ADN blanco que son marcadas con moléculas redox. La aparición de la respuesta electroquímica característica de la etiqueta redox señala el evento de hibridación [38, 39]. Los cambios físicos en el ADN, desde la forma flexible del ssDNA a la forma rígida dsDNA en forma de barra se pueden utilizar también para la detección en los métodos que emplean etiquetas, similarmente a los métodos libres de etiquetas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, es común emplear una etiqueta de ferroceno al final de la sonda inmovilizada [40, 41], la etiqueta de ferroceno se une a una estructura en forma de bucle del ADN “*stem-loop*”, inmovilizada en una superficie de oro, la flexibilidad del ssDNA permite que la etiqueta ferroceno se encuentre en las cercanías de la superficie del electrodo de manera que puede ser oxidado y reducido fácilmente. Tras la hibridación, el ADN dúplex se transforma en una forma rígida, que aumenta la distancia para la transferencia de electrones desde el electrodo a la etiqueta de ferroceno, de tal manera que prácticamente no es posible observar ninguna transferencia de electrones y por lo tanto existe una ausencia de la señal electroquímica [33], esto se puede observar en la **Fig. 1.9** en dónde se representa la inhibición de la transferencia de carga al aumentar la distancia entre la etiqueta del ADN y el electrodo.

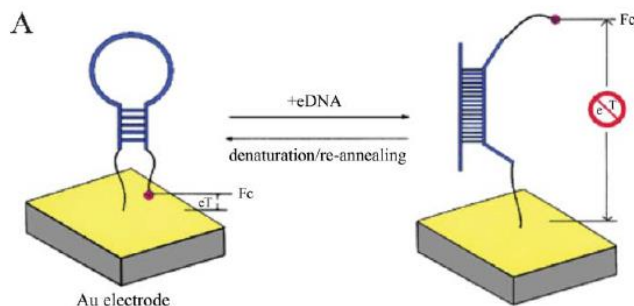


Fig. 1.9 Esquema de la estrategia “DNA stem loop” para la detección de la hibridación del ADN [33].

Mediador electrónico específico de ADN

En un enfoque alternativo a los sistemas químicos de etiquetado, se pueden emplear moléculas redox mediadoras que intrínsecamente se asocian con la doble hélice de forma no covalente. Estas moléculas se han utilizado con éxito para el análisis electroquímico de ADN. En estos análisis, la molécula redox es el *mediador* (electrostático o intercalante) que transfiere electrones hasta una base del ADN permitiendo su oxidación o reducción. Estos ensayos pueden proporcionar alta sensibilidad y simplicidad [32]. Los métodos indirectos requieren mediadores que permiten el intercambio reversible de electrones con el electrodo. Los mediadores de electrones más comunes son: $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$, osmio (Os), $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$, ferroceno y MB [31]. En este tipo de alternativa, se han explorado diferentes formas de oxidar el ADN (blanco o problema) indirectamente a través de la utilización de mediadores electroquímicos también. Por ejemplo, una respuesta amplificada de la señal de hibridación de guanina puede ser obtenida mediante el uso de la acción electrocatalítica del mediador $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$ [31]. En la **Fig. 1.10** se representa la oxidación indirecta del ADN blanco a través del uso del mediador $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$.

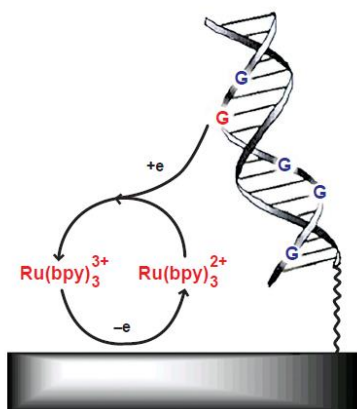


Fig. 1.10 Representación esquemática de la oxidación de la guanina mediada por un complejo rutenio en solución [32].

Otro tipo de mediadores de ADN son aquellos que emplean una molécula redox intercalada en el apilamiento tipo π del ADN. Este tipo de mediadores han demostrado que la transferencia de carga en distancias largas “*long-range electron transfer*” es excepcionalmente sensible a perturbaciones en el apilamiento de bases tal como un *mismatch*. En particular, en una dsDNA que contiene un intercalador unido covalentemente, la reducción u oxidación del intercalador puede ser llevado a cabo con un buen apilamiento de bases de ADN, pero puede ser obstruida en la presencia de un *mismatch*. Esta sensibilidad depende del acoplamiento electrónico en el apilamiento de las pares de bases más que en la termodinámica de la unión de las bases [42].

El uso de intercaladores como el azul de metileno combinados con señales redox de un compuesto electroactivo como el ferricianuro han facilitado el transporte de carga a través de la doble cadena de ADN creando un efecto electrocatalítico (**Fig. 1.11**). En este proceso electrocatalítico, los electrones fluyen desde la superficie del electrodo al MB^+ intercalado en el ADN. La reducción del MB^+ (LB^+) a su vez reduce el ferricianuro en solución, de modo que más electrones pueden fluir y el ciclo catalítico continúa. En cadenas dobles de ADN que contienen uno o más *mismatch*, pocas moléculas de MB^+ son electroquímicamente reducidas por lo que la concentración del catalizador activo se reduce en gran medida y la respuesta electrocatalítica general se ve disminuida.

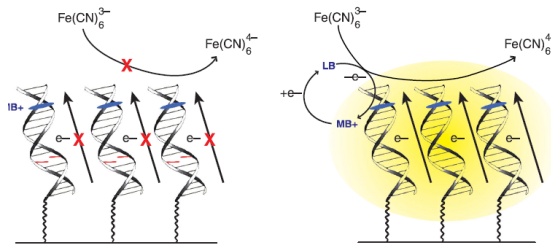


Fig. 1.11 Biosensor de ADN electroquímico basado en la transferencia de carga “long- range” para la detección de mismatch en el ADN [42].

La transferencia de carga de largo alcance, a través del ADN puede ser utilizado no sólo para detectar que se ha formado una estructura dúplex de ADN, sino también para proporcionar información sobre la calidad de la doble cadena formada [33]. El resultado es un biosensor de ADN con una selectividad superior, y mayor sensibilidad a las perturbaciones en la secuencia de bases, tales como los desfases [43]. Esta estrategia fue iniciada por Barton y colaboradores [42] utilizando intercaladores tales como el azul de metileno o la daunomicina. La estrategia depende de la capacidad del dsDNA para actuar como un conductor para la transferencia de carga a distancias de 40 Å o más [44], capacidad que el ssDNA no posee. Por lo tanto, cuando se forma una cadena dúplex de ADN, el MB o la daunomicina intercalados en la doble cadena pueden ser oxidados a través de la transferencia de carga a través del ADN. Si la sonda de ADN no ha hibridado con el blanco se observará una corriente muy reducida.

Capítulo 2: Justificación, hipótesis y objetivos

2.1 Justificación

En todo el mundo el cáncer cervical es una de las principales causas de muerte. Se presenta principalmente en mujeres de 30 a 50 años de edad, estimándose una tasa de incidencia actual de 500,000 mujeres por año, con una mortalidad de 200,000. Entre estos casos, el 80% de todos los pacientes son de países en desarrollo que tienen recursos limitados para el cuidado de la salud [45].

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus de ADN de doble cadena responsable de las infecciones de transmisión sexual más comunes, que afecta la piel y membranas mucosas [46, 47]. De los 200 tipos de VPH, 40 infectan el área de los genitales [48], siendo los de alto riesgo los implicados en el desarrollo de cáncer cervical invasivo [49]. Particularmente los genotipos del VPH 16 y 18 se han identificado en alrededor del 80% de las biopsias de cáncer cérvico uterino [50-53], de ahí la importancia de realizar la detección temprana de infección por VPH16 y 18.

Diversas técnicas moleculares se han desarrollado y aplicado con el objetivo de diagnosticar la infección de VPH. Actualmente, las técnicas más utilizadas son el ensayo de Captura de Híbridos (HC2) [45, 54], replicación en círculo rodante (RCA) [55, 56], Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) [57] y piezoeléctricas [45]. Sin embargo, problemas de reproducibilidad, rigurosos requerimientos en infraestructura e instrumentación, hacen de las técnicas de biología molecular y espectroscopía de fluorescencia opciones poco viables para el análisis de rutina.

En este sentido la detección electroquímica de secuencias de ADN específicas del VPH se presenta como una opción viable [49]. Estudios recientes señalan la factibilidad para desarrollar biosensores electroquímicos basados en el fenómeno de hibridación entre cadenas de

ADN. Estos dispositivos presentan ventajas como el bajo costo, alta sensibilidad, uso de un pequeño volumen de muestra, compatibilidad con la fabricación en serie, facilidad de microfabricación, simplicidad en su manejo y portabilidad [58].

El presente trabajo pretende contribuir con la propuesta de dos biosensores electroquímicos para la detección del VPH16 basados en los principios de “*relajación de corriente*” y “*frecuencia característica*”. A diferencia de los biosensores electroquímicos de ADN tradicionales, los biosensores aquí propuestos ofrecen ventajas, como: minimizar las etapas de procesamiento de la señal, minimizar la adquisición de datos, reducir los tiempos de detección y simplificar el método de transducción. Dichas características representan una excelente oportunidad para fabricación de sensores de ADN aplicado a pruebas de diagnóstico en el punto o sitio de atención (*Point of Care Test*).

2.2 Objetivo general

Diseñar, caracterizar y construir dos biosensores electroquímicos de ADN para la detección de VPH tipo 16 basados en los principios de detección “*Frecuencia característica*” y “*Corriente de relajación*”.

2.3 Objetivos específicos

- Determinar las condiciones experimentales eléctricas, que se requieren para medir el potencial de relajación en la superficie del electrodo modificado con ssDNA y dsDNA.
- Establecer un sistema electrónico adecuado para medir la corriente de relajación en la superficie del electrodo modificado con ssDNA y dsDNA.
- Proponer y validar el circuito equivalente de un electrodo de Au modificado con ssDNA y dsDNA en su superficie.

2.4 Hipótesis

Tras el cargado eléctrico de la doble capa de un electrodo de Au modificado con ADN es posible direccionar el flujo de corriente en la etapa de descarga únicamente sobre la superficie del electrodo. Lo cual nos permite emplear las técnicas de “*Frecuencia característica*” y “*Corriente de relajación*” para detectar la hibridación de secuencias de ADN específicas del VPH tipo 16.

Capítulo 3: Técnicas electroquímicas

3.1 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica es la técnica más ampliamente usada para adquirir información cualitativa acerca de las reacciones químicas. La voltamperometría cíclica tiene la capacidad de proporcionar rápidamente información considerable sobre la termodinámica de los procesos redox, sobre la cinética de reacciones heterogéneas de transferencia de electrones y sobre las reacciones químicas acopladas o procesos de adsorción. La voltamperometría cíclica es a menudo el primer experimento realizado en un estudio electroanalítico. En particular, la técnica ofrece una localización rápida de los potenciales redox de las especies electroactivas y una evaluación conveniente de los procesos redox.

La voltamperometría cíclica consiste de un escaneo lineal de potencial de un electrodo de trabajo estacionario (en una solución sin agitar) usando un potencial de forma de onda triangular (**Fig. 3.1**). Dependiendo de la información que se busque, uno o múltiples ciclos pueden ser usados. Durante el barrido de potencial, el potenciostato mide la corriente obtenida del potencial aplicado. El gráfico resultante de la corriente en función del potencial se denomina voltamperograma cíclico [59].

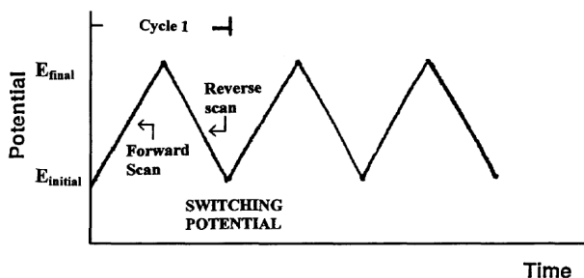


Fig. 3.1 Potencial vs tiempo en un experimento con voltamperometría cíclica [59].

La figura **Fig. 3.2** ilustra la respuesta esperada de un par redox reversible durante un solo ciclo de potencial. Se asume que solo la forma oxidada “O” está presente inicialmente. Por lo tanto, un barrido de potencial con pendiente negativa se elige para el primer medio ciclo, iniciando desde un valor donde no ocurra reducción. A medida que el potencial aplicado se aproxima al E^0 (potencial formal) para el proceso redox, una corriente catódica comienza a aumentar hasta alcanzar una corriente pico. Después de sobrepasar la región de potencial en la que el proceso de reducción se lleva a cabo (por lo menos $90/n$ mV más allá del pico), la dirección del barrido de potencial se invierte. Durante el barrido inverso, las moléculas reducidas “R” (generadas en el medio ciclo, y acumuladas cerca de la superficie) son reoxidadas nuevamente y resulta un pico anódico [59].

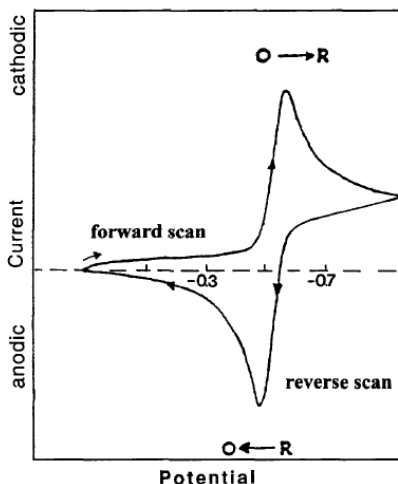


Fig. 3.2 Voltamperograma cíclico típico en un proceso redox reversible $O + ne^- \rightleftharpoons R$ [59].

Los picos característicos en el voltamperograma cíclico son causados por la formación de una capa de difusión cerca de la superficie del electrodo. Estos pueden ser mejor entendidos analizando cuidadosamente los perfiles de concentración respecto a la distancia durante el barrido de potencial.

3.2 Cronoamperometría y cronocoulombimetría

La cronoamperometría involucra la aplicación de un escalón de potencial al electrodo de trabajo desde un valor en el cual no ocurren reacciones faradaicas a un potencial en el cual la concentración superficial de la especie electroactiva es efectivamente cero (**Fig. 3.3a**). Un electrodo de trabajo estacionario y una solución sin agitación son usados. La corriente resultante respecto al tiempo es monitoreada. Dado que el transporte de masas en estas condiciones es exclusivamente por difusión, la curva de corriente contra tiempo refleja el cambio en el gradiente de concentración cerca de la superficie del electrodo. Esto involucra una gradual expansión de la capa de difusión asociada con el agotamiento del reactante, y por lo tanto la disminución de la pendiente del perfil de concentración a medida que avanza el tiempo (ver **Fig. 3.3b**) [60].

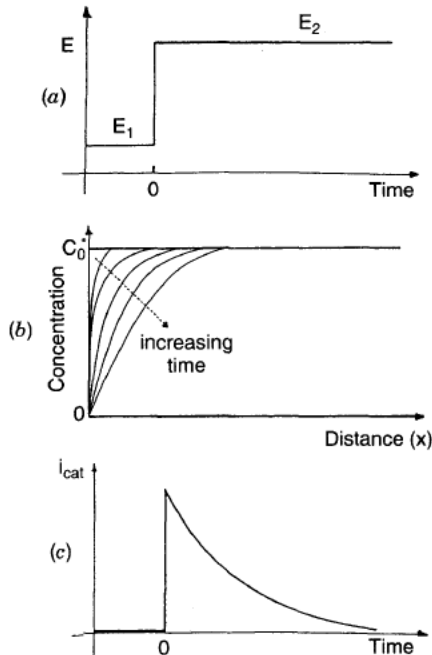


Fig. 3.3 Experimento cronoamperométrico: a) forma de onda de potencial aplicado; b) cambio de los perfiles de concentración con el tiempo; c) resultado de respuesta de corriente contra tiempo [60].

De acuerdo con ello, la corriente (en un electrodo plano) decae con el tiempo (**Fig. 3.3c**), como se indica en la ecuación de Cottrell:

$$i(t) = \frac{nFAD_o^{1/2}C_o}{(\pi t)^{1/2}} \quad (3.1)$$

La dependencia de la corriente en función del tiempo $it^{1/2}$ es denominado “comportamiento Cottrell”. Las desviaciones de tal comportamiento se producen en tiempos largos (usualmente más de 100s) como resultado de los efectos de convección naturales o utilizando microelectrodos con alta relación perímetro-área. En el último caso, una corriente independiente del tiempo (proporcional a la concentración) se obtiene para $t > 0.1$ s debido a una contribución de gran difusión radial. Para valores pequeños de $t < 50$ ms la señal cronoamperométrica contiene una contribución de fondo de la corriente de carga.

La cronoamperometría es usada a menudo para medir el coeficiente de difusión de especies electroactivas o el área superficial de electrodos de trabajo. Aplicaciones analíticas de cronoamperometría (por ejemplo, bioanálisis *in-vivo*) dependen de la pulsación del potencial del electrodo de trabajo de manera repetitiva a intervalos de tiempo fijos. La cronoamperometría también puede aplicarse al estudio de mecanismos de los procesos en el electrodo. Particularmente atractivo para este tipo de tareas se emplea experimentos con cronoamperometría de doble pulso (donde un segundo escalón es usado para investigar las especies generadas en el primer escalón).

Un experimento de escalón de potencial puede también ser usado para registrar la carga respecto al tiempo. Esto se logra mediante la integración de la corriente resultante del escalón de potencial. Tal procedimiento de medición de carga, conocido como cronocoulombimetría (CC), es particularmente útil para medir la cantidad de reactivos adsorbidos (debido a la capacidad de separar las cargas producidas por las especies adsorbidas y solución). Un gráfico de la carga (Q) vs. $t^{1/2}$ produce una intersección a $t = 0$ que corresponde a la suma de la carga debido a la reacción de las especies adsorbidas y la carga de doble capa. El primero puede estimarse restando la intersección obtenida en un experimento idéntico realizado en la solución en blanco [60].

Un aspecto atractivo de la cronocoulombimetría es que la carga de la doble capa y la carga debido a la reacción de las especies adsorbidas sobre la superficie del electrodo puede ser diferenciada de la carga debido a la reacción de moléculas redox que se difunden a la superficie del electrodo. Por consiguiente, las mediciones de las especies redox confinadas en la superficie del electrodo pueden ser hechas en presencia de la solución del

marcador redox para que el sistema sea observado en condiciones de equilibrio. Al integrar la corriente, o la carga Q , como una función contra el tiempo en un experimento cronocoulombimétrico está dado por la ecuación integrada de Cottrell,

$$Q = \frac{2nFAD_0^{1/2}C_0^*}{\pi^{1/2}}t^{1/2} + Q_{dl} + nF\Gamma_0 \quad (3.2)$$

Donde n es el número de electrones por molécula de reducción, F es la constante de Faraday (C/equiv), A el área del electrodo (cm^2), D_0 el coeficiente de difusión (cm^2/s), C_0^* la concentración de la solución (mol/cm^3), Q_{dl} la carga capacitiva (C), y $nF\Gamma_0$ la carga de la reducción de Γ_0 (mol/cm^2) del marcador redox adsorbido. El término Γ_0 se designa adsorción o el exceso de superficie y representa la cantidad de marcador redox confinado cerca de la superficie del electrodo. La intersección cronocoulombimétrica en $t=0$ es entonces la suma de la carga de doble capa y las condiciones de exceso de superficie [61-64]. El exceso de superficie de carga se determina a partir de la diferencia en las intersecciones cronocoulombimétricas para un escalón de potencial idéntico en presencia y ausencia de marcador redox [63].

3.3 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)

La espectroscopia de impedancia electroquímica es muy útil para medir la detección de analitos en bajas concentraciones, la interface electrodo/electrolito y la cinética de la superficie del electrodo. Para lograr esto, el espectro de impedancia es analizado utilizando un circuito equivalente. El circuito eléctrico más popular para una simple reacción electroquímica es el modelo de circuito equivalente eléctrico Randles-Ershler, que incluye la resistencia del electrolito, la resistencia de transferencia de carga en la interfaz / electrolito del electrodo, la capacitancia de doble capa, y la resistencia de transferencia de masa, ver **Fig. 3.4**. Este circuito comúnmente consiste de resistencias, elementos de fase constante (CPE), elementos de Warburg, inductancias y capacitancias, los cuales representan los diferentes componentes o propiedades físico-químicas de la interfaz [65].

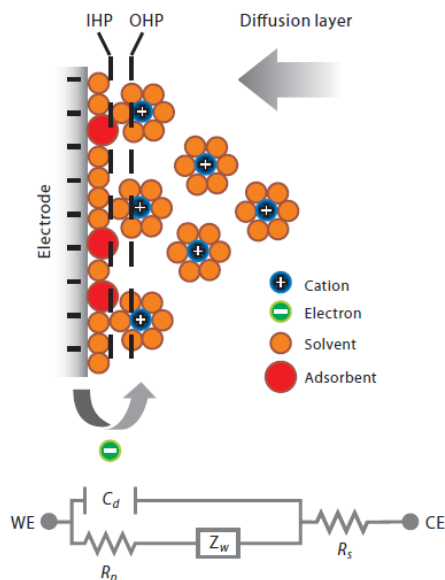


Fig. 3.4 En la parte superior se muestra una interfaz electrificada en la que el electrodo está cargado negativamente; cationes están alineados a lo largo de la superficie electrificada. En la parte inferior se muestra los elementos del circuito eléctrico correspondientes a cada componente de la interfaz [66].

La espectroscopia de impedancia es una técnica eficaz para extraer cada componente en un circuito eléctrico. La aplicación de la impedancia en sistemas electroquímicos también puede proporcionar información detallada sobre las reacciones electroquímicas. En esta técnica, se aplica una pequeña perturbación de amplitud de CA con una frecuencia cambiante a una señal constante de corriente continua (DC). Mediante el barrido de frecuencias, el cambio de impedancia puede ser registrado y cada valor de componente del sistema electroquímico puede ser obtenido [67]. Para la técnica de impedancia electroquímica se emplea un estímulo sinusoidal de baja amplitud (por lo general alrededor de 10 mV) con el fin de operar dentro de una región lineal en la celda. Esto es muy importante, ya que la naturaleza no lineal de las celdas electroquímicas puede conducir a mediciones de impedancia imprecisas [68], ver **Fig. 3.5**.

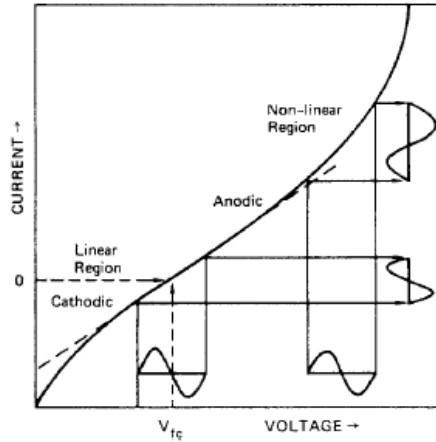


Fig. 3.5 Reflexión de una onda sinusoidal de entrada sobre una curva corriente-voltaje no lineal [68].

La impedancia de un sistema electroquímico (definido como Z) es el cociente de la función potencial contra tiempo $E(t)$ aplicada y la función de la corriente contra tiempo resultante $I(t)$:

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \sin(2\pi ft)}{I_0(\sin(2\pi ft + \varphi))} = \frac{1}{Y} \quad (3.3)$$

Donde E_0 e I_0 son las amplitudes del voltaje (V) y la corriente (A), f es la frecuencia (Hz), t es el tiempo (s), φ es el desfase (grados) entre las funciones de voltaje y de corriente e Y es la admitancia compleja ($1/\Omega$). La impedancia es un valor complejo, ya que la corriente puede variar no solo en términos de amplitud, pero también puede mostrar un desplazamiento de fase φ en comparación con la función de potencial contra tiempo. Por lo tanto, el valor puede ser descrito, ya sea por el módulo $|Z|$ y el desplazamiento de fase o alternativamente por la parte real Z_r y la parte imaginaria Z_i . Esto se ilustra en la Fig. 3.6.

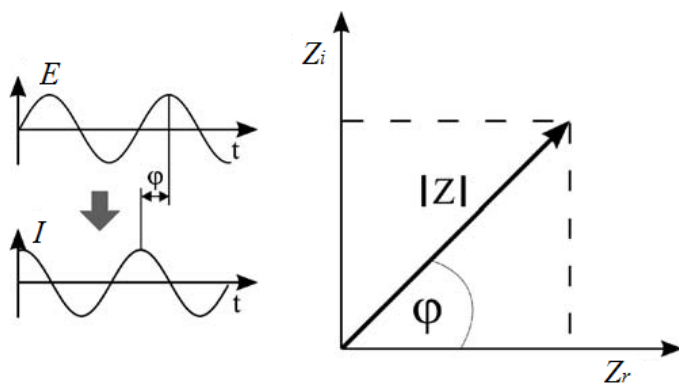


Fig. 3.6 Desfase entre corriente y voltaje en una impedancia compleja, y diagrama de impedancia Z como vector usando coordenadas rectangulares y polares [65]

El espectro de impedancia se determina generalmente a diferentes frecuencias, esto permite obtener la caracterización de superficies, capas o membranas, así como los procesos de intercambio o de difusión. La señal puede ser una onda sinusoidal simple o consistir en una suma de tales ondas con diferentes amplitudes, frecuencias y fases (por ejemplo, escalones de potencial o corriente, señales en forma de impulsos, ruido). El aplicar un gran número de frecuencias y pedir la respuesta de forma simultánea da ciertas ventajas. Sin embargo, el sistema electroquímico genera ruido y, a causa de la condición de linealidad, las amplitudes de señal son muy pequeñas [69]. Por lo tanto, un promedio de la señal debe ser utilizado para la señal de respuesta. Esto es mucho tiempo, sobre todo para las frecuencias bajas y altas impedancias.

Generalmente, el espectro de impedancia de un sistema electroquímico puede ser presentado en el diagrama de Nyquist y de bode, los cuales son representaciones de impedancia en función de la frecuencia. Un diagrama de Nyquist muestra el conjunto de datos experimentales $Z(Z_{rei}, Z_{imi}, f_i)$, ($i=1, 2, \dots, n$) donde n son los puntos medidos a diferentes frecuencias, con cada punto se representa una parte real e imaginaria de la impedancia ($Z_{rei} \sim Z_{imi}$) para una particular frecuencia f_i .

El diagrama de bode es una representación alternativa de la impedancia. Hay dos tipos de diagramas de bode, $\log|Z| \sim \log f$ (o $|Z| \sim \log f$) y $\theta \sim \log f$, describiendo la dependencia de la frecuencia en el módulo y la fase, respectivamente. Un diagrama de Bode se representa normalmente de forma logarítmica sobre el rango de frecuencia medida debido a que es el mismo número de puntos que se aplica en cada década. Ambos diagramas

por lo general comienzan con una alta frecuencia y terminan en una frecuencia baja.

La **Fig. 3.7** muestra un ejemplo de un espectro de impedancia de un sistema electroquímico con dos constantes de tiempo. **Fig. 3.7a**, **b**, y **c** son el circuito equivalente, diagrama de Nyquist, y diagrama de Bode, respectivamente.

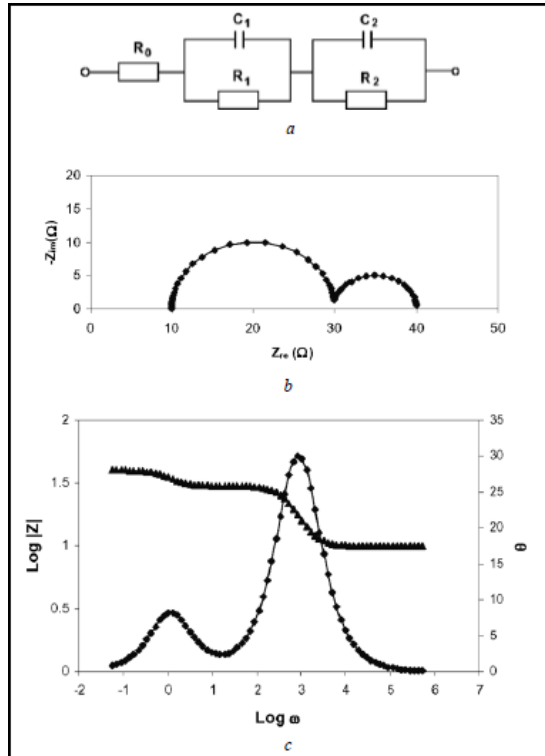


Fig. 3.7 a) Circuito equivalente de un sistema electroquímico con dos constantes de tiempo; b) diagrama de Nyquist de un modelo con dos constantes de tiempo simulado sobre un rango de frecuencias de 100KHz-0.01Hz ($R_0=10 \Omega$, $R_1=20 \Omega$, $C_1=0.0001 \text{ F}$, $R_2=10 \Omega$, $C_2=0.1 \text{ F}$); c) diagrama de bode de un modelo con dos constantes de tiempo simulado con los mismos parámetros del inciso b) [70].

El análisis de los datos de EIS se lleva a cabo habitualmente haciendo un ajuste a un modelo de circuito equivalente. La forma del espectro de impedancia del modelo es controlado por el estilo de elementos eléctricos en el modelo y las interconexiones entre ellos (combinaciones serie o paralelo). El tamaño de cada característica en el espectro es controlado por los parámetros en los elementos del circuito.

El circuito equivalente debe ser lo más simple posible para representar el sistema electroquímico y debe dar la mejor combinación posible entre la impedancia del modelo y la impedancia medida del sistema, cuyo circuito equivalente contiene al menos una resistencia de electrolito, un capacitor de doble capa, y la impedancia del proceso farádico y o no farádico [70].

Capítulo 4: Metodología experimental

En este capítulo se describen los materiales y procedimientos experimentales empleados para la inmovilización e hibridación del ADN sobre la superficie de los electrodos de Au utilizados en la detección del VPH.

4.1 Materiales

Las mediciones se realizaron en un sistema de tres electrodos: compuesto de un electrodo de trabajo de Au tipo disco de 0.5 mm de radio modificado con una capa inmovilizada de ADN de cadena simple, un electrodo de referencia de sulfatos Hg/Hg₂SO₄/K₂SO₄ (sat), y un alambre de Pt como contraelectrodo.

En este trabajo todos los valores de potencial reportados son en referencia al electrodo de referencia de sulfato saturado, excepto cuando se indica.

Las secuencias de oligonucleótidos de 30 bases relacionadas al VPH utilizadas en el presente trabajo son las siguientes:



Las secuencias de cadenas sencillas de depósito y las cadenas sencillas complementarias y no-complementarias de ADN usadas en el presente trabajo fueron adquiridas de Biosearch Technologies, Inc. Todas las soluciones de oligonucleótidos usadas en este estudio fueron preparadas en

una solución amortiguadora de fosfatos salino 0.01M (PBS, pH 7.40) y fueron mantenidas -20°C. Todas las soluciones fueron preparadas con agua ultrapura obtenidas desde un sistema de purificación Milli-Q.

4.2 Inmovilización de la sonda de ADN e hibridación

Los electrodos de oro fueron pulidos con óxido de aluminio (1, 0.3 y 0.05 μm) hasta obtener una superficie espejo. Los electrodos fueron lavados con agua desionizada y sonicados por 15 min en isopropanol para remover cualquier partícula. Subsecuentemente los electrodos fueron electroquímicamente limpiados en 0.5M H_2SO_4 empleando voltamperometría cíclica con una ventana de potencial de -0.05 V and +1.1 V, en la cual se efectúa la reducción y la oxidación de la superficie del oro. Se aplicaron aproximadamente 60 ciclos hasta que no hubo cambios en los voltamperogramas obtenidos.

La inmovilización de ssDNA sobre la superficie de oro fue realizada exponiendo el electrodo en una solución 1 μM de ssDNA disuelto en buffer de inmovilización por 1 h a temperatura ambiente. La solución de inmovilización del ADN consistió de solución amortiguadora de fosfatos 0.8 M (PB) + 1.0M NaCl + 5mM MgCl_2 + ácido etilendiamino tetracético 1mM (EDTA), pH 7.4. Después de la inmovilización el electrodo se enjuagó secuencialmente en las siguientes soluciones: solución de inmovilización, PB 200mM, PB 10mM y finalmente, PB 10 mM + EDTA 10 mM para remover cualquier ion de magnesio presente en el ADN. Para asegurar una cobertura completa del ADN sobre la superficie del electrodo de Au y evitar interacciones no específicas de oligonucleótidos, los electrodos fueron limpiados electroquímicamente en una solución de 2mM de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ + 2 mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en 50 mM PBS+ 100 mM K_2SO_4 (pH 7.4), con una ventana de potencial de -0.4 V and +0.4 V en la cual se efectúa la reducción y la oxidación del par redox. Se aplicaron aproximadamente 50 ciclos hasta que no hubo cambios en el voltamperograma.

La hibridación del electrodo sonda de ADN (Au/ssDNA) se incubó en una solución de cadena complementaria de 1 μM ADN en PBS, pH=7.4, por 1 h. Enseguida, el electrodo fue enjuagado con 50 mM PB + 100 mM K_2SO_4 , pH 7.4. La inmovilización e hibridación fueron analizadas usando

el par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. En cada experimento, la solución se desoxigenó con nitrógeno de alta pureza durante al menos 5 min y una atmósfera de nitrógeno se mantuvo sobre la solución durante las mediciones electroquímicas.

Las características de respuesta de los biosensores modificados con ADN (TH-DNA) fueron estudiadas después de la hibridación con la cadena complementaria de ADN a diferentes concentraciones (1, 5, 10, 15, 20, 100, y 1000 nM) a temperatura ambiente.

4.3 Densidad superficial de ADN

La densidad de ADN fue determinada usando un método cronocoulombimétrico. El ADN depositado sobre el electrodo fue calculado desde el número de moléculas catiónicas asociadas electrostáticamente con los aniones de la estructura del ADN. El electrodo de Au/ADN fue inmerso en una solución de hexamino rutenio (III) ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$) en un amortiguador tris. En la baja fuerza iónica del amortiguador, el $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ es atrapado electrostáticamente por los grupos fosfato del ADN. En -50 mV insignificante reducción se lleva a cabo, mientras que -600mV es suficiente para reducir toda la superficie confinada $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ e impone una corriente de difusión limitada. La cantidad de moléculas $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ absorbidas se obtendrá a partir de las curvas de CC mediante el cálculo de la intersección de carga superficial en $t = 0$. Las curvas CC fueron hechas en ausencia y presencia de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ para poder discriminar el cargado de la doble capa. Se utilizó extrapolación de ajuste con mínimos cuadrados en la parte lineal para determinar la intersección en el tiempo cero, que corresponde a $Q_{dl} + nFAG_0$. Asumiendo que la capacitancia de la doble capa es aproximadamente igual en las mediciones con y sin $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, Q_{dl} es constante en el escalón de potencial y $nFAG_0$ es calculada como la diferencia en las intersecciones. Por tanto,

$$\Gamma_0 = \frac{Q}{nFA} \quad (4.4)$$

Donde n es el número de electrones por molécula de reducción ($n=3$).

El exceso de superficie saturada de marcador redox se convierte en densidad de superficie de ADN con la relación,

$$\Gamma_{ADN} = \Gamma_0(z/m)N_A \quad (4.5)$$

Donde Γ_0 es la cantidad de marcador redox, $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (mol/cm^2); Γ_{ADN} , es la densidad de superficie de ADN ($\text{moléculas}/\text{cm}^2$); m , es el número de bases en la prueba de ADN (6.1) empleadas en este trabajo ($m = 29$); z , es la carga de la molécula redox ($z = 3$); y N_A , es el número de Avogadro.

4.4 Mediciones electroquímicas

Diferentes mediciones electroquímicas se realizaron para caracterizar los depósitos de ADN después de ser inmovilizados sobre el electrodo de Au.

Para poder determinar los voltajes y corrientes de relajación del electrodo de Au/ADN se efectuaron las mediciones electroquímicas empleando un escalón de potencial en una solución PBS (pH 7.4) + $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 2mM. Los parámetros eléctricos del escalón de potencial fueron: alto del pulso 30 mV respecto al voltaje de circuito abierto y un ancho de pulso de 750 μs . Después de aplicar el potencial a la celda electroquímica se bloqueó la descarga hacia el potencióstato, y las curvas del voltaje y de corriente de relajación del electrodo de trabajo fueron registradas durante 25 ms.

Para determinar el valor de la resistencia R_{ct} con la técnica “*Frecuencia característica*” se empleó impedancia electroquímica de una sola frecuencia. La frecuencia aplicada fue ν_C (frecuencia característica angular) con una amplitud de voltaje en su onda sinusoidal de 10mV_{ac} superpuesto en un voltaje de 30mV_{dc} . La resistencia de la solución R_s fue medida con la misma técnica con una frecuencia de excitación de 100 kHz, con un voltaje de 10mV_{ac} sobre un voltaje de 30mV_{dc} . Los electrodos de trabajo de oro modificados con ADN fueron sumergidos antes y después de hibridar en un electrolito soporte PBS (pH 7.4) y $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 2mM en cada medición.

Con la finalidad de comparar y validar los datos experimentales de las técnicas “*Frecuencia característica*” y “*Relajación de corriente*” se utilizó la técnica EIS. La impedancia fue medida sobre un rango de frecuencias de 100 kHz to 100 mHz, con un voltaje de corriente alterna de 10 mV superpuesto en un voltaje de corriente directa de 30mV_{dc} . Los potenciales fueron aplicados respecto a circuito abierto. En este caso, R_{ct} fue evaluada haciendo un ajuste por mínimos cuadrados complejos no lineales de los

datos experimentales de la espectroscopia de impedancia en el circuito equivalente de Randles y el circuito propuesto en esta tesis (ver **Fig. 6.11**). La técnica EIS fue hecha en una solución PBS (pH 7.4) + $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ / $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 2mM.

Las mediciones electroquímicas antes y después de hibridar el ADN se llevaron a cabo en un potenciostato Gamry Reference 600.

Capítulo 5: Biosensor “Frecuencia característica”

5.1 Introducción

Los biosensores electroquímicos de detección de ADN han ganado importancia en las últimas décadas como pruebas de diagnóstico para la genómica y herramientas de detección temprana para cáncer o de otras enfermedades [71-74]. EL uso de diferentes técnicas electroquímicas, tales como: cronoamperometría [75, 76], medidas de capacitancia [77-79] y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) [80-84], han demostrado ser de gran utilidad debido a su sensibilidad y bajo costo.

Muchos biosensores electroquímicos de ADN han empleado EIS como técnica de detección, midiendo el cambio en la impedancia en la superficie del electrodo de trabajo. Un analizador de impedancia extrae los componentes real e imaginaria de la impedancia del biosensor, correlacionando la variación de la impedancia con propiedades de las cadenas sencillas de ADN inmovilizadas y con la concentración del ADN blanco o problema en una muestra. Dentro de las diferentes técnicas de medición de impedancia, el analizador de respuesta en frecuencia (FRA) en unas de las más empleadas. El FRA es una técnica que mide la impedancia de un electrodo modificado aplicando una pequeña onda de CA de 5 a 15 mV de una frecuencia dada “*single-sine*” superpuesta a un potencial de corriente directa; enseguida, es medida la respuesta en corriente del sistema. Este proceso se repite en un espectro de frecuencias, típicamente de la gama de 1 MHz a 1 mHz. Los problemas con este tipo de técnica “*single-sine*”, surgen principalmente por el tiempo relativamente largo requerido para la adquisición de datos en todo el intervalo de frecuencias sobre todo a frecuencias bajas. En los esfuerzos para reducir el tiempo de medición en EIS, varios estudios han reportado métodos en los que no se emplea un barrido en frecuencia [66], por ejemplo, el uso de la Transformada Rápida de Fourier (FFT) para analizar la respuesta de corriente obtenida después de una aplicación de una señal de ruido blanco que contiene una gran gama

de frecuencias. Sin embargo, estos métodos por lo general requieren algoritmos de procesamiento, lo que indica requisitos rigurosos de hardware.

Con el objetivo de hacer una contribución al diseño de biosensores portátiles, este capítulo describe un sistema para la detección de ADN relacionado con el virus del papiloma humano (VPH) basado en un método impedimétrico de una “*frecuencia característica*” para obtener el cambio en la resistencia de transferencia de carga de un par redox indicador tras hibridar las cadenas sencillas de ADN inmovilizadas sobre electrodos de oro. El biosensor de “*frecuencia característica*” aplica un pequeño pulso de potencial para determinar la frecuencia angular característica del electrodo modificado Au/ADN, con valor obtenido se construye un espectro de impedancia del cual se extrae la resistencia de transferencia de carga. La medición realizada y su tratamiento toma sólo una fracción de segundo, que en comparación con los sistemas tradicionales basados en FRA requieren mayor tiempo. Todo lo anterior sin una pérdida significativa de la exactitud en la medición de la resistencia de transferencia asociada al evento de hibridación de ADN.

5.2 Antecedentes

Un dibujo esquemático del electrodo compuesto Au/DNA en contacto con la solución electrolítica y su circuito equivalente se muestra en **Fig. 5.1**. La parte (a) representa las moléculas de ssDNA inmovilizadas en la superficie de Au y la parte (b) representa el electrodo de Au después la hibridación con la secuencia complementaria para formar la estructura de la doble cadena de ADN. El circuito equivalente de la interfaz electrodo / electrolito está representado por un simple modelo de Randles [68], donde R_s es la resistencia de la solución electrolítica, C_{dl} es la capacitancia de doble capa de la interfaz de Au-DNA / electrolito, Z_w es un elemento de difusión de Warburg y R_{ct} es la resistencia de transferencia de carga del sistema de electrodo compuesto con respecto a la reacción electroquímica del par redox indicador $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ usado en este trabajo.

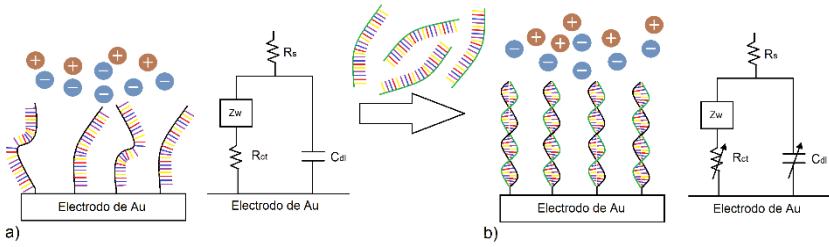


Fig. 5.1 Ilustración y modelo eléctrico del ADN/par redox: a) ssDNA inmovilizado y b) dsDNA.

Los valores de C_{dl} y R_{ct} dependen de las características físico-químicas de la capa de ADN inmovilizado sobre la superficie de oro, en este trabajo, el método impedimétrico para la detección de ADN se basa en el cambio de R_{ct} después de la hibridación. Estrictamente hablando, el valor de la resistencia de transferencia de carga depende de la reacción electroquímica específica, el área superficial y la rugosidad del electrodo, la densidad de moléculas de ADN en la superficie y la estructura de los oligonucleótidos inmovilizados [85].

En este modelo el fenómeno de hibridación produce una modificación en la capacitancia de la doble capa, y simultáneamente, un incremento en la resistencia de transferencia de carga (representado por los elementos eléctricos con flechas diagonales en la **Fig. 5.1b**), que dan lugar a un cambio medible en el tiempo de relajación (τ_d) del circuito en paralelo ($R_{ct}C_{dl}$) del circuito equivalente del bio-electrodo. Los cambios en la resistencia R_{ct} pueden estar asociados con un aumento de la carga negativa después de la hibridación debido al incremento en los grupos fosfato expuestos en la estructura del ADN al formarse la doble cadena, lo cual aumenta la repulsión electrostática hacia los aniones del indicador redox disminuyendo la cantidad de especies reaccionantes cercanas al ADN.

5.3 Fundamento metodológico del biosensor

5.3.1 Frecuencia característica

En este método, ver **Fig. 5.2**, un pulso de onda cuadrada es aplicado desde un potencial inicial, $E_i = 0$ V, a un potencial final, $E_f = \eta$, con respecto

al valor del potencial a circuito abierto del sistema. La amplitud del pulso corresponde a un sobrepotencial, η , cercano al potencial formal del par redox, indicador. η es un valor de potencial que es suficientemente pequeño para que el sistema tenga un comportamiento i - E virtualmente lineal.

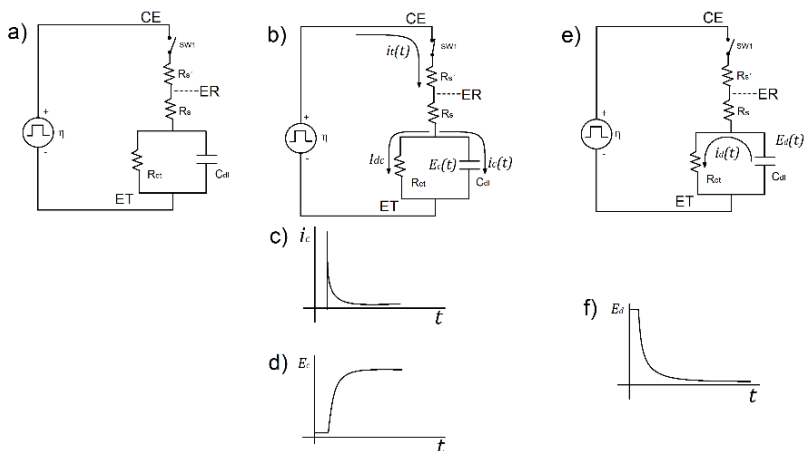


Fig. 5.2 Diagrama eléctrico propuesto para determinar el tiempo de relajación.

Para $t=0$ (**Fig. 5.2a**), el circuito está abierto (interruptor SWI abierto), condición que puede ser expresado por:

$$E_{R_s} = E_{C_{dl}} = E_{R_{ct}} = 0 \text{ V} \quad (5.1)$$

Donde E_{R_s} , $E_{C_{dl}}$ y $E_{R_{ct}}$ corresponden a las caídas de potencial en los elementos del circuito equivalente del electrodo de trabajo.

Para $t > 0$, SWI es cerrado (**Fig. 5.2b**), el voltaje aplicado al electrodo tiende a η , y el pico instantáneo de corriente está dado por la siguiente ecuación:

$$I_0 = \frac{\eta}{R_s} \quad (5.2)$$

En esta etapa el potencial es principalmente aplicado a R_s , hasta ahora ninguna carga reside en el capacitor de doble capa. Después de este cambio inicial abrupto, el total de la corriente disminuye en función del tiempo, simultáneamente, disminuye la corriente de carga $i_{C_{dl}}(t)$ del capacitor de

doble capa (**Fig. 5.2c**). Por lo tanto, la corriente de carga en la bio-interfase del electrodo puede ser expresado por la ecuación:

$$i(t) = i_{Rct} + i_{Cdl}(t) \quad (5.3)$$

En adición a la corriente de la doble capa, esta función incluye la contribución de corriente por la transferencia de electrones correspondiente a la reacción redox i_{Rct} . La corriente de carga del capacitor C_{dl} depende del tiempo, de acuerdo a la ecuación:

$$i_{Cdl}(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau_c}} \quad (5.4)$$

Donde τ_c es el tiempo de relajación en la carga del capacitor C_{dl} , el cual puede ser expresado como:

$$\tau_c = R_s C_{dl} \quad (5.5)$$

Simultáneamente (**Fig. 5.2d**), el potencial en el capacitor C_{dl} muestra un incremento exponencial respecto al tiempo de la forma:

$$E_{Cdl}(t) = \eta \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_c}} \right) \quad (5.6)$$

Para $t \geq 5\tau_c$, la carga en el capacitor C_{dl} es casi completa, entonces *SWI* es reabierto (**Fig. 5.2e**) y el potencial η aplicado es removido. El propósito de abrir *SWI* es para evitar la descarga de C_{dl} a través de R_s , ahora, el capacitor es descargado únicamente a través de R_{ct} [64], y el voltaje en el capacitor C_{dl} decrece en función del tiempo de acuerdo a la ecuación:

$$E_{Cdl}(t) = \eta e^{-\frac{t}{\tau_d}} \quad (5.7)$$

Donde τ_d es el tiempo de relajación en la descarga del capacitor C_{dl} , tal y como se muestra en el circuito **Fig. 5.2e**, este valor puede ser calculado desde la siguiente ecuación:

$$\tau_d = R_{ct} C_{dl} \quad (5.8)$$

Alternativamente, tal como se realizó en este trabajo, el valor τ_d puede ser estimado a partir de la curva de descarga del circuito en paralelo

$(R_{ct}C_{dl})$ (ver **Fig. 5.2f**) para un tiempo correspondiente a un valor de potencial igual al 63% del sobrepotencial aplicado η .

5.3.2 Extracción del valor de la Resistencia de Transferencia de Carga

Las funciones de impedancia de la parte real e imaginaria del circuito equivalente (ver, **Fig. 5.1**) están dadas por las Eq.(5.9) y (5.10), respectivamente [86]:

$$Z_{Re} = R_s + \frac{R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2}}{\left(1 + C_{dl}\sigma\omega^{-1/2}\right)^2 + \omega^2 C_{dl}^2 \left(R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2}\right)^2} \quad (5.9)$$

$$Z_{Im} = \frac{\omega C_{dl} \left(R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2}\right)^2 + \sigma\omega^{-1/2} \left(1 + C_{dl}\sigma\omega^{-1/2}\right)^2}{\left(1 + C_{dl}\sigma\omega^{-1/2}\right)^2 + \omega^2 C_{dl}^2 \left(R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2}\right)^2} \quad (5.10)$$

Estas ecuaciones contienen la contribución de impedancia de todos los elementos del circuito serie-paralelo del circuito equivalente del electrodo, ver **Fig. 5.1**, donde σ es un parámetro que depende de la concentración y de las propiedades de difusión de especies electroactivas, y $\omega = 2\pi\nu$ es la frecuencia angular de una onda sinusoidal de excitación de frecuencia ν aplicada a la celda.

Al excitar el electrodo de trabajo con una onda sinusoidal de alta frecuencia, la impedancia correspondiente al elemento de Warburg ($\sigma\omega^{-1/2}$) desaparece, y este valor es insignificante con respecto a R_{ct} . Entonces, el circuito de Randles converge a un simple circuito como se muestra en la **Fig. 5.2**. En este caso, las Eq. (5.9) y (5.10) son transformadas en las siguientes ecuaciones:

$$Z_{Re} = R_s + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{ct}^2} \quad (5.11)$$

y

$$Z_{Im} = \frac{\omega C_{dl} R_{ct}^2}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{ct}^2} \quad (5.12)$$

La principal suposición en este trabajo es que la frecuencia angular característica ω_C aplicada al electrodo de trabajo es suficientemente alta, de manera tal que se cumplen las Eq.(5.11) y (5.12).

Por tanto, considerando la Eq. (5.8) y tomando en cuenta el producto del tiempo de relajación τ_d y la frecuencia angular característica ω_C , son relacionadas de acuerdo a la ecuación:

$$\tau_d \omega_C = 1 \quad (5.13)$$

La Eq. (5.11) es reducida a:

$$Z_{Re} = R_s + \frac{R_{ct}}{2} \quad (5.14)$$

$$R_{ct} = 2(Z_{Re} - R_s) \quad (5.15)$$

Por lo tanto, la resistencia de transferencia de carga del biosensor puede ser calculada desde la Eq.(5.15) mediante la aplicación de una onda sinusoidal de potencial con una frecuencia igual a la frecuencia angular característica del circuito equivalente del bioelectrodo. La resistencia de la solución R_s puede ser obtenida desde la Eq. (5.11) aplicando al bioelectrodo una frecuencia con un valor mucho mayor que ω_C (≥ 100 kHz). En esta condición, la Eq. (5.11) se simplifica a:

$$R_s = Z_{Re} \quad (5.16)$$

5.3.3 Diseño electrónico del biosensor.

La **Fig. 5.3** muestra un esquema de los bloques principales que conforman la arquitectura electrónica del biosensor de ADN propuesto.

Este circuito controla la carga y descarga del capacitor C_{dl} , así como la aplicación de la onda sinusoidal con la frecuencia característica a la celda electroquímica.

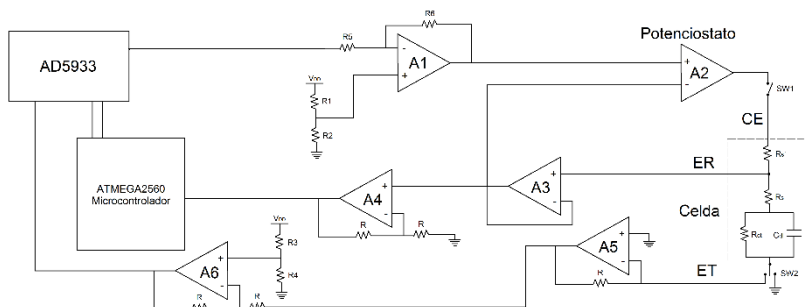


Fig. 5.3 Arquitectura electrónica del biosensor de ADN.

El cargado del capacitor C_{dl} es efectuado electrónicamente por el cierre del interruptor $SW1$ y conmutando el interruptor $SW2$ a tierra. El microcontrolador aplica la diferencia de potencial para producir la reacción electroquímica del par redox sobre el electrodo de trabajo WE . Después, el interruptor $SW1$ es abierto y el sistema cuantifica el máximo voltaje en el cargado de la doble capa y el voltaje mínimo en la caída de potencial de descarga. Entonces, el microcontrolador calcula el tiempo de relajación τ_d y almacena este tiempo en la memoria EEPROM.

A continuación, el biosensor cambia a su modo impedimétrico, cerrando el interruptor $SW1$ y conmutando el interruptor $SW2$ a la entrada del convertidor de impedancia $AD5933$. En este modo, el microcontrolador configura al circuito $AD5933$ vía $I2C$ aplicando una frecuencia de excitación de 100kHz al bioelectrodo, con el objetivo de calcular el valor de resistencia de la solución R_s .

En la segunda etapa del modo impedimétrico, el microcontrolador calcula la frecuencia angular característica ω_C , el $AD5933$ es reconfigurado para que aplique el potencial de corriente alterna con la frecuencia ω_C al bioelectrodo. Entonces, el $AD5933$ recolecta 1024 muestras de corriente alterna y calcula la transformada discreta de Fourier para proveer los valores reales Z_{Re} e imaginarios Z_{Im} de la impedancia en el bioelectrodo. Finalmente, el valor Z_{Re} es usado por el microcontrolador para calcular la resistencia de transferencia de carga R_{ct} .

Los amplificadores operacionales $A1$, $A2$ y $A6$ son usados como acopladores de impedancia para el tratamiento electrónico, mientras que los amplificadores $A3$ y $A4$ como acondicionadores de señal en el biosensor.

El amplificador A5 controla el potencial aplicado al bioelectrodo a través de los tres electrodos (referencia, trabajo y contraelectrodo) de la celda electroquímica.

5.4 Resultados

5.4.1 Desempeño del sensor en celda fantasma.

Para verificar el desempeño del Sistema propuesto de lectura de impedancia, una celda “fantasma” comercial fue usada (Gamry Instruments). Esta celda está compuesta de los siguientes componentes electrónicos de precisión: $R_1= 200 \Omega$, $R_2= 3.01 \text{ k}\Omega$ y $C_1= 1 \mu\text{F}$. R_2 está en paralelo con C_1 , y R_1 está en serie con el circuito paralelo ($R_2||C_1$); por tanto, la celda emula el circuito equivalente propuesto por el sensor de ADN en la sección 5.3 de Fundamento Metodológico. La resistencia R_2 de la celda fantasma es equivalente a R_{ct} en el sensor. Las curvas obtenidas de la carga y descarga del capacitor C_1 se muestran en la **Fig. 5.4**, donde la caída de potencial ΔE_{C_1} está indicada con una flecha. El tiempo de relajación medido en la celda fantasma por el sensor fue de 2.9 ms, correspondiente a un punto en la curva donde la caída de potencial fue $0.63\Delta E_{C_1}$.

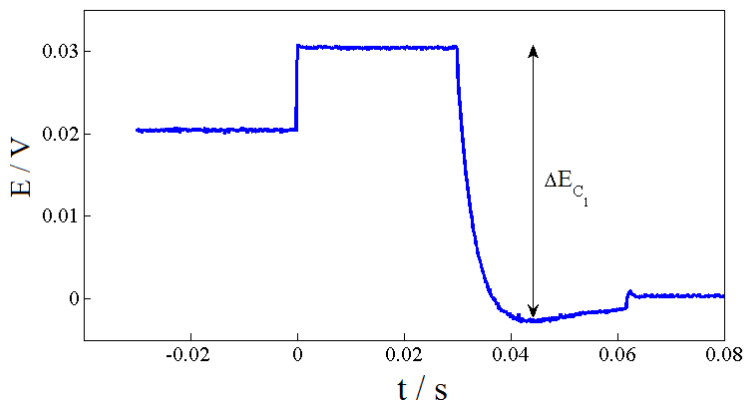


Fig. 5.4 Voltaje de relajación obtenido de la celda fantasma Gamry Instruments.

El valor obtenido de la frecuencia característica fue de 54.13 Hz. Al aplicar la onda sinusoidal con la frecuencia característica obtenida a la celda fantasma, una respuesta de impedancia fue producida, la cual se muestra como una cruz roja en el diagrama de Nyquist, ver **Fig. 5.5**. El lugar geométrico de este punto de impedancia es aproximadamente el punto más alto del arco azul mostrado en el mismo diagrama, el cual corresponde a un espectro completo de EIS de la celda fantasma adquirido usando el potencióstato Gamry 300.

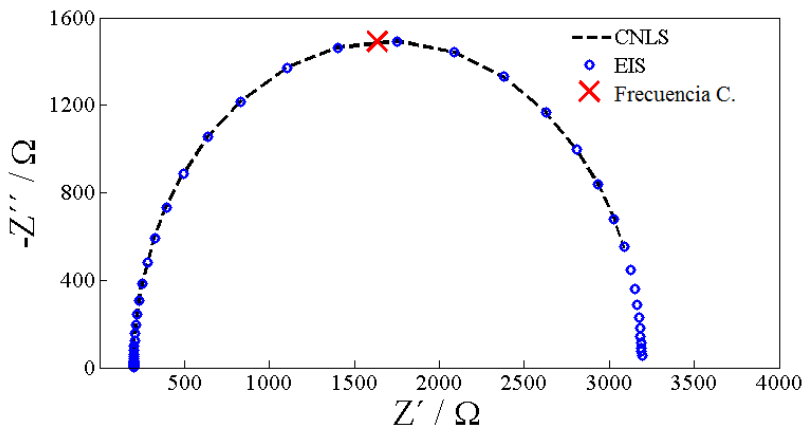


Fig. 5.5 Diagrama de Nyquist obtenido de la celda fantasma Gamry Instruments.

Como podemos observar, el componente real de la impedancia es aproximadamente la mitad de la amplitud del arco en EIS proyectado en el eje Z' , este resultado es consistente con la Eq.(5.14). El valor obtenido de R_2 desde la impedancia “*Frecuencia característica*” fue 3072 Ω , mientras el valor obtenido con el ajuste empleando CNLS de la EIS completo fue de 2994 Ω . Estos resultados indican una diferencia de 2.54%. Los valores de las otras propiedades de la celda fantasma obtenidos por las dos técnicas se presentan en la **Tabla 5.1**. Esta tabla también incluye la medición del tiempo de relajación y la frecuencia característica.

Las diferencias porcentuales mínimas que se muestran en la **Tabla 5.1** indican que el método “*frecuencia característica*” propuesto en este trabajo es adecuado para la reproducción de los valores de los elementos del circuito simple de la celda fantasma sin aplicar todas las frecuencias requeridas de un espectro completo de EIS.

Tabla 5.1 Valores experimentales de las propiedades eléctricas de la celda fantasma obtenidos por dos métodos impedimétricos.

| Parámetros | FC | EIS | Δ | Unidades |
|------------|--------|-------|----------|---------------|
| τ_d | 2.90 | 2.99 | 3.01 | ms |
| ν_c | 54.31 | 53.15 | 1.81 | Hz |
| R_2 | 3072 | 2994 | 2.54 | Ω |
| C_1 | 0.957 | 1 | 4.30 | μF |
| R_1 | 199.58 | 199.5 | 0.04 | Ω |

FC= “frecuencia característica”, Δ = diferencia porcentual

5.4.2 Detección de la hibridación del ADN.

La siguiente etapa fue aplicar la técnica “Frecuencia característica” al electrodo modificado con ADN para evaluar el cambio de R_{ct} debido al proceso de hibridación. La **Fig. 5.6** muestra las curvas de carga y descarga de la doble capa del electrodo compuesto Au/ADN antes (ssDNA) y después de la hibridación (dsDNA).

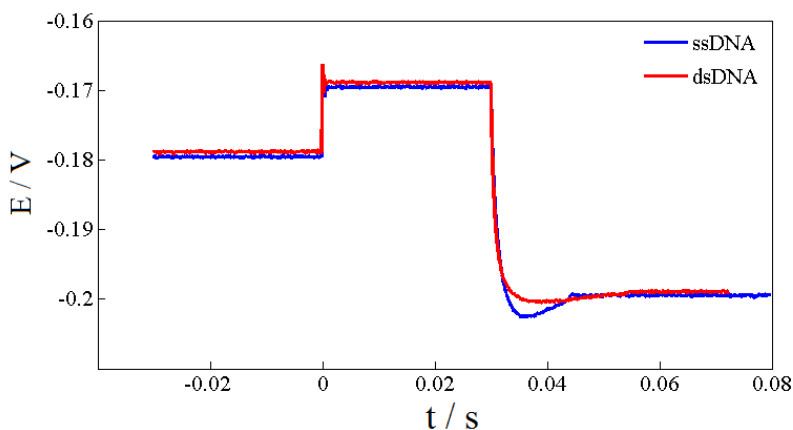


Fig. 5.6 Curvas de carga y descarga del capacitor de doble capa en electrodo compuesto Au/ADN antes (línea azul) y después de la hibridación (línea roja) del ADN.

Un cambio pequeño puedes ser observado en el potencial a circuito abierto y en el tiempo de relajación; ambos son atribuidos a la modificación de R_{ct} y C_{dl} cuando la doble cadena de ADN es formada. El tiempo de

relajación incrementó 0.81ms cuando ocurrió la hibridación; este incremento en el tiempo es un primer indicador de la modificación física en la superficie del bioelectrodo debido al proceso de reconocimiento entre la prueba inmovilizada y el ADN complementario.

Los tiempos de relajación obtenidos desde las curvas de la **Fig. 5.6** fueron transformadas en sus frecuencias características, y ondas sinusoidales con estos valores de frecuencia ν_c fueron aplicadas por el biosensor de ADN. Las respuestas en impedancia producidas desde las perturbaciones de la técnica “*frecuencia característica*” se muestran en los diagramas de Nyquist, ver **Fig. 5.7**. La cruz azul representa la impedancia antes de la hibridación, y la cruz roja representa la impedancia después de la hibridación de la sonda de ADN. Adicionalmente, la **Fig. 5.7** presenta los espectros completos de EIS correspondientes al biosensor bajo las mismas condiciones, antes y después de la hibridación con línea continua y segmentada respectivamente.

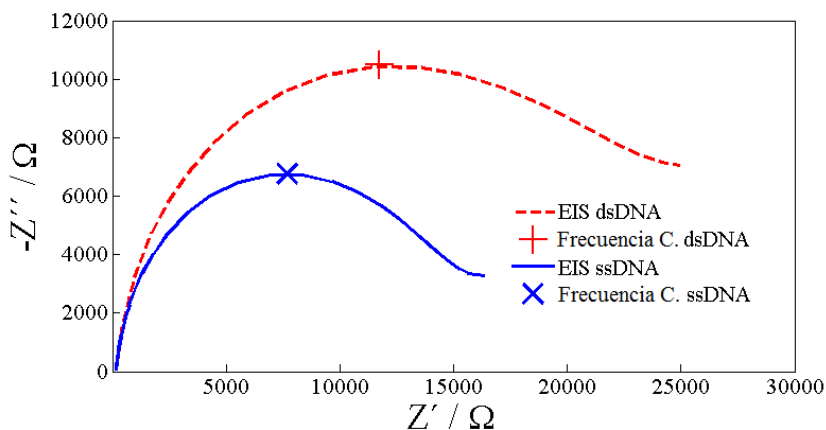


Fig. 5.7 Comparación de EIS completa (líneas) y la técnica “*frecuencia característica*”. Electrodo compuesto Au/ADN antes (línea azul) y después de la hibridación (línea roja segmentada) del ADN.

En la **Tabla 5.2** se presentan los valores de las propiedades experimentales del circuito equivalente del biosensor, las cuales fueron obtenidas por las técnicas “*Frecuencia característica*” y EIS antes y después de la hibridación. La diferencia de los valores R_{ct} obtenidos desde los dos métodos de impedancia usados fueron menor que un 5% antes y después de hibridar los oligonucleótidos sobre el bioelectrodo. Estos resultados indican que el circuito de lectura propuesto, el cual está basado

en un método “*Frecuencia característica*”, es útil con suficiente exactitud para medir la resistencia de transferencia de carga de una reacción redox a través de un sistema de electrodo complejo usado con el biosensor. Similar al caso de la celda fantasma, el procedimiento de “*Frecuencia característica*” puede reproducir los resultados de EIS para los parámetros del circuito equivalente del electrodo modificado con ADN sin hacer un espectro completo de frecuencias.

Tabla 5.2 Resultados experimentales de los parámetros eléctricos del circuito equivalente en electrodos modificados con ssDNA.

| ssDNA | | | | |
|------------|--------|--------|----------|------------|
| Parámetros | FC | EIS | Δ | Unidades |
| τ_d | 0.89 | 0.84 | 5.95 | ms |
| ν_c | 179 | 189 | 5.51 | Hz |
| R_{ct} | 15.22 | 14.48 | 4.88 | k Ω |
| C_{dl} | 0.0584 | 0.0582 | 0.34 | μ F |
| R_s | 167.9 | 167.9 | 0 | Ω |

FC= “*frecuencia característica*”, Δ = diferencia porcentual

Tabla 5.3 Resultados experimentales de los parámetros eléctricos del circuito equivalente en electrodos modificados con ds DNA.

| dsDNA | | | | |
|------------|--------|--------|----------|------------|
| Parámetros | FC | EIS | Δ | Unidades |
| τ_d | 1.6 | 1.5 | 6.25 | ms |
| ν_c | 101 | 106 | 5.15 | Hz |
| R_{ct} | 23.32 | 22.87 | 0.04 | k Ω |
| C_{dl} | 0.0678 | 0.0670 | 1.17 | μ F |
| R_s | 167.9 | 167.9 | 0 | Ω |

FC= “*frecuencia característica*”, Δ = diferencia porcentual

La **Tabla 5.2** y **Tabla 5.3** demuestran que los valores obtenidos para los otros parámetros presentados por las dos técnicas usadas son similares y que sus diferencias porcentuales son lo suficientemente pequeñas para validar el circuito equivalente propuesto para el bioelectrodo y que la simple arquitectura electrónica del biosensor diseñados un sistema adecuado para las mediciones de impedancia en electrodos modificados con ADN.

Adicionalmente, la **Fig. 5.7** muestra que la amplitud en los arcos de impedancia se incrementa debido al evento de hibridación. Este resultado indica un aumento en el valor de R_{ct} , el cual es consistente con la formación de la doble cadena de ADN que repele a los aniones del par redox usado

como indicador, disminuyendo la corriente eléctrica relacionada a la reacción de transferencia de electrones. A partir de los valores presentados en la **Tabla 5.2**, las diferencias en las propiedades del bioelectrodo debido a la hibridación pueden ser evaluadas. R_{ct} se incrementó cerca de 8 k Ω , el cual es equivalente a un 53% de su valor antes de la hibridación. La capacitancia de la doble capa C_{dl} también mostró un incremento después de la hibridación, a pesar de que el incremento fue solo del 16%. Eventualmente, esta propiedad podría también ser usada para detectar la hibridación del ADN usando el procedimiento “*frecuencia característica*”, particularmente por la exactitud de este método para obtener el valor de capacitancia (solo una diferencia del 1% respecto a EIS).

Claramente estos resultados indican que la hibridación del ADN produce un incremento significativo en la resistencia de transferencia de carga que puede ser propiamente reconocida por el circuito de lectura.

5.5 Conclusiones

El dispositivo electrónico descrito, permitió el análisis simple y eficaz del ADN correspondiente al VPH. El sistema es capaz de registrar y comparar las mediciones impedimétricas de la hibridación de los oligonucleótidos inmovilizados con su ADN complementario. Las mediciones se basan en la evaluación del tiempo de relajación del capacitor de doble capa y de la resistencia de transferencia de carga de un electrodo modificado con ADN.

La arquitectura electrónica propuesta es capaz de extraer el valor de R_{ct} a través de una estructura compacta y un reducido tiempo de medición. Por lo tanto, la simplificada estructura electrónica descrita podría ser usada para construir un biosensor de ADN portátil y con características de un biosensor de usuario final.

Aunque una sonda sintética específica de ADN del VPH y su secuencia complementaria fueron usadas en este trabajo, el biosensor puede ser usado para detectar otro tipo de virus o de microorganismos, asumiendo una adecuada inmovilización de las correspondientes sondas sobre la superficie del electrodo de oro.

Capítulo 6: Circuito equivalente de ssDNA y dsDNA

6.1 Introducción

Como ha sido señalado en capítulos anteriores, la EIS se utiliza comúnmente para la detección sin marcaje de analitos tales como, proteínas, ADN y péptidos. Varios reportes han demostrado que los biosensores impedimétricos poseen una sensibilidad favorable, fiabilidad, simplicidad, y la capacidad de preservar la integridad del analito a medir [87]. La EIS proporciona un método potente y sencillo para la medición de cambios en la masa o en las propiedades interfaciales de materiales que incluyen superficies modificadas que permiten eventos de reconocimiento molecular. Una ventaja importante de EIS es que la detección se puede ser efectuada sin marcaje o etiqueta, es decir, los cambios en las propiedades eléctricas en la superficie del electrodo surgen de la interacción sólo con la molécula blanco [88].

Por lo tanto, la EIS ofrece ventaja para los sistemas de unión basados en interacción molécula- analito. Aunque la EIS proporciona éstas comodidades, sus datos deben ser examinados con precisión y deben ser ajustados a un modelo adecuado y físicamente válido para el cálculo de sus parámetros impedimétricos del sistema electroquímico de medición [89]. El circuito equivalente juega un papel fundamental en la interpretación y el funcionamiento del biosensor y éste debe ser construido con los elementos eléctricos esenciales que representan las características de la superficie del electrodo del biosensor del DNA. En recientes estudios en los biosensores, usualmente el circuito equivalente de Randles ha sido usado para el ajuste de los datos experimentales en EIS a diferentes tipos de electrodos modificados con DNA. Sin embargo, éste circuito no es suficientemente preciso para ajustarse completamente a los datos experimentales de impedancia.

Adicionalmente al sensor descrito en el Capítulo 5:, en el presente apartado, se reporta otro sensor electroquímico de impedancia para la

detección del DNA de secuencias específicas del VPH16 de alto riesgo. Este sensor utiliza un simple método de medición que aplica un potencial de relajación a la doble capa del electrodo compuesto Au/ADN. Además, basándose en las evidencias experimentales, se propone una mejora en el circuito equivalente del sensor, el cual puede ser aplicado a electrodos modificados con ADN.

El nuevo circuito equivalente se ajusta con mayor precisión a los datos experimentales de la EIS e indica en principio la presencia de múltiples regiones de transferencia de electrones en las secuencias del ADN. Parámetros analíticos como la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad pudieron ser obtenidos a través de la simple arquitectura electrónica del sensor aquí propuesto.

6.2 Antecedentes

Las transformaciones electroquímicas que ocurren en la interfase electrodo/electrolito pueden ser modelados mediante la extracción de los componentes de los circuitos equivalentes electrónicos que corresponden a los espectros de impedancia experimental. Un circuito equivalente electrónico general (modelo Randles y Ershler [90, 91]), que muy a menudo se utiliza para modelar fenómenos interfaciales, incluye la resistencia óhmica de la solución electrolítica, R_s , la impedancia de Warburg, Z_w , resultante de la difusión de los iones del electrolito en solución hacia la superficie del electrodo, la capacitancia de doble capa, C_{dl} , y la resistencia transferencia de electrones, R_{ct} , que existe si una reacción redox ocurre en el electrolito en solución, **Fig. 6.1A**.

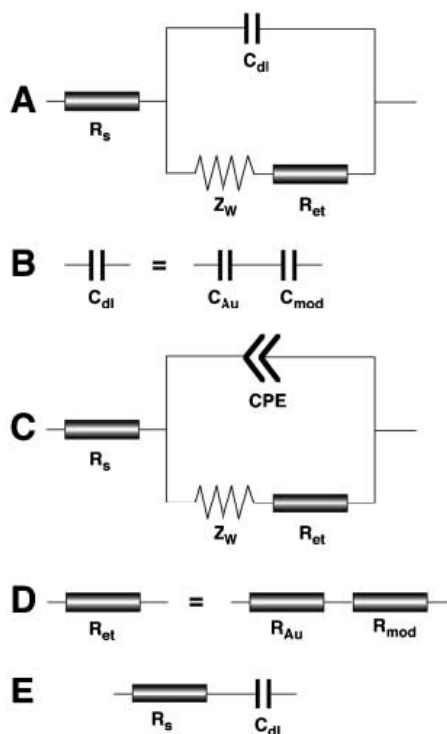


Fig. 6.1 Circuito de Randles [92].

Los elementos en paralelo (C_{dl} y $(Z_w + R_{ct})$) del circuito equivalente se introducen ya que la corriente total a través de la interfase de trabajo es la suma de distintas contribuciones de corriente del *proceso Faradaico*, I_F , y de la carga de la doble capa, I_C . Dado que todas las corrientes deben pasar a través de la resistencia no compensada de la solución electrolítica, R_s , se inserta como un elemento en serie en el circuito. Los dos componentes del esquema electrónico, R_s y Z_w , representan las impedancias correspondientes a la solución de electrolito y a las características de difusión de la especie redox electroactiva en solución. Por lo tanto, en principio estos parámetros no están afectados por las transformaciones químicas que ocurren en la superficie del electrodo. Los otros dos componentes en el circuito equivalente, C_{dl} y R_{ct} , dependen de las características dieléctricas y de transferencia farádica en la interfase electrodo / electrolito [92]. La capacitancia de la doble capa C_{dl} depende de la permitividad dieléctrica dentro de la doble capa de las moléculas cargadas, ϵ_{dl} , representada por la ecuación (6.1), donde $\epsilon_0 =$

$8.85 \times 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$ es la constante dieléctrica del vacío, ε_p es la constante dieléctrica efectiva de la capa que separa las cargas iónicas y la superficie del electrodo, A es el área del electrodo, y δ es el espesor de la doble capa.

$$C_{dl} = \frac{\varepsilon_{dl} A}{\delta}; \quad \text{Where } \varepsilon_{dl} = \varepsilon_0 \varepsilon_p \quad (6.1)$$

En el circuito electrónico equivalente la capacitancia de la doble capa, C_{dl} , puede ser representada como una suma de una capacitancia constante de un electrodo sin modificar, C_{Au} , y una capacitancia variable originada desde la superficie del electrodo modificado, C_{mod} , conectados como elementos en serie, **Fig. 6.1B**. Cualquier modificación en el electrodo en las características aislantes disminuye la capacitancia en la doble capa comparadas a un electrodo de metal puro. Por lo tanto, la capacitancia de doble capa puede ser expresada por la Eq.(6.2)

$$\frac{1}{C_{dl}} = \frac{1}{C_{Au}} + \frac{1}{C_{mod}} \quad (6.2)$$

Algunas veces, en particular cuando la superficie del electrodo es áspera, las propiedades electrónicas de la interfase no pueden describirse suficientemente bien con un elemento capacitivo, y un elemento de fase constante (CPE), deben ser introducido en lugar de una capacitancia pura, ver **Fig. 6.1C**, en cuyo caso su impedancia estará dada por la ecuación:

$$CPE = Q^{-1}(j\omega)^{-n} \quad (6.3)$$

El elemento de fase constante refleja la no-homogeneidad de la capa, y el grado de desviación del modelo Randles y Ersler es controlado por el parámetro n en la Eq(6.3). El elemento de fase constante CPE se transforma en una capacitancia cuando $n=1$ [86].

La resistencia de transferencia de carga, R_{ct} , controla la cinética de transferencia de electrones del par indicador redox en la interfase del electrodo. Por lo tanto, al modificar el aislante del electrodo, se espera el retraso en la cinética de transferencia de electrones interfaciales y el aumento de la resistencia de transferencia de carga. La resistencia de transferencia de carga en el electrodo está dada por la Eq. (6.4), donde R_{Au} y R_{mod} son la constante de resistencia a la transferencia de electrones del electrodo sin modificar y la resistencia variable de transferencia de electrones introducido por el modificador, en presencia de la prueba redox

en solución, respectivamente. Estas resistencias están conectadas también como elementos en serie en el circuito electrónico equivalente, **Fig. 6.1D**.

$$R_{ct} = R_{Au} + R_{mod} \quad (6.4)$$

Una forma típica de un espectro de impedancia de un proceso farádico acoplado a un proceso de transferencia de masa representado en un diagrama en el plano complejo de impedancia (*diagrama de Nyquist*) incluye un semicírculo seguido por una línea recta, **Fig. 6.2**. La cinética de transferencia de electrones y las características de difusión pueden ser extraídos de este tipo de espectro. El diámetro del semicírculo es igual a la resistencia de transferencia de carga en el proceso farádico o reacción electroquímica, R_{ct} . La intersección del semicírculo con el eje real de la impedancia, Z_{re} , a altas frecuencias ($\omega \rightarrow \infty$) es igual a la resistencia de la solución, R_s . La extrapolación del círculo de las frecuencias más bajas produce una intersección correspondiente a $(R_{ct} + R_s)$.

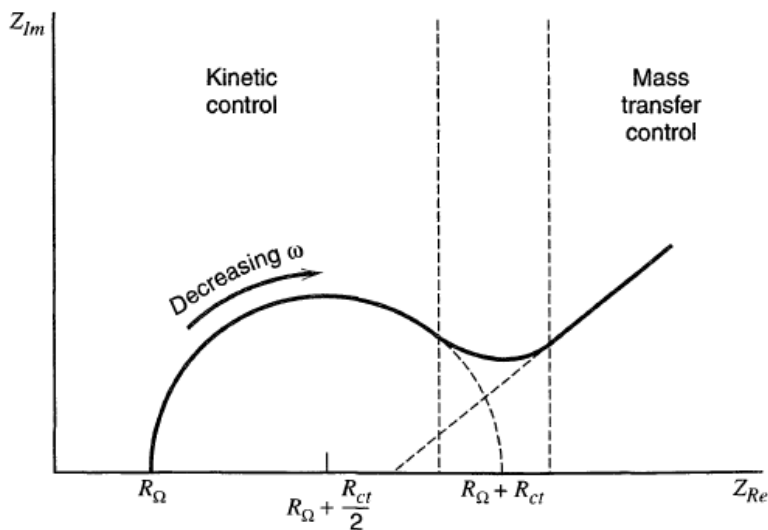


Fig. 6.2 Representación esquemática del diagrama de Nyquist [86].

La porción de semicírculo, **Fig. 6.3**, curva **a**, observado a frecuencias altas, corresponde con el proceso de transferencia limitada de electrones, mientras que la parte lineal es característico del rango de frecuencias más bajas y representa el proceso electroquímico limitado difusionalmente. En el caso de un sistema con una transferencia rápida de electrones, el espectro

de impedancia podría incluir sólo la parte lineal, curva **b**, mientras que una transferencia de electrones muy lenta da como resultado una gran región semicircular que no se acompaña por una línea recta, curva **c**.

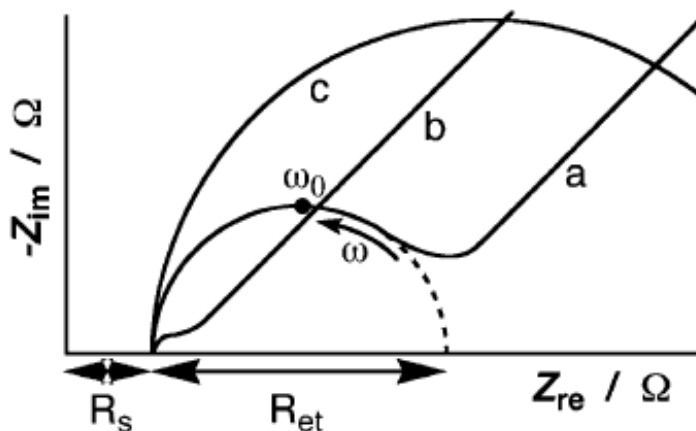


Fig. 6.3 Espectro de impedancia farádica-nofarádica presentado en la forma del diagrama de Nyquist [92].

La frecuencia característica, ω_c , dada por la Eq. (6.5), es igual la inversa de la constante de tiempo del circuito equivalente. El valor máximo de la impedancia imaginaria en la parte semicircular corresponde a $Z_{im} = 0.5R_{ct}$ y se obtiene al aplicar la frecuencia característica, ω_c .

$$\omega_c = (C_{dl}R_{ct})^{-1} \quad (6.5)$$

La Resistencia de transferencia de electrones puede ser interpretada dentro de un intercambio de corriente en un estado de equilibrio, I_0 , Eq. (6.6), y entonces la constante de velocidad de transferencia de electrones heterogénea, K_{et} , puede ser evaluada, Eq. (6.7), donde $R = 8.31 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ es la constante de los gases, T es la temperatura (K), $F = 9.65 \times 10^4 \text{ Cequiv}^{-1}$ es la constante de Faraday, A es el área del electrodo (cm^2), $[S]$ corresponde a la concentración en el seno de la solución del par redox (mol cm^{-2}), y n es el número de electrones transferidos por molécula.

$$R_{ct} = RT(nFI_0)^{-1} \quad (6.6)$$

$$I_0 = nFAk_{et}[S] \quad (6.7)$$

En ausencia de cualquier etiqueta redox en la solución de electrolito, solamente la impedancia *no-farádica* estará presente. Los parámetros de transferencia de carga característicos, R_{ct} y Z_w , se convierten infinitos, y el circuito equivalente se pueden simplificar, como se muestra en el **Fig. 6.1E**. El componente variable en el circuito es presentado por C_{mod} , y este afecta a la parte imaginaria de la impedancia, Z_{im} , Eq. (6.8), considerando únicamente el cargado de la doble capa.

$$Z_{im} = \frac{1}{\omega(C_{Au} + C_{mod})} \quad (6.8)$$

Los resultados experimentales se pueden analizar gráficamente (en el caso del espectro de la impedancia farádica usualmente por el uso de las coordenadas de Nyquist: $Z_{im} vs Z_{re}$) en el marco del modelo teórico [90, 91]. En sistemas reales usualmente es realizado un ajuste no-lineal por computadora de los datos experimentales a un modelo teórico representado por un circuito electrónico equivalente. Todas las características electrónicas del circuito equivalente y los correspondientes parámetros físicos del sistema electroquímico real pueden ser extraídos de dicho análisis. Dado que los parámetros variables del sistema representan las funciones de la capa modificada y su composición, pueden ser utilizados para caracterizar cuantitativamente la capa. Análisis de la $Z_{re}(\omega)$ y los valores $Z_{im}(\omega)$ observados a diferentes frecuencias permite el cálculo de los siguientes parámetros importantes: a) la capacitancia de doble capa, C_{dl} y su componente variable C_{mod} ; b) la resistencia de transferencia de carga, R_{ct} , y su componente variable R_{mod} ; c) la constante de velocidad de transferencia de electrones, k_{et} , para la prueba redox derivada de la resistencia de transferencia de carga, R_{ct} . Por lo tanto, la espectroscopia de impedancia representa no sólo es una técnica de transducción adecuada para seguir las interacciones interfaciales de biomoléculas, sino que también proporciona un método muy poderoso para la caracterización de las características estructurales de la interfase de sensor y para explicar los mecanismos de los procesos químicos que ocurren en las interfases electrodo / solución [92, 93].

6.3 Fundamento metodológico

La **Fig. 6.4** muestra el esquema del diagrama propuesto para definir y comprobar el circuito equivalente apropiado para depósitos de ADN sobre electrodos planos. La metodología empleada para comprobar la validez del circuito equivalente es semejante a la que se empleó en la sección 5.3 para determinar la frecuencia característica en el biosensor de ADN por el método “*frecuencia característica*”, por lo que ya no serán reescritas las ecuaciones empleadas en la metodología. Una mejora en el circuito de prueba del bioelectrodo es la sustitución del interruptor eléctrico en el contra electrodo por un dispositivo electrónico, en este caso un diodo rectificador, el cual cambia su estado de conducción eléctrica con la aplicación o ausencia de un potencial.

La **Fig. 6.4** describe los procesos de carga del capacitor C_{dl} y la descarga del mismo debido a la disipación de corriente a través de la resistencia de transferencia de carga R_{ct} después de aplicar un pulso eléctrico. En una primera parte (**Fig. 6.4a**), el electrodo de trabajo está en un estado de equilibrio, ya que ningún potencial es aplicado. En este momento el diodo rectificador colocado en el contra electrodo está no polarizado, comportándose como un circuito abierto (no conduce). Por tanto, no habrá ninguna caída de potencial en el circuito equivalente, tal como se expresa en la Eq. (5.2). Como un siguiente paso (ver **Fig. 6.4b**), el electrodo de trabajo es excitado con un sobre potencial (η), el cual es seleccionado un valor de potencial suficientemente pequeño (30 mV) para que el sistema tenga un comportamiento lineal entre el voltaje aplicado y la corriente producida. Al aplicar el sobrepotencial η el diodo es polarizado directamente permitiendo el paso de electrones a través de la unión del diodo hacia la celda electroquímica, Eq. (5.4). El sobrepotencial η carga el capacitor de la doble capa, obedeciendo a la Eq. (5.7) y simultáneamente produce una transferencia de carga debido a la presencia del par redox en la solución. Finalmente, un tercer paso, ver **Fig. 6.4c**, el sobre potencial η es removido, el diodo rectificador es polarizado inversamente (circuito abierto) debido a la carga presente en la doble capa en el electrodo de trabajo, produciendo la descarga del capacitor de la doble capa únicamente a través de la resistencia de transferencia de carga, regresando el electrodo de trabajo a un estado de equilibrio.

La función del diodo rectificador es evitar la descarga del capacitor de la doble capa a través de la resistencia de la solución electrolítica y propiciar

la descarga únicamente por las resistencias de transferencia de carga, disminuyendo el voltaje en la doble capa respecto al tiempo.

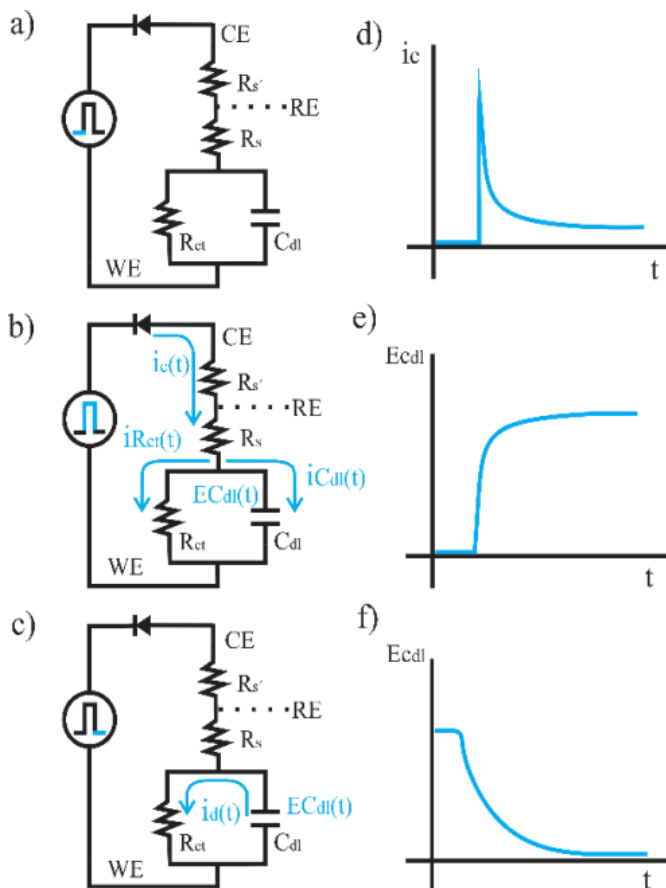


Fig. 6.4 Diagrama eléctrico propuesto para la determinación del circuito equivalente.

El potencial de descarga provee información exclusiva del ADN depositado en la superficie del Au y los cambios electroquímicos debido a las modificaciones en la doble capa que incluyen el proceso de hibridación y las reacciones redox asociadas. La magnitud y el tiempo del pulso eléctrico asegura un cargado máximo del electrodo Au/ADN mientras permanece limitado cinéticamente.

6.4 Resultados

6.4.1 Pulso de potencial

Las respuestas típicas de i - t y E - t para un pulso de potencial de 30mV aplicado al electrodo Au/ssDNA se muestra en la **Fig. 6.5** y **Fig. 6.6**. La curva de color negro en la **Fig. 6.5** corresponde a una cronoamperometría de un solo pulso, el pico de corriente tiende a un valor máximo y después decae rápidamente a un valor cercano a una corriente cero al final del tiempo del pulso. El flujo de corriente se debe a una combinación de almacenamiento de carga de la doble capa y a las reacciones redox en la superficie del electrodo, incluyendo la cinética y los procesos de difusión. En la siguiente etapa el potencial es removido y se efectúa la descarga de la doble capa de C_{dl} a través de la resistencia R_{ct} y simultáneamente por R_s , porque ellas virtualmente están conectadas en paralelo. Un pico con un máximo de corriente también es observado en la etapa de descarga.

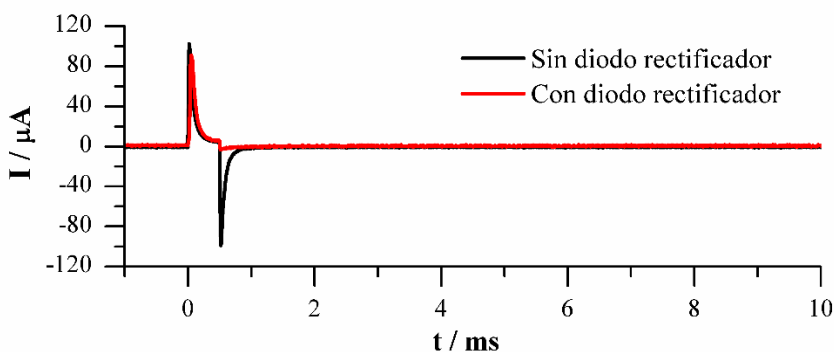


Fig. 6.5 Curvas de respuesta de corriente en un electrodo ssDNA/Au aplicando un pulso de 30mV con (línea roja) y sin diodo rectificador (línea negra).

Usando las mismas condiciones experimentales un segundo experimento de cronoamperometría de un solo pulso es realizado. En este caso un diodo rectificador es conectado en serie con el contra electrodo y virtualmente conectado con la resistencia de la solución R_s . Las respuestas de i - t y E - t para un pulso de potencial de 30 mV aplicado al electrodo ssDNA/Au con el diodo rectificador se muestra como una línea roja en la

Fig. 6.5. En la primera parte del pulso el diodo rectificador está en polarización directa y un pico similar de corriente es observado. En la segunda etapa de descarga, cuando el potencial aplicado es removido, la descarga del capacitor C_{dl} se hace únicamente a través de la resistencia R_{ct} , debido a que el diodo se encuentra en polarización inversa y esto imposibilita el flujo de corriente eléctrica a través de la resistencia de la solución R_s hacia el sensor. Como un resultado, el tiempo de descarga de voltaje en el capacitor de doble capa puede ser significativamente diferente dependiendo que tan grande o pequeña es R_{ct} . Información adicional de los procesos en el electrodo pueden ser obtenidos si nosotros medimos el potencial de descarga del C_{dl} con el electrodo de referencia. Al retirar el sobrepotencial, el decaimiento en potencial de la doble capa (**Fig. 6.6** línea roja) es mucho más lento que el observado cuando el diodo rectificador no es usado en el experimento (**Fig. 6.6** línea negra). Las curvas de decaimiento de potencial en la parte de descarga, dependen notablemente de la estructura de la doble capa, y pueden ser usadas como un principio de detección del evento de hibridación de las secuencias de ADN, como se discute enseguida.

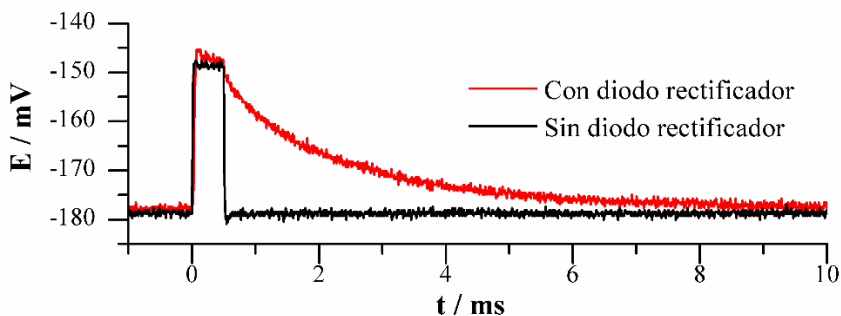


Fig. 6.6 Curvas de respuesta de potencial en un electrodo ssDNA/Au aplicando un pulso de 30mV con (línea roja) y sin diodo rectificador (línea negra).

6.4.2 Modelo de circuito equivalente

Un análisis más minucioso de las respuestas de la doble capa reveló que las curvas de decaimiento de potencial están en realidad compuestas por dos procesos relacionados a dos tiempos de relajación. Las curvas de decaimiento de los electrodos Au/ADN fueron ajustados a un modelo matemático representado por las ecuaciones (6.9) y (6.10):

$$E(t) = E_{top}(t) + E_{bottom}(t) + E_{OC} \quad (6.9)$$

$$E(t) = E_{m_{top}} e^{\frac{-t}{\tau_{top}}} + E_{m_{bottom}} e^{\frac{-t}{\tau_{bottom}}} + E_{OC} \quad (6.10)$$

Donde $E(t)$ es el potencial total de la doble capa en función del tiempo, que incluye la adición de dos términos de deconvolución E_{top} y E_{bottom} . Estas funciones de potencial son las expresiones de los decaimiento de potencial correspondientes a los tiempos de relajación τ_{top} y τ_{bottom} con iniciales potenciales máximos $E_{m_{top}}$ y $E_{m_{bottom}}$ respectivamente. El término E_{OC} en ambas ecuaciones corresponde al potencial a circuito abierto del electrodo.

Las curvas experimentales de decaimiento E-t del electrodo Au/ssDNA y Au/dsDNA se muestran en las líneas negras de la **Fig. 6.7** y **Fig. 6.8**, y sus curvas de ajuste (líneas rojas) que corresponden a la Eq. (6.10). Puede ser observado la coincidencia de las curvas y que existe un buen ajuste entre el modelo teórico expresado por las ecuaciones ((6.9) y (6.10)) y los datos experimentales.

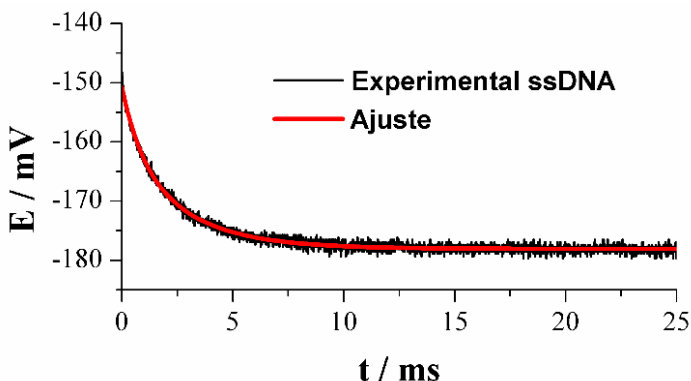


Fig. 6.7 Curva de decaimiento de potencial del electrodos Au/ssDNA con diodo rectificador.

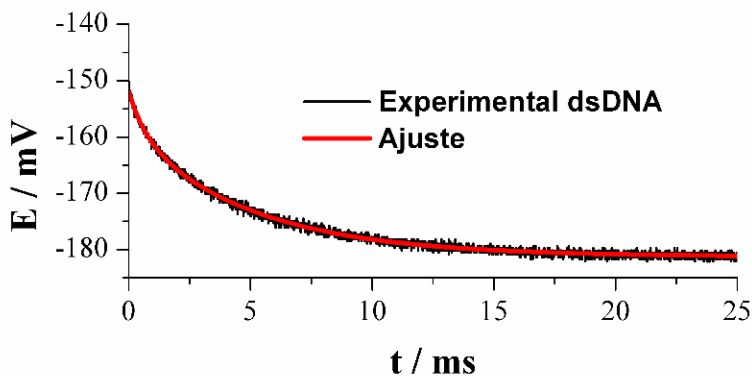


Fig. 6.8 Curva de decaimiento de potencial del electrodos Au/dsDNA con diodo rectificador.

A partir de la ecuación (6.9) pueden ser extraídas de las señales experimentales del ADN los dos componentes principales de potencial: el potencial de la interfase solución/ADN (E_{top}) y el potencial de la interfase ADN/Au (E_{bottom}). Los resultados en ssDNA se muestran en la **Fig. 6.9**. Como podemos observar, el potencial E_{bottom} (curva negra) decae muy rápido respecto al tiempo (4ms), mientras que el potencial E_{top} (curva roja) decae en un tiempo más largo (10 ms). Antes de los 4ms, el voltaje E_{bottom} juega un papel predominante en el voltaje total $E(t)$, mientras que E_{top} se va haciendo dominante gradualmente con el tiempo.

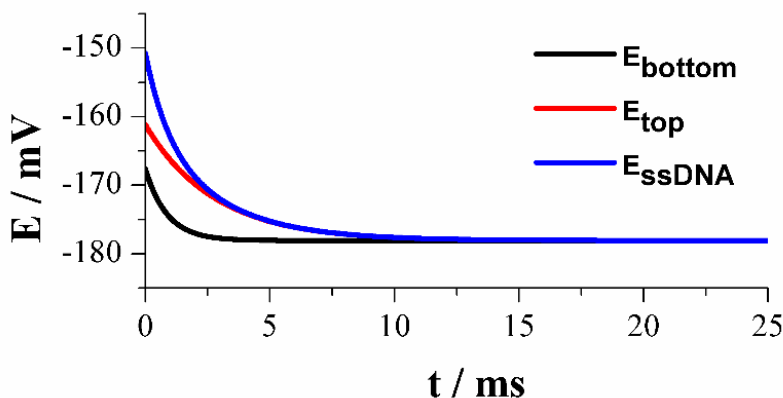


Fig. 6.9 Componentes principales de potencial: el potencial de la interfase solución/ssDNA (E_{top}) y el potencial de la interfase ssDNA/Au (E_{bottom}).

Este modelo con dos términos de decaimiento exponencial, describe el comportamiento únicamente de la descarga de la doble capa. Los parámetros obtenidos desde el ajuste del modelo con los datos experimentales se muestran en la **Tabla 6.1**:

Tabla 6.1 Parámetros obtenidos desde el ajuste de la Curva de decaimiento de potencial del electrodo Au/ssDNA.

| ssDNA | | |
|------------------------|-------|-----------------------|
| Parámetro | Valor | Error estándar |
| E_{OC} | -178 | 2.85×10^{-6} |
| $E_{m\text{top}}$ | -161 | 1.32×10^{-4} |
| τ_{top} | 2.82 | 1.25×10^{-5} |
| $E_{m\text{bottom}}$ | -167 | 1.25×10^{-4} |
| τ_{bottom} | .909 | 9.25×10^{-6} |
| R^2 | 0,999 | |

$E_x/\text{mV}, \tau_x/\text{ms}$

Tabla 6.2 Parámetros obtenidos desde el ajuste de la Curva de decaimiento de potencial del electrodo Au/dsDNA.

| dsDNA | | |
|------------------------|-------|-----------------------|
| Parámetro | Valor | Error estándar |
| E_{OC} | -181 | 2.81×10^{-6} |
| $E_{m\text{top}}$ | -159 | 1.88×10^{-5} |
| τ_{top} | 5.04 | 5.10×10^{-6} |
| $E_{m\text{bottom}}$ | -174 | 2.05×10^{-5} |
| τ_{bottom} | .738 | 4.08×10^{-6} |
| R^2 | 0.999 | |

$E_x/\text{mV}, \tau_x/\text{ms}$

Las máximas amplitudes $E_{m\text{top}}$ y $E_{m\text{bottom}}$ son atribuidas al divisor de voltaje creadas por dos resistencias de transferencia de carga que están en serie, R_{ctt} y R_{ctb} , respectivamente. R_{ctt} es la Resistencia que resulta por la inmovilización de DNA debido a la carga negativa de los grupos fosfato en el DNA, los cuales repelen electrostáticamente la carga negativa del par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ e interfieren en la transferencia de electrones sobre la superficie del electrodo de Au. R_{ctb} es la interferencia en la transferencia de electrones entre el electrodo de Au y el ADN.

El tiempo en la etapa de descarga en el cual E_{top} y E_{bottom} son aproximadamente cero están relacionadas al valor de sus constantes de tiempo, los cuales indican que el electrodo Au/ADN tiene dos capacitancias

(C_t y C_b) que están en paralelo con sus respectivas resistencias de transferencia de carga ($R_{ctt} || C_t$ y $R_{ctb} || C_b$), ver **Fig. 6.11**. Esto indica que no solo hay un tiempo de relajación, sino dos tiempos de relajación en serie (τ_{top} y τ_{bottom}), por tanto, significa que el circuito simple de Randles no es el circuito equivalente apropiado para hacer ajustes a datos experimentales de un electrodo de ADN depositado sobre una superficie de Au.

Analizando las máximas amplitudes de potencial (E_{mtop} y $E_{mbottom}$) antes y después de la hibridación de ADN, se puede observar que el potencial E_{mtop} se incrementa respecto a su potencial original en ssDNA, mientras que el potencial $E_{mbottom}$ disminuye respecto a su potencial original en el ssDNA, esto ocurre únicamente por un incremento en la resistencia R_{ctt} , la cual es directamente proporcional a la diferencia de potencial E_{mtop} . Una manera de verificar este comportamiento es comparando los tiempos en los cuales $E_{mbottom}$ es aproximadamente cero (ver **Fig. 6.9** y **Fig. 6.10**), como se puede observar no hay una diferencia significativa en sus tiempos, por tanto no hay ningún cambio significativo en el valor de la resistencia R_{ctb} o en la capacitancia C_b .

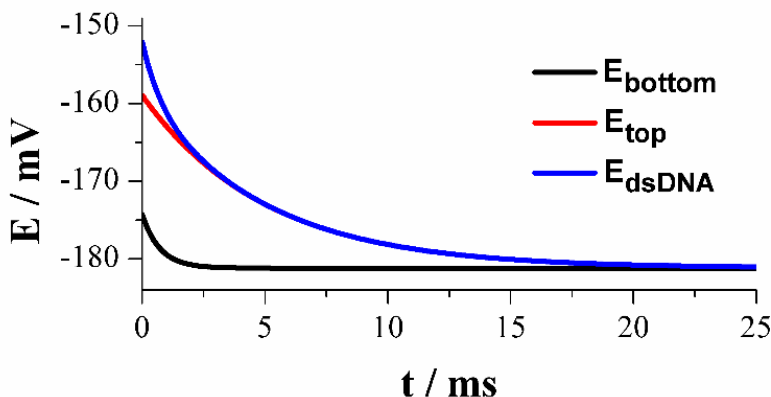


Fig. 6.10 Componentes principales de potencial: el potencial de la interfase solución/dsDNA (E_{top}) y el potencial de la interfase dsDNA/Au (E_{bottom}).

El incremento en R_{ctt} es atribuido a una mayor repulsión de especies redox con carga negativa presente en el electrolito con la carga negativa de los grupos fosfato de la doble cadena de ADN, la cual respecto a la cadena sencilla de ADN dificulta aún más el proceso de intercambio de electrones.

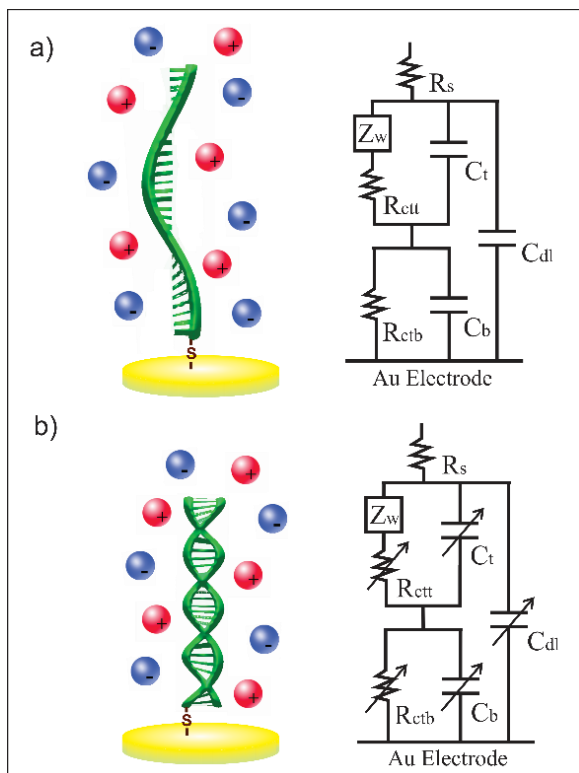


Fig. 6.11 Ilustración y modelo eléctrico de ADN/par redox: ssDNA inmovilizado y b) dsDNA.

Con la finalidad de evaluar la validez del circuito equivalente propuesto, el circuito Randles y el nuevo circuito equivalente fueron comparados de acuerdo a un ajuste de mínimos cuadrados no lineal. Las curvas de ajuste de los circuitos equivalentes respecto a sus datos experimentales son presentados en la **Fig. 6.12**, **Fig. 6.13**, **Fig. 6.14** y **Fig. 6.15**. En estas curvas se puede apreciar que el ajuste del nuevo circuito equivalente es mejor que el obtenido a partir del circuito de Randles. El grado de ajuste es comprobado a partir de los valores de desviación expresados por el valor de X cuadrada que es mucho menor en el caso del nuevo modelo propuesto.

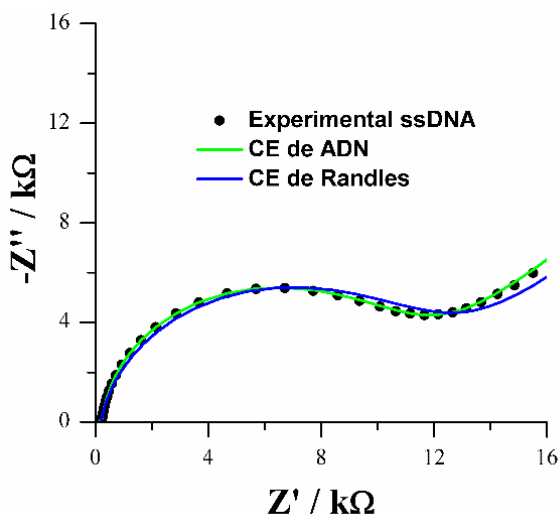


Fig. 6.12 Diagrama de Nyquist de electrodo de Au/ssDNA y su ajuste con el circuito de Randles (línea azul) y el nuevo circuito equivalente (línea verde).

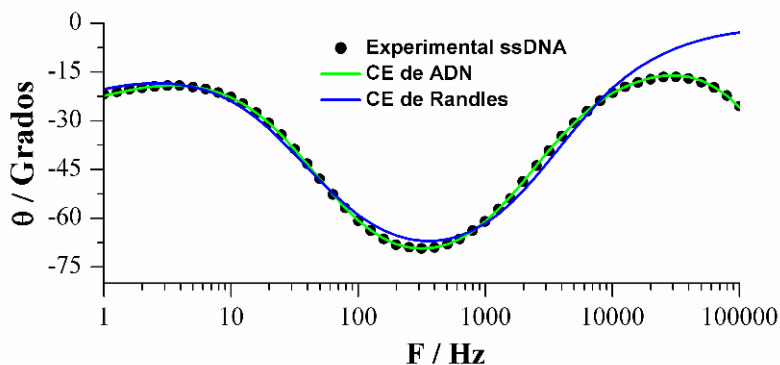


Fig. 6.13 Diagrama de bode de electrodo de Au/ssDNA y su ajuste con el circuito de Randles (línea azul) y el nuevo circuito equivalente (línea verde).

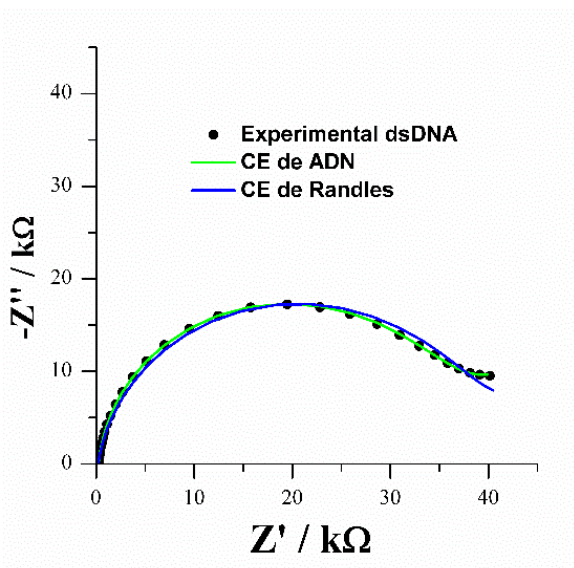


Fig. 6.14 Diagrama de Nyquist de electrodo de Au/dsDNA y su ajuste con el circuito de Randles (línea azul) y el nuevo circuito equivalente (línea verde).

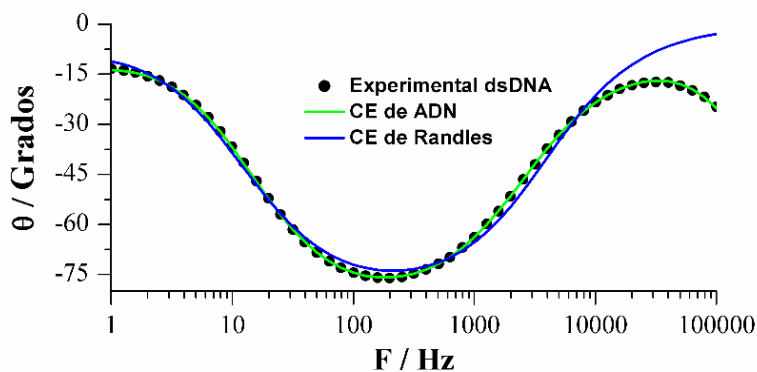


Fig. 6.15 Diagrama de bode de electrodo de Au/dsDNA y su ajuste con el circuito de Randles (línea azul) y el nuevo circuito equivalente (línea verde).

6.4.3 Desempeño analítico

Para evaluar el circuito equivalente, un pulso de potencial fue aplicado en presencia de diferentes concentraciones de target de ADN y analizado

bajo condiciones óptimas. La **Fig. 6.16** muestra la hibridación con diferentes concentraciones de cadenas complementarias de ADN. Como se puede ver, con el incremento de concentración de ADN complementario en la solución de hibridación, los valores de ΔE_{up} incrementan gradualmente, indicando el aumento de estructuras de doble hélice formadas. La diferencia de E_{mtop} (ΔE_{mtop}) antes y después de la hibridación fue utilizada como señal de sensado, se encontró que ΔE_{up} mostro un buen ajuste con los valores de $C_{DNA}(\ln C_{DNA})$ en un amplio rango de concentraciones desde 1000nM a 1nM. La ecuación de regresión fue:

$$\Delta E_{mtop} = 4.33 + 4.941 \ln(C_{DNA}/\text{nM}) \quad (6.11)$$

con un coeficiente de correlación de 0.991 y un límite de detección estimado de 0.3nM en concentración de ADN.

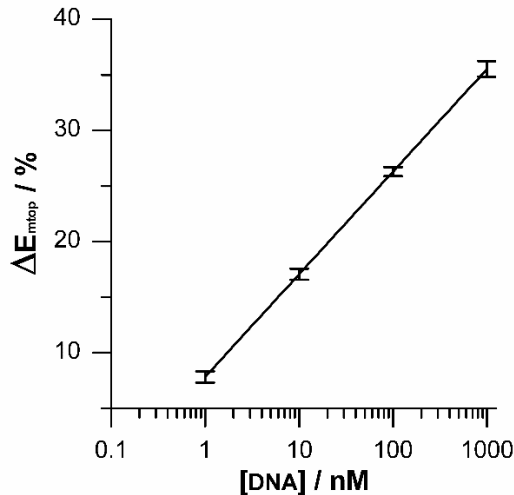


Fig. 6.16 Cambio porcentual de E_{mtop} a diferentes concentraciones de ADN complementario.

Con la finalidad de hacer un ajuste de los datos experimentales con el nuevo circuito equivalente, la técnica EIS fue empleada para caracterizar la Resistencia de transferencia de carga ($\Delta R_{total\ EIS}$) en los electrodos de Au modificados con ADN antes y después de la hibridación. Como se puede ver en la **Fig. 6.17**, los resultados mostraron que la relación entre la resistencia y la concentración de ADN complementario tiene una respuesta

logarítmica en un rango de 1 a 1000nM. La ecuación de la regresión lineal fue:

$$\Delta R_{total\ EIS} = 53.042 + 28.33\ln(C_{DNA}/nM) \quad (6.12)$$

con un coeficiente de correlación de 0.987 y un límite de detección de 0.38nM de ADN, demostrando que el análisis cuantitativo de $R_{total\ EIS}$ puede ser obtenido desde el nuevo circuito equivalente aquí propuesto, observándose que R_{total} incrementa con el aumento de la concentración de ADN complementario.

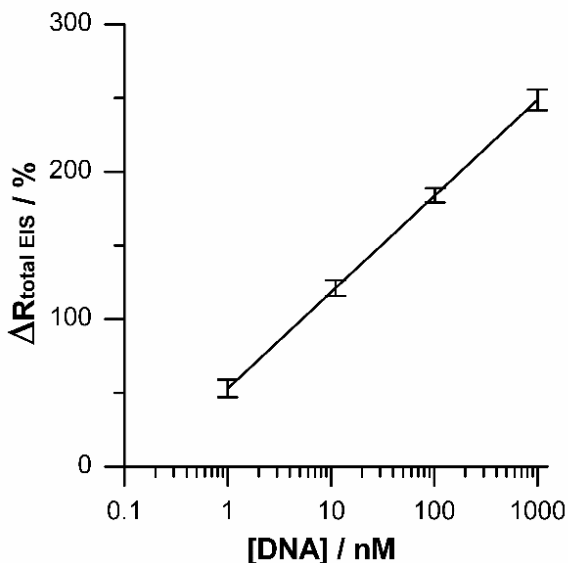


Fig. 6.17 Relación entre el cambio porcentual de $\Delta R_{total\ EIS}$ a diferentes concentraciones de ADN complementario. Para esta curva de calibración se empleó la técnica EIS y los datos experimentales de impedancia fueron ajustados con el nuevo circuito equivalente.

6.5 Conclusiones

En este capítulo, fue presentado un nuevo modelo del circuito equivalente para representar el comportamiento en impedancia de la doble capa compuesta de un electrodo de oro modificado con cadenas sencillas de ADN. El circuito propuesto es útil para la evaluación de la variación de

la resistencia de transferencia de carga asociada con la hibridación de ssDNA a diferentes concentraciones de ADN complementario. Los espectros de impedancia experimentales fueron ajustados por un método de mínimos medios cuadrados no-lineales al nuevo circuito equivalente con bastante exactitud. En comparación con el circuito de Randles, el nuevo circuito equivalente mostró un mejor ajuste en el diagrama de Bode y de Nyquist, exhibiendo un valor de R^2 de 0.999 en ssDNA. Resultados similares fueron obtenidos (R^2 de 0.999) en la hibridación de la ssDNA con su cadena complementaria. El análisis del potencial de relajación indicó que el cambio en el valor de R_{total} es principalmente causado por el cambio en la resistencia R_{ctu} (Resistencia entre el ADN y la solución). Los cambios en el potencial de relajación sobre el electrodo modificado con ADN pueden ser usados para el desarrollo de un nuevo biosensor. De manera significativa el ajuste del nuevo circuito equivalente podría ser aplicado en general a otro tipo de biosensores de ADN para la extracción de parámetros estacionarios, cinéticos y difusionales.

Capítulo 7: Biosensor “Corriente de relajación”

7.1 Introducción

La detección de la secuencia específica de ADN se ha convertido en uno de los temas más importantes en bioanálisis, debido a su potencial aplicación generalizada en diversos campos, tales como el diagnóstico de enfermedades, la detección de drogas, la prevención de epidemias, y la protección al medio ambiente [94].

La espectroscopia de impedancia electroquímica proporciona un método simple para medir cambios en la solución o propiedades interfaciales de materiales sobre la superficie de un electrodo, incluyendo superficies sensibles a eventos de reconocimiento molecular. Una ventaja importante de EIS es que la detección puede ser “*label-free*”, es decir, los cambios en las propiedades eléctricas de la superficie del electrodo surgen solo de la interacción con la molécula blanco o problema [88]. A pesar que esta técnica es altamente sensible, esta ventaja algunas veces limita su aplicación como resultado de ser tan susceptible a interferencias. Además, los genosensores electroquímicos que dependen de EIS requieren un tiempo de adquisición de datos demasiado largo [95]. Sin embargo, se ha sustituido con éxito por otras técnicas electroquímicas menos sofisticadas [96], tal como voltamperometría de pulso diferencial [97], cronoamperometría [73, 74, 98, 99], cronopotenciometría [100] o conmutación de ADN [101]. El mecanismo de conmutación de la cadena de ADN funciona por medio de la alteración de las distancias de las etiquetas redox desde el electrodo causados por la conmutación al hibridar con la cadena de ADN complementaria [101].

Tras el descubrimiento de la conmutación inducida eléctricamente de los oligonucleótidos de ADN sobre superficies de metal, las biosuperficies conmutadas han sido usadas exitosamente para la detección de ADN y proteínas con alta sensibilidad [102, 103]. Típicamente, esta metodología ha sido usada en sensores ópticos, sin embargo, poca literatura ha sido

encontrada sobre biosuperficies conmutadas aplicadas a sensores electroquímicos.

En este capítulo se describe un sistema para detectar el ADN relacionado al Virus del Papiloma Humano (VPH), basado en el método impedimétrico “*Corriente de Relajación*” (CR), el cual proporciona información acerca de las propiedades conformacionales de los bioelectrodos de ADN en base al cambio de la resistencia de transferencia de carga de un par redox debido a la hibridación de las cadenas sencillas de ADN inmovilizadas en electrodos de Au en un corto tiempo (750 μ s) y solo con un pulso de potencial. El método “*Corriente de Relajación*” está basado en el método “*frecuencia característica*” descrita en capítulos anteriores, esta metodología además de medir el voltaje en la doble capa mide también la corriente de relajación (corriente farádica). Una de las ventajas de esta metodología respecto a las metodologías impedimétricas tradicionales empleadas en biosensores de ADN es que no necesita hacer ajustes con circuitos equivalentes o la separación de sus componentes electroquímicos (farádicas y no farádicas) con ostentosos algoritmos computacionales para determinar la resistencia de transferencia de carga en el electrodo modificado con ADN.

7.2 Fundamento metodológico

7.2.1 Corriente de relajación

El objetivo de la metodología “*Corriente de Relajación*” es impedir la creación de corrientes y potenciales de relajación originadas por los elementos capacitivos (doble capa) y resistivos (resistencia de solución y de transferencia de carga) que conforman la superficie de un electrodo Au/DNA. Para el bloqueo de la corriente de cargado en la doble capa, un capacitor externo (C_{out}) es incorporado en paralelo a la celda electroquímica (ver **Fig. 7.1**).

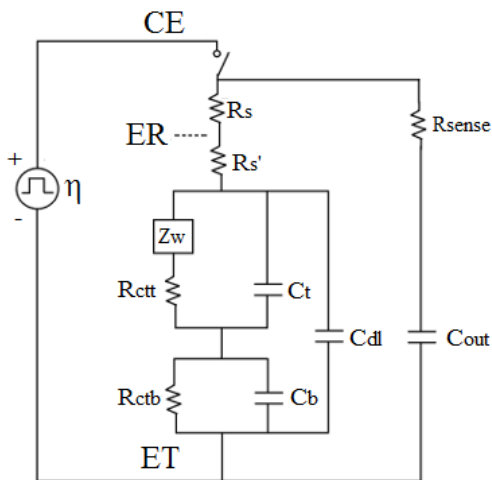


Fig. 7.1 Diagrama eléctrico propuesto para determinar la corriente de relajación

La inyección de carga es realizada aplicando un pulso de potencial (ir a la sección 5.3). El electrodo Au/DNA está en un estado de equilibrio electroquímico (Eq. (5.2)), ningún sobrepotencial es aplicado, ver **Fig. 7.1**.

Para un $t > 0$, el interruptor *SWI* está cerrado y el sobrepotencial es directamente aplicado a la celda electroquímica tal y como se muestra en la. En esta etapa dos corrientes principales fluyen a través del circuito (ver **Fig. 7.2**), la primera circula dentro de la celda electroquímica, la cual corresponde únicamente a las corrientes farádicas y es inversamente relacionada a la suma de resistencias de transferencia de carga y la resistencia de la solución. La segunda corriente eléctrica es la corriente de carga del capacitor externo, esta corriente por su naturaleza disminuye exponencialmente con el tiempo $i_{Cout}(t)$.

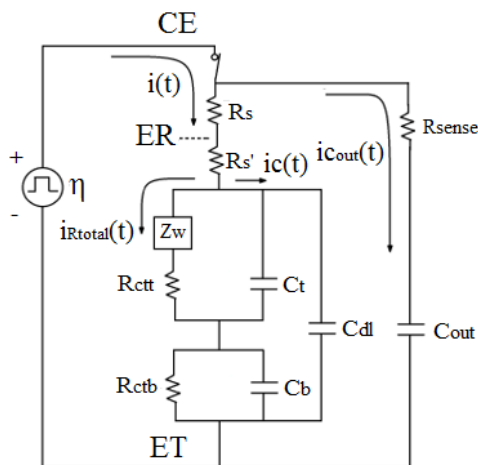


Fig. 7.2 Inyección de carga al electrodo Au/ADN.

La suma de las dos corrientes eléctricas respecto al tiempo es la corriente total demandada al sistema de detección, tal y como se muestra en la siguiente ecuación.

$$i(t) = i_{Rtotal} + i_{Cout}(t) \quad (7.1)$$

La corriente de carga del capacitor externo C_{out} está gobernada por la ecuación:

$$i_{Cout}(t) = \frac{\eta}{R_{sense}} e^{-\frac{t}{\tau_{out}}} \quad (7.2)$$

Donde

$$\tau_{out} = R_{sense} C_{out} \quad (7.3)$$

τ_{out} es la constante de tiempo del capacitor externo C_{out} en la etapa de carga. Para un $t \geq 5\tau_{out}$ la carga en el capacitor externo está casi completa, entonces el interruptor **SW1** es abierto (**Fig. 7.3**) y el potencial aplicado es removido de la celda electroquímica y de C_{out} .

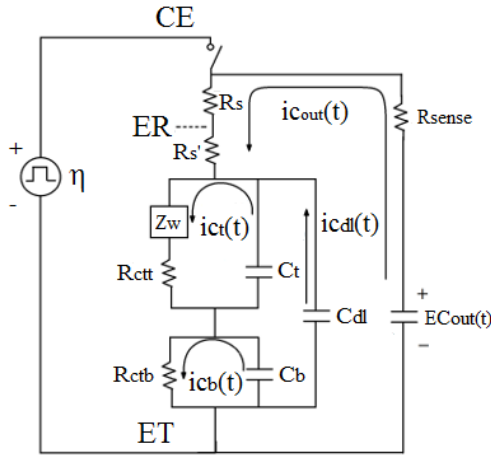


Fig. 7.3 Descarga de corriente en el electrodo de Au/ADN.

En este instante el capacitor externo comienza a descargarse por la R_{total} debido a que ella se encuentra en paralelo con el capacitor externo. R_{total} corresponde a la suma de resistencias:

$$R_{total} = R_{sense} + R_s + R_{ctu} + R_{ctd} \quad (7.4)$$

Por tanto, el voltaje y la corriente en el capacitor externo disminuirá respecto al tiempo de acuerdo a las siguientes ecuaciones respectivamente:

$$E_{Cout}(t) = \eta e^{-\frac{t}{\tau_r}} \quad (7.5)$$

$$i_{Cout}(t) = \frac{\eta}{R_{total}} e^{-\frac{t}{\tau_r}} \quad (7.6)$$

Donde τ_r es la constante de tiempo en la descarga del capacitor externo, este puede ser calculado por la siguiente ecuación.

$$\tau_r = R_{total}C_{out} \quad (7.7)$$

Despejando de la Eq. (7.5) el potencial η y sustituyéndolo en la Eq.(7.6), se obtiene la siguiente ecuación

$$i_{\text{Cout}}(t) = \frac{E_{\text{Cout}}(t)}{R_{\text{total}}} \quad (7.8)$$

O

$$R_{\text{total}} = \frac{E_{\text{Cout}}(t)}{i_{\text{Cout}}(t)} \quad (7.9)$$

El cambio en R_{total} denotado por ΔR_{total} es el parámetro de detección en el biosensor el cual es indicador de la hibridación del ssDNA en la superficie del electrodo.

7.2.2 Circuito de sentido

La arquitectura electrónica del biosensor de ADN se muestra en la **Fig. 7.4**.

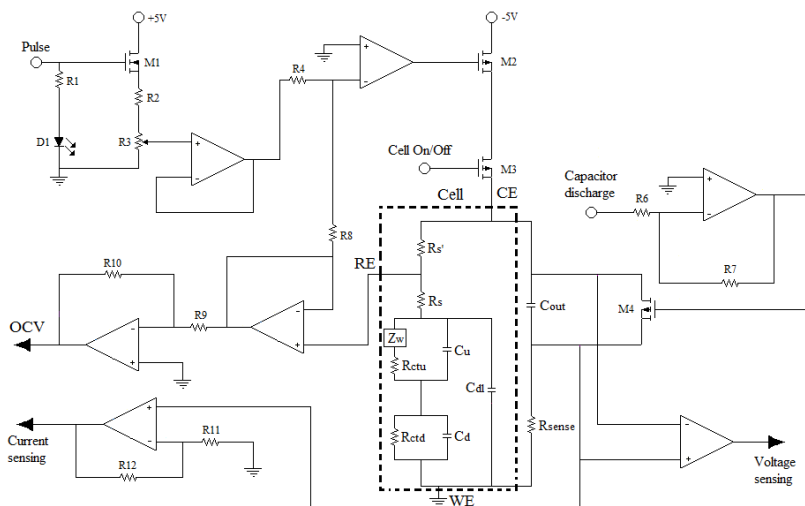


Fig. 7.4 Arquitectura electrónica del biosensor de ADN “Corriente de relajación”.

El biosensor está constituido por seis secciones electrónicas principales:

-
- “*Cell On/off*” es la entrada digital que activa el MOSFET (M3) para la interconexión entre la celda electroquímica y el biosensor. A través de M3 el potencial y la corriente es aplicada a la celda electroquímica.
 - *OCV* mide el voltaje de circuito abierto de la celda electroquímica.
 - *Pulse* La función de esta entrada es aplicar el potencial de corriente continua con la que se realiza la medición de la resistencia de transferencia de carga. La amplitud de pulso se ajusta con el resistor R3.
 - *Voltage sensing* mide la diferencia de potencial en el capacitor externo.
 - *Current sensing* mide la corriente de descarga del capacitor externo.
 - *Capacitor discharge* es la entrada digital que pone en corto circuito el capacitor externo para realizar una nueva medición.

7.3 Resultados

7.3.1 Características electroquímicas de electrodos modificados

Para evaluar el desempeño del método “*Corriente de Relajación*”, las señales de voltaje de relajación de ssDNA y dsDNA fueron medidas con la arquitectura electrónica propuesta para el biosensor. Analizando el decaimiento de potencial en cada pulso (tal como se muestra en la **Fig. 7.5**), los resultados muestran dos componentes principales (dos constantes de tiempo) en ssDNA y dsDNA sin capacitor externo, como se discutió en la sección 6.4.2.

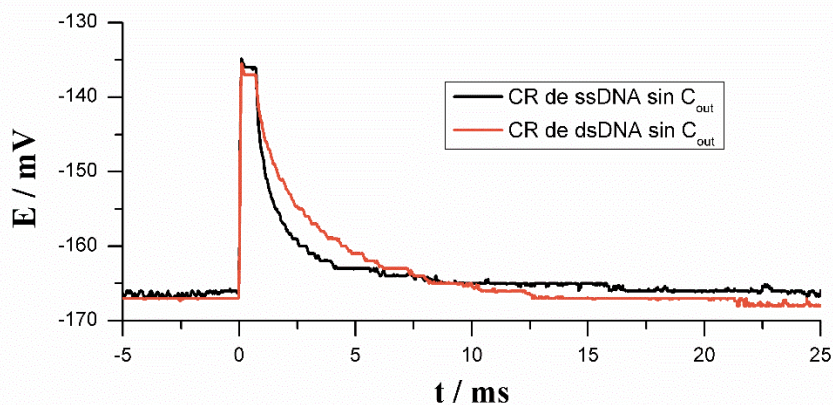


Fig. 7.5 Voltaje de relajación (sin capacitor externo C_{out}) en electrodos de Au/ssDNA y Au/dsDNA.

Con las mismas condiciones experimentales, un segundo experimento fue realizado usando el capacitor externo (ver Fig. 7.6). Se puede observar la presencia de solo un tiempo de relajación en ssDNA y dsDNA, este resultado es el efecto del capacitor externo al cancelar la carga de los capacitores formados en la superficie del electrodo DNA/Au, por tanto, el tiempo de relajación es directamente atribuido al producto de la resistencia R_{total} con el capacitor externo C_{out} como se expresa en la Eq.(7.7).

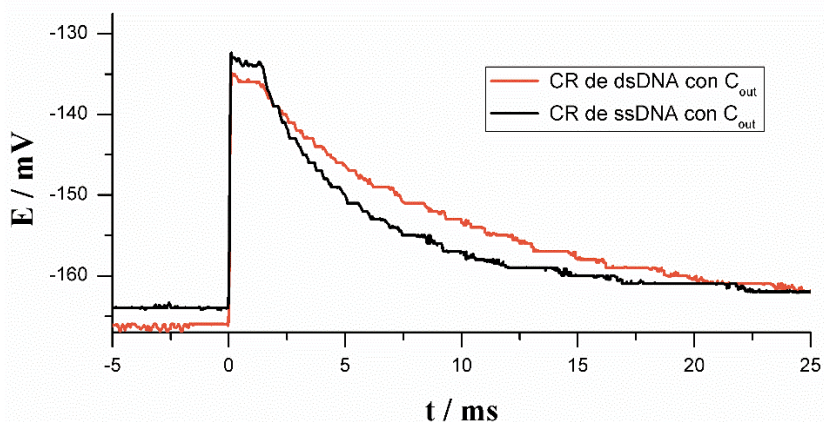


Fig. 7.6 Voltaje de relajación (con capacitor externo C_{out}) en electrodos de Au/ssDNA y Au/dsDNA.

Analizando las corrientes farádicas y no farádicas en cada pulso de potencial con el capacitor externo (ver **Fig. 7.7**), en la etapa donde el potencial está siendo aplicado se puede observar la corriente eléctrica demandada por el capacitor C_{out} (estado transiente) y la resistencia R_{total} (estado estacionario). Removiendo instantáneamente el potencial, se observa un abrupto cambio en corriente debido a la corriente de descarga del capacitor externo C_{out} a través de la resistencia R_{total} y el decaimiento de potencial en el capacitor C_{out} (ver **Fig. 7.6**) tal como se expresa en la Eq.(7.8), donde el tiempo de relajación es atribuido al producto de $R_{total}C_{out}$ de acuerdo a la Eq.(7.7).

El recuadro dentro de la **Fig. 7.7** muestra con más detalle el decremento de corriente después de hibridar la cadena sencilla de ADN con su cadena complementaria formando una doble hélice de ADN. El decremento de corriente puede ser interpretado como un incremento en la resistencia R_{total} , debido al aumento de repulsión electrostática de las cargas negativas de los grupos fosfatos del ADN y los aniones del par redox indicador $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, el cual resulta en una barrera interfacial para la transferencia de electrones hacia el electrodo.

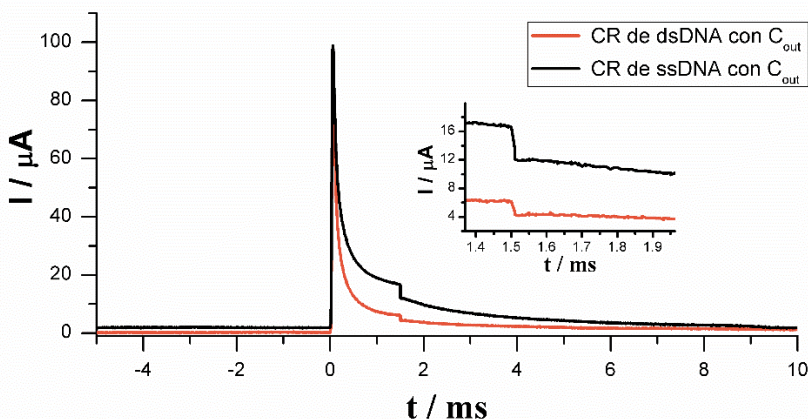


Fig. 7.7 Corriente de relajación (con capacitor externo C_{out}) en electrodos de Au/ssDNA y Au/dsDNA.

Para determinar el valor de R_{total} , el potencial y la corriente son medidos a un mismo tiempo como se expresa en la Eq. (7.9). La diferencia del valor de R_{total} antes y después de hibridar el ADN fueron usados como señal de medición para determinar si la secuencia específica de ADN

relacionada al VPH tipo 16 depositada en electrodo de Au formó la cadena doble con su cadena complementaria.

$$\Delta R_{\text{total}} = R_{\text{total dsDNA}} - R_{\text{total ssDNA}} \quad (7.10)$$

En adición, la relación porcentual de variación de señal (RVS) corresponde al cambio en la resistencia R_{total} tras la hibridación, fue determinada de acuerdo a la ecuación:

$$\Delta R_{\text{total CR}} = \frac{R_{\text{total dsDNA}} - R_{\text{total ssDNA}}}{R_{\text{total ssDNA}}} \times 100\% \quad (7.11)$$

7.3.2 Desempeño analítico

El desempeño analítico del biosensor de ADN fue investigado hibridando la prueba de ssDNA con diferentes concentraciones de secuencia complementaria de ADN. La **Fig. 7.8** describe la relación lineal entre $\Delta R_{\text{total CR}}$ y las diferentes concentraciones de ADN complementario, donde $\Delta R_{\text{total CR}}$ fue aumentando con el incremento de concentración de cadena problema. Un rango de concentraciones de 5nM a 20 nM de ADN complementario fue analizado. Los resultados mostraron una línea recta, correspondiente a la ecuación de regresión:

$$\% \Delta R_{\text{total CR}} = 2.991x + 81.5519 \quad (7.12)$$

Con un coeficiente de correlación de 0.9553. El límite de detección fue estimado como 0.39 nM empleando el valor de 3σ (donde σ es su desviación estándar del blanco). Tres repeticiones en la medición de RVS% se realizaron por cada concentración de ADN complementario. Los resultados del método de “*Corriente de Relajación*” confirmaron la hibridación exitosa del ADN complementario de VPH tipo 16.

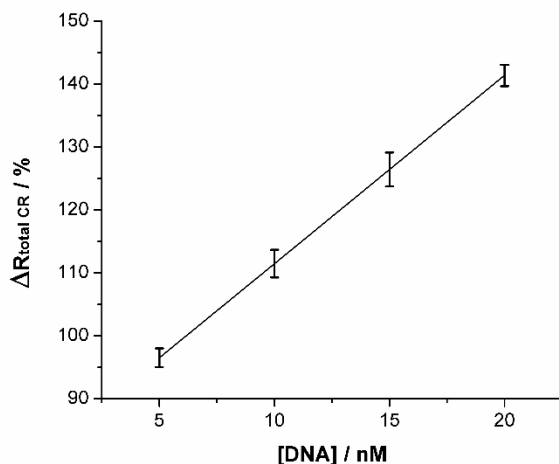


Fig. 7.8 Sensibilidad del biosensor de ADN “*Corriente de relajación*” a diferentes concentraciones de ADN.

El desempeño analítico del biosensor fue también evaluado con fines de validación y comprobación empleando la técnica EIS para seguir la inmovilización de la prueba de ADN y determinar la hibridación de los oligonucleótidos a diferentes concentraciones de ADN blanco o problema (ver **Fig. 7.9**). También se puede observar que $\Delta R_{\text{total EIS}}$ se incrementa en consecuencia del aumento de concentración de ADN complementario y posee una relación lineal en el rango de concentraciones de 5nM a 20nM. El resultado de la regresión lineal es representado por la ecuación:

$$\% \Delta R_{\text{total EIS}} = 3.083x + 82.88 \quad (7.13)$$

con un coeficiente de regresión $R^2 = 0.9329$, y un límite de detección estimado de 0.41nM. Todos los experimentos de espectroscopía de impedancia fueron ajustados con el modelo del circuito equivalente propuesto en la sección 6.4.2.

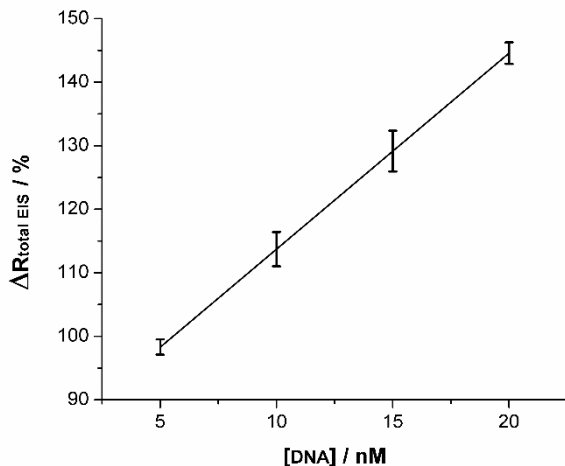


Fig. 7.9 Relación entre el cambio porcentual de $\Delta R_{\text{total EIS}}$ a diferentes concentraciones de ADN complementario. Para esta curva de calibración se empleó la técnica EIS y los datos experimentales de impedancia fueron ajustados con el nuevo circuito equivalente (ir a sección 6.4.2).

Las técnicas “*corriente de relajación*” y EIS mostraron similitudes en sus curvas de calibración ((9.12) y (9.13)), excepto que EIS tuvo menor ajuste en su coeficiente de regresión con una diferencia aproximadamente de dos centésimas respecto a la técnica “*corriente de relajación*”. Esta diferencia mayor en EIS es debido a la incertidumbre que hay al realizar los ajustes de los datos experimentales con el circuito equivalente y aunado a esto que los niveles de concentración se encuentran cercanos al límite de detección.

7.3.3 Selectividad

Para evaluar la selectividad del biosensor se emplearon diferentes cadenas de ADN: secuencia de ADN totalmente complementaria, secuencia no-complementaria y una secuencia con un *mismatch*. La **Tabla 7.1** muestra la comparación de la variación R_{total} entre la técnica “*corriente de relajación*” y la técnica EIS para la detección de $1\mu\text{M}$ de ADN complementario de HPV tipo 18, donde se observa una diferencia porcentual entre las dos técnicas, en ssDNA de 1.66% y en dsDNA de 1.50%; con un cambio en ΔR_{total} de 267% en EIS y 269% en CR.

Tabla 7.1 Comparación de la variación ΔR_{total} entre el biosensor “*corriente de relajación*” y la técnica EIS para la detección de $1\mu M$ de ADN complementario de HPV tipo 16.

| | EIS/ $k\Omega$ | Biosensor / $k\Omega$ | $\Delta/\%$ |
|--------------------|----------------|-----------------------|-------------|
| ssDNA | 2.47 | 2.52 | 1.66 |
| dsDNA | 9.12 | 9.25 | 1.50 |
| ΔR_{total} | 6.65 | 6.73 | 1.19 |

Adicionalmente, se llevó a cabo la medición por triplicado en la hibridación de cadenas de ADN con un *mismatch* (Tabla 7.2), mostrando un cambio menor en los valores de $\Delta R_{total CR}$ obtenidos en la hibridación con las secuencias complementarias de ADN. Los valores de $\Delta R_{total CR}$ fueron 209%, 227% y 216% en las muestra 1, 2 y 3, respectivamente. La comparación en las variaciones porcentuales de R_{total} en ssDNA y dsDNA (con un *mismatch*) entre la técnica “*corriente de relajación*” y la técnica EIS no fue mayor a 3.50%, ver Tabla 7.2.

Tabla 7.2 Comparación de la variación ΔR_{total} entre el biosensor “*corriente de relajación*” y la técnica EIS para la detección de $1\mu M$ de ADN complementario (1-base mismatched) de HPV tipo 16.

| ssDNA | | | |
|---------|----------------|-----------------------|-------------|
| Muestra | EIS/ $k\Omega$ | Biosensor / $k\Omega$ | $\Delta/\%$ |
| 1 | 5.23 | 5.27 | 0.79 |
| 2 | 7.20 | 7.37 | 2.37 |
| 3 | 7.82 | 7.81 | 0.1 |
| dsDNA | | | |
| Muestra | EIS/ $k\Omega$ | Biosensor / $k\Omega$ | $\Delta/\%$ |
| 1 | 16.89 | 16.31 | 3.50 |
| 2 | 23.70 | 24.10 | 1.68 |
| 3 | 24.40 | 24.69 | 1.18 |

Comparando la hibridación del ADN totalmente complementario con la cadena de ADN con un solo *mismatch*. Los cambios porcentuales de $\Delta R_{total CR}$ fueron: 269% a 217 % respectivamente. Lo cual nos da una relación de cambio de un 23% cuando hay un *mismatch* en la cadena complementaria de ADN.

7.4 Conclusiones

El sensor de ADN prototipo “*Corriente de relajación*” mostró un rendimiento aceptable debido a que su simplificada arquitectura electrónica en comparación con otros dispositivos impedimétricos de detección de ADN, ya que es más barata y requiere menos etapas de procesamiento de la señal. Debido a que el procedimiento de detección en “*corriente de relajación*” se realiza mediante el uso de corriente directa, solo un escalón de potencial es empleado, a diferencia de EIS que necesita generadores de frecuencia alterna, siendo así más propensas al ruido electromagnético ambiental. Una ventaja muy importante que ejerce la técnica de “*corriente de relajación*” respecto a EIS, es el tiempo de detección. Normalmente en experimentos convencionales de EIS emplean espectroscopias de 100kHz-10mHz con un promedio de duración de detección completo de 35 min. El tiempo de detección en la técnica “*corriente de relajación*” fue de 750 μ s, lo cual la hace una nueva técnica rápida en comparación con la tradicional EIS aplicada a biosensores de ADN. En comparación con las R_{total} obtenidas con mediciones de EIS y CR se observó una diferencia porcentual entre las dos técnicas, en ssDNA de 1.6% y en dsDNA de 1.5%. Consecuentemente, este sensor no necesita realizar ajustes de datos experimentales a circuitos equivalentes, pudiéndolo emplear en distintos tipos de topologías de biomoléculas de reconocimiento, que contengan de 1 a x tiempos de relajación. Además, el uso del arreglo eléctrico-electrónico de dispositivos (capacitor externo y diodo rectificador) y el escalón de potencial nos permitió poder separar las aportaciones de corriente faradaica y no faradaica, objetivo que hasta la actualidad no había sido posible separar por hardware en biosensores amperométricos y sin necesidad de modelos matemáticos aplicados por software a datos experimentales para la separación de las mismas.

Capítulo 8: Conclusiones generales

En este trabajo se propuso y se reportó el diseño de dos biosensores electroquímicos de ADN para la detección de VPH, basados en las metodologías “*Frecuencia característica*” y “*Relajación de corriente*” usando oligonucleótidos sintéticos correspondientes al VPH.

La técnica “*Frecuencia característica*” simplifico la espectroscopia de barrido (100KHz-10mHz) que normalmente se usa en EIS por una sola frecuencia la cual puede reconstruir toda la impedancia y determinar así los valores de resistencia de transferencia de carga, resistencia de la solución y capacitancia de la doble capa. Los tiempos de detección en impedancia con la técnica “*Frecuencia característica*” fueron de 30s que en comparación con EIS duran aproximadamente 35 min es mucho menor. Además, mostro ciertas ventajas en cuanto a su arquitectura electrónica ya que no necesita generación de ruido electrónico, ni numerosas memorias para almacenar los datos medidos al realizar los experimentos.

La propuesta del uso de diodo rectificador, transistor Mosfet o de interruptores electrónicos colocados en serie con en el contra electrodo, permitieron medir y caracterizar la descarga de potencial de la doble capa únicamente sobre la superficie del electrodo de Au modificado con ADN. Este tipo de descarga provee relevante información relacionada con los dos tiempos de relajación que están presentes en el depósito de ADN y de su circuito equivalente. Este análisis indico que el circuito de Randles actualmente utilizado como circuito para ajustar datos experimentales de espectroscopía de impedancia en electrodos Au/ADN no es el correcto, ya que este solo tiene un tiempo de relajación. El circuito equivalente aquí propuesto ajusto los datos experimentales de impedancia en todo el rango de frecuencias con un menor error en comparación con el circuito de Randles empleado tradicionalmente en investigaciones aplicadas a biosensores de ADN. Además, los resultados obtenidos en el cambio en el potencial de relajación sobre el electrodo modificado con ssDNA y dsDNA pueden ser usados para el desarrollo de un nuevo biosensor de ADN y aplicados en general usando esta misma metodología a otro tipo de biosensores para la extracción de parámetros estacionarios, cinéticos y difusionales.

Una mejora en los biosensores propuestos en esta tesis fue el biosensor “*Corriente de relajación*” debido a que este tipo de biosensor es capaz de separar la corriente faradaica y no faradaica con un pulso de potencial sin necesidad de excitar el depósito de ADN con alguna frecuencia alterna. Su tiempo de medición es estimada en 750 μ s, que en comparación con “*Frecuencia característica*” y EIS, es 40 y 2800 veces menor en su tiempo de detección, respectivamente. Los resultados obtenidos con la técnica “*Corriente de relajación*” en depósitos de ADN con dos tiempos de relajación demostraron que este tipo de biosensor puede ser aplicado en bioelectrodos modificados con multicapas de otro tipo de biomolécula de reconocimiento o de ADN para determinar su resistencia de transferencia de carga, donde usualmente la técnica EIS es difícil de implementar debido al ajuste de los datos experimentales con un circuito equivalente apropiado.

En ambos biosensores fue posible medir el potencial de relajación en la superficie del electrodo modificado con ssDNA y dsDNA, así como determinar en el caso del biosensor “*Corriente de relajación*” la corriente de relajación de la doble capa del electrodo de Au modificado con ADN. El análisis del potencial de relajación permitió determinar el circuito equivalente del depósito de ADN sobre el electrodo de Au. Cumpliendo así con los objetivos planteados al inicio del desarrollo de este trabajo.

Las técnicas “*Frecuencia característica*” y “*Corriente de relajación*” basadas en la carga y descarga de corriente de la doble capa únicamente en su superficie permitieron cabalmente detectar la hibridación del ADN proveniente del VPH tipo 16, concluyendo así que la hipótesis propuesta en esta tesis es aceptada.

Comparando los dos biosensores se puede llegar a la conclusión que el biosensor “*Corriente de relajación*” es mejor que el de “*Frecuencia característica*” debido a que emplea voltaje de corriente directa, su tiempo de detección es menor, el procesamiento de la señal no requiere varias etapas, puede ser usado en depósitos con varios tiempos de relajación en la superficie de sus bioelectrodos y la construcción de su arquitectura electrónica es más simple y barata que los biosensores basados en espectroscopia de impedancia.

En relación a biosensores de ADN basados en cronoamperometría, el biosensor “*Corriente de relajación*” impone ciertas ventajas debido a la facilidad de separación de corrientes faradaicas y no faradaicas, ya que actuales biosensores emplean algoritmos matemáticos para poder separar las corrientes u otros analizan los cambios de pendiente en su estado transiente y estacionario. Además, este tipo de análisis los hacen en la etapa de cargado donde hay implicaciones en su corriente total ya sea por el cargado de la doble capa, cambios en la resistencia solución o en la

resistencia de transferencia de carga. Esto hace que este tipo de biosensores tenga más variables y sea más ostentoso su análisis. El biosensor “*Corriente de relajación*” discrimina todas estas aportaciones de corriente empleando arreglos de componentes electrónicos (diodo rectificador, transistor Mosfet o de interruptores electrónicos) y eléctricos (Capacitores) en su celda electroquímica, que en relación con los módulos de procesamiento de señal de los biosensores amperométricos anteriormente descritos son mucho más baratos.

Una de las desventajas de los biosensores son sus límites de detección. Los límites de detección en los biosensores propuestos en esta tesis fueron altos (aproximadamente 400 pM en ambos) respecto a otro tipo de biosensores de ADN donde su límite de detección es cercano a fM e incluso hasta zM. Cabe señalar que este tipo de biosensores emplean topologías de biomoléculas de reconocimiento diferentes, así como multicapas para poder amplificar la señal de transducción y tener límites de detección menores.

Este tipo de metodologías y biosensores de ADN en un trabajo a futuro pueden ser aplicados con distintas topologías de biomoléculas de reconocimiento, para así disminuir los límites de detección y desarrollar un biosensor completamente atractivo para la detección de enfermedades u otro tipo de aplicaciones con mayor especificidad y sensibilidad. Además de esto, en futuras investigaciones se puede aplicar este tipo de biosensores en un mayor número de muestras para así desarrollar una estadística de reproducibilidad.

Bibliografía

1. Perumal, V. and U. Hashim, *Advances in biosensors: Principle, architecture and applications*. Journal of Applied Biomedicine, 2014. **12**(1): p. 1-15.
2. Kahn, K. and K.W. Plaxco, *Principles of biomolecular recognition*, in *Recognition Receptors in Biosensors*, M. Zourob, et al., Editors. 2010, Springer-Verlag: New York, NY. p. 1-863.
3. Lowe, C.R., *Overview of Biosensor and Bioarray Technologies*, in *Handbook of Biosensors and Biochips, 2 Volume Set*, R.S. Marks, et al., Editors. 2007, Wiley.
4. Altintas, Z. and I. Tothill, *Biomarkers and biosensors for the early diagnosis of lung cancer*. Sensors and Actuators, B: Chemical, 2013. **188**: p. 988-998.
5. Leca-Bouvier, B.D. and L.J. Blum, *Enzyme for Biosensing Applications*, in *Recognition Receptors in Biosensors*, M. Zourob, et al., Editors. 2010, Springer-Verlag: New York, NY. p. 1-863.
6. Morrison, D.W.G., et al., *Clinical Applications of Micro- and Nanoscale Biosensors*, in *Biomedical Nanostructures*, K. Gonsalves, et al., Editors. 2007, Wiley.
7. Amine, A., et al., *Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition*. Biosensors and Bioelectronics, 2016. **76**: p. 180-194.
8. Donahue, A.C. and M. Albitar, *Antibodies in Biosensing*, in *Recognition Receptors in Biosensors*, M. Zourob, et al., Editors. 2010, Springer-Verlag: New York, NY. p. 1-863.
9. Burcu Bahadır, E. and M. Kemal Sezgintürk, *Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics*. Talanta, 2015. **132**: p. 162-174.
10. Arugula, M.A. and A. Simonian, *Novel trends in affinity biosensors: current challenges and perspectives*. Measurement Science & Technology, 2014. **25**(3).
11. Gan, N., et al., *An ultrasensitive electrochemical immunosensor for HIV p24 based on Fe₃O₄@SiO₂ nanomagnetic probes and nanogold colloid-labeled enzyme-antibody copolymer as signal tag*. Materials, 2013. **6**(4): p. 1255-1269.
12. Venkatesh, A.G., et al., *Yeast dual-affinity biobricks: Progress towards renewable whole-cell biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **70**: p. 462-468.
13. Wang, P., *Cell-based biosensors; principles and applications*, in *Cell-based biosensors; principles and applications*, P. Wang and Q. Liu, Editors. 2010, Ringgold Inc: Portland.
14. Gu, M.B. and H.-S. Kim, *Biosensors Based on Aptamers and Enzymes*, ed. T. Scheper. Vol. 140. 2014, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
15. Lee, S., et al., *A highly sensitive aptasensor towards Plasmodium lactate dehydrogenase for the diagnosis of malaria*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **35**(1): p. 291-296.
16. Teles, F.R.R. and L.P. Fonseca, *Trends in DNA biosensors*. Talanta, 2008. **77**(2): p. 606-623.
17. Evtugyn, G., *Biochemical Components Used in Biosensor Assemblies*, in *Biosensors: Essentials*, G. Evtugyn, Editor 2014, Springer Verlag: DE.
18. Torati, S.R., et al., *Electrochemical biosensor for Mycobacterium tuberculosis DNA detection based on gold nanotubes array electrode platform*. Biosensors and Bioelectronics, 2016. **78**: p. 483-488.
19. Abdulhalim, I., M. Zourob, and A. Lakhtakia, *Overview of Optical Biosensing Techniques*, in *Handbook of Biosensors and Biochips, 2 Volume Set*, R.S. Marks, et al., Editors. 2007, Wiley.
20. Fan, X., et al., *Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review*. Analytica Chimica Acta, 2008. **620**(1): p. 8-26.
21. Dickert, F.L. and P.A. Lieberzeit, *Imprinted Polymers in Chemical Recognition for Mass-Sensitive Devices*, in *Piezoelectric Sensors*, C. Steinem and A. Janshoff, Editors. 2007, Springer-Verlag: Dordrecht.

22. Li, Y.P., et al., *External-field-free magnetic biosensor*. Applied Physics Letters, 2014. **104**(12): p. 122401.
23. Marrows, C.H., *Magnetic Biosensor Techniques*, in *Handbook of Biosensors and Biochips, 2 Volume Set*, R.S. Marks, et al., Editors. 2007, Wiley.
24. Rocha-Santos, T.A.P., *Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles*. TrAC-Trends in Analytical Chemistry, 2014. **62**: p. 28-36.
25. Arya, S.K., S.P. Singh, and B.D. Malhotra, *Electrochemical Techniques in Biosensors*, in *Handbook of Biosensors and Biochips, 2 Volume Set*, R.S. Marks, et al., Editors. 2007, Wiley.
26. Banica, F.-G., *Chemical sensors and biosensors: fundamentals and applications*2012: John Wiley & Sons.
27. Malhotra, B.D. and A. Turner, *Advances in Biosensors: Perspectives in Biosensors*2003: Elsevier Science.
28. Monošík, R., M. Stred'anský, and E. Šturdík, *Application of Electrochemical Biosensors in Clinical Diagnosis*. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2012. **26**(1): p. 22-34.
29. Watson, J.D. and F.H.C. Crick, *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-738.
30. Watson, J.D. and F.H.C. Crick, *Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid*. Nature, 1953. **171**(4361): p. 964-967.
31. Liu, A., et al., *Development of electrochemical DNA biosensors*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2012. **37**: p. 101-111.
32. Drummond, T.G., M.G. Hill, and J.K. Barton, *Electrochemical DNA sensors*. Nat Biotech, 2003. **21**(10): p. 1192-1199.
33. Odenthal, K.J. and J.J. Gooding, *An introduction to electrochemical DNA biosensors*. Analyst, 2007. **132**(7): p. 603-610.
34. Lazerges, M. and F. Bedioui, *Analysis of the evolution of the detection limits of electrochemical DNA biosensors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(11): p. 3705-3714.
35. Palecek, E., *Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid*. Nature, 1960. **188**(4751): p. 656-657.
36. Jelen, F., et al., *Label-Free Determination of Picogram Quantities of DNA by Stripping Voltammetry with Solid Copper Amalgam or Mercury Electrodes in the Presence of Copper*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(18): p. 4788-4793.
37. Wang, J. and A.-N. Kawde, *Amplified label-free electrical detection of DNA hybridization*. Analyst, 2002. **127**(3): p. 383-386.
38. Paleček, E., M. Fojta, and F. Jelen, *New approaches in the development of DNA sensors: hybridization and electrochemical detection of DNA and RNA at two different surfaces*. Bioelectrochemistry, 2002. **56**(1): p. 85-90.
39. Fojta, M., et al., *Two-surface strategy in electrochemical DNA hybridization assays: Detection of osmium-labeled target DNA at carbon electrodes*. Electroanalysis, 2003. **15**(5-6): p. 431-440.
40. Mearns, F.J., et al., *DNA biosensor concepts based on a change in the DNA persistence length upon hybridization*. Electroanalysis, 2006. **18**(19-20): p. 1971-1981.
41. Anne, A. and C. Demaille, *Electron transport by molecular motion of redox-DNA strands: Unexpectedly slow rotational dynamics of 20-mer ds-DNA chains end-grafted onto surfaces via C-6 linkers*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(30): p. 9812-9823.
42. Drummond, T.G., et al., *Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes*. Nature Biotechnology, 2000. **18**(10): p. 1096-1100.
43. Kelley, S.O., et al., *Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA*. Nucleic Acids Research, 1999. **27**(24): p. 4830-4837.
44. Holmlin, R.E., P.J. Dandliker, and J.K. Barton, *Charge transfer through the DNA base stack*. Angewandte Chemie-International, 1997. **36**(24): p. 2715-2730.
45. Jampasa, S., et al., *Electrochemical detection of human papillomavirus DNA type 16 using a pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe immobilized on screen-printed carbon electrodes*. Biosensors & Bioelectronics, 2014. **54**: p. 428-434.
46. zur Hausen, H., *Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account*. Virology, 2009. **384**(2): p. 260-265.

47. Hausen, H.z., *Papillomavirus infections — a major cause of human cancers*, 1996, Elsevier B.V. p. F55-F78.
48. Muñoz, N., et al., *Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer*. New England Journal of Medicine, 2003. **348**(6): p. 518-527.
49. Civit, L., et al., *Electrochemical genosensor array for the simultaneous detection of multiple high-risk human papillomavirus sequences in clinical samples*. Analytica Chimica Acta, 2012. **715**: p. 93-98.
50. Thomison, J., L.K. Thomas, and K.R. Shroyer, *Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma*. Human Pathology, 2008. **39**(2): p. 154-166.
51. Stoler, M.H., *Human Papillomaviruses and Cervical Neoplasia: A Model for Carcinogenesis*. International Journal of Gynecological Pathology, 2000. **19**(1): p. 16-28.
52. Ganguly, N. and S.P. Parihar, *Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis*. Journal of Biosciences, 2009. **34**(1): p. 113-123.
53. Arbyn, M., et al., *Clinical applications of HPV testing: A summary of meta-analyses*. VACCINE, 2006. **24**(Suppl. 3): p. 78-89.
54. Mateos Lindemann, M.L., et al., *Analytical Comparison of the cobas HPV Test with Hybrid Capture 2 for the Detection of High-Risk HPV Genotypes*. The Journal of Molecular Diagnostics, 2012. **14**(1): p. 65-70.
55. He, Y., et al., *Rolling circle amplification combined with gold nanoparticles-tag for ultra sensitive and specific quantification of DNA by inductively coupled plasma mass spectrometry*. Biosensors & Bioelectronics, 2014. **58**: p. 209-213.
56. Li, J., et al., *Rolling circle amplification combined with gold nanoparticle aggregates for highly sensitive identification of single-nucleotide polymorphisms*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(7): p. 2811-2816.
57. Wu, G., et al., *Fabrication and application of a new DNA biosensor based on on-substrate PCR and electrochemistry*. Sensors and Actuators, B: Chemical, 2011. **160**(1): p. 598-603.
58. Tran, L.D., et al., *Development of interdigitated arrays coated with functional polyaniline/MWCNT for electrochemical biodetection: Application for human papilloma virus*. Talanta, 2011. **85**(3): p. 1560-1565.
59. Wang, J., *Study of Electrode Reactions and Interfacial Properties*, in *Analytical Electrochemistry*2006, John Wiley & Sons, Inc. p. 29-66.
60. Wang, J., *Controlled-Potential Techniques*, in *Analytical Electrochemistry*2006, John Wiley & Sons, Inc. p. 67-114.
61. Yao, B., et al., *Sensitive detection of microRNA by chronocoulometry and rolling circle amplification on a gold electrode*. Chemical Communications, 2014. **50**(68): p. 9704-9706.
62. Sato, S. and S. Takenaka, *PCR-Free Telomerase Assay Using Chronocoulometry Coupled with Hexaammineruthenium(III) Chloride*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(3): p. 1772-1775.
63. Steel, A.B., T.M. Herne, and M.J. Tarlov, *Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(22): p. 4670-4677.
64. Keighley, S.D., et al., *Optimization of DNA immobilization on gold electrodes for label-free detection by electrochemical impedance spectroscopy*. Biosensors and Bioelectronics, 2008. **23**(8): p. 1291-1297.
65. Lisdat, F. and D. Schäfer, *The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing*. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(5): p. 1555-1567.
66. Chang, B.-Y. and S.-M. Park, *Electrochemical impedance spectroscopy*. Annual Review of Analytical Chemistry, 2010. **3**(1): p. 207-229.
67. Xiao-Zi Yuan, et al., *PEM Fuel Cells and their Related Electrochemical Fundamentals*, in *Electrochemical Impedance Spectroscopy in PEM Fuel Cells: Fundamentals and Applications*2010, Springer London: London. p. 1-37.
68. Barsoukov, E. and J.R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*2005: Wiley.
69. Retter, U. and H. Lohse, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, in *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*, F. Scholz, et al., Editors. 2010, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 159-177.

70. Xiao-Zi Yuan, et al., *Electrical Fundamentals*, in *Electrochemical Impedance Spectroscopy in PEM Fuel Cells: Fundamentals and Applications* 2010, Springer London: London. p. 39-93.
71. Levine, P.M., *Active CMOS Sensor Array for Electrochemical Biomolecular Detection*. IEEE J. Solid-State Circuits, 2008. **43**(8): p. 1859-1871.
72. Putzbach, W. and N.J. Ronkainen, *Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review*. Sensors (Switzerland), 2013. **13**(4): p. 4811-4840.
73. Zheng, D., et al., *Development of a novel electrochemical DNA biosensor based on elongated hexagonal-pyramid CdS and poly-isonicotinic acid composite film*. Biosensors & Bioelectronics, 2014. **60**: p. 167-174.
74. Shi, A., et al., *A sensitive electrochemical DNA biosensor based on gold nanomaterial and graphene amplified signal*. Sensors and Actuators, B: Chemical, 2014. **200**: p. 206-212.
75. Chowdhury, A.D., R. Gangopadhyay, and A. De, *Highly sensitive electrochemical biosensor for glucose, DNA and protein using gold-polyaniline nanocomposites as a common matrix*. Sensors and Actuators, B: Chemical, 2014. **190**: p. 348-356.
76. Wongkittisuksa, B., et al., *Development and application of a real-time capacitive sensor*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. **26**(5): p. 2466-2472.
77. Sankoh, S., et al., *A comparative study of a label-free DNA capacitive sensor using a pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe immobilized through polyphenylenediamine and polytyramine non-conducting polymers*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2013. **177**: p. 543-554.
78. Fang, X., et al., *Integrated biochip for label-free and real-time detection of DNA amplification by contactless impedance measurements based on interdigitated electrodes*. Biosensors & Bioelectronics, 2013. **44**(1): p. 241-247.
79. Thipmanee, O., et al., *Label-free capacitive DNA sensor using immobilized pyrrolidinyl PNA probe: effect of the length and terminating head group of the blocking thiols*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **38**(1): p. 430-435.
80. Tak, M., V. Gupta, and M. Tomar, *Flower-like ZnO nanostructure based electrochemical DNA biosensor for bacterial meningitis detection*. Biosensors & Bioelectronics, 2014. **59**: p. 200-207.
81. Sheng, Q., et al., *Ultrasensitive electrochemical cocaine biosensor based on reversible DNA nanostructure*. Biosensors & Bioelectronics, 2014. **51**: p. 191-194.
82. Rushworth, J.V., et al., *A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer's amyloid-beta oligomers*. Biosensors & Bioelectronics, 2014. **56**: p. 83-90.
83. Fernandes, F.C.B., et al., *Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures*. Biosensors & Bioelectronics, 2014. **57**: p. 96-102.
84. Ensafi, A.A., M. Amini, and B. Rezaei, *Assessment of genotoxicity of catecholics using impedimetric DNA-biosensor*. Biosensors & Bioelectronics, 2014. **53**: p. 43-50.
85. Lee, B., et al. *An electronic DNA sensor chip using integrated capacitive read-out circuit*. in *2010 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology*. 2010.
86. Bard, A.J. and L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* 2000: Wiley.
87. Lee, J., et al., *Wafer-scale nanowell array patterning based electrochemical impedimetric immunosensor*. Journal of Biotechnology, 2013. **168**(4): p. 584-588.
88. Mahmoud, A.M., et al., *A regenerating self-assembled gold nanoparticle-containing electrochemical impedance sensor*. Biosensors & Bioelectronics, 2014. **56**: p. 328-333.
89. Uygun, Z.O. and H.D. Ertuğrul Uygun, *A short footnote: Circuit design for faradaic impedimetric sensors and biosensors*. Sensors and Actuators, B: Chemical, 2014. **202**: p. 448-453.
90. Randles, J.E.B., *Kinetics of rapid electrode reactions*. Discussions of the Faraday Society, 1947. **1**: p. 11.
91. Ershler, B., *Investigation of electrode reactions by the method of charging-curves and with the aid of alternating currents*. Discussions of the Faraday Society, 1947. **1**: p. 269.
92. Katz, E. and I. Willner, *Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors*. Electroanalysis, 2003. **15**(11): p. 913-947.
93. Janata, J., *Electrochemical Sensors and Their Impedances: a Tutorial*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2002. **32**(2): p. 109-120.

-
94. Li, S., et al., *A high-performance DNA biosensor based on the assembly of gold nanoparticles on the terminal of hairpin-structured probe DNA*. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2016. **223**: p. 861-867.
 95. Kong, R.-M., et al., *A label-free electrochemical biosensor for highly sensitive and selective detection of DNA via a dual-amplified strategy*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **54**: p. 442-447.
 96. Galan, T., et al., *Label-free electrochemical DNA sensor using "click"-functionalized PEDOT electrodes*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015. **74**: p. 751-756.
 97. Shi, A., et al., *A sensitive electrochemical DNA biosensor based on gold nanomaterial and graphene amplified signal*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014. **200**: p. 206-212.
 98. Miao, X., et al., *Electrochemical molecular beacon biosensor for sequence-specific recognition of double-stranded DNA*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **59**(0): p. 54-57.
 99. Lee, B., et al., *One-chip electronic detection of DNA hybridization using precision impedance-based CMOS array sensor*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010. **26**(4): p. 1373-1379.
 100. Goda, T., et al., *Label-free potentiometry for detecting DNA hybridization using peptide nucleic acid and DNA probes*. *Sensors* 2013. **13**(2): p. 2267-2278.
 101. Yi, Z., et al., *A novel electrochemical biosensor for sensitive detection of telomerase activity based on structure-switching DNA*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **53**: p. 310-315.
 102. Langer, A., et al., *Protein analysis by time-resolved measurements with an electro-switchable DNA chip*. *Nat Commun*, 2013. **4**.
 103. Li, Q., et al., *Fluorescence quenching studies of potential-dependent DNA reorientation dynamics at glassy carbon electrode surfaces*. *Journal of the American Chemical Society*, 2012. **134**(35): p. 14467-14475.