



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS**

**GENERACIÓN DE UN BIOSENSOR ÓPTICO BASADO EN SILICIO  
CRISTALINO PARA LA DETERMINACIÓN DE OPSINA 5 EN MODELO  
MURINO**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA APLICADA)**

**PRESENTA**

**LIC. OSCAR IVAN TORRES MENA**

**DIRECTORES DE TESIS**

**DRA. GEORGINA BELTRÁN PÉREZ (FCFM-BUAP)**

**DR. RAÚL J. DELGADO MACUIL (CIBA-IPN)**



**PUEBLA**

**DICIEMBRE 2020**



## *INDICE*

RESUMEN .....	1
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN .....	2
1.1 Biosensores .....	3
1.2. Métodos de funcionalización .....	6
1.3. Elementos de Reconocimiento Biológico.....	8
1.4. Importancia de la proteína op5 asociada a enfermedades crónico-degenerativas en modelo murino.....	11
1.5. Objetivos de la tesis .....	12
1.5.1. Objetivo general .....	12
1.5.2. Objetivos particulares.....	12
1.6. Descripción general de los capítulos de la tesis.....	13
CAPITULO 2. BIOSENSORES BASADOS EN ANTICUERPOS .....	15
2.1. Definición de proteína.....	15
2.2. Enlaces peptídicos.....	16
2.3. Estructura proteica .....	18
2.4. Las proteínas como actuadores .....	19
2.5. Op5 asociada a enfermedades crónico-degenerativas.....	22
CAPITULO 3. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO .....	25
3.1 Teoría de la espectroscopia en el infrarrojo .....	25
3.1.1. Espectro electromagnético .....	25
3.1.2 Vibraciones diatómicas .....	26
3.1.3 Vibraciones poliatómicas .....	27
3.2. Técnicas de medición en el infrarrojo.....	28
3.2.1. Medición de la absorbancia.....	29
3.2.2. Reflectancia difusa (DRIFTS).....	30
3.2.3. Transmisión.....	31
3.2.4. Reflectancia especular/reflexión-absorción .....	31
3.2.5. Reflectancia Total Atenuada (ATR) .....	31
3.3. Onda evanescente .....	32
3.3.1. Reflexión total interna .....	32
3.3.2. Onda evanescente .....	33
3.3.3. Profundidad de penetración.....	34
3.4. Espectroscopia por Transformada de Fourier .....	35

3.5. Técnicas de macro-infrarrojo y micro-infrarrojo.....	38
3.6. Vibraciones moleculares.....	39
CAPITULO 4. METODOLOGÍA Y MATERIALES.....	43
4.1. Determinación del estado conformacional del estado de tres cromóforos .....	43
4.2. Preparación de los soportes.....	44
4.3. Hidroxilación de los soportes .....	45
4.4. Proceso de silanización por fase química .....	45
4.5. Proceso de silanización por fase gaseosa.....	46
4.6. Inmovilización del anticuerpo en la superficie del soporte .....	46
4.7. Interacción de los biosensores con tejidos de modelo murino.....	47
4.8. Preparación de los tejidos .....	47
4.9. Metodología de medición del IR en modo macro.....	48
4.10. Metodología de medición en el modo micro .....	48
CAPÍTULO 5. ARREGLOS EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN .....	50
5.1. Caracterización de los láseres usados .....	50
5.2. Solvente y concentración para la caracterización de los cromóforos .....	51
5.3. Determinación de los parámetros ópticos que afectan la conformación de los cromóforos .....	54
5.4. Autoensamblado del biosensor .....	55
5.5. Preparación de los tejidos .....	59
CAPITULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	61
6.1. Caracterización de tres estándares de cromóforos retinales .....	61
6.1.1. 9-cis retinal.....	63
6.1.2. 13-cis retinal.....	64
6.1.3. All-trans retinal .....	66
6.2. Autoensamblado de un biosensor sobre un soporte de silicio cristalino .....	68
6.3. Análisis de Componentes Principales de los espectros en modo micro IR .....	73
CAPITULO 7. CONCLUSIONES .....	79
7.1 Perspectivas del trabajo .....	80
ANEXO .....	81
BIBLIOGRAFIA .....	82

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres,  
que me templaron para llegar cada día más lejos.

A mis hermanos y primos,  
mis primeros colegas de investigación.

A Ale,  
que me anima a llegar a mi plenitud.

A mis tutores Gina y Raúl,  
que me dieron un espacio para llegar más alto.

A mis sinodales,  
por su apoyo en para la elaboración este proyecto.

A mis amigos Kary, Fany y Dany,  
que no gustan de la proteína de la cafetería.

A Alejandro Lezner, Miguel Ríos y Nicho Hinojosa,  
por motivarme a hacer *Todo a Pulmón*.

A Carl Sagan y Nightwish,  
que me retan a ir más allá del horizonte.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,  
por abrirme sus puertas para contribuir a mi formación.

Al Instituto Politécnico Nacional,  
por besar la frente de sus hijos a su regreso.

Al CONACyT,  
por la beca que me permitió finalizar esta etapa.

## RESUMEN

La comunicación entre las células se da mediante la excreción de diversos compuestos, como neurotransmisores, derivados de lípidos y proteínas. Algunas de estas proteínas han sido investigadas por la Optogenética, que, mediante el estudio de proteínas modificadas son sensibles a la luz, conocidas como cromóforos, han logrado determinar de manera específica las funciones de estas, además del como la configuración que presentan afectan su respuesta por parte de las células que las asimilan. En los últimos años se ha encontrado que los niveles de ciertas proteínas, como la opsina 5, está relacionado con padecimientos degenerativos como Alzheimer, Parkinson, depresión o algunos tipos de cáncer. Debido a ello ha sido propuesta como biomarcador, y con ello surge la necesidad de crear un dispositivo lo más barato y reproducible posible con la finalidad de detectar esta proteína. En la presente tesis se presenta la caracterización de la conformación molecular o de los isomerismos de los estándares del cromóforo 9-cis retinal, 13-cis retinal y all-trans retinal mediante irradiación con dos láseres con longitudes de onda de 633 nm y 532 nm y potencias de 15.6 mW y 24.6 mW, respectivamente; posteriormente se presenta el protocolo utilizado para el autoensamblado por monocapas de un biosensor mediante dos metodologías de funcionalización, deposición gaseosa y deposición química (también llamada húmeda o de inmersión). Utilizando la espectroscopia de infrarrojo para la caracterización de los cromóforos, se encontró que existe un tiempo umbral en que la desnaturalización o cambio de isomerismo se vuelve irreversible. Se encontró también, usando espectroscopia en el mediano infrarrojo por técnica de Reflexión Total Atenuada, que el biosensor por cualquiera de las metodologías es capaz de detectar opsina 5 en cortes criogénicos de modelo murino después de 30 minutos de interacción. El desarrollo de biosensores como el presentado aquí permitirá conocer los niveles de opsina 5 presentes en algunos tejidos y fluidos, o inclusive hasta su conformación de la opsina 5, y de esta manera poder brindar atención temprana a padecimientos como los mencionados al principio, incrementando la calidad de vida de algunos pacientes.

## **CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN**

Las opsinas, en particular la neuropsina (opsina 5, klk8, op5), son una especie de proteína que se encuentra presente en distintos tejidos como médula espinal, testículos, trompas de Falopio, útero, glándulas salivales, hipotálamo, etc.<sup>1</sup>. Sin embargo, al presentarse algunos carcinomas o padecimientos degenerativos, se ha encontrado que sus niveles aumentan<sup>2,3</sup>. Hasta el momento, la técnica para detectar estas opsinas es mediante técnicas moleculares como ELISA (Enzyme -Linked ImmunoSorbent Assay), en la cual un antígeno (molécula que es reconocida por un anticuerpo) se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima que genera un subproducto detectable, esta técnica fue propuesta como alternativa al radioinmunoensayo, riesgoso por el uso de isotopos radioactivos<sup>4</sup>.

Actualmente, la búsqueda bibliográfica <sup>1,2,12,13,3,5-11</sup> brinda información de los tejidos donde es posible encontrar op5 mediante técnicas moleculares, pero no arroja ningún resultado sobre biosensores basados en silicio cristalino para la detección de la op5 teniendo como elemento de reconocimiento biológico (ERB) un anticuerpo; menos aún, se han estudiado los inmunosensores para op5 mediante técnicas como la espectroscopía en el mediano infrarrojo por transformada de Fourier.

Por lo anteriormente descrito, en el presente trabajo se desarrolla como propuesta el autoensamblado de un biosensor basado en silicio cristalino, usando como ERB un anticuerpo policlonal para la determinación de opsinas en gónadas e hipotálamo de ratas Wistar sanas, tanto en machos como en hembras. Se utiliza como sistema de detección la espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier en modo de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR) y mediante transmisión en micro espectroscopía de infrarrojo. Se busca que el biosensor en trabajos futuros sea capaz de discriminar la presencia de los padecimientos en etapas tempranas, así como poder dar un tratamiento oportuno. Así mismo, se reporta el proceso y resultados de la caracterización de 3 distintos cromóforos, mediante radiación en la región del visible y la observación de sus cambios estructurales, mediante FTIR-ATR, esto es importante ya que poder determinar los cambios estructurales en las proteínas, permitirá establecer si se sufre alguna modificación en la estructura de las opsinas por efectos de la reacción antígeno-anticuerpo.

Por lo tanto, la implementación del biosensor óptico cuyo protocolo se muestra a lo largo de esta tesis, tiene como motivación el desarrollo de una metodología que apoye a las técnicas existentes en la detección de la op5 y al diagnóstico temprano de padecimientos crónico-degenerativos. Este trabajo puede, además, ampliar paneles de biomarcadores, para ayudar a la detección de padecimientos, como el Alzheimer en etapas tempranas. En este sentido la literatura indica que hoy la investigación presta su atención por la detección de  $\beta$ -amiloide, moléculas  $\tau$  y acetilcolina<sup>14-17</sup>.

### ***1.1 Biosensores***

Uno de los retos que enfrenta la ciencia hoy en día, principalmente dirigida hacia el área de medicina, biología y lo relacionado a procesos en la industria agroalimentaria, es la detección de ciertos componentes o moléculas que pueden determinar el estado, calidad o situación de algún sistema en particular. Es por ello que se requiere el uso de dispositivos especializados que permitan conocer o determinar los componentes de dicho sistema, estos dispositivos se denominan “biosensores”.

De manera práctica, los biosensores son “dispositivos que usan reacciones bioquímicas específicas controladas por enzimas aisladas, sistemas inmunes, tejidos, organelos o células completas para detectar componentes biológicos o químicos; usualmente mediante señales eléctricas, químicas u ópticas”<sup>18</sup>. Estos dispositivos cuentan con dos elementos primordiales, pudiendo agregarse un tercero:

- Un elemento de reconocimiento biológico (ERB).
- Un transductor que genera una señal física medible, usualmente es la plataforma sobre la que se coloca el biosensor, como silicio cristalino, fibra óptica o nanopartículas.
- Un sistema de detección que cuantifica la señal obtenida y la convierte en información fácilmente asimilable por el usuario, por ejemplo, valores o espectros en un monitor.

En la Fig. 1.1 se muestra el esquema general de un biosensor.

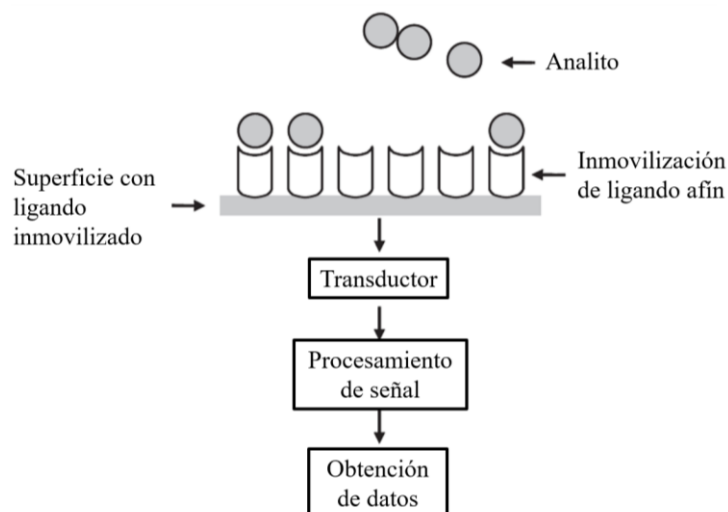


Fig. 1.1. Representación esquemática de la configuración de un biosensor, aquí se le llama ligando al ERB, y la superficie donde se inmoviliza es lo que a lo largo de este trabajo se denominará soporte o plataforma.

Imagen adaptada de Mungroo<sup>19</sup>.

De acuerdo con Midwood<sup>20</sup>, un biosensor debe tener una plataforma o soporte que sea barata preferentemente, ofrecer una buena estabilidad y reconocer los objetivos o analitos con sensibilidad y especificidad. Los biosensores hoy en día son capaces de detectar analitos en unos cuantos segundos y pueden llegar a ser portátiles como los medidores de glucosa. En medicina, se busca que detecten desequilibrios en diversas sustancias del cuerpo para diagnosticar de manera temprana enfermedades como el cáncer en distintos tejidos o padecimientos degenerativos como el Alzheimer. Algunos de los umbrales de detección llegan al rango de pico y/o femto molar<sup>21</sup>.

Aunque la mayoría de los biosensores trabajan mediante señales eléctricas, existen otro tipo de señales que nos brindan la información de una manera más conveniente y rápida como lo son las señales ópticas. Esto debido a que, de los distintos tipos de biosensores, los ópticos son los más rápidos<sup>21</sup>, ya que la respuesta de la interacción ERB-analito puede ser determinada en tiempo real. Aun así, y aunque el desarrollo de los biosensores está bastante evolucionado, se requieren de avances en su estudio e implementación en áreas de interés práctico, como la salud o la agroindustria. Carneiro (2020)<sup>21</sup> también menciona que se requieren diversas plataformas para múltiples análisis, ya que algunas permitirán una mejor manipulación mientras que otras una respuesta más rápida, incluso, *in vivo*. Una de las plataformas más usadas en el armado de biosensores es el silicio (Si), no solo por su economía

y por ser uno de los elementos más abundantes en el planeta, sino también porque sus propiedades están bien estudiadas. Así mismo, tiene distintas presentaciones como silicio amorfo, cristalino, poroso, fibra óptica, etc., cada una con una aplicación diferente<sup>22</sup>, brindando así un abanico de posibilidades para su implementación. De acuerdo con el biosensor desarrollado y la metodología de su implementación se tienen dos tipos de detecciones:

Indirectas: se presentan cuando lo que se detecta es un producto o subproducto de reacción, por ejemplo, en los medidores de glucosa, donde la respuesta se debe a un producto de la reacción de la glucosa con la enzima que sirve como ERB.

Directa: el ERB detecta directamente el analito y mediante el sistema de medición se lee o bien el enlace entre ellos, o el analito.

En la Fig. 1.2 se muestra a modo de diagrama un resumen de los biosensores.

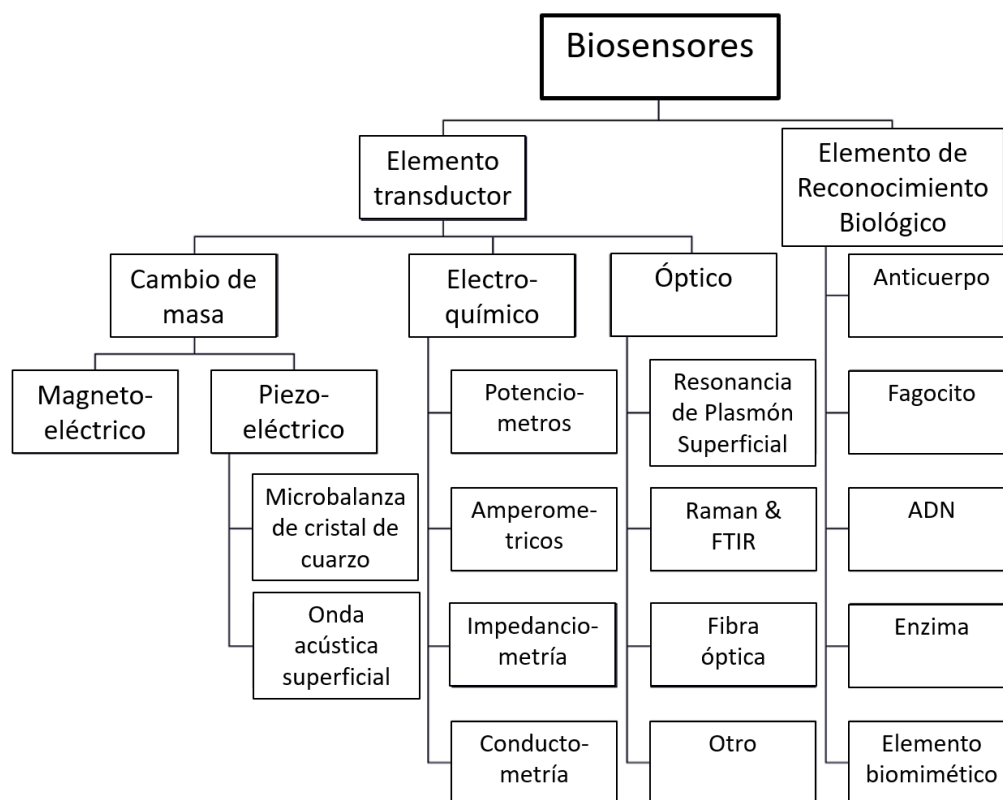


Fig. 1.2. Clasificación de los biosensores basados en el tipo de transductor y el elemento de reconocimiento biológico<sup>23</sup>.

A continuación, se describen de manera breve cada uno de los tipos de biosensor:

Cambio de masa: Los más populares son los piezoeléctricos, los cuales producen una señal eléctrica cuando una fuerza es ejercida sobre ellos. Los más comunes son las microbalanzas de cristal (QCM).

Electroquímico: estos miden una diferencia de potencial eléctrico debido a la interacción entre un analito y la superficie del biosensor. La relación existente entre el potencial y la concentración electroquímica activa suele ser logarítmica.

Óptico: son todos aquellos en los que la medición se hace mediante el uso de radiación electromagnética en sus distintas regiones, los más populares son los de fibra óptica, sin embargo, si la lectura del biosensor se realiza mediante resonancia de plasmón de superficie, efecto Raman o como será en el caso del presente trabajo, que será por infrarrojo por transformada de Fourier, estaremos hablando también de biosensores ópticos.

### ***1.2. Métodos de funcionalización***

Para que una plataforma sea responsiva a un analito, o para inmovilizar el ERB a la superficie, se usan diversas técnicas denominadas funcionalizaciones. De manera breve, la funcionalización, a través de sus diversas técnicas, permite modificar la química de una superficie sin alterar su morfología (en algunos casos, esta se modifica de manera previa) con la finalidad de que la superficie se vuelva sensible a una cierta molécula al dejar expuestos nuevos enlaces funcionales. Thirugnanasambandan<sup>24</sup> menciona que estas modificaciones se llevan a cabo con químicos adecuados, así como moléculas biológicas (como enzimas, anticuerpos o secuencias de ADN, aunque a estas se les suele denominar inmovilizaciones de un ERB), o bien, nanomateriales. La funcionalización es el proceso de agregar nuevas funciones, características, capacidades o propiedades a la superficie de un material mediante el cambio químico de dicha superficie. Es una técnica fundamental usada dentro de la química, ciencia de materiales, ingeniería biológica y textil, así como en la nanotecnología. La funcionalización se lleva a cabo mediante el enlace de moléculas o nanopartículas a la superficie de un material, a veces con un enlace químico, pero a veces simplemente a través de adsorción.

Dentro de los métodos de funcionalización se encuentran los siguientes<sup>25</sup>:

Electroinjerto: se utiliza para la deposición de monocapas de alrededor de unos 50 nm. Por lo regular las capas ensambladas tienen una alta adherencia además de ser ópticamente transparentes<sup>26</sup>.

Tiolación: esta se realiza con tioles, que son compuestos orgánicos que como grupo funcional tienen un sulfhídrido (-SH). Mediante esta se pueden llevar a cabo modificaciones oxidativas para ciertas enzimas y enlazar proteínas con residuos reactivos de cisteínas<sup>27</sup>.

Adsorción: los resultados que se presentan en adsorción en óxidos son distintos para macromoléculas y micromoléculas, aunque ambos tienen una diversidad de aplicaciones<sup>28</sup>. Este fenómeno es usado principalmente para la funcionalización de polímeros y plásticos<sup>25,29</sup>.

Silanización: En este proceso se forma un enlace covalente y estable mediante una reacción química entre un grupo hidroxilo del sustrato y un grupo silano, proveniente de algún químico<sup>30-32</sup>, se suelen dejar expuestos grupos amino (NH<sub>2</sub>) o bien hidroxilos (OH).

Esta última resulta muy buena para sustratos a base de óxidos de silicio, ya que por su naturaleza química tiende a formar enlaces covalentes, además de ser ampliamente conocida para la inmovilización de biomoléculas<sup>33-38</sup>.

Entre las principales técnicas que se utilizan para la funcionalización por silanización están las “húmedas” (o “wet” en inglés, donde la inmersión es la variante más sencilla) y las secas, mismas que se implementaron en el desarrollo del actual trabajo.

En el ejemplo de la Fig. 1.3, a una superficie (también llamada matriz o soporte) se le ha realizado un proceso mediante el cual se han agregado nuevos grupos funcionales, capaces de enlazar moléculas que la superficie del material por sí mismo no era capaz de hacerlo.

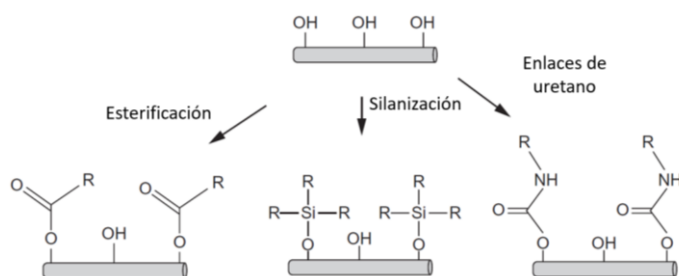
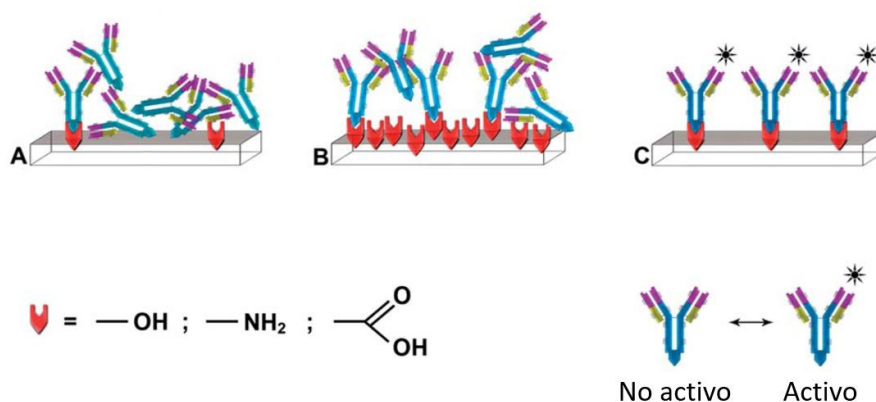


Fig. 1.3. Ilustración de funcionalizaciones comunes de nanocelulosas<sup>33</sup>.

Aunque los ejemplos mostrados en la Fig. 1.3 son para nanocelulosas, también pueden ser aplicados a otras superficies. En la Fig. 1.4 se muestra un esquema general de la funcionalización de una superficie para la inmovilización anticuerpos, los cuales requieren de la disponibilidad de grupos  $\text{NH}_2$  u  $\text{OH}$ .



*Fig. 1.4. Estrategias de bioactivación para la producción de plataformas poliméricas de detección en biosensores. Arriba: Modificación de una superficie polimérica mediante la introducción de grupos funcionales reactivos y una subsecuente inmovilización de un anticuerpo. Medio: efecto de la superficie funcionalizada poliméricamente: A) desnaturalización o desactivación proteica debido a la baja concentración de grupos funcionales que provocan que la proteína se decante; B) desnaturalización o desactivación proteica debido a la sobrefuncionalización de la superficie; y C) concentración óptima de grupos funcionales y formación de una plataforma para detección con anticuerpos activos<sup>39</sup>.*

De las técnicas anteriormente descritas, se implementó la silanización, tanto en fase gaseosa como por inmersión en fase húmeda (fase química) ya que se pretende inmovilizar anticuerpos como ERB, que están formados por proteínas. A continuación, se explica más sobre los ERB en general.

### **1.3. Elementos de Reconocimiento Biológico**

Un elemento de reconocimiento, de manera general, es el encargado de interactuar con el medio en búsqueda del analito. Un ERB es precisamente un elemento que reconoce a un solo analito, pero con la particularidad de que su origen es biológico, como pueden ser tejidos, ADN, enzimas o anticuerpos. Cuando se tiene un ERB, el dispositivo completo pasa a llamarse biosensor. A continuación, en la Fig. 1.5 se muestran algunas de las ventajas y desventajas de los distintos tipos de ERB.

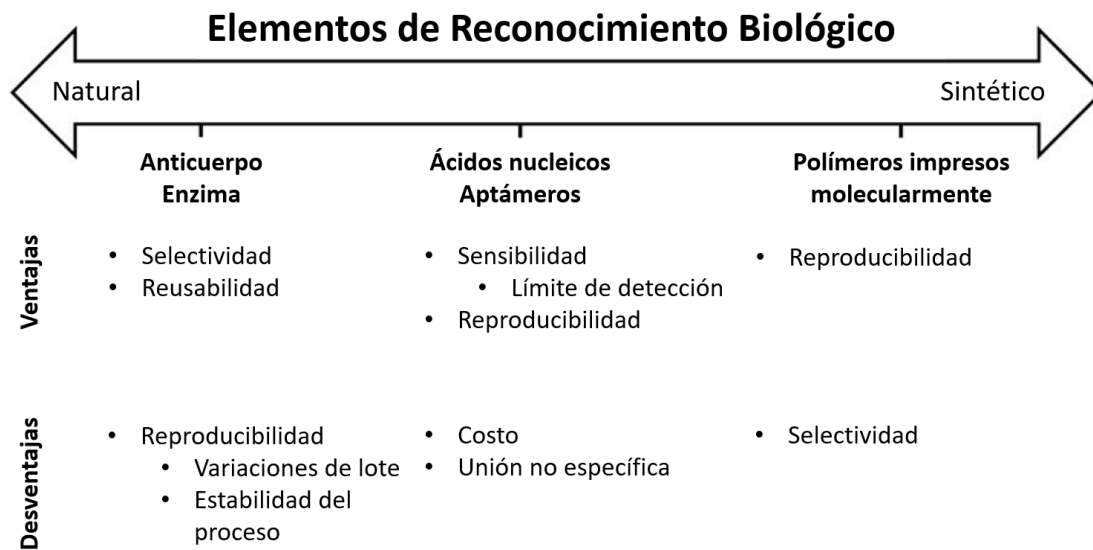


Fig. 1.5. Ventajas y desventajas de algunos Elementos de Reconocimiento Biológicos<sup>40</sup>.

Existen distintos tipos de ERB, a continuación, se explican algunos de los principales<sup>19,41</sup>:

**Biomimética:** estos ERB son del tipo sintético, tratan de imitar las funciones de sistemas naturales mediante la estimulación externa. De acuerdo con Morales (2018)<sup>40</sup> estos tienen una buena reproducibilidad, ya que no dependen de animales, pero su selectividad es pobre.

**Enzima:** estas han sido ampliamente usadas, y abarcan todo el espectro de medición<sup>42</sup>. Los biosensores más populares donde se implementan enzimas son en los medidores de glucosa basados en la enzima glucosa oxidasa.

**Ácidos nucleicos:** se implementan principalmente en la detección de DNA, asociados con desordenes o padecimientos genéticos, como lo es el caso del cáncer<sup>43</sup>.

**Células:** principalmente provenientes de bacterias, son utilizadas para la detección de toxinas. Ayudan a medir las condiciones ambientales intra y extracelularmente. Tienen la desventaja de tener un periodo de vida limitado.

**Bacteriófago:** dado que son virus que atacan bacterias de manera específica, se vuelve factible su uso para la detección de bacterias de importancia clínica. Su inmovilización resulta sencilla y tienen una alta especificidad<sup>43</sup>.

Anticuerpos (AB): los biosensores basados en este ERB se conocen de manera habitual con el nombre de inmunosensores, se usan principalmente para la detección de carcinomas<sup>44,45</sup>. Estos ERB tiene una alta especificidad, por lo cual solo crearan enlace con una molécula particular. De esta manera, se tiene la ventaja que la muestra no requiere de una alta preparación para su interacción.

Es por su alta selectividad que para el desarrollo de este trabajo se hizo uso de AB como ERB. A continuación, en la Fig. 1.6 se muestra el esquema general de un anticuerpo.

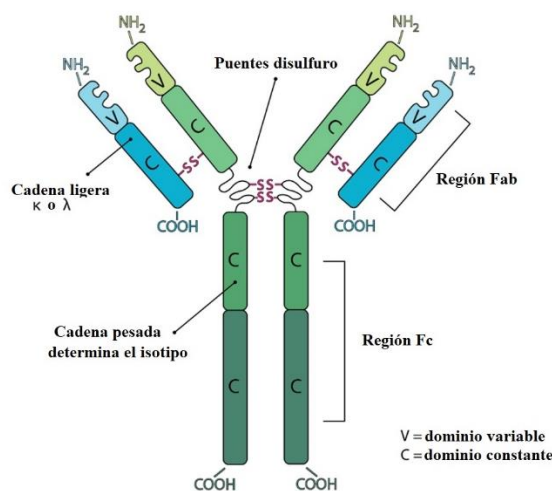


Fig. 1.6. Estructura de un anticuerpo.

Como vemos en la Fig. 1.6, un anticuerpo (AB) consta de dos cadenas pesadas, enlazadas a dos cadenas ligeras mediante puentes disulfuro. Al final de cada una de las cadenas pesadas tenemos una región variable, donde se encuentra el sitio activo, lugar al que se unirá el analito. Una vez que el analito se haya unido al AB, no es fácil romper el enlace, ya que es del tipo covalente<sup>46</sup>. Cabe mencionar que el AB es una proteína que ha alcanzado un nivel de estructuración cuaternaria. Los biosensores que usan AB como ERB hoy en día tienen una gran variedad de aplicaciones<sup>47,48</sup>, y para su funcionamiento existen dos tipos de detección, directa e indirecta, por lo que el ERB puede reaccionar con el analito (medición indirecta) o capturarlo (medición directa). En la Fig. 1.7 se muestran los esquemas de algunos arreglos de biosensores que utilizan AB como ERB.

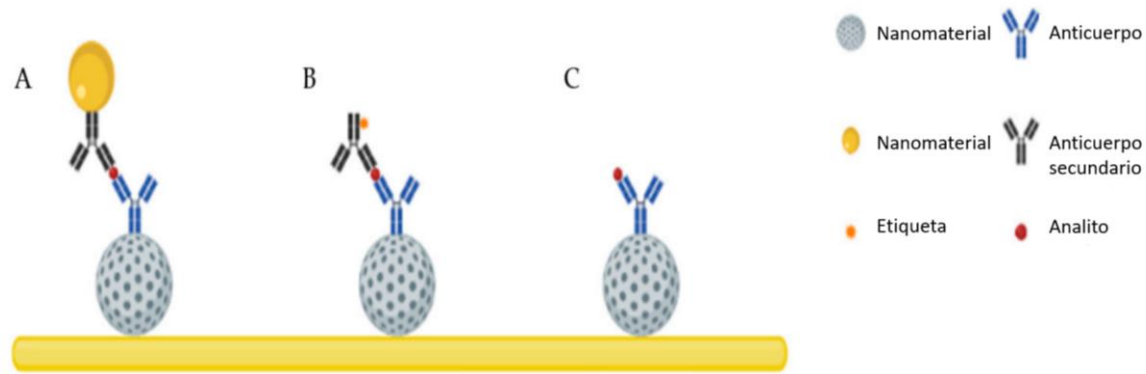


Fig. 1.7. Ilustración esquemática de los arreglos más comunes para la detección utilizando anticuerpos. a) Arreglo de sándwich con anticuerpos secundarios conjugados con nanomateriales y sin etiquetas. b) Arreglo en sándwich con anticuerpos secundarios etiquetados. c) Detección directa<sup>21</sup>.

Los primeros dos casos de la Fig. 1.7 también se pueden considerar una medición indirecta, ya que al momento de la lectura no encontraremos el analito en sí, sino otro elemento que, de no estar el analito, no podríamos encontrar tampoco, en el caso de la Fig. 1.7a) será la nanopartícula, la cual no estaría presente si no existiera una detección previa, lo mismo en la Fig. 1.7b). Este tipo de arreglos se llevan a cabo dependiendo del analito buscado, ya que puede ser más sencillo encontrar una etiqueta secundaria, posterior a la detección misma.

#### **1.4. Importancia de la proteína op5 asociada a enfermedades crónico-degenerativas en modelo murino.**

La op5 se libera en el cerebro, más específicamente en la región del hipotálamo, desde donde es distribuida a otros tejidos del cuerpo mediante el líquido cefalorraquídeo, principalmente gónadas (testículos y ovarios)<sup>1,2</sup>. Los niveles de estas proteínas se ven alterados al presentarse ciertos padecimientos degenerativos como Alzheimer, depresión<sup>49-53</sup> y ansiedad<sup>54</sup>, además de carcinomas en distintos tejidos<sup>55-57</sup>, razón por la cual la op5 ha sido propuesta durante los últimos años como biomarcador para la detección de estas afecciones. De allí que resulta importante el desarrollar un dispositivo que pueda detectar esta proteína, mejor si es barato y fácil de desarrollar.

## ***1.5. Objetivos de la tesis***

### ***1.5.1. Objetivo general***

Desarrollar un biosensor óptico utilizando como elemento de reconocimiento biológico el anticuerpo policlonal OPN5 y como matriz soporte una oblea de silicio cristalino para la determinación de la opsina op5 en diversos tejidos de rata Wistar como hipotálamo o gónadas.

### ***1.5.2. Objetivos particulares***

1. Determinar el estado conformacional de la op5, en función de los parámetros de excitación luminosa, basándonos en la caracterización de los cromóforos retinales *all-trans*, *9-cis* y *13-cis*.
2. Generar el sistema biosensor óptico tomando como matriz una oblea de silicio cristalino y como elemento de reconocimiento biológico el anticuerpo policlonal OPN5.
3. Caracterizar estructuralmente el biosensor mediante espectroscopía de micro y macro infrarrojo, de las diferentes etapas del autoensamblado del biosensor.
4. Determinar la presencia y sensibilidad del biosensor en la determinación de la op5 interactuando con distintos tejidos de rata Wistar.
5. Generar el protocolo experimental para la determinación de opsinas en modelos murino.

## ***1.6. Descripción general de los capítulos de la tesis.***

### ***Capítulo 1***

En este capítulo (Capítulo 1) introductorio se han tocado los principales temas sobre la construcción de biosensores, como lo son los distintos métodos de funcionalización y los elementos de reconocimiento biológico para la detección de la op5 en tejido de ratas de la cepa Wistar (modelo Murino) y se ha justificado el interés en la detección de esta proteína.

### ***Capítulo 2***

Se explica la composición de las proteínas, así como algunas de sus características. Dentro de los tópicos que se tocan se encuentra la estructuración de una proteína y como esta determina o afecta sus propiedades. También se describe brevemente las funciones de las proteínas como actuadores, como el caso de la channelrodopsina que actúa como un canal con 7  $\alpha$ -hélices que se abren cuando una estructura interna, llamada cromóforo, cambia de conformación. Por último, se muestran algunos de los tejidos donde es posible encontrar la op5, de interés de esta tesis.

### ***Capítulo 3***

Se explica cómo funciona la espectroscopía en infrarrojo, en particular la técnica de Reflectancia Total Atenuada. Se presentan además los equipos Vertex 70 e Hyperion 2000, ambos de la marca Bruker, con sus diagramas y componentes principales. Así mismo, se da una explicación de los fundamentos de la espectroscopía vibracional a nivel moleculares, así como de los conceptos básicos como lo son la onda evanescente y la profundidad de penetración de la onda.

### ***Capítulo 4***

Se explica cómo se realizaron paso a paso cada uno de los experimentos y las fases de cada uno de ellos. Se comienza con la parte que corresponde a la caracterización de tres cromóforos retinales, se continúa con el autoensamblado del biosensor implementando dos técnicas para la fase de funcionalización y se finaliza con una explicación general de la metodología y de algunos detalles para la toma de espectros usando los equipos descritos en el capítulo 3.

### ***Capítulo 5***

Los arreglos experimentales, así como la caracterización de los materiales usados se muestran en este capítulo. Se comienza explicando el arreglo experimental usado para la caracterización de los cromóforos, se continua con la explicación de cómo se encontró el solvente utilizado, así como la concentración adecuada. Finalmente, se explican los arreglos experimentales implementados para el armado del biosensor y su interacción.

### ***Capítulo 6***

Se presentan en este capítulo los resultados más relevantes o importantes del trabajo desarrollado a lo largo de esta tesis, tanto para la caracterización de los cromóforos, como para el desarrollo del biosensor óptico para la detección de op5 en tejido de modelo murino. Se hace uso de análisis espectroscópico y quimiométrico para resaltar algunas características del sistema que no son apreciables a simple vista.

### ***Capítulo 7***

Se resume cuáles fueron los principales resultados y actividades desarrollados en ambas etapas de la tesis, así mismo se mencionan algunas actividades que quedan como trabajo a futuro para complementar el presentado en este escrito.

## **CAPITULO 2.**

### **BIOSENSORES BASADOS EN ANTICUERPOS**

De manera general, a los biosensores que en su funcionamiento involucran el uso de anticuerpos, se les conoce como inmunosensores. Los inmunosensores o bien pueden detectar anticuerpos (como en el caso de pruebas serológicas), usarlos en ensayos tipo “sándwich” como se hace en ELISA, o bien usar anticuerpos para la detección de un antígeno o analito de interés de manera directa<sup>58</sup>, como es el caso de este trabajo.

Según Adam Augustyn et. al.<sup>59</sup>, “un anticuerpo es una proteína producida por el sistema inmune en respuesta a la presencia de una sustancia externa, la cual recibe el nombre de antígeno. Los anticuerpos reconocen a sus antígenos y se adhieren a ellos para eliminarlos del cuerpo.” Existen anticuerpos de dos tipos, monoclonales y policlonales, los primeros son producidos en una región específica y solo ligarán antígenos que se encuentren en la misma región, mientras que los anticuerpos policlonales detectarán a su antígeno independientemente de la región en que hayan sido producidos. A nivel comercial y técnico los anticuerpos monoclonales son más difíciles de producir, y por ende su costo es mayor que los anticuerpos policlonales.

Como ya se mencionó en la definición de anticuerpo, este es una proteína, las cuales se explican con más detalle a continuación.

#### ***2.1. Definición de proteína.***

Se les denomina proteína a los oligopéptidos (cadenas de más de 10 aminoácidos) que tienen un peso superior a 5kDa, que por lo regular serán varios cientos de aminoácidos.

Las proteínas abundan en todos los organismos, dado que son una de las bases sobre la cual se construye toda la vida, y por tanto la biología que conocemos. De ellas dependen las estructuras celulares como en el crecimiento óseo o muscular y la comunicación celular o entre los tejidos, por ejemplo, la que se da en la sinapsis neuronal. Si conocemos los procesos donde se ven involucradas las proteínas podremos tener una idea del funcionamiento de los distintos tejidos que conforman un ser vivo.

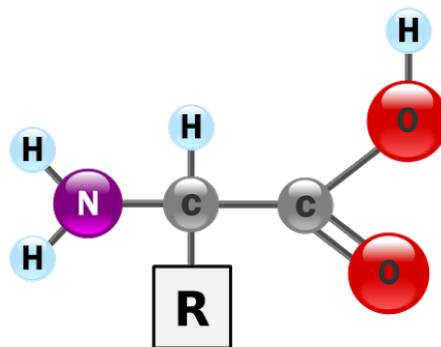
Pollock (2007)<sup>60</sup> define las proteínas como una clase de biopolímeros formados por polipéptidos de una L-alfa secuencia de aminoácidos. Pollock también menciona que la

secuencia específica de una proteína le brinda una geometría o estructura definida, que al final, resulta en una especificidad de su función, esto se entiende con los niveles de estructuración proteicos, los cuales se explican más adelante en este capítulo.

Blanco (2017)<sup>61</sup> menciona como ejemplos donde se ven involucradas las proteínas los siguientes: enzimas como catalizadores, hormonas como reguladores de la actividad celular, la hemoglobina además de algunas otras como transportadores de sustancias específicas por medio del flujo sanguíneo como lo es en el caso del hierro, anticuerpos que atacan a los agentes externos o bien se unen a proteínas específicas, receptores y transmisores que disparan señales en las células, actina y miosina que permiten la contracción muscular y el colágeno que forma las fibras que conectan a los tejidos.

## 2.2. Enlaces peptídicos

Las proteínas son básicamente cadenas de aminoácidos unidos entre ellos. Los aminoácidos se componen de un grupo amino ( $-NH_2$ ), un grupo carboxilo ( $-COOH$ ), un H solo y un grupo radical (regularmente denominado  $-R$  en los diagramas), unidos todos ellos a un carbono central. Es el grupo radical el que diferencia un aminoácido de otro, como se muestra en la Fig. 2.1.



*Fig. 2.1. Estructura general de un aminoácido. Del lado izquierdo vemos el grupo amino ( $NH_2$ ), en el medio hacia abajo tenemos el grupo radical ( $-R$ ) que brinda las propiedades particulares a cada aminoácido y lo diferencia de otro y finalmente del lado derecho se tiene al grupo carboxilo ( $COOH$ ).*

Los aminoácidos (como también pasa con los enlaces peptídicos y las proteínas), pueden tener dos distintas configuraciones, a las cuales se les denomina isomerismos. Blanco<sup>61</sup> aborda de la siguiente manera los isomerismos: “De acuerdo con la configuración tetraédrica del carbono, donde cada uno de los enlaces apunta a uno de los vértices del tetraedro y el

átomo de carbono se encuentra en el centro. Cuando el carbono está enlazado a distintos elementos o grupos atómicos, la molécula se vuelve asimétrica, a esta configuración se le conoce como “carbono asimétrico”, como se da en el caso de un enlace peptídico”.

Así, los grupos enlazados al carbono central pueden tener dos configuraciones espaciales distintas, una de las cuales es un reflejo de la otra. A estas se les conoce como compuestos quirales, pero también se suelen llamar isomerismos ópticos enantiómeros o enantiomorfismos. En la Fig. 2.2. se muestra un ejemplo del isomerismo del aminoácido alanina, donde su grupo radical es simplemente un grupo  $\text{CH}_3$ .

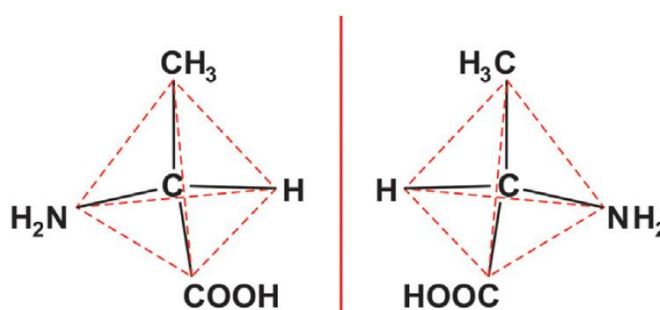


Fig. 2.2. Isomerismos de la alanina. Nótese que no hay rompimiento o formación de nuevos enlaces, sino que solo se configuran de una forma diferente<sup>61</sup>.

Como vemos en la figura anterior, la alanina se presenta asimétrica, no hay ningún tipo de rotación posible sobre el átomo de carbono para llegar de un estado a otro. Es importante hacer notar que la diferencia es solo en la configuración de los enlaces, sin embargo, estos siguen siendo los mismos. La configuración de un aminoácido puede afectar el modo en que este se enlaza a otro, y por tanto algunas de sus estructuras superiores.

Al enlace que se da entre los aminoácidos se le denomina “enlace peptídico”. Un enlace peptídico une el grupo amino de uno con el grupo carboxilo de otro, liberando en el proceso una molécula de agua. Existen aproximadamente 200 aminoácidos en la naturaleza; sin embargo, solo 20 de ellos se conjuntan para la conformación de proteínas mediante el enlace peptídico, estos aminoácidos se denominan “aminoácidos esenciales”. Los aminoácidos que se pueden conjuntar para la creación de proteínas son los siguientes: alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, fenilalanina, glicina, glutamato, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptófano y valina. El diagrama de un enlace peptídico se muestra en la Fig. 2.3.

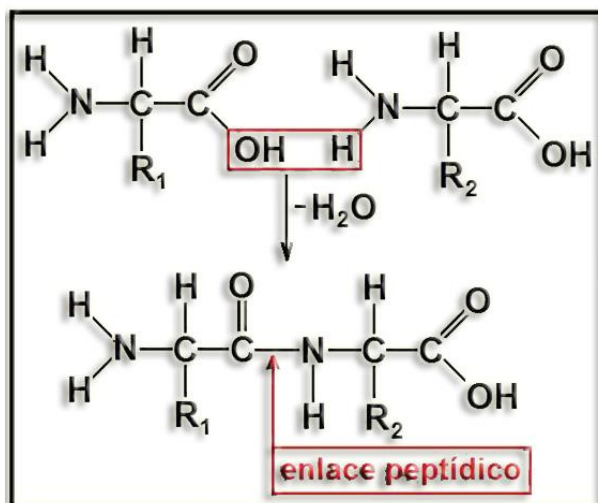


Fig. 2.3. Enlace peptídico. El grupo carboxilo del aminoácido 1, con grupo radical  $R_1$ , se enlaza al grupo amino del aminoácido 2 con grupo radical  $R_2$ . Se muestra también la molécula de agua liberada en el proceso. El enlace peptídico mostrado aquí es *trans*, ya que tiene al  $-H$  del otro lado del  $=O$ , en caso contrario sería un enlace *cis*.

En un enlace peptídico, pueden existir uno de dos tipos de isomerismos, ya sea *trans*, como el que se muestra en la figura anterior donde el  $-H$  y el  $=O$  están en lados opuestos, o bien *cis* donde están en un mismo lado. Este isomerismo, al igual que en el caso de los isomerismos en los aminoácidos puede afectar la función final de la proteína.

### 2.3. Estructura proteica

Las proteínas son enlaces de varios cientos de aminoácidos. Dependiendo como se conjunen estos, se presentarán de una manera u otra los niveles de estructuración de la proteína. Estos niveles de estructuración son los siguientes cuatro:

Estructura primaria: Se refiere a la secuencia de aminoácidos, e.g., 1-2-3-4, cuya secuencia es distinta a 3-1-2-4.

Estructura secundaria: hay dos tipos de esta, alfa-hélice y beta-lamina, es la forma que van tomando las cadenas, e. g. el ADN tiene una forma hélice y las beta-amiloide, tienen una configuración de lámina.

Estructura terciaria: Se refiere a si son globulares o fibrosas, las primeras son solubles y tienen funciones dinámicas como las enzimas o anticuerpos mientras que las segundas son insolubles y tienen principalmente funciones estructurales como la queratina.

Estructura cuaternaria: Es la unión de diversas estructuras terciarias y no lo tienen todas las proteínas. Los anticuerpos son, por ejemplo, la unión de diversas estructuras terciarias globulares.

En la Fig. 2.4 se muestran los niveles de estructuración de la proteína.

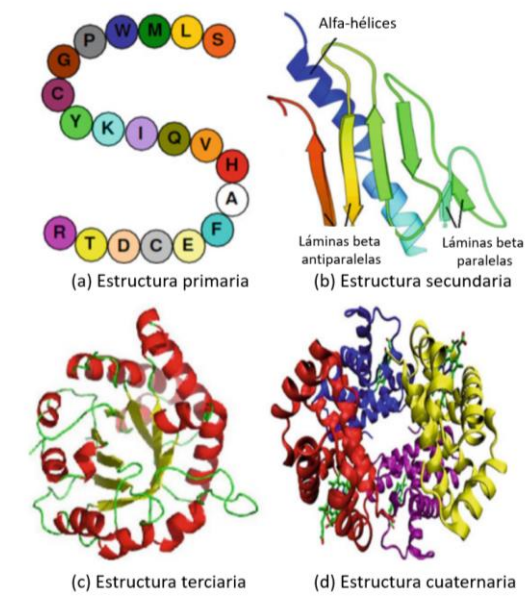


Fig. 2.4. Diferentes niveles de estructuración de las proteínas. a) primaria; que indica el orden en que se unen los aminoácidos mediante enlaces peptídicos, b) secundaria; indica si se ha formado una  $\alpha$ -hélice o una  $\beta$ -lámina, c) terciaria; donde se han conjuntado varias estructuras secundarias, pueden ser globulares o fibrosas y d) cuaternaria; son conjuntadas varias estructuras terciarias y no todas las proteínas llegan a este nivel de estructuración<sup>62</sup>.

#### 2.4. Las proteínas como actuadores

Al igual que en los aminoácidos y enlaces peptídicos, las proteínas pueden tener distintas configuraciones, que afecta el funcionamiento de esta. Para las proteínas los cambios de configuración no implican ruptura ni formación de nuevos enlaces, es decir, lo único que cambia es la estructura o configuración de estas, que al final permitirán su unión con otras moléculas, o su asimilación por parte de algunas células.

Algunas proteínas cuentan con una subestructura interna denominada “cromóforo”, los cuales son un grupo insaturable que absorbe luz y la refleja a un ángulo específico para dar matices<sup>63</sup>. Esta absorción de luz puede dar lugar a cambios de densidad electrónica o de la

geometría de la molécula<sup>64</sup>, además de darse en una región específica del espectro electromagnético<sup>65</sup>.

Una de las cualidades del cromóforo es cambiar su conformación cuando es radiado con una longitud de onda específica, típicamente en la región del espectro visible. El cambio de configuración de los cromóforos da pie a un cambio en la función de la proteína en la cual se encuentran inmersos, sirviendo estas como actuadores, canales o bombas dependiendo de su configuración. En la Fig. 2.5 se muestran algunos de los cromóforos existentes.

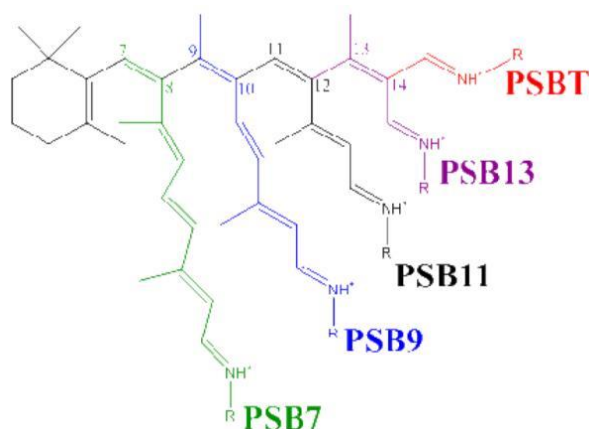


Fig. 2.5. Estructura de los cromóforos. Para el desarrollo de esta tesis se ocuparon los cromóforos 9-cis retinal (PSB9, 9cr), 13-cis retinal (PSB13, 13cr) y all-trans retinal (PSBT, altr)<sup>66</sup>.

En la Fig. 2.6 se muestran algunas proteínas que funcionan como actuadores y con qué longitud de onda se promueve o se inhibe su actividad. En esta figura vemos que los actuadores tienen una longitud de onda específica para ser activados o desactivados. Esto permite controlar la actividad de una célula, como se muestra en el esquema de la Fig. 2.7, donde una channelrodopsina, conformada por 7 alfa-hélices representadas por los cilindros azules sirve como canal de paso de ciertos iones al ser radiada con una longitud de onda específica de 460 nm, ya que el cromóforo que tiene internamente cambia de configuración.

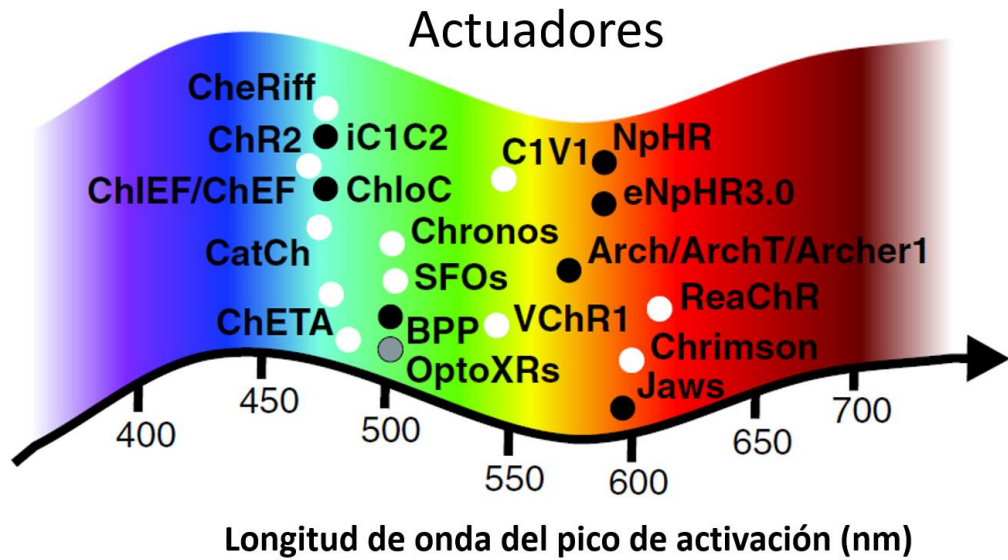


Fig. 2.6. Actuadores. Ejemplos de algunas proteínas que funcionan como actuadores. En blanco se presenta la longitud de onda en que se activan y en negro la longitud de onda en que se desactivan. Uno de los actuadores más populares es la ChR2 (Chanelrodopsina 2), que es un canal que puede ser accionado con radiación electromagnética<sup>67</sup>.

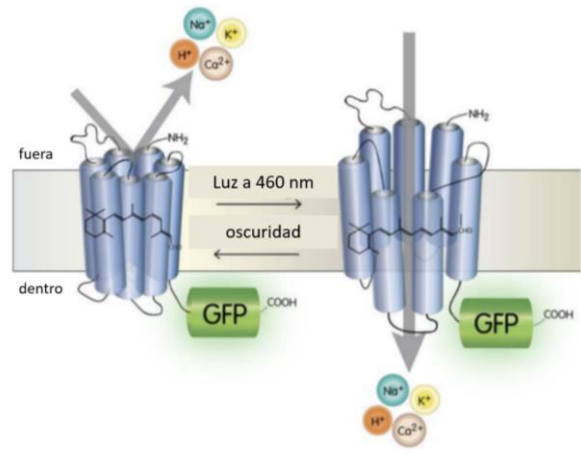


Fig. 2.7. Representación esquemática de una proteína transmembranal conocida como chanelrodopsina. Cuando es radiada con luz azul esta se abre debido al cambio conformacional del cromóforo, que cambia de un 11 cis-retinal a un all trans-retinal, permitiendo el paso de iones a través de ella. De este modo, se puede controlar la actividad de una célula<sup>68</sup>.

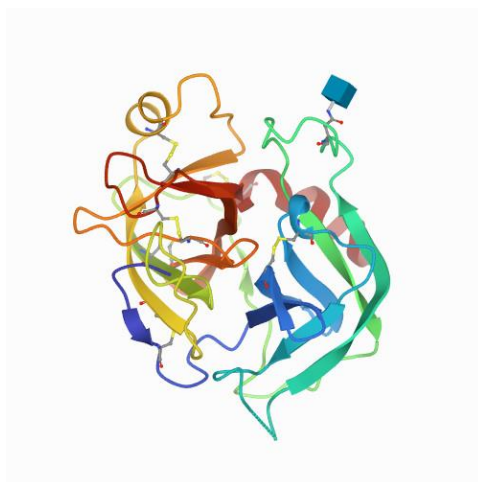
Una aplicación del ejemplo mostrado en la Fig. 2.7 es el control de los potenciales de acción en la comunicación neuronal. De esta manera se podrían inhibir o propiciar ciertos mensajes

o activar o desactivar regiones específicas en el cerebro con solo radiar a las neuronas de la región en cuestión.

### ***2.5. Op5 asociada a enfermedades crónico-degenerativas***

Los niveles de ciertas proteínas, así como sus estructuras, pueden influir directamente sobre la salud de un individuo, incluso desde años antes de manifestar cualquier síntoma, algunas proteínas pueden indicar que se tiene presente un padecimiento, como en el caso del Alzheimer, donde se ha detectado que la proteína  $\beta$ -amiloide comienza a decrecer sus niveles desde unos 25 años antes de la aparición de síntomas.

Existen diversos tipos de rodopsinas, cada una de las cuales tiende a encontrarse en tejidos o regiones particulares del organismo. La proteína a la cual hará referencia este estudio es la opsina 5 (op5), también llamada klk8 o neuropsina, de la cual se muestra su estructura en la siguiente figura.



*Fig. 2.8. Estructura de una op5 de ratón. En puntos rojos se presentan algunas moléculas de agua que no son propias de la proteína, el cubo azul en la parte superior derecha es un hidrato de carbono. Las demás estructuras son la proteína en sí, donde alcanzamos a apreciar diversas láminas beta así como alfa-hélices<sup>13</sup>.*

La op5 pertenece a la familia de las opsinas, que son proteínas fotosensibles responsables de la fotorrecepción visual y no visual en animales. Esta opsina tiene una sensibilidad máxima a la luz ultravioleta cuando es reconstruida con el cromóforo 11-cis retinal y con all-trans retinal<sup>5,69,70</sup>.

Aunque en un principio se creyó que la op5 estaba presente solo en ratas, en 2001 se descubrió que estaba presente también en humanos mediante un estudio realizado por Kishi (2001)<sup>11</sup>. En 2007 no se logró detectar de manera directa esta proteína en cerebro y testículo, pero si en otros tejidos entre los cuales se encuentra el ovario, teniendo una concentración de entre 10 - 100 ng/g<sup>1</sup>. Por otro lado, este mismo estudio revela la presencia del ARN mensajero en concentraciones grandes tanto en gónadas como en cerebro.

Sin embargo, estudios más recientes revelaron la presencia de op5 en el hipocampo<sup>5-7</sup>, donde juega un importante en la plasticidad neuronal, es decir, en la memoria, memoria social y la adaptación cerebral a nuevas actividades<sup>8-10</sup>. Así mismo, se encontró que la op5 también se encuentra presente en las gónadas de macho (testículos)<sup>2,11,12</sup>, entre otros fluidos como el líquido cefalorraquídeo.

En 2017 se descubrió en un estudio, realizado por Hecker<sup>8</sup>, que abarco 70 mamíferos (dentro de los cuales se encuentra el humano, la rata y el ratón), que algunos de ellos no expresan la op5, estos animales son, a saber, el manatí, la ballena asesina, la ballena minke y el delfín. En las siguientes tablas se muestran algunos de los tejidos y fluidos donde es posible encontrar las op5<sup>1,13</sup>.

Las concentraciones que se muestran en las tablas siguientes son para tejidos de humanos sanos, los estudios fueron realizados entre 2003 y 2007. Cuando se tienen tejidos con algún padecimiento, como el cáncer, la concentración de esta proteína puede aumentar. Por ejemplo, en cáncer de ovario la concentración en flujo de quiste de ovario sube hasta 1000 µg/L cuando sano es de apenas 1 µg/L<sup>56</sup>.

*Tabla 2.1. Tejidos donde se encontró presencia de la op5. Las concentraciones para los tejidos se encuentran en ng/g dentro de los paréntesis al inicio de cada columna.*

<b>Tejidos (&lt;10 ng/g)</b>	<b>Tejidos (10-100 ng/g)</b>		<b>Tejidos (100-1000 ng/g)</b>
Cerebro	Hígado	Corazón	Amígdala
	Cérvix	Riñón	Piel
	Glándula salival	Glándula suprarrenal	Esófago
Ovario	Tumor ovárico maligno	Vagina	Testículo
			Seno

Tabla 2. II. Fluidos donde se encontró presencia de la op5. Las concentraciones para los fluidos se encuentran en  $\mu\text{g/L}$  dentro de los paréntesis al inicio de cada columna.

Fluidos (0-1 $\mu\text{g/L}$ )	Fluidos (1-10 $\mu\text{g/L}$ )	Fluidos (10-100 $\mu\text{g/L}$ )	Fluidos (100-1000 $\mu\text{g/L}$ )
Citosol de cáncer mamario	Flujo amniótico	Leche materna	Flujo cervicovaginal
Líquido cefalorraquídeo	Flujo de quiste mamario		
	Plasma seminal		
Orina	Fluido folicular		
Fluido de quiste ovárico	Saliva		
	Suero		

Como vemos, hoy en día se conoce bastante sobre la ubicación de la opn5 en los tejidos y los fluidos corporales y ha sido propuesta como biomarcador, como se menciona en la introducción del Capítulo I. La gran mayoría de los estudios sobre la op5 han sido realizados utilizando técnicas moleculares (como ELISA) que, a pesar de ser fiables, requieren horas de trabajo post extracción de la muestra para llevarse a cabo. En este sentido el biosensor implementado en esta tesis pretende desarrollar a la par un protocolo para llevar a cabo una técnica que permita obtener de una manera más rápida y sencilla los mismos resultados de las pruebas moleculares, o bien, que sirvan como un discriminante para la realización de pruebas moleculares permitiendo la optimización de recursos.

## CAPITULO 3. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

El espectro en infrarrojo resulta de la interacción de la radiación con vibraciones moleculares y en el caso de los gases, con rotaciones moleculares. El espectro por sí mismo es una gráfica de la transmisión de radiación en IR en la muestra como una función de la longitud de onda o unidades relacionadas, como lo es el número de onda. La espectroscopia en infrarrojo es la física que trata de la teoría e interpretación de estos espectros y una de las técnicas más populares para la identificación de moléculas. La espectroscopia en infrarrojo, en su región media, puede ser usada como un tipo de *huella dactilar*, única para cada molécula. Adicionalmente, la presencia o ausencia de muchos grupos funcionales puede ser establecida mediante la interacción de este tipo de radiación con las muestras, a través del espectro resultante. Análisis cuantitativos de mezclas pueden ser obtenidos. Los espectros en infrarrojo pueden ser obtenidos para líquidos, sólidos y gases, con poco o nulo tratamiento de las muestras. Diferentes tipos de espectrómetros pueden ser usados, con una gran variedad de muestras posibles por medir<sup>71</sup>.

### ***3.1 Teoría de la espectroscopia en el infrarrojo***

#### ***3.1.1. Espectro electromagnético***

En la región del infrarrojo (IR) la unidad usada para definir el número de onda ( $\sigma$ ) es el centímetro inverso ( $\text{cm}^{-1}$ ), este representa el número de ondas de una onda continua que caben dentro de un cm. Las relaciones del centímetro inverso con otras unidades, como la longitud de onda o la frecuencia de radiación, son las siguientes:

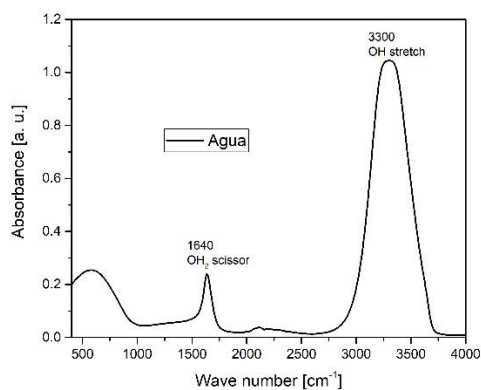
$$\sigma(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\text{cm})} = \frac{10^4}{\lambda(\mu\text{m})} = \frac{\nu(\text{Hz})}{c(\text{cm}/\text{sec})}$$

El número de onda, como vemos, es directamente proporcional a la frecuencia. La región del IR se extiende desde el fin de la región visible a  $0.78 \mu\text{m}$  hasta la región de las microondas con una longitud de onda de alrededor de 1 mm. La región del IR se divide en tres secciones, la más usada es la región del mediano infrarrojo (MIR) desde los  $2.5 \mu\text{m}$  hasta alrededor de los  $50 \mu\text{m}$  ( $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$ ), aunque algunos solo la consideran hasta los  $400 \text{ cm}^{-1}$  o  $25 \mu\text{m}$ , ya que esto depende de las limitaciones del equipo, mientras que el límite de  $4000 \text{ cm}^{-1}$  es el límite del número de onda para absorción de vibraciones fundamentales en el IR. La

región entre el visible y el MIR se le conoce como infrarrojo cercano, esta región es usada, entre otras aplicaciones, para análisis cuantitativos especialmente. A la región entre el MIR y las microondas se le conoce como infrarrojo lejano, y se usa para estudiar vibraciones de baja frecuencia y algunas rotaciones moleculares.

Las transiciones electromagnéticas dan lugar a absorciones en las regiones del visible y el ultravioleta (UV-vis), mientras que las rotaciones puras de moléculas gaseosas dan lugar a absorciones en el lejano IR y las microondas. Las vibraciones intramoleculares dan lugar a absorciones a lo largo de la mayor parte del IR.

En los espectros en infrarrojo como eje horizontal se suele usar el número de onda, siendo un poco indiferente, dependiendo de la costumbre, ordenarse de mayor a menor o a la inversa. En el eje vertical se coloca la transmisión, absorción o cualquier otra característica que se quiera reportar, aunque es usual colocar como unidades el porcentaje de radiación transmitida, absorbida, etc.; se suele reportar como unidades arbitrarias (a. u.). En los picos o bandas importantes se coloca además a que enlace está asociada esta respuesta, como se muestra en el siguiente ejemplo:



*Fig. 3.1. Espectro por FTIR del agua.*

### **3.1.2 Vibraciones diatómicas**

La molécula diatómica es la más sencilla, consistiendo solo de dos núcleos conectados por un enlace químico formado por electrones. Los electrones en una molécula se mueven mucho más rápido que el núcleo, así que los electrones se pueden equilibrar rápidamente en nuevas configuraciones electrónicas mientras que los núcleos cambian lentamente su espaciamiento.

Para el caso de una molécula diatómica, esto es parecido a la energía potencial del resorte ordinario. Existe una cierta longitud de equilibrio del enlace donde la energía es mínima. Si esta longitud incrementa o decremente, la energía potencial incrementa y aparece una fuerza restauradora. Para una molécula diatómica, existe solo un enlace y solo una vibración, que cambia la longitud del enlace periódicamente. En la aproximación del oscilador armónico, se asumen que la fuerza restauradora de cada masa es proporcionalmente lineal al cambio de longitud del enlace desde la longitud de equilibrio, la constante de proporcionalidad se denomina constante de fuerza  $k$ . Para dar una idea de este concepto se muestra la siguiente figura.

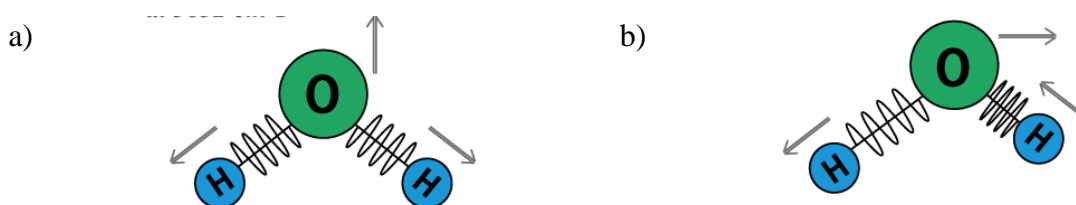


Fig. 3.2. Representación de una molécula de agua. En ella vemos los enlaces como un resorte que se puede comprimir o elongar. Aquí se presentan dos tipos de vibraciones: a) *stretching* simétrico y b) *stretching* asimétrico<sup>72</sup>.

La frecuencia vibracional  $\nu$  de la molécula diatómica puede ser calculada así:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \left[ k \left( \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right) \right]^{\frac{1}{2}}$$

Donde  $\nu$  es la frecuencia vibracional,  $m_1$  y  $m_2$  son las dos masas atómicas y  $k$  la constante de restitución. Nótese que la frecuencia es independiente de la amplitud de la oscilación. Las masas se mueven de manera tal que el centro de masas se conserva estacionario, si  $A_1/A_2$  es la amplitud relativa de las dos masas, entonces se cumple que:

$$\frac{A_1}{A_2} = -\frac{m_2}{m_1}$$

### 3.1.3 Vibraciones poliatómicas

Las moléculas poliatómicas tienen más de una frecuencia vibracional. Un átomo en una molécula puede moverse de manera independiente en tres dimensiones, por lo tanto, en una molécula con  $n$  átomos, se tienen  $3n$  maneras independientes de moverse. El centro de masas

de una molécula puede moverse solo en tres direcciones independientes. Una molécula no lineal puede rotar de tres diferentes maneras, sobre cada uno de los ejes que pasan por el centro de masas. Una molécula lineal tiene un grado menos de libertad ya que la rotación sobre su propio eje no desplaza los átomos. Quitando los movimientos que se acaban de mencionar, quedan  $3n - 6$  grados de libertad que corresponden a los movimientos internos para moléculas no lineales y  $3n - 5$  para moléculas lineales. Estos grados internos de libertad pueden cambiar la forma o tamaño de la molécula sin rotar o trasladar su centro de masas. Estos  $3n - 6$ , o bien  $3n - 5$ , grados de libertad corresponden a modos normales de vibración. En un modo normal de vibración el desplazamiento de las coordenadas cartesianas de cada átomo cambia de manera periódica, cada uno oscilando con la misma frecuencia y pasando por la configuración de equilibrio al mismo tiempo, todo sin trasladar el centro de masas. En la Fig. 3.3 se muestran los modos normales de vibración de una molécula de  $\text{CO}_2$ <sup>71</sup>.

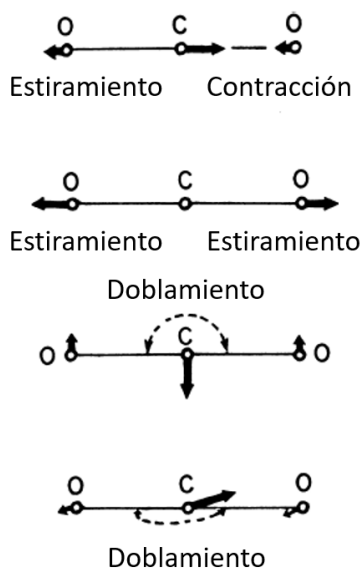


Fig. 3.3. Modos normales de vibración de una molécula de  $\text{CO}_2$ <sup>71</sup>.

### 3.2. Técnicas de medición en el infrarrojo

En un espectrómetro, una fuente de IR envía todas las longitudes de onda en IR de interés a través de la muestra, provocando que algunas de las moléculas vibren con una amplitud incrementada en función de su energía de enlace, la cual es brindada por la energía de la radiación, resultando en la absorción de la radiación de IR a ciertas frecuencias. La frecuencia

de absorción de una banda fundamental de absorción en el IR es la misma que la frecuencia de la vibración molecular que causa la absorción. Esto provee un medio para observar las vibraciones moleculares, que a su vez brinda una huella dactilar para la identificación de moléculas. Las frecuencias pueden usarse también para determinar características internas dentro de la molécula que brindan información sobre su estructura. A continuación, se explican algunas de las técnicas usadas en la espectroscopia en el infrarrojo.

### **3.2.1. Medición de la absorbancia**

Existe una variedad de técnicas para medir absorbancia. En un espectro de haz sencillo la coordenada vertical  $I$  es una medida de la intensidad de la radiación de la fuente (a una longitud de onda dada) atenuada por la absorción de la muestra además del agua y  $\text{CO}_2$  del ambiente. Un espectro de haz sencillo es tomado como referencia con el mismo instrumento, pero sin muestra, consideremos que la coordenada vertical es  $I_0$ . Si la coordenada vertical de estos dos espectros es dividida para cada valor de longitud de onda, se genera un espectro donde la coordenada vertical es la transmitancia o, multiplicada por 100, el porcentaje de la transmitancia, esto no es el porcentaje de transmitancia de la muestra, sino más bien del conjunto completo. Además, la radiación puede perderse por la reflexión del conjunto y por la dispersión, también por algún bloqueo en las aperturas de las compuertas del equipo por donde pasa la radiación, debido a ello, se debe realizar una corrección mediante la lectura del background o línea base.

Si la coordenada vertical del espectro es lineal con el porcentaje de transmitancia, entonces el porcentaje de transmitancia leído en la parte más baja de la banda de la muestra es tomado para ser proporcional a  $I$ . El porcentaje de transmitancia a una misma longitud de onda es leído por el background, que es a donde la lectura llegará si no hay una banda o pico de la muestra, este se toma proporcional a  $I_0$ .

En ocasiones la coordenada vertical del espectro es el valor de la absorbancia más que el porcentaje de transmisión, en este caso, la lectura de absorbancia en la banda o el pico es corregido restando la lectura de absorbancia al background a la misma longitud de onda.

### 3.2.2. Reflectancia difusa (DRIFTS)

Cuando un haz de IR es enfocado sobre una fina partícula de material, el haz incidente puede interactuar con la partícula de varias maneras. Primero, la radiación puede ser reflejada en la superficie superior de la partícula sin penetrarla. Segundo, la radiación puede sufrir múltiples reflexiones en las superficies de la partícula sin llegar a penetrarla. La reflectancia difusa resulta de la penetración de la radiación incidente dentro de una o más partículas de la muestra y su subsecuente dispersión desde la matriz o fluido donde se encuentra la muestra, como se observa en la Fig. 3.4.

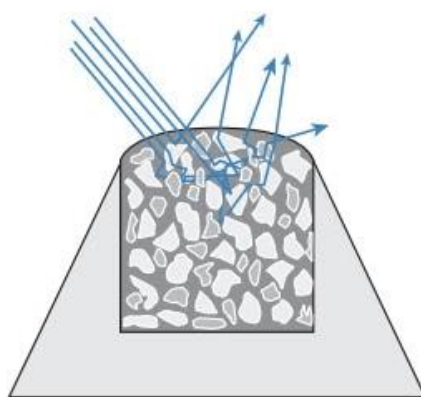


Fig. 3.4. Esquema del fenómeno de reflectancia difusa<sup>73</sup>.

Un accesorio de DRIFTS opera direccionando la energía en IR dentro de una cubeta llena con una mezcla de la muestra y en algunos casos con un fluido o matriz transparente al IR. La radiación en IR interactúa con las partículas y se refleja en sus superficies, provocando que la radiación se disperse, conforme se mueve sobre la muestra. El espejo de salida direcciona entonces la energía de dispersión al detector en el espectrómetro. El detector guarda el haz de IR alterado como una señal de interferograma, que puede ser usada para generar un espectro, típicamente el background es medido utilizando un espejo altamente reflejante.

La técnica de DRIFTS es comúnmente usada para el análisis de muestras que puedan ser dispuestas en polvos con un grano menor a 10  $\mu\text{m}$ , pudiendo ser mezcladas en un polvo como el KBr, el cual es transparente a la radiación infrarroja.

### **3.2.3. Transmisión**

En esta técnica el usuario solo debe colocar una muestra directamente en el camino del haz de IR. Como el haz pasa a través de la muestra, la energía transmitida es medida y el espectro es generado. Sin embargo, la muestra por lo general debe ser preparada antes de que la transmisión se lleve a cabo.

Esta técnica cuenta con la ventaja de ser económica, estable, que su espectro brinda excelente información espectral, lo que la vuelve ideal para mediciones cualitativas.

### **3.2.4. Reflectancia especular/reflexión-absorción**

La reflectancia especular es una técnica para la medición de superficies que opera bajo el principio de eficiencias reflexivas. Este principio establece que cada muestra tiene un índice de refracción que varía con la frecuencia de la radiación a la que es expuesta. En lugar de examinar la energía que atraviesa la muestra, la reflectancia especular mide la energía, que es reflejada en la superficie de la muestra, o su índice de refracción. Mediante la examinación de las bandas de frecuencia, en que la tasa de cambio en el índice de refracción es alta, el usuario puede hacer suposiciones sobre la absorbancia de la muestra.

La técnica de reflexión-absorción trabaja con el mismo principio, pero debido a las propiedades de la muestra, parte de la energía que pasa a través de la capa de la superficie, es absorbida dentro de la mayor parte de la muestra, y entonces se refleja en un sustrato debajo de la capa superficial. Una combinación de reflectancia especular y reflexión-absorción puede ocurrir cuando se cumplen los criterios para ambas técnicas.

Con estas técnicas se analizan comúnmente muestras que tienen superficies grandes, planas y reflectivas. Esta técnica ofrece las ventajas siguientes: es sensitiva a muestras con monocapas, es un análisis no destructivo y tiene un gran rango de accesorios disponibles, que pueden permitir variar el ángulo de incidencia del haz de infrarrojo sobre la muestra.

### **3.2.5. Reflectancia Total Atenuada (ATR)**

Un accesorio de ATR opera mediante la medición en los cambios que ocurren en una reflexión interna de un haz de IR cuando el haz se pone en contacto con la muestra. Un haz de IR es direccionado sobre un cristal ópticamente denso con un índice de refracción alto a

un cierto ángulo. Esta reflectancia interna crea una onda evanescente que se extiende de la superficie del cristal dentro de la muestra puesta en contacto con el cristal.

En regiones del espectro de IR donde la muestra absorbe energía, la onda evanescente será atenuada. El haz atenuado retorna al cristal, entonces sale del lado opuesto del cristal y es dirigido al detector en el espectrómetro IR. El detector guarda el haz atenuado como una señal de interferograma, que puede ser usado para generar un espectro en IR.

Entre las ventajas que ofrece esta técnica se encuentran las siguientes: requiere una preparación mínima de las muestras, el cristal solo requiere de una limpieza muy básica, se pueden realizar análisis de las muestras en sus estados naturales<sup>73</sup>.

### ***3.3. Onda evanescente***

La espectrometría en infrarrojo por reflexión total atenuada (ATR) funciona mediante el uso del fenómeno de onda evanescente. Primero explicaremos que es el fenómeno de reflexión total interna (TIR) para después explicar el ATR.

En espectroscopia por FTIR-ATR, la muestra es puesta en contacto con un cristal de ATR. La radiación en infrarrojo viaja a través del cristal e interactúa con la muestra en la superficie en contacto con el cristal de ATR. Dada la diferencia de índices de refracción entre ambos materiales, se produce el fenómeno de TIR. Esta reflexión forma la llamada “onda evanescente”, que se extiende dentro de la muestra. Basado en la composición de la muestra, una pequeña parte de la radiación en infrarrojo es absorbida cuando la onda evanescente interactúa con la muestra, resultando en una pequeña atenuación de la reflexión total.

#### ***3.3.1. Reflexión total interna.***

Cuando una onda que se propaga llega a la superficie entre dos medios ópticos que están caracterizados por dos índices de refracción distintos a un cierto ángulo de incidencia, la luz es totalmente reflejada, este ángulo es llamado ángulo crítico y puede ser calculado usando la ley de Snell.

La ley de Snell establece que la razón entre dos índices de refracción es igual a la razón inversa del ángulo de incidencia y refracción, para el caso donde no hay refracción, este ángulo se llama ángulo crítico, como se muestra en la Fig. 3.5.

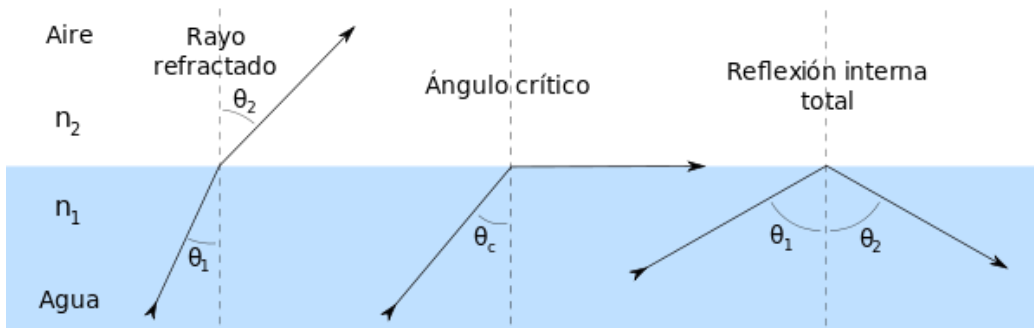


Fig. 3.5. Ejemplo de ángulo crítico para el caso de agua y aire. Cuando el ángulo de incidencia es inferior al crítico hay en su mayoría refracción. Cuando se llega al ángulo crítico deja de haber reflexión, pero la onda se mueve ahora por la interfaz. Finalmente, cuando el ángulo es superior al crítico la reflexión total interna tiene lugar<sup>74</sup>.

### 3.3.2. Onda evanescente

La TIR no explica la interacción del haz de infrarrojo con la muestra, dado que en este caso el haz no dejaría el cristal de ATR. En lugar de eso, la interacción del haz de IR y la muestra ocurre a través del campo evanescente, también llamado “onda evanescente”.

Tras la reflexión de la luz incidente en la interfaz donde el cristal toca la muestra una pequeña fracción de la luz se extiende dentro de la muestra como una onda evanescente. Cuando una onda no puede propagarse de manera regular dentro de una muestra, se concentra en proximidad al punto de reflexión total y decae exponencialmente. La onda evanescente sobresale dentro de la muestra, como se muestra en la Fig. 3.6, donde  $d_p$  representa la profundidad de penetración.

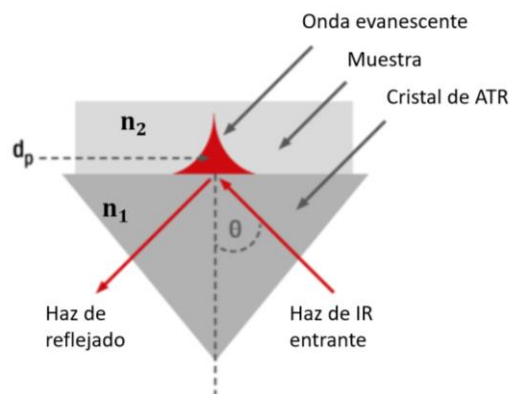


Fig. 3.6. Onda evanescente resultado de la reflexión total interna<sup>75</sup>.

### 3.3.3. Profundidad de penetración

La profundidad de penetración  $d_p$  es una medida de que tan lejos la onda evanescente se extiende dentro de la muestra. Su valor exacto es determinado por la longitud de onda de la radiación, el ángulo de incidencia y los índices de refracción para el cristal de ATR y la muestra. La  $d_p$  está definida como la distancia al punto en que la amplitud de la onda evanescente ha decrecido como  $1/e$  de su valor máximo. Se calcula con la siguiente expresión:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2}}$$

Donde  $\lambda$  es la longitud de onda,  $\theta$  el ángulo de incidencia,  $n_1$  el índice de refracción del cristal de ATR y  $n_2$  el índice de refracción de la muestra. Dado que la mayoría de las muestras orgánicas tienen un índice de refracción de 1.5 aproximadamente, considerando una longitud de onda de  $10 \mu\text{m}$ , la  $d_p$  será de aproximadamente  $2 \mu\text{m}$ . Este valor es ampliamente usado para los cálculos.

Existen dos tipos distintos de cristales o celdas de ATR; los de reflexión, que es como el usado para el desarrollo de este trabajo, y los de reflexión múltiple, donde el haz penetra múltiples veces en la muestra.

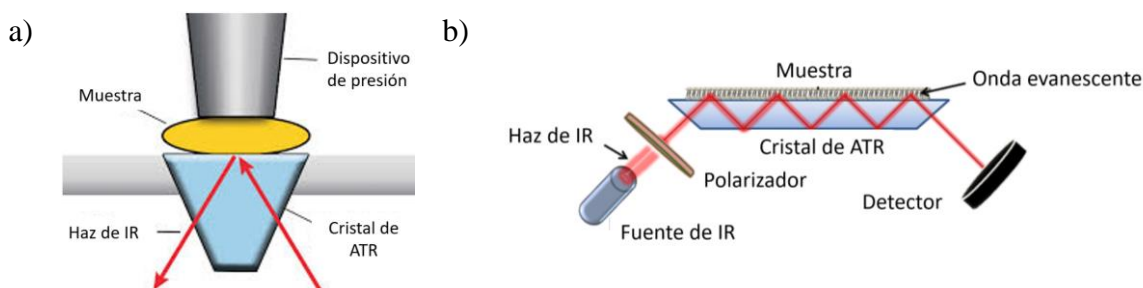


Fig. 3.7. Esquema de arreglos de cristales de ATR. a) De paso simple y b) de paso múltiple. El que se usa en el desarrollo de este trabajo es como el del caso a) <sup>76,77</sup>.

Como se observa en la Fig. 3.8, la definición de las bandas y los espectros se define mejor conforme se van aumentando el número de reflexiones, ya que la absorción va siendo mayor para cada banda presente en la muestra, sin embargo, los cristales de más de una reflexión son más caros por su longitud y es necesario un mayor volumen de muestra.

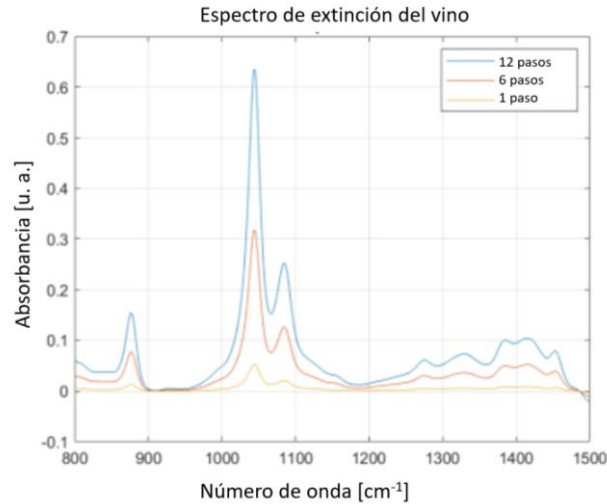


Fig. 3.8. Espectro de extinción del vino tomadas con diferente número de reflexiones<sup>78</sup>.

### 3.4. Espectroscopia por Transformada de Fourier

En un espectrómetro de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR), no existe un monocromador para dispersar o separar la radiación como función de su longitud de onda. En lugar de eso, un espectro completo es generado todo de una vez y la intensidad de todas las longitudes de onda son analizadas de manera simultánea. Ya que todas las frecuencias de la radiación llegan al detector al mismo tiempo, existe una gran relación señal-ruido. Esto es conocido como “multiplex” o la ventaja de Fellgett y es una de las principales ventajas que un espectrómetro por FTIR tiene sobre los instrumentos de dispersión, esta es particularmente notable para condiciones de bajas energías o donde la escala de expansión se requiere para mostrar bandas muy débiles. Otra de las ventajas es que estos espectros pueden ser adquiridos en menos tiempo.

La parte más importante de un espectrómetro por FTIR es un interferómetro tipo Michelson. La radiación de la fuente sale paralela y golpea un divisor de haz, típicamente a 45°, como se muestra en la Fig. 3.9. Los haces transmitido y reflejado dejan el divisor en ángulos rectos, ambos llegan a los espejos, que regresan los haces al divisor. Los dos haces se recombinan en el divisor y la interferencia tiene lugar. La radiación que abandona el divisor puede regresar a la fuente o puede viajar en ángulos rectos, pasando a través de la muestra y después viajando al detector.

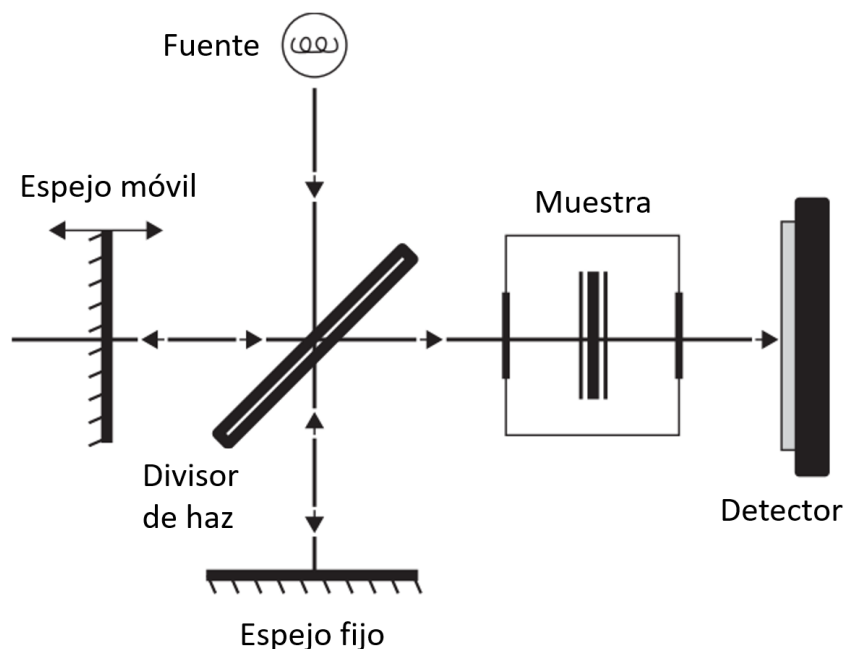


Fig. 3.9. Interferómetro de Michelson de un espectrómetro FTIR. Arriba se tiene la radiación proveniente de la fuente, que es transmitida y también reflejada por un divisor de haz a dos espejos. Ambos espejos reflejan la radiación de regreso al divisor de haz, donde ocurre la interferencia<sup>79</sup>.

Uno de los dos espejos es móvil, así que la distancia desde el divisor de haz puede ser variado, la diferencia de camino óptico entre los dos haces en el interferómetro es llamado “retardo” y es dos veces el desplazamiento del espejo móvil desde el punto en el que equidistan. Si una fuente monocromática, como un láser, es usada, la energía de radiación que llegue al detector variará como una función del coseno del retardo y la respuesta del detector será un máximo cada vez que el retardo sea un número entero de la longitud de onda de la radiación.

Si ahora usamos una fuente policromática, su espectro puede ser pensado como una serie de emisiones tipo laser muy juntas, cada una con su propia longitud de onda e intensidad. Cada una de estas genera un interferograma tipo coseno, así el interferograma de una fuente policromática de radiación es la suma de todas las funciones coseno de cada uno de los elementos tipo laser, dependiendo de la resolución del equipo. Dado que un interferómetro no produce un espectro sino un interferograma, debe usarse una computadora para llevar a cabo la transformada de Fourier, que genera el espectro del interferograma. La transformada de Fourier básicamente parte del interferograma brindado por ondas sinusoidales para cada longitud de onda de la radiación y lo transforma en un espectro utilizando la propiedad de

que a una función continua y periódica la transforman en cero, excepto en dos puntos (con valor igual a la frecuencia), donde vale  $\pi$ , como se muestra en la siguiente figura.

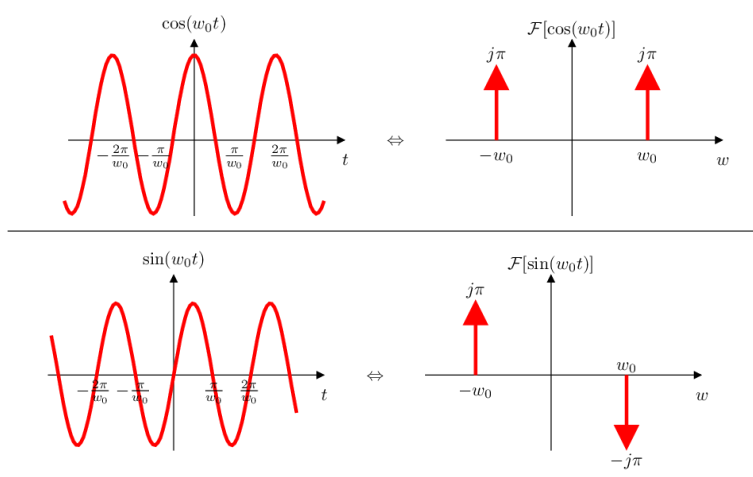


Fig. 3.10. Transformada de Fourier para las funciones seno y coseno<sup>80</sup>.

En el procesamiento del interferograma las ondas sinusoidales son acomodadas sobre la longitud de onda para producir un espectro convencional<sup>79</sup>. En la Fig. 3.11 se muestra un esquema del funcionamiento de este sistema.

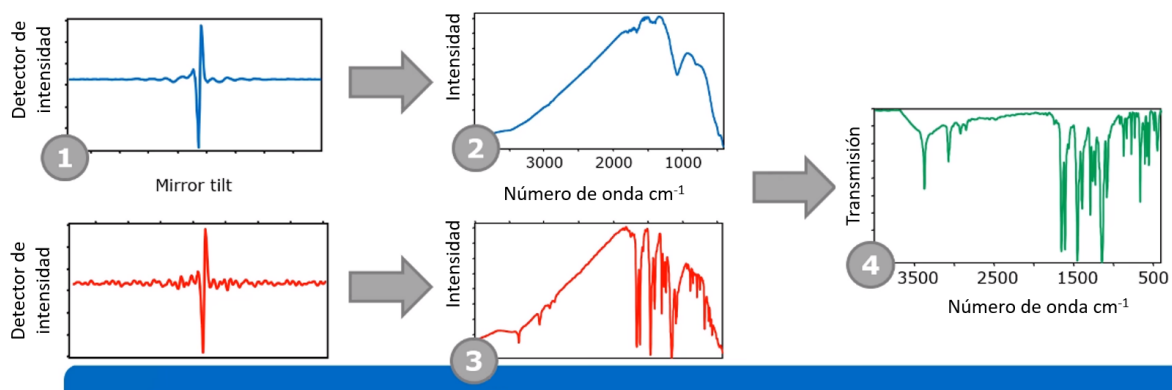


Fig. 3.11. Diagrama del funcionamiento de un espectro por FTIR<sup>81</sup>.

Un solo escaneo del espejo móvil produce un espectro completo, sin embargo, un espectro producido de un solo escaneo tiene un nivel relativamente alto de ruido. Usualmente, un cierto número de escaneos es tomado y la señal es promediada por el equipo.

Un espectro es tomado sin la muestra y otro con la muestra es guardado en la memoria, la computadora obtiene una razón entre estos dos para brindar un espectro del porcentaje de transmisión.

Mediante el uso de la computadora o el software se puede modificar aún más el espectro, por ejemplo, se puede quitar el background, o se puede generar una escala lineal de absorbancia.

### 3.5. Técnicas de macro-infrarrojo y micro-infrarrojo

A la técnica común de colocar una muestra sobre un cristal de un espectrómetro es a lo que se le conoce como macro -infrarrojo. Recibe esta denominación ya que el tamaño del cristal es de unos 2 mm de lado, por lo que el área donde se toma el espectro es grande y se tiene poca exactitud. En la siguiente figura se muestra una fotografía del espectrómetro Vertex 70 de la marca Bruker, usado para el desarrollo de este trabajo, y en la siguiente figura un diagrama del funcionamiento de este.

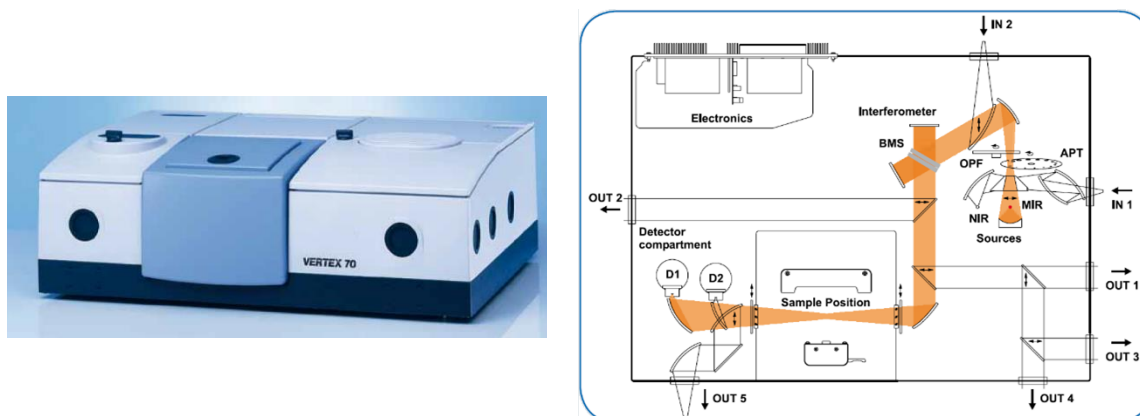
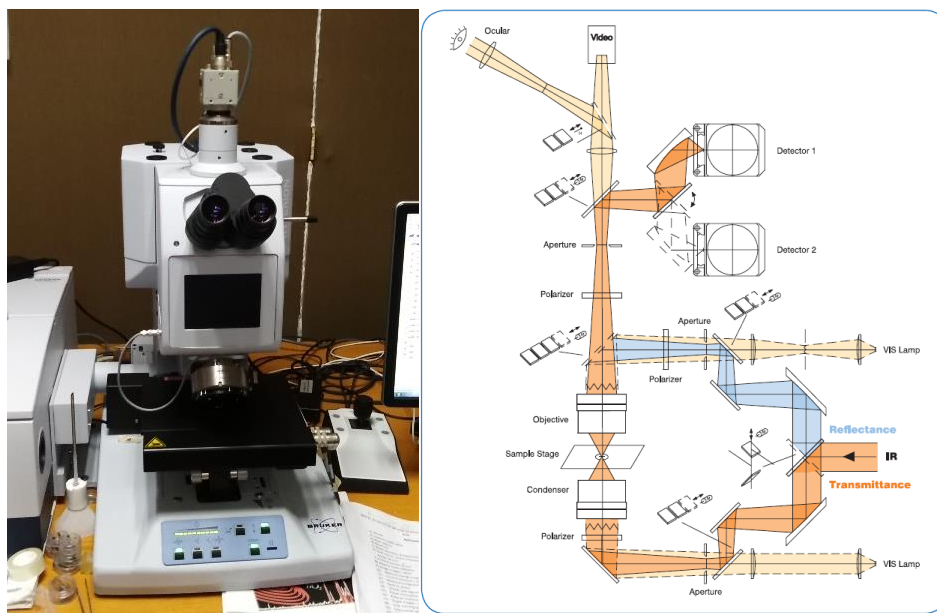


Fig. 3.12. Del lado izquierdo se observa un espectrómetro FT-IR Vertex 70, marca Bruker. Del lado derecho se muestra el diagrama del funcionamiento de dicho espectrómetro. Seguido de la fuente de radiación se encuentra el interferómetro, después de ello pasa por la muestra para llegar finalmente al detector.

Para aumentar la precisión de donde se está tomando el espectro, se hace uso de un microscopio que se puede conectar al espectrómetro. Con ayuda de este equipo se pueden obtener espectros de áreas de unos  $15 \mu\text{m}^2$ . En la Fig. 3.13 se muestra una fotografía del microscopio que se usó durante el desarrollo de este trabajo y un diagrama de su funcionamiento. La aplicación del microscopio permite obtener espectros a escala micrométrica, en regiones de muestreo muy específicas o de interés particular.



*Fig. 3.13. Del lado izquierdo se muestra una fotografía del microscopio Hyperion 2000, se observa en la foto que está conectado en la salida 1 del espectrómetro Vertex 70, así mismo se observa su joystick para mover la plataforma y enfocar las muestras. Del lado derecho se muestra un diagrama del camino que sigue la radiación proveniente de la fuente del espectrómetro.*

Para poder hacer uso de este equipo es necesario conectarlo a un puerto de salida del espectrómetro, y con ayuda del software OPUS (propio de la marca Bruker) se realizan cambios de compuertas para llevar la radiación en IR a través del microscopio. Una de las ventajas adicionales del uso del microscopio es que permite obtener fotografías de las muestras, mostrando características como su morfología aproximada o la calidad del autoensamblado para el caso del biosensor desarrollado.

### **3.6. Vibraciones moleculares**

Las moléculas están hechas de átomos conectados mediante enlaces moleculares. La longitud de dichos enlaces (la distancia entre los átomos) no está fija. Así, como un todo, la molécula vibra. Las vibraciones moleculares pueden ser considerados como el movimiento de partículas conectadas por resortes imaginarios.

Dado que la vibración de una molécula no cambia la energía de sus electrones ignoraremos la configuración electrónica y consideraremos a la molécula como un número de puntos de masa (los núcleos), las principales posiciones relativas de ellos estarán fijadas por algún campo de fuerza intramolecular. El número de “grados de libertad” que posee una molécula

es el número de coordenadas requeridas para especificar completamente la posición de los núcleos. Dado que cada núcleo necesita tres coordenadas para definir su posición en el espacio, una molécula compuesta por N núcleos tiene un total de 3N grados de libertad. De ellos, tres nos servirán para especificar la traslación del centro de masas y, en general, otras tres serán requeridas para describir la rotación de la molécula como un todo alrededor del centro de masas. Las restantes 3N-6 deben ser asociadas con los movimientos relativos entre los núcleos, o, en otras palabras, a las vibraciones de la molécula.

El desplazamiento de estos átomos será entonces  $\Delta\vec{r}_i = \vec{r}_i - \vec{r}_i^e$ , donde  $\vec{r}_i = x_i + y_i + z_i$  es la posición instantánea del átomo y  $\vec{r}_i^e$  es la posición de equilibrio del i-ésimo átomo. Por lo tanto, la energía cinética T de una molécula puede ser expresada como:

$$T = \frac{1}{2} \sum m_i \left[ \left( \frac{d\Delta\vec{x}_i}{dt} \right)^2 + \left( \frac{d\Delta\vec{y}_i}{dt} \right)^2 + \left( \frac{d\Delta\vec{z}_i}{dt} \right)^2 \right]$$

Si ahora definimos un conjunto de coordenadas nuevas de la siguiente manera:

$$q_1 = \sqrt{m_1} \Delta x_1, q_2 = \sqrt{m_1} \Delta x_2, q_3 = \sqrt{m_1} \Delta x_3, q_4 = \sqrt{m_2} \Delta x_2 \dots$$

Entonces podemos escribir la energía cinética de la siguiente forma:

$$T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N} \dot{q}_i^2$$

La energía potencial V puede ser expresada en términos de  $q_i$  tal que

$$V = V(0) + \sum \left( \frac{\partial V}{\partial q_i} \right)_0 q_i + \frac{1}{2} \sum \left( \frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right)_0 q_i q_j + \dots$$

Donde V(0) es la energía potencial en el punto de equilibrio, que bien se puede elegir V(0)=0.

$\left( \frac{\partial V}{\partial q_i} \right)_0$  es el valor en el punto de equilibrio que igualmente puede escogerse 0. Así,

aproximando a segundo orden se tiene que

$$V = \frac{1}{2} \sum f_{ij} q_i q_j$$

Donde  $f_{ij} = \left( \frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right)_0$  puede ser considerado como una fuerza constante entre las coordenadas  $q_i$  y  $q_j$ . Ahora considérese el lagrangiana  $L=T-V$ , entonces:

$$\frac{d}{dt} \left( \frac{\partial L}{\partial \dot{q}_i} \right) - \frac{\partial L}{\partial q_i} = 0, \quad i = 1, \dots, 3N$$

Tenemos que

$$\ddot{q}_i + \sum_{j=1}^{3N} f_{ij} q_j = 0$$

Supongamos que se tiene la solución  $q_i = q_i^0 \cos(\omega t + \phi)$ , sustituyendo en las ecuaciones anteriores:

$$\sum_{j=1}^{3N} (f_{ij} - \delta_{ij} \omega^2) q_j^0 = 0, \quad i = 1, \dots, 3N$$

Donde  $\delta_{ij}$  es la delta de Kronecker. Para que este conjunto de ecuaciones tenga una solución no cero, el determinante  $|f_{ij} - \delta_{ij} \omega^2| = 0$ . El número de soluciones es  $3N$ . Para una molécula no lineal, existen seis soluciones con  $\omega_k^2 = 0$ , correspondiente a las tres traslaciones y tres rotaciones de la molécula como un todo. Para una molécula lineal hay dos rotaciones, y así, cinco soluciones con  $\omega_k^2 = 0$ .

La normalización que se utiliza comúnmente es

$$\sum (q_{i,k}^0)^2 = 1$$

El  $q_{i,k}^0$  normalizado se expresa como  $L_{ik}$ . Cuando se está en un modo, la diferencia de fase entre dos átomos vibrando puede ser solo 0 (en fase) o  $\pi$  (fuera de fase), dependiendo de si sus  $L_{ik}$  tienen signos iguales u opuestos. Estos modos son conocidos como modos normales.

Nótese que, en un modo normal, la diferencia de fases entre los desplazamientos atómicos son 0 o  $\pi$ , consecuencia de la aproximación armónica. Bajo la aproximación armónica, se tiene la rutina para encontrar los eigenvalores y eigenvectores. Los eigenvalores corresponden a las frecuencias y los eigenvectores a los desplazamientos atómicos. Los eigenvectores son reales y las diferencias de fase entre los desplazamientos atómicos pueden

ser solo entre 0 y  $\pi$  dependiendo de si tienen signos iguales u opuestos. Cuando se considera una aproximación no armónica, no será posible obtener los eigenvalores y eigenvectores y las diferencias de fase no serán solo 0 o  $\pi$ . Entonces, no existen los modos normales ni las simetrías. En general, podemos decir que, en estados bajos, la diferencia de fase puede ser arbitraria y las características locales se deberán a un acoplamiento débil. En los estados más altos la fase estará fija alrededor de 0 o  $\pi$ . Para un modo normal de vibración con  $\omega_k$ , existe una coordenada normal  $Q_k$ , relacionada a  $q_i$  de cualquiera de las dos siguientes maneras equivalentes:

$$q_i = \sum_k L_{ik} Q_k$$

$$Q_k = \sum_i L_{ik} q_i$$

Así se tiene que

$$\ddot{Q}_k + \omega_k^2 Q_k = 0, \quad k = 1, 2, \dots, 3N - 6$$

Bajo la aproximación armónica, no existen acoplamientos entre los modos normales. Un modo normal es simplemente un oscilador armónico simple, y así, la energía vibracional de una molécula será:

$$E = \sum_k \hbar \omega_k \left( n_k + \frac{1}{2} \right)$$

Donde  $n_k$  son los números cuánticos.<sup>82</sup>

## **CAPITULO 4.**

### **METODOLOGÍA Y MATERIALES**

En el presente capítulo se explicará cual fue la metodología de cada una de las partes experimentales de este trabajo. Se comenzará con la caracterización de tres cromóforos retinales, posteriormente se explicará el protocolo y las técnicas de caracterización empleadas, para el autoensamblado del biosensor para la determinación de op5 en modelo murino, tema central de la presente tesis.

#### ***4.1. Determinación del estado conformacional del estado de tres cromóforos***

Como ya se explicó en capítulos anteriores, los cromóforos son una estructura interproteica que cambia de conformación o configuración cuando es irradiado con una longitud de onda específica, provocando un cambio de la función en la proteína a la que pertenece. A este cambio de conformación se le conoce como isomerismo o desnaturalización proteica, el cual puede ser reversible o irreversible, dependiendo de la longitud de onda usada para la radiación, la potencia aplicada o bien del tiempo que dure esta radiación. Se llevó a cabo una caracterización de estas estructuras debido a que la forma estructural afecta la función de la proteína, así como su asimilación por las células, pudiendo desembocar hasta en una enfermedad degenerativa.

Se hizo uso de los siguientes estándares de cromóforos: 9 cis-retinal (9cr), 13 cis-retinal (13cr) y all trans-retinal (altr), todos adquiridos a Sigma Aldrich. Para su caracterización, 0.6 mg de cada cromóforo fueron disueltos en 100  $\mu$ l de tritón X-100.

Para radiar los cromóforos se utilizaron dos fuentes, la primera fue un láser de He-Ne con longitud de onda de 633 nm y potencia de 15.2 mW y la segunda un diodo-láser con longitud de onda de 532 nm y 26.4 mW de potencia.

En el cristal del espectrómetro fueron colocados directamente 5  $\mu$ l de tritón para medirlo como línea base, después de ello se limpió el cristal y se colocó 5  $\mu$ l de muestra. Posteriormente, mediante el uso del software OPUS, se programaron cinéticas para el espectroscopio para tomar mediciones cada 5 o 10 segundos. Para todas las cinéticas se permitió que las tres primeras mediciones fueran sin radiación, midiendo únicamente la muestra, a partir de la cuarta medición, la muestra fue irradiada; después de terminado el tiempo de radiación, el camino del láser era bloqueado, o bien, el láser apagado y se permitía

que continuara el corrimiento de la cinética mientras los cromóforos regresaban a su configuración original y se tomaba lectura de ello.

Posterior a la caracterización de los cromóforos, cuya finalidad fue conocer de qué manera se pueden observar los cambios conformacionales en las proteínas, se dio paso a la parte medular de esta tesis, que es el desarrollo de biosensores en matrices planares usando anticuerpos como ERB para la detección de opsina 5 en tejidos de modelo murino.

#### **4.2. Preparación de los soportes**

Los soportes fueron obtenidos de obleas de Silicio cristalino marca *PureWafer* con una sola cara pulida y dos pulgadas de diámetro. La orientación cristalina de las obleas era (1,0,0), dopadas con Boro, tipo P, su grosor era de 254 – 304  $\mu\text{m}$  y resistividad de 5 – 10  $\Omega\text{cm}$ . En la Fig. 4.1 se muestra una imagen de las obleas usadas.



*Fig. 4.1. Obleas de silicio cristalino usadas para los soportes hechos para el autoensamblado de los biosensores.*

Con ayuda de un cortador para fibra de vidrio y pinzas de disección las obleas fueron cortadas, en los primeros intentos en soportes de 4 – 5 mm de lado, una vez perfeccionada la técnica, se lograron cortar soportes de 2 – 3 mm de lado. Esto resulta beneficioso dado que incrementa el rendimiento de la oblea, así como la del tejido cuando se lleva a cabo la interacción con el biosensor e incrementa la exactitud de la región de interacción, principalmente en el caso del hipotálamo.

Desde este punto en adelante se procuró siempre tomar los soportes por los costados con las pinzas, y que la cara pulida nunca tocara ninguna superficie hasta que se tomaran los espectros, ya que sobre esta superficie es donde se hizo crecer el biosensor.

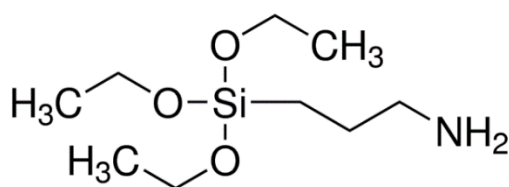
#### **4.3. Hidroxilación de los soportes**

La finalidad de hidroxilar la superficie es eliminar algunas impurezas que pudiesen haber quedado en la superficie, con la ventaja que se agregan algunos grupos -OH, a los cuales también son afines los grupos silano que se usarán en la funcionalización de la superficie.

Una vez cortados los soportes, fueron lavados bajo el chorro directo de agua desionizada y secados bajo el flujo de nitrógeno (N), posteriormente fueron sumergidos con la cara pulida hacia arriba en una caja coplin con una solución de hidróxido de potasio (KOH), agua desionizada y metanol a 1 molar, esto es 15 ml de agua desionizada, 15 ml de metanol y 844 mg de KOH en lentejas. Se permitió que los soportes se hidroxilaran por el lapso de una hora, pasado este tiempo, fueron extraídos y lavados tres veces con chorritos de 2 ml de metanol y secados bajo el flujo de N.

#### **4.4. Proceso de silanización por fase química**

El químico usado para esta funcionalización fue el 3 – aminopropiltriethoxisilano (3AMPTS), con peso molecular de 221.37 g/mol y cuya fórmula lineal es  $H_2N(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$ . La estructura de este químico es la siguiente:



*Fig. 4.2. Estructura del 3AMPTS<sup>83</sup>.*

El objetivo de esta fase es enlazar los grupos  $CH_3$  a los grupos Si-Si y Si-O de los soportes, dejando expuestos los grupos amino ( $NH_2$ ) para la inmovilización del anticuerpo.

A lo largo de este trabajo se le llamará fase química a la funcionalización por metodología de inmersión, que se detalla a continuación, todo el proceso fue llevado a cabo dentro de una campana de extracción.

En un vaso de precipitados de 50 ml cubierto de aluminio se calentaron 29.4 ml de tolueno con la finalidad de evaporar el agua que pudiese tener el tolueno. Al alcanzar los 90 °C se agregaron 600 µl de 3AMPTS, se retiró el vaso de la parrilla y se esperó que descendiera la temperatura a 30 °C, momento en que la solución fue vertida dentro de una caja coplin, los soportes previamente hidroxilados fueron introducidos con la cara pulida hacia arriba procurando evitar que se sobrepusieran, la caja fue tapada y se permitió que el proceso se llevara a cabo durante dos horas, de acuerdo al protocolo de Caso-Vargas (2016)<sup>84</sup>.

Cuando se cumplieron las dos horas, los soportes fueron extraídos, enjuagados tres veces con chorritos de 2 ml de tolueno y secados bajo el flujo de N.

Posterior a la funcionalización se pasó a la fase de inmovilización del anticuerpo OPN5.

#### ***4.5. Proceso de silanización por fase gaseosa***

Para este proceso se utilizó una mufla, una botella de 150 ml con tapón de rosca y una cama de aluminio que evitaba que los soportes entraran en contacto directo con el 3AMPTS.

El primer paso consistió en precalentar la mufla a 140 °C e introducir la botella con la cama de aluminio para que se atemperara durante 30 minutos. Posterior a esto, se sacó la botella de la mufla para colocar sobre la cama 6 o 7 soportes con la cara pulida hacia arriba.

Una vez introducidos los soportes se agregaron 100 µl de 3AMPTS en el cuello de la botella, se cerró con su tapa de rosca y se introdujo nuevamente a la mufla. Pasadas las 20 horas se sacó la botella de la mufla, las matrices fueron extraídas con pinzas y se procedió a la inmovilización del anticuerpo.

#### ***4.6. Inmovilización del anticuerpo en la superficie del soporte***

Para esta fase del autoensamblado se utilizaron agitadores orbitales a 100 rpm y cajas Petri de 4 pulgadas. La metodología para la inmovilización fue la misma independientemente de la metodología usada para la silanización de los soportes. El anticuerpo policlonal OPN5 fue adquirido en LabSpan Biosciences (Estados Unidos de América) con número de catálogo LS-C120811-50 y con apoyo del bioterio Claude Bernal de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, se otorgaron disueltos en relación 1:100 en PBS-tritón.

En una caja Petri inclinada alrededor de 5 mm, fueron colocados 5  $\mu$ l de la solución del anticuerpo, se adicionaron 95  $\mu$ l de PBS (pH 7.4), se revolvió 10 veces con ayuda de una micropipeta calibrada a 100  $\mu$ l y la solución fue reservada en la micropipeta.

Un soporte fue colocado en la parte baja de la caja Petri con la cara pulida hacia arriba y la solución fue vertida sobre él, procurando que abarcara toda su superficie. Posteriormente se encendió el agitador orbital a 100 rpm. Después de una hora los soportes fueron extraídos y enjuagados tres veces con chorritos de 100  $\mu$ l de PBS. En este punto los biosensores seleccionados para interacción no fueron secados y pasaron directamente a la interacción con los tejidos en búsqueda de la opsina 5. Algunos otros fueron secados bajo el flujo de N para ser medidos como control en el espectroscopio mediante MIR-ATR.

#### ***4.7. Interacción de los biosensores con tejidos de modelo murino***

Los tejidos de rata Wistar fueron brindados en cortes criogénicos de 30 – 70  $\mu$ m de grosor. Posteriormente dos soportes por tejido por fase de inmovilización fueron interactuados colocándolos en contacto directo la cara donde se autoensambló el biosensor (cara pulida) con el tejido de gónadas de rata macho, gónadas de rata hembra, cerebro de macho y cerebro de hembra. Se colocaron 5  $\mu$ l de PBS sobre el soporte y se dejó que se llevara a cabo la interacción durante media hora, después de este tiempo, los soportes fueron retirados y se enjuagó la cara pulida tres veces con chorritos de 100  $\mu$ l de PBS y secados bajo el flujo de nitrógeno para su posterior toma de espectro mediante MIR-ATR.

#### ***4.8. Preparación de los tejidos***

Los tejidos completos fueron otorgados por el bioterio Claude Bernard a través del laboratorio de endocrinología de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP. Estos fueron llevados para su corte por criogenia al Centro de Investigación y Reproducción Animal de la Universidad Autónoma de Tlaxcala – CINVESTAV. El material biológico fue lavado con PBS con un pH de 7.5 y posteriormente fueron fijados con formaldehído al 10%. La crioprotección se realizó mediante la inmersión en una solución de sacarosa al 30% durante 72 horas. Los cortes fueron hechos con un criostato marca Leica a -20 °C, su grosor fue desde 30 – 70  $\mu$ m. Para su manipulación los cortes fueron colocados directamente en cubreobjetos de plástico. Gracias a la colocación de los tejidos sobre los cubreobjetos se volvió sumamente sencilla la fase de interacción, ya que se simplificó la identificación de las regiones donde se

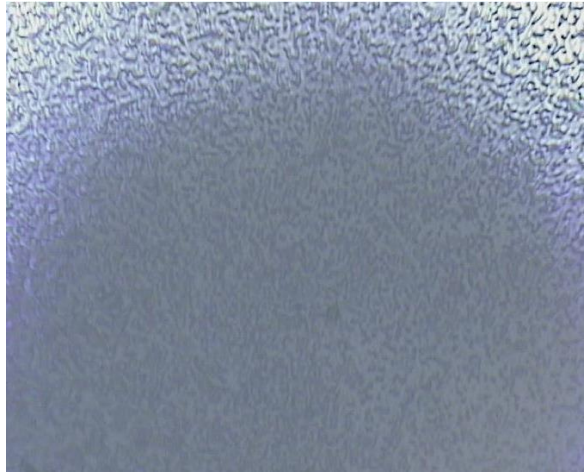
interactuó el biosensor, principalmente en el hipotálamo, y la colocación del biosensor en contacto con el tejido. Así mismo el transporte de los tejidos se volvió sencillo, ya que no existían líquidos que se pudiesen derramar.

#### ***4.9. Metodología de medición del IR en modo macro***

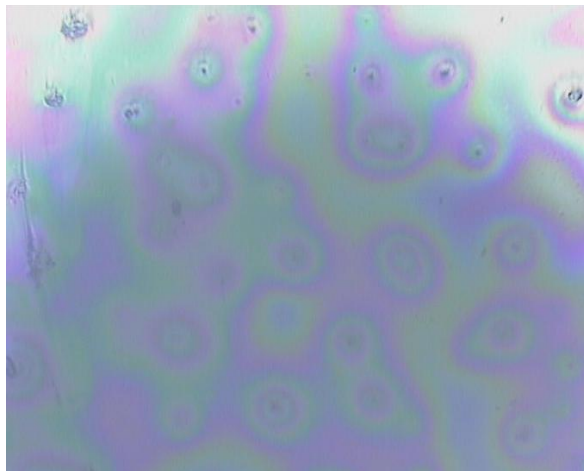
Se usó el equipo Vertex 70 de la Fig. 3.12, se tomó como línea base siempre el proceso anterior, excepto para los soportes limpios, en cuyo caso la línea base fue el cristal de seleniuro de zinc. Al retirar el soporte del cristal del espectroscopio (desde la fase de funcionalización), el cristal se limpió con alcohol étlico para eliminar residuos y se secó perfectamente antes de colocar la siguiente muestra, esto para evitar que algún residuo pudiese dar señales de fases anteriores y de esta manera se opacasen las nuevas señales. La línea base se midió 60 veces mientras que la muestra se midió 120 veces. Se procuró medir varias regiones del soporte, ya que el cristal del equipo tiene 2 mm de lado y los soportes de 3-5 mm de lado.

#### ***4.10. Metodología de medición en el modo micro***

Para esta fase se utilizó el equipo Hyperion 2000 de la marca Bruker como el mostrado en la Fig. 3.13, acoplado al espectrómetro Vertex 70, donde se encontraba la fuente de IR que se utilizó para la toma de espectros. Para hacer uso de este equipo es necesario enfriar el detector con nitrógeno líquido. Se utilizó el equipo con un objetivo de 20X, en modo de transmitancia. La línea base para todos los casos fue un espejo de oro, perteneciente a la platina propia del Hyperion 2000. Se tomaron dos mediciones en regiones distintas de cada soporte medido, en configuraciones de matrices de 4x4 cada una, con 32 mediciones por cada punto de la matriz. Para cada medición se procuró realizar los espectros en las regiones donde se tuviera mejor uniformidad y pocos espacios vacíos, como la región mostrada en la Fig. 4.3, evitando regiones como la mostrada en la Fig. 4.4. Esto hace un total de 32 mediciones por soporte muestreado.



*Fig. 4.3. Microfotografía de un biosensor interactuado con cerebro de macho. Todos los puntos que se ven en la imagen corresponden a biosensores, o bien, a regiones donde se ha (cuando menos) silanizado la superficie, mientras que en los espacios “blancos” se observa el silicio directamente.*



*Fig. 4.4. Microfotografía de un soporte funcionalizado el cual se mantuvo durante 6 meses en PBS. Como vemos, bastante material se ha removido a causa del tiempo, y aunque es un ejemplo un tanto extremo, se procuró evitar este tipo de regiones dado que nos brindan poca información debido a su baja uniformidad y cantidad de material deposito en la matriz soporte.*

Las metodologías para el autoensamblado del biosensor que se han utilizado adicionan los mismos enlaces a la superficie del soporte, aunque los resultados finales pueden variar. En el siguiente capítulo se muestran los resultados obtenidos para cada una de estas metodologías de autoensamblado, así como los correspondientes a la caracterización de cromóforos.

## CAPÍTULO 5. ARREGLOS EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN

En el presente capítulo se explicarán y mostrarán los arreglos realizados para llevar a cabo cada una de las fases del proceso experimental desarrollados en este trabajo de tesis.

### 5.1. Caracterización de los láseres usados

Al inicio, para conocer la potencia real de cada laser se usó un medidor de potencia óptica. Para ello se montó un arreglo parecido al que se tendría en la caracterización de los cromóforos, pero con la finalidad de caracterizar los láseres. Los diagramas de los arreglos para estas mediciones se muestran en la Fig. 5.1.

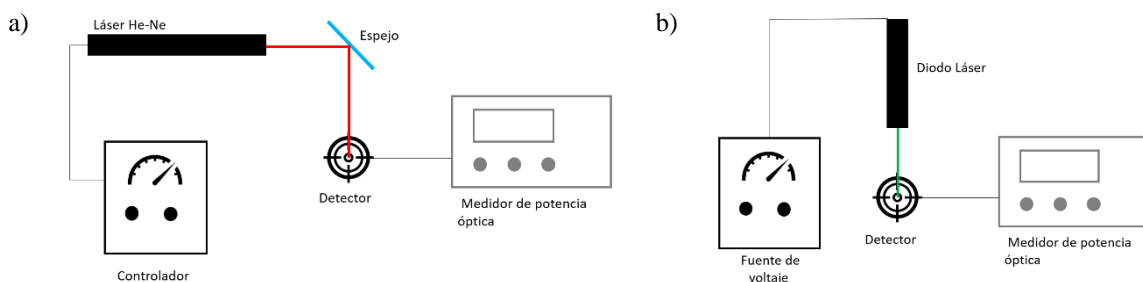


Fig. 5.1. Diagrama del arreglo para medir la potencia óptica de cada uno de los láseres. a) Para el láser de He-Ne y b) para el diodo láser.

El láser de He-Ne se ha colocado de manera horizontal y alineado para radiar el punto de interés, ya sea la muestra o el detector del medidor de potencia óptica. La radiación fue acoplada al detector de potencia marca Thorlabs modelo PM100D. La potencia del láser de He-Ne, con 633 nm de longitud de onda fue de 15.2 mW mientras que la del diodo láser con longitud de onda de 532 nm fue de 24.6 mW. En la Fig. 5.2 se muestra una foto de los arreglos usados para la medición de la potencia de los láseres y posteriormente de los cromóforos. Se decidió armar este arreglo sobre el espectrómetro debido a que esta es también la configuración usada para radiar los cromóforos en las cinéticas espectroscópicas. Este arreglo en la práctica no tiene inconveniente, ya que los detectores y el interferómetro del equipo funcionan con radiación en infrarrojo, mientras que los cromóforos sufren cambios de configuración con longitudes de onda en la región visible.

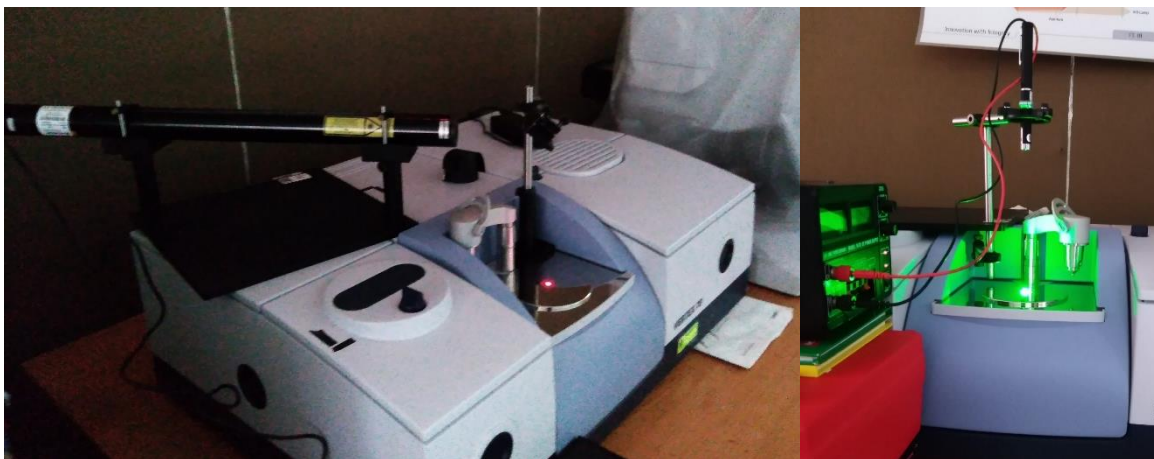


Fig. 5.2. Fotografía de los arreglos experimentales para la caracterización de la potencia de salida de los láseres, mismo arreglo utilizado para irradiar los cromóforos.

### **5.2. Solvente y concentración para la caracterización de los cromóforos**

Una vez conocida la potencia de los láseres utilizados, se buscó determinar cuál sería el mejor solvente para los cromóforos. Para ello se intentaron disolver 2 mg de all trans-retinal (altr) en 100  $\mu$ l de cada uno de ellos. A continuación, se mencionan los solventes con los que se intentó realizar la solución y el motivo por el que fueran descartados o seleccionados.

Agua: Los cromóforos resultaron no ser solubles en agua.

Buffer de fosfatos (PBS): La composición principal del PBS es agua, por lo que resulto en problemas similares al caso anterior.

Etanol: Los cromóforos resultaron ser altamente solubles en etanol, sin embargo, ya que este se evapora de manera rápida a temperatura ambiente, la señal del IR-ATR se vuelve baja en comparación con el ruido.

Cloroformo: Los cromóforos no se disolvían apropiadamente, dado que se formaban grumos, por lo que su uniformidad era pésima.

Tritón X-100 (tritón): Los cromóforos son solubles, no se evapora a temperatura ambiente, por lo que genera poco ruido en la señal del espectroscopio. Además, el tritón es adicionado al PBS donde se encuentran inmersos los anticuerpos, para mantener la estabilidad de estos; por lo que resulta útil conocer sus características. Por las razones anteriormente expuestas es que se escogió al tritón como solvente para esta parte del desarrollo experimental, con el

inconveniente que debido a su viscosidad es tardado el proceso de disolución, dependiendo del cromóforo a disolver.

En la Fig. 5.3 se presentan los espectros tomados usando el equipo Vertex 70 de los solventes en lo que se intentó disolver los cromóforos, en todos ellos se ha medido 60 veces el cristal del espectrómetro (diamante seleniuro de zinc, que llamaremos simplemente línea base cristal) y 120 veces la muestra.

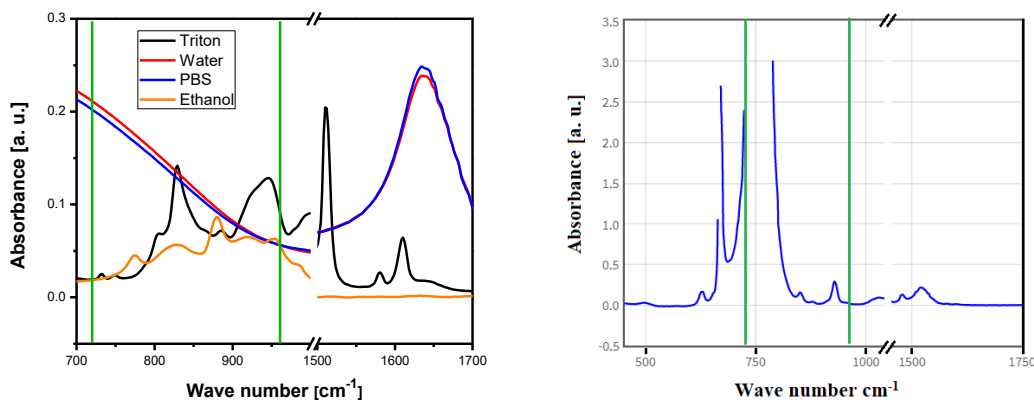


Fig. 5.3. Espectros en infrarrojo de los solventes en que se intentó disolver la all trans-retinal. Se presentan las regiones de 700 – 1000  $\text{cm}^{-1}$  donde aparecen los picos correspondientes a las configuraciones, 720  $\text{cm}^{-1}$  para cis y 960  $\text{cm}^{-1}$  para trans, ambos marcados con las líneas verticales verdes y 1500-1700  $\text{cm}^{-1}$ , donde se presentan las bandas de las aminas. Del lado izquierdo tenemos los espectros en infrarrojo correspondientes a tritón, agua, PBS y etanol, del lado derecho se tiene el espectro del cloroformo.

En estos últimos espectros debemos de prestar atención primeramente a las regiones de las aminas, ya que mediante estas podemos darnos cuenta si la solución tiene realmente cromóforos con lo que podamos experimentar. Como vemos, únicamente el agua y el PBS podrían introducir ruido para la amina primaria (NH en la región 1600 – 1700  $\text{cm}^{-1}$ ), pero no con la amina secundaria (NH<sub>2</sub> en la región 1500 – 1600  $\text{cm}^{-1}$ ). El etanol tiene una pequeña banda alrededor de 960  $\text{cm}^{-1}$ , lo cual puede ser complicado para medir los cambios de conformación, sin embargo, recordemos que fue descartado debido a su rápida evaporación, caso similar para el caso del cloroformo. Por último, tenemos al tritón, que, aunque tiene pequeños picos espectrales cercanos a las configuraciones del anticuerpo, no existe un traslape que opaque las señales de los cromóforos, así mismo tiene algunas bandas en la

región de las aminas, pero no representan gran problema ya que las aminas abarcan toda la región.

Determinado el solvente adecuado, se procedió a buscar la concentración óptima donde se pudieran apreciar mejor los cambios en las conformaciones de los cromóforos mediante los espectros en infrarrojo ( ver Fig. 5.4). Para ello se disolvieron las cantidades de 2, 1 y 0.6 mg de altr en 100  $\mu$ l de tritón y se tomaron espectros en el mediano infrarrojo. Se buscó la concentración más baja posible con el objetivo de maximizar el material para que los tiempos de desnaturalización de los cromóforos fueran pequeños, es decir, que la radiación por unidad de masa fuera la máxima. En la siguiente figura se muestran espectros de las distintas concentraciones usadas. Algunos de estos espectros se han multiplicado por una constante para poder observar de manera más fácil sus diferencias. Vemos que en la concentración de 0.6 mg, aún es posible observar el pico en  $968\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la configuración trans, característica del altr, además, se ven las bandas en la región de las aminas, por lo que se escogió como la concentración adecuada.

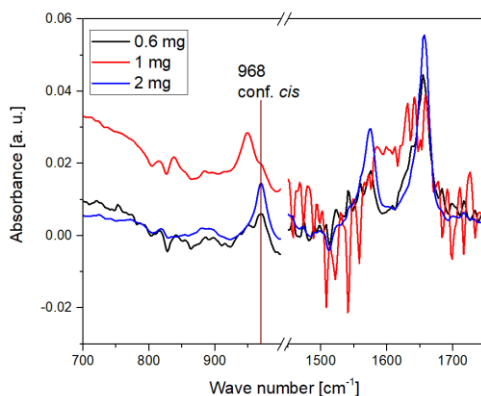


Fig. 5.4. Espectros de las distintas concentraciones de cromóforos usadas.

Mediante el análisis de los espectros se llegó a la conclusión de que la concentración de 0.6 mg en 100  $\mu$ l era la óptima, debido a que en los espectros aún era posible observar la presencia del cromóforo en las regiones de  $1500 - 1600\text{ cm}^{-1}$  (amina secundaria),  $1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$  (amina primaria) y los picos correspondientes a sus conformaciones, ubicado alrededor de  $960\text{ cm}^{-1}$  (configuración trans, principalmente para altr), si se hubiese usado 9cr o 13cr se esperaba encontrar un pico alrededor de los  $720\text{ cm}^{-1}$ . Una vez conocidos los

parámetros de potencia de los láseres, la concentración y el solvente óptimo, se procedió a la caracterización de los cromóforos mediante espectroscopia de infrarrojo.

### ***5.3. Determinación de los parámetros ópticos que afectan la conformación de los cromóforos***

Para las tomas de las cinéticas espectroscópicas, era necesario poder accionar de manera rápida los láseres, y así mismo, poder interrumpir de manera tajante la radiación. Debido a que el láser de He-Ne debía permanecer algún tiempo prendido para asegurar su estabilidad, se usó un capuchón de cartón que era o bien retirado o colocado a la salida del láser para comenzar o interrumpir la radiación. Para el diodo láser, que se mostraba estable más rápido a partir del encendido, se decidió que solo se apagaría y prendería la fuente, para así comenzar la radiación o interrumpirla. Las cinéticas para cada uno de los estándares de cromóforo y para cada laser fueron las que se muestra a continuación en la Tabla 5.I.

*Tabla 5.I. Parámetros experimentales para las cinéticas de conversión molecular de los cromóforos.*

<b>Número de mediciones por cinética</b>	<b>Duración entre cada medición [s]</b>	<b>Mediciones irradiadas</b>	<b>Tiempo de irradiación [s]</b>
<b>84</b>	<b>5</b>	3	15
		6	30
		12	60
		18	90
<b>60</b>	<b>10</b>	12	120
		18	180

Se confirmó la presencia de los cromóforos mediante las bandas espectrales correspondientes a las aminas. Conocida la presencia de los cromóforos, se tomaron los valores de los picos situados en 720 y 960  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a la configuración cis y trans, respectivamente, y se graficaron contra el tiempo, los resultados más relevantes de esto último se muestran en la sección de resultados. En estas gráficas se calculó las pendientes correspondientes al periodo radiación y post-radiación con la finalidad de observar si existían cambios.

#### 5.4. Autoensamblado del biosensor

Para el *corte* de los soportes se decidió hacer uso del cortador de fibra óptica debido a que, por su dureza, realiza cortes largos y rectos en las obleas al accionar presión sobre ellas. En la Fig. 5.5 se muestran algunos de los primeros soportes que fueron cortados con esta técnica.

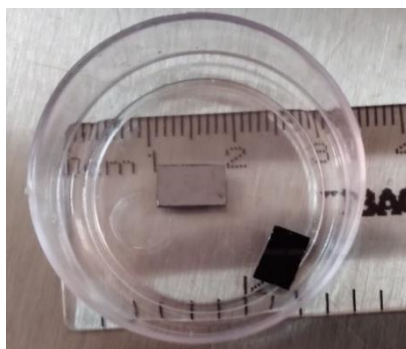


Fig. 5.5. Soportes cortados de una oblea de silicio cristalino.

Después de cortados los soportes se dio pie al proceso de *hidroxilación*, cuya finalidad es agregar grupos -OH a la superficie para que el silano se enlace de una mejor manera a la superficie. Para determinar el tiempo adecuado para el proceso de hidroxilación, se realizaron varios procesos, variando únicamente el tiempo en que los soportes permanecían sumergidos en la solución. En la Fig. 5.6 se muestra una fotografía de cómo se ven los soportes mientras están siendo hidroxilados con esta metodología.

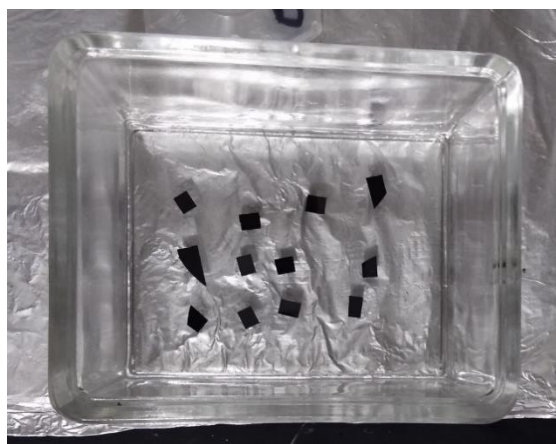


Fig. 5.6. Soportes en proceso de hidroxilación. En esta caja coplin se introdujeron de 12 hasta 16 soportes.

Aunque la fotografía da la impresión de que queda espacio disponible para más soportes, las turbulencias en la solución dentro de la caja después de introducir los soportes o verter los

solventes provocan que se puedan sobreponer, con lo que no quedaría completamente expuesta su superficie y el proceso se vería afectado.

Para la caracterización del proceso de hidroxilación se utilizó espectroscopia en infrarrojo por ATR. En esta caracterización se midió 60 veces un soporte limpio y 120 veces el soporte hidroxilado. Los espectros no presentaron diferencias significativas correspondientes a las bandas de  $1252\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{Si-O}_2$ ) entre ellos, por lo que se decidió que era apropiado hidroxilar durante solo una hora con el objetivo de ahorrar tiempo, en la Fig. 5.7 se muestran los espectros por FTIR de estos procesos.

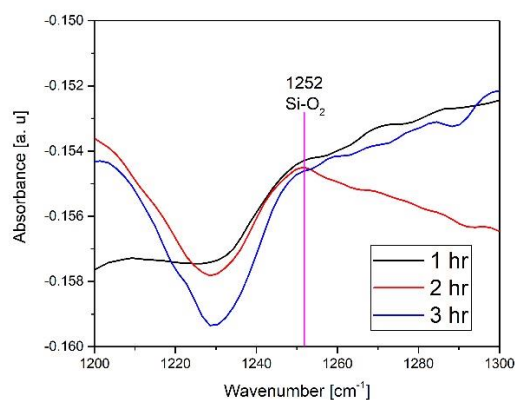


Fig. 5.7. Espectros de soportes hidroxilados durante tres distintos tiempos, se muestra solo la región de  $1200\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  ya que es aquí donde aparece la banda asociada al  $\text{Si-O}_2$  ( $1252\text{ cm}^{-1}$ ).

El tiempo que se utilizó para la etapa de *funcionalización* (2 horas), *inmovilización* del anticuerpo (1 hora) e *interacción con tejido* (30 min) fue tomado como sugerencia de González et. al. (2020)<sup>85</sup>, que a pesar de que utiliza fibra óptica, el proceso es sumamente similar al ser ambos dióxidos de silicio. En el trabajo de González et. al., se desarrolla un biosensor utilizando fibra óptica, donde se tiene la ventaja que la fibra óptica puede ser medida por transmisión al mismo tiempo que se llevan a cabo procesos en su superficie (in situ). En este último trabajo mencionado, se llega a la conclusión de que los tiempos en los que se dejan de observar cambios en la señal transmitida, y por lo tanto han finalizado los procesos, son 2 horas para la funcionalización, 1 hora para la inmovilización y 30 minutos para la interacción con tejido. Por ello se replicaron para el desarrollo del biosensor presentado en esta tesis.

En la Fig. 5.8 se muestra la caja coplin después de haber extraído los soportes funcionalizados por *fase química*, donde se percibe que parte del 3AMPTS disuelto en el tolueno se ha adherido a los soportes. En esta caja se introdujeron hasta 12 soportes y no más por el argumento de evitar superposiciones, igual al caso de la hidroxilación.

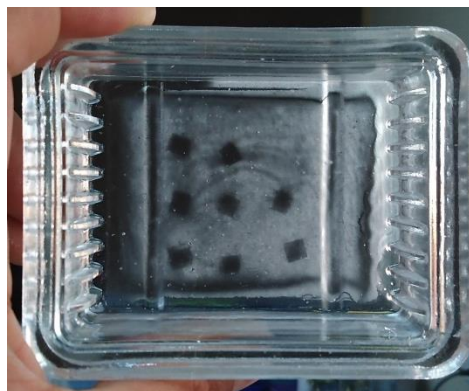


Fig. 5.8. Caja coplin donde se llevó a cabo la funcionalización por fase química.

Para la funcionalización por *fase gaseosa* se utilizó una botella para controlar el volumen de todo el proceso. En la Fig. 5.9 se muestra una botella con la cama de aluminio que se usó para la silanización por fase gaseosa.



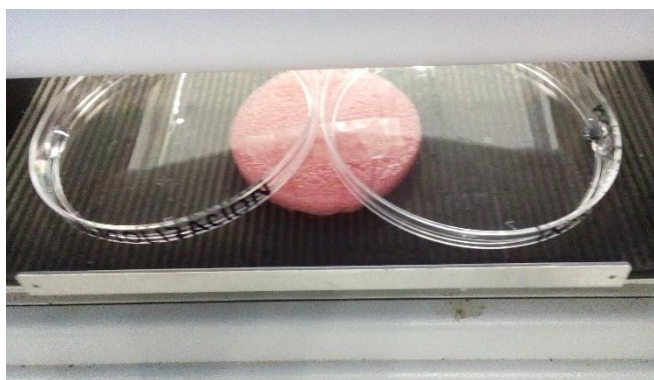
Fig. 5.9. Arreglo experimental usado para la funcionalización por fase gaseosa.

El motivo del tamaño de la cama es el tamaño de la boca de la botella, ya que debe de entrar perfectamente y sin presionarse para poder manipular los soportes al introducirlos, pero principalmente al extraerlos, ya que en ocasiones se adhieren a la misma cama. No se han colocado más camas para evitar que el 3AMPTS en forma gaseosa solo se quede depositado en la parte baja de la cama, es decir, para que pueda tener una buena circulación. En la Fig. 5.10 se muestra la cama de aluminio con soportes sobre ella dentro de la botella.



*Fig. 5.10. Soportes sobre la cama de aluminio dentro de una botella para el proceso de silanización por fase gaseosa.*

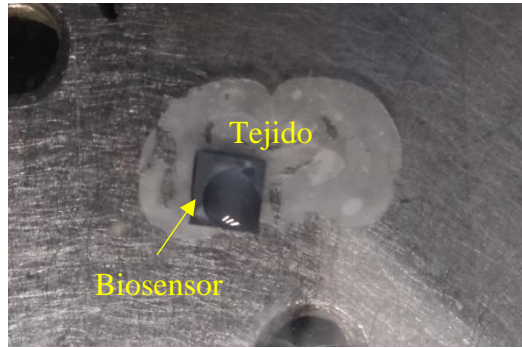
El proceso de inmovilización de anticuerpos se realizó utilizando cajas Petri sobre la plataforma de un agitador orbital, como se muestra en la Fig. 5.11.



*Fig. 5.11. Cajas Petri con soportes en el proceso de inmovilización del anticuerpo sobre la plataforma de un agitador orbital.*

Las cajas mostradas en la Fig. 5.11 se han colocado inclinadas para procurar que toda la superficie del soporte quede sumergida en la solución PBS/anticuerpo, cuyo volumen fue de 100  $\mu$ l.

Para la fase de interacción los soportes fueron colocados en contacto directo con el tejido, como se muestra en la Fig. 5.12, donde se está llevando a cabo una interacción con cerebro de modelo murino.



*Fig. 5.12. Biosensor en un soporte planar de silicio interactuando con tejido de cerebro de rata Wistar. El biosensor se encuentra en la superficie que está en contacto con el tejido.*

### **5.5. Preparación de los tejidos**

En la Fig. 5.13 se muestra un cerebro de modelo murino sumergido en sacarosa para su posterior manipulación y corte criogénico.



*Fig. 5.13. Cerebro de modelo murino sumergido en sacarosa al 30% para su protección.*

En la Fig. 5.14 se muestra el criostato marca Leica utilizada por el Centro de Investigación y Reproducción Animal, para realizar los cortes de grosor controlado.



*Fig. 5.14. Criostato utilizado para la obtención de cortes criogénicos.*

En la figura anterior el criostato está a  $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y los cortes tienen  $100\text{ }\mu\text{m}$  de grosor. Esto se utiliza solamente para avanzar rápido y llegar pronto a la región del hipotálamo, cuyos cortes fueron más delgados.

Para caracterizar el proceso general de desarrollo del biosensor antes de tener acceso al anticuerpo (AB) OPN5 se realizaron biosensores, utilizando la misma metodología de autoensamblado, pero utilizando como elemento de reconocimiento biológico (ERB) el anticuerpo antikisspeptina, este AB es afín a la proteína kisspeptina, que está relacionada con el cáncer de ovario y/o ovario poliquístico<sup>86</sup>. Los tejidos usados para esta fase de caracterización estaban inmersos en paraformaldehído para su conservación, y fueron cortados con navaja en rebanadas de  $1\text{ mm}$  de grosor aproximadamente. Con este método las rebanadas son muy gruesas, además que los cortes pueden ser poco íntegros. En la Fig. 5.15 se muestra un corte de cerebro de estos tejidos usando la técnica que se acaba de describir. En esta es posible poder observar la diferencia entre la calidad de los cortes logrados con el criostato en la Fig. 5.12, en comparación con los cortes realizados de manera manual con navaja en la Fig. 5.15. Eso sin mencionar que el área de la región hipotalámica está bien definida si se utiliza un atlas de histología del cerebro de rata.



*Fig. 5.15. Corte de cerebro de modelo murino realizado con navaja, el corte se muestra dentro del círculo rojo. Este tejido se encontraba en paraformaldehído para su conservación. Para efectos visuales se ha incrementado la saturación de la imagen.*

## CAPITULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentan a continuación los principales resultados encontrados para el desarrollo de esta tesis, se omiten algunos con la finalidad de que la atención sea prestada sobre los resultados más relevantes obtenidos, ya que son lo que brindan mayor cantidad de información.

### 6.1. Caracterización de tres estándares de cromóforos retinales

Después de encontrar la concentración óptima se procedió a realizar las cinéticas para la caracterización de los cromóforos y su conformación como función de los parámetros ópticos usados para su irradiación.

En la Fig. 6.1 se muestra una cinética característica del sistema, para esta cinética se utilizó una concentración de 1 mg de altr en 100  $\mu$ l de tritón. Esta cinética consiste en 10 mediciones de 60 segundos cada una, la muestra fue irradiada durante 4 minutos con una longitud de onda de 633 nm, la cual fue encendida en el minuto 1 y apagada en el minuto 5. La línea base que se utilizó para la toma del espectro fue el solvente tritón X-100 medida 60 veces.

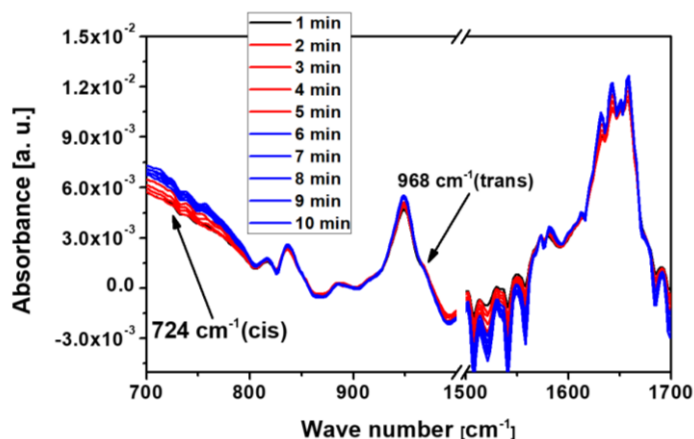


Fig. 6.1. Cinética característica del sistema. Las bandas espectrales correspondientes a las aminas II y I en los intervalos  $1500\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$  y  $1600\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, indican la presencia de cromóforo en la muestra. Así podemos asegurar que el pico a  $724 \text{ cm}^{-1}$  está relacionado con la configuración cis y el pico a  $968 \text{ cm}^{-1}$  con la configuración trans del cromóforo.

En la Fig. 6.2 se presentan los cambios de intensidad de los picos a  $724$  y  $960 \text{ cm}^{-1}$  como función del tiempo. El tiempo de acción del cromóforo fue del orden de cientos de segundos, lo cual puede deberse a que la potencia usada ( $15.23 \text{ mW}$ ) no es suficiente para obtener

cambios completos en la estructura molecular de la muestra, mucho menos un cambio o desnaturalización irreversible, aunque también se debe de tomar en consideración la concentración de la solución.

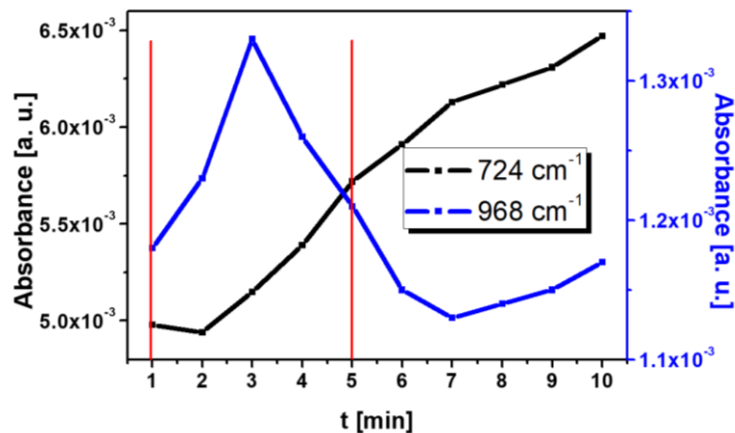


Fig. 6.2. Intensidad de los picos a 724 y 968  $\text{cm}^{-1}$  para la cinética de la figura anterior. La irradiación comenzó en el tiempo  $t=1$  min y terminó a  $t=5$  min, el resto de la cinética fue para la recuperación de la estructura molecular.

En la figura anterior podemos observar, principalmente para la banda a 968  $\text{cm}^{-1}$  (curva azul), el incremento en absorbancia hasta alcanzar su máximo en el minuto 3, posterior a esto en el minuto 7 se observa (dos minutos después de apagar la radiación), como el cromóforo intenta regresar a su estructura original.

Para la presentación de los resultados de la caracterización de los cromóforos se muestran principalmente las cinéticas de 84 mediciones con 5 seg de intervalo por cada medición, con 12 mediciones de irradiación, es decir, para las cinéticas en las que se irradia la muestra por 1 minuto, esto para ambos láseres.

Las muestras usadas tenían una concentración de 0.6 mg en 100  $\mu\text{l}$  de tritón, la línea base fue tritón medida 60 veces. El pico asociado a la configuración *cis* está centrado en 720  $\text{cm}^{-1}$  y a 960  $\text{cm}^{-1}$  para la configuración *trans*. Si pudiésemos observar la estructura completa de los cromóforos veríamos que la 9 y 13 *cis* retinal pasan a conformar un cromóforo all-*trans* retinal. Mientras que cuando se tiene originalmente un all-*trans* retinal, pasa a conformar un 11-*cis* retinal.

### 6.1.1. 9-cis retinal

Para el cromóforo 9-cis retinal (9cr) se espera un decremento del pico *cis* ( $720\text{ cm}^{-1}$ ), conforme se incrementa el tiempo de irradiación, ya que el cromóforo cambia su conformación de *cis* a *trans*. Por otro lado, la intensidad del pico *trans* ( $960\text{ cm}^{-1}$ ) deberá incrementarse conforme aumenta el tiempo de irradiación.

En las gráficas de la Fig. 6.3 se muestra el comportamiento en intensidad de los picos a  $720$  y  $960\text{ cm}^{-1}$  del cromóforo 9cr siendo irradiado por distintos tiempos con ambos láseres, uno a la vez, las líneas en naranja muestran el tiempo máximo de irradiación. Al láser de He-Ne con longitud de onda de  $633\text{ nm}$  y  $15.23\text{ mW}$  de potencia nos referiremos solo como  $633\text{ nm}$  y al diodo láser con longitud de onda de  $532\text{ nm}$  y  $24.6\text{ mW}$  de potencia como  $532\text{ nm}$ .

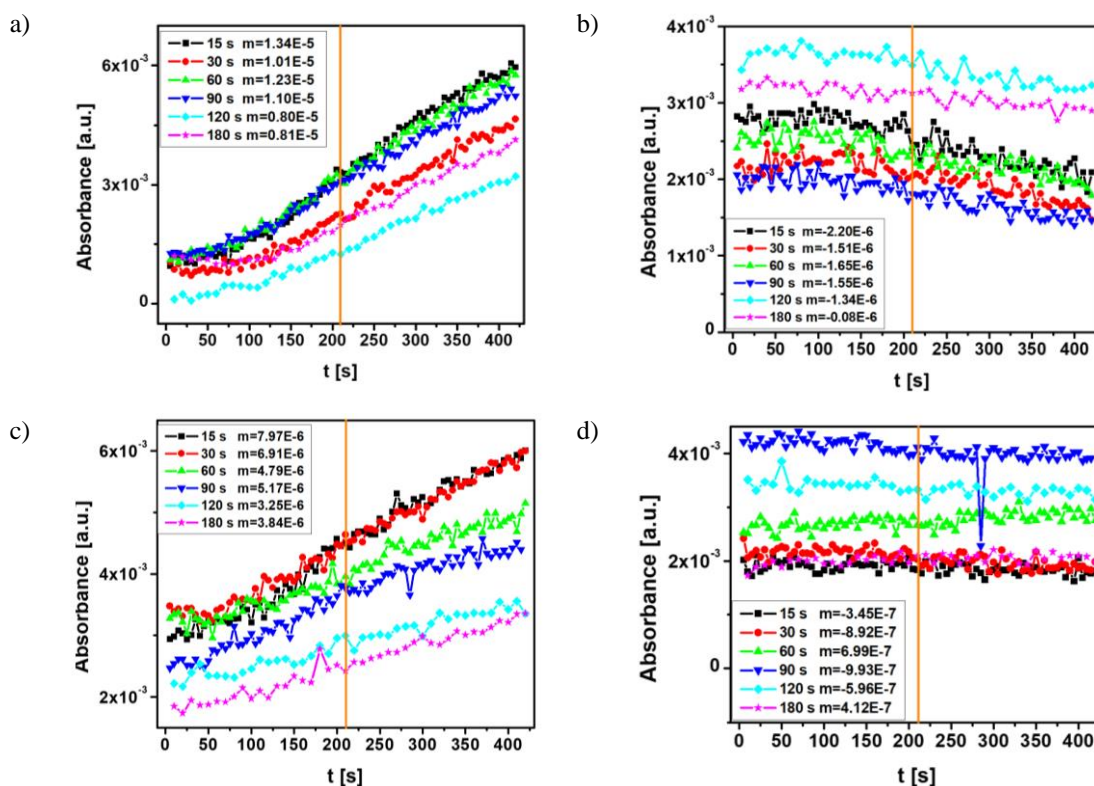


Fig. 6.3. Comportamiento de la intensidad de los picos correspondientes a las dos conformaciones del cromóforo 9cr siendo irradiado por distintos tiempos con dos láseres distintos. Las pendientes mostradas corresponden a toda la cinética. a)  $720\text{ cm}^{-1}$  con  $633\text{ nm}$ . b)  $960\text{ cm}^{-1}$  con  $633\text{ nm}$ . c)  $720\text{ cm}^{-1}$  con  $532\text{ nm}$ . d)  $960\text{ cm}^{-1}$  con  $532\text{ nm}$ .

En la Fig. 6.3a) es apreciable que la pendiente tiene una tendencia decreciente conforme se incrementa el tiempo de irradiación, como es esperado dado que se está reduciendo la

configuración *cis*, lo mismo es medianamente apreciable con la Fig. 6.3c). Aunque no se tiene la misma claridad para las Fig. 6.3b) y d), las cuales mantienen una pendiente casi constante, basta con las dos primeras, ya que el cromóforo, de manera individual no tiene superposición de configuraciones.

En la Fig. 6.4 se muestran la comparativa entre el comportamiento espectral del 9cr siendo irradiado durante 1 minuto con los dos láseres, siempre de manera independiente.

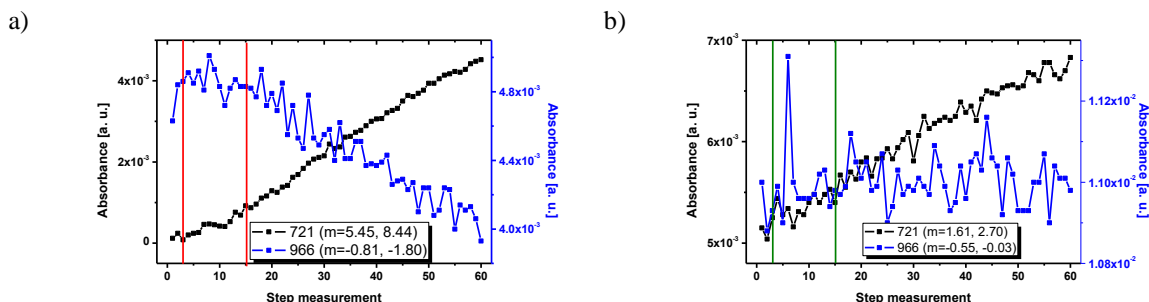


Fig. 6.4. Comportamiento espectral de la intensidad de los picos correspondientes a la conformación del cromóforo 9cr siendo irradiado por un minuto con los láseres siguientes: a) 633 nm, b) 532 nm.

En la figura anterior se muestran dos pendientes por curva, la primera corresponde a la región de irradiación, encerrada entre las dos barras verticales, y la segunda al tiempo de recuperación, es decir, desde la segunda barra hasta el final de la curva. Se espera, para este cromóforo que la primera pendiente de las curvas negras sea menor a la segunda pendiente, como vemos que sucede, y lo opuesto se espera para las curvas azules, como vemos que también pasa, a excepción para las pendientes de 966 cm⁻¹ de la Fig. 6.4b. Por lo tanto, el comportamiento espectral nos permite decir que se está presentando una desnaturalización proteica del tipo reversible.

### 6.1.2. 13-*cis* retinal

Para el cromóforo 13-*cis* retinal (13cr), al igual que para el 9cr, se espera un decremento del pico *cis*, conforme se incrementa el tiempo de radiación, ya que el cromóforo cambia su conformación de *cis* a *trans* y que la intensidad del pico *trans* incrementa su intensidad conforme aumenta el tiempo de irradiación.

En las gráficas de la Fig. 6.5 se muestra el comportamiento en intensidad de los picos a 720 y 960 cm⁻¹ del cromóforo 13cr siendo radiado por distintos tiempos con ambos láseres, uno a la vez, las líneas en naranja muestran el tiempo máximo de irradiación.

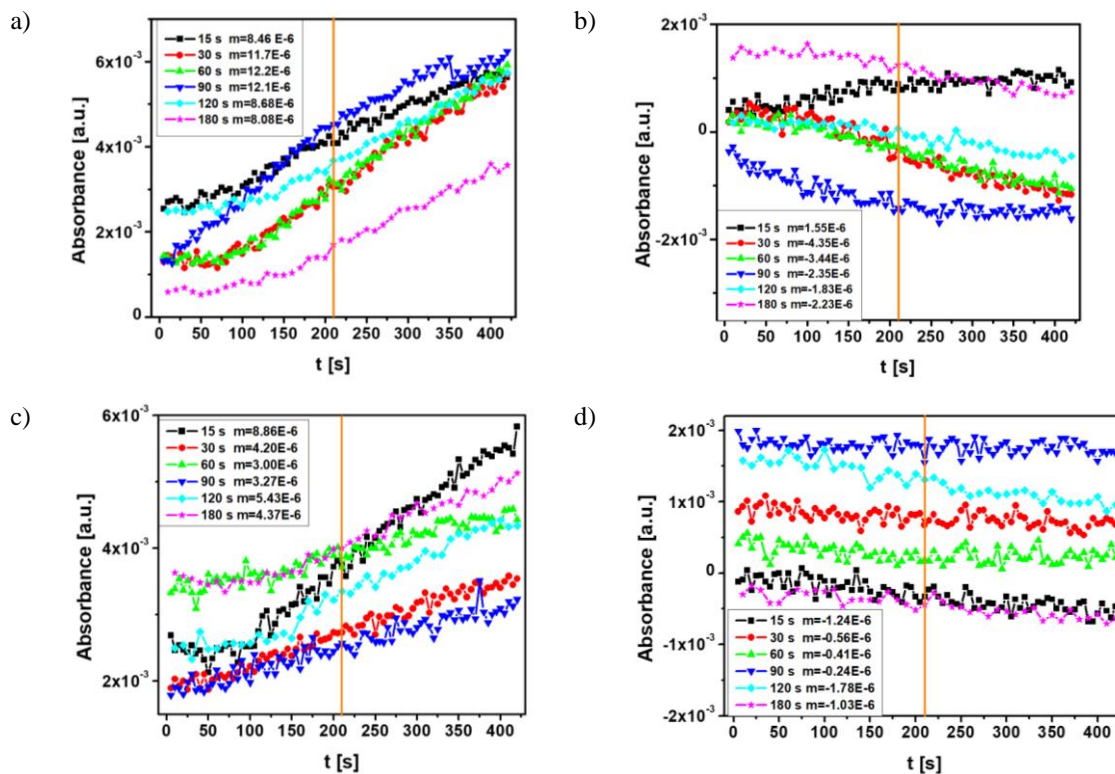


Fig. 6.5. Comportamiento de la intensidad de los picos correspondientes a la conformación del cromóforo 13cr siendo irradiado por distintos tiempos con dos láseres distintos. Las pendientes mostradas corresponden a toda la cinética. a) 720  $cm^{-1}$  con 633 nm. b) 960  $cm^{-1}$  con 633 nm. c) 720  $cm^{-1}$  con 532 nm. d) 960  $cm^{-1}$  con 532 nm.

En la figura anterior no es apreciable un comportamiento claro para la pendiente conforme aumenta el tiempo de radiación, como si pasa con la 9cr. Esto puede deberse a que el cromóforo 13cr fue el más difícil de disolver, y es posible que no lo haya hecho del todo bien, por lo que las muestras no fueron del todo uniformes, a continuación, se presenta la selección de las cinéticas correspondientes a un minuto de irradiación, donde son más apreciables los cambios.

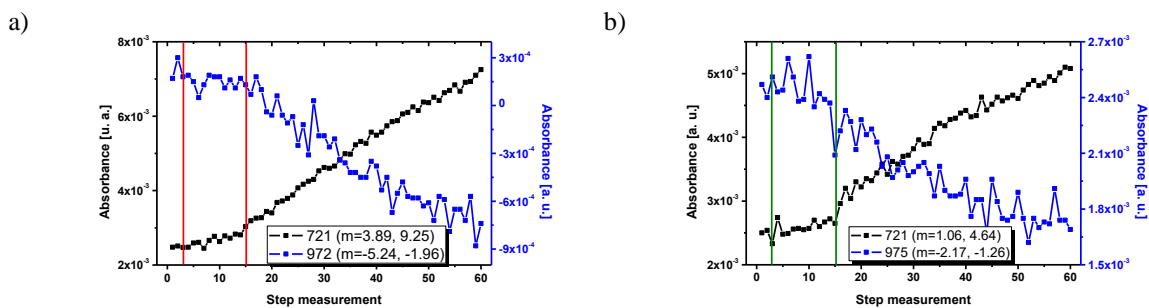


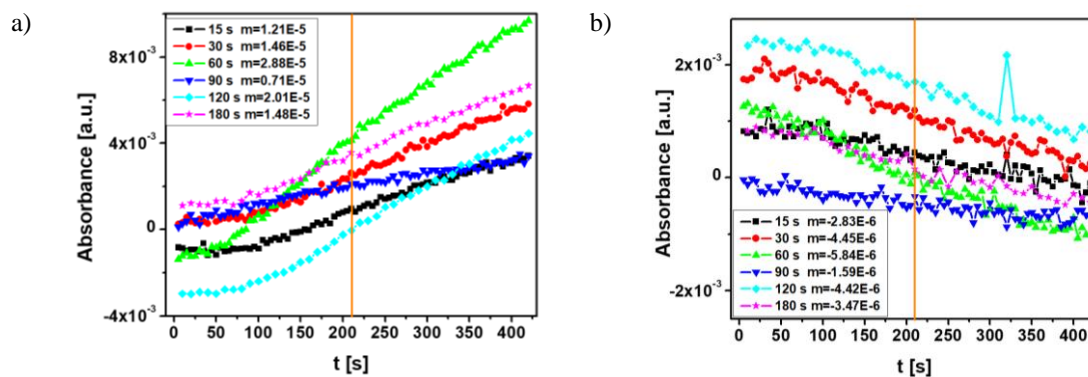
Fig. 6.6. Comportamiento espectral de la intensidad de los picos correspondientes a la conformación del cromóforo 13cr siendo irradiado por un minuto con los láseres siguientes: a) 633 nm, b) 532 nm.

En esta última gráfica se espera, al igual que para el caso del 9cr, que la primera pendiente para las curvas negras sea menor que la segunda, y lo contrario para las curvas azules. Y aunque no se cumple lo esperado para las curvas azules, las negras si lo hacen. Esto puede deberse a fluctuaciones del ambiente, como humedad que pudiese haber en el camino óptico de la radiación de IR del equipo Vertex 70, o bien, que las intensidades de los láseres no son suficiente para cambiar la conformación del cromóforo. Por lo que podemos considerar que para este caso también se tiene una desnaturalización reversible

### 6.1.3. All-trans retinal

Para el cromóforo all-trans retinal (altr), contrario que el 9cr y 13cr, se espera un incremento del pico *cis*, conforme se incrementa el tiempo de radiación, ya que el cromóforo cambia su conformación de *trans* a *cis*, y que la intensidad del pico *trans* aumente su intensidad conforme aumenta el tiempo de irradiación. Esta diferencia se debe a que la conformación original es la contraria a los dos casos anteriores.

En las gráficas de la Fig. 6.7 se muestra el comportamiento en intensidad de los picos a 720 y 960  $\text{cm}^{-1}$  del cromóforo altr siendo radiado por distintos tiempos con ambos láseres, uno a la vez, las líneas en naranja muestran el tiempo máximo de irradiación.



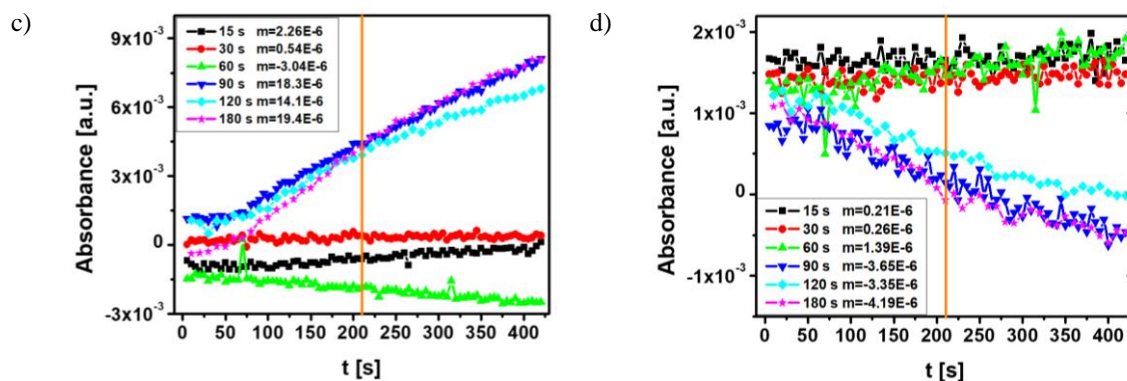


Fig. 6.7. Comportamiento de la intensidad de los picos correspondientes a las dos conformaciones del cromóforo altr siendo irradiado por distintos tiempos con dos láseres distintos. Las pendientes mostradas corresponden a toda la cinética. a)  $720\text{ cm}^{-1}$  con  $633\text{ nm}$ . b)  $960\text{ cm}^{-1}$  con  $633\text{ nm}$ . c)  $720\text{ cm}^{-1}$  con  $532\text{ nm}$ . d)  $960\text{ cm}^{-1}$  con  $532\text{ nm}$ .

En la figura anterior es claramente visible un cambio abrupto entre las curvas correspondientes a 60 y 90 segundos para la irradiación con el láser de 532 nm, por lo que podríamos asegurar que entre estos dos puntos hay un tiempo específico donde el cambio de configuración es uniforme y posiblemente, hasta irreversible. Es apreciable como con el láser de 633 nm aparentemente, no existe una relación entre el tiempo de irradiación y la pendiente de las curvas.

En la Fig. 6.8 se muestran el comportamiento espectral del altr siendo irradiado durante 1 minuto con ambos láseres.

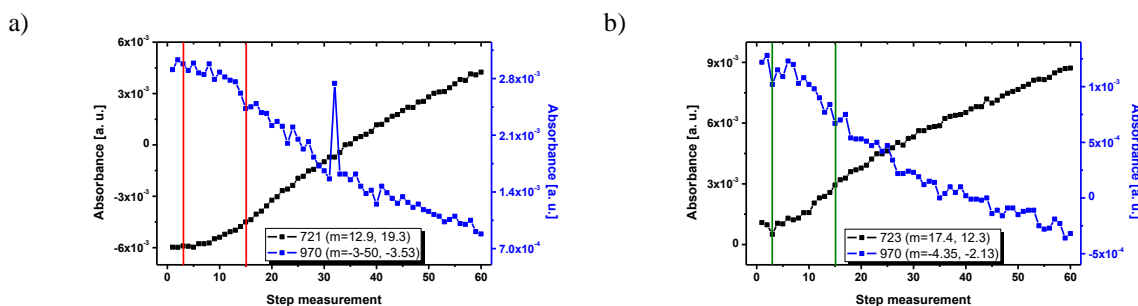


Fig. 6.8. Comportamiento espectral de la intensidad de los picos correspondientes a la conformación del cromóforo altr siendo irradiado por un minuto con los láseres siguientes: a)  $633\text{ nm}$ , b)  $532\text{ nm}$ .

Correspondiente a la configuración original, se espera que la primera pendiente de las curvas negras sea mayor que la segunda, y lo contrario para las azules, ya que este cromóforo está pasando de una configuración *trans* a una *cis*. Esto último solo pasa para el caso del láser a 532 nm, mientras que con el láser de 633 nm no, Una razón puede ser que, con el láser de

633 nm, a pesar de tener menor potencia, haya desnaturalizado de manera irreversible el cromóforo, lo que indica que el altr es más susceptible a la radiación a 633 nm que a la de 532, independientemente de la potencia.

En la siguiente tabla se muestra un resumen del comportamiento de las pendientes de los cambios de intensidades de las bandas espectrales correspondientes a los isomerismos presentes en las muestras.

*Tabla 6.I. Pendientes de las bandas espectrales a 720 y 960 cm<sup>-1</sup> de las cinéticas con un minuto de irradiación. Se muestra la pendiente durante el tiempo de irradiación ( $m_{rad}$ ) y el tiempo de recuperación ( $m_{rec}$ ).*

cromóforo	720 cm <sup>-1</sup>				960 cm <sup>-1</sup>			
	$m_{rad}$	$m_{rec}$	$m_{rad}$	$m_{rec}$	$m_{rad}$	$m_{rec}$	$m_{rad}$	$m_{rec}$
	633 nm [E-5/s]		532 nm [E-5/s]		633 nm [E-5/s]		532 nm [E-5/s]	
<b>9cr</b>	5.45	8.44	1.61	2.70	-0.81	-1.8	-0.55	-0.03
<b>13cr</b>	3.89	9.25	1.06	4.64	-0.052	-1.96	-2.17	-1.26
<b>altr</b>	12.96	19.39	17.45	12.36	-3.5	-3.53	-4.35	-2.13

## **6.2. Autoensamblado de un biosensor sobre un soporte de silicio cristalino**

El autoensamblado e interacción del biosensor consiste en las siguientes etapas:

- limpieza del soporte (Si).
- hidroxilación (OH).
- funcionalización por fase química (func chemp) o gaseosa (func gasp).
- inmovilización del anticuerpo (Imm chemp o biosensor químico e Imm gasp o biosensor gaseoso, respectivamente).
- interacción con el tejido: cerebro de hembra (female brain), cerebro de macho (male brain), ovario (ovary) y testículo (testi).

En la Fig. 6.9 se muestra el espectro de cada una de las etapas del autoensamblado del biosensor. De acuerdo con la estructura molecular de los grupos funcionales agregados a la superficie del soporte, los cambios más importantes se observan en las regiones asociadas a

los enlaces C-O ( $950\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ), Amina I ( $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ), Amina II ( $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ) y los grupos Si-O-Si (bandas debajo de los  $1112\text{ cm}^{-1}$ ). Este es el motivo por el cual solo se muestran estas regiones en los espectros de las gráficas de las figuras posteriores. Recordemos que en la caracterización espectral en modo macro se ha tomado como línea base la etapa anterior con la finalidad de que el espectro solo brinde información sobre los nuevos enlaces que se han agregado a la superficie del soporte.

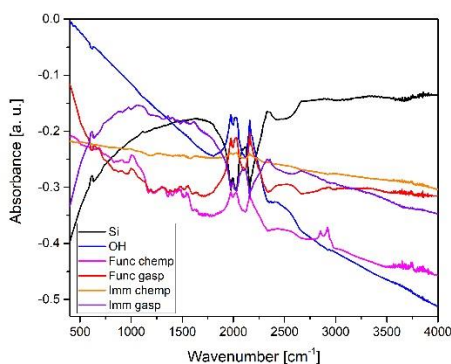
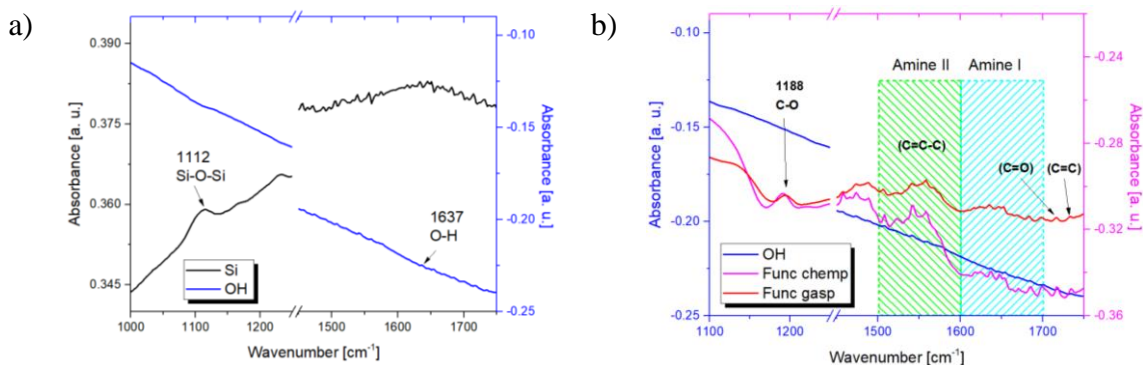


Fig. 6.9. Espectros en infrarrojo de cada etapa de autoensamblado del biosensor.

En la siguiente figura se muestran en detalle los espectros de cada etapa de autoensamblado del biosensor. Se presenta la etapa en cuestión y la anterior con la finalidad de poder lograr un comparativo.



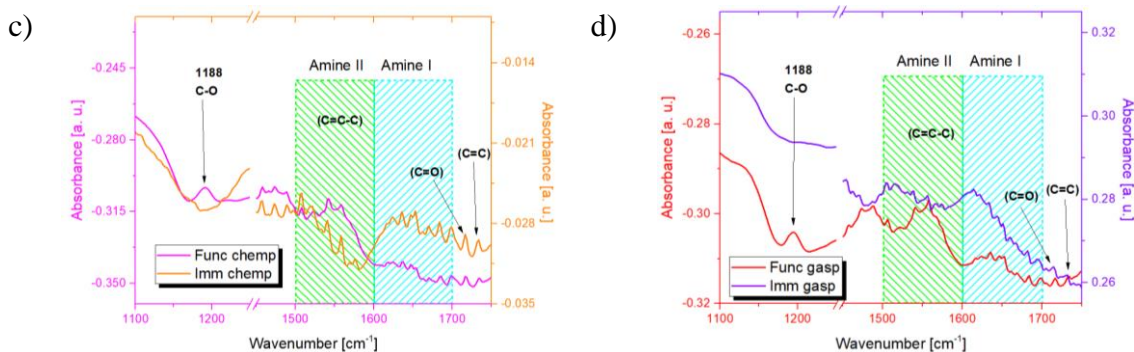


Fig. 6.10. Espectros de las etapas de autoensamblado del biosensor. Como se muestra, los principales cambios se presentan en la etapa de funcionalización por cualquiera de los métodos, pero también es apreciable para el proceso de inmovilización.

Los enlaces mostrados en la Fig. 6.10 se explican en detalle en la Tabla 6.II, donde se asocian los números de onda de las bandas vibracionales a la estructura proteica. Esta tabla también resultara útil para discutir la Fig. 6.11.

Tabla. 6.II. Enlaces y su correspondiente número de onda espectral presente en el análisis.

<i>Enlace</i>	<i>Número de onda [cm<sup>-1</sup>]</i>	<i>Estructura proteica que contribuye</i>
Si-Si	Debajo de 1100	
Si-O	Debajo de 1100	
C=C-C	1500-1600	Amina II
Torsión NH-R	1506-1557	
O-H	1637	
NH	1600-1700	Amina I
Torsión NH <sub>2</sub>	1617-1642	β-lámina
Torsión NH <sub>2</sub>	1645-1662	α-hélice
Torsión NH <sub>2</sub>	1672-1619	Doblamiento β
C=C	1715	
C=O	1740	

Como podemos ver en la Fig. 6.10 es posible observar cómo los enlaces OH afectan la absorción en infrarrojo de la muestra, a pesar de que el pico en 1637 cm<sup>-1</sup> es muy pequeño, el cambio en el signo de la pendiente es notable, lo cual se mantienen en las siguientes figuras, bandas similares fueron observadas por Tian (2010)<sup>87</sup>. En la Fig. 6.10b) podemos observar que la funcionalización por fase química brinda un espectro similar al de la funcionalización por fase gaseosa, el pico asociado al enlace CO tiene la misma intensidad en ambos procesos

de funcionalización, pero las bandas de los enlaces NH asociadas a la amina I y II tienen una mayor intensidad en la funcionalización gaseosa, esto se debe a que existen más moléculas de 3AMPTS presentes en la superficie del biosensor, a pesar de que el 3AMPTS posee grupos amino, estas bandas fueron asociadas a la estructura proteica secundaria por Sarver (1991)<sup>88</sup>. Así mismo, es posible decir que el proceso por fase gaseosa permite inmovilizar una gran cantidad del AB Opn5 que el proceso por fase química. Como es posible observar en la Fig. 6.10d), los espectros tienen una intensidad mayor y bandas bien definidas en las regiones de la amina I y II, comparado con la Fig. 6.10c).

La Fig. 6.11 muestra el espectro durante la interacción del biosensor óptico obtenidos por los dos métodos de funcionalización. La interacción fue realizada con tejido de testículo, ovario e hipotálamo de rata macho y hembra. Para cada una de las figuras el eje izquierdo corresponde a la fase de inmovilización y el derecho a la detección de la op5 en el tejido. También, para cada uno de los incisos, la figura superior (naranja) corresponde a la fase química y la inferior (violeta) a la fase gaseosa. Byler (1986)<sup>89</sup>, asoció la estructura proteica a las bandas mostradas en la Tabla 6.II. Es posible observar bandas similares de la Tabla 6.II en los espectros de la Fig. 6.11, especialmente los picos de 1645 a 1662  $\text{cm}^{-1}$ , asociados a la estructura  $\alpha$  hélices, que es la estructura principal de la op5<sup>89</sup>. Igualmente, en las figuras es posible observar la estructura conformacional de las proteínas (láminas  $\beta$  y doblamientos  $\beta$ ) y los enlaces dobles asociados a las proteínas (C=C y C=O)<sup>88-91</sup>. Para el análisis es necesario tomar en cuenta que, para el espectro de la fase de inmovilización, se usó como línea base el soporte funcionalizado, mientras que, para la interacción, la línea base fue el soporte con el AB Opn5 inmovilizado. Dado que el enlace del AB Opn5 es covalente al 3AMPTS, las señales correspondientes al anticuerpo no deben disminuir su intensidad, ya que este enlace es de los más fuertes en la naturaleza.

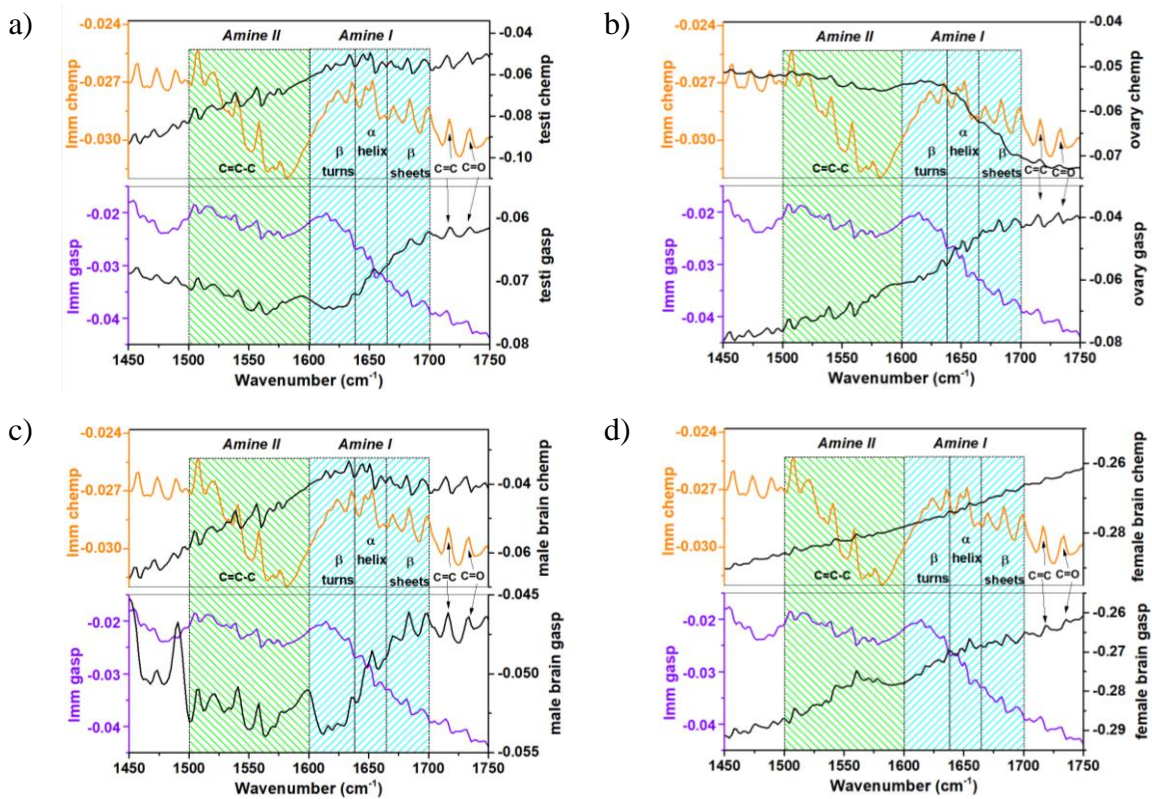


Fig. 6.11. Espectros en IR de la interacción del biosensor con tejido. Aquí se muestra la interacción con cuatro tejidos: a) testículo, b) ovario, c) cerebro de macho y d) cerebro de hembra.

Si comparamos las intensidades de todos los pares de gráficas de la Fig. 6.11, vemos que se observan cambios en las bandas indicadas, significando que existe una nueva molécula covalentemente unida en la superficie del biosensor, a saber, op5. También es posible observar que el biosensor químico brinda una mejor respuesta para el tejido de macho, mientras que el biosensor gaseoso lo hace para tejido de hembra. Estos resultados no tienen una relación real género-proceso, es decir, fue fortuito, ya que depende principalmente de la cantidad de op5 presente en el tejido y no del género. Además, es apreciable que el orden de respuesta es similar, aunque los picos espectrales para la interacción con tejido de macho tienen una mejor definición y que las señales para la interacción con cerebro de hembra tienen un orden de magnitud mayor en su absorbancia. La más baja intensidad de absorbancia se presentó para el tejido de ovario, para los dos biosensores utilizados. Las bandas de la amina I y II muestran vibraciones asociadas a los enlaces principales de las proteínas, C=C-C, láminas  $\beta$ ,  $\alpha$  hélices, doblamientos  $\beta$ , C=C y C=O, que se relacionan con el cambio en la longitud del enlace. Estos modos de vibración están presentes en los cuatro espectros en cada

figura, todas estas bandas están asociadas a los modos de vibración de la op5. Estos resultados son acordes a los obtenidos por Byler<sup>89</sup>, donde se realizó la deconvolución del espectro en IR para obtener los picos asociados a la estructura proteica, también estas bandas están reportadas por otros autores en trabajos para la determinación de la estructura secundaria de las proteínas<sup>88,90,91</sup>.

### ***6.3. Análisis de Componentes Principales de los espectros en modo micro IR***

Dado que los espectros obtenidos por modo micro son 32 por fase o interacción, se decidió generar un análisis quimiométrico de los resultados experimentales, para lo cual se utilizó el método numérico denominado Análisis de Componentes Principales (PCA), este método numérico nos permitirá visualizar un conjunto grande de datos de manera más sencilla. Los Componentes Principales (PC) corresponden a eigenvectores de nuestro conjunto de datos tratado como matriz de vectores, cada uno de los eigenvectores asociados con eigenvalores. Estos eigenvalores indican como una transformación lineal transforma vectores de un espacio a otro, y serán precisamente estos eigenvalores los que nos dirán cuáles son nuestros PC.

Cada una de las PC representa una variable nueva, que no se podía obtener de maneja directa de los datos originales. Este tratamiento permite que algunos datos de nuestro conjunto, que aparentemente se encontraban juntos y no se podían discriminar entre ellos, se separen de acuerdo con las nuevas variables. Los nuevos vectores que encontraremos, y que graficaremos para el PCA, son las proyecciones sobre los eigenvectores que hemos encontrado.

El PCA, aunado a la técnica de espectroscopia en micro infrarrojo y al microscopio óptico del que está acompañado el equipo, permite tener una idea de la uniformidad que tiene el autoensamblado, o bien, la reproducibilidad que se alcanza con los protocolos implementados. Dentro de las pruebas que se realizaron se encuentran las interacciones con tejido de soportes que solo fueron funcionalizados, a estas pruebas se les agrega la etiqueta de control (ctrl). Estas últimas pruebas, al no contar con un ERB, no son capaces de detectar op5, por lo que los puntos en los PCA no deberían agruparse a las interacciones donde si se tiene un ERB. Estas últimas pruebas nos sirven para conocer qué tan reales están siendo nuestras detecciones de op5. En la Fig. 6.12 se muestra el PCA de todo el proceso para las dos metodologías de funcionalización. Para este análisis se ha considerado la región

correspondiente a las aminas I y II, es decir,  $1500-1700\text{ cm}^{-1}$ . Los datos para silicio limpio e hidroxilación son los mismos para ambas metodologías de funcionalización, ya que estos son independientes del proceso. En este gráfico de todos los procesos, se puede observar como las interacciones biosensor-tejido se aglomeran en valores negativos del PC2, y el resto de los puntos que tienen que ver con las diferentes etapas del proceso de auto ensamblado o los controles en la parte positiva del PC2. Esto se puede observar para ambos procesos de funcionalización tanto en fase líquida como en fase gaseosa.

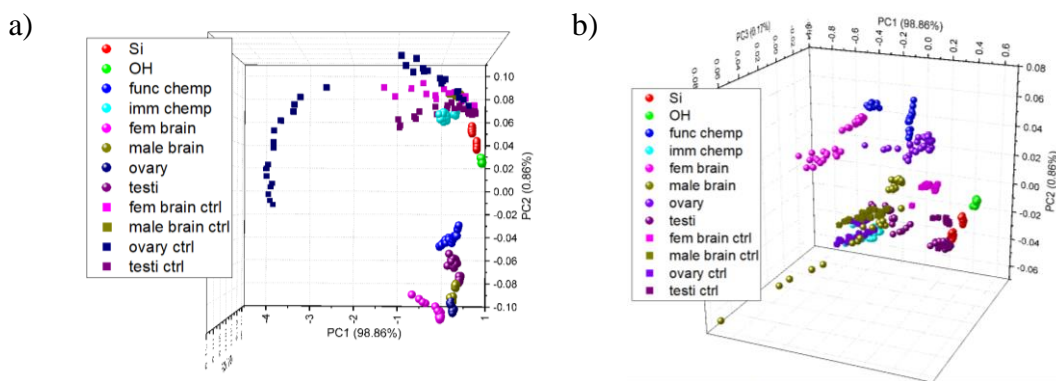


Fig. 6.12. PCA del proceso completo de autoensamblado del biosensor, interacciones y control para los biosensores funcionalizados por fase a) química y b) gaseosa.

A continuación, se muestran los PCA por etapas para tener una mejor comparativa entre el autoensamblado, interacciones y controles.

En la Fig. 6.13 se muestran el PCA obtenido para el autoensamblado del biosensor, es decir, desde la limpieza del soporte hasta la inmovilización del AB Opn5 sobre la superficie del soporte. Se muestra el PCA para los dos primeros componentes principales (PC), ya que con ello se logra determinar más del 99.65% de la varianza, lo cual es la mayor parte del sistema.

Como vemos en la Fig. 6.13, a pesar de que el proceso de funcionalización es distinto, los datos de ambas funcionalizaciones tienden a agruparse en la parte negativa tanto del PC1 como del PC2 (tercer cuadrante), mientras que los datos de la inmovilización del anticuerpo tienden a agruparse en la parte negativa del PC1, pero positiva del PC2 (segundo cuadrante). En otras palabras, en el eje negativo del PC1, se están agrupando señales correspondientes a los enlaces biológicos. Los datos del silicio limpio tienden a agruparse en la parte positiva del PC1 y PC2, mientras que los datos de los soportes hidroxilados se mantienen cerca del cero del PC2, pero positivos del PC1. Con esto podemos decir que el componente principal

1 determina la presencia o no, de los enlaces NH en la superficie de los biosensores desarrollados. De igual manera la elipse de error, al 95% de confianza, muestran la total aglomeración de los datos en función de la etapa del proceso.

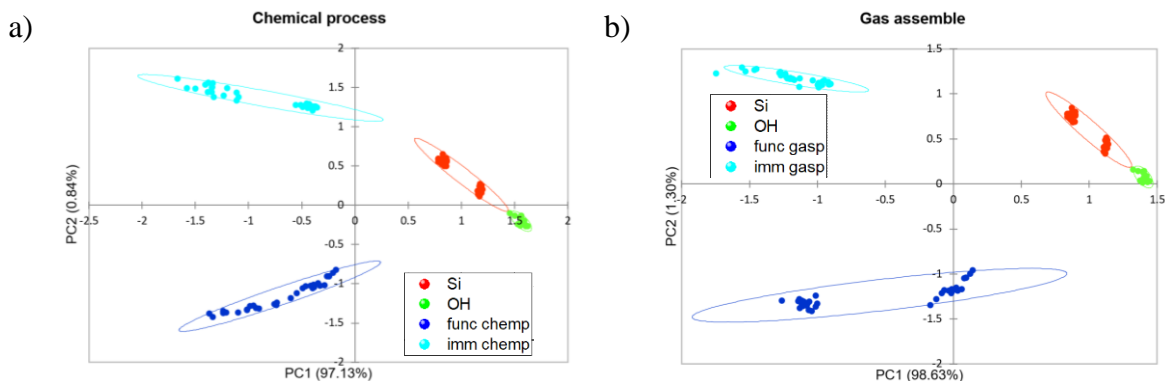


Fig. 6.13. PCA del autoensamblado de los biosensores funcionalizados por: a) fase química y b) por fase gaseosa. Se muestran también las elipses de confianza con un intervalo de confianza del 95% de cada una de las etapas de autoensamblado.

En la Fig. 6.14 se muestran los PCA correspondientes al biosensor armado por ambas metodologías de funcionalización y su interacción con tejidos, es decir, la respuesta de los biosensores. Se ha hecho el PCA con los tres primeros PC's, y se ha buscado la mejor perspectiva donde se logre visualizar una mejor agrupación de los datos.

En la Fig 6.14 son visibles las diferencias entre la etapa de inmovilización e interacciones, además, es posible notar diferencias entre las respuestas del biosensor dependiendo del tejido. De igual manera, podemos ver que tienen un orden aparente, por lo que la mayor diferencia entre los puntos correspondientes a los biosensores y los de las respuestas se encuentra con la del cerebro de hembra, después con el ovario, cerebro de macho y finalmente con el testículo. Entre las interacciones con ambos biosensores, la que parece tener mejor respuesta es el ovario, esto en el PCA en 2D, dado que su elipse de confianza es la más pequeña comparada con las demás interacciones, aunque en 3D la discriminación es mejor, dado que se visualiza más porcentaje de la varianza del proceso. La elipse de error, al 95% de confianza, para las Figuras 6.14c y 6.14d, muestran que la fase química, es donde se tiene el mayor volumen de datos al interior de la elipse.

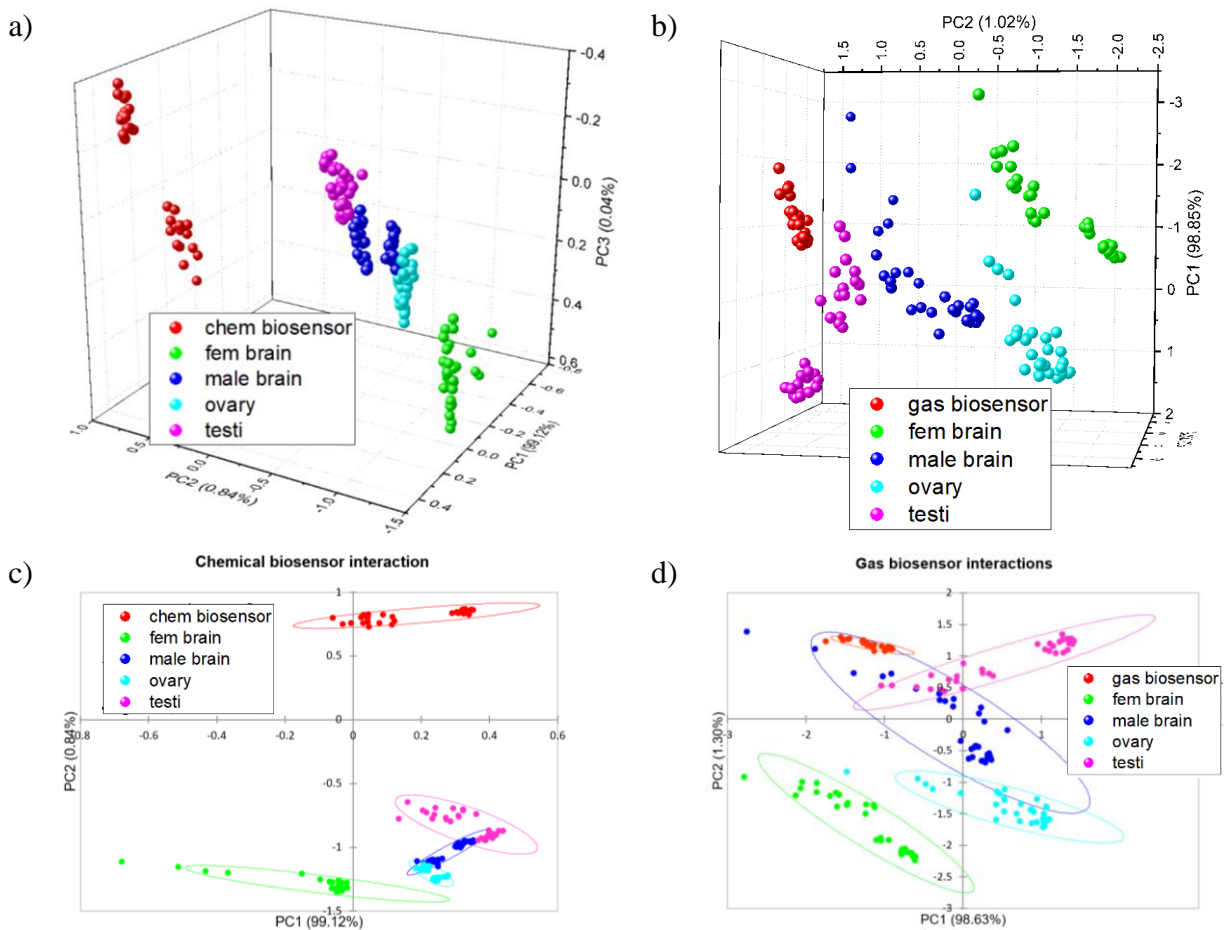


Fig. 6.14. PCA de un biosensor y sus interacciones en 2D y 3D. El biosensor fue funcionalizado por fase química (a y c) y gaseosa (b y d). Se muestran también las elipses de confianza con un intervalo de confianza del 95% para cada una de las interacciones en 2D.

Desde la Fig. 6.12 vemos que las interacciones con funcionalización por fase química y sus controles se separan muy bien, por lo que podemos conjeturar que el biosensor está funcionando de manera correcta, pero no así para la funcionalización por fase gaseosa y sus respectivos controles. En la siguiente figura se muestran los PCA de las interacciones y su control correspondiente para tener un mejor comparativo.

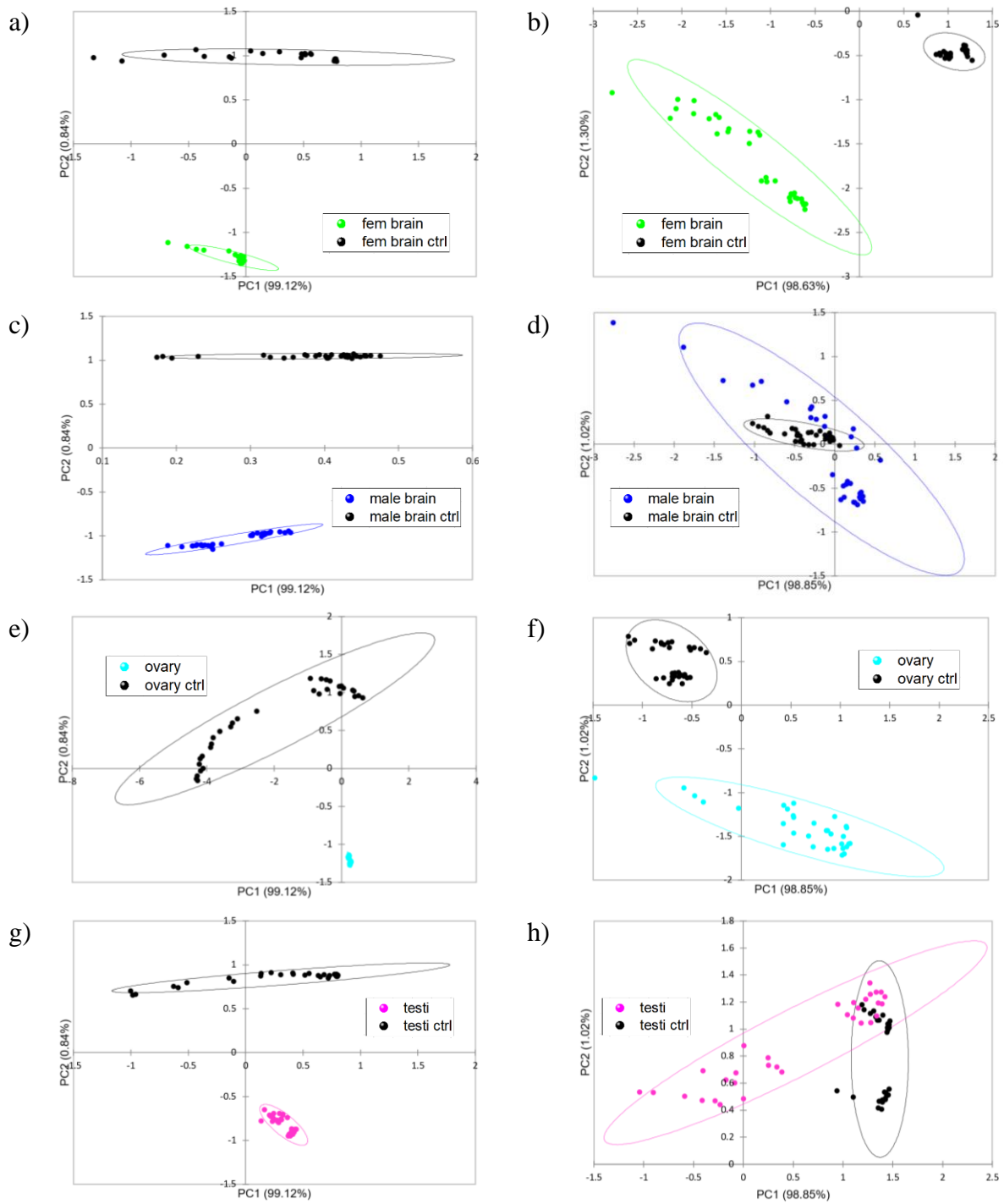


Fig. 6.15. PCA de las interacciones y sus controles correspondientes. Del lado izquierdo tenemos las interacciones y controles correspondientes al biosensor químico, y en la derecha los correspondientes al biosensor gaseoso. En color se muestra la interacción y en negro su control. En la mayoría bastan los dos primeros PC (1 y 2) para encontrar las diferencias, excepto en el último donde se ha buscado la mejor perspectiva para que estas diferencias sean apreciables. Se muestran también las elipses de confianza con un intervalo de confianza del 95%. Se presentan las siguientes interacciones, entendiendo que la etiqueta en el

*nombre se refiere al método de funcionalización: a) cerebro de hembra químico, b) cerebro de hembra gaseoso, c) cerebro de macho químico, d) cerebro de macho gaseoso, e) ovario químico, f) ovario gaseoso, g) testículo químico, h) testículo gaseoso.*

En la Fig. 6.15 vemos que para las interacciones químicas se definen muy bien las diferencias entre las interacciones y los controles, donde estos últimos se agrupan todos alrededor del valor 1 para el PC2. Sin embargo, esto no sucede del todo para las interacciones gaseosas, donde los controles no se agrupan hacia alguna región en específico, y en algunos casos, como en los tejidos de macho, parecieran mezclarse las señales.

Esto puede deberse a tres razones, probablemente no independientes la una de otra. La primera es que los tejidos y el anticuerpo Opn5, tenían alrededor de 6 meses que habían sido adquiridos, y a pesar de que los tejidos se encontraban cubiertos de sacarosa y guardados en refrigeración de 4 °C, pudo haber decaído parte de la op5 presente, la cual dejó de ser detectable por parte de los biosensores. La segunda es que el proceso de funcionalización por fase gaseosa, aunque tiene una mayor uniformidad, está sujeta a algún cambio relacionado con la temperatura desconocido en este momento, que le impide inmovilizar de manera óptima el anticuerpo Opn5, que ha sido guardado por mucho tiempo, a la superficie del soporte, mientras que el proceso de funcionalización por fase química no tiene este problema. Es posible también que, en el caso de los biosensores gaseosos, se genere un impedimento estérico entre las moléculas debido a que el depósito de 3AMPTS fuese demasiado grande.

## **CAPITULO 7. CONCLUSIONES**

Se encontró que el solvente ideal para disolver cromóforos retinales es el tritón X-100 ya que permite una buena disolución y su espectro en infrarrojo no opaca las señales de los cromóforos. Así mismo se encontró que la concentración óptima para esta disolución es de 0.6 mg por 100  $\mu$ l de tritón X-100, dado que se observan señales en el espectro de IR y optimiza el rendimiento de los cromóforos. Usando la concentración mencionada antes, se observó que al aplicar una irradiación de a lo más tres minutos con un láser He-Ne con longitud de onda de 633 nm con una potencia de 15.23 mW, y otra de un diodo láser con longitud de onda de 532 nm y 26.4 mW de potencia, es posible obtener una desnaturalización reversible de los cromóforos.

Los cambios conformacionales son más apreciables para el pico a  $720\text{ cm}^{-1}$  que para el pico a  $960\text{ cm}^{-1}$  pero es suficiente con el primero para conocer que la isomerización está teniendo lugar. Es observable que a más bajas concentraciones de altr (al momento de buscar la concentración óptima), la isomerización en los espectros se observa más rápido, tanto cuando la irradiación es accionada como cuando es apagada. Se observó que para el cromóforo altr existe un tiempo umbral de irradiación para observar los cambios conformacionales usando el láser He-Ne. Este tiempo umbral se observó entre los 60 y 90 segundos.

Se realizó la construcción de un biosensor óptico basado en silicio cristalino mediante el autoensamblado de monocapas utilizando como elemento de reconocimiento biológico el anticuerpo policlonal Opn5, implementando dos métodos de funcionalización, uno químico y otro gaseoso.

La opsina 5 fue determinada en cortes criogénicos de cerebro y gónadas de rata Wistar después de media hora de interacción para ambos procesos de funcionalización. Los cortes criogénicos fueron implementados para tener el mayor control posible del área donde se hace uso del biosensor, además de incrementar la eficiencia y rendimiento del tejido. Como cambios principales en las bandas espectrales fueron identificado las correspondientes a las aminas I y II, y a los enlaces C=C y C=O. Para cada etapa se obtuvieron 32 espectros y se realizó el análisis de componentes principales (PCA) en la región de las aminas I y II ( $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ), determinando más del 99.9% de varianza de todo el proceso para las tres primeras

PC. Se obtuvo una buena discriminación de las etapas, principalmente para los biosensores funcionalizados por fase química y su interacción.

La detección mediante espectroscopia de infrarrojo por ATR de la op5 en tejido de hembra resultó mejor para el proceso en fase gaseosa, así mismo, la detección espectral por ATR en tejido de macho tuvo mejores resultados para el proceso por fase química. Sin embargo, usando micro espectroscopia de infrarrojo por transmisión y el PCA correspondiente es posible discriminar perfectamente cada etapa de autoensamblado del biosensor, así como la detección de la op5. Incluso es posible discriminar entre los tejidos donde se interaccionó, así como sus controles. Aunque, cada uno de los dos procesos mostrados aquí tienen una buena respuesta para la detección de op5 por sí misma, se vuelve más eficiente cuando se usa un análisis quimiométrico como lo es PCA. Para los biosensores desarrollados durante este trabajo se logró una buena reproducibilidad en los resultados.

### ***7.1 Perspectivas del trabajo***

Como trabajo a futuro resulta necesario reproducir el protocolo aquí mostrado con todos los componentes y materiales frescos para poder comparar los resultados al modo en que se espera que opere el biosensor. Así mismo se necesita conocer la morfología de cada una de las etapas de autoensamblado del biosensor con la finalidad de mejorar los protocolos, para esto resulta útil técnicas como Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) o Microscopia por Electrónica de Barrido (SEM). Estas técnicas, aunadas a la Espectroscopia de Fotoelectrones emitida por rayos X (XPS), brindará información que permita discernir si existe una uniformidad óptima o si acaso se presenta una esteréis, principalmente en el caso de los biosensores gaseosos. Así mismo, se deben de hacer interacciones con tejidos de individuos que han sido inducidos con alguna enfermedad, para lograr tener un comparativo en la respuesta del biosensor.

Determinar la conformación de la op5 presente en los tejidos como función del padecimiento inducido o el protocolo implementado para dicha inducción del padecimiento.

Finalmente, para obtener una mejor caracterización de los cromóforos, es necesario usar láseres con otras longitudes de onda, así como potencias mayores para las longitudes de onda utilizadas durante el desarrollo de este trabajo.

## ANEXO

### *Congresos*

2019

- **Determinación de parámetros ópticos para la manipulación de opsinas aplicables en optogenética.** Torres Mena Oscar Ivan, Pérez Beltrán Georgina, Delgado Macuil Raúl, Rojas López Marlon, Muñoz Aguirre Severino, Castillo Mixcóatl Juan. Poster y memoria. *X Iberoamerican Optics Meeting, XIII Latinamerican Meeting on Optics, Lasers and Applications & Mexican Optics and Photonics Meeting. Cancún, Quintana Roo.* (23 de septiembre de 2019).

2020

- **Generation of an optical biosensor on a crystalline silicon matrix (1 0 0) to determinate opsins in murino model.** Torres Mena Oscar Ivan, Pérez Beltrán Georgina, Delgado Macuil Raúl, Alatraste Bueno Victorino, Rojas López Marlon, Muñoz Aguirre Severino, Castillo Mixcóatl Juan. Aceptado en la modalidad de poster. *30th Anniversary World Congress on Biosensors.* Busan, Korea. (reprogramado al 26-29 de julio de 2021).
- **Development of an optical biosensor on a crystalline silicon matrix to determinate opsins in murino model.** Torres Mena Oscar Ivan, Pérez Beltrán Georgina, Delgado Macuil Raúl, Alatraste Bueno Victorino, Rojas López Marlon, Muñoz Aguirre Severino, Castillo Mixcóatl Juan. Aceptado en la modalidad de poster y memoria. *XI Biochemical Engineering International Congress, XII Biochemical Engineering National Congress, XVIII Biomedicine and Molecular Biotechnology Scientific Meetings.* Huatulco, Oaxaca. (reprogramado al 14 – 16 de abril de 2021).

### *Artículos*

- **Infrared spectroscopy for opsin 5 determination in murino model tissues.** G. Beltran-Perez, O. I. Torres-Mena, J. Castillo-Mixcoalt, Victorino Alatraste-Bueno, V. Lopez Gayou, R. Delgado-Macuil. En revision por autores para publicarse en *Applied Spectroscopy*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Shaw, J. L. V. & Diamandis, E. P. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin. Chem.* **53**, 1423–1432 (2007).
2. Darling, M. R., Tsai, S., Jackson-Boeters, L., Daley, T. D. & Diamandis, E. P. Human kallikrein 8 expression in salivary gland tumors. *Head Neck Pathol.* **2**, 169–174 (2008).
3. Tailor, P. D. *et al.* Diagnostic and prognostic biomarker potential of kallikrein family genes in different cancer types. *Oncotarget* **9**, 17876–17888 (2018).
4. Voller, A., Bartlett, A. & Bidwell, D. E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Pathol.* **31**, 507–520 (1978).
5. Yamashita, T. *et al.* Evolution of mammalian Opn5 as a specialized UV-absorbing pigment by a single amino acid mutation. *J. Biol. Chem.* **289**, 3991–4000 (2014).
6. Ceolin, L. *et al.* Cell type-specific mRNA dysregulation in hippocampal CA1 pyramidal neurons of the fragile X syndrome mouse model. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 1–11 (2017).
7. Tamura, H., Kawata, M., Hamaguchi, S., Ishikawa, Y. & Shiosaka, S. Processing of neuregulin-1 by neuropsin regulates GABAergic neuron to control neural plasticity of the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* **32**, 12657–12672 (2012).
8. Hecker, N., Sharma, V. & Hiller, M. Transition to an aquatic habitat permitted the repeated loss of the pleiotropic KLK8 gene in mammals. *Genome Biol. Evol.* **9**, 3179–3188 (2017).
9. Konar, A., Kumar, A., Maloney, B., Lahiri, D. K. & Thakur, M. K. A serine protease KLK8 emerges as a regulator of regulators in memory: Microtubule protein dependent neuronal morphology and PKA-CREB signaling. *Sci. Rep.* **8**, 1–9 (2018).
10. Nakazawa, H. *et al.* Dataset on the effect of knockout of KLK8 in social memory. *Data Br.* **26**, 104458 (2019).
11. Kishi, T., Grass, L., Soosaipillai, A., Shimizu-Okabe, C. & Diamandis, E. P. Human kallikrein 8: Immunoassay development and identification in tissue extracts and biological fluids. *Clin. Chem.* **49**, 87–96 (2003).
12. Tarttelin, E. E., Bellingham, J., Hankins, M. W., Foster, R. G. & Lucas, R. J. Neuropsin (Opn5): A novel opsin identified in mammalian neural tissue. *FEBS Lett.* **554**, 410–416 (2003).
13. Kishi, T. *et al.* Crystal Structure of Neuropsin, a Hippocampal Protease Involved in Kindling Epileptogenesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 4220–4224 (1999).
14. da Silva, W. & Brett, C. M. A. Novel biosensor for acetylcholine based on acetylcholinesterase/poly(neutral red) – Deep eutectic solvent/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticle modified electrode. *J. Electroanal. Chem.* **872**, 114050 (2020).
15. Evered, L. *et al.* Predicts Postoperative Cognitive Dysfunction. 353–361 (2018).

16. Bateman, R. J. *et al.* Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **367**, 795–804 (2012).
17. Snyder, H. M. *et al.* HHS Public Access. **10**, 109–114 (2016).
18. Pirzada, M. & Altintas, Z. Nanomaterials for healthcare biosensing applications. *Sensors (Switzerland)* **19**, (2019).
19. Mungroo, N. A. & Neethirajan, S. Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry-A Review. *Biosensors* **4**, 472–493 (2014).
20. Midwood, K. S., Carolus, M. D., Danahy, M. P., Schwarzbauer, J. E. & Schwartz, J. Easy and efficient bonding of biomolecules to an oxide surface of silicon. *Langmuir* **20**, 5501–5505 (2004).
21. Carneiro, P., Morais, S. & do Carmo Pereira, M. Biosensors on the road to early diagnostic and surveillance of Alzheimer's disease. *Talanta* **211**, 120700 (2020).
22. Xu, Y. *et al.* Silicon-Based Sensors for Biomedical Applications: A Review. *Sensors* **19**, 2908 (2019).
23. Neethirajan, S., Ragavan, V., Weng, X. & Chand, R. Biosensors for sustainable food engineering: Challenges and perspectives. *Biosensors* **8**, (2018).
24. Thirugnanasambandan, T. *Functionalization on sensing surfaces for efficient biomolecular capturing. Nanobiosensors for Biomolecular Targeting* (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/B978-0-12-813900-4.00003-8.
25. Rull, J. *et al.* Functionalization of silicon oxide using supercritical fluid deposition of 3,4-epoxybutyltrimethoxysilane for the immobilization of amino-modified oligonucleotide. *Appl. Surf. Sci.* **354**, 285–297 (2015).
26. Palacin, S. *et al.* Molecule-to-metal bonds: Electrografting polymers on conducting surfaces. *ChemPhysChem* **5**, 1468–1481 (2004).
27. Nakashima, F., Shibata, T. & Uchida, K. A unique mechanism for thiolation of serum albumins by disulphide molecules. *J. Biochem.* **167**, 165–171 (2020).
28. Chibowski, S., Patkowski, J. & Grzadka, E. Adsorption of polyethyleneimine and polymethacrylic acid onto synthesized hematite. *J. Colloid Interface Sci.* **329**, 1–10 (2009).
29. Feyssa, B. *et al.* Patterned Immobilization of Antibodies within Roll-to-Roll Hot Embossed Polymeric Microfluidic Channels. *PLoS One* **8**, (2013).
30. Gu, W. & Tripp, C. P. Reaction of silanes in supercritical CO<sub>2</sub> with TiO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Langmuir* **22**, 5748–5752 (2006).
31. Lenci, S., Tedeschi, L., Pieri, F. & Domenici, C. UV lithography-based protein patterning on silicon: Towards the integration of bioactive surfaces and CMOS electronics. *Appl. Surf. Sci.* **257**, 8413–8419 (2011).
32. González-Guerrero, A. B., Alvarez, M., Castaño, A. G., Domínguez, C. & Lechuga,

- L. M. A comparative study of in-flow and micro-patterning biofunctionalization protocols for nanophotonic silicon-based biosensors. *J. Colloid Interface Sci.* **393**, 402–410 (2013).
33. Abu Ghalia, M. & Dahman, Y. *Synthesis and utilization of natural fiber-reinforced poly (lactic acid) bionanocomposites. Lignocellulosic Fibre and Biomass-Based Composite Materials: Processing, Properties and Applications* (Elsevier Ltd., 2017). doi:10.1016/B978-0-08-100959-8.00015-9.
  34. Hwang, K. Y., Kim, J. H., Suh, K. Y., Ko, J. S. & Huh, N. Low-cost polymer microfluidic device for on-chip extraction of bacterial DNA. *Sensors Actuators, B Chem.* **155**, 422–429 (2011).
  35. Mery, E. *et al.* A silicon microfluidic chip integrating an ordered micropillar array separation column and a nano-electrospray emitter for LC/MS analysis of peptides. *Sensors Actuators, B Chem.* **134**, 438–446 (2008).
  36. Shen, Q. *et al.* Capture and biological release of circulating tumor cells in pancreatic cancer based on peptide-functionalized silicon nanowire substrate. *Int. J. Nanomedicine* **14**, 205–214 (2019).
  37. Presnova, G. *et al.* Biosensor based on a silicon nanowire field-effect transistor functionalized by gold nanoparticles for the highly sensitive determination of prostate specific antigen. *Biosens. Bioelectron.* **88**, 283–289 (2017).
  38. Touahir, L. *et al.* Functionalized Silicon Surfaces for Biological and Chemical Sensors. *Sens. Lett.* **8**, 447–456 (2010).
  39. Hosseini, S., Ibrahim, F., Djordjevic, I. & Koole, L. H. Recent advances in surface functionalization techniques on polymethacrylate materials for optical biosensor applications. *Analyst* **139**, 2933–2943 (2014).
  40. Morales, M. A. & Halpern, J. M. Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors. *Bioconjug. Chem.* **29**, 3231–3239 (2018).
  41. Liu, H., Ge, J., Ma, E. & Yang, L. *Advanced biomaterials for biosensor and theranostics. Biomaterials in Translational Medicine: A Biomaterials Approach* (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/B978-0-12-813477-1.00010-4.
  42. Chambers, J. P., Arulanandam, B. P., Matta, L. L., Weis, A. & Valdes, J. J. Biosensor recognition elements. *Curr. Issues Mol. Biol.* **10**, 1–12 (2008).
  43. Baryeh, K., Takalkar, S., Lund, M. & Liu, G. *Introduction to medical biosensors for point of care applications. Medical Biosensors for Point of Care (POC) Applications* (Elsevier Ltd, 2017). doi:10.1016/B978-0-08-100072-4.00001-0.
  44. Wilson, M. S. Electrochemical immunosensors for the simultaneous detection of two tumor markers. *Anal. Chem.* **77**, 1496–1502 (2005).
  45. Zhong, Z. *et al.* Nanogold-enwrapped graphene nanocomposites as trace labels for sensitivity enhancement of electrochemical immunosensors in clinical immunoassays: Carcinoembryonic antigen as a model. *Biosens. Bioelectron.* **25**,

- 2379–2383 (2010).
46. Ju, H., Lai, G. & Yan, F. *Immunosensing for Detection of Protein Biomarkers*. *Immunosensing for Detection of Protein Biomarkers* (Elsevier, 2017). doi:10.1016/C2016-0-01168-3.
  47. Luy en, T. T. *et al.* Nghiên cứu chế tạo cảm biến miễn dịch điện hóa sử dụng kháng thể IgY chiết xuất trực tiếp từ trứng gà làm phần tử dò ứng dụng trong phát hiện virus Newcastle. **2**, 62–68 (2018).
  48. Figueiredo, A. *et al.* Corrigendum: Electrical Detection of Dengue Biomarker Using Egg Yolk Immunoglobulin as the Biological Recognition Element. *Sci. Rep.* **7**, 46865 (2017).
  49. Shimizu-Okabe, C. *et al.* Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer’s disease brain. *Neuroreport* **12**, 2747–2751 (2001).
  50. Keyvani, K. *et al.* Higher levels of kallikrein-8 in female brain may increase the risk for Alzheimer’s disease. *Brain Pathol.* **28**, 947–964 (2018).
  51. Teuber-Hanselmann, S. *et al.* CSF and blood kallikrein-8: A promising early biomarker for Alzheimer’s disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **91**, 40–48 (2020).
  52. Bobińska, K. *et al.* Human neuropsin gene in Depression. *Psychiatr. Danub.* **29**, 195–200 (2017).
  53. Diamandis, E. P. & Yousef, G. M. Human tissue kallikreins: A family of new cancer biomarkers. *Clin. Chem.* **48**, 1198–1205 (2002).
  54. Attwood, B. K. *et al.* Neuropsin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety. *Nature* **473**, 372–377 (2011).
  55. Magklara, A. *et al.* The human KLK8 (neuropsin/ovasin) gene: Identification of two novel splice variants and its prognostic value in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**, 806–811 (2001).
  56. Kishi, T. *et al.* Human kallikrein 8, a novel biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res.* **63**, 2771–2774 (2003).
  57. Obiezu, C. V. & Diamandis, E. P. Human tissue kallikrein gene family: Applications in cancer. *Cancer Lett.* **224**, 1–22 (2005).
  58. Piro, B. & Reisberg, S. Recent advances in electrochemical immunosensors. *Sensors (Switzerland)* **17**, (2017).
  59. Britannica, E. Antibody. <https://www.britannica.com/science/antibody>.
  60. Pollock, V. Proteins. *xPharm Compr. Pharmacol. Ref.* 1–11 (2007) doi:10.1016/B978-008055232-3.60055-8.
  61. Blanco, A. & Blanco, G. Proteins. in *Medical Biochemistry* 21–71 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-803550-4.00003-3.

62. Jana, N. D., Das, S. & Sil, J. Backgrounds on Protein Structure Prediction and Metaheuristics. 1–28 (2018) doi:10.1007/978-3-319-74775-0\_1.
63. J.N., C. 1 - Introduction to colouration of textiles. in *Fundamentals and Practices in Colouration of Textiles* (ed. J.N., C.) 1–11 (Woodhead Publishing India, 2014). doi:10.1016/B978-93-80308-46-3.50001-7.
64. Kuball, H. G., Höfer, T. & Kiese-walter, S. Chiroptical spectroscopy, general theory. *Encycl. Spectrosc. Spectrom.* 217–231 (2016) doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.04980-5.
65. Millington, K. R. Improving the whiteness and photostability of wool. *Adv. Wool Technol.* 217–247 (2008) doi:10.1533/9781845695460.2.217.
66. Sekharan, S. & Morokuma, K. Why 11-cis-retinal? Why not 7- cis -, 9- cis -, or 13- cis- retinal in the eye? *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 19052–19055 (2011).
67. Dufour, S. & De Koninck, Y. Optrodes for combined optogenetics and electrophysiology in live animals. *Neurophotonics* **2**, 031205 (2015).
68. Flannery, J. G. & Greenberg, K. P. Looking within for Vision. *Neuron* **50**, 1–3 (2006).
69. Kojima, D. *et al.* UV-sensitive photoreceptor protein OPN5 in humans and mice. *PLoS One* **6**, (2011).
70. Yamashita, T. *et al.* Opn5 is a UV-sensitive bistable pigment that couples with Gi subtype of G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 22084–22089 (2010).
71. Colthup, N. B. Infrared Spectroscopy. in *Encyclopedia of Physical Science and Technology* vol. 24 793–816 (Elsevier, 2003).
72. Global), (Jasco. Principles of Infrared Spectroscopy. <https://www.jasco-global.com/principle/principles-of-infrared-spectroscopy-1-molecular-vibrations-and-infrared-absorption/>.
73. ThermoFisher. FTIR Sample Handling Techniques. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques.html>.
74. Resnick R., Halliday D., K. K. S. *Física Vol. 2.* (2002).
75. Ruyschaert, J. M. & Raussens, V. ATR-FTIR analysis of amyloid proteins. *Methods Mol. Biol.* **1777**, 69–81 (2018).
76. ThermoScientific. Technical Note 52527.
77. Ausili, A., Sánchez, M. & Gómez-Fernández, J. C. Attenuated total reflectance infrared spectroscopy: A powerful method for the simultaneous study of structure and spatial orientation of lipids and membrane proteins. *Biomed. Spectrosc. Imaging* **4**, 159–170 (2015).

78. Anton, P. Reflectancia Total Atenuada. <https://wiki.anton-paar.com/co-es/reflectancia-total-atenuada-rta/>.
79. Subramanian, A. & Rodriguez-saona, L. *Spectroscopy*. (2009).
80. Rodríguez-Herrera J.F., G.-R. V. Teoría de señales. <https://w3.ual.es/~vruiiz/Docencia/Apuntes/Signals/Theory/index.html>.
81. Bruker. FTIR Basics – Principles of Infrared Spectroscopy. <https://www.youtube.com/watch?v=KR0WMB3AR3s>.
82. WU, G. Molecular vibration. *Nonlinearity Chaos Mol. Vib.* 1–14 (2005) doi:10.1016/b978-044451906-1/50001-6.
83. Aldrich, S. 3AMPTS. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440140?lang=es&region=MX#>.
84. Caso-Vargas, L. R. Desarrollo de un método de determinación de aminas biógenas en tilapia por espectroscopias UV/Vis e Infrarrojo. (Instituto Politécnico Nacional, 2016).
85. González-León, K. *et al.* Experimental characterization of a biosensor based on a tapered optical fiber for kisspeptin detection. *Appl. Opt.* **59**, D131 (2020).
86. Oakley, A. E., Clifton, D. K. & Steiner, R. A. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr. Rev.* **30**, 713–743 (2009).
87. Tian, R. *et al.* Infrared characterization of interfacial Si-O bond formation on silanized flat SiO<sub>2</sub>/Si Surfaces. *Langmuir* **26**, 4563–4566 (2010).
88. Sarver, R. W. & Krueger, W. C. Protein secondary structure from fourier transform infrared spectroscopy: A data base analysis. *Anal. Biochem.* **194**, 89–100 (1991).
89. Byler, D. M. & Susi, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* **25**, 469–487 (1986).
90. Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A. & Yu, S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nat. Protoc.* **10**, 382–396 (2015).
91. Sow, L. C., Nicole Chong, J. M., Liao, Q. X. & Yang, H. Effects of  $\kappa$ -carrageenan on the structure and rheological properties of fish gelatin. *J. Food Eng.* **239**, 92–103 (2018).