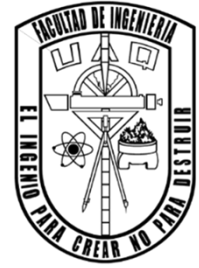




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



FACULTAD DE INGENIERÍA

“Extracción de esfuerzos superficiales en cantilevers micromecánicos como biosensor para la detección de pesticidas.”

TESIS

Que para obtener el título de:

Ingeniero en Nanotecnología

Presenta:

Felipe de Jesús García Paredes

Directora de tesis:

Dra. María Guadalupe Ferreira García

Codirectores:

Dra. Daniela Diaz Alonso

Dr. David Andrés Fernández Benavides

Santiago de Querétaro, Querétaro, 2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería en Nanotecnología



**EXTRACCIÓN DE ESFUERZOS SUPERFICIALES EN CANTILEVERS
MICROMECAÑICOS COMO BIOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DE
PESTICIDAS**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Ingeniero en Nanotecnología

Presenta:

Felipe de Jesús García Paredes

Dirigido por:

Dra. María Guadalupe Ferreira García

Dra. Daniela Díaz Alonso

Dr. David Andrés Fernández Benavides

SINODALES

Dra. María Guadalupe Ferreira García
Presidente

Dr. Gabriel López Calzada
Secretario

Dr. José Alberto Rodríguez Morales
Vocal

Dr. Héctor Paul Reyes Pool
Suplente

Firma

Firma

Firma

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Julio, 2022

© 2022 - Felipe de Jesús García Paredes

All rights reserved.

Para mi madre...

Agradecimientos

Al Centro de Ingeniería y Desarrollo Industrial (CIDESI) por otorgarme la oportunidad de realizar mi estancia en sus laboratorios. Asimismo, a los integrantes de la gerencia de fabricación aditiva y la gerencia de Microtecnologías por fortalecer mi formación profesional y personal.

Al Centro de Investigaciones en Óptica (CIO), por permitirme el uso de la instrumentación óptica en la parte experimental de la tesis, además del apoyo incondicional por parte del Dr. David Monzón Hernández, el Dr. Noé Alcalá Ochoa y a Monserrat del Carmen Alonso Murias.

A la Dra. Daniela Diaz Alonso, investigadora del CIDESI, por su constante apoyo durante la redacción y experimentación de esta tesis, además de sus enseñanzas dentro y fuera de los laboratorios.

A la Ing. Ana Paulina Gonzáles Arceo, por sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio y por su alta disposición a enseñarme las técnicas necesarias para realizar con éxito la inmovilización de moléculas.

A la Dra. María Guadalupe Ferreira García, directora de tesis, por sus recomendaciones y sugerencias para la solución de problemáticas durante el proyecto, además de proporcionarme herramientas para la búsqueda de información.

Al Dr. David Andrés Fernández Benavides y al Ing. Alberto Peñaloza Hernández por la enseñanza en el uso de software de diseño y distintas técnicas de impresión 3D.

Al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), Campus UNAM Juriquilla, al laboratorio de microscopía, en especial a Manuel Aguilar Franco por su apoyo durante la caracterización por SEM y EDS de las muestras.

A mis compañeros durante las prácticas profesionales, en especial a Emmanuel Guzmán Escobedo y a Gregorio Reyes Hernández quienes me fueron guiando en el camino laboral y de investigación durante mi estancia en el CIDESI.

A mis sinodales por las observaciones a mi trabajo y ayudarme a crecer como estudiante y profesionista.

A CONACYT/CIDESI por el apoyo económico recibido gracias al proyecto FORDECYT-PRONACES 618306/2020 .

Abstract

Molecular binding over a biosensing surface changes the surface stress that is used for biological detection, being the key mechanism for a suspended biosensor array operating in static mode. In that case, the sensing surface is functionalized with a bioreceptor film that exhibit high binding affinity to the target molecules, which leads to a proportional bending. This work is focused on the experimental analysis of surface stress onto silicon microcantilevers ($500 \times 90 \times 1\mu m^3$ and $750 \times 90 \times 1\mu m^3$) which are used for biological detection of bovine serum albumin (BSA) proteins and the pesticide carbaryl. The experimental setup is developed to detect a low concentration according to the resulting mechanical deflection with a displacement resolution of 1nm. In order to monitor the changes in the microcantilever surface stress, when the targeted molecule is detected, an optical technique has been implemented consisting of a pair of extrinsic optical fiber Fabry-Perot interferometers (EFPI) in parallel. The microcantilever deflection modifies the length of the Fabry-Perot cavity, formed between the fiber tip and the microcantilever, producing a shift of the interference pattern. Thus obtaining measurements as small as 284.1 nm and as large as 422.8 nm, which are proportionally related to the concentration used, being the first the smallest and the second the highest concentration, to later use the Stoney equation to obtain surface stresses from 0.828 N/m to 0.1243 N/m, thus fulfilling the objective of obtaining surface stresses through the use of optical interference instrumentation.

Resumen

La unión molecular sobre una superficie biosensora provoca un cambio en la tensión superficial que se puede utilizar para detección biológica. Este es el mecanismo clave para un biosensor basado en microcantilevers suspendidos que operan en modo estático. En ese caso, la superficie de detección se funcionaliza con una película biorreceptora que exhibe una alta afinidad de unión a las moléculas objetivo, lo que conduce a una flexión proporcional. Este trabajo se centra en el análisis experimental de la tensión superficial en microcantilevers de silicio ($500 \times 90 \times 1\mu m^3$ y $750 \times 90 \times 1\mu m^3$) que se utilizaron para la detección biológica de proteínas de albúmina de suero bovino (BSA). La configuración experimental está desarrollada para detectar una concentración baja de acuerdo con la desviación mecánica resultante con una resolución de desplazamiento de 1 nm. Para monitorear los cambios en la tensión superficial del microcantilever cuando la molécula objetivo es detectada, se ha implementado una técnica óptica que consiste en un par de interferómetros de Fabry-Perot de fibra óptica extrínseca (EFPI) en paralelo. La deflexión del microcantilever modifica la longitud de la cavidad de Fabry-Perot, formada entre la punta de la fibra y el microcantilever, produciendo un desplazamiento del patrón de interferencia. Logrando así obtener mediciones tan pequeñas como 284.1 nm y tan grandes como 422.8 nm, que están proporcionalmente relacionadas con la concentración utilizada, siendo la primera la más pequeña y la segunda la de mayor concentración, para posteriormente usar la ecuación de Stoney obteniendo esfuerzos superficiales de 0.828 N/m hasta 0.1243 N/m cumpliendo así el objetivo de obtener esfuerzos superficiales mediante el uso de instrumentación de interferencia óptica.

Índice

Agradecimientos	i
Abstract	iii
Resumen	v
Índice	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tablas	xi
1 Introducción	1
1.1 Justificación	3
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Hipótesis	4
1.4 Objetivo	4
1.4.1 Objetivos Específicos.	4
1.5 Estructura de la Tesis	4
2 Revisión de literatura	5
2.1 Antecedentes	5
2.1.1 Sistemas microelectromecánicos (MEMS)	5
2.1.2 Biosensores	5
2.1.3 Cantilever	6
2.1.4 Biosensor microcantilever	7
2.1.5 Esfuerzos Superficiales	8
2.1.6 Interferometría	11
2.1.7 Detección de pesticidas con albúmina de suero bovino (BSA)	12
3 Metodología	15
3.1 Cantilevers	15
3.2 Diseño de celda de inmovilización	16
3.3 Limpieza	17
3.4 Funcionalización	18

3.5	Inmovilización	18
3.5.1	Activación de grupos carboxilo	18
3.5.2	Unión covalente de la proteína a la mSAM	18
3.5.3	Bloqueo de los grupos carboxilo activados y no reaccionados	18
3.6	Caracterización mediante Microscopía de Barrido Electrónico.	19
3.6.1	Análisis EDS	20
3.7	Diseño celda de inmunoensayo	21
3.8	Detección de la deflexión en los cantilevers	22
4	Resultados y Discusión	25
4.1	Resultados	25
4.2	Discusión	28
5	Conclusiones	31
5.1	Conclusión	31
5.2	Publicaciones	32
	Referencias	33

Índice de Figuras

1.1	Representación esquemática de un biosensor con su transductor y bioreceptores así como un analito [3].	1
1.2	Esquema representativo de la medición mediante interferometría óptica. OSA(Analizador de espectro óptico)[5].	2
2.1	Representación esquemática de los distintos tipos de componentes que puede tener un biosensor [16].	6
2.2	Imagen representativa de un cantilever funcionalizado. La parte receptora está conformada por los elementos azules y dorados, y el rojo es el analito (autoría propia).	7
2.3	Esquema de Interferómetro Fabry-Pérot: a) en transmisión, b) en reflexión. S: fuente de luz; BS: divisor del haz; L: lente convergente; M: espejo plano; SM: espejo esférico; O: detector [24].	12
3.1	Imagen de microscopía del arreglo de los cantilevers en el chip.	15
3.2	Esquema de soporte junto a su versión impresa (autoría propia).	16
3.3	Esquema celda de inmovilización junto a su versión impresa (autoría propia).	16
3.4	Esquema celda de inmovilización junto a su versión impresa (autoría propia).	17
3.5	Portasensores en el ozonificador (autoría propia).	17
3.6	Celdas de inmovilización en el agitador a 25rpm (autoría propia).	18
3.7	Celdas de inmovilización etiquetadas con la concentración de BSA inmovilizada	19
3.8	Imágenes SEM de cantilevers inmovilizados a distintas concentraciones de BSA.	19
3.9	Gráfica de espectroscopia por EDS de los microcantilevers funcionalizados con BSA.	20
3.10	Imagen SEM cantilever inmovilizado a 25 $\mu g/ml$, el recuadro amarillo indica la sección en la que se hizo el análisis EDS (autoría propia).	21
3.11	Celda de inmunoensayo en el interferómetro Fabry-Pérot (autoría propia).	22
3.12	Pieza inferior de la celda de inmunoensayo con el chip de los cantilevers (autoría propia).	22
3.13	Arreglo del Interferómetro Fabry-Pérot donde la fibra óptica se encuentra sobre el cantilever inmerso en una solución (autoría propia).	23
4.1	Curva de referencia con solución PBS.	25
4.2	Gráfica de respuesta de la longitud de onda durante el proceso de detección.	26
4.3	Gráfica de Longitud de onda a lo largo del tiempo.	27
4.4	Gráfica de Longitud de onda a lo largo del tiempo.	28

4.5	Cambio de reflexión a través del tiempo.	29
4.6	Cambio de longitud de onda del patrón de interferencia a través del tiempo.	30
5.1	Reconocimiento para el primer lugar de posters	32

Índice de Tablas

2.1	Deflexiones máximas del plano medio del microcantilever de los dos grupos de estudio considerados. Se muestran las deflexiones obtenidas para los valores extremos del intervalo de $\Delta\sigma_s$ considerado.	11
4.1	Extracción de Esfuerzos Superficiales a partir del desplazamiento del cantilever. . . .	29

Introducción

En el campo de los sistemas microelectromecánicos (MEMS) uno de los que más destaca sin duda es el desarrollo de biosensores. Una de las ventajas de éste tipo de sistemas es que se desarrolla en un ámbito multidisciplinario, por lo que tiene un alcance infinito de posibilidades [1]. El concepto “biosensor” ha ido cambiando conforme el tiempo, actualmente en la literatura, algunos autores lo definen como un dispositivo analítico autónomo que responde de forma reversible y selectiva a la presencia de especies químicas. Por lo tanto, un biosensor debe de responder de manera específica, continua, rápida, selectiva e idealmente sin ningún reactivo adicional, además se debe de tomar en cuenta distintos enfoques respecto al ambiente en el que se verá implementado [1]. Un biosensor cuenta de varias partes, como se muestra en la Figura 1.1. Es importante destacar entre ellas el elemento biológico y el transductor; el elemento biológico se encargará de detectar específicamente una sustancia; y el transductor se encargará de interpretar la reacción del reconocimiento biológico y traducirla a una señal cuantificable [2].

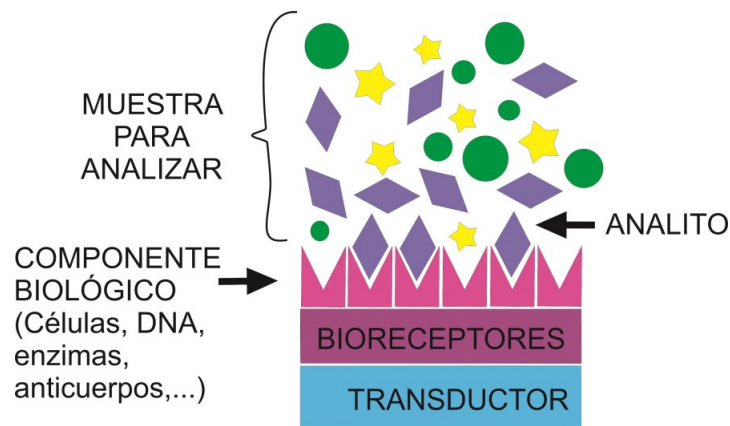


Figura 1.1: Representación esquemática de un biosensor con su transductor y bioreceptores así como un analito [3].

En un biosensor las características más importantes son:

- **Selectividad:** Se define como la habilidad del receptor para aceptar una determinada molécula y rechazar otra. La parte que delimita que tan selectivo es un biosensor es la afinidad que tenga el analito con el elemento biológico que esté anclado en el biosensor [4].
- **Sensibilidad:** Se define como el nivel mínimo de detección que puede ser captada/detectada en la entrada del transductor y todavía producir una señal de salida [4].

En este trabajo se le dará principal énfasis a la sensibilidad del biosensor y como se mencionó recientemente, el método de transducción es un elemento importante para la sensibilidad de este; los biosensores se pueden clasificar según su método de transducción. Los principales métodos de transducción son electroquímicos, ópticos, y mecánicos. Los biosensores mecánicos son adecuados para detecciones muy sensibles, en el que la transducción se basa en cambios en la masa y/o deflexión que es el que se usará en este biosensor y para poder cuantificar esta deflexión se usará interferometría óptica, que consiste en la interferencia del rayo láser de referencia y el rayo láser reflejado por el cantilever. Parte de la luz se refleja en la interfaz entre la fibra óptica y el medio circundante, y la otra parte se refleja desde el cantilever hacia la fibra óptica (Véase la figura 1.2). Los dos haces interfieren dentro de la fibra óptica y la señal de interferencia, se puede medir con un fotodiodo. La interferometría es un método muy sensible que proporciona una medición directa y absoluta del desplazamiento. La principal problemática de este método es que la luz debe estar muy cerca de la superficie del cantilever para obtener suficiente luz reflejada [5].

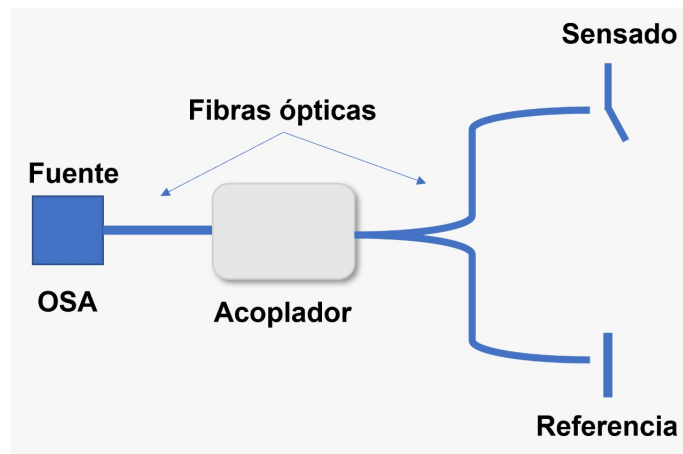


Figura 1.2: Esquema representativo de la medición mediante interferometría óptica. OSA(Analizador de espectro óptico)[5].

Por otro lado, en México el uso de pesticidas es un tema que ha tomado relevancia debido a que su uso desmedido tiene relación con la contaminación de aguas y suelos, así como de enfermedades en humanos. Dada esta problemática es posible formar moléculas conjugadas compuestas por pesticidas anclados a una molécula de mayor tamaño como lo es la albúmina de suero bovino. Lo anterior debido a dos principales razones; la primera, los antígenos de pesticidas tienen un bajo peso molecular, por lo cual se conocen como haptenos, esto requiere que se encuentren adheridos a un sistema de mayor tamaño y peso molecular para ser detectados; la segunda, la BSA como molécula de soporte para los pesticidas, presenta enlaces tipo amina ($-NH$) los cuales son requeridos para an-

clar el sistema biológico a una fase sólida, en este caso, considerada en la superficie del biosensor [6].

Además, los pesticidas unidos a la albúmina se pueden utilizar como nuevos biomarcadores de la exposición humana a pesticidas. El comportamiento toxicocinético de los pesticidas depende en gran medida de los fenómenos de unión. La razón de usar albumina es justamente la que se menciona en el comentario anterior. Debido a que nuestro sistema se encuentra conjugado con moléculas de albumina, y al mismo tiempo, los protocolos de anclaje biológico se encuentran diseñados para albumina de suero bovino. El sistema biológico que se usará, será albumina de suero bovino para realizar la prueba de concepto del sistema de medición por interferometría óptica propuesto. En este caso particular, se usará albumina como bioreceptor y anticuerpos contra albumina como moléculas analito a identificar [7].

1.1 Justificación

Los efectos de los agentes contaminantes, como los compuestos usados en la preparación de pesticidas o generados en su degradación, han creado la necesidad de sistemas de detección. Es necesario el control adecuado para evitar contaminar suelos, aguas superficiales y subterráneas, y al aire con aerosoles, de lo contrario representa un riesgo potencial para el medio ambiente y a la salud humana, debido a la acumulación de sustancias tóxicas. Este proceso contaminante suele percibirse tiempo después. En este sentido, se ha otorgado gran importancia al diseño de sistemas para el reconocimiento de contaminantes presentes en líquidos [9].

Los sensores basados en el uso de microcantilevers tienen un enorme potencial para la detección de varios analitos en medios gaseosos, al vacío y líquidos. Han despertado un interés considerable debido a su alta especificidad, alta sensibilidad, simplicidad, bajo costo y bajo requerimiento de analito. Los sensores basados en microcantilever pueden detectar trazas de sustancias en partes por billón (ppb) y partes por trillón (ppt), lo cual lo hace uno de los métodos de detección con más sensibilidad actualmente [10].

Para la detección de los pesticidas en medio líquido, se usará un método de detección óptica, que posee una alta sensibilidad debido a que la fibra óptica puede estar separada del cantilever incluso a micrómetros, pero puede llegar a detectar deflexiones de hasta 0.01 \AA [11].

1.2 Planteamiento del problema

En México se carece de técnicas eficientes para la detección de pesticidas en concentraciones mínimas. Una forma para detectar la concentración molecular es mediante la medición de la deflexión del cantilever debido al estrés de adsorción en un solo lado de éste. Dependiendo de la naturaleza del enlace químico de la molécula, la deflexión mecánica por esfuerzos de compresión y de tensión. Tras la unión del analito con el receptor, la superficie del microcantilever experimentará ya sean esfuerzos de tensión o compresión. Esto hace que el microcantilever se flexione, generalmente a una escala nanométrica, lo que puede medirse mediante técnicas ópticas. La deflexión debe ser proporcional a la concentración de analito, lo que lleva a nuestra problemática principal que es determinar exactamente cuánto esfuerzo superficial provoca una determinada concentración de la molécula al cantilever [8].

1.3 Hipótesis

Será posible cuantificar los esfuerzos superficiales en un microcantilever, mediante un arreglo por interferometría óptica que permita precisar su magnitud de deformación, al ser sometido a cambios de concentraciones moleculares en su superficie, producto de una reacción inmunológica entre albumina de suero bovino inmovilizada en su superficie, y anticuerpos contra BSA, logrando así desarrollar un biosensor.

1.4 Objetivo

Cuantificar la magnitud de los esfuerzos superficiales en biosensores basados en microcantilevers a partir del análisis, evaluación de la deflexión mecánica correspondiente a diversas concentraciones moleculares de Albumina de Suero Bovino.

1.4.1 Objetivos Específicos.

Los objetivos específicos de este proyecto son los siguientes:

- Funcionalizar los cantilevers mediante la inmovilización de albumina de suero bovino.
- Establecer un método de detección a partir de un interferómetro Fabry-Pérot.
- Medir la deflexión mecánica proporcional a la concentración de Albumina de Suero Bovino en presencia de anticuerpos contra BSA.
- Cuantificar el esfuerzo superficial realizado en distintas concentraciones.

1.5 Estructura de la Tesis

La tesis está organizada de la siguiente manera:

- En el capítulo 2 se abordará los principios teóricos de los biosensores, esfuerzos superficiales, interferometría y de la molécula BSA.
- En el capítulo 3 se abordará la metodología realizada durante la experimentación de los cantilevers, desde su funcionalización hasta el método de detección para medir la deflexión de los cantilevers.
- En el capítulo 4 se presentarán los resultados y su análisis.
- En el capítulo 5 se expondrán las conclusiones y publicaciones realizadas durante el desarrollo de este proyecto.

Revisión de literatura

2.1 Antecedentes

2.1.1 Sistemas microelectromecánicos (MEMS)

Los sistemas microelectromecánicos o MEMS (por sus siglas en inglés) son una tecnología que se puede definir como componentes mecánicos y eléctricos miniaturizados fabricados utilizando tecnología de microfabricación. El tamaño físico de los dispositivos MEMS puede variar desde un micrómetro hasta varios milímetros. Además, los tipos de dispositivos MEMS pueden variar desde estructuras relativamente simples sin elementos móviles hasta sistemas electromecánicos extremadamente complejos con múltiples elementos móviles bajo control microelectrónico integrado [12].

La tecnología de microelectrónica y los MEMS se pueden utilizar para producir estructuras, equipos y sistemas complejos a microescala. La tecnología de micromaquinado de silicio, surge como una vertiente de los procesos de fabricación de circuitos integrados (CI), pero ahora se están desarrollando muchos procesos de micromecanizado específicos de MEMS únicos. En MEMS, se pueden usar una variedad de mecanismos de conversión para transformar señales del mundo real de una forma de energía a otra, logrando así el desarrollo de muchos microsistemas diferentes; los más destacados en éste campo serían los microsensores en especial los de uso biológico [13].

2.1.2 Biosensores

Un biosensor se define como un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, sistema inmunológico, tejidos, orgánulos o células completas para detectar compuestos, generalmente a través de señales eléctricas, térmicas u ópticas. Según los tipos de componentes de detección biológica, los biosensores se pueden dividir en biosensores de enzimas, biosensores inmunes, biosensores nucleares y biosensores de receptores [14].

Según el proceso de transducción, los biosensores también se pueden clasificar en biosensores electroquímicos, ópticos, semiconductores, fotoeléctricos y piezoeléctricos (Véase Figura 2.1). Hasta ahora, los biosensores se han desarrollado rápidamente y han desempeñado un papel importante en

el análisis clínico, farmacéuticos, industrias de procesamiento de alimentos y monitoreo ambiental [15].

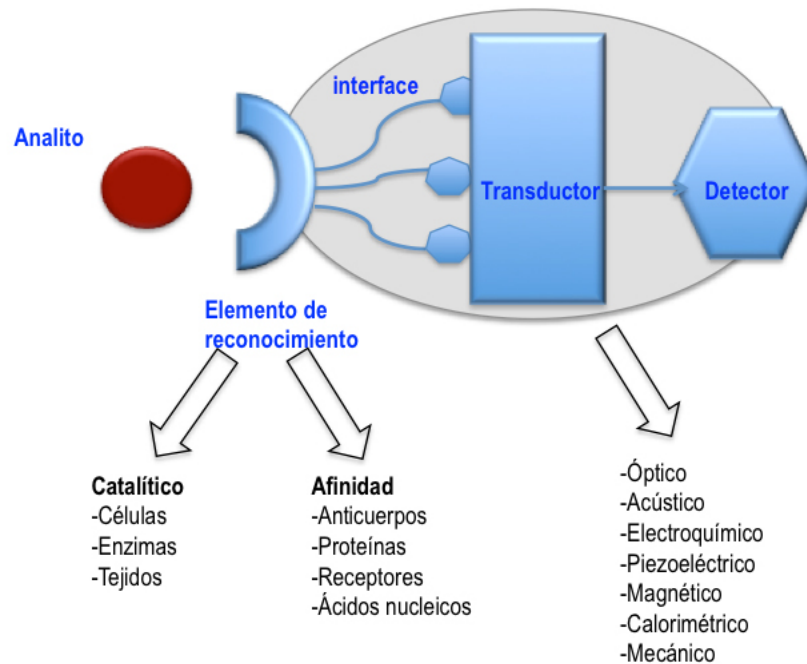


Figura 2.1: Representación esquemática de los distintos tipos de componentes que puede tener un biosensor [16].

2.1.3 Cantilever

Un cantilever es un actuador tipo de viga que está apoyada y restringida en un solo extremo. Según esta descripción, las alas de la mayoría de los aviones, balcones de edificios y puentes levadizos son cantilevers. Las torres de radio independientes, ancladas al suelo, suspendidas hacia arriba sin cables también son cantilevers. Por supuesto, el cantilever más comúnmente conocido es el trampolín en las albercas [31].

Los cantilevers pueden presentarse en todos los tamaños. Los ejemplos anteriores varían en longitud desde unos pocos metros hasta cientos de metros. En contraste, los microcantilevers pueden ser tan delgados como unos cuantos nanómetros con longitudes que van desde decenas de micrómetros hasta cientos de ellos. Los cantilevers se utilizan en una variedad de sistemas microelectromecánicos (MEMS) como microtransductores, sensores, interruptores, actuadores, resonadores y sondas. Su flexibilidad y versatilidad lo hacen un componente popular para una variedad de aplicaciones en varios campos, todo ello depende del modo en el que se hayan diseñado:

- El modo de operación estático, considera que el microcantilever se mantiene inmóvil durante su funcionamiento inicial, lo que permite medir su deformación debida a la acción de factores

externos. Cuando una superficie de un microcantilever se funcionaliza y adsorbe una capa de biomoléculas, se genera una tensión superficial, lo que provoca la deflexión del cantilever.[32].

- El modo dinámico significa que el microcantilever se encuentra oscilando durante todo su funcionamiento, en este caso, la medición de la frecuencia de resonancia permite inferir cambios de masa adheridos en la superficie del cantilever. Este aumento en la masa del sensor supuesto para la adhesión hace que su frecuencia de resonancia varíe en función de la adsorción. Estos cambios en la frecuencia de resonancia están directamente relacionado con varias características del adsorbato, como el módulo de Young, la forma, la orientación o el área de contacto de la superficie [32].

2.1.4 Biosensor microcantilever

Con el avance de la tecnología de miniaturización, los equipos de diagnóstico molecular son cada vez más pequeños. La gente está cada vez más interesada en el campo de la investigación de biosensores en plataformas miniaturizadas. La miniaturización es esencial para la monitorización fisiológica *in vivo*, las matrices de sensores multiespecíficos, la portabilidad de los sensores y la minimización del volumen de muestra. Los biosensores tradicionales requieren una gran cantidad de embalaje, interfaces electrónicas complejas y un mantenimiento regular. Estas deficiencias se pueden reducir mediante el uso de dispositivos MEMS que integran estructuras electrónicas y micromecánicas en el chip. Los cantilevers (también conocidos como voladizos) se han utilizado en pruebas físicas, químicas y biológicas. También tienen una amplia gama de aplicaciones en el campo médico, especialmente en la detección de enfermedades asintomáticas, la detección de mutaciones puntuales, el control de la glucosa en sangre y la detección de agentes de guerra química y biológica (Véase Figura 2.2) [16].

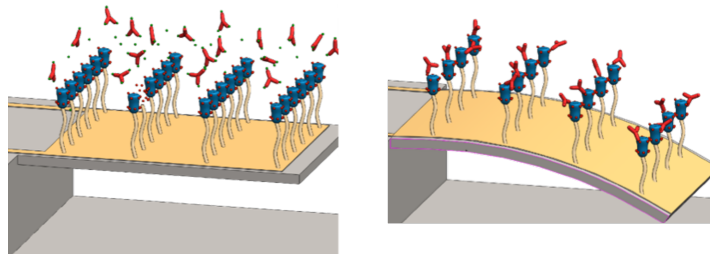


Figura 2.2: Imagen representativa de un cantilever funcionalizado. La parte receptora está conformada por los elementos azules y dorados, y el rojo es el analito (autoría propia).

Estos sensores tienen muchas ventajas sobre las técnicas de análisis tradicionales en términos de alta sensibilidad, bajos requisitos de analitos, procedimientos no peligrosos y respuesta rápida. Además, en los últimos años se han desarrollado tecnologías para la fabricación y uso de nanocantilevers para aplicaciones de detección, dando como resultado sistemas nanoelectromecánicos (NEMS). Este desarrollo eleva el límite de sensibilidad hasta el punto en que los investigadores ahora pueden visualizar los recuentos moleculares, con capacidades de análisis de analitos de alto rendimiento y detección ultrasensible, esta tecnología brinda una gran esperanza a la próxima generación de sensores miniaturizados y altamente sensibles. Cabe destacar que gran parte de su funcionalidad está íntimamente desarrollado con el método de transducción a utilizar [17].

Transductores ópticos

Los transductores ópticos permiten la determinación cuantitativa de una o más de las características fundamentales de la radiación óptica como amplitud, fase, frecuencia y polarización. Debido a que no existe una distinción clara entre aplicaciones analíticas y biosensibles, es muy común observar que las técnicas ópticas se denominan como “sondas”. Para aplicaciones de biodetección, un cambio de la actividad, la concentración o la distribución espacial de una estructura bioquímica o biológica tiene que resultar en un cambio de una de las cantidades fundamentales antes mencionadas. Cabe señalar que el término sonda se utiliza en un sentido muy general, el uso de una sonda de este tipo puede significar que la capa biosensora de interés debe prepararse sobre la superficie de la estructura del transductor óptico utilizada como sonda.

El rendimiento de las sondas directas para determinar las concentraciones en la superficie de un transductor depende de la cobertura de la superficie del receptor en la interfaz biosensora. Normalmente, tales capas biológicas están por debajo de la cobertura de la monocapa. Por tanto, los esquemas de transducción óptica basados en la absorción no proporcionan suficiente sensibilidad a comparación con aquellos basados en la adsorción. Las sondas que se basan en cambios en la propagación de la luz guiada son más prometedoras. Los efectos involucrados incluyen cambios de fase, efectos de acoplamiento entre estructuras de guía de ondas, resonancia de plasmón de superficie, acopladores de rejilla, interferometría de doble haz y de modo de latido. Además, se pueden aplicar técnicas reflectométricas como la elipsometría, que exhibe una alta sensibilidad haciendo uso de luz de estado de polarización variable, o técnicas más simples como interferencia de reflexión múltiple (interferencia de luz blanca) en películas delgadas. Dado que no existen posibilidades de detectar el estado de fase o polarización directamente, para todos estos métodos la lectura se basa en una modulación de intensidad local o espacial [18].

2.1.5 Esfuerzos Superficiales

Todas las superficies de los materiales están conformadas por energía y esfuerzos superficiales. La diferencia entre éstas propiedades es importante; la energía superficial, es un valor escalar que equivale al trabajo mínimo por unidad de área para realizar un corte en un sólido, mientras que el esfuerzo superficial, es un tensor que describe la fuerza en el plano por unidad de longitud requerida para estirar la superficie [19].

El esfuerzo superficial tiene un gran efecto sobre las propiedades mecánicas y físicas de materiales y dispositivos, especialmente nanomateriales y nanodispositivos. Dado que las configuraciones de enlace de los átomos en las superficies se vuelven diferentes cuando los materiales adsorbidos están situados en las superficies, el esfuerzo superficial puede alterarse por la presencia de adsorbatos. Este mecanismo constituye la base para las detecciones químicas, físicas y biológicas mediante biosensores basados en cantilever de nano y micro escala [20].

Los métodos más comunes para medir el cambio de tensión superficial inducido por la adsorción se basan en la deflexión estática y el cambio de frecuencia de resonancia de la vibración de los sensores de microcantilever. Generalmente, la deflexión de los cantilevers se ve impulsada por un eigenesfuerzo y el cambio de la tensión superficial, mientras que el cambio de frecuencia de vibración es afectado por la carga de masa y la elasticidad de la superficie. El cambio de tensión superficial puede surgir de diversos mecanismos de interacción de los adsorbatos, incluida la interacción electrostática, las fuerzas de Van der Waals, la interacción dipolo-dipolo y los enlaces de

hidrógeno, cambios en la distribución de carga de los átomos de la superficie, entre otros. Por lo que se puede concluir que la tensión superficial inducida por la adsorción da como resultado la deflexión y el cambio de frecuencia de resonancia de los microcantilevers [21].

Ecuación de Stoney

El esfuerzo superficial se genera en el sitio en el que las moléculas de la capa funcionalizada se unen a la superficie del cantilever. Debido a que la fuerza dentro de la capa funcional intenta mantener constante la distancia entre las moléculas, el cantilever responde con una curvatura debido a su flexibilidad [22]. El cambio de estrés superficial resultante se calcula de acuerdo con la fórmula de Stoney como:

$$\Delta\sigma = \frac{Et^2}{4R(1-\nu)} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde, $\Delta\sigma$ es el estrés superficial, E es el módulo de elasticidad del material que esté hecho el cantilever, t es el espesor de este, R es el radio de curvatura del cantilever y ν es el coeficiente de Poisson.

La deflexión mecánica de un cantilever rectangular simple debido a cargas distribuidas y puntuales se puede calcular como:

Para carga distribuida (Ec. 2):

$$\delta = \frac{qL^2}{[8EI]} \quad (\text{Ec. 2})$$

Para carga puntual (Ec. 3):

$$\delta = \frac{pL^3}{[3EI]} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde, δ es la deflexión, I es el momento de inercia, q y p son cargas distribuidas y puntuales, respectivamente.

Este modo de funcionamiento estático se puede realizar en varios ambientes. El modo de funcionamiento estático es ideal en aplicaciones de base líquida, sin embargo, generalmente requiere capa de detección bastante específica, basada en reconocimientos moleculares, tales como hibridación de ADN o reconocimientos de antígeno-anticuerpo como es el caso de la albúmina de suero bovino [22].

Análisis de Tamayo *et al.*

Tamayo *et al.* consideraron un voladizo con una longitud L , un ancho b y un espesor h , sometido a una carga de tensión superficial uniforme e independiente de la deformación σ en la cara superior. El modelo de Stoney predice que el voladizo se dobla con una curvatura uniforme (κ) en proporción a la tensión superficial siguiente.

$$\kappa = \frac{h - h_n}{D(1 + \nu)}\sigma \quad (2.1)$$

Donde ν es el coeficiente de Poisson, para un voladizo de un solo material, es la distancia entre el eje neutro y la superficie inferior $\frac{h}{2}$, D es la rigidez a la flexión biaxial por unidad de ancho, dada por $\frac{Eh}{12(1-\nu)^2}$, donde E es el módulo de Young. Suponiendo que la viga es isotrópica y uniforme, el espesor de la viga es pequeño en comparación con la dimensión lateral, y la deformación y rotación

son pequeñas. Esto es muy adecuado para los microcantilevers usados más comúnmente, cuya longitud, ancho y grosor están normalmente en el rango de 100-500 μm , 10-100 μm y 0,1-1 μm , respectivamente. Sin embargo, la ecuación de Stoney es estrictamente válida solo para placas que no están sujetas a lo largo de los bordes. El microcantilever está rígidamente conectado al sustrato del chip, por lo que presenta un desplazamiento cero en su extremo de empotramiento, por lo que parecería es incompatible con la curvatura uniforme predicha por Stoney [33].

Por lo que a fin de estimar la magnitud de la deflexión del plano medio, a lo largo del plano de simetría longitudinal de los microcantilevers ($\bar{w}(\bar{x})$), Tamayo et al. Propusieron el siguiente modelo:

$$\bar{w}(\bar{x}) = \frac{1}{2} \kappa_{St} \left(\frac{b}{\alpha}\right)^2 [\bar{x}^2 + 2v(e^{-\bar{x}} + \bar{x} - 1)] \quad (2.2)$$

En él, $x = \alpha \frac{\bar{x}}{b}$. Donde x es la posición de un punto de interés a lo largo de la longitud del microcantilever ($0 < x < L$), b es el ancho del microcantilever y α es una relación numérica cuyo valor se determina en términos del coeficiente de Poisson (v), $\alpha(v) \cong 2.2803 + 1.0056v - 0.1762v^2$. Asimismo, en la ecuación 2.1, κ_{St} hace referencia a la curvatura del microcantilever determinada mediante el modelo de Stoney:

$$\kappa_{St} = \frac{6(1-v)}{Eh^2} \Delta\sigma_s \quad (2.3)$$

donde E es el módulo elástico, h es el espesor del microcantilever y $\Delta\sigma_s$ es la diferencia de esfuerzos superficiales que actúa sobre él. A partir de la segunda derivada de la deflexión del microcantilever, Tamayo et al. obtuvieron los modelos analíticos para estimar la curvatura promedio, longitudinal ($\bar{k}_x(\bar{x})$) y transversal ($\bar{k}_y(\bar{x})$), del plano medio del microcantilever a lo largo de su plano de simetría longitudinal:

$$\bar{k}_x(\bar{x}) = \kappa_{St}(1 + ve^{-\bar{x}} = \kappa_{St}(1 + ve^{-\alpha \frac{\bar{x}}{b}}) \quad (2.4)$$

$$\bar{k}_y(\bar{x}) = \kappa_{St}(1 + ve^{-\bar{x}} = \kappa_{St}(1 - e^{-\alpha \frac{\bar{x}}{b}}) \quad (2.5)$$

Ambas expresiones permiten estimar de manera certera la curvatura longitudinal y la parábola transversal del microcantilever próximo de la región de empotramiento, pudiéndose llevar a cabo una comparación bidimensional del comportamiento mecánico del microcantilever. A diferencia de la convexidad estimada por Stoney, las expresiones 2.4 y 2.5 consideran la limitación de movimiento impuesta por el empotramiento y predicen que las curvaturas aumenten o disminuyan de modo exponencial a lo largo del plano de simetría longitudinal del microcantilever a una índice particular linealmente proporcional a su ancho, α/b .

Comparación entre análisis de Stoney y Tamayo *et al.*

Se realizó un análisis de los microcantilevers comerciales en el que el coeficiente de Poisson es de 0.24 y con módulo elástico de 168 gigapascales, sujetos a un esfuerzo superficial de tipo compresivo en el rango de $1 \text{ mN/m} < \Delta\sigma_s < -200 \text{ mN/m}$. Este tipo y rango de esfuerzo superficial abarca la gran variedad de esfuerzos superficiales reportados en la literatura, debido a la captura de diferentes tipos de moléculas (proteínas, pesticidas, cadenas de ADN y ARN, anticuerpos, entre otras moléculas). En la tabla 2.1 se muestran los valores de deflexión máxima del plano medio de los microcantilevers al ser sometidos a los valores extremos de $\Delta\sigma_s$ [34].

De acuerdo con estos resultados, el modelo de Stoney subestima la deflexión de los microcantilevers entre un $\sim 2\%$ y $\sim 3\%$. Diferencia que puede ser considerada insignificante.

Tabla 2.1: Deflexiones máximas del plano medio del microcantilever de los dos grupos de estudio considerados. Se muestran las deflexiones obtenidas para los valores extremos del intervalo de $\Delta\sigma_s$ considerado.

$\Delta\sigma_s$	b= 90 μm, h=1 μm			
	L= 500 μm		L= 750 μm	
	-1 mN/m	-200 mN/m	-1 mN/m	-200 mN/m
$\bar{w}(x = L)$ Tamayo	-3.5 nm	-700.24 nm	-7.8 nm	-1.56 μm
$w_{St}(x = L)$ Stoney	-3.4 nm	-678.57 nm	-7.63 nm	-1.53 μm

2.1.6 Interferometría

Interferencia óptica

La interferencia óptica es cuando dos haces se combinan por superposición en un punto del espacio, lo que afecta la distribución de intensidad resultante. La coherencia de dos haces indica qué punto se encuentran en fase sus ondas. Si la relación de fase cambia rápida y aleatoriamente, el haz de luz es incoherente. Si dos trenes de ondas son coherentes y el valor máximo de una onda coincide con el valor máximo de la otra onda, las dos ondas se combinan en este punto para producir mayor intensidad. Si son coherentes, y el valor máximo de una onda coincide con el valor mínimo de la otra, las dos ondas se anularán parcial o completamente, y la intensidad va a disminuir [23].

Fibras ópticas

La mayoría de los interferómetros en óptica tradicional tienen sus equivalentes en fibras ópticas. En estos interferómetros, la luz es guiada por fibras ópticas y la placa de separación se reemplaza por acopladores direccionales de fibra óptica. En algunos casos, el espejo se puede reemplazar con un extremo de fibra adecuadamente procesado.

En los últimos años, los interferómetros de fibra óptica se han convertido en la base de una nueva generación de sensores ópticos. Actualmente, las aplicaciones más desarrolladas son las relacionadas con hidrófonos y giroscopios, pero se han investigado y desarrollado ampliamente otros tipos de sensores. Los sensores interferométricos de fibra óptica se basan en la medición de parámetros físicos, a través de los cuales se genera la modulación de fase en la señal óptica. Podemos dividir este tipo de sensores en dos grupos:

- **Sensores intrínsecos:** Un sensor intrínseco es un interferómetro de fibra óptica en el que la acción de una magnitud produce una modulación en la fase de la onda guiada. En un sensor directo esta modulación está producida por la acción directa sobre la fibra de una magnitud. En un sensor indirecto, la magnitud a medir actúa sobre un elemento auxiliar que es el que, al interactuar sobre la fibra, produce la modulación de fase.

- **Sensor extrínseco:** En el sensor externo, el haz de luz atraviesa el área de medición a través de caninos no guiados. De esta forma, la zona sensible se sitúa fuera de la fibra, por lo que la modulación de fase provocada por la amplitud a medir se produce en el haz no guiado. En este tipo de sensor, la fibra óptica solo se utiliza como guía de ondas que conecta la fuente, el detector y el área de medición. Estos dispositivos pueden utilizar sistemas ópticos distintos de las fibras ópticas, es decir, pueden ser un dispositivo híbrido con una parte de fibra óptica y la otra parte de fibra óptica tradicional. Esto puede simplificar el diseño de componentes ópticos, aumentar la versatilidad del dispositivo y entrar en otros entornos inaccesibles. Un ejemplo de este tipo de sensor es un dispositivo que utiliza un interferómetro confocal de Fabry-Pérot como elemento sensor y una fibra óptica para guiar la luz.

Interferómetro Fabry-Pérot

El interferómetro de Fabry-Pérot apareció por primera vez en 1899 y es un dispositivo que genera interferencias a través de la división de la amplitud. Consiste en una cavidad llena de aire u otros medios, limitada por dos superficies altamente reflectantes, que permiten el paso de una cierta cantidad de luz. La interferencia es causada por la diferencia de trayectoria óptica entre el haz transmitido y el haz reflejado doble en ambos lados de la cavidad del interferómetro, es decir, un interferómetro es un instrumento que utiliza la interferencia de ondas de luz para medir parámetros como el grosor, el desplazamiento, el índice de refracción, la concentración química y la rugosidad con alta precisión. Este tipo de instrumento de medición se ha implementado a escala microscópica, utilizando ópticas integradas, para una variedad de aplicaciones, incluidos sensores y realización de mediciones. Consiste en un dispositivo óptico en el que dos haces viajan a lo largo de dos trayectorias diferentes y luego interfieren; una de estas trayectorias es la referencia y la otra es la muestra o camino por medir [24].

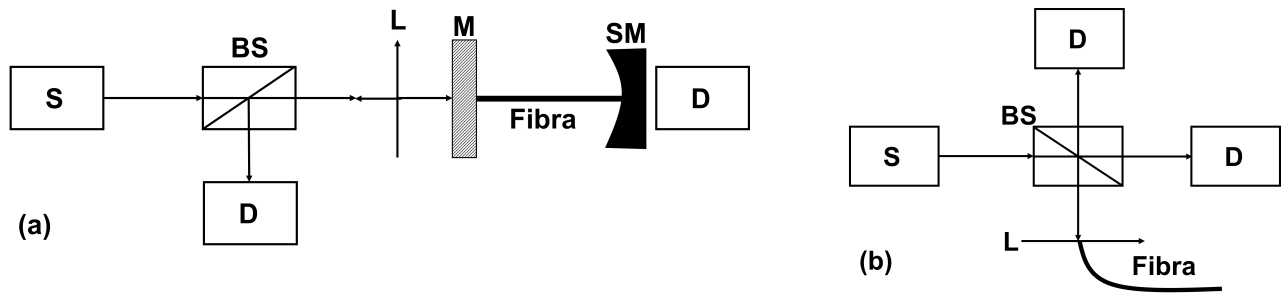


Figura 2.3: Esquema de Interferómetro Fabry-Pérot: a) en transmisión, b) en reflexión. S: fuente de luz; BS: divisor del haz; L: lente convergente; M: espejo plano; SM: espejo esférico; O: detector [24].

2.1.7 Detección de pesticidas con albúmina de suero bovino (BSA)

Las albúminas séricas son las proteínas de la fracción total soluble en agua más abundantes (52-62%) en el plasma sanguíneo. Generalmente, tienen una sola cadena polipeptídica compuesta

aproximadamente por 585 residuos de aminoácidos. Las funciones circulatorias, nutricionales y fisiológicas de las albúminas séricas las convierten en biomacromoléculas esenciales que actúan como transportadores para llevar, distribuir y entregar diferentes sustancias exógenas o endógenas, iones, ácidos grasos, moléculas pequeñas como los productos farmacéuticos en el cuerpo. Las albúminas séricas más usadas en diferentes casos son la albúmina sérica humana (HSA por sus siglas en inglés) y la bovina (BSA por sus siglas en inglés) [25].

La BSA se compone de una sola cadena polipeptídica que incluye 583 residuos de aminoácidos. Los 17 puentes disulfuro reticulados de residuos de aminoácidos de cisteína (Cys) estabilizan la estructura. Su peso molecular es de aproximadamente 66,8 kDa, y la estructura en forma de corazón tiene tres dominios homólogos I-III y cada dominio consta de dos subdominios, A y B, con propiedades de unión únicas. En el subdominio IB y el subdominio IIA, BSA contiene dos residuos de aminoácidos triptófano (Trp) como Trp-134 y Trp-212, respectivamente [25].

Las interacciones de las proteínas plasmáticas y los pesticidas tienen una importancia toxicológica, porque controlan el grado y el tiempo de acción de los pesticidas en el organismo, es importante recalcar que esto se debe principalmente por el enlace covalente que se genera entre la albúmina y el pesticida, por lo que los pesticidas unidos a la albúmina pueden ser usados como conjugados con el objetivo de permitir una biodetección con alta sensibilidad y selectividad [26].

Metodología

En esta sección se proporcionará las características de los cantilevers utilizados así como el procedimiento que se realizó para la funcionalización e inmovilización de la proteína BSA en ellos, dividiendo este proceso en cuatro secciones principales: diseño de celda de inmovilización, limpieza, funcionalización e inmovilización. Además, igual se describirán los procesos realizados para caracterizar los cantilevers funcionalizados y sus correspondientes mediciones de deflexión.

3.1 Cantilevers

En este trabajo se utilizaron cantilevers comerciales de modo estático recubiertos con una capa de 2 nm de titanio y encima de ésta una capa de 20 nm de oro, que vienen embebidos en un chip de $3\text{ mm} \times 2.5\text{ mm}$ en un arreglo de 8, posicionados paralelamente entre sí (Véase Figura 3.1) con espesor de 1 micrómetro y una longitud de 500 y 750 micrómetros, por cuya constante de elasticidad es de 23 mN/m y 7 mN/m respectivamente, tienen un coeficiente de Poisson de 0.24, un módulo de Young de 129 GPa en el plano $[1\ 0\ 0]$ y de 168 GPa en el plano $[1\ 1\ 0]$.

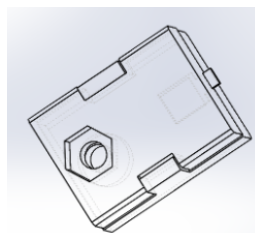


Figura 3.1: Imagen de microscopía del arreglo de los cantilevers en el chip.

3.2 Diseño de celda de inmovilización

Debido a la fragilidad de los cantilevers, fue necesario tener una celda que pudiese ser utilizada tanto para la inmovilización como para la funcionalización. Empleando el software SolidWorks y las técnicas de impresión 3D por estereolitografía se diseñó la celda considerando: un soporte para manipular con más confianza y rapidez el chip con los cantilevers y una celda de inmovilización en la que pudiesen estar los cantilevers inmersos en distintas soluciones.

Para el soporte se diseñó un conjunto de dos piezas unidas (Véase Figura 3.2) mediante un tornillo para ejercer presión al chip y éste quede inmóvil.



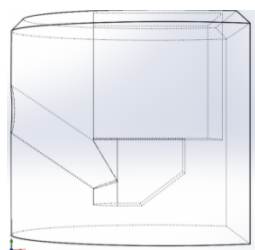
(a) Esquema del soporte 1cmx1.5cmx2cm para el chip.



(b) Soporte para chip impreso en teflón.

Figura 3.2: Esquema de soporte junto a su versión impresa (autoría propia).

Para la celda de inmovilización era importante mantener inmerso los cantilevers en distintas disoluciones, de igual manera era importante recuperarlas en su totalidad para evitar contaminación cruzada, en este diseño como se puede observar en la figura 3.3a, se consideró una entrada para la punta de la micropipeta hacia una piscina interna con un volumen de 100 microlitros, en la parte superior se empuja el chip con su soporte, de tal forma que los cantilevers queden inmersos en la solución y permitan ser inmovilizados dentro de la celda, tal como se ve en la figura 3.4.

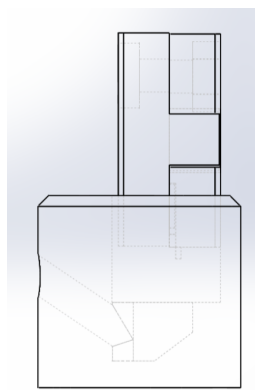


(a) Esquema de la celda de inmovilización, en donde las líneas punteadas indican cortes por la parte interior.



(b) Celda de Inmovilización impresa en teflón.

Figura 3.3: Esquema celda de inmovilización junto a su versión impresa (autoría propia).



(a) Esquema de la celda de inmovilización con el soporte empotrado (b) Celda de Inmovilización impresa con el soporte empotrado.

Figura 3.4: Esquema celda de inmovilización junto a su versión impresa (autoría propia).

3.3 Limpieza

La limpieza para los cantilevers se llevó a cabo en la celda de inmovilización previamente descrita, mediante un reflujó con pipeta, primero con agua bidestilada, posteriormente con etanol absoluto para dejarlo secar a la intemperie. Una vez secos, los cantilevers se exponen a radiación en un ozonificador UV/ozono y finalmente se enjuagan con etanol.



Figura 3.5: Portasensores en el ozonificador (autoría propia).

3.4 Funcionalización

Para la funcionalización de los cantilevers, se mantienen sumergidos los cantilevers con agitación constante (30 rpm) durante 18 horas en una solución de 11-Mercapto-1-Undecanol (MUOH) y Ácido 16-Mercaptohexadecanoico (MHDA) con una relación molar de 0.0103:0.0107 respectivamente y diluidos en etanol.



Figura 3.6: Celdas de inmovilización en el agitador a 25rpm (autoría propia).

3.5 Inmovilización

3.5.1 Activación de grupos carboxilo

Se agregó la solución activadora EDC-NHS con una relación molar de 0.005:0.2, repetir 2 veces, dejando los sensores en agitación suave (25 rpm) durante 3.5 horas. Posteriormente se enjuagó con etanol, para después dejar secar a temperatura ambiente por 10 minutos.

3.5.2 Unión covalente de la proteína a la mSAM

Se hizo limpieza a los sensores con tampón fosfato de sodio (PBS), 0.1 M, pH 7.5. Posteriormente se agregó la cantidad de BSA deseada a inmovilizar, en cada chip se agregó de forma separada las siguientes concentraciones 100 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$.

Se dejó en agitación suave (25 rpm) durante 2.5 horas a temperatura ambiente.

3.5.3 Bloqueo de los grupos carboxilo activados y no reaccionados

Se enjuagaron los sensores tampón fosfato de sodio (PBS), 0.1 M, pH 7.5, después se enjuagó con tampón borato de sodio (BBS), 0.1 M, pH 8.75.

Se agregó a cada sensor una solución de etanolamina con tampón borato de sodio (BBS) con relación en volumen de 3:4.7 respectivamente y se dejó los sensores en agitación suave (25 rpm) durante 1 hora a temperatura ambiente.

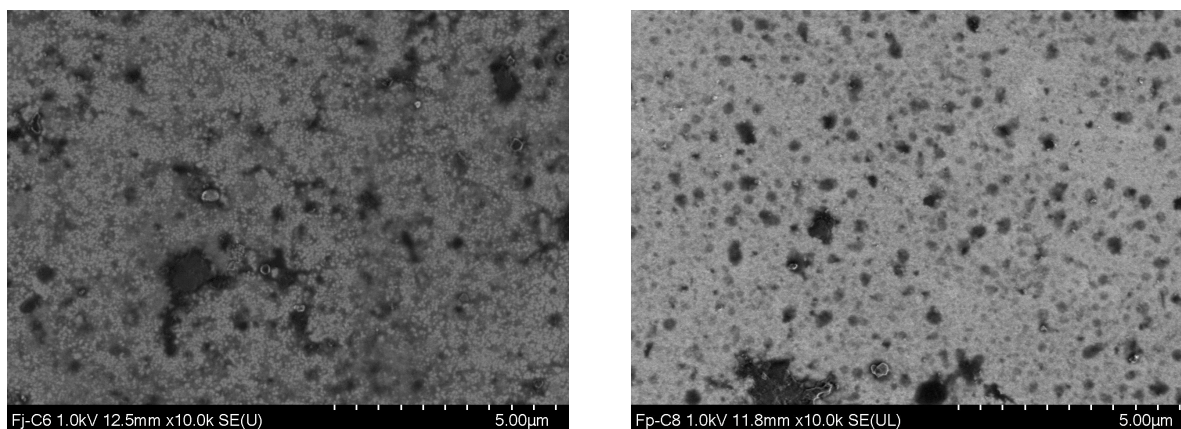


Figura 3.7: Celdas de inmovilización etiquetadas con la concentración de BSA inmovilizada

Se enjuagó tampón de borato de sodio (BBS), 0.1 M, pH 8.75, después con agua bidestilada (sin reflujo), dejando secar a temperatura ambiente y finalmente se almacenaron los sensores a 4°C.

3.6 Caracterización mediante Microscopía de Barrido Electrónico.

La microscopía de barrido electrónico (SEM) es una técnica de obtención de imágenes ampliamente utilizada en investigación de materiales debido a su alta resolución y capacidades de analizar características morfológicas, estructurales y químicas de las muestras bajo estudio [35]. Dicho lo anterior, se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido, marca Hitachi Modelo SU8230 de emisión de campo de cátodo frío, obteniendo así las siguientes imágenes:



(a) Imagen SEM cantilever inmovilizado a 25 $\mu\text{g/ml}$ (b) Imagen SEM cantilever inmovilizado a 100 $\mu\text{g/ml}$

Figura 3.8: Imágenes SEM de cantilevers inmovilizados a distintas concentraciones de BSA.

3.6.1 Análisis EDS

La espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS, también abreviada como EDX o XEDS) es una técnica analítica que puede realizar caracterización química y análisis elemental de materiales. Una muestra excitada por una fuente de energía (como un haz de electrones de un microscopio electrónico) disipa parte de la energía absorbida expulsando electrones del núcleo. Un electrón de capa de mayor energía continúa ocupando su lugar, liberando diferencias de energía en forma de rayos X que tienen un espectro característico basado en el átomo de origen. Esto permite el análisis de componentes de un volumen de muestra específico excitado por la fuente de energía. La posición del pico en el espectro identifica al elemento y la intensidad de la señal corresponde a la concentración del elemento [38]. Por lo que es de vital importancia en ésta investigación ya que asegura que las imágenes SEM analizadas de manera cualitativa, concluyan que el procedimiento de inmovilización fue exitoso, se utilizó un EDS marca Bruker modelo X Flash 6/60 acoplado a un Microscopio Electrónico de Barrido Marca Hitachi Modelo SU8230 de emisión de campo de cátodo frío con las siguientes condiciones: voltaje de aceleración 20 kV y WD(Working Distance) de 15 mm.

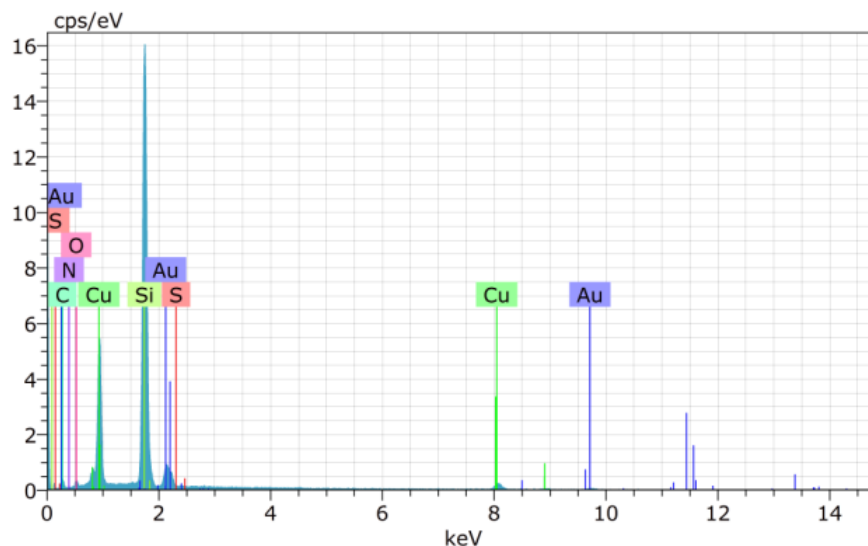


Figura 3.9: Gráfica de espectroscopia por EDS de los microcantilevers funcionalizados con BSA.

Como se puede apreciar en la figura 3.9 los distintos elementos encontrados en la muestra son Si, Cu, Au, S, N, O y C, los elementos que conforman parte de la BSA es el C, O, N y el S ya que son los elementos que se encuentran presentes en la proteína [39], los elementos Si y Au forman parte de la composición del cantilever como se mencionó con anterioridad y el Cu es debido a que las muestras se situaron en un portamuestras de dicho elemento.

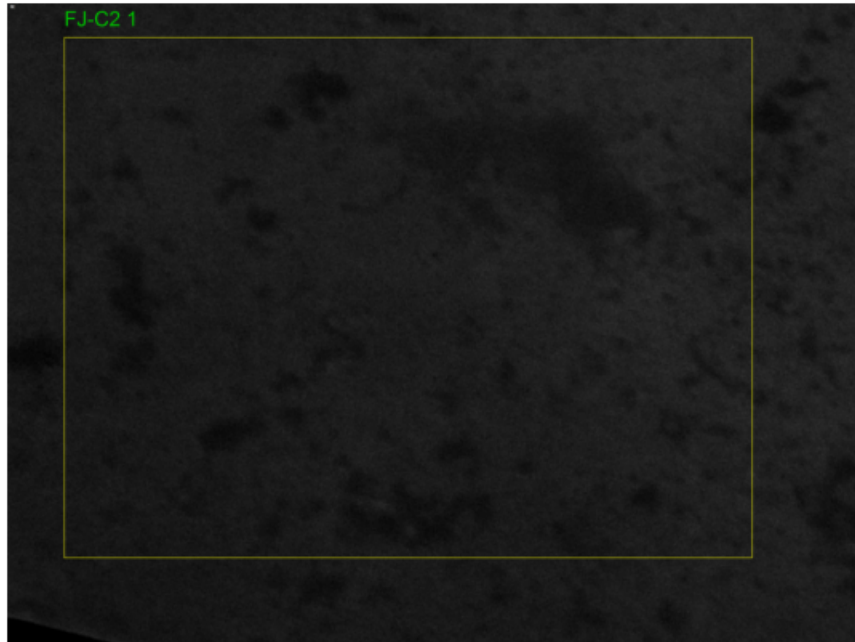


Figura 3.10: Imagen SEM cantilever inmobilizado a $25 \mu\text{g/ml}$, el recuadro amarillo indica la sección en la que se hizo el análisis EDS (autoría propia).

3.7 Diseño celda de inmunoensayo

La celda de inmunoensayo es fundamental para realizar de manera controlada, la ejecución de las rutinas de inmunoensayo; y evaluar los desplazamientos mecánicos de los cantilevers ante la presencia de las moléculas a detectar. En este caso, el diseño de la celda de inmunoensayo debe satisfacer ciertas consideraciones:

- Debido a que el método de detección es óptico, y se emplea una fibra óptica para este propósito, debe permitir el acceso de la fibra óptica para posicionarse encima de los cantilevers durante los experimentos de detección.
- Incluir un acceso de entrada para la solución de interés a detectar y las soluciones asociadas a las limpiezas durante las rutinas de medición (solución anti-BSA)
- Considerar un acceso de salida para las soluciones
- Garantizar la estanqueidad de las soluciones en todo momento.
- Soportes en la base de la celda, que permitan fijarse al interferómetro para evitar movimientos indeseados durante las rutinas de mediciones.

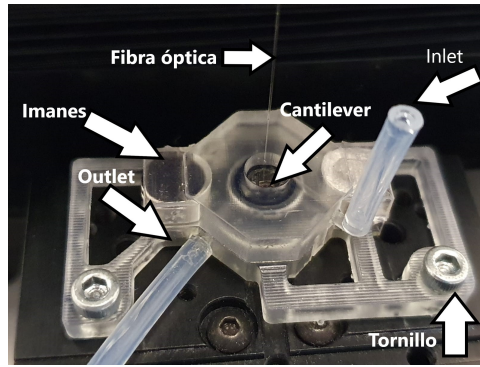


Figura 3.11: Celda de inmunoensayo en el interferómetro Fabry-Pérot (autoría propia).

Todos estos requisitos fueron analizados y empleando el software SolidWorks y las técnicas de impresión 3D por estereolitografía, se diseñó y desarrolló la celda de inmunoensayo presentada en la figura 3.11. Esta celda consiste en 2 partes, la parte superior dispone de un orificio de 6mm de diámetro y en sus extremos cuenta con imanes. Mientras que la parte inferior se constituye de un orificio de 6mm de diámetro con su correspondiente empaque (o-ring), como se aprecia en la figura 3.12, tiene en su periferia un sistema de acople con tornillos para asegurar el empotramiento hacia la base del interferómetro, y también dispone de un par de imanes en sus extremos. Los imanes se emplean para garantizar el sellado y la estanqueidad del líquido en la celda de inmunoensayo, es decir, se encargan de la sujeción entre las dos partes de la celda. Para facilitar el ingreso de las soluciones se consideran secciones de manguera en la entrada y salida de la celda. Otro aspecto importante que destacar es que, durante las rutinas de medición, estas mangueras permiten el ingreso y extracción de líquidos de manera simultánea, considerando el uso de micropipetas y jeringas.

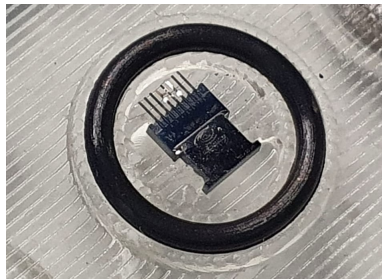


Figura 3.12: Pieza inferior de la celda de inmunoensayo con el chip de los cantilevers (autoría propia).

3.8 Detección de la deflexión en los cantilevers

En cada medición los cantilevers fueron sumergidos en soluciones con distintas concentraciones de Anti-BSA (que es la molécula a detectar), $37.5 \mu\text{g/ml}$, $75 \mu\text{g/ml}$ y $300 \mu\text{g/ml}$ respectivamente; las concentraciones seleccionadas fueron producto de una estandarización previamente utilizada en el

proyecto Kanan para la detección de Covid-19 [40]; se sumergían mediante la inyección de las soluciones por el tubo "inlet" mostrado en la figura 3.11 y posteriormente se vaciaba por el tubo outlet, es necesario aclarar que en cada cambio de solución hubo una limpieza de los cantilevers mediante la inyección de ácido clorhídrico a 0.1M y solución PBS.

Para detectar la deflexión mecánica en los cantilevers se utilizó un interferómetro Fabry-Pérot en el que se emplearon fibras ópticas monomodo que se utilizan para comunicaciones, que como su nombre lo indica, permite un solo modo de propagación cuando la longitud de onda de la luz es mayor a 1280 nm. En estas pruebas se utilizó un láser sintonizable en el rango de 1510 a 1590 nm como fuente de luz. Lo que asegura que solo se propague el modo fundamental y que la interferencia óptica se deba exclusivamente a la diferencia de camino óptico entre el haz que se refleja en la punta de la fibra óptica y el haz que sale de la fibra óptica, que viaja primero a lo largo del gap de aire que existe entre la fibra óptica y el cantilever, y que al reflejarse en la superficie de oro vuelve a acoplarse en el núcleo de la fibra óptica. El núcleo de la fibra óptica tiene un diámetro de $8.2 \mu\text{m}$. Debido a estas dimensiones, cuando la luz sale de la fibra óptica el haz diverge, es decir, el cono de luz aumenta considerablemente a una distancia relativamente corta, de unas cuantas centenas de micrómetros.



Figura 3.13: Arreglo del Interferómetro Fabry-Pérot donde la fibra óptica se encuentra sobre el cantilever inmerso en una solución (autoría propia).

Para realizar las mediciones, se requirió hacer una curva de referencia ;es importante aclarar que no fue una calibración debido a que usamos nuestro propio sistema para relacionar la longitud de onda reflectada respecto a la distancia entre el cantilever y la fibra óptica, además de que los equipos son previamente calibrados con el uso de espejos para normalizar la medición del láser. Para obtener la curva de referencia, la fibra óptica es colocada a una distancia inicial aproximada

de 40 micrómetros, respecto a la superficie del cantilever; posteriormente, la fibra óptica se aleja del cantilever de manera controlada en rangos de 100 nanómetros. Concluido el procedimiento, se realiza la primera medición de interés. La curva de referencia es necesaria también para evitar que las mediciones en diversas condiciones del ambiente como temperatura, vibraciones, humedad, entre otros, impacten en los resultados obtenidos.

Resultados y Discusión

4.1 Resultados

A continuación se presentarán los resultados obtenidos a partir del interferómetro Fabry-Pérot.

Se fue variando la distancia de la fibra óptica respecto a los cantilevers por 100 nm hasta llegar a 1 micrómetro, obteniendo así la curva de referencia como se muestra en la figura 4.1, gracias a ello mediante el software OriginLab 2022, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\Delta\lambda = -56.40091 \cdot X + 0.57364 \quad (4.1)$$

En donde $\Delta\lambda$ representa la longitud de onda (nm) y $X(\mu m)$ representa la posición de los cantilevers respecto a la fibra óptica.

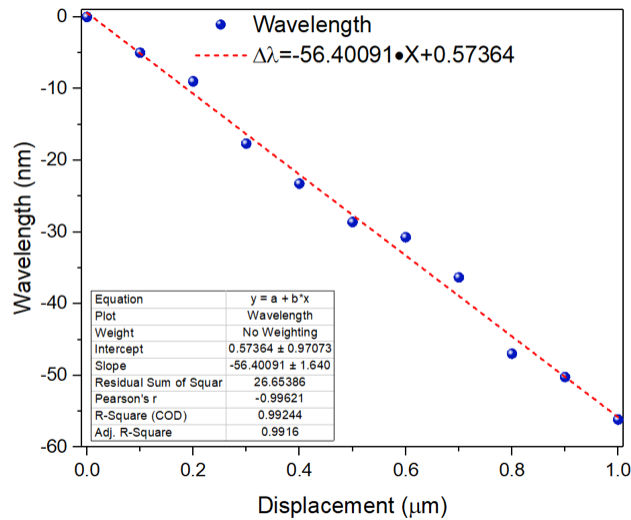


Figura 4.1: Curva de referencia con solución PBS.

En el primer experimento se utilizó un cantilever de 500 micras inmovilizado a $25 \mu\text{g/ml}$ de BSA inmerso en una solución de PBST y Anti-BSA a una concentración de saturación de $75 \mu\text{g/ml}$ y el cambio de la longitud de onda ($\Delta\lambda$) se ve representada en la gráfica de la figura 4.2.

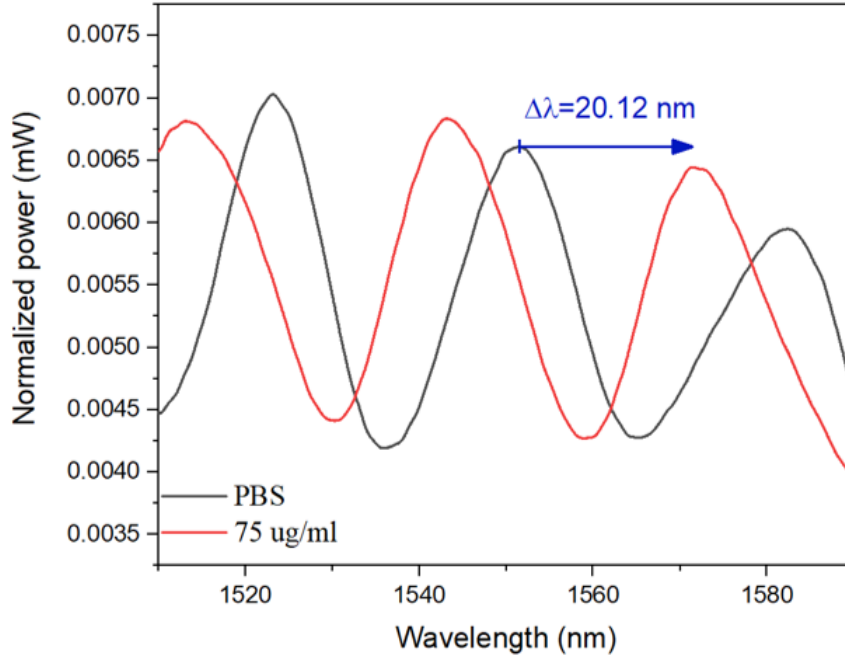


Figura 4.2: Gráfica de respuesta de la longitud de onda durante el proceso de detección.

Entonces, utilizando la ecuación 4.1 queda la siguiente expresión:

$$20.12 = -56.40091 \cdot X + 0.57364 \quad (4.2)$$

Por lo que es necesario despejar X.

$$X = \frac{(20.12 \text{ nm} - 0.57364 \text{ nm})}{-56.40091 \text{ nm}/\mu\text{m}} = -0.3465 \mu\text{m} \quad (4.3)$$

Obteniendo así un desplazamiento máximo de acuerdo con la curva de referencia de 346 nm.

En el segundo experimento se utilizó un cantilever de 500 micras inmovilizado a $12.5 \mu\text{g/ml}$ de BSA inmerso en una solución de PBST y Anti-BSA a una concentración de saturación de $37.5 \mu\text{g/ml}$ y el cambio de la longitud de onda ($\Delta\lambda$) se ve representada en la gráfica de la figura 4.3.

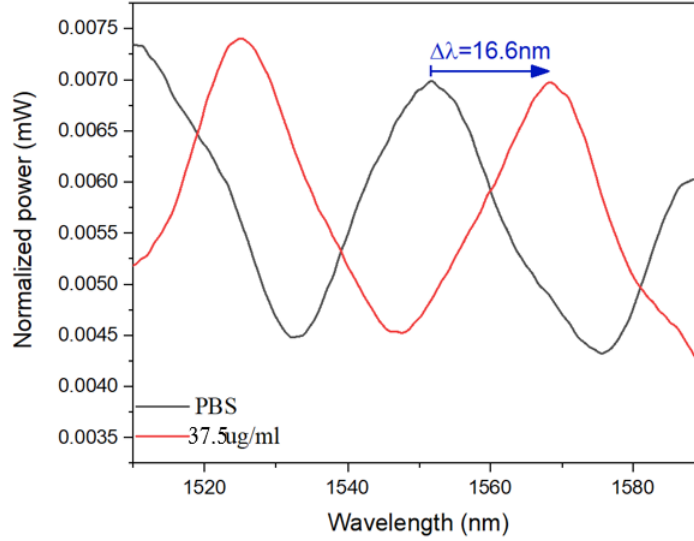


Figura 4.3: Gráfica de Longitud de onda a lo largo del tiempo.

Entonces, utilizando la ecuación 4.1 queda la siguiente expresión:

$$16.6 = -56.40091 \cdot X + 0.57364 \quad (4.4)$$

Por lo que es necesario despejar X.

$$X = \frac{(16.6 \text{ nm} - 0.57364 \text{ nm})}{-56.40091 \text{ nm}/\mu\text{m}} = -0.2841 \mu\text{m} \quad (4.5)$$

Obteniendo así un desplazamiento máximo de acuerdo a la curva de referencia de 284 nm.

En el tercer experimento se utilizó un cantilever de 500 micras inmovilizado a $100 \mu\text{g/ml}$ de BSA inmerso en una solución de PBST y Anti-BSA a una concentración de saturación de $300 \mu\text{g/ml}$ y el cambio de la longitud de onda ($\Delta\lambda$) se ve representada en la gráfica de la figura 4.4.

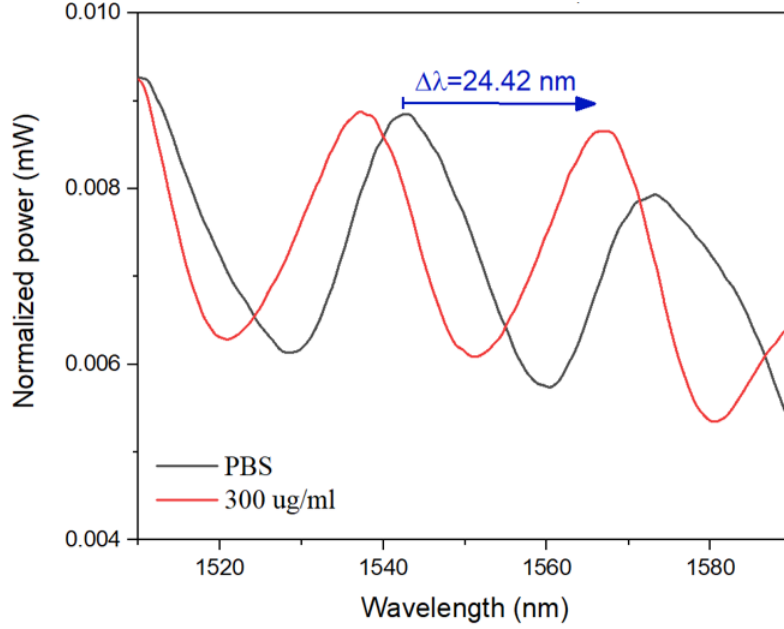


Figura 4.4: Gráfica de Longitud de onda a lo largo del tiempo.

Entonces, utilizando la ecuación 4.1 queda la siguiente expresión:

$$24.42 = -56.40091 \cdot X + 0.57364 \quad (4.6)$$

Por lo que es necesario despejar X.

$$X = \frac{(24.42nm - 0.57364nm)}{-56.40091nm/\mu m} = -0.4228\mu m \quad (4.7)$$

Obteniendo así un desplazamiento máximo de acuerdo con la curva de referencia de 422 nm.

4.2 Discusión

Para la extracción de esfuerzo superficiales se utilizó la ecuación de Stoney (Ec. 4.8) despejando $\Delta\sigma_s$ y utilizando los desplazamientos de los resultados antes presentados (X) como \bar{w}_{St} .

$$\bar{w}_{St} = \frac{3x^2(1-v)}{Eh^2} \Delta\sigma_s \quad (4.8)$$

$$\Delta\sigma_s = \frac{\bar{w}_{St}(Eh^2)}{3x^2(1-v)} \quad (4.9)$$

Sustituyendo los valores de las propiedades de los cantilevers la ecuación sería la siguiente:

$$\Delta\sigma_s = \frac{\bar{w}_{St}(1.68 \times 10^{11}N/m^2) - (0.000001m)^2}{3(.0005m)^2(1 - 0.24m/m)} = \bar{w}_{St} \times 294736.8421N/m^2 \quad (4.10)$$

Sustituyendo \bar{w}_{St} (en metros) según lo obtenido, consiguiendo así los siguientes resultados:

Tabla 4.1: Extracción de Esfuerzos Superficiales a partir del desplazamiento del cantilever.

BSA ($\mu g/ml$)	Anti-BSA ($\mu g/ml$)	X (nm)	$\Delta\sigma_s$ (N/m)
12.5	37.5	284.1	-0.0828
25	75	346.5	-0.1021
100	300	422.8	-0.1243

Como se puede apreciar en la tabla 4.1 los esfuerzos superficiales son proporcionales a la deflexión del cantilever, es importante mencionar que se obtienen esfuerzos negativos debido a nuestro sistema de referencia en el que se toma la deflexión como un desplazamiento negativo en el eje y. También se comprueba que los cantilevers detectan de manera correcta el anticuerpo BSA y lo más importante es que se flexionan proporcionalmente a la cantidad de Anti-BSA sobre ellos.

Una de las principales preocupaciones durante el desarrollo del biosensor al usar el interferómetro Fabry-Pérot es que la temperatura fuese un factor determinante durante las mediciones por lo que se procedió a analizar un cantilever de $750 \mu m$ inmerso en PBS a lo largo del tiempo (Véase Figura 4.5) y se puede observar que la variación de temperatura en el tiempo no es significativa para las mediciones.

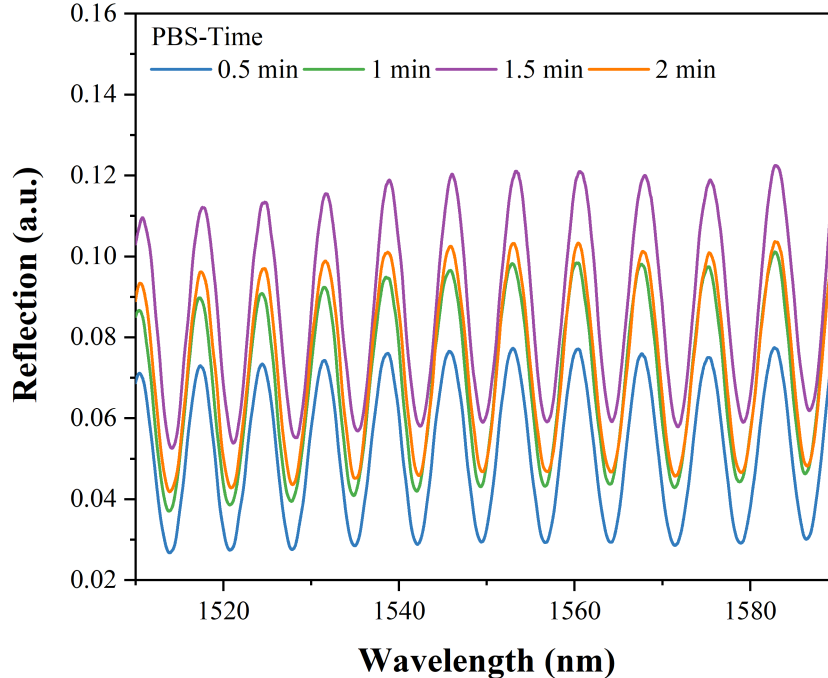


Figura 4.5: Cambio de reflexión a través del tiempo.

Debido al análisis por interferometría óptica y al cambio de reflectancia, se podía observar cuando la tensión superficial del líquido ejercía un cambio a la medición, afectando tanto la posición de la fibra óptica respecto al cantilever, como a la interacción del cantilever respecto a la fibra óptica, esto lo podemos inferir de la figura 4.6 donde se compararon las longitudes de onda máximas de 2 cantilevers de $500 \mu m$ inmovilizado con $100 \mu g/ml$ BSA a lo largo del tiempo; debido a que la tendencia hacia longitudes cortas nos indica que la longitud óptica de la cavidad está disminuyendo, indicando que el cantilever no se está alejando de la fibra sino acercándose.

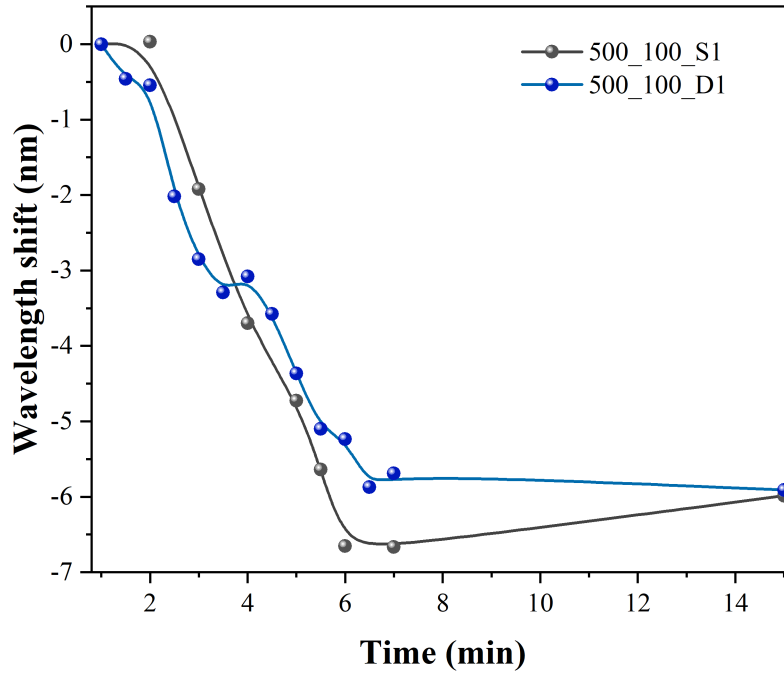


Figura 4.6: Cambio de longitud de onda del patrón de interferencia a través del tiempo.

Como se observa en la figura 3.8 lo que predomina dentro de las imágenes son cuerpos circulares de tonalidades claras y oscuras, según la literatura aquellos cuerpos esféricos con tonalidades claras representan la molécula BSA y aquellos cuerpos oscuros representarían la acumulación de ellas y esto tendría una relación lógica con nuestro sistema presentado en las imágenes, ya que en el cantilever inmovilizado a mayor concentración (Véase Figura 3.8b) puede observarse más presencia de los cuerpos con tonalidad oscura que en el cantilever con menor concentración, infiriendo de manera cualitativa que la inmovilización obedece un comportamiento satisfactorio y es proporcional a la cantidad inmovilizada sobre el cantilever respecto a la concentración de la solución en la que fue inmerso [36][37].

Conclusiones

5.1 Conclusión

Una de las principales ventajas de emplear cantilevers como biosensores, como se mencionó anteriormente, es su alta sensibilidad; sin embargo, se pudo observar que esta misma característica representa un gran reto a vencer para emplearlos de la manera correcta, esto es porque al ser tan susceptibles a variaciones mínimas de las concentraciones de moléculas a los que están expuestos, también resultan sumamente sensibles al medio en que se encuentren durante su operación. Por ejemplo, un reto superado durante su operación se debió a que el líquido en la celda de inmunoensayo empleada para la detección, propiciaba durante su vaciado que los cantilevers se flexionaran por la acción mecánica de succión del líquido y la tensión superficial que el líquido ejercía sobre ellos, incluso una gota; los cantilevers se recuperaban mecánicamente cuando la celda de inmunoensayo volvía a llenarse y cubrirlos en su totalidad. Por este motivo, fue necesario realizar rutinas de medición poniendo especial énfasis en la sincronización del flujo de entrada y de salida en la celda para evitar estos fenómenos inherentes a la detección biológica.

Los microcantilever son una tecnología emergente que tienen un campo muy amplio y por ende inexplorado, a lo largo de esta tesis se exploró su campo en el ámbito de sensado biológico; se pudo demostrar que los cantilevers al ser sometidos a diversas concentraciones de la proteína BSA, las cuales son absorbidas en su superficie, resultan en diferentes magnitudes proporcionales de desplazamientos mecánicos; estos son atribuidos a los cambios de esfuerzos superficiales derivados de la reacción inmunológica entre la albumina de suero bovino inmovilizada y los anti BSA. La misma deformación de los cantilevers sí pudo ser medida como se tenía pensado en la hipótesis, mediante el arreglo de interferometría óptica de Fabry-Perot, pudiendo detectar movimientos a escala nanométricas, el más pequeño fue la deflexión de 284.1 nm que corresponde a la concentración más pequeña (37.5 $\mu\text{g/ml}$ de BSA).

La implementación de un arreglo de interferometría óptica para la medición de los cantilevers resultó satisfactoria, obteniendo de manera exitosa el cálculo de esfuerzos superficiales sobre el cantilever, llegando a detectar tan poco como .0828 N/m, difícilmente se hubiese podido llegar al mismo resultado con un microscopio óptico de 500x de aumento ya que aunque usa el mismo ángulo que el interferómetro, solo puede realizar mediciones en un eje perpendicular al microscopio, en un

futuro recomendaría tener un ambiente aún más controlado para evitar los más posible vibraciones, que incluso la vibración sonora ocasionaba interferencia en las mediciones.

Para finalizar, con los datos obtenidos durante el análisis de Fabry-Pérot y las ecuaciones de Stoney, se puede concluir que se obtuvo una herramienta de sensado acorde a lo esperado, con proporcionalidad a la cantidad adsorbida del Anti-BSA con respecto a la deflexión de los cantilevers, es decir, se obtuvo un biosensor capaz de medir deflexiones nanométricas, dando paso a la extracción de esfuerzos superficiales en el mismo.

5.2 Publicaciones

Durante la realización de ésta tesis, se desarrolló un poster para el congreso XIV International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum - 2021 el cual recibió el reconocimiento como el mejor poster del congreso y se puede consultar el poster en el siguiente link: <https://bit.ly/3EnawsR>

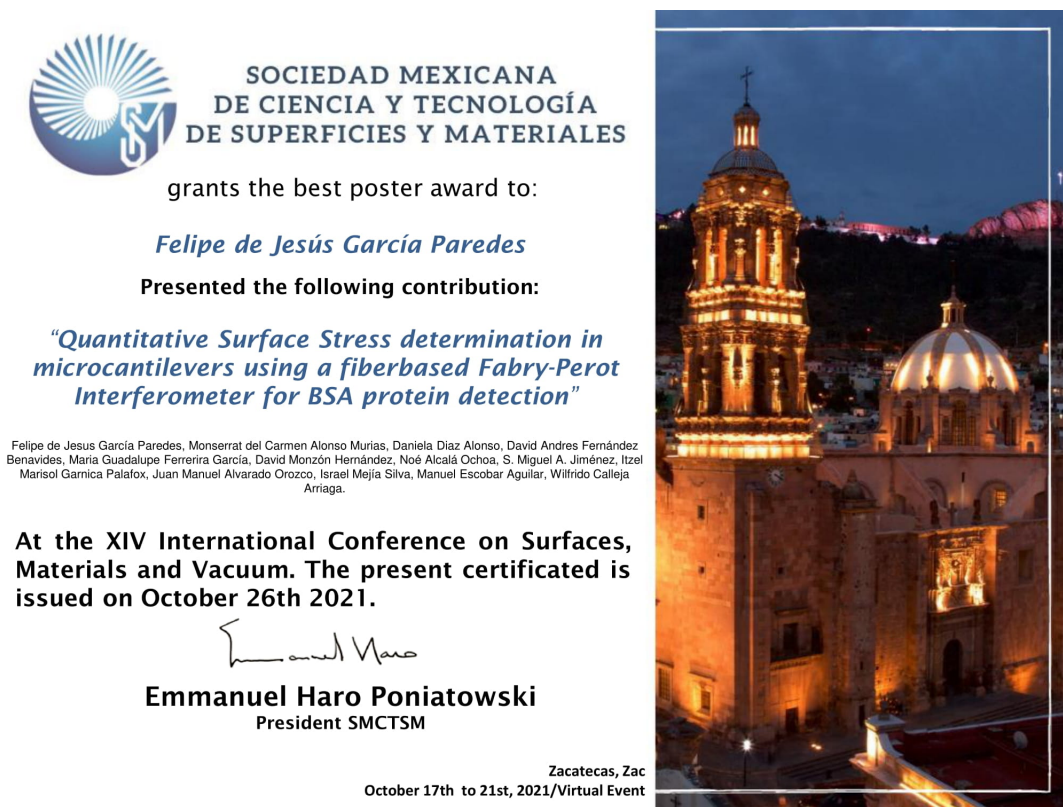


Figura 5.1: Reconocimiento para el primer lugar de posters

Referencias

1. Coulet, P. R. (2019). What is a Biosensor?. *Biosensor Principles and Applications*, 1-6.
2. Murphy, L. (2006). Biosensors and bioelectrochemistry. *Current opinion in chemical biology*, 10(2), 177-184.
3. Ramírez, E. T., & Albores, A. M. (2014). Biosensores enzimáticos.
4. Songa, E. A., & Okonkwo, J. O. (2016). Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review. *Talanta*, 155, 289-304.
5. Vashist, S. K. (2007). A review of microcantilevers for sensing applications. *J. of Nanotechnology*, 3, 1-18.
6. A novel bismuth-based lead-free piezoelectric transducer immunosensor for carbaryl quantification. D.A. Fernández et.al, *Sensors & Actuators: B. Chemical* 285 (2019) 423–430
7. Xu, C., Zhang, A., & Liu, W. (2007). Binding of phenthoate to bovine serum albumin and reduced inhibition on acetylcholinesterase. *Pesticide biochemistry and physiology*, 88(2), 176-180.
8. Yang, M., Zhang, X., Vafai, K. & Ozkan, C.S. (2003) High sensitivity piezoresistive cantilever design and optimization for analyte-receptor binding. *J. Micromech. Microeng.*, 13, 864-72.
9. Quirós-Bustos, N., Scott-Cháves, J., Vega-Castillo, P., & Roa-Gutiérrez, F. (2012). Aplicaciones Ambientales de la Nanotecnología: Desarrollo de un Sensor para la Detección de Contaminantes químicos en Aguas superficiales de Acueductos Rurales y de una Metodología para el Tratamiento de Agua, utilizando Nanotubos de Carbono.
10. Vashist, S. K., & Holthöfer, H. (2010). Microcantilevers for sensing applications. *Measurement and Control*, 43(3), 84-88.
11. Rugar, D., Mamin, H.J. & Guethner, P. (1989) Improved fiber-optic interferometer for atomic force microscopy.
12. Di Barba, P., & Wiak, S. (2020). MEMS: field models and optimal design (pp. 1-185). Basel Switzerland:: Springer.

13. Judy, J. W. (2001). Microelectromechanical systems (MEMS): fabrication, design and applications. *Smart materials and Structures*, 10(6), 1115.
14. A.D. McNaught, A. Wilkinson, *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the “Gold Book”), (1997) 143. doi:10.1351/goldbook.B00663.
15. Jiahui Lai, Yingchun Yi, Ping Zhu, Jing Shen, Kesen Wu, Lili Zhang, and Jian Liu. Polyani-line based glucose biosensor: A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 782: 138–153, 2016.
16. Grayson, A.C.R., Shawgo, R.S., Johnson, A.M., Flynn, N.T., Li, Y., Cima, M.J. & Langer, R. (2004) A BioMEMS Review: MEMS technology for physiologically integrated devices. *Proc. IEEE*, 92(1), 6-21.
17. Seelig, J.D., Lang, H.P., Zhang, J., Hunziker, P., Ramseyer, J.P., Meyer, E., Hegner, M. & Gerber, C. (2003) Label-free protein assay based on a nanomechanical cantilever array. *Nanotechnology*, 14, 86-90.
18. Brecht, A., & Gauglitz, G. (1995). Optical probes and transducers. *Biosensors and Bioelectronics*, 10(9-10), 923-936.
19. Yi, X., & Duan, H. L. (2009). Surface stress induced by interactions of adsorbates and its effect on deformation and frequency of microcantilever sensors. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 57(8), 1254-1266.
20. Godin, M., Tabard-Cossa, V., Miyahara, Y., Monga, T., Williams, P. J., Beaulieu, L. Y., ... & Grutter, P. (2010). Cantilever-based sensing: the origin of surface stress and optimization strategies. *Nanotechnology*, 21(7), 075501.
21. de Cezaro, A. M., Ballen, S. C., Hoehne, L., Steffens, J., & Steffens, C. (2021). Cantilever Nanobiosensors Applied for Endocrine Disruptor Detection in Water: A Review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232(6), 1-21.
22. Chaudhary, M., & Gupta, A. (2009). Microcantilever-based sensors. *Defence Science Journal*, 59(6), 634-641.
23. Malacara, D. (2015). *Óptica básica*. Fondo de cultura económica.
24. Puerto Sanchez, J. S., & Corregidor Carreño, E. L. Análisis de una cavidad Fabry-Perot en sensores ópticos basados en redes de difracción de Bragg.
25. Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Jahanban-Esfahlan, R., Roufegarinejad, L., Tabibiazar, M., & Amarowicz, R. (2019). Recent developments in the detection of bovine serum albumin. *International journal of biological macromolecules*, 138, 602-617.
26. Cserhádi, T., & Forgács, E. (1995). Charge transfer chromatographic study of the binding of commercial pesticides to various albumins. *Journal of Chromatography A*, 699(1-2), 285-290.
27. Santiago Barahona, B. (2016). Funcionalización de materiales nanocarbonosos con polietilenoimina.

28. Jaramillo, M., Marín, P. A., Torres, R. A., Pabón, E., Montagut, Y. J., Robledo, J., ... & Montoya, A. (2014, October). Advances in the development of a piezoelectric immunosensor for the detection of a tuberculosis biomarker. In 2014 IEEE 9th IberoAmerican Congress on Sensors (pp. 1-4). IEEE.
29. Ran, Z. L., Rao, Y. J., Liu, W. J., Liao, X., & Chiang, K. S. (2008). Laser-micromachined Fabry-Perot optical fiber tip sensor for high-resolution temperature-independent measurement of refractive index. *Optics express*, 16(3), 2252-2263.
30. Rao, Y. J., Ran, Z. L., & Gong, Y. (2017). *Fiber-Optic Fabry-Perot Sensors: An Introduction*. CRC Press.
31. Fengyuan Li, Brandon Patterson, Jason Clark, yi zeng (2014), "SUGARCube - Cantilever," <https://nanohub.org/resources/sugar>. (DOI: 10.4231/D3Z02Z93N).
32. Ruz Martínez, J. J. (2016). *Teoría de sensores nanomecánicos aplicados a la detección biológica*
33. J. Tamayo, J. Ruz, V. Pini, P. Kosaka, M. Calleja, Quantification of the surface stress in microcantilever biosensors: Revisiting Stoney's equation, *Nanotechnology* 23 (2012) 475702.
34. Garnica-Palafox, I.M., Jimenez, S.M.A, Diaz-Alonso, D., Fernandez Benavides, D.A., Calleja-Arriaga, W., Alvarado-Orozco, J.M., (In press 2021) An analytical model for the response of a piezoresistive micro-cantilever to surface stress: Preliminary considerations for biochemical sensor design.,*International Journal of Non-Linear Mechanics*
35. Zaefferer, S. (2011). A critical review of orientation microscopy in SEM and TEM. *Crystal Research and Technology*, 46(6), 607-628.
36. Liu, Z., Deng, X., Wang, M., Chen, J., Zhang, A., Gu, Z., & Zhao, C. (2009). BSA-modified polyethersulfone membrane: preparation, characterization and biocompatibility. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(3), 377-397.
37. Sahu, D. P., & Jammalamadaka, S. N. (2019). Detection of bovine serum albumin using hybrid TiO₂+ graphene oxide based Bio-resistive random access memory device. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
38. Mohammed, A., & Abdullah, A. (2018, November). Scanning electron microscopy (SEM): A review. In *Proceedings of the 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics—HERVEX, Băile Govora, Romania* (pp. 7-9).
39. Wang, J., Zhao, J., & Ma, G. (2019). Extremely concentrated silver nanoparticles stabilized in aqueous solution by Bovine Serum Albumin (BSA). *Nano-Structures & Nano-Objects*, 19, 100349.
40. Biosensor incremental project. (2021). Retrieved 26 May 2022, from conmadmexico.com/biosensor-incremental-project/

