Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas

Estudio de la respuesta de un biosensor mediante la simulación de interacciones proteína-proteína usando Resonancia de Plasmones Superficiales.

Tesis presentada al

Posgrado en Física Aplicada

como requisito para obtener el título de

Maestría en Ciencias en Física Aplicada

Presenta

Karen Régules Medel

Director de Tesis

Dr. Victor Manuel Altuzar Aguilar

Asesores de Tesis

Dr. Victor Manuel Altuzar Aguilar

Dr. Severino Muñoz Aguirre

Puebla, Pue. Enero 2022

Título: Estudio de la respuesta de un biosensor mediante la simulación de interacciones proteína-proteína usando Resonancia de Plasmones Superficiales.

Estudiante: Karen Régules Medel

COMITÉ

_____

Dra. Georgina Beltrán Pérez
Presidente

_____

Dr. Juan Castillo Mixcoatl
Secretario

_____

Dr. Vicente Garibay Febles
Vocal

_____

Dra. Claudia Oliva Mendoza Barrea
Suplente

_____

Dr. Victor Manuel Altuzar Aguilar
Asesor

_____

Dr. Severino Muñoz Aguirre
Coasesor

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por la educación y formación brindada.

Al fondo SEP-CONACYT, por el financiamiento para el desarrollo de esta tesis (proyectos 286652, 286647 y A1-S-31186).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) la beca otorgada durante mis estudios de maestría, que permitieron la realización de este trabajo de tesis.

A los miembros del Cuerpo Académico de Optoeléctronica y Fotónica de la FCFM-BUAP.

A mis asesores, Dr. Víctor Manuel Altuzar Aguilar y Dr. Severino Muñoz Aguirre, por la guía, enseñanza y tiempo brindado para la realización de este trabajo.

A la Dr. Claudia Oliva Mendoza Barrera por su orientación, apoyo y colaboración.

Al Dr. Aldo Yair Tenorio Barajas, por su colaboración en este trabajo, que fue fundamental para su desarrollo.

Dedicatorias

Esta tesis se la dedico a Dios quien me llenó de amor, paciencia y perseverancia para culminar este trabajo y llegar a esta etapa de mi vida.

A mi madre, por su apoyo en todos los ámbitos de mi vida. Gracias por darme la oportunidad de estudiar.

A mi abuela, por cuidarme como una hija y poner todo su amor en cada detalle hacia mí.

A mi tía, que me inspiró y me sigue inspirando a destacar.

A mis hermanos, con los que puedo seguir disfrutando la vida como si fuéramos niños.

A mi novio Alejandro, que con amor me ha impulsado a ser mejor cada día.

Nomenclatura y Abreviaturas

Abreviatura	Concepto	Unidades
Abs	Anticuerpos	
AMA	Aislante/Metal/Aislante	
anti-BSA	Anticuerpo de la proteína BSA	
anti-HSA	Anticuerpo de la proteína HSA	
ATR	Reflexión total atenuada	
Au	Oro	
B	Densidad de flujo magnético	T
BSA	Albúmina de Suero Bovino	
c	Velocidad de la luz	m/s^2
CH_3CO_2K	Acetato de potasio	
CH_3COOH	Ácido acético	
CH_3COONa	Acetato de sodio	
D	Densidad de flujo eléctrico	C/m^2
d	Espesor de la película adsorbida	nm o Å
E	Campo eléctrico	V/m
EDC	1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida	
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	
Fab	Fragmento de unión al antígeno	
Fc	Fragmento critalizable	
gp120	Glucoproteína superficial que forma parte de la envoltura del VIH	
H	Campo magnético	A/m
HeNe	Hélio-Neón	
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacinil-(1)] etanosulfónico	
HIgG	Inmunoglobulina G humana	
HSA	Albúmina de suero humano	
IgA	Inmunoglobulina A	
IgD	Inmunoglobulina D	
IgE	Inmunoglobulina E	
IgG	Inmunoglobulina G	
IgM	Inmunoglobulina M	
I	Intensidad de luz reflejada	
IA	Inmunoensayos	
$Im[\,]$	Parte imaginaria de un número complejo	
$\mathbf{J}_{ext}$	Densidad superficial de corriente	A/m^2
k	Número de onda	m^{-1}
l_d	Longitud de decaimiento característica de la onda evanescente	nm
MUA	11-ácido mercaptoundecanoico	
n	Índice de refracción	RIU
N	Densidad numérica del adsorbato	$moléculas/cm^3$

n_{eff}	Índice de refracción efectivo	RIU
$\tilde{n}$	Índice de refracción complejo	RIU
PDB	*Protein Data Bank*	
$Re[\,]$	Parte real de un número complejo	
RI	Índice de refracción	RIU
r	Coeficiente de reflexión para el campo eléctrico	
R	Reflectancia	
R_{SPR}	Respuesta del sensor SPR	
$\boldsymbol{S}$	Vector de Poynting	W/m^2
SAM	Monocapa autoensamblada	
SPP	Polaritones de plasmones superficiales	
SPR	Resonancia de Plasmones Superficiales	
SPRM	Microscopía de resonancia de plasmones superficiales	
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinimida	
TE	Transversal eléctrica	
TIR	Reflexión total interna	
TM	Transversal magnética	
v	Velocidad de fase	m/s^2
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana	
α_B	Ángulo de Brewster	rad o deg
α_c	Ángulo crítico en TIR	rad o deg
θ_{SPR}	Ángulo de mínima reflectancia para SPR	deg
Δ	Cambio de valor de una variable	
∇	Operador Nabla	
Γ	Concentración superficial del adsorbato	moléculas/cm^2
λ	Longitud de onda	nm
ω	Frecuencia angular	rad/s
π	Número pi	
ε	Constante dieléctrica	F/m
$\tilde{\varepsilon}$	Constante dieléctrica compleja	F/m
μ	Permeabilidad magnética	H/m
ρ	Densidad absoluta	g/cm^3
ρ_{ext}	Densidad de carga externa	C/m^3

Resumen

El desarrollo de dispositivos biosensores tiene gran relevancia en la detección de moléculas, particularmente en biomedicina. En la presente tesis se desarrolló una metodología para la simulación por dinámica computacional y las ecuaciones de Fresnel, de tres distintos inmunobiosensores ópticos, con potencial aplicación en el diagnóstico o monitoreo terapéutico de diferentes enfermedades. Para ello, se modeló y simuló un biosensor multicapa de Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR) para la detección de antígenos presentes en fluidos humanos. Los elementos de reconocimiento de los biosensores estudiados fueron: 1) albumina de suero de bovino (BSA), 2) albúmina de suero humano (HSA) y 3) anticuerpo humano IgG1b12. Los anticuerpos mencionados se inmovilizaron sobre una película SPR de oro empleando tres tipos de moléculas orgánicas propuestas. Los parámetros físicos de las diferentes monocapas, de cada biosensor, fueron determinadas y empleadas en el modelo teórico de las ecuaciones de Fresnel. Por su parte, se emplearon anti-BSA, anti-HSA y glucoproteína gp120 como antígenos. Se determinaron las conformaciones de unión óptimas de ligando a proteína, para determinar los sitios de unión entre las moléculas de anclaje a la superficie de oro y las proteínas bioreceptoras en el sensor. Los distintos ángulos de calibración de un sensor SPR, para diferentes concentraciones de soluciones de etanol-agua, fueron determinados computacionalmente y comparados con las curvas experimentales en la región lineal y no lineal, previamente reportadas por Jung y colaboradores. La simulación de las curvas SPR mostró que las monocapas funcionales con mejor respuesta se ubican en la región lineal, con un cambio en la respuesta SPR de entre 1.7° y 0.38°. Para la monocapa de IgG, el ángulo mínimo SPR θ_{spr} correspondió a $70.16°$; mientras que para BSA e IgG1b12 humana fueron de $73.87°$ y $71.15°$, respectivamente. El desplazamiento angular de las curvas SPR después de la interacción con los antígenos respectivos anti-BSA, anti-HSA y glucoproteína gp120, fueron de $1.7°$, $1.22°$ y $0.38°$, respectivamente. El ángulo de alto contraste para un buffer neutro (HEPES), los tres biosensores propuestos se encuentran en la región lineal, con un ángulo de contraste $\theta_c = 67°$.

Introducción

En los últimos años se han generado una variedad de avances en el desarrollo de biosensores, debido a la importancia actual de la detección de sistemas biológicos. Entre las técnicas de biosensado con mayor impacto se encuentran las basadas en procesos eléctricos, magnéticos y ópticos [1]. De acuerdo a la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), un biosensor es un dispositivo integrado autónomo capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa específica, utilizando un elemento de reconocimiento biológico o biomimético que está en contacto espacial directo con un transductor [2]. La capa de biorreconocimiento, típicamente compuesta por enzimas, anticuerpos o ácidos nucleicos, está diseñada específicamente para interactuar con el compuesto diana en una muestra. Cuando ocurre la interacción bioquímica, el transductor detecta una serie de cambios fisicoquímicos en el medio o la superficie y los convierte en señales discretas o continuas (**Figura I**) [3].

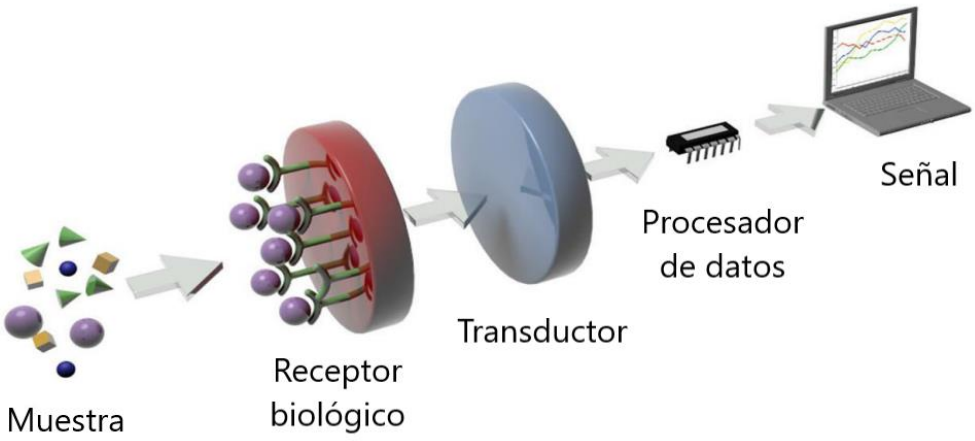

Figura I. Representación esquemática de un biosensor que incluye la muestra heterogénea, el receptor biológico específico, el transductor, el sistema de procesamiento de datos y la señal final [4].

Por su lado, la tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) ha evidenciado ser un instrumento de gran utilidad en el análisis de detección, que permite una lectura directa y en tiempo real de la interacción analito-bioreceptor y la regulación de expresión génica, sin la necesidad de otra molécula de etiquetado. Ello simplifica la medición, a la vez que reduce el tiempo de análisis y aumenta la fiabilidad comparativamente con la mayoría de técnicas inmunológicas que requieren del uso de moléculas marcadores, como los flurocromos [5-7]. Es una técnica sensible que encuentra aplicabilidad en campos como genómica, proteómica, y celómica, donde la afinidad y la cinética de unión se pueden estimar directamente a partir de las respuestas medidas [8, 9]. La técnica SPR se basa en la óptica de onda evanescente, la cual

involucra diversos fenómenos físicos y métodos asociados con la reflexión total interna de la luz en la interfase entre dos medios [10]. En ella se excitan plasmones superficiales en la interfase entre una película metálica y un medio dieléctrico, y se miden los cambios en el índice de refracción de la muestra de interés que esté en contacto con la película metálica. Dichos cambios modifican la constante de propagación del plasmón superficial, alterando así la condición de acoplamiento entre una onda de luz y el plasmón superficial [11]. Los instrumentos basados en SPR utilizan un método óptico para medir el índice de refracción cerca de la superficie de un sensor (~200 nm desde la superficie) [12], empleando tres unidades esenciales integradas: unidad óptica, de manipulación de líquidos y la superficie del sensor [13]. El sensor forma una barrera física entre la unidad óptica (sección seca) y la celda de flujo (sección húmeda) tal que se mida el desplazamiento del ángulo SPR. En general se utilizan tres sistemas ópticos diferentes para excitar plasmones de superficie: 1) sistemas con prismas, 2) rejillas y 3) guías de ondas ópticas. Dentro de los primero encontramos instrumentos con acoplador de prisma o "configuración de Kretschmann" [14]. En ella, (**Figura II**), un prisma acopla luz p-polarizada en el sensor recubierto con una delgada película metálica. La intensidad de la luz reflejada hacia un detector se mide entonces empleando un fotodiodo o una cámara CCD.

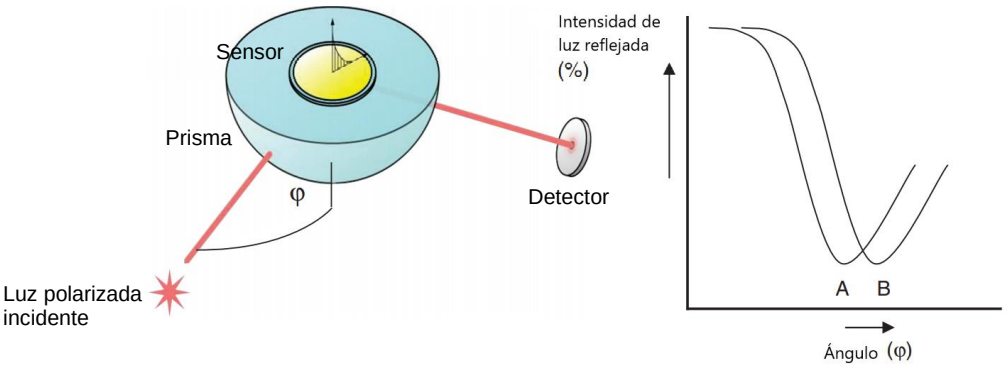

Figura II. Configuración experimental esquemática de la excitación por SPR. Se coloca un sensor (chip) con una capa de oro en un prisma. La luz polarizada incide desde la fuente de luz en el chip del sensor. La intensidad de la luz reflejada se mide en el detector CCD. A un cierto ángulo de incidencia (φ), se produce la excitación de los plasmones superficiales, lo que provoca una caída en la intensidad de la luz reflejada (A). Un cambio en el índice de refracción en la superficie de la película de oro provocará un cambio de ángulo de la curva SPR de A a B [13].

En instrumentos con acopladores de rejilla [15], la luz se refleja en el sustrato de índice de refracción más bajo. Es decir, la luz viaja a través del líquido antes de que los fotones generen ondas de plasmón superficial en los instrumentos elipsométricos [16]. Algunos instrumentos aplican acopladores de guías de ondas ópticas [17] o miden el cambio de longitud de onda SPR como resultado del proceso de interacción biomolecular [18].

Los sensores SPR tienen la capacidad de medir niveles bajos de compuestos químicos y biológicos cerca de la superficie del sensor. La detección de un evento de unión biomolecular ocurre cuando las biomoléculas se acumulan en la superficie del sensor y cambian el índice de refracción al reemplazar la muestra líquida. Las moléculas de proteínas tienen un índice de refracción más alto que las moléculas de agua ($\Delta n \approx 10^{-1}$) [19]. Su sensibilidad SPR está en el rango $\Delta n \approx 10^{-5}$ RIU o 1 $\mathrm{pg\ mm^{-2}}$ de material proteínico [13]. A menudo, en la biodetección en tiempo real, los valores absolutos no son un requisito previo, solo se monitorea el cambio como resultado de la interacción bioespecífica en la superficie del sensor.

En particular el desarrollo de dispositivos biosensores basados en esta tecnología, para reconocer moléculas del sistema inmune, inmunosensores, ha supuesto un importante avance tecnológico en el área de la medicina clínica [20]. Es posible modelar el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales en sistemas de múltiples capas utilizando la electrodinámica clásica, a partir de la solución de las ecuaciones de Fresnel [21, 22], las cuales describen el comportamiento de la luz al pasar por medios de distintas propiedades dieléctricas.

En este trabajo de tesis se desarrollaron simulaciones mediante ecuaciones de Fresnel y dinámica molecular de tres inmunosensores multicapa SPR para la detección de anti-BSA, anti-HSA y glucoproteína gp120 [23, 24].

En el capítulo uno se presenta el estudio de la teoría electromagnética que describe el fenómeno SPR y el análisis de un sistema multicapa basado en las ecuaciones de Fresnel.

En el capítulo dos, se describe el estudio y la propuesta de una estrategia de inmovilización de anticuerpos para obtener inmunoensayos en formato directo de biomarcadores proteicos en fluidos biológicos. Además, se presenta la optimización geométrica de tres moléculas orgánicas utilizadas para inmovilización de anticuerpos y el proceso de simulación de interacciones anticuerpo-antígeno en Autodock Vina para tres anticuerpos: BSA-antiBSA, HSA-antiHSA y la IgG1 b12 humana-glucoproteína gp120.

En el capítulo tres se presenta la metodología para la fabricación de inmunosensores haciendo hincapié en los biosensores SPR.

En el capítulo cuatro se muestran los resultados y discusiones de las simulaciones computacionales realizadas para la determinación de las curvas de reflectancia vs ángulo, para un sistema SPR con una película nanométrica de oro en la detección de interacciones antígeno-anticuerpo en un biosensor SPR convencional. Se incluye el protocolo y el modelo teórico-computacional de funcionalización propuesto para el óptimo anclado covalente de proteínas en la superficie de oro del biosensor. Los

parámetros físicos de las diferentes monocapas, de cada biosensor, fueron determinadas en el software Avogadro y empleadas en el modelo teórico de las ecuaciones de Fresnel. Así mismo, se determinaron las predicciones en las conformaciones de unión óptimas de ligando a proteína, para determinar los sitios de unión entre las moléculas de anclaje a la superficie de oro y las proteínas bioreceptoras en el sensor. Por último, se analizaron las curvas SPR de las interacciones BSA-antiBSA, HSA-antiHSA y la IgG1 b12 humana-glucoproteína gp120.

Objetivo General

Simular la interacción proteína-proteína utilizando el fenómeno SPR mediante un modelo multicapa de las ecuaciones de Fresnel.

Objetivos Específicos

1. Revisar la literatura sobre el fenómeno SPR y sus aplicaciones enfocadas a la biomedicina.
2. Desarrollar la teoría electromagnética detrás del fenómeno SPR.
3. Caracterizar el sistema SPR simulado mediante el estudio y simulación de curvas SPR a diferentes índices de refracción (etanol: agua desionizada).
4. Establecer un modelo teórico y computacional mediante Matlab del sistema multicapa del fenómeno SPR utilizando ecuaciones de Fresnel.
5. Simular un protocolo de deposición de monocapas orgánicas con grupos carboxilo-terminales sobre sustratos SPR utilizando monocapas autoensambladas (SAM), que se utilizarían como soporte de anclado para biosensores de proteínas.
6. Optimizar las configuraciones geométricas de las moléculas encargadas del proceso de inmovilización covalente del anticuerpo en sus tres diferentes fases (MUA, MUA+NHS, MUA+EDC), por medio de la Mecánica Molecular en el software Avogadro.
7. Obtener el sitio de unión entre la monocapa orgánica con grupos carboxilo-terminales (11-*ácido mercaptoundecanoico MUA*) y las proteínas utilizadas como elemento de reconocimiento biológico (BSA, HSA y HIgG) del biosensor, mediante la simulación de interacciones de Van der Waals y puentes de hidrógeno con softaware AutoDock Vina.
8. Diseñar, simular y analizar la respuesta de las curvas SPR obtenidas de los biosensores con proteínas ligando BSA, HSA e IgG humana (anticuerpo IgG1 b12 humano para el reconocimiento del VIH) en superficies funcionalizadas SPR y su interacción con otra proteína contenida en el soluto (anti-BSA, anti-HSA y antígeno gp120).

Índice General

Agradecimientos ..... **I**

Dedicatorias ..... **II**

Nomenclatura y Abreviaturas ..... **IV**

Resumen ..... **VI**

Introducción ..... **VII**

Objetivo General ..... **XI**

Objetivos Específicos ..... **XI**

Índice General ..... **XII**

Índice de Tablas ..... **XV**

Índice de Figura ..... **XVI**

Teoría Electromagnética de Plasmones Superficiales en Películas Metálicas **1**

1.1 Reflexión y refracción de ondas electromagnéticas en una interfaz plana entre dieléctricos 6

1.1.1 Ángulo de Brewster 14

1.1.2 Reflexión total interna 14

1.1.3 Ángulo crítico 14

1.1.4 La onda evanescente 14

1.2 Ecuación de dispersión para plasmones superficiales 16

1.3 Ecuación de onda para plasmones superficales en metal 17

1.4 Polaritones de plasmones superficiales en una sola interfaz 19

1.5 Sistemas multicapas 21

1.6 Simulación de curva de respuesta SPR de tres capas. 23

1.7 Simulación de curva de respuesta SPR multicapas. 26

Interpretación cuantitativa de la respuesta de los sensores de resonancia de plasmón superficial a las películas adsorbidas **28**

2.1 Respuesta de SPR a soluciones en bulto: gráficos de calibración 28

2.2 Cálculo de la respuesta SPR a las películas adsorbidas 32

2.2.1 La respuesta SPR de una sola capa de espesor uniforme 32

2.2.2 Estimación del espesor de la película de adsorbato a partir de la respuesta SPR medida 35

2.2.3 Estimación de la cobertura de adsorbato a partir de la respuesta SPR medida 36

2.2.4 Estimación del índice de refracción de un adsorbato. 36

2.2.5 Estimación de la longitud de decaimiento del campo electromagnético evanescente. 37

2.2.6 La respuesta SPR de las estructuras de película multicapa 38

2.3 Predicción de los cambios de intensidad de luz reflejada de las curvas SPR calculadas 39

2.3.1 Relación entre los cambios en la intensidad de la luz reflejada y los cambios de ángulo 43

2.3.2 Predicción de la respuesta de intensidad del microscopio SPR a la adsorción de película delgada 44

2.3.3 Estimación del espesor del adsorbato y la cobertura de la superficie a partir de los cambios de intensidad 45

Metodología experimental para inmunoensayos 46

3.1 Biosensores 47

3.1.1 Tipo de biosensores 47

3.1.2 Inmunosensores de Resonancia de Plasmón Superficial 50

3.2 Selección de Bioreceptor 54

3.2.1 Métodos de inmovilización de anticuerpos en superficies de Au 55

3.2.2 Anticuerpos y antígenos 58

4. Resultados y discusiones 60

4.1 Introducción al Docking Molecular y a la Optimización Geométrica Molecular 60

4.2 Optimización geométrica de las moléculas usadas en la prefuncionalización del arreglo SPR 63

4.2.1 Optimización geométrica de la molécula ácido mercaptoundecanoico. 64

4.2.2 Optimización geométrica de la molécula 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida 66

4.2.3 Optimización geométrica de la molécula N-hidroxisulfosuccinimida 68

4.3 Funcionalización del arreglo SPR e interacciones antígeno-anticuerpo 70

4.3.1 Docking molecular entre proteínas y la molécula funcionalizadora de un sensor SPR 72

4.4 Simulación de curvas SPR para un biosensor SPR 81

Conclusiones 91

Bibliografía 93

Índice de Tablas

Tabla 2.1 Ángulo SPR obtenido mediante el modelo de Fresnel para 3 capas en un sistema SPR para siete soluciones etanol-agua con diferentes concentraciones y su correspondiente índices de refracción 30

Tabla 2.2 Ángulo SPR obtenido mediante el modelo de Fresnel para 3 capas en un sistema SPR para siete soluciones sacarosa-agua con diferentes concentraciones y su correspondiente índices de refracción 31

Tabla 4.2 Resultados al realizar docking molecular entre BSA y MUA. Se muestran los aminoácidos receptores de la molécula MUA con menor energía de unión obtenidos en Autodock y el espesor de la proteína BSA [110]. 80

Tabla 4.3 Resultados al realizar docking molecular entre HSA y MUA. Se muestran los aminoácidos receptores de la molécula MUA con menor energía de unión obtenidos en Autodock y el espesor de la proteína HSA [110]. 81

Tabla 4.4 Diferencia en la reflectancia y ángulo $\Delta\boldsymbol{\theta spr}$ del biosensor con capas adsorbidas MUA-antígeno y su interacción con su anticuerpo en el ángulo de alto contraste $\boldsymbol{\theta c}$. 90

Índice de Figura

Figura 1.1. Vector de propagación $\boldsymbol{k}$ y dos vectores de polarización ortogonales $\boldsymbol{\epsilon 1}$ y $\boldsymbol{\epsilon 2}$ para las intensidades de campo $\boldsymbol{E}$ y $\boldsymbol{B}$ de una onda transversal electromagnética 9

Figura 1.2. La onda incidente $\boldsymbol{k}$ incide en la interfaz del plano entre diferentes medios, dando lugar a una onda reflejada $\boldsymbol{k''}$ y una onda refractada $\boldsymbol{k}$ 10

Figura 1.3. Reflexión y refracción con polarización perpendicular al plano de incidencia (transversal eléctrica)..... 12

Figura 1.4. Reflexión y refracción con polarización paralela al plano de incidencia (transversal magnética) 13

Figura 1.5. Definición de una geometría de guía de onda plana. Las ondas se propagan a lo largo de la dirección x en un sistema de coordenadas cartesianas 17

Figura 1.6. Geometría para la propagación de SPP en una única interfaz entre un metal y un dieléctrico..... 19

Figura 1.7. Geometría de un sistema con tres capas que consiste en una capa delgada metálica I en medio de dos espacios semi infinitos dieléctricos II y III..... 21

Figura 1.8. Sistema de N capas utilizado en mediciones SPR 27

Figura 2.1 Simulación de curva SPR convencional de escaneo de intensidad vs. ángulo. La curva mostrada fue calculada usando las ecuaciones de Fresnel para 3 capas (Vidrio/Oro/Agua). 29

Figura 2.2 Simulación de las curvas SPR convencionales de escaneo de intensidad vs. ángulo a diferentes índices de refracción. 30

Figura 2.3 Respuesta SPR simulada (ángulo mínimo en la intensidad de la luz reflejada) versus el índice de refracción ($\boldsymbol{n}$) de las disoluciones en contacto con la superficie de la sonda SPR de oro. La figura inserta es la respuesta SPR simulada, excepto en un rango estrecho de $\boldsymbol{n}$ cerca del del agua (1.330). 32

Figura 2.4 Diagrama esquemático de una estructura bicapa que implica un adsorbato $\boldsymbol{a}$ de espesor de índice de refracción $\boldsymbol{na}$ directamente sobre la superficie del sensor SPR, sobre la cual se encuentra la disolución s, de índice de refracción $\boldsymbol{ns}$ 33

Figura 2.5 Diagrama esquemático de la estructura de tres capas que involucra una capa de pre-adsorbato b de espesor $\boldsymbol{db}$ que funcionaliza directamente la superficie metálica del sensor SPR, sobre la cual hay una segunda capa de adsorbato $\boldsymbol{a}$ de espesor $\boldsymbol{da}$ y finalmente la disolución s en bulto. 38

Figura 2.6 Curvas de reflectividad SPR predichas a partir de cálculos de Fresnel. Se utilizó un modelo de pila dieléctrica para calcular las respuestas para capas infinitamente gruesas de índices de refracción 1.3330 y 1.3342 en contacto con una película de oro de 47 nm de espesor en un prisma SF14 iluminado por una luz de longitud de onda de 632.8 nm..... 40

Figura 2.7 Curvas de reflectividad SPR calculadas (línea negra $\boldsymbol{n = 1.3330}$ y línea gris $\boldsymbol{n = 1.3342}$) y la curva de diferencia resultante (círculos negros) trazada en una escala expandida. Las curvas de reflectividad son las curvas de la Figura 2.6 trazadas para un rango de ángulo mayor. La curva de diferencia para las curvas de reflectividad muestra la magnitud de los cambios de intensidad de luz debido al aumento en el índice de refracción de la capa adyacente a la superficie de oro en el modelo utilizado para los cálculos (eje derecho).... 41

Figura 2.8 Relación calculada (símbolos abiertos) y medida (círculos rellenos) entre los cambios absolutos en la intensidad reflejada y los cambios en el índice de refracción global en ángulos en las regiones casi lineales en los lados izquierdo y derecho de la curva de reflectividad SPR mínima. Los cambios calculados son para ángulos incidentes de 54.6° (□) y 56.1 ° (Δ) en los lados izquierdo y derecho, respectivamente. La curva medida (●) y la curva predicha de las ecuaciones de Fresnel concuerdan bien.... 42

Figura 3.1 Esquema básico de un biosensor. 1) Transductor; 2) Elemento de reconocimiento biológico; 3) Muestra [39].... 47

Figura 3.2 Principales tipos de biosensores sobre una superficie de oro funcionalizada con ácido carboxílico en función del bioreceptor empleado: (a) Biosensor enzimático. (b) Biosensor de ADN. (c) Inmunosensor [48].... 48

Figura 3.3 Esquema del principio de detección de un biosensor de ondas evanescentes 50

Figura 3.4 Esquemas de un SPP en la interfaz de un metal y un dieléctrico que muestran: (a) la oscilación de carga colectiva en la superficie y (b) la distribución transversal del campo evanescente.... 51

Figura 3.5 Métodos de acoplamiento SPR, que incluyen (a) una configuración de Kretschmann acoplado a prisma, (b) acoplamiento de guía de onda y (c) acoplamiento de rejilla 52

Figura 3.6 Esquema de un biosensor SPR que emplea una configuración de Kretschmann con una fuente de luz.... 53

Figura 3.7 Curvas SPR representativas para sensores SPR. Reflectividad contra (a) $\boldsymbol{\theta}$ y (b) $\boldsymbol{\lambda}$, junto con su correspondiente seguimiento en tiempo real de los desplazamientos de las curvas mediante el monitoreo de (c) cambios de la reflectividad, R, y (d) cambios de la longitud de onda de resonancia, $\boldsymbol{\lambda SPR}$..... 54

Figura 3.8 Representación gráfica de una SAM mixta sobre una superficie de oro..... 57

Figura 3.9 Representación esquemática del proceso de inmovilización covalente (acoplamiento amino) del anticuerpo y posteriormente de la interacción anticuerpo-antígeno..... 57

Figura 3.10 Estructura básica de un anticuerpo..... 59

Figura 4.1 Representación esquemática del proceso de prefuncionalización del sensor. Primeras tres fases antes del acoplamiento amino con el anticuerpo. Fase 1: Anclaje con molécula MUA. Fase 2: Interacción entre MUA y EDC. Fase 3: Interacción entre MUA y Sulfo-NHS. 63

Figura 4.2 Diagrama de flujo del proceso para la optimización geométrica de moléculas orgánicas (11-MUA, EDC y NHS) en Avogadro Chemistry. 65

Figura 4.3 Datos obtenidos en Avogadro Chemistry al finalizar simulación para la optimización geométrica de la molécula MUA. Las esferas color gris representan a los átomos de hidrógeno, las de color negro son representados los átomos de carbón, las de color amarillo los átomos de azufre y las de color rojo los átomos de oxígeno..... 66

Figura 4.4 Datos obtenidos en Avogadro Chemistry al finalizar simulación para la optimización geométrica de la molécula EDC. Las esferas color gris representan a los átomos de hidrógeno, las de color negro son representados los átomos de carbón, las de color azul representan los átomos de nitrógeno. 67

Figura 4.5 Datos obtenidos en Avogadro Chemistry al finalizar simulación para la optimización geométrica de las moléculas MUA y EDC al interaccionar. 68

Figura 4.6 Datos obtenidos en Avogadro Chemistry al finalizar simulación para la optimización geométrica de la molécula Sulfo-NHS. 69

Figura 4.7 Datos obtenidos en Avogadro Chemistry al finalizar simulación para la optimización geométrica de las moléculas MUA y Sulfo-NHS al interaccionar. 70

Figura 4.8 Representación esquemática del proceso de funcionalización del sensor SPR. Últimas dos fases en la que ocurre el acoplamiento amino y la interacción antígeno-anticuerpo. Fase 4: Acoplamiento amino entre la molécula MUA y la proteína. Fase 5: Interacción antígeno-anticuerpo. 71

Figura 4.9 Diagrama de flujo del proceso para el docking molecular entre la una proteína, como IgG1, BSA y HSA (flexible y libre de moverse) y la molécula MUA (rígida) en Autodock Vina para la obtención del sitio más probable de unión. 75

Figura 4.10 Visualización en 3D de la molécula MUA y los aminoácidos con los que interaccionó al realizar un docking con la proteína IgG1 b12. La molécula MUA se encuentra encerrada en una superficie gris. Se muestran los aminoácidos con los que ha interactuado por enlaces de Van der Waals y por puentes de hidrógeno, los cuales se muestran con una línea punteada verde 76

Figura 4.11 Visualización en 2D obtenida en ProteinPlus de la molécula MUA y los aminoácidos con los que interaccionó al realizar un docking con la proteína IgG1 b12. Se muestran los aminoácidos con los que ha interactuado por enlaces de Van der Waals, representado por una línea verde, y por puentes de hidrógeno, los cuales se muestran con una línea punteada negra 76

Tabla 4.1 Resultados al realizar docking molecular entre IgG1 b12 y MUA. Se muestran los aminoácidos receptores de la molécula MUA con menor energía de unión obtenidos en Autodock [110] y el espesor de la proteína IgG1 medido desde el aminoácido receptor y el aminoácido al otro extremo de la proteína. Se resalta de color amarillo el promedio ponderado de los espesores de la proteína IgG1 b12. 77

Figura 4.12 Uso del software PBD y Pymol para medir la distancia entre el aminoácido obtenido por Autodock como uno de los sitios más probables (Arg106M) y el aminoácido en el extremo opuesto de éste (Trp104) obteniendo una distancia igual a $\mathbf{129.66}$ Å. . 78

Figura 4.13. Visualización en 3D de la molécula MUA y los aminoácidos con los que interaccionó al realizar un docking con la a) proteína BSA y b) la proteína HSA. La molécula MUA se encuentra encerrada en una superficie gris. Se muestran los aminoácidos con los que ha interactuado por enlaces de Van der Waals y puentes de hidrógeno 79

Figura 4.14 Visualización en 2D obtenida en ProteinPlus de la molécula MUA y los aminoácidos con los que interaccionó al realizar un docking a) con la proteína BSA y b) con la proteína HSA. Se muestran los aminoácidos con los que ha interactuado por enlaces de Van der Waals, representado por una línea verde, y por puentes de hidrógeno, los cuales se muestran con una línea punteada negra. 79

Figura 4.15 Intensidad de reflectancia de salida del sensor SPR calculada para un sistema de 5 capas: vidrio/oro/monocapa de MUA/monocapa de IgG1 b12/buffer HEPES para distintos espesores (uniones más probables) calculados de la proteína IgG1 b12. 84

Figura 4.16 Intensidad reflectancia de salida del biosensor SPR (IgG1 b12 – gp120) calculada considerando distintas las 5 etapas (véase Figura 4.1 y Figura 4.8). 84

Figura 4.17 Intensidad de salida del sensor SPR calculada para un sistema de 5 capas: vidrio/oro/monocapa de MUA/monocapa de BSA/buffer acetato de potasio, para distintos espesores calculados de la proteína BSA. 85

Figura 4.18 Intensidad de reflectancia de salida del sensor SPR calculada para un sistema de 5 capas: vidrio/oro/monocapa de MUA/monocapa de HSA/buffer acetato de sodio, para distintos espesores calculados de la proteína HSA. 87

Figura 4.19 Intensidad de salida del biosensor SPR (BSA – antiBSA) calculada considerando distintas etapas..... 88

Figura 4.20 Intensidad de salida del biosensor SPR (HSA – antiHSA) calculada considerando distintas etapas..... 89

Figura 4.21 Intensidad de salida del sensor SPR para tres biosensores propuestos (IgG1 b12-gp120, HSA-antiHSA, BSA-antiBSA) calculada considerando una solución de buffer HEPES. 90

Capítulo 1

Teoría Electromagnética de Plasmones Superficiales en Películas Metálicas

En el estudio de las propiedades del fenómeno de resonancia de plasmones superficiales (SPR), se toma como punto de partida las cuatro ecuaciones vectoriales de Maxwell, que vienen dadas por

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \rho_{ext}, \tag{1.1}$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0, \tag{1.2}$$

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial \mathrm{t}}, \tag{1.3}$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = \mathbf{J}_{ext} + \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial \mathrm{t}}, \tag{1.4}$$

donde $\boldsymbol{D}$ es la densidad de flujo eléctrico (C/m^2), $\boldsymbol{E}$ el campo eléctrico (V/m), $\boldsymbol{H}$ el campo magnético (A/m), $\boldsymbol{B}$ la densidad de flujo magnético (T), ρ_{ext} la densidad de carga externa (C/m^3) y $\mathbf{J}_{ext}$ la densidad de corriente (A/m^2). En ellas se distingue entre carga y corriente externa (ρ_{ext}, $\mathbf{J}_{ext}$) que impulsan al sistema, y la carga y corriente interna (ρ_{int},$\boldsymbol{J}$) que responden a los estímulos externos, tal que $\rho_{tot} = \rho_{ext} + \rho$ y $J_{tot} = \mathbf{J}_{ext} + \boldsymbol{J}$ [25]. Además, las cargas y corrientes internas responden a las externas de acuerdo a

$$\rho_{tot} = \rho_{ext} + \rho_{int} \tag{1.5}$$

$$\mathbf{J}_{tot} = \mathbf{J}_{ext} + \mathbf{J}_{int} \tag{1.6}$$

Los cuatro campos macroscópicos $\boldsymbol{E}$, $\boldsymbol{D}$, $\boldsymbol{B}$ y $\boldsymbol{H}$ se relacionan con la polarización $\mathbf{P}$ y la magnetización $\mathbf{M}$, mediante

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P}, \tag{1.7}$$

$$\mathbf{H} = \frac{1}{\mu_0}\mathbf{B} - \mathbf{M}, \tag{1.8}$$

donde $\varepsilon_0 = 8.854\text{x}10^{-12}$ Faradios/metro (F/m) y $\mu_0 = 1.257\text{x}10^{-6}$ Henrios/metro (H/m) son la permitividad eléctrica y la permeabilidad magnética del vacío, respectivamente. Para el caso particular de este trabajo de tesis, no es necesario considerar una respuesta magnética dado que se consideran exclusivamente medios no-magnéticos. Por su parte $\mathbf{P}$, que describe el momento dipolar eléctrico por unidad de volumen dentro del material, está relacionado con la densidad de carga interna por

$$\nabla \cdot \mathbf{P} = -\rho_{int} \tag{1.9}$$

La condición de conservación de carga

$$\nabla \cdot \mathbf{J}_{int} = -\frac{\partial \rho_{int}}{\partial t} \tag{1.10}$$

también requiere que las densidades de corriente y carga internas se relacionen por

$$\mathbf{J}_{int} = \frac{\partial \mathbf{P}}{\partial t} \tag{1.11}$$

Usando esta aproximación, el campo eléctrico $\mathbf{E}$ (macroscópico) incluye todos los efectos de la polarización, el campo interno y el externo. De las ecuaciones (1.1) y (1.7) tenemos

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \nabla \cdot (\varepsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P}) = \varepsilon_0 \nabla \cdot \mathbf{E} - \rho_{int}, \tag{1. 12}$$

$$\nabla \cdot \mathbf{E} = \frac{1}{\varepsilon_0}(\rho_{ex} t + \rho_{i^{nt}}) = \frac{\rho_{tot}}{\varepsilon_0}. \tag{1. 13}$$

En este trabajo se considerarán solamente medios lineales, isotrópicos y no-magnéticos, por lo cual se definen las relaciones constituyentes mediante

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 \varepsilon \mathbf{E} \tag{1.14}$$

$$\mathbf{B} = \mu_0 \mu \mathbf{H} \tag{1.15}$$

donde ε es la permitividad relativa o función dieléctrica del material considerado, y de carácter adimensional, mientras que $\mu = 1$ es la permeabilidad relativa para un medio no-magnético. Definiendo la relación entre el campo eléctrico $\mathbf{E}$ y la polarización $\mathbf{P}$, y de (1.7) y (1.14), tenemos

$$\mathbf{P} = \varepsilon_0 \chi \mathbf{E}, \tag{1.16}$$

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 \mathbf{E}(1 + \chi), \tag{1.17}$$

$$\varepsilon = 1 + \chi \tag{1.18}$$

donde χ es la susceptibilidad eléctrica.
La relación entre la densidad de corriente interna y el campo eléctrico se define mediante la conductividad σ, dada en Siemens/metro (S/m):

$$\mathbf{J}_{\text{int}} = \sigma \mathbf{E} \tag{1.19}$$

Las ecuaciones (1.14) y (1.19) son correctas únicamente para medios lineales que no presentan dispersión temporal ni espacial. Como la respuesta óptica de los metales depende de la frecuencia, es necesario considerar la no-localidad en tiempo y espacio (retraso en tiempo y respuesta no-local) generalizando las relaciones lineales a

$$\mathbf{D}(\boldsymbol{r}, t) = \varepsilon_0 \int dt' \boldsymbol{dr}' \varepsilon(\boldsymbol{r} - \boldsymbol{r}', t - t') \mathbf{E}(\boldsymbol{r}', t') \tag{1.20}$$

$$\mathbf{J}(\boldsymbol{r}, t) = \int dt' \boldsymbol{dr}' \sigma(\boldsymbol{r} - \boldsymbol{r}', t - t') \mathbf{E}(\boldsymbol{r}', t') \tag{1.21}$$

donde se supone que todas las escalas de longitud son muy grandes, para asegurar homogeneidad. Para respuestas locales, la forma de las funciones de respuesta es una función delta (δ), y se recuperan (1.14) y (1.19).
Es posible simplificar (1.20) y (1.21) tomando la transformada de Fourier inversa respecto a $\int dt dr \exp[i(\boldsymbol{k} \cdot \boldsymbol{r} - \omega t)]$, cambiando las convoluciones por multiplicaciones. Así, se obtienen las componentes de onda plana de los campos, con vector de onda $\boldsymbol{k}$ y frecuencia angular ω, lo que conduce a las relaciones constitutivas en el dominio de Fourier. Aplicando este procedimiento para la densidad de flujo eléctrico

$$\mathrm{F}\{\mathbf{D}(\boldsymbol{r}, t)\} = \varepsilon_0 \mathrm{F}\{\mathbf{E}\} \cdot \mathrm{F}\{\varepsilon\} \tag{1.22}$$

y haciendo lo mismo para la densidad de corriente, se llega a

$$\mathrm{F}\{\mathbf{D}(\boldsymbol{r}, t)\} = \mathbf{D}(\boldsymbol{k}, \omega) = \varepsilon_0 \varepsilon(\boldsymbol{k}, \omega) \mathbf{E}(\boldsymbol{k}, \omega) \tag{1.23}$$

$$\mathrm{F}\{\mathbf{J}_{\text{int}}(\boldsymbol{r}, t)\} = \mathbf{J}_{\text{int}}(\boldsymbol{k}, \omega) = \sigma(\boldsymbol{k}, \omega) \mathbf{E}(\boldsymbol{k}, \omega) \tag{1.24}$$

En este dominio, $\partial_t \to i\omega$ y $\nabla \to i\boldsymbol{k}$. Bajo esta consideración, usando las ecuaciones (1.7), (1.10), (1.23) y (1.24) se llega a la relación entre la función dieléctrica y la conductividad

$$\mathbf{J}_{\text{int}}(\boldsymbol{r},t)=\frac{\partial}{\partial t}\mathbf{P}(\boldsymbol{r},t), \tag{1.25}$$

$$\mathbf{J}_{\text{int}}(\boldsymbol{k},\omega)=-i\omega\mathbf{P}(\boldsymbol{k},\omega)=\sigma(\boldsymbol{k},\omega)\mathbf{E}(\boldsymbol{k},\omega), \tag{1.26}$$

$$\mathbf{D}(\boldsymbol{k},\omega)=\varepsilon_0\mathbf{E}(\boldsymbol{k},\omega)+\mathbf{P}(\boldsymbol{k},\omega), \tag{1.27}$$

$$\mathbf{D}(\boldsymbol{k},\omega)=\varepsilon_0\mathbf{E}(\boldsymbol{k},\omega)+\frac{1}{-i\omega}\sigma(\boldsymbol{k},\omega)\mathbf{E}(\boldsymbol{k},\omega)=\varepsilon_0\varepsilon(\boldsymbol{k},\omega)\mathbf{E}(\boldsymbol{k},\omega) \tag{1.28}$$

$$\varepsilon(\boldsymbol{k},\omega)=1+\frac{i\sigma(\boldsymbol{k},\omega)}{\varepsilon_0\omega} \tag{1.29}$$

Por otro lado, se puede tomar la función dieléctrica y la conductividad como funciones complejas de la frecuencia angular ω, asociarlas mediante (1.29) y determinar el índice de refracción complejo:

$$\varepsilon(\omega)=\varepsilon_1(\omega)+i\varepsilon_2(\omega) \tag{1.30}$$

$$\tilde{n}(\omega)=\sqrt{\varepsilon(\omega)}=n(\omega)+i\kappa(\omega) \tag{1.31}$$

donde ε_1, ε_2, n y κ son números reales. De lo anterior, se deduce que

$$\varepsilon=n^2+2in\kappa-\kappa^2 \tag{1.32}$$

$$\varepsilon_1=n^2-\kappa^2,\qquad \varepsilon_2=2n\kappa, \tag{1.33}$$

$$n^2=\frac{\varepsilon_1}{2}+\frac{1}{2}\sqrt{\varepsilon_1^2+\varepsilon_2^2}. \tag{1.34}$$

El coeficiente de extinción κ, determina la absorción óptica de las ondas electromagnéticas que se propagan a través del medio. Está vinculado al coeficiente de absorción α_B de la ley de Beer, que describe la atenuación exponencial de la intensidad de un haz propagándose a través de un medio

$$\alpha_B=\frac{2\kappa(\omega)\omega}{c}, \tag{1.35}$$

$$I(x)=I_0\exp[-\alpha_B x] \tag{1.36}$$

donde $c = (\mu_0 \varepsilon_0)^{-1/2}$ metros/segundo es la velocidad de la, e luz en el vacío, x es una coordenada espacial arbitraria, e I_0 e I son las intensidades de la luz incidente y transmitida, respectivamente, y están dadas en candelas.

Por último, para obtener las soluciones a las ecuaciones de Maxwell para ondas viajeras, en ausencia de estímulos externos, se combinan (1.*3*) y (1.*4*). Así, evaluando en el dominio del tiempo tenemos

$$\nabla \times (\nabla \times \mathbf{E}) = \nabla \times \left(-\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t}\right) = -\frac{\partial}{\partial t}(\nabla \times \mathbf{B}) = -\mu_0 u \frac{\partial}{\partial t}\left(\mathbf{J}_{ext} + \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t}\right), \tag{1.37}$$

$$\mu = 1, \qquad \frac{\partial \mathbf{J}_{ext}}{\partial t} = 0, \tag{1.38}$$

$$\nabla \times (\nabla \times \mathbf{E}) = -\mu_0 \frac{\partial^2 \mathbf{D}}{\partial t^2} \tag{1.39}$$

que en el dominio de Fourier implica

$$-\mathbf{k} \times \mathbf{k} \times \mathbf{E}(\mathbf{k}, \omega) = -\mu_0 (-i\omega)^2 \mathbf{D}(\mathbf{k}, \omega) = \mu_0 \omega^2 \mathbf{D}(\mathbf{k}, \omega), \tag{1.40}$$

$$\mathbf{k}(\mathbf{k} \cdot \mathbf{E}) - k^2 \mathbf{E} = -\varepsilon(\mathbf{k}, \omega) \frac{\omega^2}{c^2} \mathbf{E}, \tag{1.41}$$

la ecuación de onda. Es necesario distinguir dos casos, que dependen de la dirección de polarización del vector de campo eléctrico. Primero, para ondas transversales

$$\mathbf{k} \cdot \mathbf{E} = 0, \tag{1.42}$$

$$k^2 = \varepsilon(\mathbf{k}, \omega) \frac{\omega^2}{c^2}, \tag{1.43}$$

Segundo, para ondas longitudinales. Allí, las direcciones de $\mathbf{k}$ y de $\mathbf{E}$ son iguales por lo que el lado izquierdo de (1.56) es cero: $\mathbf{k}(\mathbf{k} \cdot \mathbf{E}) = k^2 \mathbf{E}$. Entonces, se llega a

$$\varepsilon(\mathbf{k}, \omega) = 0 \tag{1.44}$$

Esto implica que las oscilaciones colectivas longitudinales sólo pueden ocurrir a frecuencias para las que la función dieléctrica vale cero. Posteriormente se discute cómo esta condición impide la excitación de plasmones superficiales para luz con polarización tipo s.

1.1 Reflexión y refracción de ondas electromagnéticas en una interfaz plana entre dieléctricos

Una característica básica de las ecuaciones de Maxwell para el campo electromagnético es la existencia de soluciones de ondas viajeras que representan el transporte de energía de un punto a otro. Las ondas electromagnéticas más simples y fundamentales son las ondas transversales planas [26]. Las soluciones pueden obtenerse en medios simples no conductores descritos por permeabilidad y susceptibilidad espacialmente constante. En ausencia de fuentes, las ecuaciones de Maxwell, ecuaciones (1.1)-(1.4), en un medio infinito son

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = 0, \tag{1.45}$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0, \tag{1.46}$$

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t}, \tag{1.47}$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t}, \tag{1.48}$$

Suponiendo soluciones con dependencia armónica del tiempo $e^{-i\omega t}$ a partir de las cuales podemos construir una solución arbitraria por superposición de Fourier, las ecuaciones para las amplitudes $\mathbf{E}(\omega, \boldsymbol{x})$, etc. tenemos que

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = 0, \tag{1.49}$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0, \tag{1.50}$$

$$\nabla \times \mathbf{E} = i\omega \mathbf{B}, \tag{1.51}$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = -i\omega \mathbf{D}, \tag{1.52}$$

donde ω es la frecuencia angular de la onda (rad/s). Si suponemos que ε y μ son reales y positivos, no hay absorción en el medio. Entonces las ecuaciones para $\mathbf{E}$ y $\mathbf{H}$ que obtenemos al sustituir las ecuaciones constitutivas son

$$\nabla \times \mathbf{B} + i\omega\mu\varepsilon \mathbf{E} = 0, \tag{1.53}$$

$$\nabla \times \mathbf{E} - i\omega\mathbf{B} = 0, \tag{1.54}$$

Al combinarlas, obtenemos

$$\nabla\left(\nabla \cdot \varepsilon\frac{\mathbf{E}}{\varepsilon}\right) - \nabla^2\mathbf{E} - \omega^2\mu\varepsilon\mathbf{E} = 0 \tag{1.55}$$

Usando la identidad $\nabla \cdot (\varepsilon\mathbf{E}) = \mathbf{E} \cdot \nabla\varepsilon + \varepsilon\,\nabla \cdot \mathbf{E}$ y la ecuación (1.49), podemos reescribir la expresión como

$$\nabla\left(\frac{\mathbf{E}}{\varepsilon} \cdot \nabla\varepsilon\right) - \nabla^2\mathbf{E} - \omega^2\mu\varepsilon\mathbf{E} = 0 \tag{1.56}$$

Para variaciones despreciables de la constante dieléctrica $\varepsilon(\boldsymbol{r})$, es decir $\nabla\varepsilon = 0$, obtenemos la ecuación de onda de Helmholtz,

$$\nabla^2\mathbf{E} + \omega^2\mu\varepsilon\mathbf{E} = 0 \tag{1.57}$$

Con el mismo procedimiento podemos encontrar una expresión similar para **B,** obteniendo

$$(\nabla^2 + \omega^2\mu\varepsilon)\begin{Bmatrix}\mathbf{E}\\ \mathbf{B}\end{Bmatrix} = 0 \tag{1.58}$$

Una posible solución es una onda plana que viaja en la dirección x, $e^{ikx-i\omega t}$. De la ecuación (1.58), encontramos el requisito de que el número de onda k (1/m) y la frecuencia ω están relacionados por

$$k = \sqrt{\mu\varepsilon}\,\omega \tag{1.59}$$

La velocidad fase de la onda es

$$v = \frac{\omega}{k} = \frac{1}{\sqrt{\mu\varepsilon}} = \frac{c}{n}, \qquad n = \sqrt{\frac{\mu}{\mu_0}\frac{\varepsilon}{\varepsilon_0}} \tag{1.60}$$

donde la cantidad n es el *índice de refracción* y generalmente es una función de la frecuencia. La solución en una dimensión es

$$u(x,t) = ae^{ikx-i\omega t} + be^{-ikx-i\omega t} \tag{1.61}$$

Usando $\omega = kv$ de (1.60), se puede re-escribir como

$$u(x,t) = ae^{ik(x-vt)} + be^{-ik(x+vt)} \tag{1.62}$$

Consideremos ahora una onda electromagnética plana con frecuencia ω y un vector de onda $\mathbf{k} = k\mathbf{n}$**,** que satisfaga la ecuación de onda Helmholtz y las ecuaciones de Maxwell. La restricción impuesta por la ecuación (1.58) es esencialmente cinemática; mientras que las impuestas por las ecuaciones de Maxwell, dinámicas. Con la convención de que los campos físicos eléctricos y magnéticos se obtienen tomando las partes reales de cantidades complejas, escribimos los campos de onda plana como

$$\mathbf{E}(\boldsymbol{x},t) = \mathfrak{E}e^{ik\mathbf{n}\cdot\boldsymbol{x}-i\omega t}, \tag{1.63}$$

$$\mathbf{B}(\boldsymbol{x},t) = \mathfrak{B}e^{ik\mathbf{n}\cdot\boldsymbol{x}-i\omega t}, \tag{1.64}$$

donde $\mathfrak{E}$, $\mathfrak{B}$ y $\mathbf{n}$ son vectores constantes. Cada componente de $\mathbf{E}$ y $\mathbf{B}$ satisface (1.58), por lo que

$$k^2\mathbf{n}\cdot\mathbf{n} = \mu\varepsilon\omega^2 \tag{1.65}$$

Para recuperar (1.59) es necesario que $\mathbf{n}$ sea un vector unitario de modo que $\mathbf{n}\cdot\mathbf{n} = 1$. Con la ecuación de onda satisfecha, sólo queda fijar las propiedades vectoriales para que las ecuaciones de Maxwell (1.49)-(1.52) sean válidas.
Las ecuaciones de divergencia exigen que

$$\mathbf{n}\cdot\mathfrak{E} = 0 \tag{1.66}$$

$$\mathbf{n}\cdot\mathfrak{B} = 0 \tag{1.67}$$

Esto significa que $\mathbf{E}$ y $\mathbf{B}$ son perpendiculares a la dirección de propagación $\mathbf{n}$. Tal onda se llama onda transversal. Las ecuaciones de rotacional proporcionan una restricción adicional

$$\mathfrak{B} = \sqrt{\mu\varepsilon}\,\mathbf{n}\times\mathfrak{E} \tag{1.68}$$

donde $\sqrt{\mu\epsilon} = n/c$ y n es el índice de refracción definido en (1.60).
Si $\mathbf{n}$ es real, (1.68) implica que $\mathfrak{E}$ y $\mathfrak{B}$ tienen la misma fase. Entonces es útil introducir un conjunto de vectores unitarios reales mutuamente ortogonales $(\boldsymbol{\epsilon}_1, \boldsymbol{\epsilon}_2, \mathbf{n})$, como se muestra en la **Figura 1.1**. En términos de estos vectores unitarios, las intensidades de campo $\mathfrak{E}$ y $\mathfrak{B}$ son

$$\mathfrak{E} = \boldsymbol{\epsilon}_1 E_0, \quad \mathfrak{B} = \boldsymbol{\epsilon}_2 \sqrt{\mu\varepsilon}\,\mathrm{E}_0 \tag{1.69}$$

$$\mathfrak{E} = \boldsymbol{\epsilon}_2 E_0', \quad \mathfrak{B} = -\boldsymbol{\epsilon}_1 \sqrt{\mu\varepsilon}\,\mathrm{E}_0' \tag{1.70}$$

donde E_0 y E_0' son constantes. Las ondas descritas por (1.63)-(1.64) y (1.69)-(1.70) son ondas transversales que se propagan en la dirección $\mathbf{n}$.

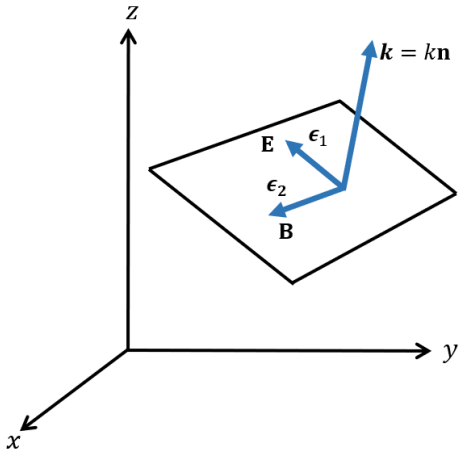

Figura 1.1. Vector de propagación $\boldsymbol{k}$ y dos vectores de polarización ortogonales $\boldsymbol{\epsilon}_1$ y $\boldsymbol{\epsilon}_2$ para las intensidades de campo $\boldsymbol{E}$ y $\boldsymbol{B}$ de una onda transversal electromagnética [26].

Representa un flujo de energía promediado en el tiempo dado por la parte real del vector de Poynting complejo:

$$\boldsymbol{S} = \frac{1}{2}\mathbf{E} \times \mathbf{H}^* \tag{1.71}$$

El flujo de energía (energía por unidad de área por unidad de tiempo) es

$$\boldsymbol{S} = \frac{1}{2}\sqrt{\frac{\varepsilon}{\mu}}|\mathrm{E}_0|^2\mathbf{n} \tag{1.72}$$

La onda plana (1.63)-(1.64) y (1.69) es una onda con su vector de campo eléctrico siempre en la dirección $\boldsymbol{\epsilon}_1$. Dicha onda se dice que está *polarizada linealmente* con el vector de polarización $\boldsymbol{\epsilon}_1$. Por su parte, la onda descrita en (1.70) está polarizada linealmente con el vector de polarización $\boldsymbol{\epsilon}_2$ y es linealmente independiente del primero. Entonces

$$\mathbf{E_1} = \boldsymbol{\epsilon_1}\mathrm{E}_1 e^{i\boldsymbol{k}\cdot\boldsymbol{x}-i\omega t}, \quad \boldsymbol{E_2} = \boldsymbol{\epsilon_2}\mathrm{E}_2 e^{i\boldsymbol{k}\cdot\boldsymbol{x}-i\omega t} \tag{1.73}$$

donde

$$\mathbf{B_j} = \sqrt{\mu\varepsilon}\frac{\boldsymbol{k}\times\mathbf{E_j}}{\boldsymbol{k}}, \quad j = 1,2 \tag{1.74}$$

La reflexión y la refracción de la luz en una superficie plana entre dos medios de diferentes propiedades dieléctricas son fenómenos familiares. Los cuales son de interés para nuestro tema a tratar.

El sistema de coordenadas y los símbolos apropiados para el problema se muestran en la **Figura 1.2**. Los medios debajo y arriba del plano $z = 0$ tienen permeabilidades y permitividades μ, ϵ y μ', ϵ', respectivamente. Los índices de refracción, definidos a través de (1.60), son $n = \sqrt{\mu\epsilon/\mu_0\epsilon_0}$ y $n' = \sqrt{\mu'\epsilon'/\mu_0\epsilon_0}$. Una onda plana con el vector de onda $\boldsymbol{k}$ y la frecuencia ω es incidente al medio μ, ϵ. Las ondas refractadas y reflejadas tienen vectores de onda $\boldsymbol{k}'$ y $\boldsymbol{k}''$, respectivamente, y $\mathbf{n}$ es un vector unitario normal dirigido del medio μ, ϵ al medio μ', ϵ'.

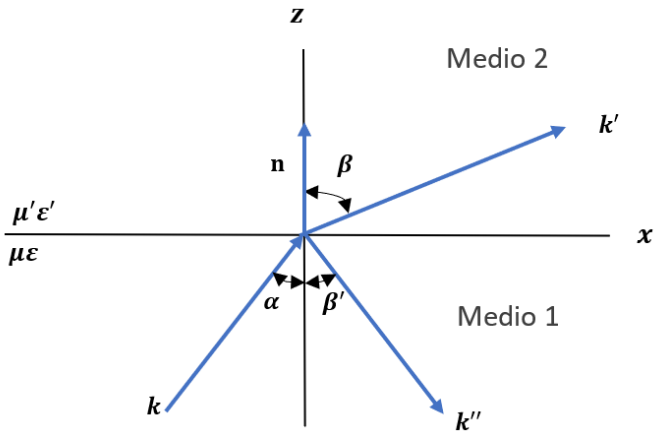

Figura 1.2. La onda incidente $\boldsymbol{k}$ incide en la interfaz del plano entre diferentes medios, dando lugar a una onda reflejada $\boldsymbol{k}''$ y una onda refractada $\boldsymbol{k}'$ [26].

Según (1.73)-(1.74), las tres ondas son:

Incidente:

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 e^{ik\cdot x - i\omega t} \tag{1.75}$$

$$\mathbf{B} = \sqrt{\mu\varepsilon}\frac{\boldsymbol{k}\times\mathbf{E}}{k} \tag{1.76}$$

Refractada:

$$\mathbf{E}' = \mathbf{E}'_0 e^{ik'\cdot x - i\omega t} \tag{1.77}$$

$$\mathbf{B}' = \sqrt{\mu'\varepsilon'}\frac{\boldsymbol{k}' \times \mathbf{E}'}{k'} \tag{1.78}$$

Reflejada:

$$\mathbf{E}'' = \mathbf{E}''_0 e^{i\boldsymbol{k}''\cdot x - i\omega t} \tag{1.79}$$

$$\mathbf{B}'' = \sqrt{\mu\varepsilon}\frac{\boldsymbol{k}'' \times \mathbf{E}''}{k''} \tag{1.80}$$

Los números de onda tienen las magnitudes:

$$|k| = |k''| = k = \frac{\omega}{c}\sqrt{\mu\varepsilon} \tag{1.81}$$

$$|k'| = k' = \frac{\omega}{c}\sqrt{\mu'\varepsilon'} \tag{1.82}$$

La existencia de la condición de frontera en $z = 0$, la cual debe cumplirse en todos los puntos del plano en todo momento, implica que la variación espacial (y temporal) de todos los campos deben ser las mismas en $z = 0$. En consecuencia, los factores de fase deben ser todos iguales en $z = 0$

$$(k \cdot x)_{z=0} = (k' \cdot x)_{z=0} = (k'' \cdot x)_{z=0} \tag{1.83}$$

independientemente de la naturaleza de las condiciones de frontera. La ecuación (1.83) contiene todos los aspectos cinemáticos de la reflexión y refracción. Podemos notar que los tres vectores de onda yacen en un plano. Podemos reescribir (1.83) como

$$k \sin\alpha = k' \sin\beta = k'' \sin\beta' \tag{1.84}$$

Como $k = k''$, encontramos que $\alpha = \beta'$. El ángulo de incidencia es igual al ángulo de reflexión (Ley de Snell).

Las propiedades dinámicas dependen totalmente de la naturaleza de los campos electromagnéticos y de sus condiciones de frontera. Aplicando las condiciones de frontera sabemos que las componentes normales de $\mathbf{D}$ y $\mathbf{B}$ son continuas y las componentes tangenciales de $\mathbf{E}$ y $\mathbf{H}$ son continuas. Sustituyendo los campos $\mathbf{D} = \varepsilon\mathbf{E}$ y $\mathbf{B} = \mu\mathbf{H}$ correspondientes al sistema (incidente, refractado y reflejado) tenemos

$$[\varepsilon(\mathbf{E_0} + \mathbf{E''_0}) - \varepsilon'\mathbf{E'_0}] \cdot \mathbf{n} = 0 \tag{1.85}$$

$$[\boldsymbol{k} \times \mathbf{E_0} + \boldsymbol{k}'' \times \mathbf{E''_0} - \boldsymbol{k}' \times \mathbf{E'_0}] \cdot \mathbf{n} = 0 \tag{1.86}$$

$$[\mathbf{E_0} + \mathbf{E''_0} - \mathbf{E'_0}] \times \mathbf{n} = 0 \tag{1.87}$$

$$\left[\frac{1}{\mu}(\boldsymbol{k} \times \mathbf{E_0} + \boldsymbol{k''} \times \mathbf{E''_0}) - \frac{1}{\mu'}\boldsymbol{k'} \times \mathbf{E'_0}\right] \times \mathbf{n} = 0 \tag{1.88}$$

En el caso particular en que el *campo eléctrico es perpendicular al plano de incidencia* (***polarización TE o tipo s***, **Figura 1.3**), debido a que los vectores de campo eléctrico son todos paralelos a la superficie, la condición de frontera para el campo eléctrico (1.87) es

$$\mathrm{E}_0 + \mathrm{E}''_0 = \mathrm{E}'_0 \tag{1.89}$$

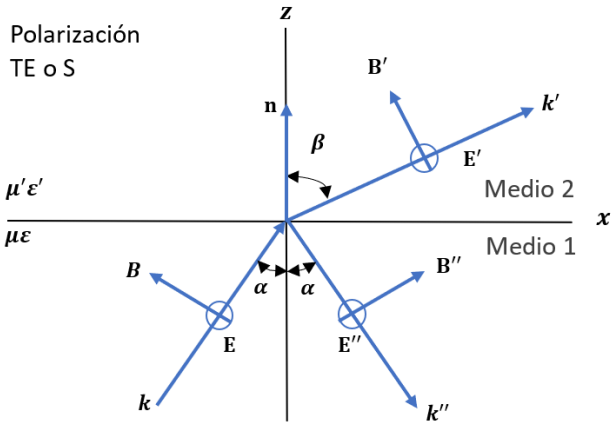

Figura 1.3. Reflexión y refracción con polarización perpendicular al plano de incidencia (transversal eléctrica) [26].

De la ecuación (1.88) usamos la propiedad del triple producto vectorial, y la ecuación (1.82) para llegar a la expresión

$$\mathrm{E}''_0 \cos\alpha + \sqrt{\frac{\mu\varepsilon'}{\mu'\varepsilon}}\,\mathrm{E}'_0 \cos\beta = \mathrm{E}_0 \cos\alpha \tag{1.90}$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones dado por (1.89)-(1.90) y utilizando la ley de Snell, se llega a

$$\mathrm{E}'_0 = \frac{2\cos\alpha \sin\beta}{\sin(\alpha - \beta)}\mathrm{E}_0 \tag{1.91}$$

$$\mathrm{E}''_0 = \frac{\sin(\alpha + \beta)}{\sin(\alpha - \beta)}\mathrm{E}_0 \tag{1.92}$$

Ahora, en el caso particular para el campo $\mathbf{E}$ *paralelo al plano de incidencia*, ***polarización TM* o tipo p**, **Figura 1.4**, la condición de frontera para el campo eléctrico (1.87) es

$$\mathrm{E}_{\mathbf{0}}' \cos\beta + \mathrm{E}_0'' \cos\alpha = \mathrm{E}_{\mathbf{0}} \cos\alpha \tag{1.93}$$

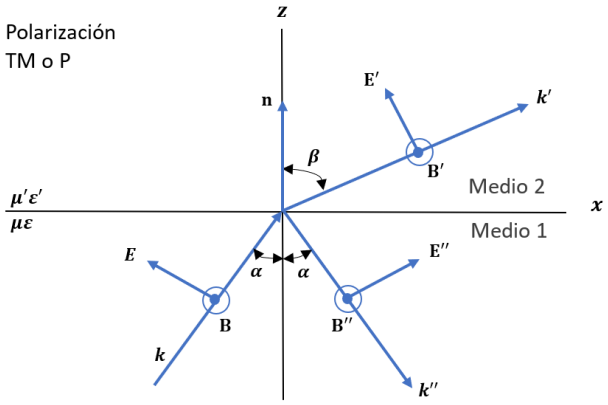

Figura 1.4. Reflexión y refracción con polarización paralela al plano de incidencia (transversal magnética) [26].

Debido a que los vectores de campo magnético son todos paralelos a la interfaz, la condición de frontera para el campo magnético (1.88) es

$$\mathrm{E}_0 + \mathrm{E''}_0 - \frac{n'\mu}{n\mu'}\mathrm{E'}_0 = 0 \tag{1.94}$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones dado por (1.93)-(1.94) y utilizando la ley de Snell se obtiene que

$$\mathrm{E}_0' = \frac{2\cos\alpha \sin\beta}{\sin(\alpha+\beta)\cos(\alpha-\beta)}\mathrm{E}_0 \tag{1.95}$$

$$\mathrm{E}_0'' = \frac{\tan(\alpha-\beta)}{\tan(\alpha+\beta)}\mathrm{E}_0 \tag{1.96}$$

conocidas como *ecuaciones de Fresnel*.

El coeficiente de reflexión complejo para campo eléctrico de luz incidente (polarización TM) es descrito por la ecuación de Fresnel (1.96) como

$$r_p = \left|\frac{\mathrm{E}_0''}{\mathrm{E}_0}\right| = \left|\frac{\tan(\alpha-\beta)}{\tan(\alpha+\beta)}\right| \tag{1.97}$$

1.1.1 Ángulo de Brewster

Para polarización tipo TM se observa que no hay onda reflejada cuando los ángulos $\alpha = \beta$ y $\alpha + \beta = \frac{\pi}{2}$. Del coeficiente de reflexión (1.97), si $\alpha + \beta = \frac{\pi}{2}$ entonces $\tan(\alpha + \beta) \to \infty$ y, por lo tanto, $r_p \to 0$. El caso en que $\alpha = \beta$ los medios son idénticos, mientras que para $\alpha + \beta = \frac{\pi}{2}$, el *ángulo de Brewster* α_B se obtiene de la ley de Snell

$$\alpha_B = \tan^{-1}\left(\frac{n'}{n}\right) \tag{1.98}$$

1.1.2 Reflexión total interna

La reflexión interna total (TIR, por sus siglas en inglés) es el fenómeno que se produce cuando un rayo de luz atraviesa un medio de índice de refracción n' menor (aire o agua) que el índice de refracción n (prisma) en el que éste se encuentra ($n > n'$). Se refracta de tal modo que no es capaz de atravesar la superficie entre ambos medios, propagándose paralelamente a la interfaz [27].

Este fenómeno sólo se produce para ángulos de incidencia superiores a un cierto valor crítico α_c. Para ángulos mayores, la luz deja de atravesar la superficie con mayor índice de refracción y es **reflejada internamente de manera total**. La reflexión total interna solamente ocurre en rayos que viajan de un medio de alto índice refractivo hacia medios de menor índice de refracción [28].

1.1.3 Ángulo crítico

El ángulo crítico o ángulo límite también es el ángulo mínimo de incidencia en el cual se produce la reflexión total interna. El ángulo de incidencia se mide respecto a la normal de la separación de los medios [27]. El ángulo crítico viene dado por

$$\alpha_c = \arcsin\left(\frac{n'}{n}\right) \tag{1.99}$$

donde n y n' son los índices de refracción de los medios con $n > n'$. Esta ecuación es una aplicación de la ley de Snell con un ángulo de refracción de 90°.

1.1.4 La onda evanescente

La descripción matemática de la onda evanescente, es el concepto central del sensado en la espectroscopia de resonancia de plasmones superficiales (SPR). Esto puede ser

explicado considerando el fenómeno de TIR que ocurre en el campo evanescente de una superficie reflejante.

Una onda plana electromagnética que se propaga en un medio con índice de refracción n puede describirse por un campo eléctrico $\mathbf{E}$ como

$$\mathbf{E} = \mathbf{E_0}\exp(i\omega t - i\boldsymbol{k}\cdot\boldsymbol{r}) = \mathbf{E_0}\exp(i\omega t - ik_x x - ik_z z) \tag{1.100}$$

donde $\mathbf{E_0}$ es la amplitud del campo eléctrico, ω es la frecuencia angular, $\boldsymbol{k}$ es el vector de onda, $\boldsymbol{r} = (x, y, z)$ es la posición del vector e $i = \sqrt{-1}$.

La magnitud del vector k está dada por

$$k = \sqrt{k_x^2 + k_z^2} = n\frac{2\pi}{\lambda} = n\frac{\omega}{c} \tag{1.101}$$

Ahora, consideremos la refracción de esa onda en una interfaz entre dos medios 1 y 2 con índices de refracción n y n', respectivamente (ver **Figura 1.2**). Sin pérdida de generalidad, sea la dirección del haz de luz de manera que $k_z = 0$, tal que disminuyamos una dimensión. Para esta situación, la ley de Snell es válida

$$n\sin\alpha = n'\sin\beta \tag{1.102}$$

o, equivalentemente,

$$k_x = k_x' \equiv k_x \tag{1.103}$$

De las ecuaciones (1.102) y (1.103), la componente del vector de onda k_z perpendicular a la interfaz es

$$k_z'^{\,2} = n^2\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2\left(\frac{n'^2}{n^2} - sin^2\,\alpha\right) \tag{1.104}$$

Supóngase que $n > n'$. De la ecuación (1.104) tenemos que $\sin\alpha > \frac{n'}{n}$, con $\frac{n'}{n} < 0$, por lo que $k_z^{'}$ es imaginaria. Entonces, la ecuación (1.100) para el medio 2 (n') sólo existe una onda viajera paralela a la interfaz

$$\mathrm{E} = \mathrm{E}_0 e^{-k_z' z} e^{i\omega t - ik_x x} \tag{1.105}$$

1 con la amplitud del campo el eléctrico decayendo exponencialmente a lo largo de la dirección z y con una distancia característica $\frac{1}{\kappa_z'} \equiv \frac{1}{ik_z'}$. Este campo en el medio 2 es el *campo evanescente*. De (1.104) puede determinarse su profundidad de

penetración, siendo del *orden de una mitad de longitud de onda*. Esto explica la sensibilidad de interfaz del campo evanescente, es decir, cerca de la interfaz está presente un campo evanescente por lo tanto, sólo un cambio en la propiedad dieléctrica en la vecindad de la interfaz lo modificará [13]. Por tanto, la reflexión interna total desde un índice de refracción de un medio alto a un medio de bajo índice de refracción generará un campo evanescente a una determinada longitud de onda de la luz incidente. La onda evanescente crea un campo evanescente de volumen fijo donde, cerca de la superficie, el índice de refracción promedio determina las condiciones de reflectividad. Particularmente en una película de metal, los plasmones superficiales excitados también generan un campo evanescente.

1.2 Ecuación de dispersión para plasmones superficiales

La relación de dispersión para un SP presenta una relación entre la frecuencia angular ω y el vector de onda k. En esta tesis, se emplean las ecuaciones de Fresnel y de Maxwell para su determinación [25].

Como analizamos anteriormente, para cualquier interfaz entre dos medios el coeficiente de reflexión complejo para campo eléctrico de luz incidente polarizada TM es descrito por la expresión (1.97), donde E_0 y E_0'' son los campos eléctricos incidente y reflejado, respectivamente, y los ángulos α y β' están definidos como se muestra en la **Figura 1.2**.

La reflectancia R_p (para polarización TM), definida como la razón de las intensidades reflejadas, cumple que

$$R_p = \left|r_p\right|^2 \tag{1.106}$$

Existen dos casos de interés: 1) $\alpha + \beta = \frac{\pi}{2}$ (ángulo de Brewster, sección 1.1.1) y 2) si $\alpha - \beta' = \frac{\pi}{2}$. En este caso de (1.97) y (1.106) implica $R_p \to \infty$, por lo que hay un E_0'' finito para cada valor pequeño de E_0. Esta circunstancia corresponde a la "*resonancia*". De esta relación entre α y β' podemos deducir la relación de dispersión, entonces $\cos\alpha = -\sin\beta'$ y $\tan\alpha = \frac{k_x}{k_z} = -\frac{n'}{n}$. Para los componentes del vector $\boldsymbol{k} = (k_x, k_y)$ tenemos enotnces

$$k_x^2 = k^2 - k_z^2 = k^2 - k_x^2\frac{\varepsilon}{\varepsilon'} \tag{1.107}$$

$$k_x = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\varepsilon\varepsilon'}{\varepsilon+\varepsilon'}}, \quad k_Z = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\varepsilon^2}{\varepsilon+\varepsilon'}}, \quad k_z' = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\varepsilon'^2}{\varepsilon+\varepsilon'}} \tag{1.108}$$

donde ε y ε' son las constantes dieléctricas de los materiales 1 y 2, respectivamente. La ecuación (1.108) es la *ecuación de dispersión* para una interfaz entre dos medios semi-infinitos.

1.3 Ecuación de onda para plasmones superficales en metal

Definimos la geometría de propagación de una guía de onda plana (**Figura 1.5**) que se propaga a lo largo de la dirección x, por lo que $\varepsilon = \varepsilon(z)$.

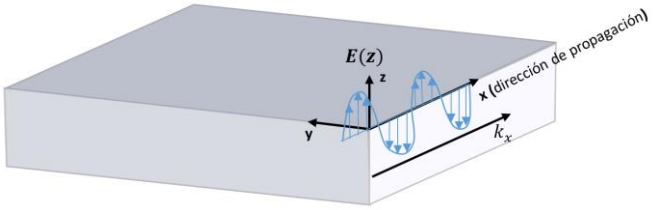

Figura 1.5. Definición de una geometría de guía de onda plana. Las ondas se propagan a lo largo de la dirección x en un sistema de coordenadas cartesianas [25].

Sustituyendo $\mathbf{E} = \mathbf{E}(z)e^{i\beta x}$ en la ecuación de onda de Helmholtz (1.58) se obtiene que

$$\frac{\partial^2 \mathrm{E}}{\partial z^2} + (k^2\varepsilon - \beta^2)\mathrm{E} = 0 \tag{1.109}$$

donde $\beta = k_x$ es la *constante de propagación* de la onda viajera.

Para deducir las expresiones de las diferentes componentes de los campos $\mathbf{E}$ y $\mathbf{H}$, se emplearán las ecuaciones de Faraday (1.3) y Ampere-Maxwell (1.4) cuando $\frac{\partial}{\partial t} = -i\omega$. De aquí que

$$\frac{\partial \mathrm{E}_y}{\partial z} = -i\omega\mu\mathrm{H}_x \tag{1.110}$$

$$\frac{\partial \mathrm{E}_x}{\partial z} - i\beta\mathrm{E}_z = i\omega\mu\mathrm{H}_y \tag{1.111}$$

$$i\beta \mathrm{E}_y = i\omega\mu \mathrm{H}_z \tag{1.112}$$

$$\frac{\partial \mathrm{H}_y}{\partial z} = i\omega\varepsilon_0\varepsilon E_x \tag{1.113}$$

$$\frac{\partial \mathrm{H}_x}{\partial z} - i\beta \mathrm{H}_z = -i\omega\varepsilon_0\varepsilon E_y \tag{1.114}$$

$$i\beta \mathrm{H}_y = -i\omega\varepsilon_0\varepsilon E_z \tag{1.115}$$

Para la polarización TM o **p** (**Figura 1.4**), donde sólo los componentes $\mathrm{E}_x, \mathrm{E}_z$ y H_y son diferentes de cero, el sistema de ecuaciones se reduce a

$$E_x = -i\frac{1}{\omega\varepsilon_0\varepsilon}\frac{\partial H_y}{\partial z} \tag{1.116}$$

$$E_z = -\frac{\beta}{\omega\varepsilon_0\varepsilon}H_y \tag{1.117}$$

Mientras que la ecuación de onda para la polarización TM es

$$\frac{\partial^2 \mathrm{H}_y}{\partial z^2} + (k^2\varepsilon - \beta^2)\mathrm{H}_y = 0 \tag{1.118}$$

Para la *polarización* TE o **s**, donde sólo los componentes $\mathrm{H}_x, \mathrm{H}_z$ y E_y son diferentes de cero, (**Figura 1.3**), el sistema de ecuaciones se reduce a

$$\mathrm{H}_x = i\frac{1}{\omega\mu}\frac{\partial \mathrm{E}_y}{\partial z} \tag{1.119}$$

$$H_z = \frac{\beta}{\omega\mu}\mathrm{E}_y \tag{1.120}$$

Y la ecuación de onda respectiva es

$$\frac{\partial^2 \mathrm{E}_y}{\partial z^2} + (k^2\varepsilon - \beta^2)\mathrm{E}_y = 0 \tag{1.121}$$

1.4 Polaritones de plasmones superficiales en una sola interfaz

Considérese una interfaz entre un material dieléctrico no absorbente $(z > 0)$ con constante dieléctrica real ε_2 y un material **conductor** $(z < 0)$ descrito por una función $\varepsilon_1(\omega)$, **Figura 1.6**. Es decir, $Re[\varepsilon_1] < 0$.

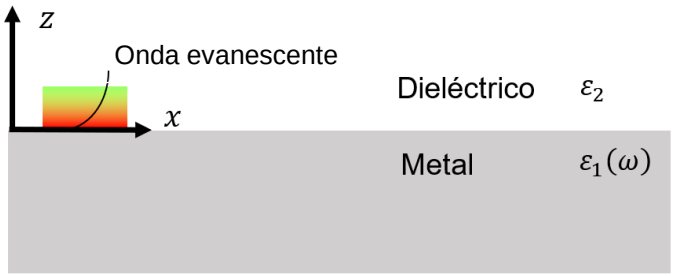

Figura 1.6. Geometría para la propagación de SPP en una única interfaz entre un metal y un dieléctrico [25].

Considérese las soluciones de onda propagándose en la interfaz, es decir, con un decaimiento evanescente en la dirección z.

1. *Polarización TM*. De las ecuaciones (1.116) y (1.117) se tiene que para el espacio dieléctrico $(z > 0)$

$$\mathrm{H}_y(z) = A_2 e^{i\beta x} e^{-k_2 z} \tag{1.122}$$

$$\mathrm{E}_x(z) = iA_2 \frac{1}{\omega\varepsilon_2} k_2 e^{i\beta x} e^{-k_2 z} \tag{1.123}$$

$$\mathrm{E}_z(z) = -A_1 \frac{\beta}{\omega\varepsilon_2} e^{i\beta x} e^{-k_2 z} \tag{1.124}$$

Mientras que para el metal $(z < 0)$

$$\mathrm{H}_y(z) = A_1 e^{i\beta x} e^{k_1 z} \tag{1.125}$$

$$\mathrm{E}_x(z) = -iA_1 \frac{1}{\omega\varepsilon_1} k_1 e^{i\beta x} e^{k_1 z} \tag{1.126}$$

$$\mathrm{E}_z(z) = -A_1 \frac{\beta}{\omega\varepsilon_1} e^{i\beta x} e^{k_1 z} \tag{1.127}$$

Aplicando la continuidad de H_y, igualando (1.122) y (1.123) y evaluando en $z = 0$, se tiene

$$A_1 = A_2 \tag{1.128}$$

Para la condición de continuidad de $\varepsilon_i \mathrm{E}_x$, igualando (1.123) con (1.126) y evaluando en la interfaz $z = 0$

$$\frac{k_2}{k_1} = -\frac{\varepsilon_2}{\varepsilon_1} \tag{1.129}$$

Dado que para H_y las ecuaciones (1.122) y (1.125) deben satisfacer la ecuación de onda (1.118), se tiene que

$$k_1^2 = \beta^2 - {k_0}^2 \varepsilon_1 \tag{1.130}$$

$$k_2^2 = \beta^2 - {k_0}^2 \varepsilon_2 \tag{1.131}$$

La combinación de (1.129) y (1.130) implican la *relación de dispersión* de SPPs propagándose en la interfaz

$$\beta = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}} \tag{1.132}$$

2. *Polarización TE*. De (1.119)-(1.121), las expresiones respectivas para las componentes del campo para el espacio $(z > 0)$ son

$$\mathrm{E}_y(z) = A_2 e^{i\beta x} e^{-k_2 z} \tag{1.133}$$

$$\mathrm{H}_x(z) = -iA_2 \frac{1}{\omega\mu} k_2 e^{i\beta x} e^{-k_2 z} \tag{1.134}$$

$$\mathrm{H}_z(z) = A_2 \frac{\beta}{\omega\mu} e^{i\beta x} e^{-k_2 z} \tag{1.135}$$

Y para $(z < 0)$

$$\mathrm{E}_y(z) = A_1 e^{i\beta x} e^{k_1 z} \tag{1.136}$$

$$\mathrm{H}_x(z) = iA_1 \frac{1}{\omega\mu} k_1 e^{i\beta x} e^{k_1 z} \tag{1.137}$$

$$\mathrm{H}_z(z) = A_1 \frac{\beta}{\omega\mu} e^{i\beta x} e^{k_1 z} \tag{1.138}$$

Por continuidad de E_y, (1.133) es igual a (1.136), que para $z = 0$ implica

$$A_2 = A_1$$

Por continuidad de H_x, (1.134) es igual a (1.137), que en $z = 0$ es

$$A_1(k_1 + k_2) = 0$$

Como el confinamiento a la superficie requiere que $Re[k_1] > 0$ y $Re[k_2] > 0$, esta condición sólo se satisface si $A_1 = 0$, y así también $A_1 = A_2 = 0$. Por lo tanto, no existen modos superficiales para la *polarización TE*. En conclusión, *los polaritones de plasmones superficiales SPP sólo existen para polarización TM*.

1.5 Sistemas multicapas

Ahora dirigimos nuestra atención a los SPP en multicapas que consisten en películas Los SPP en multicapas consisten en películas delgadas alternas y dieléctricas. En dicho sistema, cada interfaz individual puede soportar SPP vinculados. Cuando la separación entre interfaces adyacentes es comparable o menor que la longitud de decaimiento z del modo de interfaz, las interacciones entre SPP dan lugar a modos acoplados. Considérese un sistema de tres capas como el representado en la **Figura 1.7**: una delgada capa metálica (I) intercalada entre dos revestimientos dieléctricos gruesos (infinitos) (II) y (III), una heteroestructura de aislante/metal/aislante (AMA).

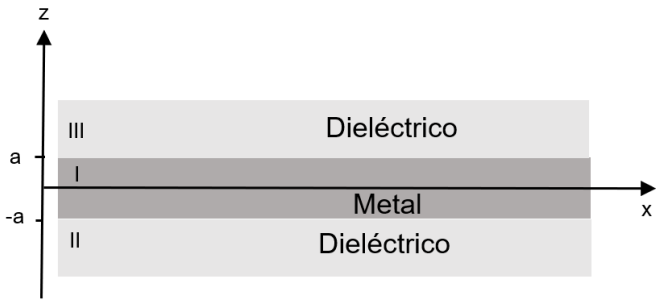

Figura 1.7. Geometría de un sistema con tres capas que consiste en una capa delgada metálica I en medio de dos espacios semi infinitos dieléctricos II y III.

En este trabajo nos enfocamos en los modos enlazados de orden más bajo de TM, es decir, aquellos que no son oscilatorios en la dirección z normal a las interfaces. De (1.116)-(1.119), para $z > a$ los componentes del campo son

$$\mathrm{H}_y = Ae^{i\beta x}e^{-k_3 z} \tag{1.139}$$

$$\mathrm{E}_x = iA\frac{1}{\omega\varepsilon_0\varepsilon_3}k_3 e^{i\beta x}e^{-k_3 z} \tag{1.140}$$

$$\mathrm{E}_z = -A\frac{\beta}{\omega\varepsilon_0\varepsilon_3}e^{i\beta x}e^{-k_3 z} \tag{1.141}$$

Mientras para $z < -a$ obtenemos

$$\mathrm{H}_y = Be^{i\beta x}e^{k_2 z} \tag{1.142}$$

$$\mathrm{E}_x = -iB\frac{1}{\omega\varepsilon_0\varepsilon_2}k_2 e^{i\beta x}e^{k_2 z} \tag{1.143}$$

$$\mathrm{E}_z = -B\frac{\beta}{\omega\varepsilon_0\varepsilon_2}e^{i\beta x}e^{k_2 z} \tag{1.144}$$

Es decir, los campos decaen exponencialmente en los revestimientos (II) y (III). Por simplicidad, denotamos la componente del vector de onda perpendicular a las interfaces como $k_i \equiv k_{i,z}$. En la región central $-a < z < a$, los modos localizados en la interfaz superior e inferior se acoplan como

$$\mathrm{H}_y = Ce^{i\beta x}e^{k_1 z} + De^{i\beta x}e^{-k_1 z} \tag{1.145}$$

$$\mathrm{E}_x = -iC\frac{1}{\omega\varepsilon_0\varepsilon_1}k_1 e^{i\beta x}e^{k_1 z} + iD\frac{1}{\omega\varepsilon_0\varepsilon_1}k_1 e^{i\beta x}e^{-k_1 z} \tag{1.146}$$

$$\mathrm{E}_z = C\frac{\beta}{\omega\varepsilon_0\varepsilon_1}e^{i\beta x}e^{k_1 z} + D\frac{\beta}{\omega\varepsilon_0\varepsilon_1}e^{i\beta x}e^{-k_1 z} \tag{1.147}$$

Por continuidad de H_y y E_x, (1.139) a (1.141) son iguales a (1.145)-(1.147) en $z = a$. De esta forma

$$Ae^{-k_3 a} = Ce^{k_1 a} + De^{-k_1 a} \tag{1.148}$$

$$\frac{A}{\varepsilon_3}k_3e^{-k_3a} = -\frac{C}{\varepsilon_1}k_1e^{k_1a} + \frac{D}{\varepsilon_1}k_1e^{-k_1a} \tag{1.149}$$

En $z = -a$ se igualan (1.142)-(1.144) con (1.145)-(1.147), evaluando en $z = -a$, tal que

$$Be^{-k_2a} = Ce^{-k_1a} + De^{k_1a} \tag{1.150}$$

$$-\frac{B}{\varepsilon_2}k_2e^{-k_2a} = -\frac{C}{\varepsilon_1}k_1e^{-k_1a} + \frac{D}{\varepsilon_1}k_1e^{k_1a} \tag{1.151}$$

generándose un sistema lineal de cuatro ecuaciones acopladas. Además, H_y debe cumplir la ecuación de onda (1.118) en las tres regiones distintas

$$k_i^2 = \beta^2 - k_0^2\varepsilon_i \tag{1.152}$$

para $i = 1,2,3$. Entonces, resolviendo (1.148)-(1.151) se obtiene una expresión implícita para la relación de dispersión que une β y ω por

$$\tanh k_1a = -\frac{k_2\varepsilon_1}{k_1\varepsilon_2} \tag{1.153}$$

De forma similar, existe una ecuación que describe los modos de paridad vectorial impar ($\mathrm{E}_x(z)$ es una función par, y $\mathrm{H}_y(z)$ y $\mathrm{E}_z(z)$ son funciones impares), que se obtiene al considerar $k_1\varepsilon_2 = -k_2\varepsilon_1$:

$$\tanh k_1a = -\frac{(-k_1\varepsilon_2)}{(-k_2\varepsilon_1)} = -\frac{k_1\varepsilon_2}{k_2\varepsilon_1} \tag{1.154}$$

Las relaciones de dispersión (1.153) y (1.154) ahora se pueden aplicar a las estructuras AMA para investigar las propiedades de los modos SPP acoplados en este sistema.

1.6 Simulación de curva de respuesta SPR de tres capas.

Parte del funcionamiento del sistema SPR implica la reflexión total interna de la luz (1.99) al interior del prisma (medio 1) cuando hace contacto con la superficie metálica (medio 2). Considerando que el ángulo de transmisión entre la onda transmitida y la normal a la superficie sea recto

$$\theta_{c,tra} = \frac{n_1}{n_2}\sin(\theta_{c,inc}) = 1, \qquad \theta_{c,inc} = \arcsin\left(\frac{n_1}{n_2}\right), \qquad n_2 < n_1. \tag{1.155}$$

donde n_1 y n_2 son los índices de refracción del prisma y del metal, respectivamente. Para $\theta > \theta_{c,inc}$

$$\cos(\theta_{tra}) = \sqrt{1 - \sin^2(\theta_{tra})} = i\sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(\theta_{inc}) - 1}, \tag{1.156}$$

que implica que el campo eléctrico transmitido será

$$\mathbf{E}_{\boldsymbol{tra}}(\boldsymbol{r}, t) = \mathbf{E}_{\mathbf{0},\boldsymbol{tra}} \exp\left(i(\boldsymbol{k}_{\boldsymbol{tra}} \cdot \boldsymbol{r} - \omega_{tra} t)\right)$$

$$= \mathbf{E}_{\mathbf{0},\boldsymbol{tra}} \exp\left(i(k_{tra}\sin(\theta_{tra})\, x + \cos(\theta_{tra})\, z - \omega_{tra} t)\right)$$

$$= \mathbf{E}_{\mathbf{0},\boldsymbol{tra}} \exp\left(i(k_{tra}\sin(\theta_{tra})\, x - \omega_{tra} t)\right) \exp\left(-k_{tra}\sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(\theta_{inc}) - 1} \cdot z\right) \tag{1.157}$$

$$= \mathbf{E}_{\mathbf{0},\boldsymbol{tra}} \exp\left(i\left(n_2\left[\frac{\omega_{inc}}{c}\sin(\theta_{tra})\, x\right] - \omega_{tra} t\right) - n_2\left[\frac{\omega_{inc}}{c}\right]\sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(\theta_{inc}) - 1} \cdot z\right)$$

De la **Figura 1.4**, las componentes x y z del vector de onda en el prisma (indicado con el índice pri) son

$$k_x^{pri} = n_{pri}\left(\frac{\omega}{c}\right)\sin(\theta_{pri}), \tag{1.158}$$

$$k_z^{pri} = n_{pri}\left(\frac{\omega}{c}\right)\cos(\theta_{pri}). \tag{1.159}$$

Para que ocurra la excitación de plasmones superficiales, las componentes sobre el plano horizontal del vector de onda de la luz incidente en la media esfera de vidrio deben ser iguales a la relación de dispersión de los plasmones superficiales en la interfase metal/medio 2, dada por (1.132)

$$k_x^{luz} = k_0\sqrt{\varepsilon_{pri}}\sin\theta_{pri} = k_0\sqrt{\frac{\varepsilon_1\varepsilon_2}{\varepsilon_1+\varepsilon_2}} = k_{SPP} \tag{1.160}$$

donde las constantes dieléctricas ε_{pri}, ε_1 y ε_2 corresponden al material de la media esfera (usualmente vidrio), a la película metálica y al aire (o a otro medio distinto). Como un ejemplo del modelo más simple, se puede considerar el sistema de tres capas vidrio/metal/aire, para el que la condición (1.97) se escribe

$$\begin{aligned} r_{ik}^p &= \frac{n_k\cos(\theta_i) - n_i\cos(\theta_k)}{n_k\cos(\theta_i) + n_i\cos(\theta_k)} = \frac{n_k\left(k_{i,z}/k_i\right) - n_i\left(k_{k,z}/k_k\right)}{n_k\left(k_{i,z}/k_i\right) + n_i\left(k_{k,z}/k_k\right)} \\ &= \frac{\left(n_k k_{i,z}c/n_i\omega\right) - \left(nk_{k,z}c/n_k\omega\right)}{\left(n_k k_{i,z}c/n_i\omega\right) + \left(n_i k_{k,z}c/n_k\omega\right)} = \frac{\left(k_{i,z}/{n_i}^2\right) - \left(k_{k,z}/{n_k}^2\right)}{\left(k_{i,z}/{n_i}^2\right) + \left(k_{k,z}/{n_k}^2\right)} \\ &= \frac{\left(k_{i,z}/{\varepsilon_i}^2\right) - \left(k_{k,z}/{\varepsilon_k}^2\right)}{\left(k_{i,z}/{\varepsilon_i}^2\right) + \left(k_{k,z}/{\varepsilon_k}^2\right)} \\ r_{ik}^p &= -r_{ki}^p, \end{aligned} \tag{1.161}$$

Por otra parte, la longitud del camino óptico se puede considerar como

$$\begin{aligned} k_{1,z}d_1 = k_1 d_1\cos(\theta_1) &= n_1 k_0 d_1\sqrt{1-\left(\frac{n_{pri}}{n_1}\right)^2\sin^2\left(\theta_{pri}\right)} \\ &= k_0 d_1\sqrt{\varepsilon_1 - {n_{pri}}^2\sin^2\left(\theta_{pri}\right)} \end{aligned} \tag{1.162}$$

y la ecuación de la reflexión total

$$R = \left|r_{pri,1,2}^p\right|^2 = \left|\frac{r_{pri,1}^p + r_{1,2}^p\exp\left(i(2k_{1.z}d_1)\right)}{1 + r_{pri,1}^p r_{1,2}^p\exp\left(i(2k_{1.z}d_1)\right)}\right|^2, \tag{1.163}$$

donde

$$r_{ik}^p = \frac{\cos(\theta_i)/n_i - \cos(\theta_k)/n_k}{\cos(\theta_i)/n_i + \cos(\theta_k)/n_k} \tag{1.164}$$

$$n_{pri}\sin\left(\theta_{pri}\right) = n_1\sin(\theta_1) = n_2\sin(\theta_2) \tag{1.165}$$

$$n_k \sin(\theta_k) = n_k\sqrt{1-\sin^2(\theta_k)} = n_k\sqrt{1-{n_{pri}}^2\sin^2\left(\theta_{pri}\right)/{n_k}^2} = \sqrt{{n_k}^2-{n_{pri}}^2\sin^2\left(\theta_{pri}\right)} \tag{1.166}$$

$$r_{ik}^{p} = \frac{\sqrt{\varepsilon_i-{n_{pri}}^2\sin^2\left(\theta_{pri}\right)}/\varepsilon_i - \sqrt{\varepsilon_k-{n_{pri}}^2\sin^2\left(\theta_{pri}\right)}/\varepsilon_k}{\sqrt{\varepsilon_i-{n_{pri}}^2\sin^2\left(\theta_{pri}\right)}/\varepsilon_i + \sqrt{\varepsilon_k-{n_{pri}}^2\sin^2\left(\theta_{pri}\right)}/\varepsilon_k}, \tag{1.167}$$

$$r_{pri,1}^{p} = \frac{\cos\left(\theta_{pri}\right)/n_{pri} - \sqrt{\varepsilon_1-{n_{pri}}^2\sin^2\left(\theta_{pri}\right)}/\varepsilon_1}{\cos\left(\theta_{pri}\right)/n_{pri} + \sqrt{\varepsilon_1-{n_{pri}}^2\sin^2\left(\theta_{pri}\right)}/\varepsilon_1}. \tag{1.168}$$

Sustituyendo valores en las expresiones (1.163)-(1.168) se obtiene la solución de la reflexión del sistema óptico de 3 capas. Los casos que interesan en Plasmónica, cuando se usan 3 materiales distintos son aquellos donde existen interfases metal/dieléctrico.

1.7 Simulación de curva de respuesta SPR multicapas.

En la práctica, es común utilizar sistemas de más de una capa intermedia (entre el prisma y el medio circundante). Por ello, es necesario contar con un desarrollo teórico que permita calcular la reflexión existente en sistemas con un número indeterminado de capas. Este problema ha sido resuelto con anterioridad por otros autores [21], [22].

En la **Figura 1.8** se presenta el caso planteado por Wilford Hansen [21], donde se consideran $N-1$ interfases en $z=z_k$, con $k=1,2,\ldots,N-1$, una polarización TM en una matriz M_k, donde $z_{k-1} \le z \le z_k$ y $z \ge z_{N-1}$

$$M_k = \begin{pmatrix} cos(\beta_k) & -i\,sin(\beta_k)/q_k \\ -iq_k\,sin(\beta_k) & cos(\beta_k) \end{pmatrix} \tag{1.169}$$

donde

$$q_k = \sqrt{\mu_k\,/\,\varepsilon_k}\cos(\theta_k)\,,\mu_k \approx 1, \tag{1.170}$$

$$q_k \approx \sqrt{1/\varepsilon_k}\cos(\theta_k) = \frac{\sqrt{\varepsilon_k - n_1^2\,sin^2(\theta_1)}}{\varepsilon_k}, \tag{1.171}$$

$$\beta_k = \frac{2\pi}{\lambda_0}n_k[z_k - z_{k-1}]\cos(\theta_k) = \frac{2\pi}{\lambda_0}[z_k - z_{k-1}]\sqrt{\varepsilon_k - n_1^2\,sin^2(\theta_1)} \tag{1.172}$$

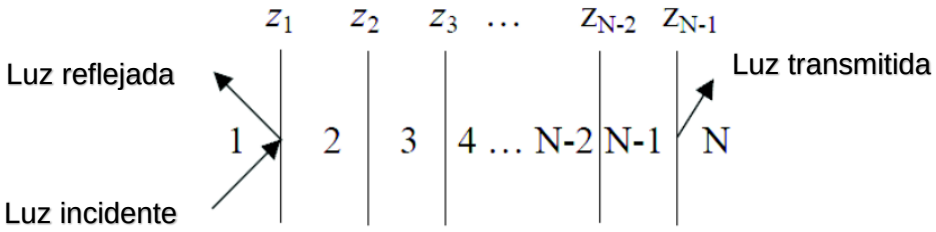

Figura 1.8. Sistema de N capas utilizado en mediciones SPR [29].

Una vez obtenidos los elementos de (1.171) y (1.172) para cada matriz con subíndice k, el coeficiente de reflexión para la polarización que TM está dado por

$$r_p = \frac{(M_{11} + M_{12}q_N)q_1 - (M_{21} + M_{22}q_N)}{(M_{11} + M_{12}q_N)q_1 - (M_{21} + M_{22}q_N)}, \tag{1.173}$$

con

$$M_{ij} = \left(\prod_{k=2}^{N-1} M_k\right)\Bigg|_{ij}, \qquad i,j = 1,2. \tag{1.174}$$

El resultado buscado se obtiene sustituyendo (1.173) en (1.106). La solución numérica de las expresiones anteriores permite calcular la respuesta del montaje SPR en configuración Kretschmann-Raether, empleada en este trabajo de tesis. Los resultados obtenidos aquí se utilizan para graficar las curvas ángulo-reflectancia para un microscopio SPR.

Capítulo 2

Interpretación cuantitativa de la respuesta de los sensores de resonancia de plasmón superficial a las películas adsorbidas

Se presenta un formalismo matemático simple pero cuantitativo para la interpretación de señales SPR de películas adsorbidas de una amplia variedad de estructuras. Se puede utilizar para estimar espesores de película adsorbida, coberturas de superficie o concentraciones de superficie a partir de la respuesta SPR en todo el rango de espesores de película.

2.1 Respuesta de SPR a soluciones en bulto: gráficos de calibración

En el capítulo 1, se propuso un modelo para calcular la reflectancia contra ángulo incidente en un sistema SPR de 3 capas, el cual ha sido utilizado para conseguir una simulación de la respuesta del sensor SPR para un sistema vidrio/oro/agua mostrada en la **Figura 2.1.**

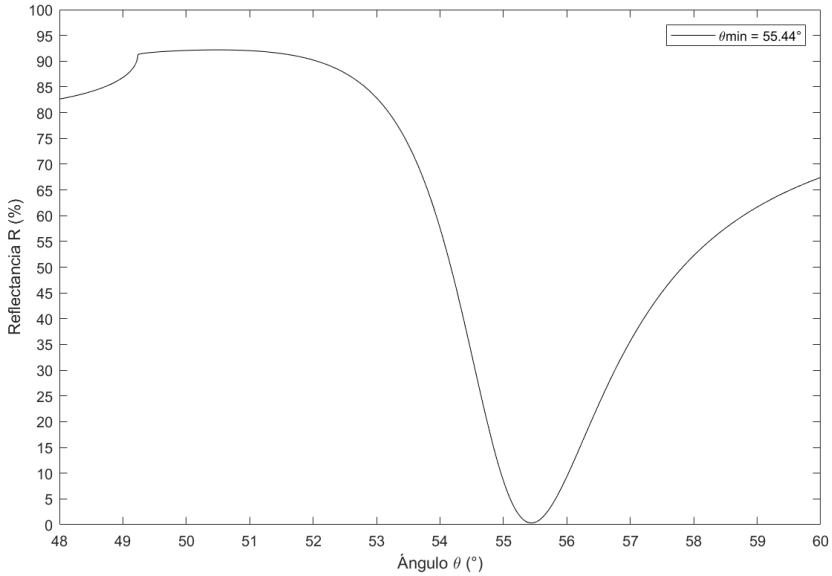

Figura 2.1 Simulación de curva SPR convencional de escaneo de intensidad vs. ángulo. La curva mostrada fue calculada usando las ecuaciones de Fresnel para 3 capas (Vidrio/Oro/Agua).

La respuesta del sensor SPR está caracterizada por el cambio en el ángulo (θ_{spr}) donde ocurre la mínima reflectancia de la curva SPR, llamado ángulo SPR. El cambio de dicho ángulo ($\Delta\theta_{spr}$) está asociada con los cambios en el índice de refracción del medio Δn, el cual se encuentra en contacto directo con la superficie metálica del dispositivo SPR [12]. En la **Figura 2.2** se muestran los diferentes ángulos SPR hallados en la simulación anterior, contra el índice de refracción que le corresponde a cada sistema. Los ángulos SPR obtenidos se muestran en la Tabla 2.1 y Tabla 2.2 en función del índice de refracción, los RI que van de 1.333 hasta 1.3606 corresponden a siete disoluciones de etanol-agua como función de su concentración (Tabla 2.1), mientras que los RI de 1.3706 hasta 1.4201 corresponden a seis disoluciones de sacarosa-agua a diferentes concentraciones (Tabla 2.2). En estas tablas se clasifican la concentraciones en porcentaje de masa (% masa), refiriéndose a esto como la masa del soluto dividido por la masa total de la solución [30].

Los códigos utilizados para predecir las curvas SPR de este capítulo se encuentran disponibles en un repositorio de Github (hacer click o dirigirse a https://github.com/karenrmedel/Curvas_SPR_de_Calibracion_3_Capas).

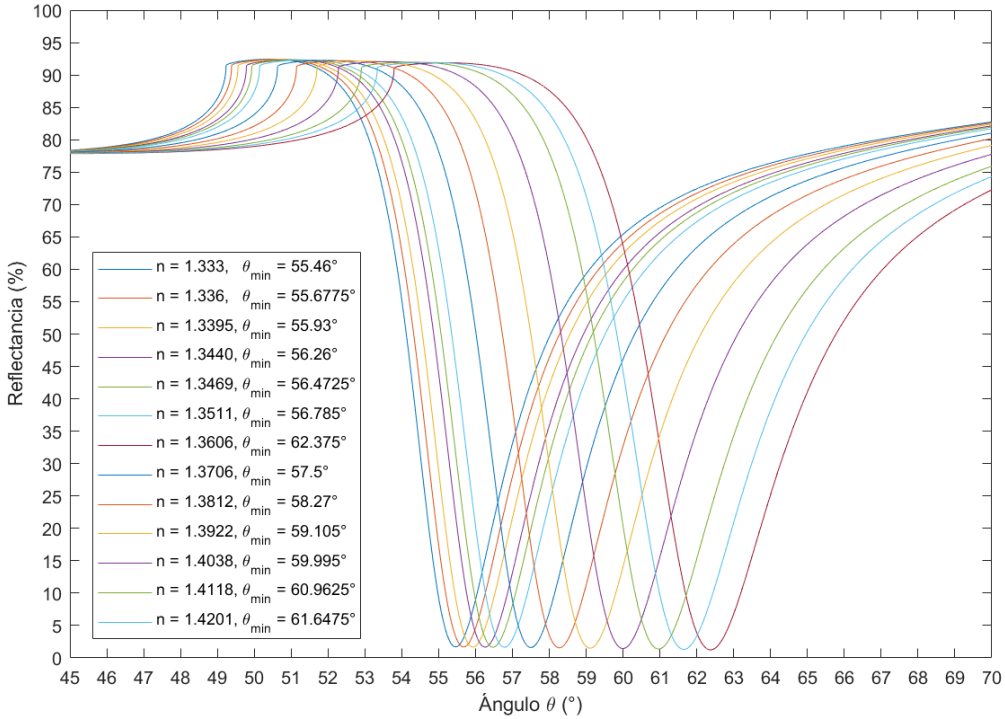

Figura 2.2 Simulación de las curvas SPR convencionales de escaneo de intensidad vs. ángulo a diferentes índices de refracción.

Tabla 2.1 Ángulo SPR obtenido mediante el modelo de Fresnel para 3 capas en un sistema SPR para siete soluciones etanol-agua con diferentes concentraciones y su correspondiente índices de refracción [30].

% Masa para etanol	Índice de refracción $(R.U)$	Ángulo SPR (°)
0.5	1.333	55.46
1	1.336	55.67
10.0	1.3395	55.93
16.0	1.3440	56.26
20.0	1.3469	56.47
26.0	1.3511	56.78
46.0	1.3606	62.37

Tabla 2.2 Ángulo SPR obtenido mediante el modelo de Fresnel para 3 capas en un sistema SPR para siete soluciones sacarosa-agua con diferentes concentraciones y su correspondiente índices de refracción [30].

% Masa para sacarosa	Índice de refracción $(R.U)$	Ángulo SPR $(°)$
24.0	1.3706	57.50
20.0	1.3812	58.27
36.0	1.3922	59.10
42.0	1.4038	59.99
46.0	1.4118	60.96
50.0	1.4201	61.64

El ángulo del mínimo θ_{spr} de las curvas SPR se puede graficar en función del índice de refracción n de la disolución en contacto con la película de oro, para las variadas disoluciones binarias utilizadas en las tablas anteriores (sacarosa/agua, etanol/agua), cada una con un rango de concentraciones. Para estas disoluciones, el cambio en el ángulo mínimo SPR ($\Delta\theta_{spr}$) debido a las diferencias en la adsorción entre las diferentes disoluciones debe ser muy pequeño en comparación con los cambios medidos, que están dominados por cambios en el índice de refracción de estas disoluciones. La respuesta en todos los casos es bastante lineal en un rango ángulos SPR lo suficientemente estrecho de índices de refracción ($n = 1.333$ a 1.340), pero se presenta una no linealidad al variar el rango de índice más amplio disponible ($n = 1.333$ a 1.4201) (**Figura 2.3**). Por lo tanto, en un rango estrecho de RI, la respuesta a los cambios en el índice de refracción, en ausencia de adsorción de la disolución, se puede aproximar de manera lineal como:

$$R_{SPR} = m\,\Delta n = m\left(n_{final} - n_{inicial}\right) \tag{2.1}$$

La magnitud de la pendiente local, m, en cualquier pequeño rango de índices de refracción puede considerarse como un "*factor de sensibilidad*" para el sensor. Las unidades en esta pendiente son la "unidad de índice de refracción" o RIU (por sus siglas en inglés). Si bien esto es innecesario ya que el índice de refracción realmente no tiene unidades, creemos que hace que el documento sea más fácil de seguir. El factor de sensibilidad obtenido para la **Figura 2.3** inserta es igual a 72.4178 RIU.

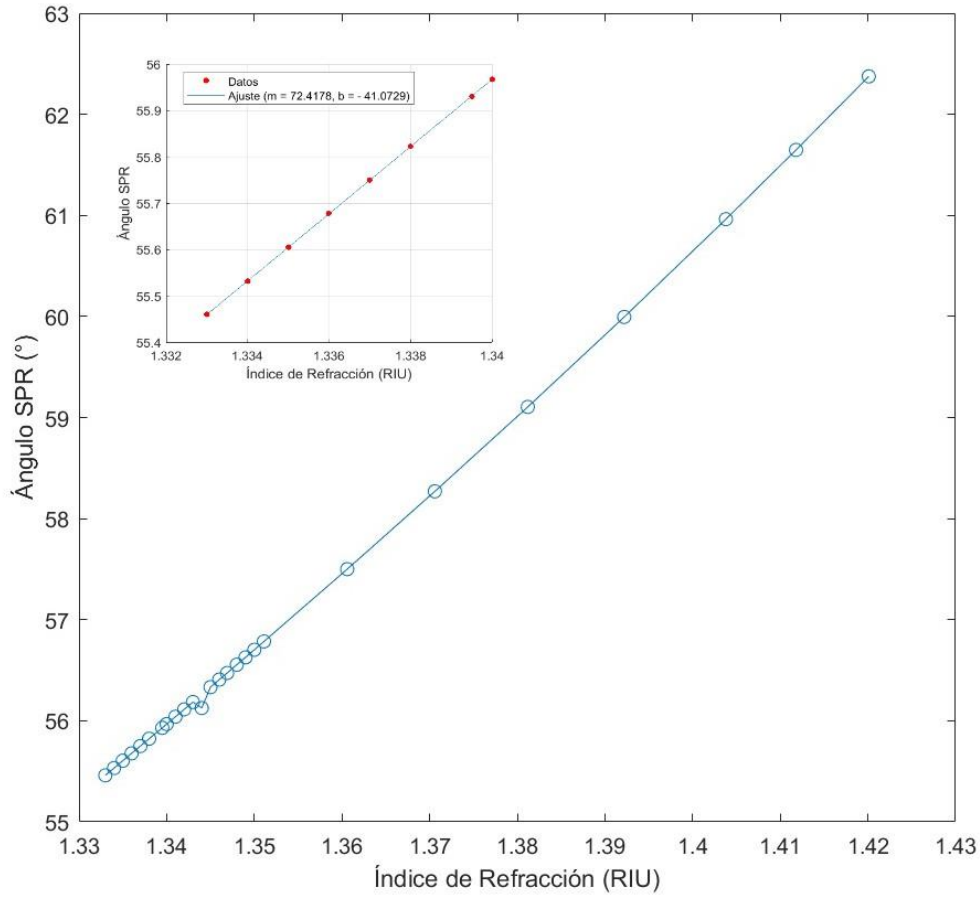

Figura 2.3 Respuesta SPR simulada (ángulo mínimo en la intensidad de la luz reflejada) versus el índice de refracción (n) de las disoluciones en contacto con la superficie de la sonda SPR de oro. La figura inserta es la respuesta SPR simulada, excepto en un rango estrecho de n cerca del del agua (1.330).

Como se describe con más detalle a continuación, la curvatura en dichos gráficos de calibración podría incorporarse explícitamente en una ecuación polinomial de bajo orden, por ejemplo, agregando un segundo término a la ecuación (2.1), $m_2\,\Delta n^2$, que sería insignificante para Δn pequeño:

$$R_{SPR} = m_1\,\Delta n + m_2\,\Delta n^2 \qquad (2.2)$$

2.2 Cálculo de la respuesta SPR a las películas adsorbidas

2.2.1 La respuesta SPR de una sola capa de espesor uniforme

En la **Figura 2.4** consideramos la estructura de una bicapa idealizada, en donde una capa de espesor uniforme (d) e índice de refracción (n_a) es adsorbida en la superficie

metálica de oro de un sensor SPR (Au/vidrio). Por encima de esta capa de adsorbato hay una disolución líquida en bulto de índice n_s. ¿Cuál debería ser la respuesta SPR para tal estructura?

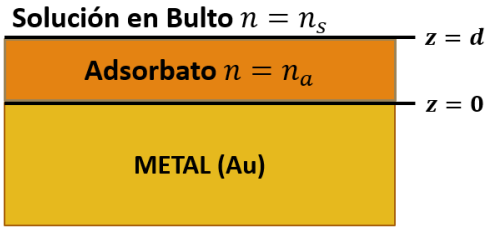

Figura 2.4 Diagrama esquemático de una estructura bicapa que implica un adsorbato a de espesor de índice de refracción n_a directamente sobre la superficie del sensor SPR, sobre la cual se encuentra la disolución s, de índice de refracción n_s [12].

En este caso definimos la *respuesta SPR*, R_{SPR}, como el cambio en el ángulo ($\Delta\theta$) del mínimo de la curva SPR en la intensidad de luz reflejada asociada con esta adsorción a partir del metal limpio en contacto con la misma solución en bulto, sin capa intermedia. El *índice efectivo de refracción* para la bicapa, n_{eff}, es el promedio ponderado del absorbato n_a y la disolución n_s, entonces se podría estimar la respuesta a la adsorción (por ejemplo, el cambio en la posición del θ_{spr} después de la adsorción del adsorbato) usando la ecuación de respuesta lineal (2.1*)*. Por lo tanto, la respuesta SPR estimada sería

$$R_{SPR} = m(n_{eff} - n_s) \tag{2.3}$$

o

$$R_{SPR} = m_1(n_{eff} - n_s) + m_2(n_{eff} - n_s)^2 \tag{2.4}$$

dependiendo de si uno está usando la gráfica de calibración lineal o cuadrática. En las ecuaciones (2.3) y (2.4) , n_{eff} debe ser el promedio ponderado de n_a más n_s. Dado que la luz se está utilizando para sondear este índice de refracción, es natural suponer que el factor de ponderación adecuado en cada punto de la estructura de la bicapa debe ser proporcional a la intensidad de la luz en ese punto. El campo electromagnético evanescente decae exponencialmente en este medio con una longitud de decaimiento característica, $\frac{1}{\kappa_z'} \equiv l_d$, de ~25-50% de la longitud de onda de la luz [12].

La irradiancia es proporcional al cuadro de la amplitud del campo, tal que decae con la altura z sobre la superficie del metal como $[exp\,(-z\,/\,l_d)]^2$. Por lo tanto, el factor de ponderación adecuado para calcular este índice de refracción promedio debe ser

$exp\ (-2z\ /\ l_d)]$ [31]. Por lo tanto, el índice efectivo de refracción se calcula promediando el índice de refracción sobre la profundidad de toda la estructura de la bicapa, siempre ponderando el índice local con este factor. Por lo tanto, este promedio se calcula con la integral de profundidad, dado por

$$n_{eff} = \left(\frac{2}{l_d}\right)\int_0^{\infty} n(z)\left[\exp\left(-\frac{2z}{l_d}\right)\right]dz \tag{2.5}$$

donde $n(z)$ es el índice de refracción a la altura z. Esta ecuación no se limita a la estructura de doble capa y debería ser generalmente útil incluso para estructuras multicapa mucho más complejas.

Para la estructura bicapa de la **Figura 2.4**, $n(z) = n_a$ en la región $0 < z < d$, y $n(z) = n_s$ para $d < z < \infty$. Tomando la ecuación (2.5) obtenemos

$$n_{eff} = n_s + (n_a - n_s)\left[1 - exp\left(-\frac{2d}{l_d}\right)\right] \tag{2.6}$$

Si se utiliza una gráfica de calibración lineal de respuesta versus índice de refracción (RI) en bulto, entonces se aplica la ecuación (2.3) y al sustituir la ecuación (2.6) por n_{eff} se obtiene la respuesta del sensor para el modelo bicapa.

$$R_{SPR} = m(n_{eff} - n_s) = m(n_a - n_s)\left[1 - exp\left(-\frac{2d}{l_d}\right)\right] \tag{2.7}$$

El desarrollo anterior supuso que la respuesta SPR era proporcional al cambio en el índice de refracción global en el rango entre n_s y n_{eff}. Si este no es el caso, se puede usar la curva de calibración no lineal más compleja, la ecuación (2.2), para reemplazar la ecuación (2.1) para soluciones a granel, en cuyo caso la respuesta a una capa adsorbida viene dada por la ecuación (2.4). Tras la sustitución de la ecuación (2.6) por el índice de refracción efectivo de la bicapa en la ecuación (2.4), tenemos

$$R_{SPR} = m_1(n_a - n_s)\left[1 - exp\left(-\frac{2d}{l_d}\right)\right] + m_2\left\{(n_a - n_s)\left[1 - exp\left(-\frac{2d}{l_d}\right)\right]\right\}^2 \tag{2.8}$$

Las constantes m_1 y m_2 se determinarían a partir de la curva de calibración, ajustando la respuesta al índice de soluciones a granel con la ecuación cuadrática (2.2).
La ecuación (2.8) debe usarse en lugar de la ecuación (2.7) siempre que haya una no linealidad sustancial en la respuesta SPR a los cambios en el índice de refracción global en el rango entre n_s y n_{eff}, que generalmente ocurre cuando su diferencia es grande.

2.2.2 Estimación del espesor de la película de adsorbato a partir de la respuesta SPR medida

Las ecuaciones (2.7) y (2.8) se pueden usar para estimar el espesor de un adsorbato a partir de una respuesta SPR medida, así como para predecir la respuesta de una determinada estructura de adsorbato. Tenga en cuenta que el factor sensibilidad m en dichas ecuaciones se determina primero a partir de las curvas de calibración utilizando soluciones en bulto de etanol/agua tal como lo haremos en la presente tesis. El índice de refracción de la disolución en bulto, n_s, puede obtenerse de mediciones anteriores [32] o medidas, como se ha hecho en un refractómetro. A continuación, presentamos métodos para estimar n_a si no puede determinarse por estos métodos. Las ecuaciones (2.7) y (2.8) anteriores se puede usar para predecir la respuesta SPR de un adsorbato de cierto espesor o, por el contrario, para estimar el espesor del adsorbato a partir de la respuesta SPR medida. Las ecuaciones se pueden reorganizar para encontrar el espesor d del adsorbato

$$d = -\left(\frac{l_d}{2}\right) ln\left(1 - \frac{R_{SPR}}{R_{max}}\right) \tag{2.9}$$

donde R_{max} es la respuesta máxima que se mediría para un adsorbato infinitamente grueso, o

$$R_{max} = m(n_a - n_s) \tag{2.10}$$

Notemos que R_{max} podría medirse directamente en algunos casos, pero en la mayoría de los casos (tales como proteína o adsorción de monocapas de tioles) sólo se calcula a partir de la ecuación (2.10) como la pendiente de calibración m veces la diferencia entre los índices de refracción del adsorbato y solvente.

En el caso especial donde el espesor de adsorbato $d \ll l_d$, la ecuación (2.9) se reduce a

$$d = \left(\frac{l_d}{2}\right)\left(\frac{R_{SPR}}{R_{max}}\right) = \left(\frac{l_d}{2}\right)\left\{\frac{R_{SPR}}{m(n_a - n_s)}\right\} \tag{2.11}$$

así que la respuesta es directamente proporcional al espesor del adsorbato. Esto es lo que llamaremos el "*régimen de respuesta lineal*" y que usaremos en este trabajo de investigación. Se ha predicho y observado la respuesta lineal al espesor de la película o la cobertura de la superficie de adsorbato en muchos artículos de investigación donde el adsorbato no era demasiado grueso [33], [34], [35].

2.2.3 Estimación de la cobertura de adsorbato a partir de la respuesta SPR medida

Una vez que hemos estimado el espesor promedio, d, de un adsorbato uniformemente extendido mediante el procedimiento anterior, se puede convertir esto a la concentración superficial, Γ, en moléculas por unidad de área (cm^2). El factor de conversión es solo la densidad numérica en bulto del adsorbato, N, en unidades de moléculas por unidad de volumen (cm^3) [12]

$$\Gamma\left(\frac{\text{moléculas}}{\text{cm}^2}\right) = d\,(\text{cm}) \times N\left(\frac{\text{moléculas}}{\text{cm}^3}\right) \tag{2.12}$$

La densidad numérica del adsorbato, N, puede calcularse a partir de la densidad del adsorbato, ρ en unidades de $\mathrm{g/cm}^3$, simplemente dividiendo por el peso molecular y multiplicando por el número de Avogadro.

2.2.4 Estimación del índice de refracción de un adsorbato.

¿Cómo se determina n_a, el RI del adsorbato? Si el adsorbato es una molécula que puede suponerse relativamente poco perturbada tras la adsorción, el valor apropiado para n_a es solo el índice de refracción de la molécula en forma pura y condensada, que también se puede encontrar [32] o medir. La mayoría de las proteínas, por ejemplo, tienen un índice de refracción cercano a 1.6 [19], y no se espera que esto se perturbe mucho después de la adsorción, ya que la molécula es tan grande en relación con la fracción que realmente se uniría a la superficie.

Un método más complejo para estimar índices de refracción se basa en la ecuación de Clausius-Mossotti, que para una muestra de compuesto puro j es [12]

$$\frac{n_j^2 - 1}{n_j^2 + 2} = \frac{N_{j,0}A_j}{3\,\epsilon_0} \tag{2.13}$$

Aquí n_j es su índice de refracción (RI), ϵ_0 es la permitividad del vacío, $N_{j,0}$ es la densidad numérica (número de moléculas de j por unidad de volumen en j puro), y A_j es la polarización dependiente de la frecuencia de la molécula. Primero consideremos una disolución fluida. Para una mezcla de compuesto j con k, cada uno con densidades numéricas N_j y N_k, se puede estimar el índice de refracción de la disolución, n_{soln},

usando la misma fórmula, pero reemplazando n_j con n_{soln}, y $N_{j,0}A_j$ con la suma $N_jA_j + N_kA_k$. Si la disolución es ideal, entonces $N_j = f_jN_{j,0}$, donde f_j es la fracción de volumen de j (es decir, la fracción de su volumen ocupado por j), y lo mismo para k. El uso de la ecuación (2.13) para expresar A_j y A_k en términos de n_j y n_k, respectivamente, da la ecuación de Lorenz-Lorentz [19]

$$\frac{n_{soln}^2 - 1}{n_{soln}^2 + 2} = f_j\left[\frac{n_j^2 - 1}{n_j^2 + 2}\right] + f_k\left[\frac{n_k^2 - 1}{n_k^2 + 2}\right] \tag{2.14}$$

Esto resulta para dar una variación casi lineal en el RI de la disolución con la fracción de su volumen ocupado por k, de modo que lo siguiente se cumple dentro de un pequeño porcentaje cuando n_j y n están dentro del rango habitual de las aplicaciones SPR (de 1.33 a 1.6)

$$n_{soln} = f_jn_j + f_kn_k = f_j(n_j - n_k) + n_k \tag{2.15}$$

La ecuación (2.14*)* se puede aplicar para determinar el RI de las moléculas midiendo la contribución que hacen al RI de una solución en bulto.

También se puede medir n_a en casos en los que se pueden anclar adsorbatos muy gruesos. Simplemente midiendo la respuesta máxima para un espesor infinito y se puede aplicar (2.10). Como se conoce la pendiente de la gráfica de calibración, m, y el RI del solvente es conocido, se puede resolver para n_a.

2.2.5 Estimación de la longitud de decaimiento del campo electromagnético evanescente.

La longitud de decaimiento del campo electromagnético evanescente, l_d, es un parámetro clave en estos cálculos. La profundidad de la sonda (campo eléctrico evanescente) de la técnica SPR es la mitad de decaimiento de la longitud de onda de la luz incidente. Una estimación aproximada pero razonable es que l_d es igual a 37 $\pm$ 13% de la longitud de onda de la luz incidente en el mínimo SPR, λ.

Una estimación más precisa de l_d proviene de las ecuaciones de Maxwell

$$l_d = \frac{\frac{\lambda}{2\pi}}{Re\left\{\left[\frac{n_{eff}^2\tilde{\varepsilon}_{metal}}{n_{eff}^2 + \tilde{\varepsilon}_{metal}}\right] - \eta_{eff}^2\right\}^{\frac{1}{2}}} = \frac{\frac{\lambda}{2\pi}}{Re\left\{-\frac{n_{eff}^4}{n_{eff}^2 + \tilde{\varepsilon}_{metal}}\right\}^{\frac{1}{2}}} \tag{2.16}$$

donde $\tilde{\varepsilon}_{metal}$ es la constante dieléctrica compleja del metal a esa longitud de onda [36] y n_{eff} es el índice efectivo de refracción de la muestra bajo estudio.

Debe recordarse que el uso de un solo valor de l_d a través de la profundidad de la sonda es realmente una aproximación en las estructuras bicapa y multicapa, ya que su valor depende localmente del RI del medio local. Tal dependencia local podría incorporarse fácilmente en la ecuación (2.5). Sin embargo, no es necesaria para la mayoría de las aplicaciones ya que 1) l_d varía solo débilmente con RI y 2) los espesores de los adsorbatos son típicamente pequeños en comparación con l_d.

2.2.6 La respuesta SPR de las estructuras de película multicapa

En aplicaciones de sensores SPR, es común tener una estructura de tres capas del tipo representado en la **Figura 2.5**, donde el adsorbato $\boldsymbol{b}$ se usa para unir un receptor selectivo a la superficie del metal, y el adsorbato $\boldsymbol{a}$ es el analito que posteriormente se une a la luego de la disolución $\boldsymbol{s}$. Este modelo permite que se pueda tener una estructura multicapa con varias sustancias diferentes.

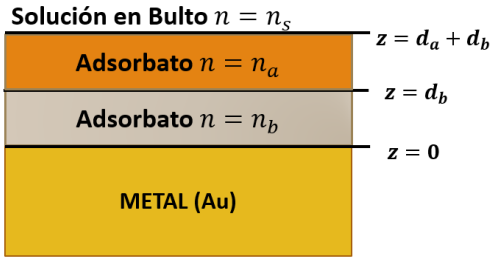

Figura 2.5 Diagrama esquemático de la estructura de tres capas que involucra una capa de pre-adsorbato b de espesor d_b que funcionaliza directamente la superficie metálica del sensor SPR, sobre la cual hay una segunda capa de adsorbato $\boldsymbol{a}$ de espesor d_a y finalmente la disolución s en bulto.

Estimar la respuesta SPR a tales estructuras multicapa es una extensión de las ecuaciones (2.7) y (2.8). Nuevamente, se usa la ecuación (2.5) para calcular un índice de refracción promedio ponderado adecuadamente para la estructura multicapa y se sustituye en las ecuaciones (2.3) y (2.4). Para el modelo tri-capa de la **Figura 2.5**

$$n_{eff} = n_b\left[1 - exp\left(-\frac{2d_b}{l_d}\right)\right] + n_a\left\{exp\left(-\frac{2d_b}{l_d}\right) - exp\left[-\frac{2(d_a+d_b)}{l_d}\right]\right\} + n_s\, exp\left[-\frac{2(d_a+d_b)}{l_d}\right] \quad (2.17)$$

Cuando se sustituye en la ecuación de respuesta SPR estimada (2.3), esto nos da

$$\Delta R_{SPR} = m(n_a - n_s)\left[1 - exp\left(-\frac{2d_a}{l_d}\right)\right] exp\left(-\frac{2d_b}{l_d}\right) \quad (2.18)$$

para la respuesta SPR a la adición de la película de analito, **a**. Aquí, ΔR se define como la respuesta SPR sólo a la adición de **a**, después de que **b** ya estaba presente, y m es la pendiente de la gráfica de calibración, tomada en este rango de n_{eff}. Observe la similitud de esta expresión con la ecuación (2.7): Difieren solo por el factor de escala adicional de $exp\left(-\frac{2d_b}{l_d}\right)$ en la ecuación (2.18). Es decir, la respuesta SPR al agregar un adsorbato a es igual que en el caso más simple de la especie a sola, excepto que su magnitud se reduce en este factor debido a la capa intermedia del adsorbato **b**.

2.3 Predicción de los cambios de intensidad de luz reflejada de las curvas SPR calculadas

Las curvas de reflectividad en la **Figura 2.6** se calcularon utilizando un modelo de un medio estratificado de n fases basado en los cálculos de Fresnel de Hansen [21]. El modelo es una pila de dieléctricos que consiste en una capa de solución infinitamente gruesa con índice de refracción fijo en contacto con una película de oro de 47 nm de espesor acoplado a un prisma de vidrio SF14 iluminado por un haz de HeNe laser estabilizado en potencia ($\lambda = 632.8\, nm$) [12]. Las curvas que se muestran corresponden a la respuesta de dos disoluciones globales cuyos índices de refracción son 1.3330 (agua, curva negra) y 1.3342 (etanol-agua, curva gris), una diferencia de 0.0012.

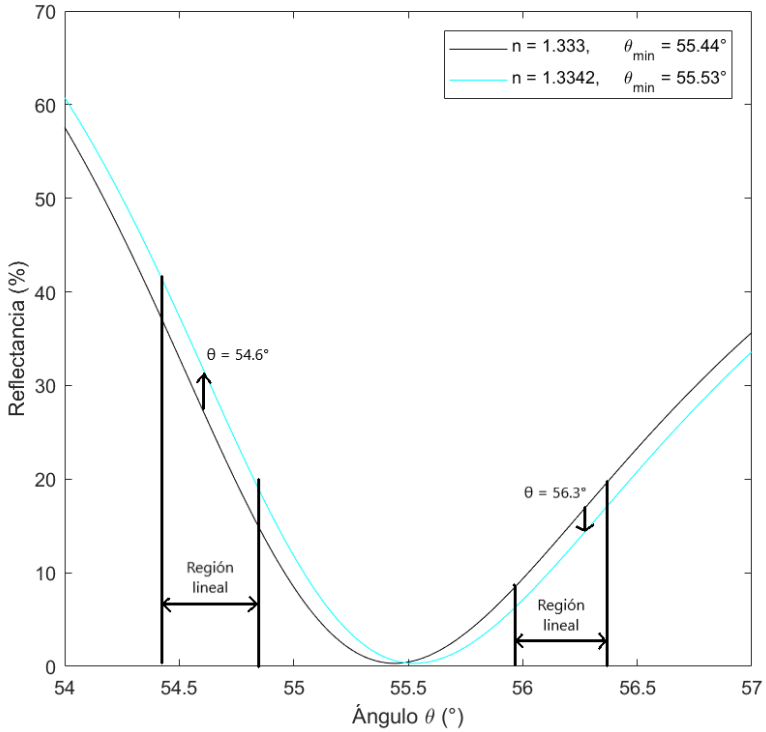

Figura 2.6 Curvas de reflectividad SPR predichas a partir de cálculos de Fresnel. Se utilizó un modelo de pila dieléctrica para calcular las respuestas para capas infinitamente gruesas de índices de refracción 1.3330 y 1.3342 en contacto con una película de oro de 47 nm de espesor en un prisma SF14 iluminado por una luz de longitud de onda de 632.8 nm. De [37].

Ambas curvas en la **Figura 2.6** muestran una caída característica en la intensidad reflejada debido al acoplamiento entre la luz incidente y los plasmones superficiales que se propagan en la interfaz película metálica/dieléctrico. El mínimo de la curva de reflectividad (curva SPR) tiene un θ_{spr} característico y cambia a un ángulo mayor cuando aumenta el índice de refracción de la solución en bulto en contacto con la película metálica. Las líneas negras verticales en la **Figura 2.6** indican los rangos de ángulo sobre los cuales hay regiones anchas y casi lineales a ambos lados de este mínimo donde la magnitud de la pendiente (intensidad reflejada versus ángulo de incidencia) es casi constante cerca de su valor máximo. En la discusión a continuación, nos referiremos a estos rangos donde la pendiente es grande y permanece constante ($\pm 9\%$) como "**regiones lineales**" o **"ángulos de alto contraste**". Cuando la curva SPR se mueve a ángulos más altos debido al aumento del índice de refracción, hay un cambio en la intensidad de luz reflejada ΔI, medida en ambas regiones lineales (izquierda y derecha) como se muestra por las flechas. Si los ángulos de incidencia/detección se fija en un ángulo (ángulo de alto contraste) en la región lineal en el lado izquierdo del mínimo de la curva (por ejemplo, 54.6°), se observa un aumento en la intensidad de la luz reflejada a medida que el mínimo cambia a ángulos más altos.

Las curvas SPR de la **Figura 2.6** se repiten para un rango de ángulo de incidencia mayor en la Figura 2.7. También se grafica la diferencia entre las curvas SPR trazadas en una escala expandida, la cual muestra el cambio de la magnitud de la intensidad de la luz reflejada ΔR cuando la curva SPR cambia a ángulos mayores debido al aumento en el índice de refracción de la capa adyacente a la superficie de la película de oro. El cambio del índice de refracción de $\Delta n = 0.0012$ o 0.09% produce un aumento de intensidad al ángulo fijo o de sensado 54.6° de $\Delta I = 4.8\%$ y una disminución de intensidad de 2.8% a 56.3° (región lineal derecha), otra vez en unidades de reflectividad absoluta, no relativa.

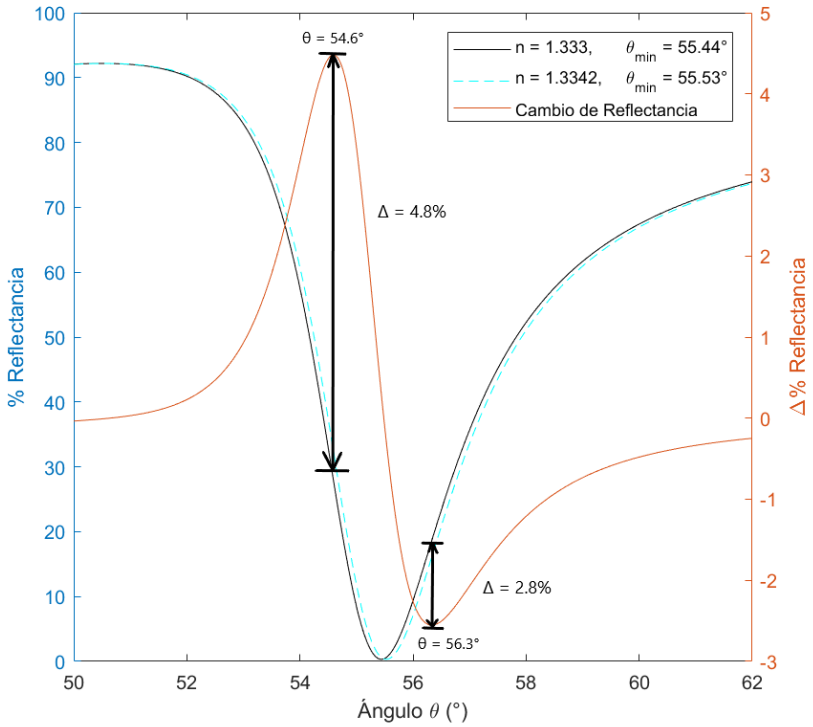

Figura 2.7 Curvas de reflectividad SPR calculadas (línea negra $n = 1.3330$ y línea gris $n = 1.3342$) y la curva de diferencia resultante (círculos negros) trazada en una escala expandida. Las curvas de reflectividad son las curvas de la Figura 2.6 trazadas para un rango de ángulo mayor. La curva de diferencia para las curvas de reflectividad muestra la magnitud de los cambios de intensidad de luz debido al aumento en el índice de refracción de la capa adyacente a la superficie de oro en el modelo utilizado para los cálculos (eje derecho). De [37].

Se calcularon curvas de diferencia similares (en relación con un índice de refracción del agua 1.3330) para una serie de disoluciones con índices de refracción cada vez mayores (Tabla 2.1 y Tabla 2.2). Los ángulos de las regiones lineales de la curva SPR (para un índice de refracción de 1.3330) en la **Figura 2.6** se seleccionaron y utilizaron para encontrar los cambios de intensidad reflejados correspondientes a esas otras curvas.

El valor absoluto del cambio en la intensidad reflejada ΔI medida versus el cambio en el índice de refracción en bulto para dos ángulos fijos de alto del alto

contraste (seleccionados de ambos lados de la curva de reflectividad SPR versus ángulo) se muestran en la Figura 2.7. El ángulo de alto contrastes en la región lineal izquierda fue de 54.6 ℃ y para la región lineal derecha de 56.1 ℃. La relación es lineal para la intensidad cambios de menos del 20% (izquierda) y 10% (derecha) para ángulos de alto contraste por debajo y por encima de la resonancia SPR, respectivamente. La relación lineal inicial es una consecuencia natural de la forma lineal de la curva SPR en estos ángulos de alto contraste como se destaca por las líneas negras continuas en la **Figura 2.6**.

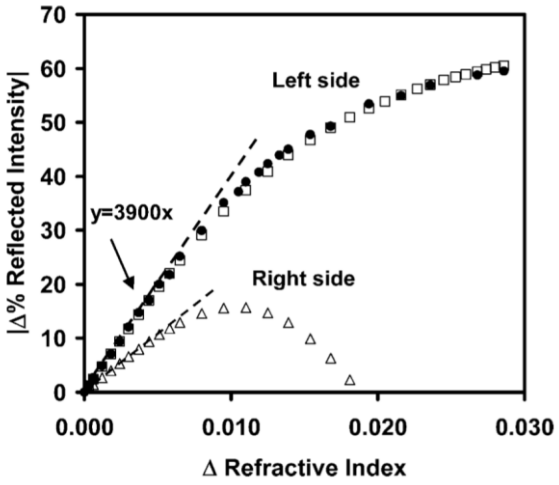

Figura 2.8 Relación calculada (símbolos abiertos) y medida (círculos rellenos) entre los cambios absolutos en la intensidad reflejada y los cambios en el índice de refracción global en ángulos en las regiones casi lineales en los lados izquierdo y derecho de la curva de reflectividad SPR mínima. Los cambios calculados son para ángulos incidentes de 54.6° (□) y 56.1 ° (Δ) en los lados izquierdo y derecho, respectivamente. La curva medida (●) y la curva predicha de las ecuaciones de Fresnel concuerdan bien. De [37].

Ambas curvas en la Figura 2.8 se vuelven no lineales para cambios mayores en el índice de refracción. A 54.6 ° (lado izquierdo), la intensidad eventualmente se satura como se esperaba debido a la saturación de intensidad a medida que uno se mueve hacia la izquierda en la curva de intensidad/ángulo SPR de la Figura 2.7. A 56.1° (lado derecho), el valor absoluto del cambio de intensidad (negativo aquí) se satura y luego disminuye en la Figura 2.7, como se esperaba a medida que uno se mueve de derecha a izquierda en la curva de intensidad/ángulo SPR de la **Figura 2.6**, pasando por el mínimo.

En base a los resultados anteriores, en la presente tesis se hará un análisis de la región lineal del lado izquierdo de la curva de intensidad reflejada vs ángulo o curva SPR. Eligiendo el ángulo de alto contraste a 20% de la intensidad reflejada de la curva de la curva SPR respecto al ángulo mínimo θ_{spr}.

2.3.1 Relación entre los cambios en la intensidad de la luz reflejada y los cambios de ángulo

Como se muestra arriba, el cambio de intensidad (ΔI) medido en un ángulo de alto contraste es directamente proporcional al cambio en el índice de refracción de la disolución cerca de la superficie del sensor SPR, para pequeños cambios:

$$\Delta I = s(\Delta n) = s(n_{inicial} - n_{final}) \tag{2.19}$$

donde s es la constante de proporcionalidad. En un rango de índice de refracción estrecho y en ausencia de absorción, se mostró que

$$\Delta\Theta_{SPR} = m(\Delta n) = m(n_{inicial} - n_{final}) \tag{2.20}$$

donde $\Delta\Theta_{min}$ es el desplazamiento del ángulo de resonancia SPR medido y n es el índice de refracción de la solución cerca de la superficie del sensor. Como se muestra esquemáticamente en la **Figura 2.6**, para una región lineal de una curva SPR típica con pendiente M (*porcentaje de intensidad reflejada por grado*), un diferencial de desplazamiento en el ángulo mínimo SPR (Θ_{SPR}) expresado por $d\Theta_{SPR}$ causará un cambio diferencial proporcional en el porcentaje de intensidad de luz reflejada en un ángulo de alto contraste dado Θ_i, dado por

$$dI = Md\Theta_{SPR} \tag{2.21}$$

Para un rango finito de cambio en Θ_{min}, esto se puede expresar como

$$\Delta I = M\Delta\Theta_{SPR} \tag{2.22}$$

La combinación de las ecuaciones *(*2.20*)* y *(*2.22*)* da

$$\Delta I = Mm\Delta n = s\Delta n \tag{2.23}$$

la misma relación proporcional que la ecuación (2.19), con $s = Mm$. La pendiente, s, puede considerarse el factor de sensibilidad para el sistema de microscopio SPR, determinado fácilmente por un gráfico de calibración de ΔI versus índice de refracción en bulto.

2.3.2 Predicción de la respuesta de intensidad del microscopio SPR a la adsorción de película delgada

Ahora, usamos esta proporcionalidad para derivar una relación simple entre el cambio de intensidad medido en la microscopía SPR debido a la adsorción de la disolución líquida sobre la superficie del sensor y el espesor o la cobertura de la película del adsorbato (masa por unidad de área). Anteriormente, se mostró que, en la espectroscopia SPR, el cambio en el ángulo mínimo SPR debido a la adsorción viene dado por

$$\Delta\Theta_{SPR} = m\Delta n_{eff} \tag{2.24}$$

donde m es la pendiente de la gráfica de calibración (ver ecuación (2.20)) utilizada para encontrar el factor de sensibilidad del sistema óptico SPR y el índice de refracción efectivo n_{eff} del material en contacto con la superficie metálica activa del sustrato SPR. La sustitución de la ecuación (2.24) en la ecuación (2.23) da

$$\Delta I = Mm\Delta n_{eff} \ = s\Delta n_{eff} \tag{2.25}$$

Tenga en cuenta que s es la pendiente de la gráfica de calibración de ΔI versus Δn_{eff} medida al monitorear la respuesta del instrumento SPR (intensidad de luz reflejada en un ángulo de alto contraste) a los cambios del índice de refracción en bulto (cuando la adsorción es insignificante), exactamente como se hizo en Figura 2.8. Por lo tanto, medir ΔI permite una medición directa de $\Delta n_{eff} = \Delta I/s$.

Cuando se mide Δn_{eff} en el caso de adsorbato que se adsorbe en la superficie del sensor SPR, se puede usar su valor para determinar el espesor efectivo de la película y la cobertura absoluta ($\mathrm{g/cm^2}$) en la superficie. Sustituyendo en la ecuación (2.25) la expresión en ecuación (2.5) para n_{eff} da

$$\Delta n_{eff} = \frac{\Delta I}{s} = \left(\frac{2}{l_d}\right)\int_0^\infty \Delta n(z)\left[\exp\left(-\frac{2z}{l_d}\right)\right]dz \tag{2.26}$$

donde ΔI es la medición de la intensidad reflejada en ángulo de alto contraste, $\Delta n(z)$ es el cambio en el índice de refracción promediado por área a la distancia z de la superficie, y s es el factor de sensibilidad del microscopio SPR. Para el caso especial de que ΔI se mide entre un tiempo inicial con la superficie en disolución de índice de refracción n_s y sin adsorbato y un tiempo final con una película adsorbida de espesor d (mucho menor que l_d) e índice de refracción n_a, entonces esta integral simplifica para dar

$$\Delta n_{eff} = \frac{\Delta I}{s} = \left(\frac{2}{l_d}\right)(n_a - n_s) \tag{2.27}$$

2.3.3 Estimación del espesor del adsorbato y la cobertura de la superficie a partir de los cambios de intensidad

Para obtener el espesor efectivo de la película adsorbida retomamos el resultado obtenido de n_{eff} para un sistema bicapa en la ecuación (2.6) y lo sustituimos en la ecuación (2.27). De esta manera, el cambio de intensidad será

$$\Delta I = s(n_a - n_s)\left[1 - exp\left(-\frac{2d}{l_d}\right)\right] \tag{2.28}$$

Tomando en cuenta un espesor lo suficientemente pequeño podemos simplificar la expresión (2.28). Obteniendo la ecuación para el espesor efectivo

$$d = \left(\frac{l_d}{2}\right)\left[\frac{\Delta I}{s(n_a - n_s)}\right] \tag{2.29}$$

La ecuación (2.29) también se aplica cada vez que el adsorbato se une a una superficie que fue recubierta previamente con otra película. Cuando la película de adsorbato es rugosa o porosa (por ejemplo, intercalada con solvente), este espesor d se refiere al "espesor efectivo", es decir, el espesor que tendría el mismo número de moléculas de adsorbato por unidad de área si se adsorbe en una película plana de espesor uniforme de adsorbato puro a la misma densidad a la que se refiere el valor n_a.

Capítulo 3

Metodología experimental para inmunoensayos

Los inmunoensayos (IA) desempeñan un papel fundamental en diversos entornos bioanalíticos, como el diagnóstico clínico, el análisis biofarmacéutico, la vigilancia ambiental, la seguridad y las pruebas alimentarias. Durante tres decádas, se ha desarrollado una amplia gama de IA para proporcionar la detección cuantitativa, semicuantitativa o cualitativa de analitos. La detección precisa de analitos en las primeras etapas es un requisito esencial para que todos los entornos bioanalíticos controlen y gestionen de forma eficaz la calidad de los medicamentos biofarmacéuticos, los alimentos y el medio ambiente [38].

Las plataformas de biodetección y diagnóstico con alta sensibilidad, especificidad y tiempo de respuesta rápido se basan en biomoléculas inmovilizadas como anticuerpos (Abs), aptámeros, enzimas, ácidos nucleicos, receptores y células completas para la detección de analitos diana. Dichas biomoléculas de detección deben unirse a la superficie de un transductor de señal con una propiedad química, eléctrica u óptica específica requerida [39]. El evento de reconocimiento biológico genera una señal cuantificable, que se equipara a la cantidad o concentración del analito. Por lo tanto, la inmovilización de biomoléculas juega un papel crucial para lograr una alta sensibilidad y selectividad con una vida útil prolongada del dispositivo. Los materiales del sustrato como electrodos, placas de microtitulación, nanopartículas, nanotubos, grafeno, etc., para la inmovilización de biomoléculas deben modificarse en su superficie mediante grupos funcionales tal que se unan a biomoléculas, alta actividad, buena orientación y excelente estabilidad a largo plazo [40].

El desarrollo de biosensores con diferentes alternativas en su metodología a los sistemas de inmunoanálisis clásicos, se ha llevado a cabo debido a la necesidad de análisis rápidos, con manejo sencillo y bajo costo. A partir de sus inicios, la tecnología en biosensores ha destacado en su aplicación para el inmunoanálisis, de manera que en la actualidad los inmunosensores representan una herramienta muy importante en diversas áreas.

3.1 Biosensores

Un *biosensor electroquímico* se define como un dispositivo integrado autónomo que es capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa específica utilizando un elemento de reconocimiento biológico (receptor bioquímico) que se retiene en contacto espacial directo con un elemento de transducción electroquímica [2].

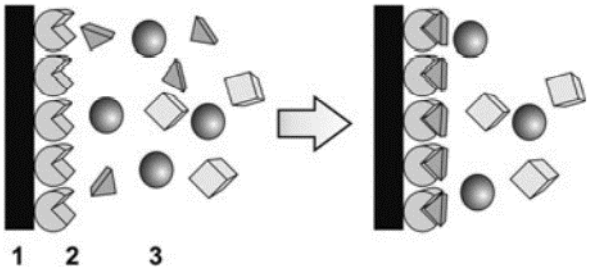

Figura 3.1 Esquema básico de un biosensor. 1) Transductor; 2) Elemento de reconocimiento biológico; 3) Muestra [39].

En la **Figura 3.1** se muestra un esquema general del funcionamiento de un biosensor. Como resultado de la interacción específica entre el analito y el bioreceptor se produce una variación de las propiedades fisicoquímicas en la interfase entre el bioreceptor (2) y el transductor (1), cuya señal se cuantifica mediante un sistema electrónico de adquisición, amplificación y procesado de datos [41-44].

En la fabricación de biosensores se deben considerar diferentes características que incluyen no solo a la elección del transductor y el bioreceptor, sino también al diseño de sistemas fluídicos, la química de inmovilización de biomoléculas en la superficie del sensor, el diseño de los ensayos y el análisis de los datos. La adecuada selección del bioreceptor y del transductor es la tarea más importante para el éxito del desarrollo del dispositivo ya que determina la selectividad y sensibilidad del sensor. La elección del tipo de elemento de reconocimiento determina cuál será la variación en las propiedades fisicoquímicas que ocurran debido a la interacción con el analito, las cuales deben ser aprovechadas óptimamente por el transductor.

3.1.1 Tipo de biosensores

Existe gran variedad de posibles combinaciones entre los elementos de reconocimiento biológico y sistemas de transducción para un biosensor, elegida de acuerdo a la aplicación. Pueden clasificarse según su *i) bioreceptor* y según su *ii) transductor*.
i) Atendiendo al primer criterio de clasificación, pueden distinguirse dos grandes grupos:

- **Biosensores catalíticos***:* Usa como elemento de reconocimiento un biocatalizador que utiliza el analito como sustrato, de forma que tras la unión al mismo se produce una modificación química del analito que hace posible su detección mediante la medida de los cambios fisicoquímicos que tengan lugar durante el proceso catalítico (**Figura 3.2a**). Los bioreceptores que se emplean son células, secciones de tejidos o enzimas [45].
- **Biosensores de afinidad:** Se explota la interacción específica del analito con el elemento de reconocimiento sin la necesidad de transformación catalítica, originando una reacción de equilibrio en la que se forma un complejo analito-bioreceptor. Su especificidad radica en minimizar las interacciones no específicas. Sus mecanismos de transducción se basan en los cambios fisicoquímicos generados por la unión analito-bioreceptor (aumento de masa, modificación de las propiedades ópticas del sustrato o la producción de señales eléctricas). Los principales tipos de biosensores de afinidad son los de ADN (**Figura 3.2b**), donde el elemento bioreceptor son cadenas de oligonucleótidos sintéticas que hibridan por complementariedad con la secuencia a analizar [46], y los inmunosensores que la interacción entre antígeno-anticuerpo (**Figura 3.2c**), donde se usan inmunoensayos para la detección del analito [47].

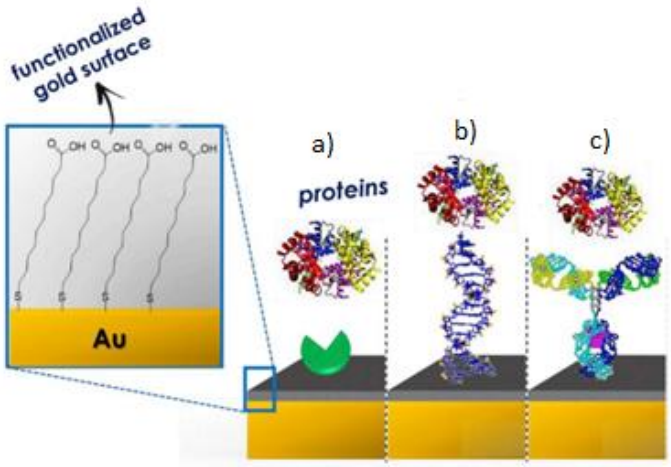

Figura 3.2 Principales tipos de biosensores sobre una superficie de oro funcionalizada con ácido carboxílico en función del bioreceptor empleado: **(a)** Biosensor enzimático. **(b)** Biosensor de ADN. **(c)** Inmunosensor [48].

En la regeneración de este tipo de sensores, debe buscarse que la disociación analito-bioreceptor no alteren la estructura de la molécula utilizada como elemento de reconocimiento.

ii) De acuerdo a su *transductor,* este tipo de biosensores se clasifican en:

- **Biosensores electroquímicos:** El mecanismo de transducción ligado al evento de reconocimiento molecular se basa en el proceso de catálisis, principalmente enzimático, en el que las especies electroquímicas como electrones, iones o compuestos con estados de oxidación variable son consumidos o generados. El cambio electroquímico registrado es proporcional a la concentración del analito que se desea detectar [49].
- **Biosensores Micro/nanomecánicos:** Emplean micropalancas semejantes a los cantiléver del microscopio de fuerzas atómicas (AFM), sobre cuya superficie se inmoviliza el bioreceptor. La interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito produce una respuesta de tipo nanomecánico que consiste en un cambio de la deflexión y/o de la frecuencia de resonancia de la micropalanca [50].
- **Biosensores Ópticos**: Estos tipos de biosensores detectan la interacción biológica midiendo variaciones de las propiedades ópticas de la luz propagada, como intensidad, longitud de onda, índice de refracción o polarización [51], [52]. Los sensores ópticos se pueden dividir en dos tipos: biooptrodos y sensores de ondas evanescentes. En los bio-optrodes se conduce la luz (generalmente con fibra óptica) a la cámara de evaluación donde la interacción biomolecular produce un cambio en las propiedades de la luz (absorción, fluorescencia, índice de refracción, bioluminiscencia o dispersión) [53]. Estos sensores suelen emplear etiquetas ópticas, como tintes o moléculas fluorescentes. Por otro lado, los biosensores de ondas evanescentes explotan la posibilidad del confinamiento de las ondas electromagnéticas (EM) en ciertos dieléctricos y / o metales, lo que puede resultar en un modo EM localizado o propagado (**Figura 3.3**) [54]. Parte del modo EM penetra en el medio externo, formando el campo evanescente. El campo evanescente actúa como una sonda para detectar cambios en el índice de refracción (RI, por sus siglas en inglés) causados, por ejemplo, por una interacción biológica, de modo que no se requiere ninguna etiqueta para la detección. Los interferómetros, resonadores o biosensores plasmónicos son ejemplos típicos de biosensores de ondas evanescentes [55], [56]. Estos dispositivos alcanzan una alta sensibilidad de detección con un tiempo de respuesta corto, no sufren interferencias electromagnéticas o mecánicas y presentan una potencial capacidad de miniaturización. El trabajo desarrollado durante esta tesis de maestría se ha basado en la simulación de la biofuncionalización de este último tipo de biosensor con anticuerpos, para su uso como inmunosensor en distintas aplicaciones, por lo que en el siguiente apartado se describirá en detalle el funcionamiento del dispositivo.

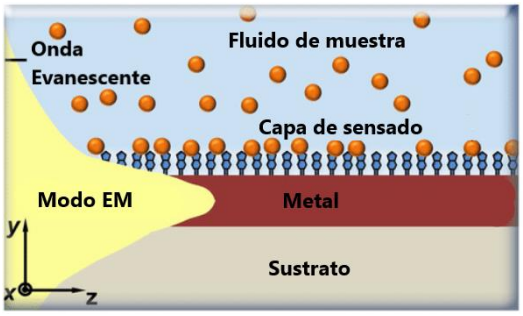

Figura 3.3 Esquema del principio de detección de un biosensor de ondas evanescentes [57].

3.1.2 Inmunosensores de Resonancia de Plasmón Superficial

Desde la introducción de sensores refractométricos basados en SPR por Nylander y Liedberg [58] hace más de tres décadas, el interés en la detección plasmónica ha aumentado enormemente. Los biosensores SPR son en la actualidad los sensores ópticos libres de etiqueta más utilizados y comercializados, convirtiéndose en una herramienta muy extendida para el estudio de cualquier tipo de interacciones bioquímicas. La detección SPR muestra excelentes propiedades para su aplicación en diferentes campos, como monitoreo ambiental, análisis de calidad y seguridad alimentaria, diagnóstico y biomedicina, ingeniería biológica, descubrimiento de fármacos, entre otras [59].

El biosensor SPR se basa en la propagación de polaritones de plasmón de superficie (SPP), ondas electromagnéticas que ocurren en la interfaz entre una película delgada de metal y un dieléctrico que se comporta como un plasma de electrones casi libres, generando un campo evanescente (**Figura 3.4a**). Como se mencionó en el Capítulo 1, el SPP es un modo magnético transversal (TM) (el vector magnético es perpendicular a la dirección de propagación de la onda y paralelo al plano de la interfaz) y se caracteriza por una distribución de campo evanescente y su vector de propagación (1.132), la cual la reescribiremos de la siguiente manera:

$$\beta = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} \tag{3.1}$$

En esta ecuación, ε_m representa la función dieléctrica compleja y dependiente de la frecuencia para el metal ($\varepsilon_m = \varepsilon_{1m} + i\varepsilon_{2m}$) y ε_d es la constante dieléctrica del medio. Este constituye el principio fundamental de las plataformas de detección refractométrica. Las interacciones bioquímicas que ocurren en las proximidades de la interfaz metal-dieléctrico inducen cambios en el RI que alteran la condición de propagación del SP.

Estos cambios se pueden rastrear en tiempo real proporcionando una señal medible y cuantificable sin la necesidad de etiquetado.

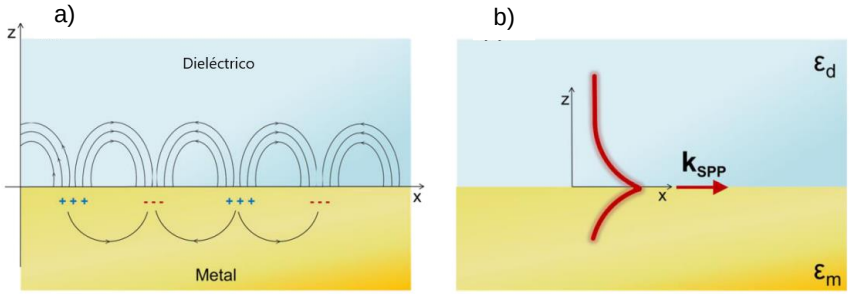

Figura 3.4 Esquemas de un SPP en la interfaz de un metal y un dieléctrico que muestran: (a) la oscilación de carga colectiva en la superficie y (b) la distribución transversal del campo evanescente [4].

Para la excitación y propagación de SPP, la parte real de ε_m debe ser negativa y su valor absoluto menor que ε_d. En longitudes de onda ópticas, esta condición se cumple para varios metales, de los cuales el oro, la plata o el aluminio son los más utilizados en biosensores plasmónicos.

El campo evanescente del SPP está confinado en la interfaz metal-dieléctrico y disminuye exponencialmente en ambos medios (**Figura 3.4b**). Ya que el campo electromagnético evanescente decae en el medio dieléctrico con una longitud de decaimiento característica de ~25-50% de la longitud de onda de la luz, este campo muestra una profundidad de penetración típica entre 100-500 nm cuando se trabaja en regiones visibles o infrarrojas cercanas. Esto es particularmente importante para la detección de SPR, ya que representa la sonda de profundidad en sensores ópticos que utilizan SPP. Esto significa que solo las interacciones biomoleculares que ocurren en la superficie del metal y dentro de la profundidad de penetración del campo evanescente producirían cambios en el RI y podrían detectarse.

La excitación del SPR se logra acoplando una onda de luz a los plasmones superficiales solo si el componente del vector de onda de la luz paralelo a la interfaz coincide con el vector de propagación del SPP, como se expresó en la ecuación (1.160). Generalmente, el vector de propagación SPP es considerablemente mayor que el número de onda de la onda de luz en el dieléctrico, por lo tanto, los plasmones de superficie no pueden excitarse mediante iluminación directa. Se pueden emplear varias técnicas para mejorar el vector de onda de la luz entrante mediante a) acoplamiento de prisma, b) acoplamiento de guía de onda y c) acoplamiento de rejilla (**Figura 3.5**) [60].

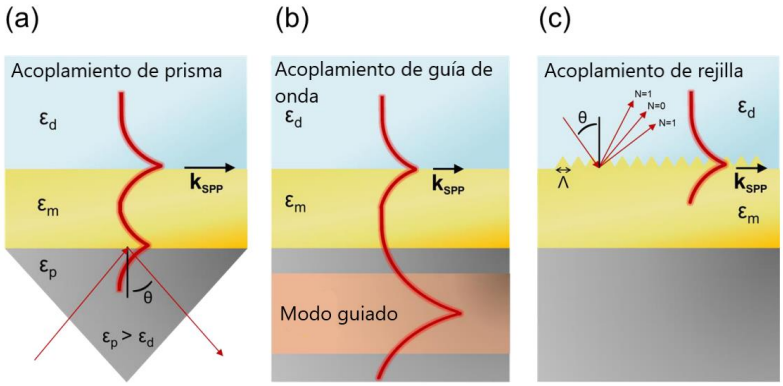

Figura 3.5 Métodos de acoplamiento SPR, que incluyen (a) una configuración de Kretschmann acoplado a prisma, (b) acoplamiento de guía de onda y (c) acoplamiento de rejilla [4].

Los acopladores de prismas son el método más común utilizado para la excitación óptica de plasmones de superficie. En la conocida configuración de Kretschmann (**Figura 3.5a**) [14], la luz pasa a través de un prisma de RI alto (ε_p) y se refleja totalmente en la base del prisma, generando una onda evanescente que penetra en la película metálica. Esta onda evanescente se propaga a lo largo de la interfaz con un cierto vector de propagación que se puede ajustar para que coincida con el del SPP controlando el ángulo de incidencia. Este método se conoce como método de reflexión total atenuada (ATR) [61].

De manera similar, el proceso de excitación de SPP se puede lograr utilizando una estructura SPR basada en guías de ondas ópticas [62]. La onda de luz es guiada por una guía de ondas ópticas y, al entrar en la región con una fina capa de metal, penetra evanescente a través de la capa de metal excitando un SPP en su interfaz exterior (**Figura 3.5b**).

La excitación mediante acopladores de rejilla se basa en la difracción de la onda de luz. La componente del vector de onda de las ondas difractadas paralelas a la interfaz se incrementa en una cantidad inversamente proporcional al período de la red y puede coincidir con la del SPP (**Figura 3.5c**)

La SPR se caracteriza por la aparición de una caída de reflectividad espectral, que depende en gran medida del índice de refracción del dieléctrico, pero también de las propiedades de la película metálica. Aunque la plata ha mostrado una excitación SPR más eficiente (es decir, picos más profundos y agudos) y es bastante versátil para la funcionalización, también es muy susceptible a la oxidación de la superficie al exponerse a la atmósfera o entornos acuosos líquidos. Por lo tanto, la biofuncionalización y el rendimiento del ensayo se vuelven más complicados y requieren una protección cuidadosa de la superficie y condiciones precisas de análisis para evitar o minimizar la degradación. Por el contrario, el oro es muy resistente a la oxidación y a otros contaminantes atmosféricos y puede modificarse fácilmente para los procedimientos de

biofuncionalización de la superficie (por ejemplo, química de tiol-oro) [4]. Esto hace que el oro sea el metal más práctico y eficiente para los biosensores SPR. El grosor de la película de oro también es un factor determinante. Para las configuraciones de Kretschmann en particular, el espesor debe ser de alrededor de 50 nm. Por encima de este espesor, la caída de la luz reflectante se vuelve superficial, mientras que por debajo de 50 nm el pico se vuelve más ancho, empeorando la sensibilidad del biosensor [63]. Un biosensor SPR generalmente consiste en un sistema óptico para la excitación e interrogación de SPP en propagación, es decir, la fuente de luz (ya sea monocromática o de banda ancha) y el detector (basado en intensidad o fase); el transductor plasmónico, que suele estar formado por una fina película (≈ 50 nm) de oro que incorpora el elemento de reconocimiento biomolecular en su superficie; y un sistema fluídico que comprende una o más celdas de flujo para el confinamiento de la muestra en la superficie de detección y sistemas de suministro de flujo para la inyección y el suministro de la muestra. La **Figura 3.6** ilustra un biosensor SPR típico que emplea una configuración de Kretschmann. En este esquema particular, la excitación SPP se puede lograr mediante modulación de longitud de onda de luz (λ) o modulación de ángulo de incidencia (θ) [64].

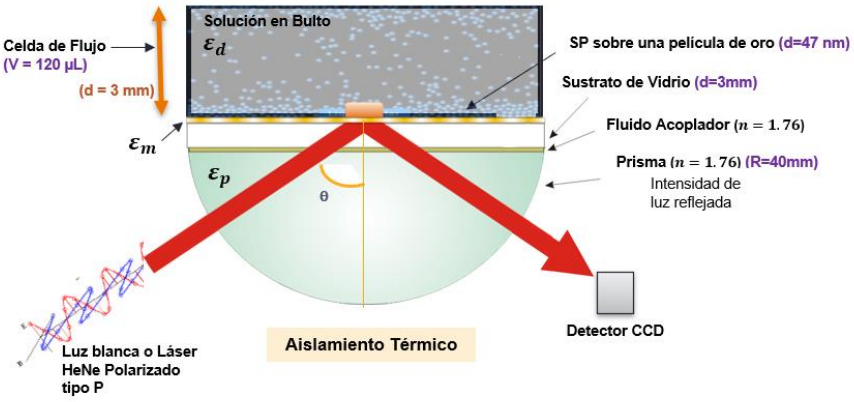

Figura 3.6 Esquema de un biosensor SPR que emplea una configuración de Kretschmann con una fuente de luz.

Cuando se trabaja con una fuente monocromática, la luz reflejada se mide en función del ángulo θ. En cierto ángulo denotado como θ_{TIR}, se establece el fenómeno TIR. A medida que aumenta el ángulo, la intensidad reflejada exhibe una fuerte disminución, hasta que se alcanza un valor mínimo. Es en este ángulo (θ_{SPR}), donde el vector de onda de luz coincide con el vector de onda SPP, cediendo a la excitación del SPP. Cuando tiene lugar una interacción biomolecular dentro del campo evanescente del SPP, se induce un cambio de RI local que altera el vector de onda del SPP y su condición de excitación. Los cambios en el SPP se pueden observar como cambios en

las características de la luz. Estos pueden detectarse mediante el monitoreo dependiente del tiempo de toda la curva, o fijando θ en el punto donde se maximiza la pendiente de la curva de resonancia SPP, después de lo cual se monitorean los cambios de intensidad de la luz reflejada en función del tiempo (**Figura 3.7 a** y **c**).

Por otro lado, cuando se ilumina con una fuente de luz de banda ancha (CW laser) en un θ fijo, la detección se realiza mediante análisis espectral de la luz reflejada. El espectro de reflectividad muestra una caída ubicada en λ_{SPR}, que está sujeta a desplazamientos laterales (espectrales) inducidos por cambios de RI. La medición espectral de λ_{SPR} traduce los cambios de RI en una cantidad detectable que se puede extraer en función del tiempo (**Figura 3.7 b** y **d**). Trabajando en cualquiera de los dos esquemas, las interacciones bioquímicas se pueden monitorear directamente en tiempo real, lo que permite la evaluación de los estudios de afinidad y cinética de una manera simple, rápida y sin etiquetas.

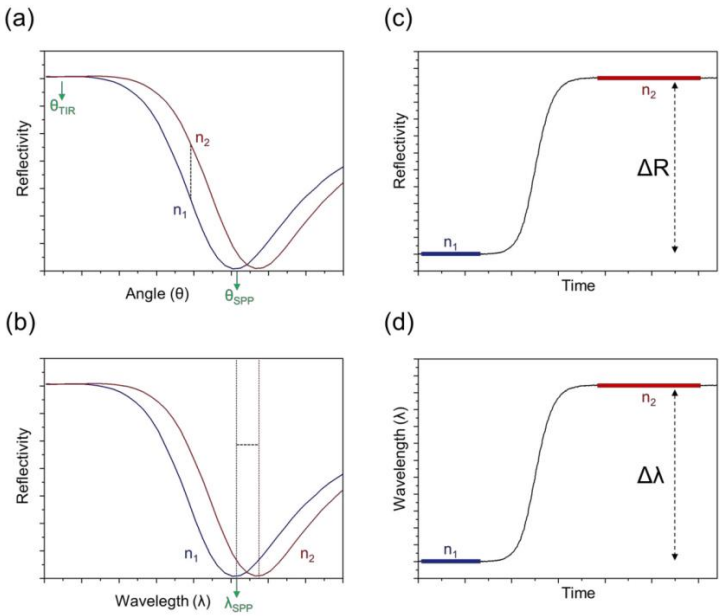

Figura 3.7 Curvas SPR representativas para sensores SPR. Reflectividad contra (a) θ y (b) λ, junto con su correspondiente seguimiento en tiempo real de los desplazamientos de las curvas mediante el monitoreo de (c) cambios de la reflectividad, R, y (d) cambios de la longitud de onda de resonancia, λ_{SPR} [4].

3.2 Selección de Bioreceptor

En los biosensores SPR los inmunoreactivos se inmovilizan en un soporte sólido, tal que la interacción tiene lugar en la interfase sólido-líquida. Los tipos de ensayo que acostumbran a utilizarse en dichos sensores son los formatos no competitivos directo e indirecto (tipo sándwich), y el formato competitivo [65]. La base del formato no

competitivo es la inmovilización de un anticuerpo con el que se lleva cabo la detección directa del analito una vez que se produce la unión entre los dos. El formato sándwich es usado en los inmunosensores para la amplificación de la respuesta obtenida en la detección del analito por medio del ensayo directo. El último formato es el competitivo, el cual es utilizado a menudo en el diseño de los inmunosensores SPR. En esta clase de ensayo se inmoviliza el analito o un similar al mismo, y la muestra a examinar se incuba con una concentración de anticuerpo anteriormente definida. La existencia del analito en la muestra inhibe la interacción del anticuerpo al analito inmovilizado en el área del sensor, por lo cual la señal del SPR es inversamente proporcional a la concentración de analito.

La prevención de la adsorción inespecífica de otras moléculas sobre el área sensora es importante, y cobra particular trascendencia una vez que se labora con muestras reales de procedencia biomédico o medioambiental, donde un analito en bajas concentraciones ha de ser detectado en una mezcla de diversos compuestos de mayor concentración. Dichos cuatro componentes limitan la funcionalidad del área sensora y con ello la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del inmunosensor. Exceptuando la prevención de uniones inespecíficas, similarmente crítica en el proceso de inmovilización del anticuerpo y del antígeno, lo demás de componentes que condicionan el éxito del inmunoensayo son en especial relevantes una vez que se inmoviliza el anticuerpo en vez del antígeno. La probable variación estructural de la molécula es más crítica en la situación del anticuerpo, pues la pérdida de actividad biológica del mismo afecta de manera directa en su capacidad de unión al analito, por lo cual tiene un efecto directo sobre la sensibilidad del inmunosensor. Por otro lado, el gran tamaño del anticuerpo es responsable de que el fenómeno de impedimento estérico entre moléculas durante su inmovilización se manifieste en mayor medida en este caso.

Gracias a la importante influencia de los componentes descritos sobre la eficiencia de la inmovilización de anticuerpos, la elección de un procedimiento de inmovilización correcto con el que se consiga una alta densidad de anticuerpos de manera correcta orientados, que preserve la funcionalidad de los mismos, y que minimice el impacto del impedimento estérico entre moléculas, es un desafío en el desarrollo de inmunosensores basados en anticuerpos como bioreceptores.

3.2.1 Métodos de inmovilización de anticuerpos en superficies de Au

Por convención la inmovilización de los anticuerpos sobre un área sensora se ha hecho por medio de la adsorción física de la molécula o por medio de la unión covalente de la

misma a la superficie anteriormente modificada químicamente. En la situación de la unión covalente, el anticuerpo se ha inmovilizado, bien por medio la formación de una matriz de dos dimensiones, por medio de monocapas autoensambladas, o bien mediante una matriz tridimensional, principalmente utilizando hidrogeles de dextrano carboximetilado [66].

El área de oro limpia muestra una enorme tendencia a la adsorción y desnaturalización de las proteínas, por lo cual el manejo generalizado de la fisisorción del anticuerpo como procedimiento de inmovilización a pesar del efecto que la desnaturalización del mismo logre tener sobre la sensibilidad del inmunosensor, se debería a su velocidad y simplicidad, debido a que no necesita que el área sea modificada antes y la unión ocurre de manera directa por medio de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Sin embargo, gracias a la inespecificidad de la unión esta resulta débil y, por consiguiente, poco estable frente a variaciones de pH, temperatura, fuerza iónica o frente a la naturaleza química del microambiente, por lo cual la pérdida de anticuerpo inmovilizado se crea con facilidad, reduciendo de manera considerable la reproducibilidad del inmunosensor. Por otro lado, el poco control sobre el proceso de inmovilización que caracteriza a esta táctica conduce a una orientación al azar del anticuerpo y a una posible formación de multicapas, lo cual disminuye no solo la reproducibilidad, sino además la sensibilidad final.

Los inconvenientes de la inmovilización del anticuerpo por medio de fisisorción se han superado con el avance de la técnica basada en el autoensamblaje de moléculas alquílicas con un conjunto tiol (R−SH) en un extremo sobre el área de oro, la cual permitió inmovilizar los anticuerpos de manera covalente. La formación espontánea de monocapas de moléculas tioladas, conocidas como SAMs, está dirigida primordialmente por la coordinación entre los tioles o disulfuros y el oro, acompañada de interrelaciones de fuerzas de Van der Waals en medio de las cadenas alquílicas [67]. Las moléculas se disponen de manera drásticamente ordenada, y orientadas sobre el área sensora con un ángulo de inclinación aproximado de 30º (**Figura 3.8**), dando sitio a monocapas uniformes y compactas. A partir de que la formación de las SAMs ha sido descrita por primera vez por Nuzzo y Allara en 1983 [68], las monocapas de tioles sobre oro, en especial alcanotioles, son el sistema autoorganizado más ampliamente estudiado. El hecho de usar SAMs mixtas formadas por un alcanotiol con un conjunto reactivo, diluido con uno que muestra un conjunto servible inerte, posibilita mantener el control de la densidad de puntos de vista de alianza del anticuerpo a el área [69]–[71]. Además, el uso de SAMs mixtas, en especial las formadas por alcanotioles de cadena extensa para el anclaje del anticuerpo, e hidroxialcanotioles ($HS-(CH_2)_m-OH$) de cadena corta como molécula espaciadora, demostró que se incrementa la prevención de la

desnaturalización de proteínas y de las interrelaciones inespecíficas, comparativamente con las SAMs compuestas por un exclusivo tiol [72], [73].

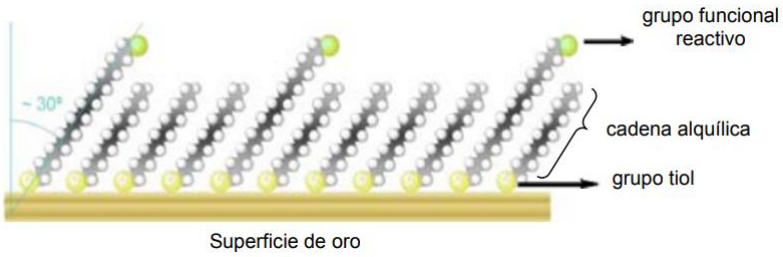

Figura 3.8 Representación gráfica de una SAM mixta sobre una superficie de oro [20].

La elaboración de capas estables, con una densidad controlada, evitando la formación de multicapas y consiguiendo de esta forma construcciones más reproducibles, son las primordiales ventajas que muestra la inmovilización covalente del anticuerpo. El proceso de la unión covalente principalmente se desarrolla mediante la formación de un enlace entre los equipos electrofílicos como carboxilos y aldehídos en el área, y los conjuntos nucleofílicos, como aminos o tioles, presentes en los aminoácidos de la molécula de anticuerpo. La vía de inmovilización más común usa el enlace carboxilo-amino, y obtiene el nombre de acoplamiento amino. La reacción se apoya en la activación del ácido carboxílico terminal del alcanotiol de la SAM por medio de carbodiimida (EDC) cartacterizado por el grupo funcional (RN=C=NR) y N-Hidroxisuccinimida (NHS, $(CH_2CO)_2NOH$), lo cual da sitio a la formación de un compuesto intermediario que reacciona con un grupo amino del anticuerpo estableciéndose la unión covalente del mismo al alcanotiol (**Figura 3.9**) [74].

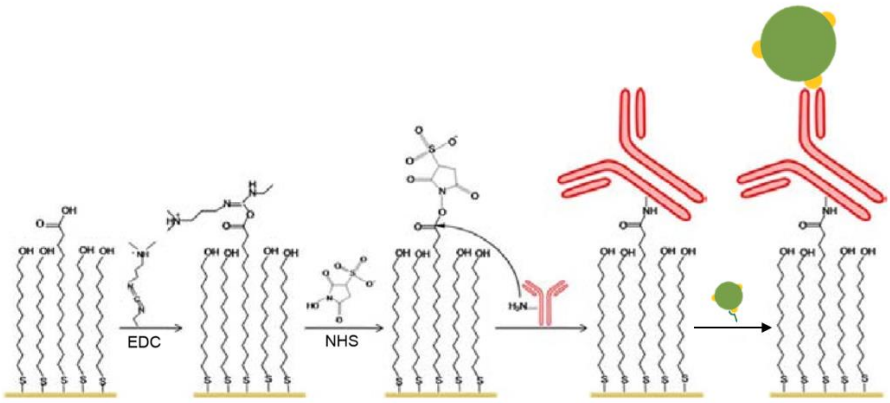

Figura 3.9 Representación esquemática del proceso de inmovilización covalente (acoplamiento amino) del anticuerpo y posteriormente de la interacción anticuerpo-antígeno.

Además de prevenir el impedimento estérico entre moléculas de anticuerpo, las SAM mixtas en las que el alcanotiol reactivo se diluye con un hidroxialcanotiol de cadena más corta han demostrado su eficiencia en la prevención de la desnaturalización de proteínas

y la fisisorción de las mismas durante el proceso de inmovilización [20]. Por esto motivo en este trabajo se han escogido el ácido mercaptoundecanoico (MUA), como molécula funcional, y junto con una molécula de menor tamaño, por ejemplo 8-Mercapto-1-octanol ($HS-CH_2(CH2)_6CH_2-OH$), como molécula espaciadora se formaría una SAM mixta experimentalmente.

3.2.2 Anticuerpos y antígenos

Los anticuerpos (Ab) son glicoproteínas pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas (Ig) que son producidas por las células B en el plasma y utilizadas por el sistema inmunológico de los vertebrados para identificar y neutralizar agentes extraños en el cuerpo, conocidos como antígenos [44]. La estructura básica de un anticuerpo se describe en la **Figura 3.10**. Un anticuerpo es una molécula en forma de Y que presenta cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) con pesos moleculares de 50 kDa y dos cadenas ligeras (L) con pesos moleculares de 25 kDa, unidas por enlaces disulfuro. Las cadenas tienen regiones tanto constantes (C) como variables (V). El reconocimiento de antígenos está mediado por los dominios variables ligeros (V_L) y pesados (V_H), conocidos como región Fab (fragmento de unión al antígeno), situada en los brazos de la Y. La base de la Y está compuesta por dominios constantes de las dos cadenas H. Esta región se denomina región Fc (fragmento cristalizable) y desempeña un papel en la actividad de las células inmunitarias, asegurando que cada anticuerpo genere una respuesta inmunitaria adecuada para un antígeno determinado, uniéndose a una clase específica de receptores Fc y otras moléculas inmunes [43].

Las dimensiones moleculares estimadas de los anticuerpos son 15 x 7 x 3,5 nm (aunque las inmunoglobulinas son muy flexibles) [75]. En células de mamíferos, existen cinco clases de inmunoglobulinas que se distinguen por sus cadenas pesadas: IgA, IgD, IgG, IgM y IgE. La IgA forma una molécula de dímero y se encuentra principalmente en áreas mucosas (p. Ej., Intestino, vías respiratorias o vías urogenitales). Previene la colonización por patógenos extraños [76]. La IgD y la IgM están relacionadas con el mecanismo de respuesta inmunológica: la IgD actúa como receptor de antígeno en las células B y activa a los basófilos y mastocitos; a su vez, la IgM es secretada por las células B formando una molécula pentamérica para eliminar patógenos en las primeras etapas de la respuesta humoral [77]. La IgE es el anticuerpo involucrado en los procesos alérgicos; se une a los alérgenos y desencadena la liberación de histamina de los mastocitos y basófilos. Finalmente, la IgG es la clase predominante de anticuerpos producidos durante la respuesta inmune madura, siendo el único isotipo capaz de atravesar la placenta para otorgar inmunidad pasiva al feto. La IgG proporciona la mayor

parte de la inmunidad basada en anticuerpos contra patógenos y, por lo tanto, es la más estudiada y empleada en biociencias [78].

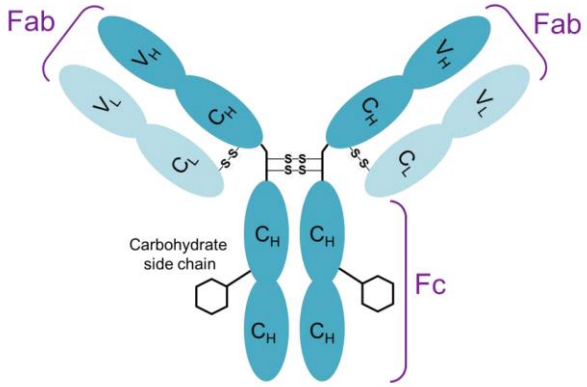

Figura 3.10 Estructura básica de un anticuerpo [4].

Debido a la excepcional afinidad y especificidad por la unión de antígenos junto con el importante papel en la respuesta inmune humana, los anticuerpos se utilizan ampliamente en el campo biomédico, ya sea como elementos de biorreconocimiento para análisis inmunoquímicos o como biomarcadores clínicos para diagnóstico.

3.2.2.1 Anticuerpos como elementos de biorreconocimiento

Las técnicas inmunoquímicas abarcan todas aquellas metodologías analíticas que implican la interacción entre un anticuerpo específico y su molécula objetivo. Entre ellos, los inmunoensayos son la técnica más utilizada para determinar la presencia de un analito en una muestra de forma cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa.

En la investigación de biosensores, los anticuerpos se consideran los elementos de bioreconocimiento de referencia y se utilizan para innumerables aplicaciones en el campo clínico, pero también en el monitoreo ambiental, el descubrimiento de fármacos, la seguridad alimentaria, etc. capacidades de reconocimiento de anticuerpos (es decir, afinidad y especificidad) pero para desarrollar nuevas técnicas de conjugación, marcaje o inmovilización que mejoren la detectabilidad y maximicen la reproducibilidad y precisión del análisis.

Debido a la importancia de los anticuerpos en el área de biosensores se ha escogido trabajar con tres diferentes anticuerpos y su correspondiente antígeno, como lo es la proteína albúmina de suero bovino (BSA), albúmina de suero humano (HSA) y la proteína IgG humana (anticuerpo IgG1 b12 humano para el reconocimiento del VIH).

Capítulo 4

4. Resultados y discusiones

En este capítulo mostramos los resultados y discusiones de las simulaciones computacionales realizadas para la curva de reflectancia vs ángulo para un sistema SPR con una película nanométrica de oro para la detección de interacciones antígeno-anticuerpo en un biosensor SPR convencional. Se muestra el protocolo de funcionalización propuesto para el óptimo anclado covalente de proteínas en la superficie de oro del biosensor, así como su respectivo modelo teórico-computacional para cada etapa de dicha funcionalización. Posteriormente, se muestra la optimización geométrica obtenida en el software Avogadro de las diferentes moléculas utilizadas para simular el sistema multicapa SPR, con el fin de obtener sus características físicas necesarias para la correcta representación del biosensor en el modelo teórico de Fresnel mostrado en el Capítulo 1. Asimismo, se expone los resultados obtenidos con el software Autodock de las predicciones en las conformaciones de unión de ligando a proteína óptimas, necesarias para conseguir los sitios de unión entre las moléculas de anclaje a la superficie de oro y las proteínas bioreceptoras en el sensor. Por último, se analizan las curvas SPR obtenidas en los biosensores con proteínas ligando BSA, HSA e IgG1 b12 humano en superficies funcionalizadas SPR y su interacción con otra proteína contenida en el soluto (anti-BSA, anti-HSA y anti-HIgG).

4.1 Introducción al Docking Molecular y a la Optimización Geométrica Molecular

La optimización geométrica de una molécula y las interacciones de las proteínas con ligandos, otras proteínas o superficies están controladas por una serie compleja de interacciones intermoleculares. Tales interacciones dependen tanto de las interacciones específicas en el sitio de unión como de las fuerzas no específicas fuera del sitio de unión. Esta interacción de fuerzas específicas y no específicas controla todas las interacciones de proteínas que van desde las colisiones bimoleculares en disoluciones hasta la adhesión entre células. La complejidad de las interacciones entre proteínas y moléculas diana flexibles, incluidas otras proteínas, ácidos nucleicos y moléculas

pequeñas, a menudo está determinada por la considerable flexibilidad de los sitios de unión a proteínas y por los reordenamientos estructurales que se producen al unirse la molécula asociada [4].

Un objetivo de muchos estudios biofísicos es determinar las fuerzas moleculares que controlan las interacciones biológicas y utilizar esta información para manipular racionalmente la función de la proteína modificando la proteína, el ligando que interactúa o ambos. Las fuerzas que controlan el comportamiento de las proteínas y sus orígenes físico-químicos se infieren a partir de medidas cinéticas de unión en equilibrio o se calculan con modelos moleculares. Las energías calculadas se utilizan para identificar el papel de las interacciones físicas y químicas en la función y el comportamiento de las proteínas. Aunque los cálculos detallados son factibles para moléculas pequeñas, tales cálculos se vuelven desmedidos a medida que aumentan el tamaño y la complejidad de las macromoléculas biológicas. Las fuerzas dependientes del tiempo entre especies blandas o móviles añaden otro grado de complejidad, mientras que los modelos estáticos de interacciones no describen la gama completa de parámetros que influyen en el comportamiento biológico.

Se utilizan predicciones de la estructura computacional de complejos ligando-proteína mediante métodos de acoplamiento, como DOCK, FLEXx y GOLD [79]–[81], en combinación con funciones de puntuación empíricas. para predecir las orientaciones de los ligandos en los sitios de unión y las afinidades de unión de los ligandos a las proteínas. Si bien las geometrías de enlace dependen de los métodos de acoplamiento, las estimaciones de energía de enlace dependen en gran medida de las funciones potenciales utilizadas para calcularlas. Los potenciales basados en el conocimiento siguen reglas basadas en el análisis estadístico de afinidades y geometrías de unión de complejos proteína-ligando determinados experimentalmente. Estas reglas se convierten en "pseudo-potenciales" que luego se aplican para valorar orientaciones de ligandos generadas por computadora [82], [83]. Una de las principales preocupaciones con estos métodos es que solo pueden seleccionar aquellas orientaciones que se han observado en las estructuras cristalinas utilizadas para derivar el potencial.

Las funciones de puntuación basadas en regresión estiman las afinidades de unión sumando términos de interacción derivados de los parámetros estructurales ponderados de los complejos. Los pesos se asignan mediante métodos de regresión ajustando afinidades predichas y determinadas experimentalmente a un conjunto dado de complejos de entrenamiento [84]. Una preocupación con estos métodos es la dependencia del tamaño, la composición y la generalidad del conjunto de entrenamiento utilizado para derivar los pesos [85]. Además, tales métodos solo pueden interpolar y, por lo tanto, no pueden identificar nuevos andamios moleculares que no están presentes

en el conjunto de entrenamiento. Sin embargo, las mejoras en los métodos basados en la regresión han contribuido a algunos ejemplos alentadores que demuestran el potencial de tales técnicas [86].

Los enfoques basados en el primer principio también se aproximan a la energía libre de enlace sumando las contribuciones individuales de diferentes interacciones. Sin embargo, los términos de energía individual se derivan de la teoría físico-química y no se determinan por ajuste a afinidades experimentales. En la mayoría de los casos, las contribuciones de la mecánica molecular en fase gaseosa se combinan con energías libres de solvatación. La evaluación de la energía de solvatación es un desafío tanto en términos de demandas computacionales como de precisión [87]. Los métodos utilizados para calcular la solvatación incluyen métodos de solventes implícitos como Poisson-Boltzmann y métodos de Born generalizados de superficie [88]. Los cálculos de energía de la fase gaseosa dependen del tipo de campo de fuerza, por ejemplo, los paquetes de dinámica molecular AMBER, CHARMM, DRIEDING [89], [90]. Los enfoques basados en el primer principio a menudo calculan el orden correcto de las energías libres de enlace, pero los números generalmente exceden los valores experimentales de manera significativa.

La flexibilidad de las proteínas y la dinámica de las interfaces intermoleculares pueden regular la afinidad de unión y la especificidad en el reconocimiento molecular. Se ha sugerido que la estabilidad estructural y la flexibilidad durante el reconocimiento molecular están asociadas con la dureza del escenario de energía de enlace subyacente y pueden estar relacionadas con varias funciones, como la especificidad o la permisividad en el reconocimiento. Sin embargo, predecir las subestructuras correctas de los complejos proteína-ligando es extremadamente difícil, especialmente en los casos en los que se desconoce el sitio de unión de una proteína flexible. Los enfoques jerárquicos que incorporan flexibilidades tanto de ligando como de proteína han contribuido al progreso reciente en el acoplamiento ligando-proteína. Dichos procedimientos incluyen enfoques de acoplamiento de múltiples etapas y una jerarquía de funciones energéticas que tienen como objetivo capturar las sutilezas de la flexibilidad de las proteínas en la unión del ligando.

El método de unión de ligando virtual, usado en esta tesis, utiliza un acoplamiento de ligando flexible utilizando el software DOCK 4.0 como una búsqueda de grano grueso seguida de una dinámica de grano fino basada en los primeros principios. Una ventaja de usar DOCK 4.0 es que su esquema de reconstrucción de ligando basado en fragmentos puede generar efectivamente una gran cantidad de conformaciones de ligando en muy poco tiempo utilizando una función de puntuación rápida, basada en interacciones de Van der Waals y de Coulomb.

4.2 Optimización geométrica de las moléculas usadas en la prefuncionalización del arreglo SPR.

En esta tesis llamaremos prefuncionalización a las primeras tres etapas de funcionalización del sensor SPR propuesto en el Capítulo 3 (**Figura 3.9**), antes de anclar la proteína receptora del antígeno. La prefuncionalización consiste primeramente en el autoensamblaje de moléculas alquílicas con un grupo tiol en un extremo sobre la superficie de oro, como antes se ha mencionado, en esta tesis se usará el alcanotiol ácido mercaptoundecanoico (MUA) en la primera etapa de la prefuncionalización. Seguido de esto, para dar lugar a la interacción entre el grupo carboxilo de la molécula MUA y el grupo amino del anticuerpo, se realizan la segunda y tercera etapa para la activación del grupo carboxilo de la molécula MUA mediante las moléculas 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), mayormente conocida como carbodiimida, y por N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS), como se muestra en la **Figura 4.1**.

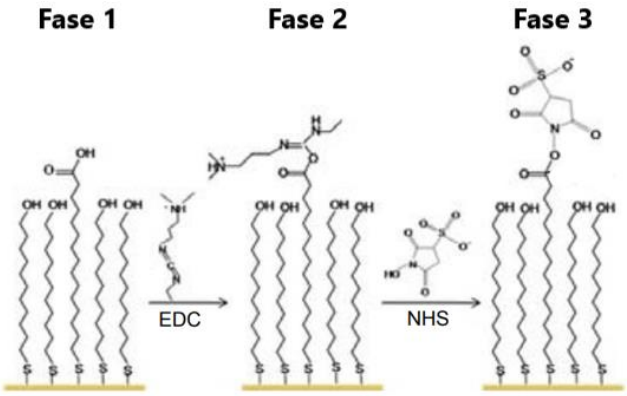

Figura 4.1 Representación esquemática del proceso de prefuncionalización del sensor. Primeras tres fases antes del acoplamiento amino con el anticuerpo. Fase 1: Anclaje con molécula MUA. Fase 2: Interacción entre MUA y EDC. Fase 3: Interacción entre MUA y Sulfo-NHS.

En la Sección 1.7 de esta tesis se mostró el modelo multicapas para predecir las curvas del sensor SPR en el que podemos notar que un parámetro indispensable para la obtención de este resultado es el espesor de la monocapa adsorbida sobre la película de oro, es por lo que es indispensable obtener el tamaño de las moléculas adsorbidas. Para la obtención de estos parámetros se ha realizado optimizaciones geométricas de las diferentes moléculas en el proceso de prefuncionalización. Esto fue mediante el software libre Avogadro Chemistry, el cual es un visualizador y editor de moléculas avanzado diseñado para uso multiplataforma en química computacional, modelado molecular, bioinformática, ciencia de materiales y áreas relacionadas. Nos ofrece una representación flexible de alta calidad, una potente arquitectura de complementos y la

posibilidad de obtener la configuración más probable de moléculas pequeñas a través de la Mecánica Molecular utilizando campos de fuerza como son UFF, GAFF, MMFF94, entre otros.

En estos campos de fuerza populares, mencionados anteriormente, la energía potencial se da en una fórmula analítica. La energía potencial en el campo de fuerza Mecánica Molecular se puede escribir como [91]:

$$E_{MM} = E_{bond} + E_{ang} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{ele} + E_{cross} \quad (4.1)$$

donde E_{bond} es la energía de enlace entre átomos. E_{ang} es la energía de flexión del ángulo entre dos átomos unidos a un tercer átomo. E_{tors} es la energía asociada con el movimiento de rotación de los enlaces. E_{vdw} describe la energía combinada de repulsión y dispersión interacciones de Van der Waals entre dos átomos. E_{ele} representa la energía en el sistema debido a interacciones electrostáticas. E_{cross} representa un efecto híbrido de términos de energía de acoplamiento.

La simulación fue realizada bajo el campo de fuerza MMFF94 ya que este es particularmente apropiado para compuestos orgánicos como lo son los alcanos, alcoholes, tioles, ácidos carboxílicos, disulfuros, aminos, entre otros. Este campo de fuerza también agrega cargas electrostáticas y enlaces de hidrógeno.

4.2.1 Optimización geométrica de la molécula ácido mercaptoundecanoico.

La primera fase de la prefuncionalización del sensor consiste en el anclaje de la molécula 11-MUA en la superficie de la película de oro del sensor, por lo tanto, para determinar los parámetros de interés es necesario simular la configuración geométrica de dicha molécula para un correcto análisis del sensor multicapas a base del sistema SPR: La serie de pasos que se llevaron a cabo para la simulación en Avogadro Chemistry para la obtención de la configuración más probable de la molécula 11-MUA se ilustran en el diagrama de flujo de la **Figura 4.2**.

La simulación fue realizada bajo el campo de fuerza MMFF94 ya que este es particularmente apropiado para compuestos orgánicos como lo son los alcanos, alcoholes, tioles, ácidos carboxílicos, disulfuros, aminos, entre otros. Este campo de fuerza también agrega cargas electrostáticas y enlaces de hidrógeno, las cuales se muestran a continuación.

Los cálculos computacionales para la optimización geométrica se mantuvieron en acción hasta obtener una energía $E = -79.9352\ \mathrm{kJ/mol}$, con lo que se obtuvo un tamaño de la molécula igual a $d = 15.23\ \text{Å}$, dicha distancia fue medida desde del átomo

de azufre (color amarillo) marcado por el número 1 hasta el átomo de oxígeno (color rojo) marcado por el número 2, como se muestra en la **Figura 4.3**.

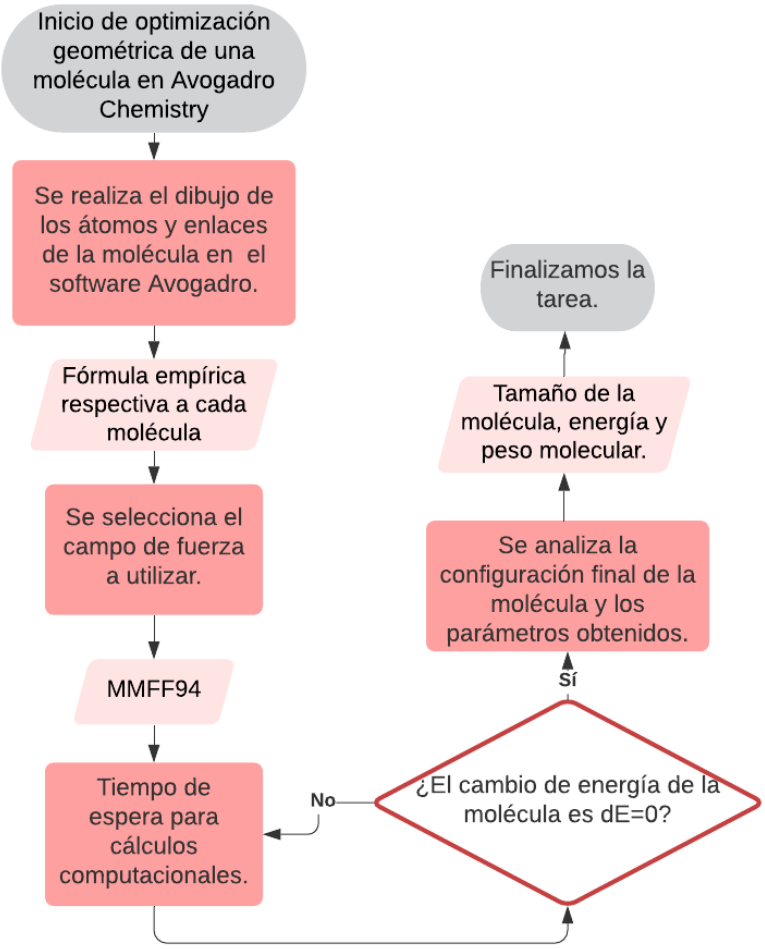

Figura 4.2 Diagrama de flujo del proceso para la optimización geométrica de moléculas orgánicas (11-MUA, EDC y NHS) en Avogadro Chemistry.

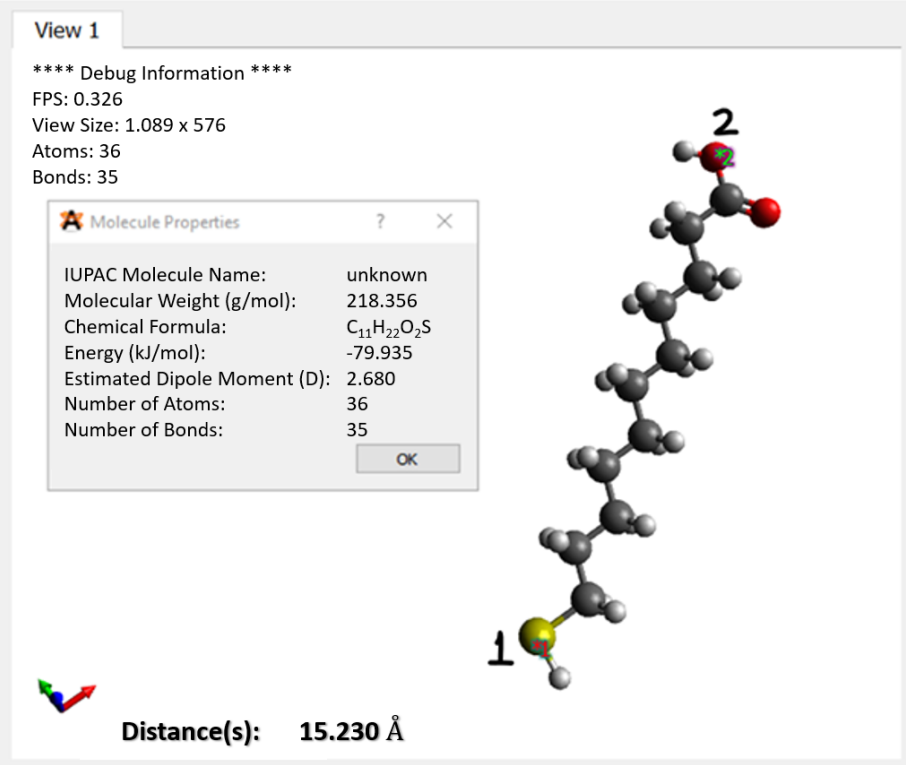

Figura 4.3 Datos obtenidos en Avogadro Chemistry al finalizar simulación para la optimización geométrica de la molécula MUA. Las esferas color gris representan a los átomos de hidrógeno, las de color negro son representados los átomos de carbón, las de color amarillo los átomos de azufre y las de color rojo los átomos de oxígeno.

4.2.2 Optimización geométrica de la molécula 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida

Para la segunda fase de la prefuncionalización del sensor, se hace interaccionar la molécula carbomiida con al alcanotiol 11-MUA, con el objetivo de hacer químicamente reactivo la terminal carboxílica del alcanotiol.

Similarmente que en la Sección 4.2.1, la serie de pasos que se llevaron a cabo para la simulación en Avogadro Chemistry para la obtención de la configuración más probable de la molécula EDC se ilustran en el diagrama de flujo de la Figura 4.2.

Los cálculos computacionales para la optimización geométrica se mantuvieron en proceso hasta obtener una energía $E = -26.552\ \mathrm{kJ/mol}$, en la que ya no se muestra cambio de energía $dE = 0$, con lo que se obtuvo un tamaño de la molécula igual a $d = 12.348\ \text{Å}$, dicha distancia fue medida desde del átomo de hidrógeno, marcado por el número 1 y representado por el color gris, hasta el otro extremo átomo de hidrógeno, marcado por el número 2, como se muestra en la **Figura 4.4**.

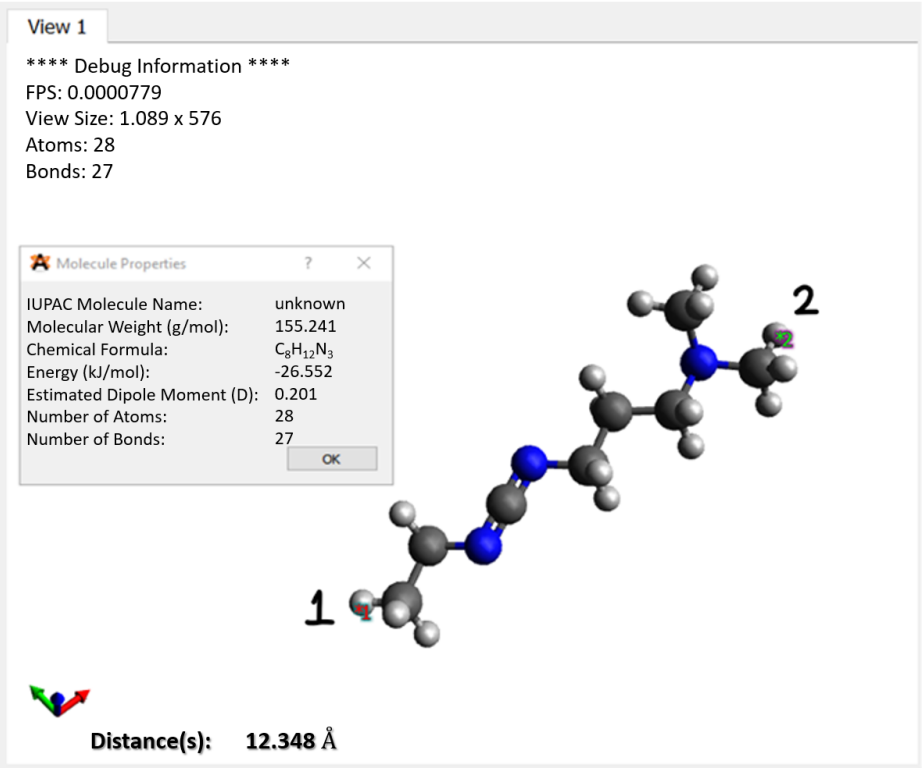

Figura 4.4 Datos obtenidos en Avogadro Chemistry al finalizar simulación para la optimización geométrica de la molécula EDC. Las esferas color gris representan a los átomos de hidrógeno, las de color negro son representados los átomos de carbón, las de color azul representan los átomos de nitrógeno.

Puesto que para los intereses de esta tesis es imperativo conocer la configuración geométrica de la interacción entre el alcanotiol 11-MUA y la molécula EDC, y no por separado, se realizó una segunda simulación en la que estas dos moléculas han interaccionado para predecir dicha configuración que es de nuestro interés.

La serie de pasos que se llevaron a cabo para la simulación en Avogadro Chemistry para la obtención de la configuración más probable de las moléculas MUA y EDC en interacción es similar al proceso mostrados en la **Figura 4.2**.

Los cálculos computacionales para la optimización geométrica se mantuvieron en acción hasta obtener una energía $E = 114.687\ \mathrm{kJ/mol}$, en la que ya no se muestra cambio de energía $dE = 0$, con lo que se obtuvo un tamaño igual a $d = 2.104\ \text{Å}$, dicha distancia fue medida desde del átomo de nitrógeno, marcado por el número 1, hasta el átomo de hidrógeno, marcado por el número 2, representado como se muestra en la **Figura 4.5**. Esta selección de átomos para calcular la distancia fue escogida de dicha manera para representar el espesor efectivo de la capa adsorbida sobre la molécula MUA, la cual depende de la posición e inclinación de la molécula EDC.

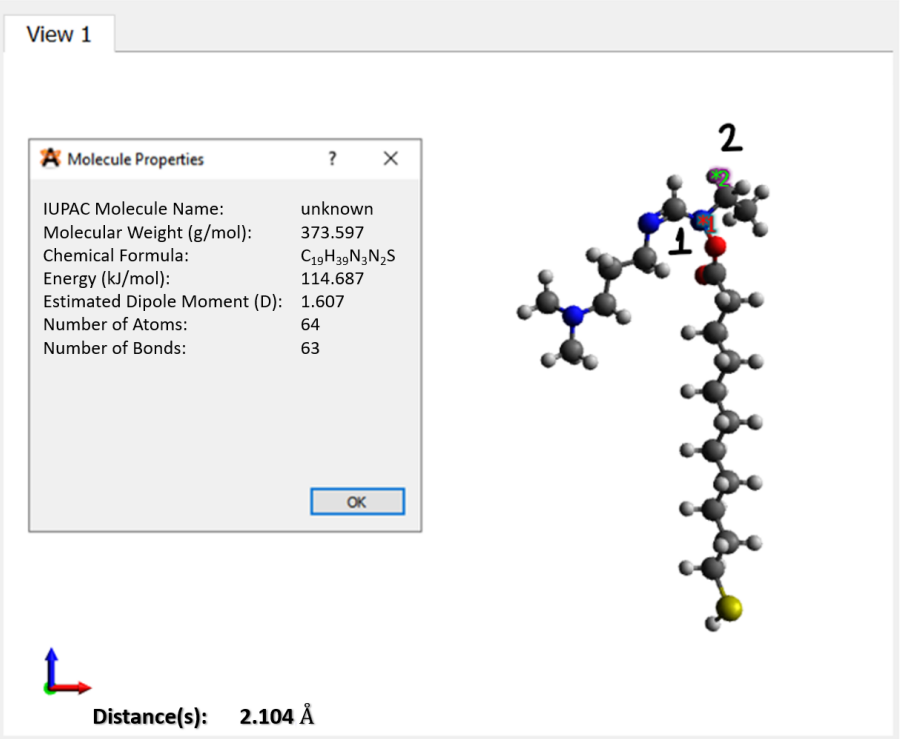

Figura 4.5 Datos obtenidos en Avogadro Chemistry al finalizar simulación para la optimización geométrica de las moléculas MUA y EDC al interaccionar.

4.2.3 Optimización geométrica de la molécula N-hidroxisulfosuccinimida

Para la tercera y última fase de la prefuncionalización del sensor, se hace interaccionar la molécula sulfo-NHS con al alcanotiol 11-MUA, para así finalizar el proceso de activación química y dar lugar al acomplamiento amino entre el grupo carboxilo del alcanotiol y el grupo amino de la proteína.

La serie de pasos que se llevaron a cabo para la simulación en Avogadro Chemistry para la obtención de la configuración más probable de la molécula sulfo-NHS se ilustran en el diagrama de flujo de la **Figura 4.2**.

Los cálculos computacionales para la optimización geométrica se mantuvieron en acción hasta obtener una energía $E = -379.86\ \mathrm{kJ/mol}$, en la que ya no se muestra cambio de energía $dE = 0$, con lo que se obtuvo un tamaño de la molécula igual a $d = 5.765\ \text{Å}$, dicha distancia fue medida desde del átomo de oxígeno marcado por el número 1, hasta el otro extremo átomo de oxígeno marcado por el número 2, como se muestra en la **Figura 4.6**.

Puesto que para los intereses de esta tesis es imperativo conocer la configuración geométrica de la interacción entre el alcanotiol MUA y la molécula Sulfo-NHS, y no por separado, se realizó una segunda simulación en la que estas dos

moléculas han interaccionado para predecir dicha configuración que es de nuestro interés.

La serie de pasos que se llevaron a cabo para la simulación en Avogadro Chemistry para la obtención de la configuración más probable de las moléculas MUA y Sulfo-NHS en interacción es similar al proceso mencionado anteriormente.

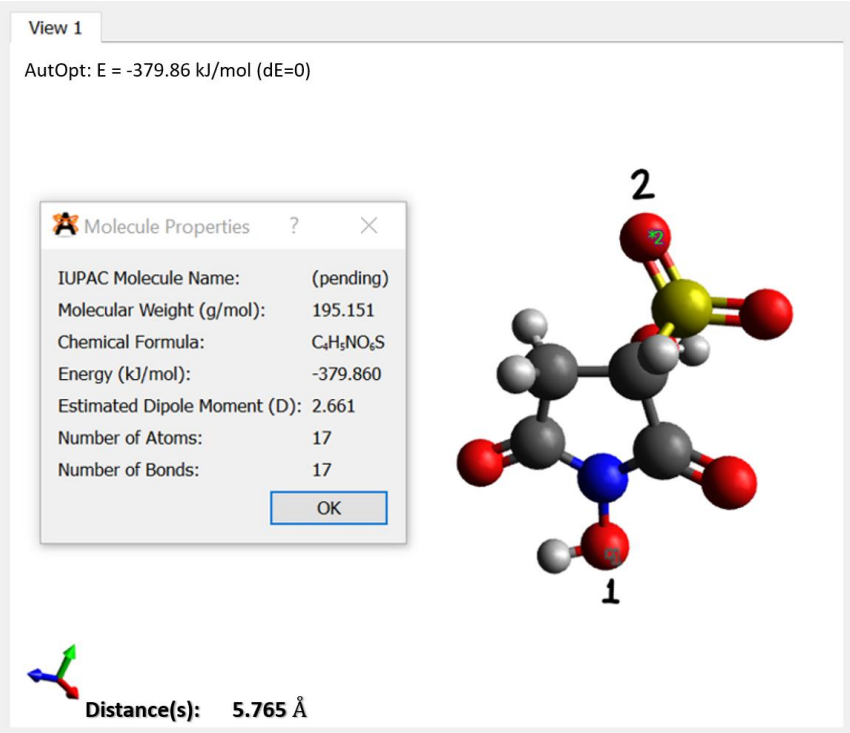

Figura 4.6 Datos obtenidos en Avogadro Chemistry al finalizar simulación para la optimización geométrica de la molécula Sulfo-NHS.

Los cálculos computacionales para la optimización geométrica se mantuvieron en acción hasta obtener una energía $E = -486.538\ \mathrm{kJ/mol}$, , en la que ya no se muestra cambio de energía $dE = 0$, con lo que se obtuvo un tamaño igual a $d = 5.760\ \text{Å}$, dicha distancia fue medida desde del átomo de oxígeno marcado por el número 1, hasta el átomo de oxígeno marcado por el número 2, representado como se muestra en la **Figura 4.7**. Esta selección de átomos para calcular la distancia fue escogida de dicha manera para representar el espesor efectivo de la capa adsorbida sobre la molécula MUA, la cual depende de la posición e inclinación de la molécula Sulfo-NHS.

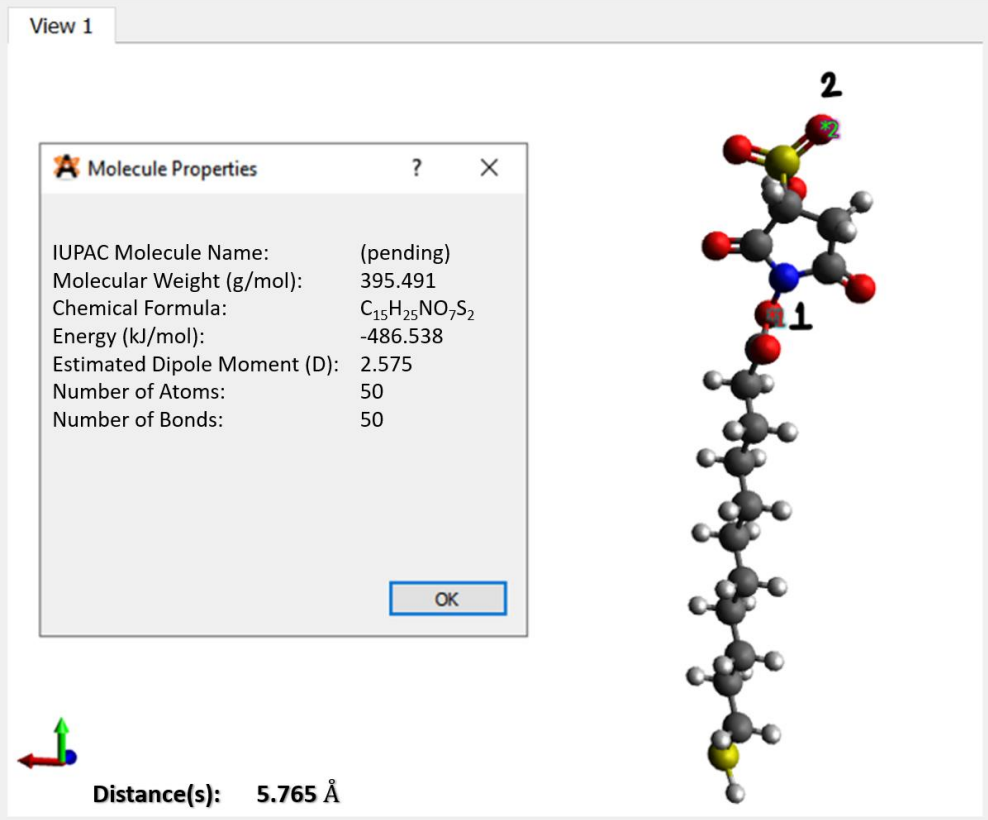

Figura 4.7 Datos obtenidos en Avogadro Chemistry al finalizar simulación para la optimización geométrica de las moléculas MUA y Sulfo-NHS al interaccionar.

Estas distancias obtenidas serán usadas posteriormente en esta tesis como espesores de monocapas orgánicas adsorbidas en las diferentes capas del sistema SPR para la detección interacciones antígenos-anticuerpos.

4.3 Funcionalización del arreglo SPR e interacciones antígeno-anticuerpo

La funcionalización del sensor SPR consiste en las últimas 2 fases del protocolo propuesto en el Capítulo 3 (**Figura 3.9**), el cual radica en el acoplamiento amino entre la molécula 11-MUA, seguido por la interacción antígeno-anticuerpo, tal como se representa en la **Figura 4.8**.

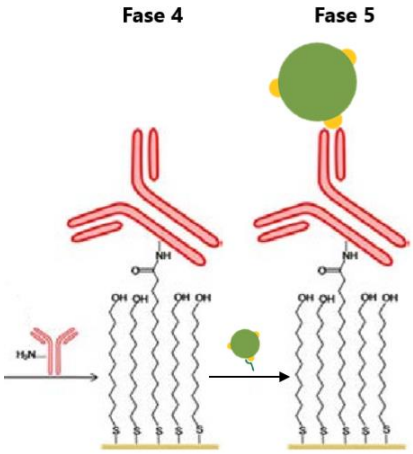

Figura 4.8 Representación esquemática del proceso de funcionalización del sensor SPR. Últimas dos fases en la que ocurre el acoplamiento amino y la interacción antígeno-anticuerpo. Fase 4: Acoplamiento amino entre la molécula MUA y la proteína. Fase 5: Interacción antígeno-anticuerpo.

Con las mismas intenciones expuestas en la sección 4.2, el objetivo de la realización del docking molecular será obtener el espesor de la monocapa adsorbida de proteína sobre la película de oro y la SAM de alcanotioles 11-MUA, con el fin de obtener las diferentes curvas SPR en estas últimas dos fases de funcionalización. El docking molecular que predice el sitio de unión más probable entre la proteína de interés y el alcanotiol MUA, obteniendo los aminoácidos específicos en los que el grupo amino de la proteína interacciona con el grupo carboxilo del MUA y así, obtener el espesor de la monocapa de proteínas adsorbidas sobre la superficie del biosensor. Este proceso fue efectuado mediante el software libre Autodock Vina, el cual es un software utilizado para predecir las conformaciones unidas óptimas de ligandos a proteínas desarrollado por el instituto de tecnología Scripps, con el mismo funcionamiento que DOCK 4.0 ya explicado anteriormente, con la diferencia de ser una nueva generación del software. Utiliza el modelo de Mecánica Molecular basado en el campo de fuerza *General AMBER Force Field* (GAFF) mediante la Mecánica Clásica y estima la energía libre de unión de un ligando a su objetivo.

El modelo presentado en esta tesis para la forma del campo de fuerza AMBER, ecuación (4.2), puede describirse con el enlace y los ángulos representados por una expresión armónica diagonal simple, la interacción VDW, interacciones electrostáticas modeladas por interacciones de Coulomb de cargas puntuales centradas en átomos y energías diedras representadas con un conjunto de parámetros, a menudo solo especificados por los dos átomos centrales [92]. El campo de fuerza tiene la siguiente forma:

$$E_{pair} = \sum_{bonds} k_r\left(r - r_{eq}\right)^2 + \sum_{angles} k_\theta\left(\theta - \theta_{eq}\right)^2 + \sum_{dihedrals} \frac{v_n}{2} \times [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i<j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^{6}} + \frac{q_i q_j}{\varepsilon R_{ij}}\right] \quad (4.2)$$

Aquí, r_{eq} y θ_{eq} son parámetros estructurales de equilibrio; k_r, k_θ, v_n son constantes de fuerza; n es multiplicidad y γ es el ángulo de fase para los parámetros del ángulo de torsión. Los parámetros A, B y q caracterizan los potenciales no enlazados.

Los resultados mostrados en las siguientes secciones fueron obtenidos utilizando el campo de fuerza GAFF ya que tienen una buena reputación para el estudio de proteínas y ácidos nucleicos [93].

4.3.1 Docking molecular entre proteínas y la molécula funcionalizadora de un sensor SPR

Comprender los procesos involucrados en las interacciones de biomoléculas con superficies en las que se adsorben biomoléculas tiene un valor científico y práctico significativo [94]–[96]. Muchas de las técnicas que se utilizan actualmente para la investigación de interacciones biomoleculares en sistemas modelo, como los complejos antígeno-anticuerpo [97], el reconocimiento de polipéptidos o proteínas por receptor celular [98] y la hibridación de ADN se basan en la interacción específica entre biomoléculas en la solución en bulto y las especies adheridas a varios tipos de superficies. Problemas prácticos como la mejora de la sensibilidad y especificidad de los inmunoensayos y la disminución de la interacción de las proteínas de los fluidos humanos (sangre, lágrimas, saliva) con las superficies de los materiales para su uso en implantes clínicos [99], lentes de contacto [100] y aleaciones dentales están relacionados con la actividad de adsorción de proteínas y las propiedades superficiales.

Los métodos extremadamente sensibles disponibles para estudiar la interacción de una biomolécula con una superficie incluyen la técnica de resonancia de plasmón de superficie [101], [102], elipsometría [103], espectroscopia de fluorescencia de reflexión interna total [104] y técnicas basadas con escáner de fluorescencia donde es necesario el etiquetado de proteínas. Los anticuerpos ligados a enzimas [105] y los isótopos radiactivos, por ejemplo, pueden detectar concentraciones del orden de picomolares de analitos en una disolución. Los límites de detección de estas técnicas no suelen estar determinados ni por las reacciones bioquímicas específicas implicadas ni por las

técnicas de medición empleadas (fluorescencia, radiación radiactiva, ondas electromagnéticas de superficie evanescente o polarización de la luz) para observar la adsorción de proteínas. En la mayoría de los casos, la sensibilidad está limitada por la adsorción inespecífica de biomoléculas, que a su vez depende de las propiedades biofísicas y químicas de la superficie adsorbida.

Un método excelente para la investigación *in situ* de la adsorción de proteínas es la resonancia de plasmón superficial (SPR) [101], [102]. Este método permite el seguimiento directo, sin etiquetar el analito, de la cinética de las interacciones entre proteínas y una superficie en tiempo real. La observación de un cambio de SPR, durante la formación de la capa de proteína en una superficie, proporciona información sobre la concentración superficial de las proteínas.

Como se ha mencionado en esta tesis, la posición mínima de la curva SPR, medida por el ángulo de la luz incidente en la superficie del metal, depende de los espesores e índices de refracción de todos los componentes de la estructura de la capa en la superficie del metal y de las propiedades ópticas del medio que está en contacto con la superficie de la muestra. Este fenómeno se utiliza para medir la adsorción de proteínas en la superficie del oro modificado en tiempo real. Cuando el espesor de la capa de proteína aumenta durante la adsorción, los cambios de la reflectividad de la curva SPR medida en el ángulo de alto contraste corresponden a la cantidad de proteína en la superficie.

El propósito de este capítulo es obtener el espesor de la capa de proteína que se absorbería en un experimento, sobre la superficie de oro modificada por alcanotioles con el grupo funcional terminal carboxilo (COO^-) gracias al acoplamiento amino con la proteína. Para eso se llevó acabo la simulación en Autodock de la interacción (anclado) entre la molécula MUA con tres proteínas diferentes: BSA, HSA y la proteína IgG1 b12 humana. Dichos resultados se presentan en las secciones a continuación.

4.3.1.1 Interacción entre el alcanotiol MUA y la proteína IgG1 b12 humana mediante docking molecular

Para simular la fase 4 representada en la **Figura 4.8**, en la que se lleva a cabo la interacción entre el alcanotiol encargado de la prefuncionalización del sensor SPR y la proteína encargada de reaccionar con el analito encontrado disolución en bulto, se utilizará el recurso de Autodock Vina en el que, con ayuda de la base de datos de Protein Data Bank (PDB por sus siglas en inglés), se llevará a cabo la interacción proteína-molécula para encontrar los sitios de unión más probables. En esta sección hablaremos de la interacción entre la proteína IgG1 b12 humana y la molécula 11-MUA.

Para llevar a cabo este proceso se siguió una serie de pasos, los cuales son representados en el diagrama de flujo en la **Figura 4.9**, los cuales consistieron en cargar el archivo .pdb en Autodock de la proteína IgG1 b12 humana, con clave PDB: 1HZH [106], libre de algún otro ligando y de cargas externas, para después seleccionar los parámetros necesarios para el docking, en este caso nos interesa mantener la proteína en un $\mathrm{pH} = 4.7$ el cual se utiliza en un buffer HEPES para un procedimiento de anclaje de ésta proteína y evitar su desnaturalización [107], para esto, se hizo uso de la ecuación de Henderson–Hasselbalch (4.3), la cual es usada para definir la carga de los aminoácidos en la proteína a fin de obtener el pH deseado [108]:

$$\mathrm{pH} = \mathrm{pK_a} + \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right) \tag{4.3}$$

donde $\mathrm{K_a}$ es la constante de disociación del ácido débil, $\mathrm{pK_a} = -\log \mathrm{K_a}$, además $[HA]$ y $[A^-]$ son las molaridades del ácido débil y su base conjugada. De esta manera, se analizó y se le asignó una carga específica a cada grupo de aminoácidos dentro de la proteína.

A continuación, se cargó el archivo .pdb del ligando obtenido en la optimización geométrica en Avogadro Chemistry, en este caso MUA, y se definió que la proteína se mantendría rígida, al contrario del ligando que será flexible y libre de moverse. Por último, se seleccionó las dimensiones de la caja mallado (Grid) en la que se lleva acabo las interacciones, para esta tesis seleccionamos las dimensiones tales que se cubrieran la proteína completa. De esta manera se le permitió al programa hacer los cálculos necesarios de interacciones electroestáticas entre la totalidad de la proteína y la molécula 11-MUA, se programó el software tal que por cada corrida hiciera 10 repeticiones.

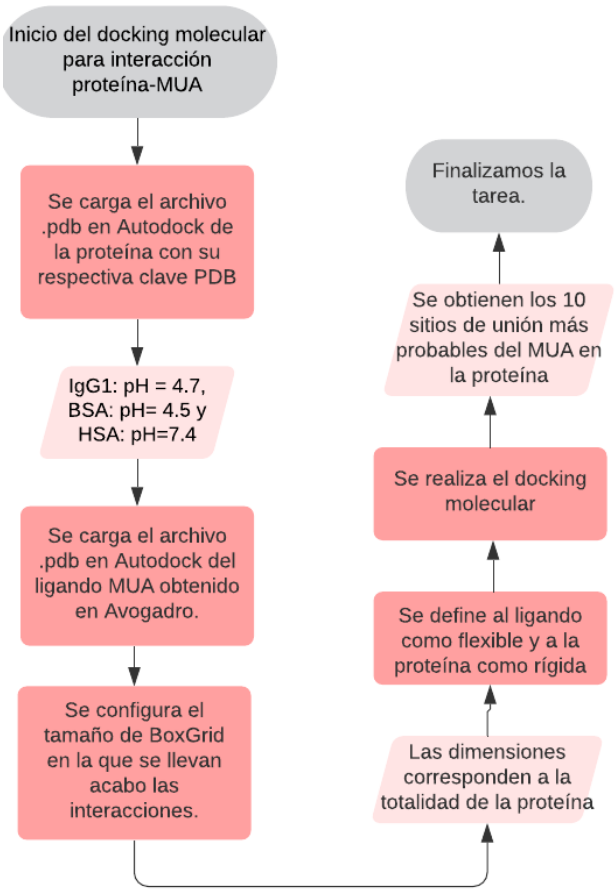

Figura 4.9 Diagrama de flujo del proceso para el docking molecular entre la una proteína, como IgG1, BSA y HSA (flexible y libre de moverse) y la molécula MUA (rígida) en Autodock Vina para la obtención del sitio más probable de unión.

Los datos obtenidos fueron los 10 sitios de unión más probables por cada repetición en una corrida, aquellos que se requirieron menor energía para llevar a cabo la interacción. Autodock nos permite visualizar la molécula en 3D y los aminoácidos de la proteína con los que interactuó, especificando si ocurrieron interacciones de Van der Waals, mostrados como aminoácidos cercanos a la molécula, o puentes de hidrógeno (línea punteada color verde), como se muestra en la **Figura 4.10**.

Para una mejor visualización de las interacciones encontradas y, por lo tanto, un mejor análisis, se hizo uso del recurso Proteins*Plus*, el cual es un servidor que permite visualizar interacciones en 2D entre proteína-ligando y distintas funciones más [109]. De esta manera logramos distinguir con más certeza con cual grupo de la molécula interaccionaron los aminoácidos de nuestra proteína, el grupo carboxilo o el grupo sulfhidrilo (**Figura 4.11**), ya que el grupo tiol se encuentra en un enlace metálico con la superficie de oro, sólo nos interesó los enlaces con el grupo carboxilo.

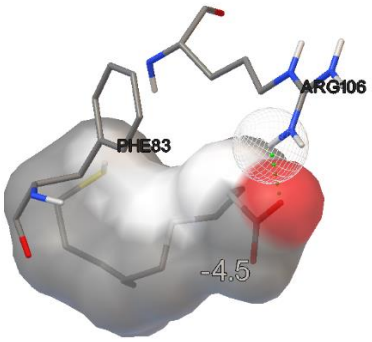

Figura 4.10 Visualización en 3D de la molécula MUA y los aminoácidos con los que interaccionó al realizar un docking con la proteína IgG1 b12. La molécula MUA se encuentra encerrada en una superficie gris. Se muestran los aminoácidos con los que ha interactuado por enlaces de Van der Waals y por puentes de hidrógeno, los cuales se muestran con una línea punteada verde [110].

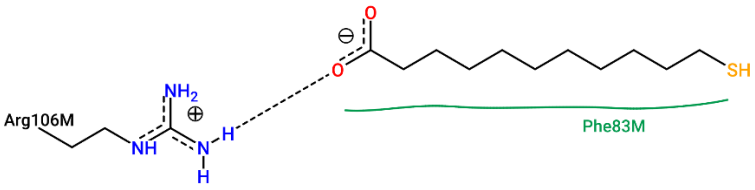

Figura 4.11 Visualización en 2D obtenida en ProteinPlus de la molécula MUA y los aminoácidos con los que interaccionó al realizar un docking con la proteína IgG1 b12. Se muestran los aminoácidos con los que ha interactuado por enlaces de Van der Waals, representado por una línea verde, y por puentes de hidrógeno, los cuales se muestran con una línea punteada negra [109].

Para cada proteína se realizaron 10 corridas obteniendo un total de 100 sitios de unión más probables. En la **Tabla 4.1** se encuentran los resultados obtenidos del docking molecular realizado entre la proteína IgG1 b12 y el alcanotiol 11-MUA. Se presentan 7 aminoácidos diferentes de la secuencia estructural de la inmunoglobulina G1 b12, estos fueron los aminoácidos con los que la molécula 11-MUA interaccionó (aminoácido receptor), dichos aminoácidos fueron seleccionados al ser los que requirieron una menor energía de unión (obtenida a través del software Autodock). Los aminoácidos que se encuentran en estos resultados son: Arginina (Arg), Serina (Ser), Lisina (Lys) y Glutamina (Gln). Con el fin de conseguir el tamaño de la proteína IgG1 b12 humana, medido a partir de los aminoácidos receptores, se utilizó el recurso disponible en PDB, en el cual además de permitir visualizar e identificar la totalidad de aminoácidos encontrados en la proteína, permite tomar distancia de aminoácido-aminoácido, apoyándose del software Pymol, como es mostrado en **Figura 4.12**. Dichas distancias medidas en Å, se muestran en la **Tabla 4.1** y fueron usadas como el espesor de la monocapa de proteína IgG1 b12 humana adsorbida sobre la superficie SPR. Adicionalmente, con el fin de ordenar los sitios de unión del más al menos probable, se

exponen las energías de unión en kcal/mol, además del número de veces que cada aminoácido se repitió en los 100 aminoácidos receptores obtenidos en el docking.

En esta tabla expuesta, encontramos un espesor mínimo de 76.51 Å para el aminoácido Ser280 y un espesor máximo de 142.63 Å para el aminoácido Gln100, teniendo así una variación en el espesor de la proteína HSA de $\Delta d_{\mathrm{HSA}} = 66.09$ Å, es por lo cual que fue necesario encontrar un promedio ponderado de los resultados obtenidos para el espesor de BSA, tomando como factor de ponderamiento la energía de unión obtenida, teniendo una mayor contribución los espesores con menor energía y mayor número de repeticiones. El valor obtenido como promedio ponderado fue $d_{\mathrm{BSA}} = 128.46$ Å, dicha información será de utilidad en secciones posteriores.

Tabla 4.1 Resultados al realizar docking molecular entre IgG1 b12 y MUA. Se muestran los aminoácidos receptores de la molécula MUA con menor energía de unión obtenidos en Autodock [110] y el espesor de la proteína IgG1.

Aminoácido Receptor	Aminoácido Extremo	Espesor IgG1 (Å)	No. Repeticiones	Energía (kcal/mol)
Arg106	**Trp104**	**136.75**	**12**	-4.5
Ser171	Trp104	131.11	3	-4.1
Lys228	Pro455	87.19	2	-4
Gln166	Trp104	124.96	2	-4
Lys104	Trp104	130.11	2	-4.5
Ser280	Trp104	76.51	1	-3.9
Gln100	Ser60	142.63	1	-4.3
Promedio ponderado:		128.46		

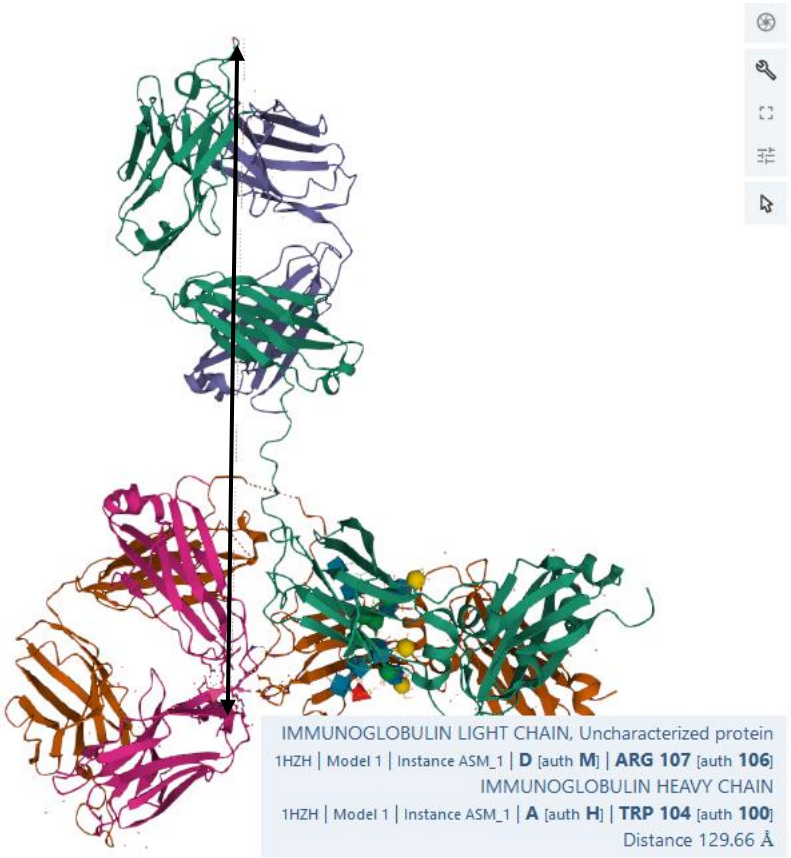

Figura 4.12 Uso del software PBD y Pymol para medir la distancia entre el aminoácido obtenido por Autodock como uno de los sitios más probables (Arg106M) y el aminoácido en el extremo opuesto de éste (Trp104) obteniendo una distancia igual a 129.66 Å.

4.3.1.2 Interacción entre el alcanotiol MUA y las proteínas BSA y HSA mediante docking molecular

Un procedimiento similar al expuesto en la sección anterior se siguió para obtener los diferentes sitios de unión entre BSA-MUA y HSA-MUA. Para la proteína BSA se utilizó en archivo PBD: 4F5S y para HSA el archivo PDB: 1AO6 [111], [112]. Para cada proteína se utilizó un pH diferente basándose, nuevamente, en el pH utilizado en un anclaje experimental. Para la proteína BSA se configuró el docking con un $\mathrm{pH} = 4.5$ para un buffer de Acetato de Potasio y el docking para la proteína HSA fue configurado con un $\mathrm{pH} = 5.2$ para un buffer de Acetato de Sodio [113], [114].

Los datos obtenidos fueron los 10 sitios de unión más probables por cada una de las diez corridas por proteína. La visualización en 3D que Autodock nos permite lograr de la molécula MUA y los aminoácidos con los que ha interaccionado se muestra en la **Figura 4.13a** para la proteína BSA y en la **Figura 4.13b** para la proteína HSA.

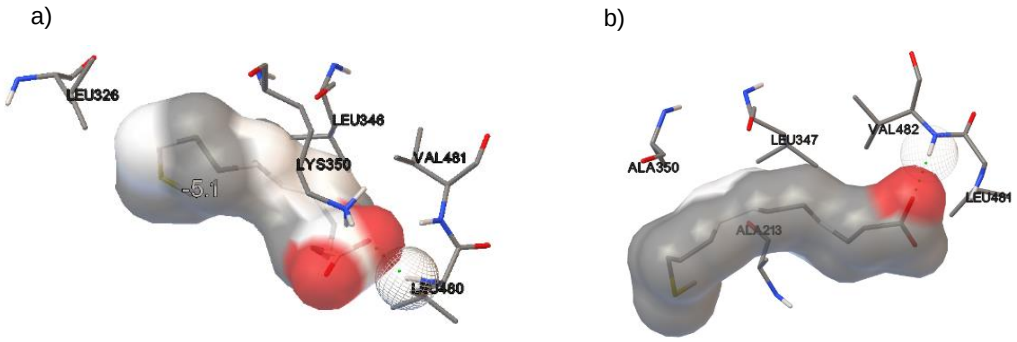

Figura 4.13. Visualización en 3D de la molécula MUA y los aminoácidos con los que interaccionó al realizar un docking con la a) proteína BSA y b) la proteína HSA. La molécula MUA se encuentra encerrada en una superficie gris. Se muestran los aminoácidos con los que ha interactuado por enlaces de Van der Waals y puentes de hidrógeno [110].

Nuevamente, para distinguir con más certeza con cual grupo de la molécula interaccionaron los aminoácidos de nuestra proteína, se obtuvieron imágenes en 2D con el servidor Protein*Plus* de dichos enlaces de Van der Waals o puentes de hidrógeno con la molécula MUA (**Figura 4.14a** para BSA y **Figura 4.14b** para HSA).

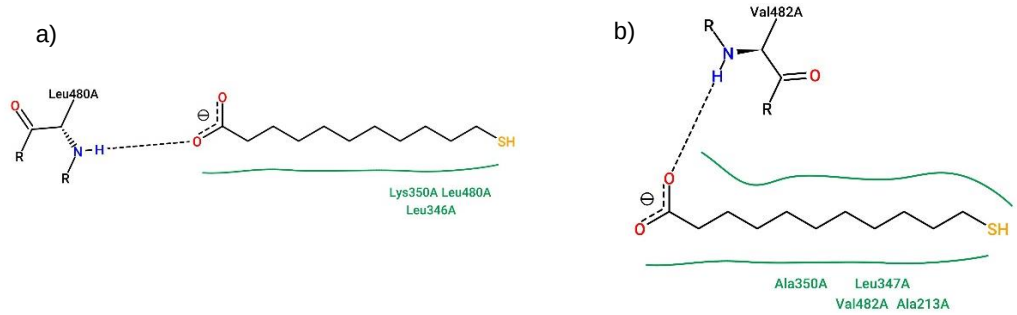

Figura 4.14 Visualización en 2D obtenida en ProteinPlus de la molécula MUA y los aminoácidos con los que interaccionó al realizar un docking a) con la proteína BSA y b) con la proteína HSA. Se muestran los aminoácidos con los que ha interactuado por enlaces de Van der Waals, representado por una línea verde, y por puentes de hidrógeno, los cuales se muestran con una línea punteada negra.

Para cada proteína se realizaron 10 corridas obteniendo un total de 100 sitios de unión más probables. En la **Tabla 4.2** se encuentran los resultados obtenidos del docking molecular realizado entre la proteína BSA y el alcanotiol 11-MUA. Se presentan 14 aminoácidos diferentes de la secuencia estructural de la proteína BSA, estos son los aminoácidos receptores de la molécula 11-MUA, dichos aminoácidos fueron seleccionados al ser los que requirieron una menor energía de unión (obtenida a través del software Autodock). Los aminoácidos que se encuentran en estos resultados son: Tirosina (Tyr), Arginina (Arg), Valina (Val), Lisina (Lys), Leucina (Leu), Treonina (Thr), Serina (Ser), Glicina (Gly) y Glutamina (Gln). Con el fin de conseguir el tamaño de la proteína BSA, medido a partir de los aminoácidos receptores, se utilizó el recurso disponible en PDB, el cual nos permitió tomar distancia de aminoácido-aminoácido.

Dichas distancias medidas en Å, se muestran en la **Tabla 4.2** y fueron usadas como el espesor de la monocapa de proteína BSA adsorbida sobre la superficie SPR. Adicionalmente, con el fin de ordenar los sitios de unión del más al menos probable, se exponen las energías de unión en kcal/mol, además del número de veces que cada aminoácido se repitió en los 100 aminoácidos receptores obtenidos en el docking.

En la tabla mostrada, encontramos un espesor mínimo de 47.2 Å para el aminoácido Ser453 y un espesor máximo de 75.26 Å para el aminoácido Thr578, teniendo así una variación en el espesor de la proteína HSA de $\Delta d_{\mathrm{HSA}} = 28.06$ Å, es por esto que fue necesario encontrar un promedio ponderado de los resultados obtenidos para el espesor de BSA, tomando como factor de ponderamiento la energía de unión obtenida, teniendo una mayor contribución los espesores con menor energía y mayor número de repeticiones. El valor obtenido como promedio ponderado fue $d_{\mathrm{BSA}} = 59.14$ Å el cual será utilizado en resultados presentados a continuación.

Tabla 4.2 Resultados al realizar docking molecular entre BSA y MUA. Se muestran los aminoácidos receptores de la molécula MUA con menor energía de unión obtenidos en Autodock y el espesor de la proteína BSA [110].

Aminoácido Receptor	Aminoácido Extremo	Espesor BSA (Å)	No. Repeticiones	Energía (kcal/mol)
Tyr137	Asp363	61.31	16	-5.4
Arg208	Asp562	63.45	16	-5.2
Val481	Asp56	50.81	10	-5.4
Tyr160	Ala583	52.59	10	-5.3
Lys350	Glu171	57.08	10	-5.4
Leu480	Glu171	49.77	7	-5.4
Tyr400	Ser58	63.26	7	-6.1
Thr578	Ser58	75.26	7	-6.1
Ser453	Ala55	47.2	3	-5.3
Arg347	Asp56	53.98	3	-5.3
Arg484	Asp56	56.31	3	-5.2
Arg185	Asp363	57.86	3	-5.2
Gly21	Asp364	59.53	3	-4.9
Gln579	Ser58	74.13	2	-6.2
Promedio Ponderado:		59.14		

Para cada proteína se realizaron 10 corridas obteniendo un total de 100 sitios de unión más probables. En la **Tabla 4.3** se encuentran los resultados obtenidos del docking molecular realizado entre la proteína HSA y el alcanotiol 11-MUA. Se presentan 8 aminoácidos diferentes de la secuencia estructural de la proteína HSA, estos fueron los aminoácidos receptores de la molécula 11-MUA, dichos aminoácidos fueron seleccionados al ser los que requirieron una menor energía de unión (obtenida a través

del software Autodock). Los aminoácidos que se encuentran en estos resultados son: Tirosina (Tyr), Valina (Val), Arginina (Arg) y Leucina (Leu). Con el fin de conseguir el tamaño de la proteína HSA, se midieron las distancias entre aminoácido receptor y aminoácido extremo, dichas distancias medidas en Å, se muestran en la **Tabla 4.3** y fueron usadas como el espesor de la monocapa de proteína HSA adsorbida sobre la superficie SPR. Adicionalmente, con el fin de ordenar los sitios de unión del más al menos probable, se exponen las energías de unión en kcal/mol, además del número de veces que cada aminoácido se repitió en los 100 aminoácidos receptores obtenidos en el docking.

En esta tabla expuesta, encontramos un espesor mínimo de 44.06 Å para el aminoácido Arg222 y un espesor máximo de 68.21 Å para el aminoácido Leu327, teniendo así una variación en el espesor de la proteína HSA de $\Delta d_{\mathrm{HSA}} = 24.15$ Å, es por esto que fue necesario encontrar un promedio ponderado de los resultados obtenidos para el espesor de HSA, tomando como factor de ponderamiento la energía de unión obtenida, teniendo una mayor contribución los espesores con menor energía y mayor número de repeticiones. El valor obtenido como promedio ponderado fue $d_{\mathrm{HSA}} = 57.51$ Å el cual será utilizado en resultados presentados a continuación.

Tabla 4.3 Resultados al realizar docking molecular entre HSA y MUA. Se muestran los aminoácidos receptores de la molécula MUA con menor energía de unión obtenidos en Autodock y el espesor de la proteína HSA [110].

Aminoácido Receptor	Aminoácido Extremo	Espesor HSA (Å)	No. Repeticiones	Energía (kcal/mol)
Tyr138	Ala364	62.74	13	-5.3
Val482	Asp56	50.43	5	-5.1
Arg257	Ala582	54.82	5	-5.1
Leu481	Ala172	49.4	3	-5.1
Arg209	Ala561	62.87	2	-4.9
Arg222	Ala92	44.06	1	-4.8
Arg186	Ser312	52.34	1	-5.1
Leu327	Thr566	68.21	1	-4.8
Promedio Ponderado:		57.51		

4.4 Simulación de curvas SPR para un biosensor SPR

En esta sección se hará una comparación entre las curvas SPR obtenidas en cada una de las distintas fases mostradas en la **Figura 3.9** para cada una de las proteínas trabajas (IgG1 b12, BSA y HSA), apoyándonos de los datos obtenidos en las optimizaciones geométricas y los dockings moleculares presentados en anteriormente. Cristofolini tradujo a código para MatLab el programa propuesto por Yamamoto para sistemas de n

capas, y aplicó sus resultados al cálculo de la intensidad de la luz reflejada por 4 capas (un caso particular del modelo de n capas) [29], [115]. Haciendo algunas modificaciones al último, se trabaja aquí para sistemas de hasta 6 capas.

El mecanismo de sensado es el siguiente: luego de obtener una gráfica de reflectancia contra ángulo como la de la **Figura 2.1**, se añade una monocapa sobre la superficie de oro, y se obtiene otra curva, cuyo valle estará desplazado a la derecha como en la **Figura 2.2**. Consecuentemente, también cambiará el valor del ángulo de mínima reflectancia. Como se estudió previamente, es en este ángulo donde la excitación de los plasmones superficiales es mayor, lo que disminuye la cantidad de luz reflejada. Al añadir material extra sobre la superficie de la película de oro, los plasmones tendrán su máxima excitación en un ángulo distinto debido al cambio de índice de refracción. Para los cinco casos a considerar en este trabajo: 1) Vidrio/Oro/MUA/Buffer, Vidrio/Oro/MUA/EDC/Buffer, 2) Vidrio/Oro/MUA/NHS/Buffer, 3) Vidrio/Oro/MUA/Proteína1/Buffer y 4) Vidrio/Oro/MUA/Proteína1/Proteína2/Buffer, luego de agregar cada monocapa orgánica ocurrirá un corrimiento a la derecha de dicho ángulo SPR.

Los valores de los índices de refracción de las monocapas MUA, EDC y NHS se obtienen de los resultados presentados por ChemSpider [116]–[118], y del espesor corresponde al obtenido en Avogadro Chemistry. Para la monocapa de la proteína 1 se usan valores del índice de refracción distintos según cada caso, IgG1 b12, BSA o HSA, y corresponden a los presentados por Cullen et al para cada una de las proteínas [119]. En la **Figura 4.15** se presenta el resultado del cálculo para un modelo idealizado de montaje de 5 capas: Vidrio/Oro/MUA/Proteína1/Buffer para el anticuerpo IgG1 b12 ($n = 1.542$), el espesor de dicha proteína lo variamos con los 7 espesores obtenidos con Autodock y Pymol en **Tabla 4.1**, cada color representa la curva SPR obtenida correspondiente a cada espesor de 76.1, 87.19, 124.96, 130.11, 131.11, 136.75, 142.63 Å. En la gráfica inserta de la **Figura 4.15** se muestra un acercamiento del comportamiento de los ángulos de resonancia (θ_{SPR}) que muestra valores de 68.78, 69.06, 70.07, 70.21,70.23, 70.39 y 70.55°, respectivamente. Observamos de manera general que la curva SPR se desplaza hacia la derecha cuando los espesores de la película son mayores. Por tanto, el fenómeno SPR nos puede dar información del aminoácido receptor más probable de la proteína bajo estudio y el alcanotiol 11-MUA.

Debido a que el sistema propuesto para la simulación del biosensor SPR se basa en un método de inmovilización covalente aleatorio, es decir, que el sitio de unión entre la proteína bioreceptora y la superficie del sensor puede ocurrir en cualquier parte de la proteína indistintamente, se ha obtenido un rango de variación en el espesor de la monocapa adsorbida de $66.09\,\text{Å}$ mediante las simulaciones en Autodock. En consecuencia, las 7 curvas SPR presentadas en la **Figura 4.15** muestran una

variabilidad en el ángulo SPR de 1.77°. No obstante, con el propósito de realizar un análisis más preciso, se tomará en cuenta el espesor promedio adsorbido, obtenido como el promedio ponderado de los distintos espesores mostrados en **Tabla 4.2**, con un espesor de $128.46\,\text{Å}$. Los códigos utilizados en este capítulo se encuentran disponibles en un repositorio de Github (hacer click o dirigirse a https://github.com/karenrmedel/Curva_SPR_Biosensores).

En cada una de las siguientes figuras, se muestran las respuestas esperadas del dispositivo sensor luego de agregar cada monocapa. Se toma en cuenta primero un prisma de vidrio (medio 1), con un depósito de película de oro de espesor ~47 nm sobre su superficie plana (medio 2). Sobre esta película de oro se van añadiendo las diferentes monocapas, quedando siempre la solución buffer como último medio (medio 3 – 6). Cabe aclarar que los índices de refracción utilizados en esta tesis son medidos con una longitud de onda igual a $\lambda = 633\,nm$, que corresponde para un láser He-Ne.

Para nuestro primer sistema en el que trabajamos con la proteína IgG1 b12, como punto de partida, se muestra el montaje más sencillo (línea negra sólida, **Figura 4.16**): vidrio ($n = 1.723$), oro ($\tilde{n} = 0.1726 + i3.4218,\ d = 47\,nm$) y buffer HEPES ($n = 1.3341$). La línea negra punteada representa el cálculo obtenido al añadir el compuesto que permiten el enlace de las proteínas ligando a la superficie metálica: MUA ($n = 1.483$, $d = 15.23\,\text{Å}$); estos son considerados como una sola monocapa (SAM). Para la siguiente fase, la línea azul eléctrica sólida representa el resultado obtenido al añadir el primer compuesto para activar el grupo carboxilo del alcanotiol: EDC ($n = 1.459$, $d = 2.104\,\text{Å}$). Seguido de esto, la línea azul eléctrica segmentada, representa el cálculo conseguido al añadir el segundo compuesto para activar el grupo carboxilo: NHS ($n = 1.6$, $d = 5.76\,\text{Å}$); retirando la monocapa anterior EDC. Por su parte, la línea negra segmentada-punteada representa el resultado de añadir a la anterior, y antes del buffer, una monocapa de proteína IgG1 b12 ($n = 1.542$) para esta ocasión se seleccionó el espesor promedio de la película ($d_{\text{IgG1}} = 128.46\,\text{Å}$), obteniendo un $\theta_{IgG1} = 70.16°$, cabe señalar que la monocapa del compuesto NHS fue retirada para este cálculo. Por último, la línea negra segmentada representa las monocapas anteriores más otra monocapa de la proteína gp120 la cual es el antígeno para IgG1 b12, una glucoproteína hallada en la superficie del virus VIH, esta proteína es la encargada de que ocurra la interacción anticuerpo-antígeno con el anticuerpo ($n = 1.4555,\ d = 19.30\,\text{Å}$) [120], [121]. Para finalmente, encontrar un ángulo SPR $\theta_{gp120} = 70.54°$ para el sistema biosensor de 6 capas.

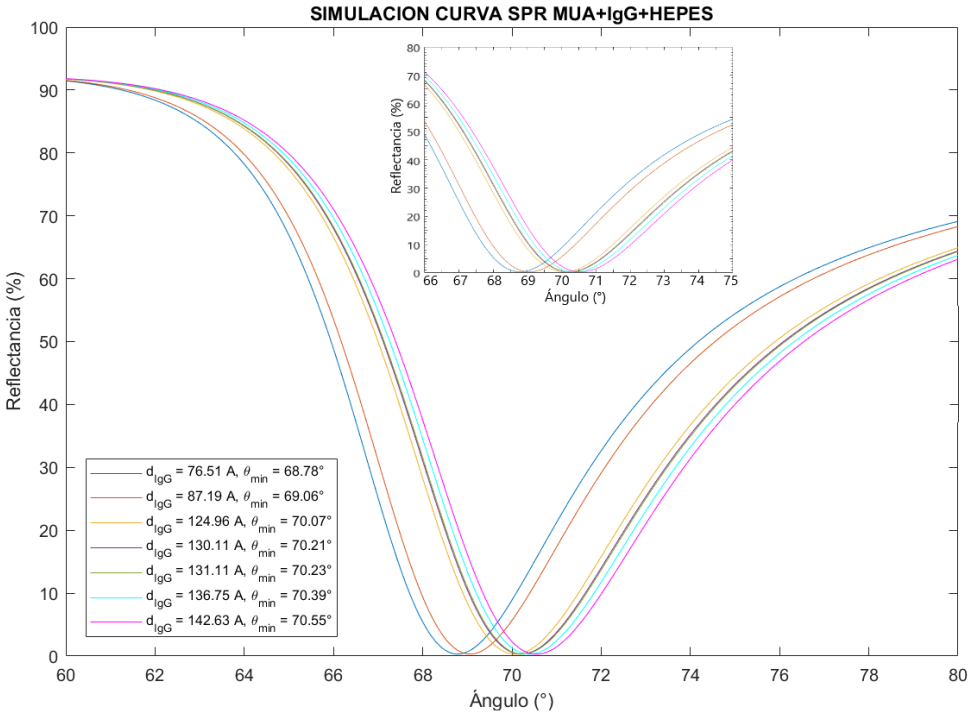

Figura 4.15 Intensidad de reflectancia de salida del sensor SPR calculada para un sistema de 5 capas: vidrio/oro/monocapa de MUA/monocapa de IgG1 b12/buffer HEPES para distintos espesores (uniones más probables) calculados de la proteína IgG1 b12.

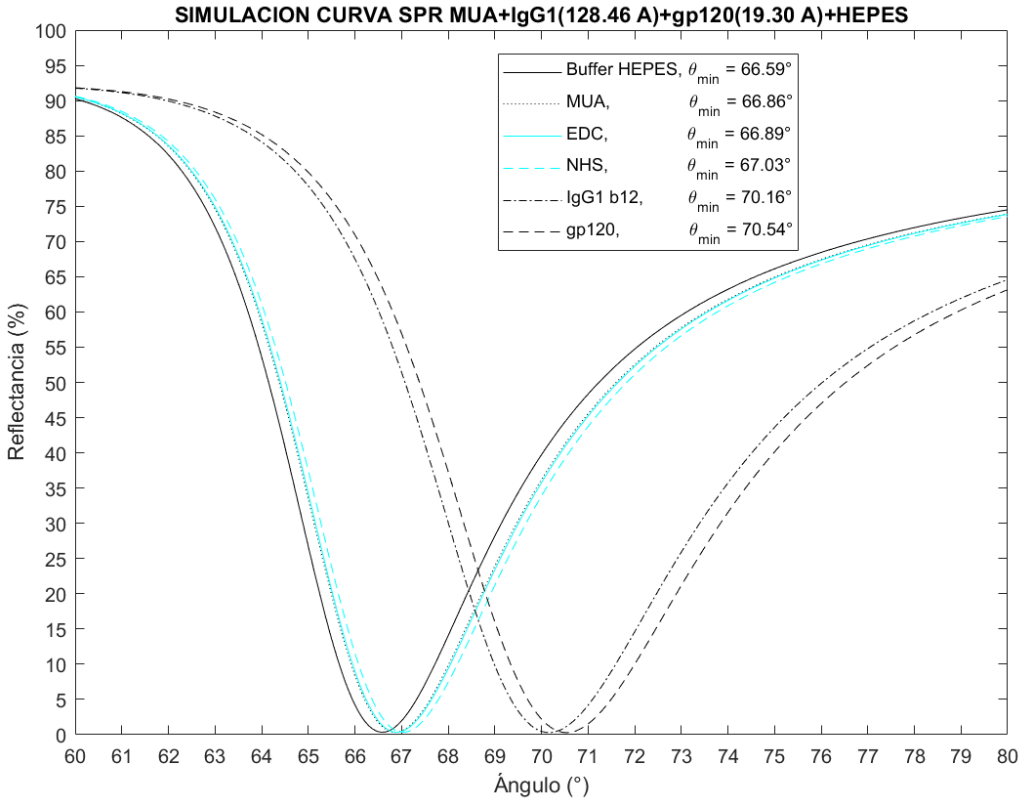

Figura 4.16 Intensidad reflectancia de salida del biosensor SPR (IgG1 b12 – gp120) calculada considerando distintas las 5 etapas (véase Figura 4.1 y Figura 4.8).

Posteriormente, la **Figura 4.17** muestra el resultado de la curva SPR para 5 capas: Vidrio/Oro/MUA/Proteína1/Buffer para la proteína BSA ($n = 1.575$), el espesor de dicha proteína lo variamos con los 15 espesores obtenidos con Autodock y Pymol en **Tabla 4.2**, para la solución buffer se utilizó Acetato de Potasio ($n = 1.37$) [122]. Cada color representa la curva SPR obtenida correspondiente a cada espesor de 47.2, 49.77, 50.81, 52.59, 53.98, 56.31, 57.08, 57.86, 59.53, 61.31, 63.26, 63.45, 74.13, 75.26 Å. En la gráfica inserta de la **Figura 4.17** se muestra un acercamiento del comportamiento de los ángulos de resonancia (θ_{SPR}) que muestra valores de 73.51, 73.59, 73.62, 73.62, 73.67, 73.71, 73.78, 73.81, 73.83, 73.88, 73.93, 73.99, 74, 74.32 y 74.36°, respectivamente. Observamos de manera general que la curva SPR se desplaza hacia la derecha cuando los espesores de la película son mayores. Por tanto, el fenómeno SPR nos puede dar información del aminoácido receptor más probable de la proteína bajo estudio y el alcanotiol 11-MUA.

Se ha obtenido un rango de variación en el espesor de la monocapa adsorbida de proteína igual a 28.06 Å mediante las simulaciones en Autodock. En consecuencia, las 15 curvas SPR presentadas en la **Figura 4.17** muestran una variabilidad en el ángulo SPR de $0.85°$. Sin embargo, con el propósito de realizar un análisis más preciso, se tomará en cuenta el espesor promedio mostrado en la **Tabla 4.2**.

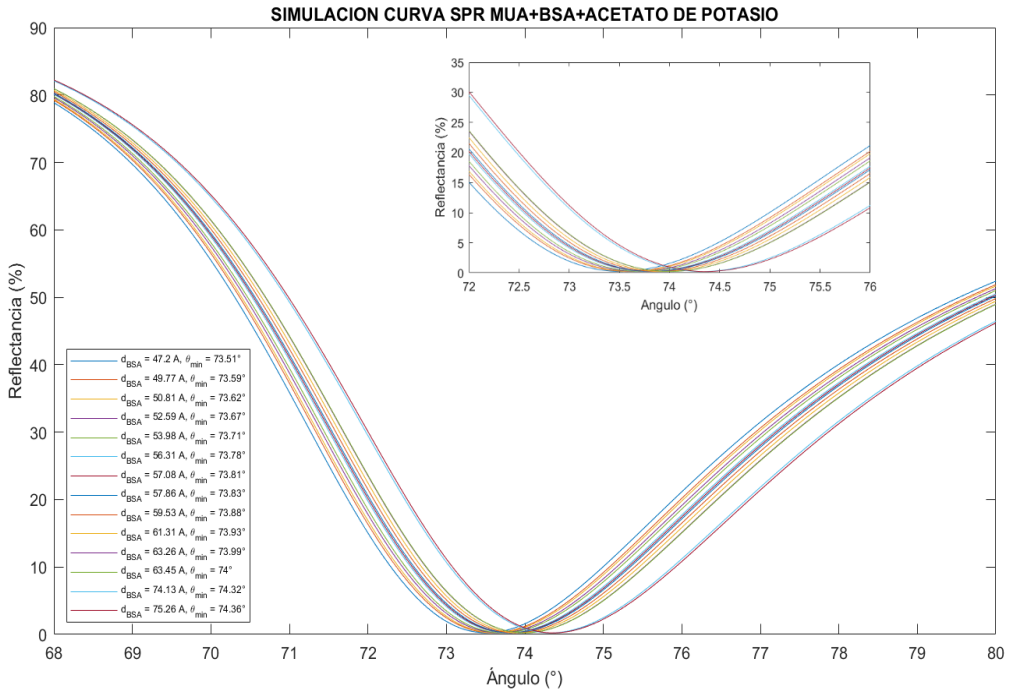

Figura 4.17 Intensidad de salida del sensor SPR calculada para un sistema de 5 capas: vidrio/oro/monocapa de MUA/monocapa de BSA/buffer acetato de potasio, para distintos espesores calculados de la proteína BSA.

De la misma manera, la **Figura 4.18** representa la curva obtenida para el modelo de 5 capas para la proteína Vidrio/Oro/MUA/Proteína1/Buffer para la proteína HSA ($n = 1.575$), el espesor de dicha proteína lo variamos con los 8 espesores obtenidos con Autodock y Pymol en **Tabla 4.3**, para la solución buffer se utilizó Acetato de Sodio ($n = 1.3525$) [123]. Cada color representa la curva SPR obtenida correspondiente a cada espesor de 44.06, 49.4, 50.43, 52.34, 54.83, 62.74, 62.87 y 68.21 Å. En la gráfica inserta de la **Figura 4.18** se muestra un acercamiento del comportamiento de los ángulos de resonancia (θ_{SPR}) que muestra valores de 70.75, 70.91, 70.94, 70.99, 71.07, 71.3, 71.31, 71.47 °, respectivamente. Observamos de manera general que la curva SPR se desplaza hacia la derecha cuando los espesores de la película son mayores. Por tanto, el fenómeno SPR nos puede dar información del aminoácido receptor más probable de la proteína bajo estudio y el alcanotiol 11-MUA.

Se ha obtenido un rango de variación en el espesor de la monocapa adsorbida de proteína igual a 24.15 Å mediante las simulaciones en Autodock. En consecuencia, las 8 curvas SPR presentadas en la **Figura 4.18** muestran una variabilidad en el ángulo SPR de $0.72°$. Sin embargo, con el propósito de realizar un análisis más preciso, se tomará en cuenta el espesor promedio calculado en la **Tabla 4.3** como el promedio ponderado de los espesores obtenidos en Autodock.

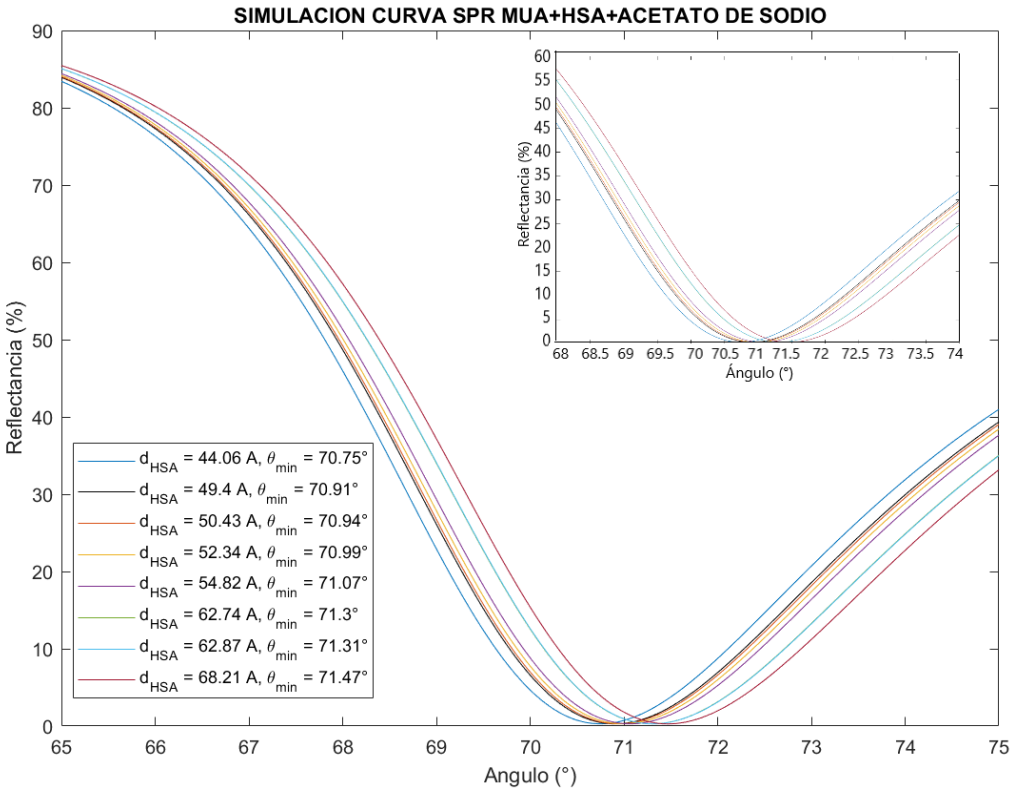

Figura 4.18 Intensidad de reflectancia de salida del sensor SPR calculada para un sistema de 5 capas: vidrio/oro/monocapa de MUA/monocapa de HSA/buffer acetato de sodio, para distintos espesores calculados de la proteína HSA.

A continuación, presentamos la curva SPR para las diferentes fases del sensor, repitiendo el proceso para la inmunoglobulina anteriormente. Para el segundo sistema en el que trabajamos, utilizamos la proteína BSA. Como punto de partida, se muestra el montaje más sencillo (línea negra sólida, **Figura 4.19**): vidrio/oro/buffer Acetato de Potasio ($n = 1.37$). La línea negra punteada representa el cálculo obtenido al añadir el compuesto que permiten el enlace de las proteínas ligando a la superficie metálica: MUA. Para la siguiente fase, la línea azul sólida representa el resultado obtenido al añadir el primer compuesto para activar el grupo carboxilo del alcanotiol: EDC. Seguido de esto, la línea azul segmentada, representa el cálculo conseguido al añadir el segundo compuesto para activar el grupo carboxilo: NHS; retirando la capa anterior EDC. Por su parte, la línea negra segmentada-punteada representa el resultado de añadir a la anterior, y antes del buffer, una monocapa de BSA ($n = 1.575$) para esta ocasión se seleccionó el espesor promedio de la película obtenida con los sitios de unión más probable ($d_{BSA} = 59.14$ Å), obteniendo un ángulo SPR $\theta_{BSA} = 73.87°$, cabe señalar que la capa del compuesto NHS fue retirada para este cálculo. Por último, la línea negra segmentada representa las capas anteriores más otra monocapa de la proteína anti-BSA, esta proteína es la encargada de que ocurra la interacción anticuerpo-antígeno con el anticuerpo ($n = 1.542$, $d_{anti-BSA} = 40$ Å), como resultado se obtuvo el ángulo SPR para esta fase del biosensor igual a $\theta_{anti-BSA} = 75.08°$. Siguiendo la misma dinámica para la proteína HSA, ahora para el espesor promedio obtenido para HSA ($n = 1.575$, $d_{HSA} = 57.51$ Å) y anti-HSA ($n = 1.542$, $d_{anti-HSA} = 55$ Å), se obtuvieron las curvas SPR de las diferentes etapas mostradas en la **Figura 4.20**, con ángulos SPR $\theta_{HSA} = 71.15°$ y $\theta_{anti-HSA} = 72.84°$ respectivamente [124].

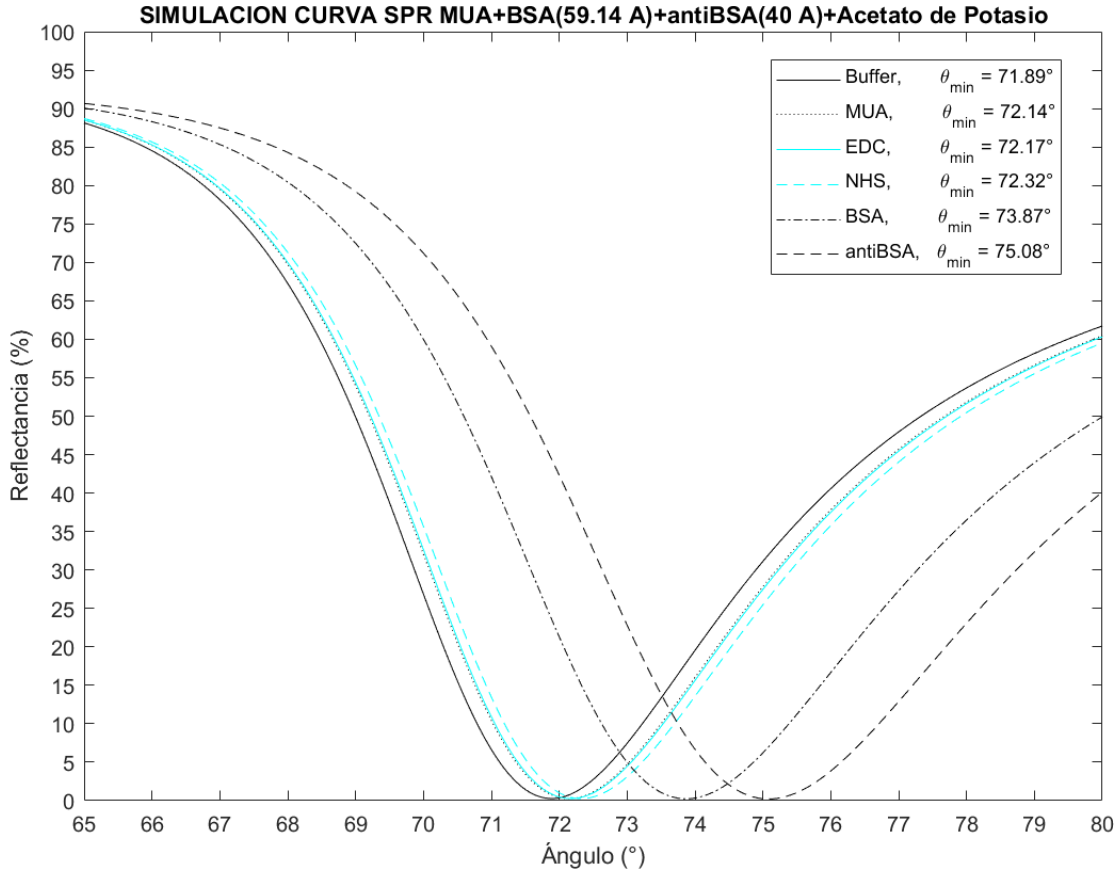

Figura 4.19 Intensidad de salida del biosensor SPR (BSA – antiBSA) calculada considerando distintas etapas.

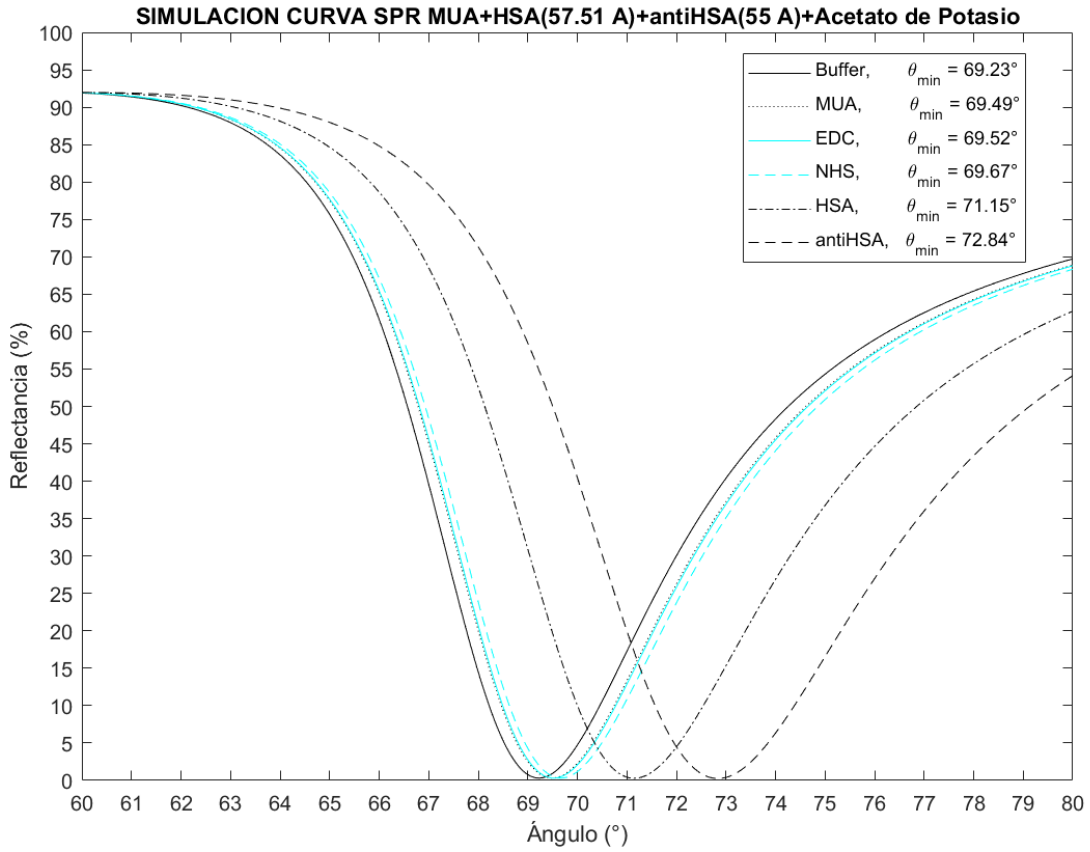

Figura 4.20 Intensidad de salida del biosensor SPR (HSA – antiHSA) calculada considerando distintas etapas.

Con motivo de analizar y comprar las respuestas de los tres biosensores propuestos, se obtuvieron las curvas SPR para los sistemas IgG1-gp120, BSA-antiBSA, HSA-antiHSA utilizando un mismo buffer con pH neutro para las proteínas (buffer HEPES $\mathrm{pH} = 7.4$), y de esta manera obtener el rango de variación de ángulo SPR entre los distintos biosensores, dicho arreglo se muestra en la **Figura 4.12**. En la figura podemos notar que el ángulo SPR para las proteínas bioreceptoras, IgG1 b12, BSA y HSA son $70.16°, 68.54°, 68.49°$ respectivamente. Luego, haciendo la simulación para un sistema en el que las proteínas bioreceptoras han interaccionado con su respectivo analito: gp120, antiBSA y antiHSA, se obtuvo los ángulos SPR iguales a $70.54°, 69.77°, 70.19°$, consiguiendo de esta manera un cambio en el ángulo SPR de $0.38°, 1.23°, 1.70°$ respectivamente.

Así mismo, podemos notar que la región lineal para este conjunto de curvas SPR se encuentra en la vecindad del ángulo $\theta_c = 67°$ el cual llamaremos ángulo de alto contraste, mencionado anteriormente en la **Sección 2.3**. Este ángulo, que coincide con el 20% de la reflectancia, es el ángulo que nos permitiría relacionar proporcionalmente la reflectancia con el índice de refracción de la muestra a analizar en un experimento de microarreglos con estas tres proteínas propuestas, cómo se mostró en la ecuación

(2.19). Esta información fue colocada en la **Tabla 4.4**, en la que se presenta la diferencia de la reflectancia en el ángulo de alto contraste para cada anticuerpo con su respectivo antígeno, encontrando que la diferencia de reflectancia para el sistema IgG1 b12/gp120 es $\Delta R = 5.49\,\%$, para HSA/antiHSA es $\Delta R = 32.78\,\%$ y para BSA/antiBSA es $\Delta R = 24.77\,\%$. Con esta información podemos afirmar que existe la posibilidad de crear un microarreglo utilizando estas tres proteínas, obteniendo la respuesta del sensor a un ángulo fijo igual al ángulo de alto contraste $\theta_c = 67°$.

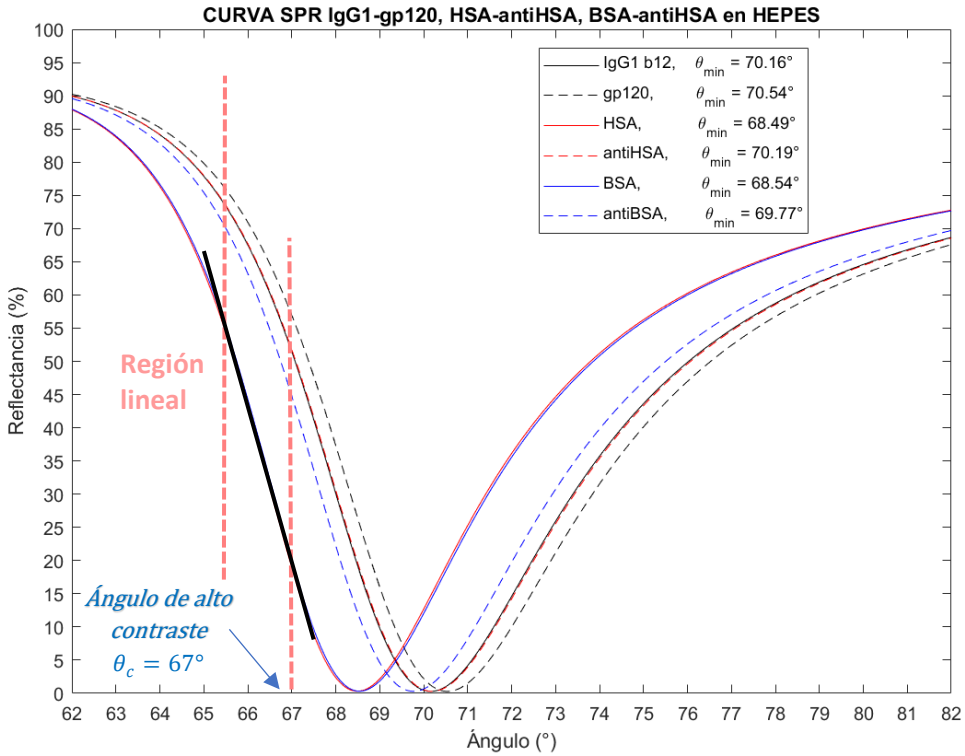

Figura 4.21 Intensidad de salida del sensor SPR para tres biosensores propuestos (IgG1 b12-gp120, HSA-antiHSA, BSA-antiBSA) calculada considerando una solución de buffer HEPES.

Tabla 4.4 Diferencia en la reflectancia y ángulo $\Delta\theta_{spr}$ del biosensor con capas adsorbidas MUA-antígeno y su interacción con su anticuerpo en el ángulo de alto contraste θ_c.

Anticuerpo	R (%)	θ_{spr} (°)	Antígeno/Anticuerpo	R (%)	θ_{spr} (°)	ΔR (%)	$\Delta\theta_{spr}$ (°)
IgG1b12	51.47	70.16	gp120/IgG1b12	56.96	70.54	5.49	0.38
HSA	19.03	68.49	Anti-HSA/HSA	51.81	70.19	32.78	1.70
BSA	20.03	68.54	Anti-BSA/BSA	44.80	69.77	24.77	1.23

Conclusiones

En este trabajo, presentamos un estudio teórico de la interacción de la luz con un sistema SPR de hasta 6 capas, utilizando las ecuaciones de Fresnel y un modelo general para el cálculo de la reflexión de la luz por medios estratificados (Hansen, 1967 y Abelès, 1950). De esta manera, se simularon las curvas de calibración de un sensor SPR, obteniendo un factor de sensibilidad de $\mathrm{m} = 72.4178\ °/\mathrm{RIU}$.

Se simuló la respuesta del biosensor SPR para una interacción antígeno-anticuerpo para tres proteínas diferentes, IgG1 b12, BSA y HSA. Para llevar a cabo esta tarea, fue necesario proponer un protocolo de prefuncionalización y funcionalización de la superficie sensora. Así mismo, se realizó una simulación de las interacciones de Van der Waals y puentes de hidrógeno entre la monocapa orgánica con grupos carboxilo-terminales MUA y las proteínas encargadas del reconocimiento biológico entre antígeno-anticuerpo a través de Autodock Vina, para obtener los sitios de unión entre el compuesto MUA y dichas proteínas. Además de realizar una optimización geométrica en Avogadro Chemistry para los dos compuestos (EDC y NHS) encargados de la activación química del grupo carboxilo del alcanotiol MUA para dar lugar al acoplamiento amino. De esta manera, se obtuvieron los espesores de las películas adsorbidas en el biosensor para cada una de las etapas del protocolo de funcionalización. El espesor total de la película funcional (MUA/EDC/NHS) fue cercano a $23\ \text{Å}$.

Así mismo, se determinaron las regiones más probables de interacción de MUA con tres proteínas (HSA, BSA e IgG) a través del software Autodock Vina. Determinando los siguientes parámetros, para la monocapa de proteína IgG tiene un espesor promedio $d_{\mathrm{IgG}} = 128.46\ \text{Å}$, para la proteína BSA un $d_{\mathrm{BSA}} = 59.14\ \text{Å}$ y para la proteína HSA un espesor $d_{\mathrm{HSA}} = 57.51\ \text{Å}$.

Seguidamente, se logró replicar y complementar las curvas de calibración de un sensor SPR elaboradas experimentalmente (Jung et al., 1998), obteniendo los distintos ángulos SPR para una serie de índices de refracción de diferentes concentraciones de etanol diluido en agua. Se consiguió obtener una réplica de las curvas experimentales en la región lineal y no lineal. Asimismo, se desarrolló y analizó el modelo propuesto por Jung et al. 1998 para cuantificar el número de proteínas soluto que interactúan con la superficie del sensor SPR.

Finalmente, se muestra las respuestas del dispositivo sensor luego de agregar cada monocapa sobre la superficie del biosensor necesarias para el anclado covalente de los tres antígenos IgG, BSA y HSA propuestos en esta tesis. Se observa mediante la simulación de curvas SPR que las diferentes capas adsorbidas para una correcta

funcionalización de proteínas se ubican en la región lineal con un cambio en la respuesta SPR de entre 1.7° a 0.38° y encontramos los siguientes parámetros: para la monocapa de moléculas orgánicas como MUA, EDC y NHS los espesores $d_{\mathrm{MUA}} = 15.23\,\text{Å}$, $d_{\mathrm{EDC}} = 2.104\,\text{Å}$ y $d_{\mathrm{NHS}} = 5.76\,\text{Å}$ respectivamente. Para la monocapa de proteína IgG un espesor $d_{\mathrm{IgG}} = 128.46\,\text{Å}$ y un ángulo minino SPR de $\theta_{IgG} = 70.16°$; para la proteína BSA un $d_{\mathrm{BSA}} = 59.14\,\text{Å}$ y un $\theta_{BSA} = 73.87°$ y para la proteína HSA un espesor $d_{\mathrm{HSA}} = 57.51\,\text{Å}$ y un $\theta_{HSA} = 71.15°$. Observamos de manera general un desplazamiento de las curvas SPR del θ_{spr} del biosensor de HSA cuando interacciona con el antígeno-HSA de $\Delta\theta_{spr} = 1.7\,°$, para el biosensor de BSA con su correspondiente antígeno de $\Delta\theta_{spr} = 1.22\,°$ y para el biosensor de IgG b12 con el antígeno gp120 de $\Delta\theta_{spr} = 0.38\,°$. Así mismo, se obtuvo que en un buffer neutro (HEPES), los tres biosensores propuestos se encuentran en la región lineal, con un ángulo de contraste $\theta_c = 67°$. Consiguiendo así que el cambio de reflectancia para el sistema IgG1 b12/gp120 es $\Delta\mathrm{R} = 5.49\,\%$, para HSA/antiHSA es $\Delta\mathrm{R} = 32.78\,\%$ y para BSA/antiBSA es $\Delta\mathrm{R} = 24.77\,\%$. Lo que da a lugar diferentes propuestas de actividades para la continuación de este trabajo, como lo es la elaboración de microarreglo de inmunosensores de las proteínas BSA, HSA e IgG1, la comparación experimental de estos tres biosensores propuestos en esta tesis, la cuantificación de proteínas adsorbidas en la superficie y la determinación la relación constante de adsorción, desorción y equilibrio de los inmunosensores.

Bibliografía

[1] P. Alivisatos, “The use of nanocrystals in biological detection,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 22, no. 1, pp. 47–52, 2004, doi: 10.1038/nbt927.

[2] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, “Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification1International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, no. 1, pp. 121–131, 2001, doi: https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4.

[3] Y. Jeong-Yeol, *Introduction to Biosensors*, Second. Springer, 2016.

[4] M. Soler-Aznar, “Nanoplasmonic Biosensors for Clinical Diagnosis at the Point of Care,” Universitat Autònoma de Barcelona, 2015.

[5] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Actuators, “Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing,” *Sensors and Actuators*, vol. 4, pp. 299–304, 1983.

[6] R. Karlsson, A. Michaelsson, and L. Mattsson, “Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system,” *J. Immunol. Methods*, vol. 145, pp. 229–240, 1991.

[7] N. J. de Mol and M. J. E. Fischer, “Surface plasmon resonance: A general introduction.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 627, pp. 1–14, 2010, doi: 10.1007/978-1-60761-670-2_1.

[8] E. Baldrich, A. Restrepo, and C. K. O’Sullivan, “Aptasensor Development: Elucidation of Critical Parameters for Optimal Aptamer Performance,” *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 23, pp. 7053–7063, Dec. 2004, doi: 10.1021/ac049258o.

[9] M. L. Doyle, D. G. Myszka, and I. M. Chaiken, “Molecular interaction analysis in ligand design using mass transport, kinetic and thermodynamic methods,” *J. Mol. Recognit.*, vol. 9, no. 2, pp. 65–74, Mar. 1996, doi: https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(199603)9:2<65::AID-JMR245>3.0.CO;2-B.

[10] W. Knoll, “Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 49, no. 1, pp. 569–638, 1998, doi: 10.1146/annurev.physchem.49.1.569.

[11] J. Homola, “Present and future of surface plasmon resonance biosensors,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 377, no. 3, pp. 528–539, 2003, doi: 10.1007/s00216-003-2101-0.

[12] L. S. Jung, C. T. Campbell, T. M. Chinowsky, M. N. Mar, and S. S. Yee,

"Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films," *Langmuir*, vol. 14, no. 19, pp. 5636–5648, Sep. 1998, doi: 10.1021/la971228b.

[13] R. Schasfoort and A. Tudos, *Handbook of surface plasmon resonance*. UK: RSC Publishing, 2008.

[14] E. Kretschmann, "Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen," *Zeitschrift für Phys. A Hadron. Nucl.*, vol. 241, no. 4, pp. 313–324, 1971, doi: 10.1007/BF01395428.

[15] D. Wassaf *et al.*, "High-throughput affinity ranking of antibodies using surface plasmon resonance microarrays," *Anal. Biochem.*, vol. 351, no. 2, pp. 241–253, 2006, doi: https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.043.

[16] M. Pérez-Morales, J. M. Pedrosa, E. Muñoz, M. T. Martín-Romero, D. Möbius, and L. Camacho, "Ellipsometric study of a phospholipid monolayer at the air–water interface in presence of large organic counter ions," *Thin Solid Films*, vol. 488, no. 1, pp. 247–253, 2005, doi: https://doi.org/10.1016/j.tsf.2005.04.080.

[17] J. Ctyrokya, J. Homola, and M. Skalskya, "No Title," *Opt. Quantum Electron.*, vol. 29, pp. 301–311, 1997.

[18] C. R. Yonzon, E. Jeoung, S. Zou, G. C. Schatz, M. Mrksich, and R. P. Van Duyne, "A Comparative Analysis of Localized and Propagating Surface Plasmon Resonance Sensors: The Binding of Concanavalin A to a Monosaccharide Functionalized Self-Assembled Monolayer," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 39, pp. 12669–12676, Oct. 2004, doi: 10.1021/ja047118q.

[19] T. L. McMeekin, M. Groves, and N. J. Hipp, "Refractive Indices of Amino Acids, Proteins, and Related Substances," in *Amino Acids and Serum Proteins*, vol. 44, 1964, pp. 54–66.

[20] E. de Juan-Fraco, "Estrategias de inmovilización de anticuerpos para la detección directa de hormonas mediante Inmunosensores de Resonancia de Plasmón Superficial," Universitat Autònoma de Barcelona, 2013.

[21] W. Hansen, "Electric Fields Produced by the Propagation of Plane Coherent Electromagnetic Radiation in a Stratified Medium," *J. Opt. Soc. Am.*, vol. 58, no. 3, pp. 380–390, 1968, doi: 10.1364/JOSA.58.000380.

[22] F. Abelès, "Recherches sur la propagation des ondes électromagnétiques sinusoïdales dans les milieux stratifiés," *Ann. Phys. (Paris).*, vol. 12, no. 5, pp. 706–782, 1950, doi: 10.1051/anphys/195012050706.

[23] P. Ripphausen, B. Nisius, L. Peltason, and J. Bajorath, "Quo Vadis, Virtual Screening? A Comprehensive Survey of Prospective Applications," *J. Med. Chem.*, vol. 53, no. 24, pp. 8461–8467, Dec. 2010, doi: 10.1021/jm101020z.

[24] S. Forli and A. J. Olson, “A Force Field with Discrete Displaceable Waters and Desolvation Entropy for Hydrated Ligand Docking,” *J. Med. Chem.*, vol. 55, no. 2, pp. 623–638, Jan. 2012, doi: 10.1021/jm2005145.

[25] S. A. Maier, *Plasmonics: fundamentals and applications*. Bath: Springer, 2007.

[26] J. D. Jackson, *Classical Electrodynamics*, 3rd ed. Hoboken, 1999.

[27] J. B. Marion and M. A. Heald, “Reflection and Refraction,” in *Classical Electromagnetic Radiation*, 2nd ed., Academic Press, 1965, pp. 159–197.

[28] A. V Nabok, A. Tsargorodskaya, A. K. Hassan, and N. F. Starodub, “Total internal reflection ellipsometry and SPR detection of low molecular weight environmental toxins,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 246, no. 4, pp. 381–386, 2005, doi: https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2004.11.084.

[29] M. Yamamoto, “Surface Plasmon Resonance (SPR) Theory: Tutorial,” vol. 48, no. 3, pp. 209–237, 2002.

[30] O. Söhnel and P. Novotný, *Densities of aqueous solutions of inorganic substances*, vol. 22. Elsevier Publishing Company, 1985.

[31] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lundström, “Biosensing with surface plasmon resonance — how it all started,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 10, no. 8, pp. i–ix, 1995, doi: https://doi.org/10.1016/0956-5663(95)96965-2.

[32] D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 87 th. Boston: CRC Press, 1990.

[33] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, and C. Urbaniczky, “Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 143, no. 2, pp. 513–526, 1991, doi: https://doi.org/10.1016/0021-9797(91)90284-F.

[34] W. Lukosz, “Integrated-optical and surface-plasmon sensors for direct affinity sensing. Part II: Anisotropy of adsorbed or bound protein adlayers,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 12, no. 3, pp. 175–184, 1997, doi: https://doi.org/10.1016/S0956-5663(97)85335-3.

[35] R. P. H. Kooyman, H. Kolkman, J. Van Gent, and J. Greve, “Surface plasmon resonance immunosensors: sensitivity considerations,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 213, pp. 35–45, 1988, doi: https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)81337-9.

[36] E. D. Palik and G. Ghosh, *Handbook of Optical Constants of Solids*. Orlando, Florida: Academic Press, 1985.

[37] J. S. Shumaker-Parry and C. T. Campbell, “Quantitative Methods for Spatially Resolved Adsorption/Desorption Measurements in Real Time by Surface Plasmon Resonance Microscopy,” *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 4, pp. 907–917, Feb. 2004, doi: 10.1021/ac034962a.

[38] V. SK and J. Luong, “Immunoassays: An Overview,” in *Handbook of Immunoassay Technologies*, 2018, pp. 1–18.

[39] G. Evtugyn, *Biosensors: Essentials*. Springer, 2014.

[40] S. K. Vashist, E. Lam, S. Hrapovic, K. B. Male, and J. H. T. Luong, “Immobilization of Antibodies and Enzymes on 3-Aminopropyltriethoxysilane-Functionalized Bioanalytical Platforms for Biosensors and Diagnostics,” *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 21, pp. 11083–11130, Nov. 2014, doi: 10.1021/cr5000943.

[41] I. Jeppsson *et al.*, “Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method.,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 45, no. 4, pp. 558–562, 2007.

[42] K. Matsubara, S. Kawata, and S. Minami, “Optical chemical sensor based on surface plasmon measurement,” *Appl. Opt.*, vol. 27, no. 6, pp. 1160–1163, Mar. 1988, doi: 10.1364/AO.27.001160.

[43] D. L. Nelson, C. M. Cuchillo-Foix, A. L. Lehninger, and M. M. Cox, *Lehninger: Principios de Bioquímica*. Barcelona: Omega, 2005.

[44] C. K. Mathews, K. E. Van-Holde, D. R. Appling, and S. J. Anthony-Cahill, *Biochemestry*, 4th ed. Toronto: Pearson, 2013.

[45] F. Schubert, U. Wollenberger, F. W. Scheller, and H. . Müller, “Artificially Coupled Reactions with Immobilized Enzymes: Biological Analogs and Technical Consequences.,” in *Bioinstrumentation and Biosensors*, Marcel Dek., D. L. Wise, Ed. New York, 1991, pp. 19–38.

[46] T. Jiang, M. Minunni, P. Wilson, J. Zhang, A. P. F. Turner, and M. Mascini, “Detection of TP53 mutation using a portable surface plasmon resonance DNA-based biosensor,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, no. 10, pp. 1939–1945, 2005, doi: https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.08.040.

[47] E. Gizeli and C. R. Lowe, “Immunosensors,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 7, no. 1, pp. 66–71, 1996, doi: https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80097-8.

[48] D. E. P. Souto, J. Volpe, C. de C. Gonçalves, C. H. I. Ramos, and L. T. Kubota, “A brief review on the strategy of developing SPR-based biosensors for application to the diagnosis of neglected tropical diseases,” *Talanta*, vol. 205, p. 120122, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120122.

[49] N. J. Ronkainen-Matsuno, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, “Electrochemical biosensors.,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, pp. 1747–1763, 2010.

[50] M. Álvarez, L. G. Carrascosa, K. Zinoviev, J. A. Plaza, and L. M. Lechuga, “Biosensors Based on Cantilevers,” in *Biosensors and Biodetection*, A. Rasooly and K. E. Herold, Eds. Totowa, NJ: Humana Press, 2009, pp. 51–71.

[51] F. S. Ligler and C. . Taitt, *Optical biosensors: today and tomorrow*. 2011.

[52] R. Narayanaswamy and O. S. Wolfbeis, *Optical sensors: industrial, environmental and diagnostic applications.* 2004.

[53] M. E. Bosch, A. J. R. Sánchez, F. S. Rojas, and C. B. Ojeda, “Recent Development in Optical Fiber Biosensors,” *Sensors (Basel).*, vol. 7, no. 6, pp. 797–859, Jun. 2007.

[54] C. S. Huertas, O. Calvo-Lozano, A. Mitchell, and L. M. Lechuga, “Advanced Evanescent-Wave Optical Biosensors for the Detection of Nucleic Acids: An Analytic Perspective,” *Front. Chem.*, vol. 7, p. 724, 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00724.

[55] H. N. Daghestani and B. W. Day, “Theory and Applications of Surface Plasmon Resonance, Resonant Mirror, Resonant Waveguide Grating, and Dual Polarization Interferometry Biosensors,” *Sensors*, vol. 10, no. 11, pp. 9630–9646, 2010, doi: 10.3390/s101109630.

[56] V. M. N. Passaro, F. Dell’Olio, B. Casamassima, and F. De Leonardis, “Guided-Wave Optical Biosensors,” *Sensors*, vol. 7, no. 4, pp. 508–536, 2007, doi: 10.3390/s7040508.

[57] E. Melnik, *Photolithographic local surface modification of integrated evanescent wave based biosensors*. 2013.

[58] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lunström, “Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing,” *Sensors and Actuators*, vol. 4, pp. 299–304, 1983, doi: https://doi.org/10.1016/0250-6874(83)85036-7.

[59] J. Homola, “Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species,” *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 2, pp. 462–493, Feb. 2008, doi: 10.1021/cr068107d.

[60] J. X. J. Zhang and K. Hoshino, “Optical transducers: Optical molecular sensing and spectroscopy,” in *Micro and Nano Technologies*, J. X. J. Zhang and K. B. T.-M. S. and N. (Second E. Hoshino, Eds. Academic Press, 2019, pp. 231–309.

[61] H. Raether, “Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings,” in *Surface plasmons on gratings*, H. Raether, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1988, pp. 91–116.

[62] R. Kashyap and G. Nemova, “Surface plasmon resonance-based fiber and planar waveguide sensors.,” *J. Sensors*, vol. 2009, 2009.

[63] K. Nagata and H. Handa, *Real-time analysis of biomolecular interactions.* 2000.

[64] J. Homola, *Surface plasmon resonance based sensors.* Springer, 2006.

[65] D. R. Shankaran and N. Miura, “Trends in interfacial design for surface plasmon resonance based immunoassays,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 40, no. 23, pp. 7187–7200, Nov. 2007, doi: 10.1088/0022-3727/40/23/s02.

[66] Z. Díaz-Betancor, “Vías de inmovilización de biomoléculas sobre SU-8 y otras superficies poliméricas para su utilización en biosensado óptico sin marcaje,” Universitat Politècnica de València, 2020.

[67] S. Ferretti, S. Paynter, D. A. Russell, K. E. Sapsford, and D. J. Richardson, “Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 19, no. 9, pp. 530–540, 2000, doi: https://doi.org/10.1016/S0165-9936(00)00032-7.

[68] R. G. Nuzzo and D. L. Allara, “Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 105, no. 13, pp. 4481–4483, Jun. 1983, doi: 10.1021/ja00351a063.

[69] L. H. Dubois and R. G. Nuzzo, “Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 43, no. 1, pp. 437–463, Oct. 1992, doi: 10.1146/annurev.pc.43.100192.002253.

[70] A. Ulman, “Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers,” *Chem. Rev.*, vol. 96, no. 4, pp. 1533–1554, Jan. 1996, doi: 10.1021/cr9502357.

[71] G. M. Whitesides and P. E. Laibinis, “Wet chemical approaches to the characterization of organic surfaces: self-assembled monolayers, wetting, and the physical-organic chemistry of the solid-liquid interface,” *Langmuir*, vol. 6, no. 1, pp. 87–96, Jan. 1990, doi: 10.1021/la00091a013.

[72] E. Briand, M. Salmain, J.-M. Herry, H. Perrot, C. Compère, and C.-M. Pradier, “Building of an immunosensor: How can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency?,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 3, pp. 440–448, 2006, doi: https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.05.018.

[73] S. Chen, L. Li, C. L. Boozer, and S. Jiang, “Controlled Chemical and Structural Properties of Mixed Self-Assembled Monolayers by Coadsorption of Symmetric and Asymmetric Disulfides on Au(111),” *J. Phys. Chem. B*, vol. 105, no. 15, pp. 2975–2980, Apr. 2001, doi: 10.1021/jp0040650.

[74] P. L. Domen, J. R. Nevens, A. K. Mallia, G. T. Hermanson, and D. C. Klenk, “Site-directed immobilization of proteins,” *J. Chromatogr. A*, vol. 510, pp. 293–302, 1990, doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)93763-X.

[75] E. O. Saphire *et al.*, “Contrasting IgG Structures Reveal Extreme Asymmetry and Flexibility,” *J. Mol. Biol.*, vol. 319, no. 1, pp. 9–18, 2002, doi: https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00244-9.

[76] B. J. Underdown and J. M. Schiff, “Immunoglobulin A: Strategic Defense Initiative at the Mucosal Surface,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 1, pp. 389–417, Apr. 1986, doi: 10.1146/annurev.iy.04.040186.002133.

[77] R. Geisberger, M. Lamers, and G. Achatz, “The riddle of the dual expression of

IgM and IgD.," *Immunology*, vol. 118, no. 4, pp. 429–437, 2006.

[78] G. B. Pier, J. B. Lyczak, and L. M. Wetzler, *Immunology, infection, and immunity.* ASM Press, 2004.

[79] T. J. A. Ewing, S. Makino, A. G. Skillman, and I. D. Kuntz, "DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases," *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, vol. 15, no. 5, pp. 411–428, 2001, doi: 10.1023/A:1011115820450.

[80] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, and R. Taylor, "Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking11Edited by F. E. Cohen," *J. Mol. Biol.*, vol. 267, no. 3, pp. 727–748, 1997, doi: https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897.

[81] B. Kramer, M. Rarey, and T. Lengauer, "Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein–ligand docking," *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 37, no. 2, pp. 228–241, Nov. 1999, doi: https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19991101)37:2<228::AID-PROT8>3.0.CO;2-8.

[82] H. Gohlke, M. Hendlich, and G. Klebe, "Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions11Edited by R. Huber," *J. Mol. Biol.*, vol. 295, no. 2, pp. 337–356, 2000, doi: https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3371.

[83] I. Muegge and Y. C. Martin, "A General and Fast Scoring Function for Protein−Ligand Interactions: A Simplified Potential Approach," *J. Med. Chem.*, vol. 42, no. 5, pp. 791–804, Mar. 1999, doi: 10.1021/jm980536j.

[84] H. J. Bohm and M. Stahl, "Rapid empirical scoring functions in virtual screening applications," *Med Chem Res*, vol. 9, pp. 445–462, 1999.

[85] J. R. H. Tame, "Scoring functions: A view from the bench," *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, vol. 13, no. 2, pp. 99–108, 1999, doi: 10.1023/A:1008068903544.

[86] D. Rognan, S. L. Lauemøller, A. Holm, S. Buus, and V. Tschinke, "Predicting Binding Affinities of Protein Ligands from Three-Dimensional Models: Application to Peptide Binding to Class I Major Histocompatibility Proteins," *J. Med. Chem.*, vol. 42, no. 22, pp. 4650–4658, Nov. 1999, doi: 10.1021/jm9910775.

[87] I. Massova and P. A. Kollman, "Combined molecular mechanical and continuum solvent approach (MM-PBSA/GBSA) to predict ligand binding," *Perspect. Drug Discov. Des.*, vol. 18, no. 1, pp. 113–135, 2000, doi: 10.1023/A:1008763014207.

[88] B. K. Shoichet, A. R. Leach, and I. D. Kuntz, "Ligand solvation in molecular docking," *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 34, no. 1, pp. 4–16, Jan. 1999, doi: https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19990101)34:1<4::AID-PROT2>3.0.CO;2-6.

[89] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus, “CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations,” *J. Comput. Chem.*, vol. 4, no. 2, pp. 187–217, Jun. 1983, doi: https://doi.org/10.1002/jcc.540040211.

[90] S. L. Mayo, B. D. Olafson, and W. A. Goddard, “DREIDING: a generic force field for molecular simulations,” *J. Phys. Chem.*, vol. 94, no. 26, pp. 8897–8909, Dec. 1990, doi: 10.1021/j100389a010.

[91] T. A. Halgren, “Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94,” *J. Comput. Chem.*, vol. 17, no. 5–6, pp. 490–519, Apr. 1996, doi: https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P.

[92] W. D. Cornell *et al.*, “A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, no. 19, pp. 5179–5197, May 1995, doi: 10.1021/ja00124a002.

[93] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, and D. A. Case, “Development and testing of a general amber force field,” *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 9, pp. 1157–1174, Jul. 2004, doi: https://doi.org/10.1002/jcc.20035.

[94] J. D. Andrade and V. Hlady, “Protein adsorption and materials biocompatibility: A tutorial review and suggested hypotheses,” *Adv. Polym. Sci.*, vol. 79, pp. 1–63, 1986.

[95] W. Norde, “Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 25, pp. 267–340, 1986, doi: https://doi.org/10.1016/0001-8686(86)80012-4.

[96] T. A. Horbertt and J. L. Brash, *Proteins at Interfaces. Physicochemical and Biochemical Studies*. Washington, D.C., 1987.

[97] A. Sadana and A. M. Beelaram, “Antigen-antibody diffusion-limited binding kinetics of biosensors: a fractal analysis,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 10, no. 3, pp. 301–316, 1995, doi: https://doi.org/10.1016/0956-5663(95)96849-T.

[98] S. N. Khilko, M. Corr, L. F. Boyd, A. Lees, J. K. Inman, and D. H. Margulies, “Direct detection of major histocompatibility complex class I binding to antigenic peptides using surface plasmon resonance. Peptide immobilization and characterization of binding specificity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 21, pp. 15425–15434, 1993, doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)82275-X.

[99] K. D. Park and S. Q. Kim, *Poly (ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications*. New York, London: Plenum Press, 1992.

[100] D. Horsley, J. Herron, V. Hlady, and A. J. D., *Proteins at interfaces: physicochemical and biochemical studies*. Washington, D.C.: ACS Publications,

1987.

[101] I. Pockrand, J. D. Swalen, J. G. Gordon, and M. R. Philpott, “Surface plasmon spectroscopy of organic monolayer assemblies,” *Surf. Sci.*, vol. 74, no. 1, pp. 237–244, 1978, doi: https://doi.org/10.1016/0039-6028(78)90283-2.

[102] P. B. Daniels, J. K. Deacon, M. J. Eddowes, and D. G. Pedley, “Surface plasmon resonance applied to immunosensing,” *Sensors and Actuators*, vol. 15, no. 1, pp. 11–18, 1988, doi: https://doi.org/10.1016/0250-6874(88)85013-3.

[103] U. Jönsson, M. Malmqvist, and I. Ronnberg, “Adsorption of immunoglobulin G, protein A, and fibronectin in the submonolayer region evaluated by a combined study of ellipsometry and radiotracer techniques,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 103, no. 2, pp. 360–372, 1985, doi: https://doi.org/10.1016/0021-9797(85)90115-8.

[104] V. Hlady and J. D. Andrade, “Fluorescence emission from adsorbed bovine serum albumin and albumin-bound 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate studied by TIRF,” *Colloids and Surfaces*, vol. 32, pp. 359–369, 1988, doi: https://doi.org/10.1016/0166-6622(88)80029-5.

[105] G. Nimeri, B. O. Lassen, C. G. Gölander, U. Nilsson, and H. Elwing, “Adsorption of fibrinogen and some other proteins from blood plasma at a variety of solid surfaces,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 6, no. 6, pp. 573–583, Jan. 1995, doi: 10.1163/156856294X00527.

[106] E. O. Saphire *et al.*, “Crystal Structure of a Neutralizing Human IgG Against HIV-1: A Template for Vaccine Design,” *Science (80-.).*, vol. 293, no. 5532, pp. 1155–1159, Aug. 2001, doi: 10.1126/science.1061692.

[107] M. Brigham-Burke, J. R. Edwards, and D. J. O’Shannessy, “Detection of receptor-ligand interactions using surface plasmon resonance: Model studies employing the HIV-1 gp120/CD4 interaction,” *Anal. Biochem.*, vol. 205, no. 1, pp. 125–131, 1992, doi: https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90588-X.

[108] H. N. Po and N. M. Senozan, “The Henderson-Hasselbalch Equation: Its History and Limitations,” *J. Chem. Educ.*, vol. 78, no. 11, p. 1499, Nov. 2001, doi: 10.1021/ed078p1499.

[109] K. Schöning-Stierand *et al.*, “ProteinsPlus: interactive analysis of protein–ligand binding interfaces.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 48, pp. W48–W53, 2020.

[110] G. M. Morris *et al.*, “AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility,” *J. Comput. Chem.*, vol. 30, no. 16, p. 2785, Dec. 2009, doi: 10.1002/JCC.21256.

[111] A. Bujacz, “Structures of bovine, equine and leporine serum albumin,” *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 68, no. 10, pp. 1278–1289, Oct. 2012,

doi: 10.1107/S0907444912027047.

[112] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, and K. Kobayashi, “Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution,” *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 12, no. 6, pp. 439–446, Jun. 1999, doi: 10.1093/protein/12.6.439.

[113] K. Wadu-Mesthrige, N. A. Amro, and G.-Y. Liu, “Immobilization of proteins on self-assembled monolayers,” *Scanning*, vol. 22, no. 6, pp. 380–388, Nov. 2000, doi: https://doi.org/10.1002/sca.4950220607.

[114] Å. Frostell-Karlsson *et al.*, “Biosensor Analysis of the Interaction between Immobilized Human Serum Albumin and Drug Compounds for Prediction of Human Serum Albumin Binding Levels,” *J. Med. Chem.*, vol. 43, no. 10, pp. 1986–1992, May 2000, doi: 10.1021/jm991174y.

[115] L. Cristofolini, “Surface Plasmon Resonance Calculator,” *MATLAB Central File Exchange*, 2020. https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/13700-surface-plasmon-resonance-calculator (accessed Aug. 16, 2021).

[116] ChemSpider, “CSID:473151 (MUA).” http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.473151.html (accessed Aug. 16, 2021).

[117] ChemSpider, “CSID:15119 (EDC).” http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.15119.html (accessed Aug. 18, 2021).

[118] ChemSpider, “CSID:72416 (NHS).” http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.72416.html (accessed Aug. 18, 2021).

[119] D. C. Cullen, R. G. W. Brown, and C. R. Lowe, “Detection of immuno-complex formation via surface plasmon resonance on gold-coated diffraction gratings,” *Biosensors*, vol. 3, no. 4, pp. 211–225, 1987, doi: https://doi.org/10.1016/0265-928X(87)85002-2.

[120] K. V Gadhvi, “Study of Selected Anti Arthritic Ayurvedic Preparations in Arthritis,” 2012.

[121] L. Guilhaudis, A. Jacobs, and M. Caffrey, “Solution structure of the HIV gp120 C5 Domain,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 269, no. 19, pp. 4860–4867, Oct. 2002, doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03187.x.

[122] L. Dieguez, N. Darwish, M. Mir, E. Martinez, M. Moreno, and J. Samitier, “Effect of the Refractive Index of Buffer Solutions in Evanescent Optical Biosensors,” *Sens. Lett.*, vol. 7, pp. 851–855, Oct. 2009, doi: 10.1166/sl.2009.1161.

[123] S. Kim *et al.*, “PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. D1, pp. D1388–D1395, Jan. 2021, doi: 10.1093/nar/gkaa971.

[124] M. T. Flanagan and R. H. Pantell, “Surface plasmon resonance and immunosensors,” *Electron. Lett.*, vol. 20, no. 23, pp. 968–970, 1984.