

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS DE LICENCIATURA

**DESARROLLO DE UNA NUEVA FASE SENSORA
PARA LA DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE
*SALMONELLA***

EMILIO JOSÉ SANTIAGO RODRÍGUEZ

JUNIO, 2013

Memoria presentada a la Facultad de Química
de la Universidad de Oviedo por Emilio José
Santiago Rodríguez para optar al Grado de
Licenciado en Química.

Oviedo, Junio de 2013

M^a JESÚS LOBO CASTAÑÓN y ARTURO JOSÉ MIRANDA ORDIERES,

Profesores Titulares del Departamento de Química Física y Analítica
de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada **“DESARROLLO DE UNA NUEVA FASE SENSORA PARA LA DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE *SALMONELLA*”** se ha realizado en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, bajo su dirección autorizando su presentación como Tesis de Licenciatura.

Oviedo, Junio de 2013

Fdo. María Jesús Lobo Castañón

Fdo. Arturo José Miranda Ordieres

JOSÉ ENRIQUE SÁNCHEZ URÍA

Director del Departamento de Química Física y Analítica de la
Universidad de Oviedo,

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada **“DESARROLLO DE UNA NUEVA FASE SENSORA PARA LA DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE SALMONELLA”** se ha realizado en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo bajo la dirección de los doctores M^a Jesús Lobo Castañón y Arturo José Miranda Ordieres, por el licenciado Emilio José Santiago Rodríguez, y autoriza su presentación con el fin de optar al Grado de Licenciado en Química.

Oviedo, Junio de 2013

Fdo. José Enrique Sánchez Uría

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. SALMONELLA COMO PROBLEMA ANALÍTICO	1
1.2. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETECCIÓN	2
1.2.1. Métodos de cultivo	3
1.2.2. Métodos rápidos	4
1.3. FUNDAMENTOS DE LOS GENOENSAYOS ELECTROQUÍMICOS	5
1.3.1. Transducción electroquímica	6
1.3.2. Superficie de reconocimiento	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES, INSTRUMENTACIÓN Y PROTOCOLOS	13
3.1. REACTIVOS	14
3.2. INSTRUMENTACIÓN	15
3.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	17
3.3.1. Acondicionamiento de los electrodos de oro	17
3.3.2. Construcción del sensor	17
3.3.3. Protocolo de operación	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1. SELECCIÓN DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DEL ANALITO	21
4.2. DISEÑO DE LAS SECUENCIAS DE SONDA DE CAPTURA E INDICADORA	22
4.3. ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LA FASE SENSORA	24
4.3.1. Estudio electroquímico de la superficie	25
4.3.2. Análisis de la superficie por AFM	27
4.3.3. Comparación de la respuesta del sensor sobre ambos tipos de superficie	29
4.3.4. El 4-ATP como bloqueante alternativo	31
4.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE SONDA DE CAPTURA Y BLOQUEANTE	34
4.5. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL GENOSENSOR	43
5. CONCLUSIONES	45
6. REFERENCIAS	47
ANEXO I	50

1.INTRODUCCIÓN

1.1 SALMONELLA COMO PROBLEMA ANALÍTICO

Las enfermedades transmitidas por patógenos presentes en la comida son muy comunes en la sociedad actual. La Organización mundial de la salud estima que en 2005 murieron aproximadamente 1.8 millones de personas en el mundo debido a enfermedades provocadas por estos patógenos. Se conocen aproximadamente unos 200 tipos de estos organismos siendo la *Salmonella* uno de los más destacables, especialmente desde el desarrollo de la sociedad industrial. Tiene un amplio rango de huéspedes, entre ellos la mayor parte de la cabaña (ovejas y cerdos sobretodo) de los países desarrollados, siendo común la contaminación de las carnes de consumo humano.^[1] En las últimas décadas se ha informado del aumento en el número de brotes y casos esporádicos, representando en España aproximadamente 2.3 casos por cada 100.000 habitantes.

La *Salmonella* recibe su nombre por Daniel Elmer Salmon, un patólogo veterinario estadounidense, aunque fue su colega y contemporáneo Theobald Smith (conocido por su trabajo con anafilaxis) quien descubrió la bacteria en 1885, aislándola de cerdos con cólera. La salmonelosis entérica está habitualmente causada por *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, con más de 2.000 cepas descritas, es de importancia en países en desarrollo, donde su incidencia está en aumento, y en algunos países, la enfermedad es endémica. La salmonelosis es una enfermedad de transmisión alimentaria, en especial por alimentos de origen animal y pueden aparecer en brotes en escuelas, guarderías, restaurantes y residencias de ancianos. El período de incubación es por lo general entre 12 a 36 horas, a veces hasta 6 y 48 horas.^[2]

El género *Salmonella* es de taxonomía difícil, modificada en estos últimos años por el aporte de estudios moleculares de homología de ADN que han clarificado el panorama taxonómico de las enterobacterias.

El tratamiento taxonómico actual de *Salmonella* ha simplificado el espectro, reagrupando todas las cepas (patógenas o no) en dos únicas especies: *S. enterica* y *S. bongori*. Ésta última (previamente subespecie V) no es patógena para el ser humano.

La especie *S. entérica* tiene seis subespecies:

- I *enterica*
- II *salamae*

- IIIa *arizonae*
- IIIb *diarizonae*
- IV *houtenae*
- VI *indica*

La fiebre tifoidea es una de las enfermedades que pueden ser ocasionadas por bacterias del género *Salmonella*. Habitualmente esta enfermedad está provocada por cepas de *Salmonella Typhi*. El único reservorio de la *Salmonella Typhi* es el hombre, de modo que se transmite de una persona a otra. La fiebre paratifoidea tiene ciertas similitudes con la fiebre tifoidea, pero tiene un curso más benigno. La paratifoidea B es más frecuente en Europa que se presenta como una gastroenteritis severa y la paratifoidea C es una infección rara, generalmente vista en el extremo Oriente que se presenta como una septicemia.^[3]

La mayoría de los casos de salmonelosis son causados por la ingestión de alimento de origen animal contaminado, también en algunas verduras, tomates, etc. Entre los alimentos involucrados en el aumento de incidencia de *Salmonella* se encuentran la leche, los huevos y las carnes.^[4]

La prevención de *Salmonella* como contaminante de alimentos es una necesidad para la sociedad actual, desarrollándose distintos métodos y estrategias con el fin de erradicar los contagios, aunque el tamaño del inóculo de *Salmonella* requerido para causar enfermedad sintomática en adultos sanos no está bien establecido, pero se sabe que puede ser pequeño, de no más de 100 organismos.

1.2. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETECCIÓN

La aparición cada vez más frecuente de brotes de contaminación bacteriana en alimentos, algunos mortales, ha llevado al desarrollo de numerosas técnicas de detección, cada vez más rápidas. Las técnicas utilizadas han de ser sensibles, específicas, de bajo coste y alta facilidad de uso.^[5]

Hay dos grupos principales, diferenciados principalmente por el tiempo del análisis, los métodos de cultivo y los métodos de diagnóstico rápido.

1.2.1. Métodos de cultivo

Los métodos tradicionales de cultivo (ISO 6579; 2002, 2011) para la detección de *Salmonella* engloban varias etapas. Primero hay dos etapas de enriquecimiento, la segunda de ellas selectivo de la *Salmonella*, seguida de un cultivo en placas. Con estas tres etapas se confirman las muestras que dan negativo en contaminación por el patógeno.

Las muestras que dan positivo deben ser confirmadas posteriormente mediante pruebas bioquímicas y serológicas^[6]. Las pruebas serológicas, que normalmente utilizan métodos de aglutinación, permiten una detección específica de los diferentes serotipos basándose en los antígenos somáticos (O) y flagelares (H).

La detección de *Salmonella* mediante cultivo destaca por ser un método sensible y sobretodo fiable, siendo la única que detecta las células viables, pero requiere 4-5 días para la detección de negativos y al menos una semana para la confirmación de positivos, siendo esta cuestión su principal barrera analítica.

1.2.2. Métodos rápidos

La *Salmonella* es la principal responsable de infecciones alimentarias del mundo, sobre todo en regiones muy pobladas como la zona asiática y en Estados Unidos. La enorme cantidad de casos que necesitan ser analizados en estas zonas es tan grande que los métodos de cultivo tradicionales se han visto desbordados^[7]. Con la finalidad de resolver este problema se han desarrollado en los últimos tiempos métodos basados en ácidos nucleicos e inmunoensayos aportando mayor especificidad y sobre todo un menor tiempo de análisis.

1.2.3. Métodos inmunoquímicos

Los avances en la producción de anticuerpos específicos han permitido que los métodos basados en inmunoensayos se hayan destacado como una opción rápida y económica para la detección de *Salmonella*. Existen numerosos kits comerciales para este fin.

Estos métodos han sido comparados con los métodos tradicionales de cultivo, mostrando numerosas aplicaciones en la detección de patógenos, teniendo como principal problema el aumento de las señales del blanco debido a las interacciones no específicas.^[8]

Hay muchos formatos de ensayo para la detección de patógenos pero todos basan su detección en la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. Los inmunoensayos más utilizados para la detección de *Salmonella* son del tipo ELISA. Este inmunoensayo sigue un formato tipo sándwich con un anticuerpo de captura y otro de detección marcado con radioisótopos o, más comúnmente, con enzimas.

Como contrapartida estos kits pueden detectar falsos positivos en muestras reales debido a la presencia de microflora competitiva^[7].

1.2.4. Métodos basados en ADN

La sensibilidad, rapidez y especificidad de estos métodos los han convertido en una de las opciones más utilizadas y desarrolladas en los últimos años. Una diferencia clara respecto a los métodos anteriores es que el uso de ADN como factor clave de la detección los hace más específicos. Se detecta una secuencia genómica que es única de la *Salmonella* y no de otros patógenos.

✓ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica se basa en la amplificación en varios ciclos de una secuencia específica del ADN del patógeno. Esto es posible mediante la duplicación en cada ciclo de las hebras simples de ADN por medio de dos oligonucleótidos (cebadores) que las utilizan como molde. Los cebadores se hibridan al ADN flanqueando la secuencia que se quiere amplificar y posteriormente la polimerasa Taq produce la elongación^[9].

Los reactivos necesarios son los dos cebadores, la polimerasa Taq termoestable y los cuatro desoxinucleótidos trifosfato en exceso.

Los métodos basados en PCR combinan la simplicidad con una gran sensibilidad y especificidad, y con ellos se pueden detectar *Salmonella* en menos tiempo que los métodos tradicionales^[6].

Hay varios formatos de PCR pero se pueden clasificar en dos tipos: análisis cualitativo por PCR convencional y cuantitativo por PCR a tiempo real. El análisis cualitativo se ocupa exclusivamente de detectar la presencia de ADN del patógeno, mientras que el cuantitativo es capaz de detectar, mediante el uso de fluoróforos y desactivadores de la fluorescencia el producto de la PCR durante el proceso de amplificación^[7].

Los métodos tradicionales de PCR consumen mucho espacio de laboratorio en comparativa con la PCR a tiempo real, y además son muy laboriosos debido al análisis posterior por electroforesis. En cambio la PCR a tiempo real exige unos conocimientos técnicos elevados y una instrumentación cara.

Se han descrito innumerables trabajos de la detección de patógenos mediante PCR debido a que esta técnica tiene sensibilidad comparable a los métodos tradicionales reduciendo enormemente el tiempo de análisis.^[6-7, 10] Como contrapartida tenemos el problema de que la PCR amplifica también las secuencias de ADN de células muertas dando a veces falsos positivos.

✓ Biosensores de hibridación

Los biosensores se definen como cualquier dispositivo analítico cuya fase sensora incorpora un elemento de reconocimiento biológico en contacto con el transductor, siendo capaz de detectar el evento de reconocimiento molecular entre el analito y la biomolécula y transformarlo en una señal analítica, generalmente eléctrica.^[5]

Los genosensores son un grupo dentro de los biosensores que utilizan la especificidad de la hibridación entre dos hebras complementarias de ADN como elemento de reconocimiento.

Estas técnicas tienen muchas ventajas respecto a las anteriores: son simples, económicas, necesitan instrumentación sencilla y el tiempo de análisis se reduce hasta las horas.

Como contrapartida estas técnicas aún no han adquirido sensibilidad suficiente para la detección de patógenos en muestras reales por lo que suele ser necesaria una etapa de amplificación anterior.

1.3. FUNDAMENTOS DE LOS GENOENSAYOS ELECTROQUÍMICOS

En el presente trabajo se procederá a desarrollar un genoensayo electroquímico para la detección de *Salmonella*, por tanto se describirán los fundamentos teóricos de este método con más detalle en esta sección.

Los genoensayos se caracterizan por su rapidez de análisis y por su bajo coste económico. Son las dos principales diferencias con los métodos de detección anteriores. Se considera un genoensayo a todo método cuya zona de reconocimiento biológica sea ADN, pero no se puede dar una visión única, ya que existen diversidad de formatos posibles

Un genosensor consta principalmente de dos partes: la zona de reconocimiento que interactúa con el analito y el transductor, que convierte el evento de reconocimiento en señal eléctrica.

La señal electroquímica se puede generar de maneras muy diversas, aunque podemos agruparlas en dos grandes grupos: metodologías sin marcadores y métodos basados en el empleo de marcas.

1.3.1 Transducción electroquímica

✓ Sensores sin marcadores

El marcaje de las sondas de ADN puede llegar a ser un problema para el desarrollo de genosensores reduciendo significativamente su tiempo de vida. Para evitar este problema se busca que los propios cambios físicos producidos por la hibridación sean los indicadores de que se ha llevado a cabo.^[9]

Hay muchos tipos, se puede detectar por la variación de la masa, el índice de refracción o por ejemplo la inhibición del proceso redox del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$ en el caso de los electroquímicos. Esta es una forma muy común en los genoensayos debido a la alta repulsión entre ésta molécula y los grupos fosfato del ADN (**Esquema 1, A**). Cuantas más hebras tengamos inmovilizadas más repulsión habrá y más inhibido estará el proceso redox.

✓ Sensores con marcadores

Esta metodología es la más fiable y sensible de las dos, en cambio como se ha comentado anteriormente, las marcas se degradan. La necesidad de marcas produce también un aumento del coste económico de reactivos.

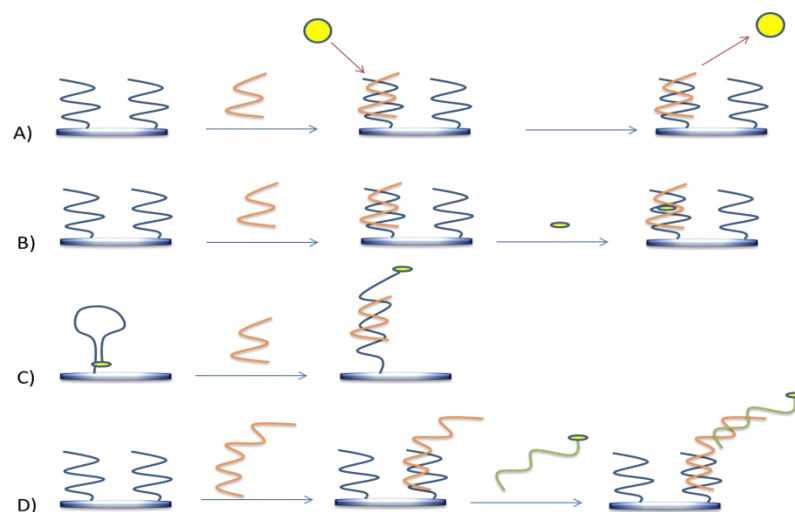
Hay tres tendencias principales: intercalantes, estructuras secundarias y marcas enzimáticas, marcadores electroactivos etc.

Al principio el uso de reactivos que después de la hibridación de ambas sondas se intercalan en la doble hélice era muy común. La señal detectada es proporcional al número de sondas analito hibridadas. Sin embargo es complicado cuantificar la señal ya que puede que una doble hélice quede sin marca o que en la misma tengamos dos marcas (**Esquema 1, B**).

Utilización como sonda de captura una secuencia con estructura secundaria, por ejemplo mango-bucle (*hairpin*). Esta sonda está marcada, y la posterior hibridación abre su estructura secundaria proporcionando señal (**Esquema 1, C**). La apertura de esta estructura puede proporcionar o inhibir la señal dependiendo del reactivo que escojamos. Es condición indispensable que el balance energético de la hibridación sea mayor que la apertura de la estructura secundaria.

La última tendencia implica que el marcador esté unido covalentemente a la sonda. Es la más sensible de las tres ya que produce una señal inequívoca de que existe la secuencia analito en la muestra. La sonda marcada, denominada indicadora, se une a la sonda de analito por una zona complementaria diferente a la de captura realizando así un ensayo tipo sándwich (**Esquema 1, D**). El principal inconveniente de este procedimiento es la necesidad de marcar directamente las sondas.

En el presente trabajo la forma de transducción escogida es el empleo de sondas indicadoras marcadas.



Esquema 1. Esquema que muestra los distintos tipos transducción electroquímica. **A)** Sin marcadores, **B)** Reactivos intercalantes como marca, **C)** Estructuras secundarias, **D)** Sondas indicadoras marcadas.

✓ Generación de señal

Hay una gran cantidad de marcas posibles, muchas de ellas disponibles comercialmente, pero las más utilizadas por su extraordinaria capacidad de amplificación son las enzimas. Las enzimas que más se han utilizado son la ALP (fosfatasa alcalina) y la HRP (peroxidasa de rábano silvestre).

En este trabajo la marca enzimática utilizada es la HRP y el sustrato de la enzima es la tetrametilbencidina (TMB). El proceso de generación de señal se basa en la detección del producto electroactivo, la forma oxidada de la TMB (TMBox), por métodos electroquímicos.

1.3.2. Superficie de reconocimiento

Hay una inmensa variabilidad de tipos de biosuperficies pero sin duda la más utilizada son las monocapas autoensambladas o SAMs (self-assembled monolayers). Muchos sistemas son capaces de experimentar un proceso de autoensamblado sobre un sustrato sólido^[11] pero los más estudiados han sido los compuestos de azufre sobre metales nobles, especialmente oro.

Se han publicado muchos trabajos describiendo las aplicaciones de las SAMs,^[12] haciendo énfasis en el desarrollo de biosensores electroquímicos y especialmente en aquellas que detectan secuencias específicas de ADN apoyándose en la reacción de hibridación.

Mientras que los primeros trabajos^[13] describían la formación de la monocapa como la inmovilización de un tiol y la consiguiente inmovilización de la sonda mediante un acoplamiento carboimida, los procedimientos más actuales inmovilizan directamente los oligonucleótidos tiolados. Sin embargo, esta nueva estrategia tuvo un problema en sus inicios debido al enorme número de uniones de las hebras con el oro a través de las bases nitrogenadas.^[14]

Tarlov y sus colaboradores^[15] propusieron la introducción de un tiol inerte con el fin de controlar las propiedades de la biocapa. Estas investigaciones mostraron que la introducción de este compuesto no solo tenía el efecto de espaciador de las hebras, controlando su densidad, sino que también tenía un efecto positivo sobre la señal de los blancos. La introducción del compuesto disminuía el número de uniones inespecíficas entre los nucleótidos y el sustrato de oro. Para la obtención de estas monocapas mixtas primero se sumerge el oro en una disolución de sonda de ADN tiolada, y una vez fijada, se añade un

alcanotiol como espaciador. Por razones geométricas y de solubilidad, Tarlov empleó el 6-mercapto-1-hexanol como espaciador.

Estudios posteriores^[16] mostraron que aunque este tratamiento elimina muchas de las interacciones de la sonda inmovilizada con el sustrato de oro, parte de las hebras seguían interaccionando a través de sus bases nitrogenadas. Se intentó eliminar estos efectos completamente mediante la codeposición de ambos reactivos pero no se logró nada significativo.

Aunque algunos autores consideran que los grupos hidrofílicos de los ácidos nucleicos impiden la obtención de monocapas densas,^[17] la densidad del empaquetamiento puede ser controlada por la concentración salina, alcanzándose recubrimientos del 75 % para concentraciones de Mg^{2+} 0.1 M.^[18] Concentraciones salinas altas favorecen la quimisorción ya que minimizan la repulsión electrostática entre las hebras de ADN.

El efecto de la densidad de recubrimiento de la sonda sobre la señal obtenida es mucho más acusado cuando la sonda tiene estructuras secundarias, ya que la señal se basa en un cambio conformacional inducido por la reacción de hibridación sobre la secuencia de ADN inmovilizada.^[19] Su influencia es tal que se han descrito trabajos en los que hay diferentes rangos lineales para un mismo ensayo modificando únicamente parámetros experimentales relacionados con la densidad de empaquetamiento molecular de la sonda (concentración y tiempo de reacción).^[20]

Las monocapas autoensambladas y especialmente, las construidas sobre oro, han sido una de los métodos más estudiados y utilizados en el desarrollo de genosensores. El uso de bloqueantes para mejorar el comportamiento de estas monocapas, y especialmente el 6-mercapto-hexanol, se considera un complemento necesario para eliminar las interacciones del ADN con el oro, aumentando la señal. En el presente trabajo se desarrollara una nueva fase sensora en la que se diseñaran las sondas de ADN del genosensor, que serán inmovilizadas sobre una superficie de oro depositada sobre vidrio por pulverización catódica sobre vidrio (*sputtering*) utilizando como bloqueante el 4 aminotiofenol. Este reactivo no han sido utilizado con anterioridad con este tipo de superficie, intentándose con ello disminuir las uniones inespecíficas y buscar unas condiciones más favorables para la hibridación de las hebras de ADN.

2.OBJETIVOS

La enorme cantidad de brotes toxiinfecciosos producidos por la *Salmonella* hacen necesario un estricto control y una rápida detección para garantizar la seguridad medioambiental y agroalimentaria^[5].

La industria alimentaria y la sanidad en general demandan sistemas de fácil manejo, alta sensibilidad y bajo coste para el control de patógenos. Estas características las engloban los transductores electroquímicos, que además aportan un alto grado de posibilidad de miniaturización en comparación con otros métodos de detección.

El objetivo general del trabajo es el desarrollo de un genoensayo de hibridación con transducción electroquímica amplificada, en formato de tipo sensor, para la detección de una secuencia de ADN (secuencia analito) específica de patógenos bacterianos del género *Salmonella*.

Los objetivos específicos, que marcan la estrategia general de desarrollo del ensayo, son los siguientes:

1. Diseño de una nueva fase sensora construída sobre un sustrato electródico de oro depositado en fase vapor sobre vidrio. Este material se ha obtenido reciclando consumibles (discos sensores) de un equipo de espectroscopía de resonancia de plasmón superficial (SPR) disponible en el laboratorio. Este diseño incluye:

a. El corte, limpieza, preparación y fijación de contacto eléctrico en las piezas de oro/vidrio recicladas para permitir su uso como electrodo indicador en una celda de tres electrodos convencional.

b. La inmovilización de una secuencia de ADN complementaria de la secuencia analito, modificada con un grupo tiol terminal para facilitar la formación de una monocapa autoensamblada sobre la superficie de oro.

c. El bloqueo de la superficie de oro restante mediante un nuevo reactivo, que se utiliza por primera vez para esta finalidad, el 4-aminotiofenol. Dada la importancia de la naturaleza química del reactivo de bloqueo presenta en las características analíticas de sensores de este tipo, el trabajo tiene como objetivo la evaluación comparativa de este nuevo bloqueante con el utilizado tradicionalmente, el 6-mercaptohexanol.

2. Optimización de las condiciones experimentales para la deposición de la monocapa autoensamblada mixta formada por la sonda de captura tiolada y el reactivo de bloqueo.

3. Evaluación de las características analíticas básicas del genoensayo.

3.MATERIALES, INSTRUMENTACIÓN Y PROTOCOLOS

3.1 REACTIVOS

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por Sigma-Life Sciences (Madrid, España). Sus secuencias de bases se especifican en la **Tabla 1**.

Nombre	Función	Secuencia de bases 5'→3'
SalCPTiol	Sonda de captura	GCGCGCGGCATCCGCATCAATAATACCGCCTTCAAAT[ThiC3]
SalDPFluor	Sonda indicadora	[Flc]ACCGTAAAGCTGGCTTCCCTTCCAGTACGCTTCGCCGTTTC
SalT	Analito	ATTTGAAGGCCGGTATTATTGATGCGGATGCCGCGCGGAACGGCGAA GCGTACTGGAAAGGGAAAGCCAGCTTACGGT

Tabla 1. Nombre, función y secuencia de los oligonucleótidos empleados.

El oligonucleótido modificado con tiol se suministró en forma protegida con un grupo disulfuro para minimizar la oxidación que conduciría a la formación de disulfuros.

Es necesario, por tanto, reducir el grupo disulfuro con ditioneitol (DTT).

La disolución posteriormente se purificó con una columna de exclusión por tamaños NAPTM-10 Columns SephadexTM G-25 DNA Grade (GE Healthcare) y finalmente se determinó la concentración del oligonucleótido tiolado espectrofotométricamente a 260 nm.

Las disoluciones y reactivos empleados se resumen en la **Tabla 2**:

Reactivo	Pureza	Casa comercial
20 x SSPE*		Sigma
10 x PBS*		Sigma
PBS-caseína		Sigma
Alcohol isopropílico		Prolabo
3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)	99%	Sigma
FAB anticuerpo antiluoresceína-HRP		Sigma
H ₂ SO ₄	95-97 %	Merck
H ₂ O ₂	33%	Probus
Albúmina de suero bovina	98%	Sigma

Tabla 2. Reactivos y disoluciones utilizadas.

*El SSPE es una disolución reguladora de fosfato 0.2 M de pH aproximado 7.4 que contiene 2.98 M de NaCl y 0.02 M EDTA.

*El PBS es una disolución reguladora de fosfato 0.01 M, 0.0027 M de KCl y 0.137 M de NaCl, su pH aproximado es de 7.4.

La composición de las disoluciones empleadas es la siguiente:

- Disolución de sonda de captura, bloqueante y lavado: 2x SSPE (dilución 1:10 de 20x).
- Disolución de hibridación: 2x SSPE + 0.25% albúmina de suero bovina.
- Disolución de marcaje: PBS 1x (dilución de la disolución comercial 1:10) + 0.5% caseína.

3.2. INSTRUMENTACIÓN

La señal electroquímica se mide por medio de un potenciostato PGSTAT 10 controlado por un equipo informático que lleva incorporado el programa GPES 4.9.

Para las medidas cronoamperométricas se emplearon electrodos fabricados a partir de discos utilizados para la detección por resonancia de plasmón de superficie (SPR). Estos discos son de oro depositado por pulverización catódica (*sputtering*) sobre vidrio (**Figura 1**).

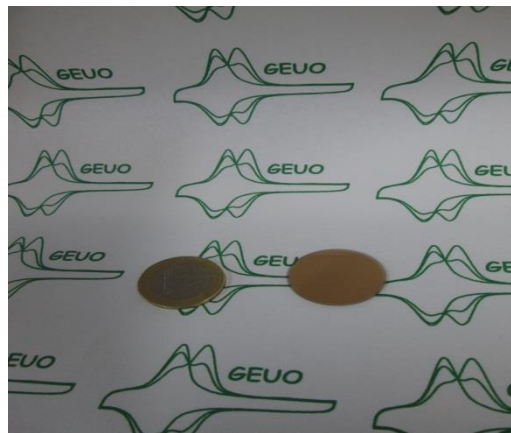


Figura 1. Disco de SPR en la parte derecha de la imagen.

Los discos se cortan en porciones de 3 mm de ancho y 10 mm de largo aproximadamente y posteriormente se lavan con alcohol isopropílico para limpiar cualquier resto de materia orgánica presente.

Para conseguir una buena reproducibilidad las porciones se introducen en piraña (70% H₂SO₄, 30% H₂O₂) durante 30 segundos, la cual se enfría previamente durante 90 segundos. A continuación se limpian con abundante agua y se secan con una corriente de nitrógeno.

Por último se pega a la superficie la conexión de cobre y se cubre la zona con adhesivos de teflón para delimitar la celda a un círculo de 2 mm de diámetro que será la superficie de trabajo.

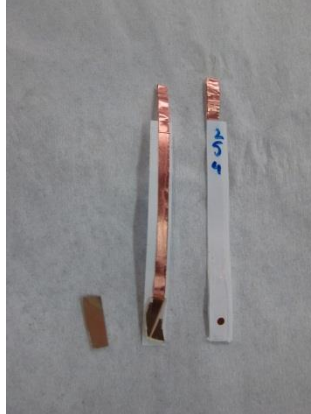


Figura 2. Porción de disco de SPR, electrodo en proceso de construcción y finalizado de izquierda a derecha.

En la preparación de las disoluciones de oligonucleótidos se empleó una centrífuga Herearus Biofuge , Thermo Scientific antes de ser alicuotadas.

Finalmente al igual que todas las disoluciones empleadas se homogeneizan mediante agitación en vórtex.

La elección de los discos de SPR como superficie de transducción sobre la que se construye el sensor es debida al buen comportamiento que se espera de una superficie de sus características. La deposición del oro por medio de *sputtering* proporciona, en principio, una superficie menos rugosa y más homogénea favoreciendo las condiciones del genoensayo.

La utilización de estos discos es la base sobre la que comienza el presente trabajo. Este material es caro, exige una construcción laboriosa y que necesita mucha instrumentación y sobretodo no es reutilizable, las medidas solo pueden ser realizadas una vez y después los discos se desechan. Actualmente la química, y la investigación en general, pasan por una época de poca inversión que limita las posibilidades de los grupos de investigación, por ello, el aprovechamiento de los recursos disponibles y la creatividad es una opción a tener en cuenta.

3.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.3.1. Acondicionamiento de los electrodos de oro.

Como paso previo a la construcción del genosensor los electrodos se limpian electroquímicamente mediante voltametría cíclica en medio sulfúrico (0.1 M). Se les somete a 5 ciclos entre 0.1 y 1.65 voltios con una velocidad de barrido de 100 mv/s, hasta obtener el comportamiento voltamétrico característico de una superficie de oro policristalino.

3.3.2. Construcción del sensor

La construcción del sensor se inicia con la inmovilización de la sonda de captura tiolada sobre los electrodos limpios

Los electrodos se dejan durante toda la noche con atmósfera saturada a una temperatura de 4 °C en nevera. Para ello se añaden 6 µL de disolución de oligonucleótido tiolado (SalCPTiol) preparado en disolución reguladora 2 x SSPE (**Esquema 2**, etapa **1**). Posteriormente se lava con la misma disolución reguladora, se secan con corriente de nitrógeno y se añaden 6 µL de disolución de 4-ATP de la concentración adecuada, manteniéndose 50 minutos en nevera en las mismas condiciones de temperatura y humedad (**Esquema 2**, etapa **2**).

3.3.3 Protocolo de operación

Con el genosensor construido se propone el empleo de un ensayo de hibridación con formato sándwich en el que se distinguen dos etapas: hibridación homogénea e hibridación heterogénea.

A) Hibridación homogénea

En un tubo eppendorf se añade un volumen adecuado de la disolución analito (Salt) y la disolución de sonda de detección (SalDPFluor), ambas en 2x SSPE con 2.5% de BSA (**Esquema 2**, etapa **3**). Después de 30 minutos esta disolución es adecuada para su empleo en la segunda etapa. Todas las operaciones en las que se maneja la sonda marcada se han de realizar en ausencia de luz ya que la fluoresceína se degrada en su presencia, por ello los eppendorf se cubren con papel de aluminio.

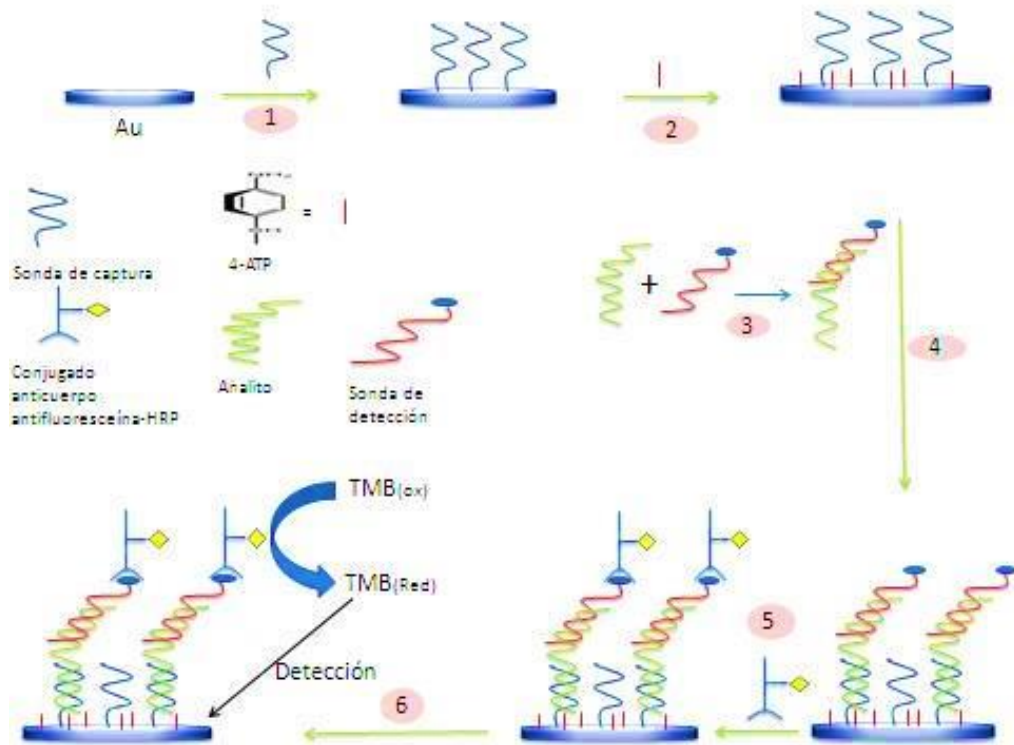
B) Hibridación heterogénea

Una vez terminada la primera etapa de la hibridación, sobre los sensores limpios y secos se añaden 6 μL de la disolución de la fase homogénea (**Esquema 2**, etapa **4**), para proteger los dispositivos de la luz las placas de Petri donde están los electrodos se cubren con papel de aluminio.

En estas condiciones se mantienen los electrodos durante 120 minutos, tiempo suficiente para que el dúplex formado por analito y sonda de detección difunda hacia la superficie electródica donde se encuentra la sonda de captura.

Para visualizar electroquímicamente que se ha producido el evento de la hibridación la siguiente etapa en la operación con el sensor es el marcaje enzimático. En esta etapa se utiliza una dilución 1/300 (150 U/mL) del conjugado anticuerpo antifluoresceína-HRP comercial con PBS + 0.5% de caseína. Una vez limpiados los electrodos con disolución reguladora y secados con corriente de nitrógeno se añaden 6 μL de esta disolución y se mantienen protegidos de la luz durante 30 minutos (**Esquema 2**, etapa **5**).

A continuación, los electrodos se lavan con la disolución reguladora habitual y se secan con corriente de nitrógeno antes de ser introducidos en una microcelda con un puente salino de KCl saturado. En la microcelda se añaden 500 μL de la disolución comercial de TMB y H_2O_2 y después de 30 segundos de reacción se mide el producto de la reacción enzimática (**Esquema 2**, etapa **6**). Las medidas cronoamperométricas se llevan a cabo a un potencial de 0 voltios durante 60 segundos.



Esquema 2. Esquema que resume todos los pasos del procedimiento experimental. **1)** Inmovilización de la sonda de captura, **2)** Bloqueo de la superficie, **3)** Hibridación homogénea, **4)** Hibridación heterogénea, **5)** Marcaje enzimático, **6)** Detección

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SELECCIÓN DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DEL ANALITO

El proceso de diseño de un genosensor comienza con la elección de la secuencia de ácidos nucleicos que se va a utilizar como diana. Esta debe ser lo más específica posible del patógeno que queremos detectar. Se busca una secuencia de ADN que no tenga cualquier otro ser vivo, y que, por tanto, pueda interferir en el análisis.

La capacidad de la *Salmonella* para adherirse y entrar en las células del epitelio intestinal es un paso esencial en el ciclo de la vida de estos microorganismos. Esta propiedad determina la virulencia del patógeno y está localizada en un grupo de genes denominados *invA*, *hilA* y la secuencia de inserción *IS200*, específica de este género^[5]. Todos estos genes han sido utilizados en el desarrollo de genosensores para la detección de la bacteria. En este trabajo se seleccionó como secuencia analito un fragmento de 80 bases del gen *invA* que se muestra en la **Tabla 1**:

5'-ATT TGA AGG CCG GTA TTA TTG ATG CGG ATG CCG CGC GCG AAC GGC GAA GCG
TAC TGG AAA GGG AAA GCC AGC TTT ACG GT-3'

Los criterios principales de elección de la secuencia son dos, la especificidad y la capacidad de ser ampliada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otro tipo de métodos de amplificación de ácidos nucleicos, por lo que se recomienda que su tamaño se restrinja a unas 100 bases.

Para comprobar la especificidad se introduce la secuencia en el programa BLAST^[21], donde es comparada con su base de datos que contiene secuencias de material genómico de todos los seres vivos. Se encuentran 91 secuencias entre 96-100% de igualdad (coincidencia en número de bases), que se corresponden entre un 99-100% al género *Salmonella* y no aparecen homologías significativas con otras especies.

Durante el proceso de operación del sensor es necesario que la secuencia diana forme un híbrido estable con las secuencias de captura e indicadora, por tanto, otra característica importante de la secuencia seleccionada como analito es su capacidad para formar estructuras secundarias, que deben destruirse durante el proceso de hibridación.

La estructura más estable de la secuencia analito seleccionada, obtenida del programa MFOLD^[22] se muestra en la **Figura 3**, esta estructura tiene una energía libre de Gibbs de -10.95 kcal/mol.

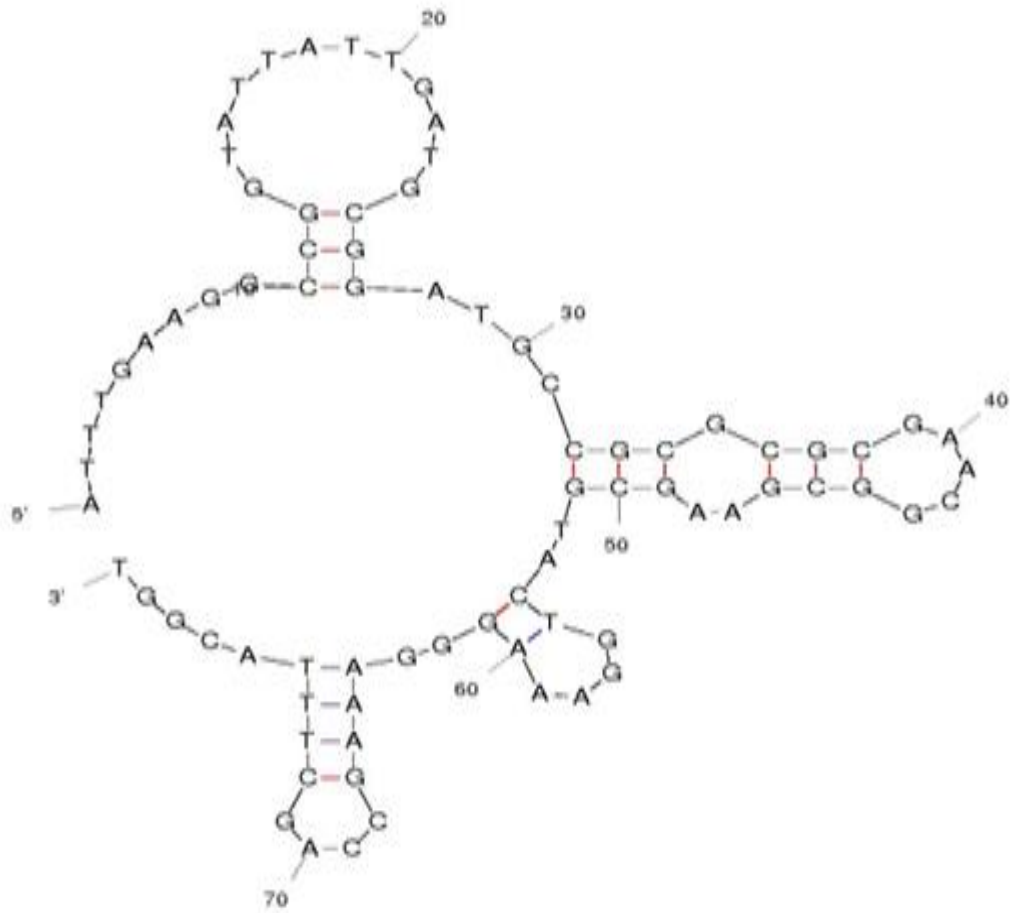


Figura 3. Estructura más estable de la secuencia analito.

4.2. DISEÑO DE LAS SECUENCIAS DE SONDA DE CAPTURA E INDICADORA.

Tal como se muestra gráficamente en el **Esquema 2**, el formato de ensayo seleccionado exige diseñar dos secuencias de ADN complementarias a distintas partes de la secuencia analito, una de ellas actuará como secuencia de captura y será, por tanto, inmovilizada sobre la superficie del transductor y la segunda funcionará como secuencia indicadora.

Al tener dos zonas de complementariedad se aumenta la selectividad del ensayo, aunque dividir la secuencia analito en dos partes no es trivial ya que no necesariamente proporciona los mejores resultados.

Para establecer la partición más adecuada para el diseño del ensayo se utiliza el programa MFOLD^[22], de acceso libre, que permite predecir la estructura secundaria de una cadena de ADN sencilla en unas determinadas condiciones de concentración salina y temperatura.

Se busca localizar secuencias con estructuras secundarias débiles que permitan hibridar con una barrera energética lo más pequeña posible con la secuencia analito.

La primera opción investigada fue seleccionar un fragmento de 30 nucleótidos complementarios al extremo 5' de la secuencia analito como sonda de captura y con los 50 nucleótidos restantes hasta el extremo 3', diseñar una sonda complementaria como indicadora (Figura 4).

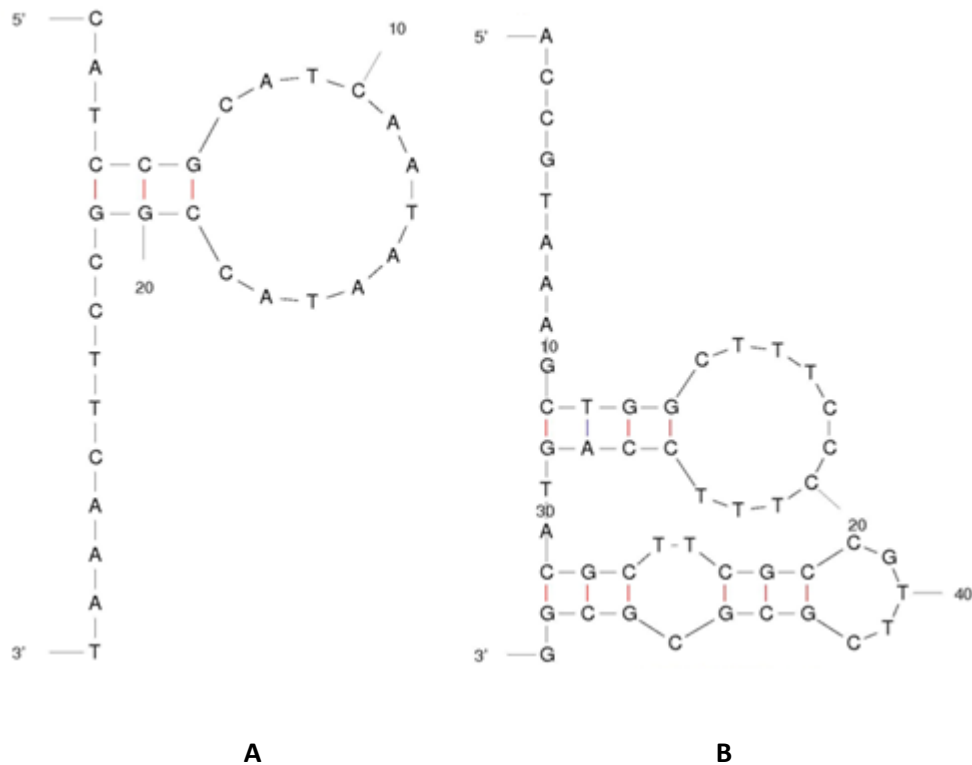


Figura 4. Estructura de las sondas. **A)** Captura de 30 nucleótidos, **B)** Detección de 50 nucleótidos.

Aunque la sonda de captura presenta una estructura secundaria muy débil ($\Delta G = 0.5$ kcal/mol), no sucede lo mismo con la sonda indicadora que presenta dos estructuras secundarias importantes a partir del nucleótido 10 aproximadamente con un $\Delta G = -6.15$ kcal/mol.

Por esta razón se fue aumentando la longitud de la secuencia de captura y disminuyendo la sonda indicadora con el objetivo de eliminar parcialmente su estructura secundaria, como situación de compromiso se seleccionaron una sonda de captura de 38 nucleótidos con un $\Delta G = -3.35$ kcal/mol y una sonda indicadora de 42 nucleótidos con un $\Delta G = -1.94$ kcal/mol (**Figura 5**).

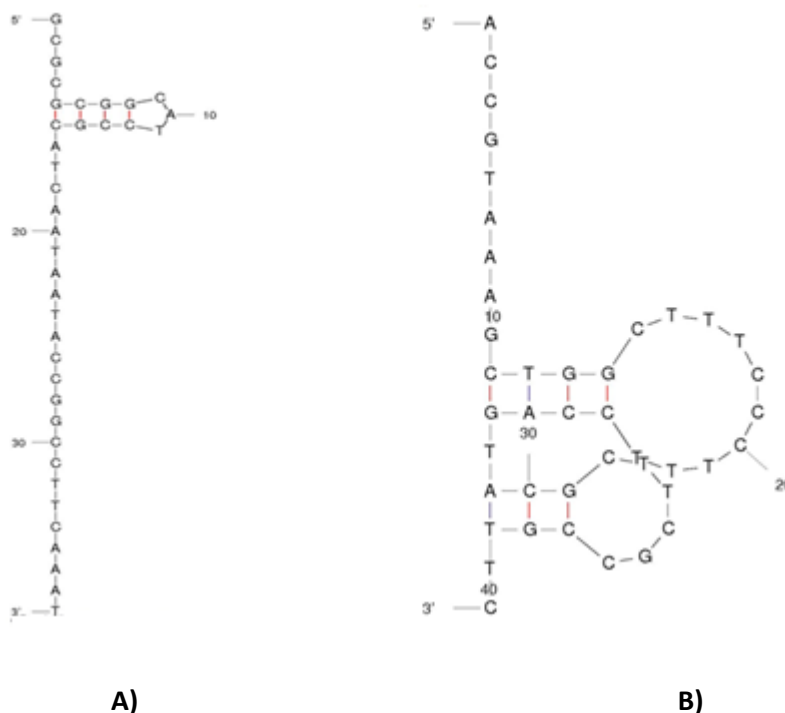


Figura 5. Estructuras secundarias de las sondas seleccionadas. **A)** Captura. **B)** Indicadora.

Desde el punto de vista de la espontaneidad de la hibridación ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$), la energía de formación del dúplex tiene que ser superior a la suma de todas las energías de las estructuras de las 3 secuencias de oligonucleótidos. Hay que tener en cuenta además que la formación del dúplex disminuye la entropía del sistema por lo tanto el término entrópico por la temperatura va en detrimento de la hibridación. Calculando con el MFOLD^[22] de la misma forma que los anteriores, se establece que la formación del dúplex tiene un $\Delta G = -128.3$ kcal/mol, siendo significativamente superior a la energía de las estructuras de las sondas.

4.3. ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LA FASE SENSORA

El empleo de monocapas basándose en la quimisorción para el desarrollo de genosensores ha sido ampliamente utilizado aprovechando la enorme afinidad que el grupo tiol tiene por el oro^[23]. Este grupo se incorpora en el extremo 3' de la sonda de captura, lo que

permite su inmovilización sobre el transductor, obteniendo así la fase de reconocimiento biológica.

El ordenamiento y comportamiento de estas monocapas depende de la propia secuencia de nucleótidos^[24], así como de la superficie sobre la que se inmoviliza.

El oro utilizado en este trabajo es depositado por sputtering sobre vidrio. Es poco frecuente el uso de este tipo de oro para el desarrollo de biosensores, siendo más común el uso de electrodos serigrafados de oro^[10c]

Con el fin de caracterizar nuestra superficie electródica se hace un seguimiento electroquímico de su superficie además de un estudio por AFM (Microscopía de fuerza atómica).

Los resultados obtenidos con la nueva fase sensora así como el estudio de la superficie serán comparados con electrodos serigrafados de oro. Se trata de un sistema de 3 electrodos serigrafados sobre un mismo soporte de alúmina. El electrodo auxiliar y el de referencia son de oro, mientras que el electrodo de pseudoreferencia es de plata al igual que los contactos eléctricos.

El experimento realizado es idéntico para ambos electrodos siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3.

También se realiza un estudio del comportamiento del 4-ATP como bloqueante mediante AFM, comparando los resultados obtenidos con el bloqueante por excelencia: el mercaptohexanol.

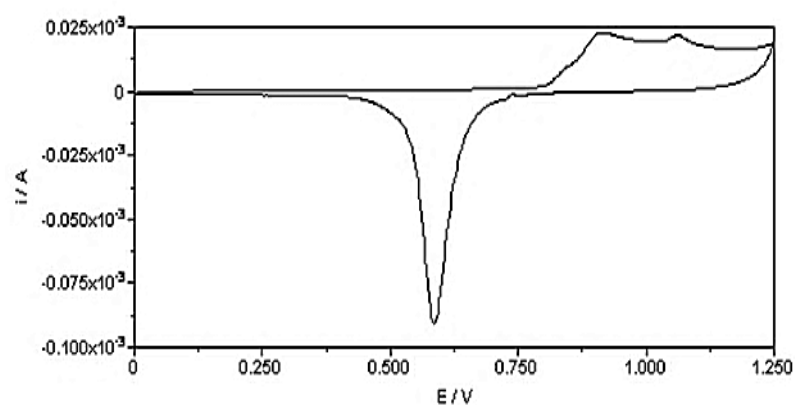
4.3.1. Estudio electroquímico de la superficie

Se puede estimar el área electroquímica a partir de la carga necesaria para formar o redissolver electroquímicamente una monocapa compacta en la superficie.^[25] Así la verdadera área del oro se puede obtener midiendo la carga necesaria para reducir una capa de óxidos de oro adsorbidos ($383 \mu\text{C}/\text{cm}^2$). La formación de los óxidos se realiza mediante voltametría cíclica entre 0.1 y 1.65 voltios en H_2SO_4 0.1 M.

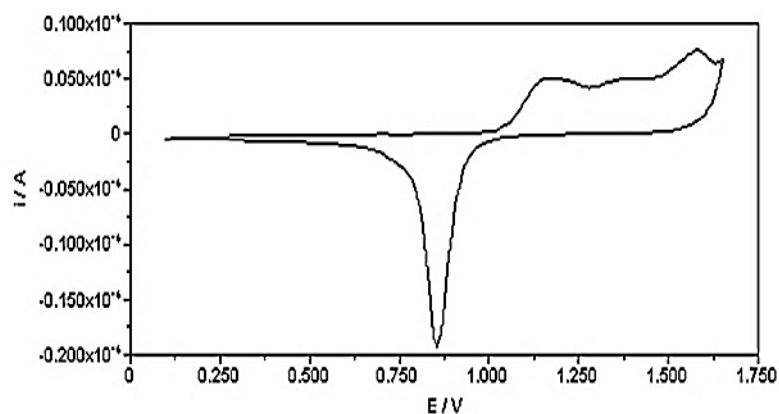
Dependiendo de la rugosidad de la superficie del transductor puede haber diferencias significativas entre el área geométrica de este y el área electroquímicamente activa. Por esta

razón, en primer lugar se determinó el factor de rugosidad de los nuevos electrodos en comparación con los electrodos serigrafiados de oro.

En la **Figura 6** se muestran los voltamperogramas cíclicos de los electrodos construidos y los serigrafiados. Como se puede observar la formación de los óxidos y la posterior reducción se producen a diferentes potenciales, esto se debe a que se utiliza distinto electrodo de referencia. Ag/AgCl con puente de KNO_3 saturado para los nuevos electrodos y un pseudo referencia de plata para los serigrafiados de oro.



A)



B)

Figura 6. Voltamperogramas cíclicos en H_2SO_4 0.1 M. **A)** Electrodo serigrafiado. **B)** Electrodo obtenido por *sputtering*.

Con los resultados obtenidos se hace un cálculo de la rugosidad de la superficie de los dos tipos de electrodos comparando el área electroquímica con el área geométrica ($A = \pi r^2$).

El radio de los electrodos obtenidos a partir de blancos de *sputtering* es 0.1 cm, la mitad del de los electrodos serigrafiados. En la **tabla 3** se muestran los resultados obtenidos observándose una diferencia apreciable en la rugosidad de cada tipo de electrodo.

	Área media (cm ²)	RSD (%)	Rugosidad media
Nuevos electrodos	0.036 ± 0.004	10.9	1.15
Serigrafiados	0.17 ± 0.04	19.4	1.59

Tabla 3. Comparativa de la rugosidad de la superficie de ambos electrodos. n=220 para los nuevos electrodos y n=20 para los electrodos serigrafiados

Los datos muestran que los electrodos serigrafiados de oro tienen una superficie más rugosa que los electrodos con oro depositado por *sputtering*, así como una desviación mayor. Por regla general un aumento de la rugosidad dificulta la hibridación de las sondas de ADN y aumenta las zonas de unión inespecífica.

4.3.2. Análisis de la superficie por AFM

La microscopia AFM sondea la superficie de una muestra con una punta muy aguda, de un par de micras de largo y menos de 100 Å de diámetro obteniendo un mapa topográfico de la superficie. Esta técnica se ha convertido en una de las más utilizadas en el análisis de superficies contribuyendo al entendimiento de la estructura y función de muestras biológicas. Su éxito en esta disciplina descansa en su habilidad para obtener imágenes de biomoléculas en condiciones ambientales^[24].

La rugosidad en AFM se expresa con el parámetro RMS *roughness*. Es un parámetro estadístico que se define como el valor cuadrático medio o RMS (del inglés *root mean square*). El nombre deriva del hecho de que es la raíz cuadrada de la media aritmética de los cuadrados de los valores. En este método se refiere a la desviación (negativa y positiva) respecto a una superficie plana ideal.

Las imágenes de AFM de los discos para la detección por SPR (**Figura 7**) muestran una distribución bastante homogénea con un RMS *roughness* de 4.8 nm. Es una rugosidad muy

baja, lo que está de acuerdo con los datos obtenidos en el análisis electroquímico de la superficie.

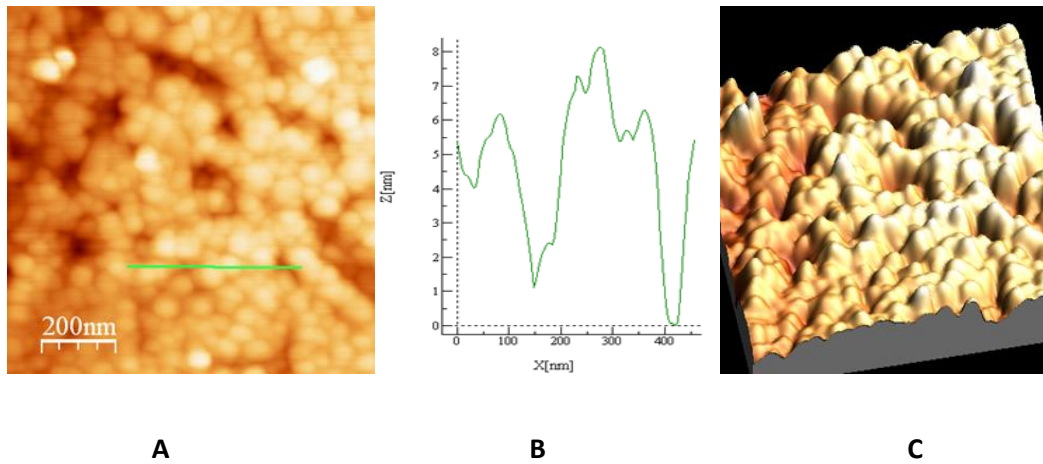


Figura 7. A) Imagen AFM $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$ de oro depositado por *sputtering* lavado con IPA y piraña. **B)** Variación de la rugosidad del oro a lo largo de la línea verde de la figura 13 A). **C)** Imagen de la figura 13 A) en 3D.

Por el contrario, el análisis topográfico de los electrodos serigrafados de oro muestran una rugosidad mucho mayor que la esperada teniendo en cuenta las pruebas electroquímicas. La rugosidad expresada en RMS *roughness* tiene un valor 245.5 nm. En la **Figura 8 B)** se muestra una zona concreta de la superficie con una variación de altura de más de 300 nm.

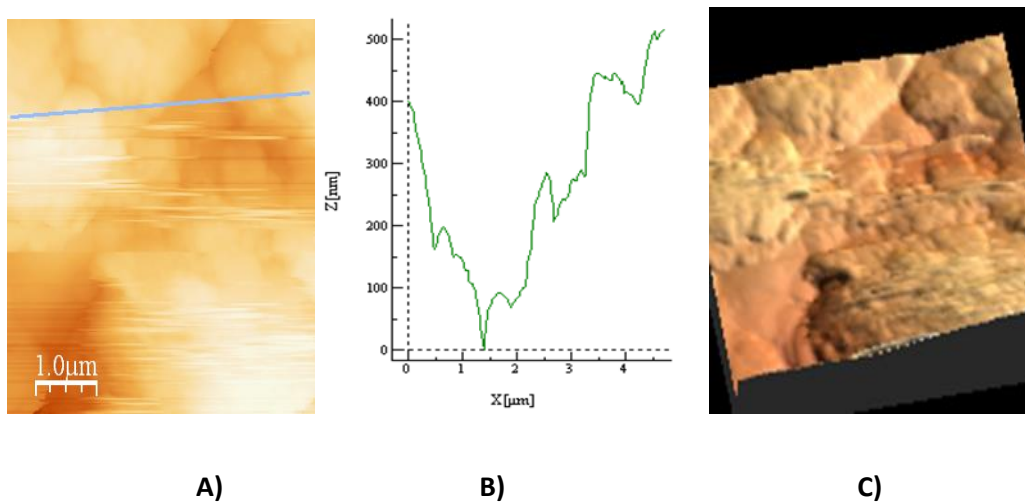


Figura 8. A) Imagen AFM de una sección oro serigrafiado limpiado electroquímicamente de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$. **B)** Variación de la superficie a lo largo de la línea azul de la figura 9 **A)**. **C)** Imagen en 3D de la figura 9 **A)**.

Para comparar los resultados obtenidos mediante ambos estudios de la superficie, se calculó la relación entre la rugosidad del electrodo serigrafiado y la de los nuevos electrodos (rugosidad relativa), tanto por los valores obtenidos por medidas electroquímicas como para los encontrados para AFM.

	Rugosidad electroquímica	RMS <i>roughness</i>	Rugosidad relativa
Serigrafiados	1.59	245.50	51.15
Nuevos electrodos	1.15	4.80	1.38

Tabla 4. Rugosidades relativas de los dos tipos de electrodos.

Esta diferencia observada se interpreta teniendo en cuenta que toda la superficie del electrodo serigrafiado en contacto con las diferentes disoluciones del ensayo no es únicamente oro, ya que existen aglomerantes en la tinta empleada en la preparación que no son conductores. Esto explica la elevada rugosidad relativa entre los nuevos electrodos y los serigrafiados que muestra el AFM.

Estas pruebas son más cualitativas que cuantitativas pero la enorme diferencia entre ambas rugosidades relativas nos proporciona una razón de peso para la interpretación anterior.

La menor rugosidad y la mayor homogeneidad mostradas por la superficie de oro seleccionada en este estudio favorecen las condiciones de hibridación y aumentan la densidad de sondas de captura inmovilizadas, mejorando las características del ensayo.

4.3.3. Comparación de la respuesta del sensor sobre ambos tipos de superficie

Para comparar las dos superficies de oro estudiadas desde el punto de vista operacional, se prepararon genosensores utilizando el protocolo descrito en la sección 3.3. empleando una concentración de sonda de captura de $1\ \mu\text{M}$ y $1\ \text{mM}$ de 6-mercaptohexanol

como bloqueante. En la **figura 9** se resumen los valores de las señales obtenidas para el blanco y para una concentración de secuencia diana 0.5 nM, tanto cuando se emplearon los electrodos serigrafados como cuando el soporte fueron los nuevos electrodos.

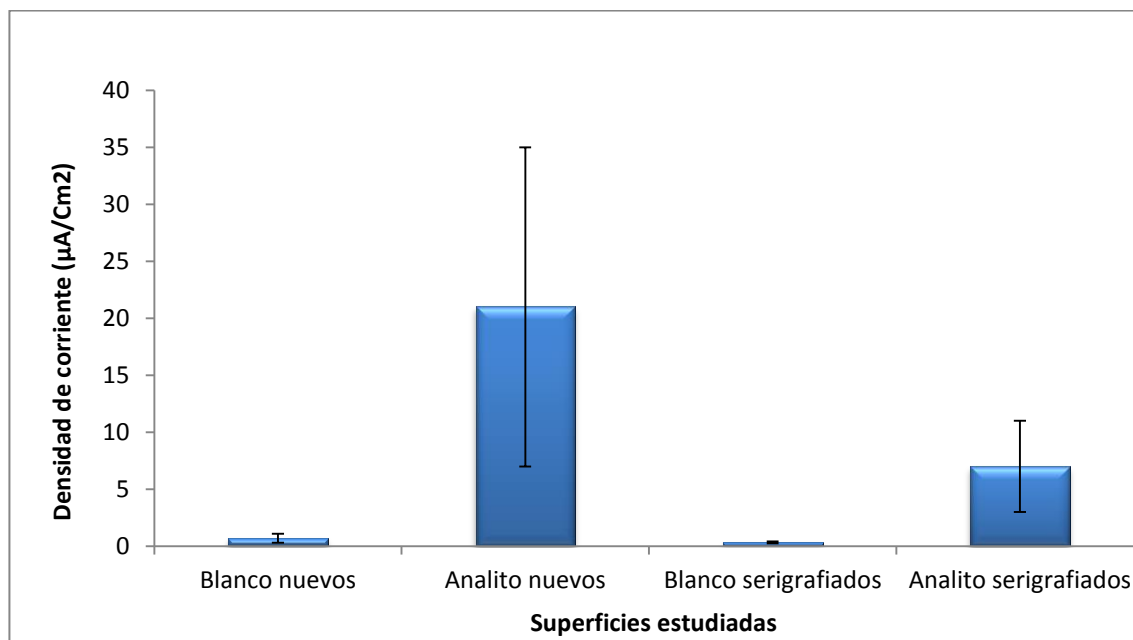


Figura 9. Densidad de corriente para los blancos y para 0.5 nM de analito en electrodos de oro depositados por *sputtering* y serigrafados.

A pesar de que las señales obtenidas sobre los nuevos electrodos, expresadas en densidad de corriente, son mayores, también los valores del blanco lo son, por tanto, en términos de señal/blanco (**Figura 10**), no se observan diferencias significativas entre ambos tipos de superficies cuando se utilizó 6-mercaptohexanol como bloqueante.

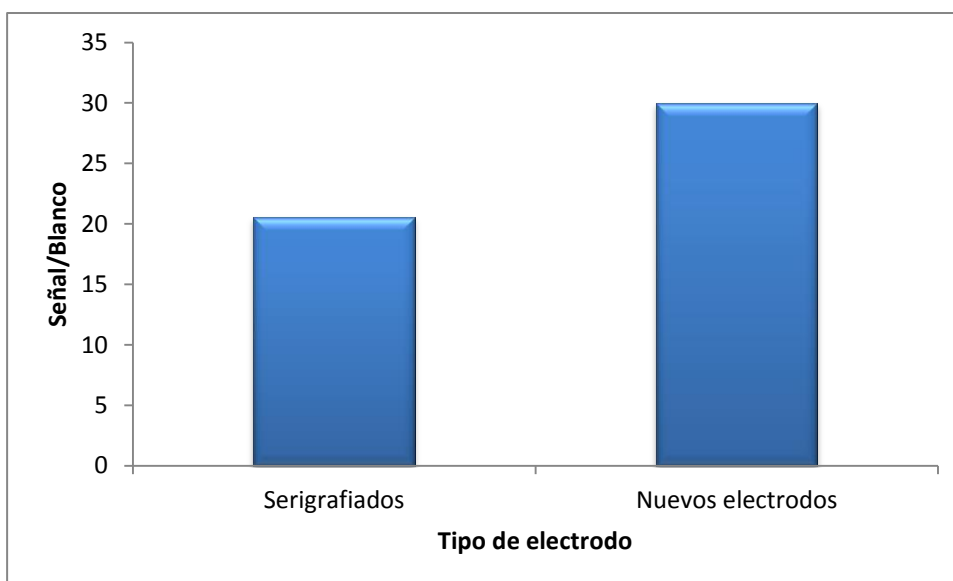


Figura 10. Relación señal/blanco entre los dos tipos de electrodos utilizando 6-mercaptophexanol como bloqueante.

4.3.4. El 4-ATP como bloqueante alternativo

El uso de bloqueantes con el fin de eliminar las uniones inespecíficas a la superficie electródica es muy común en los ensayos de genosensores. Esta práctica ha sido ampliamente descrita en muchos trabajos.

El 6-mercaptophexanol y el 11-undecanol como bloqueantes han sido las primeras opciones en los trabajos sobre oro^[26], mostrando una disminución importante de la señal de los blancos. Estos alcanotioles contribuyen además a desplazar las hebras de ADN adsorbidas a través de las bases al oro y orientan la sonda de captura de manera que la reacción de hibridación en superficie sea favorable.

En este trabajo se plantea utilizar el 4-ATP como bloqueante alternativo. No hay apenas trabajos que describan el 4-ATP como bloqueante. Se han hecho estudios de polimerización de 4-ATP inmovilizado y con anilina en disolución^[27] y se ha utilizado para inmovilizar sondas en superficie por medio de su grupo amino^[28], pero no se han realizado estudios de cómo influye este compuesto como bloqueante en la señal de un genoensayo.

Se pretende disminuir la señal de los blancos sacando provecho de las propiedades químicas derivadas del anillo aromático de su estructura. Se aumentaría el bloqueo de la

superficie debido a un empaquetamiento más compacto de la monocapa, producido por las interacciones π entre los anillos orientados en la superficie del electrodo.

Con el fin de definir cuál es el efecto sobre la superficie del 4-ATP como bloqueante se realizan medidas de microscopia de fuerza atómica.

En la **Figura 11** se muestran las imágenes de AFM de una sección de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$. El RMS *roughness* es de 2.35 nm. El valor ha disminuido respecto al medido en superficies de oro sin modificar, que presenta un RMS *roughness* de 4.80 nm.

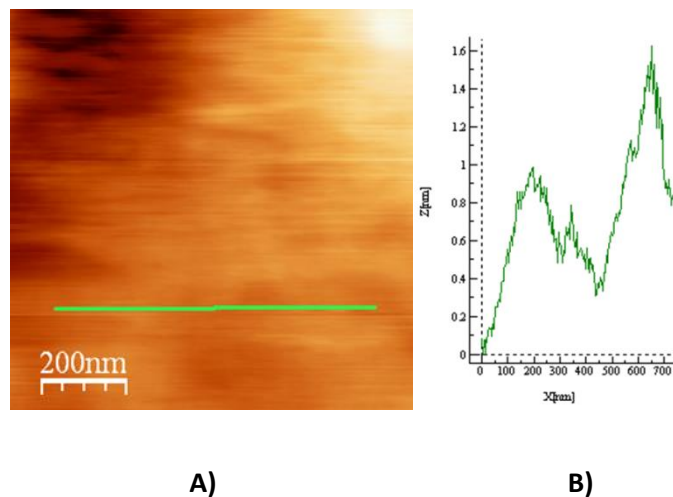


Figura 11. A) Imagen AFM de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$. **B)** Rugosidad de la superficie a lo largo de la línea verde.

La disminución del RMS *roughness* va pareja con una pérdida de relieve en la superficie como consecuencia de la inmovilización de 4-ATP, como muestra la **Figura 13** las superficies de oro depositado por *sputtering* y recubiertas de una monocapa de 4-ATP son mucho más homogéneas.

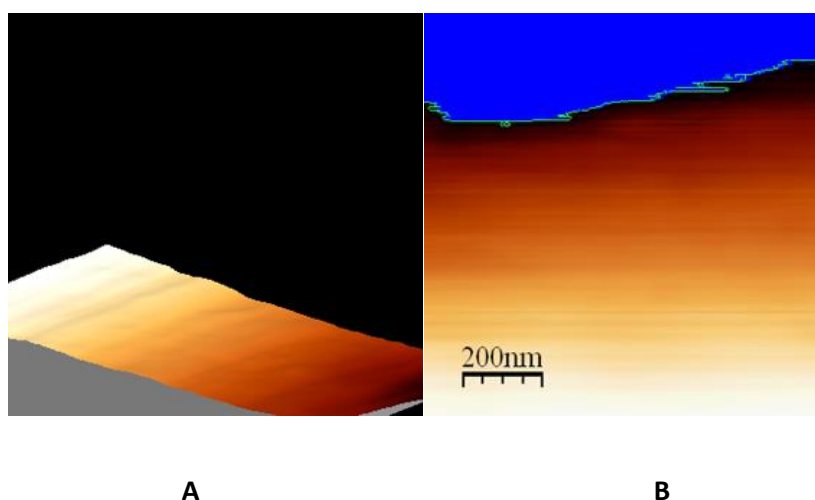


Figura 12. A) Imagen en 3D de la 16 A). B) Pérdida de relieve experimentado en la superficie.

La zona azul de la **Figura 12 B)** indica los puntos que se encuentran por debajo de 20 nm de altura. La pérdida de altura es progresiva a lo largo de toda la imagen, es decir, el 4-ATP elimina variaciones bruscas de altura entre puntos cercanos.

Una vez analizados los efectos del 4-ATP sobre la superficie se procedió a un estudio comparativo de la respuesta del sensor preparado sobre los nuevos electrodos empleando como bloqueante 4-ATP y uno de los más utilizados en estudios con genosensores: el 6-mercaptohexanol. El estudio se realizó siguiendo el protocolo de la sección 3.3. con 1 μM como concentración de sonda de captura y 1 mM como concentración de bloqueante.

Tipo de electrodo		Bloqueante	Densidad de corriente($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
Serigrafiados	Blanco	4-ATP	0.4 ± 0.3
	Blanco	6-mercaptohexanol	0.34 ± 0.09
	Analito	4-ATP	6 ± 4
	Analito	6-mercaptohexanol	7 ± 4
nuevos electrodos	Blanco	4-ATP	0.12 ± 0.03
	Blanco	6-mercaptohexanol	0.7 ± 0.4
	Analito	4-ATP	21 ± 8
	Analito	6-mercaptohexanol	21 ± 14

Tabla 5. Tabla resumen del estudio de la fase sensora. La concentración de analito es de 0.5 nM en todos los casos.

La nueva fase sensora con 4-ATP en su superficie comparada con la que utiliza electrodos serigrafiados, proporciona señales similares y blancos 3.5 veces inferiores como muestra la **Tabla 5**. Esta combinación proporciona una relación señal/blanco de 170, muy superior a cualquiera de las otras opciones estudiadas.

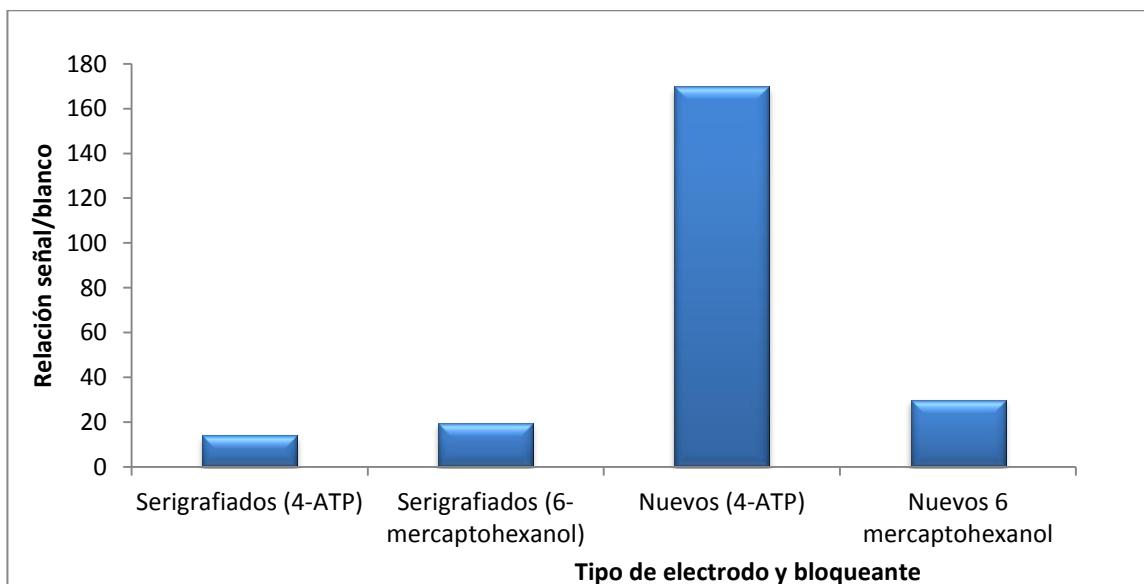


Figura 13. Relaciones señal/blanco de las diferentes combinaciones de superficie y bloqueante.

Cuando se emplea 6-mercaptohexanol como bloqueante en los nuevos electrodos se obtienen valores de blanco 5.8 veces superiores a los obtenidos en el diseño que utiliza 4-ATP. Además la reproducibilidad de las medidas es superior en el último caso. Por tanto, el uso del 4-ATP como bloqueante en combinación con los electrodos de oro obtenidos por *sputtering* es la mejor opción para la construcción de nuestro genosensor electroquímico.

Se ha analizado la fase sensora con el fin de comparar el nuevo ensayo con las prácticas más tradicionales, llegando a la conclusión de que la combinación de una superficie muy poco rugosa y homogénea con el 4-ATP como bloqueante, no solo disminuye la señal de los blancos, sino que también aumenta las señales de analito.

4.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE SONDA DE CAPTURA Y BLOQUEANTE

La optimización del diseño del sensor supone seleccionar las concentraciones de sonda de captura y bloqueante empleadas en su construcción. Como ambos factores pueden estar

relacionados, y un estudio de cada uno por separado podría conducir a conclusiones erróneas, se realizó un diseño factorial^[29] para estudiar el efecto conjunto de ambos factores sobre la respuesta del sensor a un nivel de concentración de secuencia de oligonucleótido diana fijo. El diseño factorial utilizado es 2^k , donde la base es el número de niveles que se consideran para cada factor (nombrados "alto" y "bajo") y el exponente es el número de factores estudiados (concentración de sonda de captura y bloqueante), por tanto, en este caso el diseño factorial es 2^2 .

Se plantean medidas aleatorizadas del blanco y del analito por separado con sensores construidos empleando todas las posibles combinaciones de los dos factores seleccionados por triplicado. La concentración de analito escogida para el estudio es de 0.5 nM. Como no existen referencias previas de estudios con 4-ATP se repite el análisis para tres niveles diferentes de concentración:

- 1) 0.01 a 0.1 μM de sonda de captura y 0.01 a 0.1 mM de bloqueante.
- 2) 0.1 a 1 μM de sonda de captura y 0.1 a 1 mM de bloqueante.
- 3) 0.5 a 5 μM de sonda de captura y 0.5 a 5 mM de bloqueante.

Los datos obtenidos para el primer intervalo se muestran en la **Tabla 6** donde las concentraciones alta y baja son cifradas con +1 y -1 respectivamente.

BLANCO					
Factor A(C.P en μM)	Factor B(BLOQ en mM)	Combinación	Y_1	Y_2	Y_3
1	1	(+1,+1)	0.44	0.35	0.44
1	0,1	(+1,-1)	0.95	1.11	1.03
0,1	1	(-1,+1)	0.18	0.35	0.26
0,1	0,1	(-1,-1)	1.09	1.34	1.39

A)

ANALITO					
Factor A(C.P en μM)	Factor B(BLOQ en mM)	Combinación	Y_1	Y_2	Y_3
1	1	(+1,+1)	11.20	9.56	10.51
1	0,1	(+1,-1)	9.15	9.91	10.06
0,1	1	(-1,+1)	0.58	0.57	0.49
0,1	0,1	(-1,-1)	0.94	1.22	1.11

B)

Tabla 6. Datos experimentales obtenidos para blanco y muestra para el intervalo 0.01 a 0.1 μM de sonda de captura y 0.01 a 0.1 mM de bloqueante. El valor denominado como y son las señales en $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. **A)** Blanco. **B)** Analito.

La suma de las señales (y) se utiliza para el cálculo de los efectos principales, que indican cual es la tendencia de cambio en la respuesta producida por un cambio en la concentración de los factores estudiados. Se denomina efecto principal A a la concentración de sonda de captura, B a la de bloqueante y AB a la interacción de ambos. En la **Tabla 7** se muestran los datos obtenidos (ecuaciones en el *Anexo I*)

Intervalos		Efecto principal A	Efecto principal B	Efecto principal AB
1)	Blanco	-0,049	-0,817	0,196
	muestra	9,245	0,084	0,627
2)	blanco	0,009	0,016	0,071
	muestra	-17,958	4,155	-0,0003
3)	blanco	-0,107	-0,119	0,182
	muestra	-4,631	0,155	-1,424

Tabla 7. Efectos principales de todos los intervalos de concentraciones se muestran en la página anterior.

Un valor positivo de un efecto principal indica que al aumentar dicha concentración produce un aumento en la señal, y al contrario en caso de ser negativo. La magnitud de él efecto principal nos indica como esa variación hace aumentar o disminuir la señal, un valor alto indica que una pequeña variación producirá un efecto significativo en la señal, es estadísticamente significativo.

Los resultados finales se expresan en términos de un modelo de regresión. Este modelo viene dado por la ecuación:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2$$

Donde β_1 y β_2 son los coeficientes de regresión de cada factor, β_0 es el término independiente, y β_{12} es el coeficiente que indica la interacción entre ambos factores. x_1 y x_2 son las diferentes combinaciones de las concentraciones cifradas (+1 y -1) posibles para ambos factores (ecuaciones en *Anexo I*). Los distintos coeficientes están relacionados con cada efecto principal correspondiente (A, B y AB), siendo:

$$\beta_1 = A/2$$

$$\beta_2 = B/2$$

$$\beta_{12} = AB/2$$

De este modo obtenemos los modelos de regresión ajustados para cada señal de respuesta.

El coeficiente β_{12} es proporcional a la interacción entre sonda de captura y bloqueante e influye en la variación de la señal del analito con la concentración. El efecto principal AB del blanco del intervalo 2) (**Tabla 7**) pone de manifiesto la interacción entre ambos factores. Es el efecto principal con mayor peso estadístico de los tres y justifica la realización de este análisis.

En el intervalo de concentraciones de 0.01 a 0.1 μM de sonda de captura y 0.01 a 0.1 mM de bloqueante (intervalo 1) el blanco se ve afectado de manera significativa por la concentración de bloqueante empleada para la construcción del sensor como se aprecia en la **Figura 14**. El aumento de la concentración de sonda de captura no produce apenas variación en la densidad de corriente correspondiente al blanco.

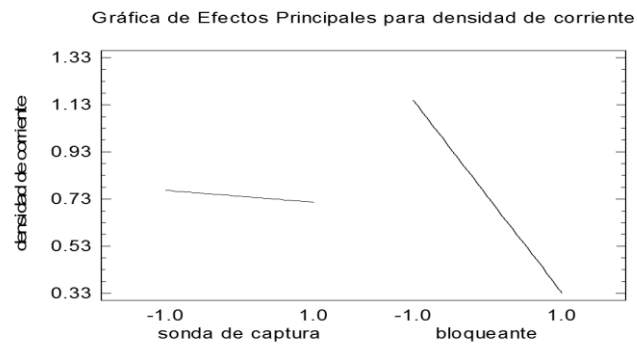


Figura 14. Variación de la densidad de corriente del blanco en el intervalo 1).

La señal para 0.5 nM en cambio se ve más influenciada por el aumento la sonda de captura, produciendo un aumento de la densidad de corriente de 10 veces como se ve en la **Figura 15**. En este caso el efecto del bloqueante es despreciable.

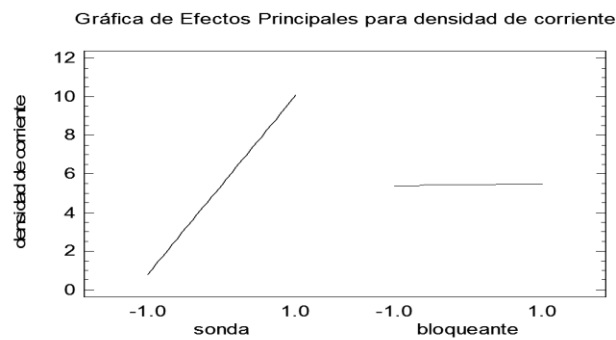


Figura 15. Variación de la densidad de corriente del analito en el rango 0.01 a 0.1 μM .

La interacción entre ambos factores es despreciable para la muestra, pero el efecto de la concentración de bloqueante sobre el blanco depende de la concentración de sonda tal y como muestra la **Figura 16**.

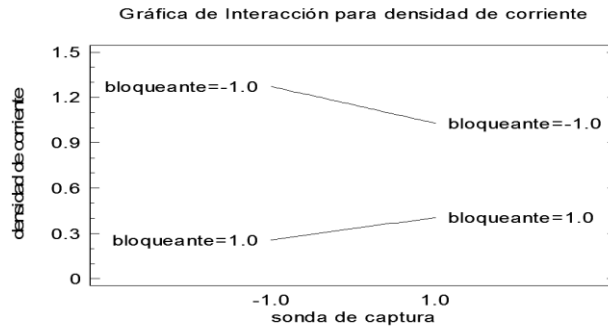


Figura 16. Interacción entre ambos factores para el intervalo 1).

Con el modelo de regresión obtenido por separado para blanco y analito se construye un modelo para representar como varía la relación señal/blanco con los dos factores de diseño estudiados (**Figura 17**), observándose un máximo para 0.1 μM de sonda de captura y 0.1 mM de bloqueante y una relación señal/blanco de aproximadamente 25.

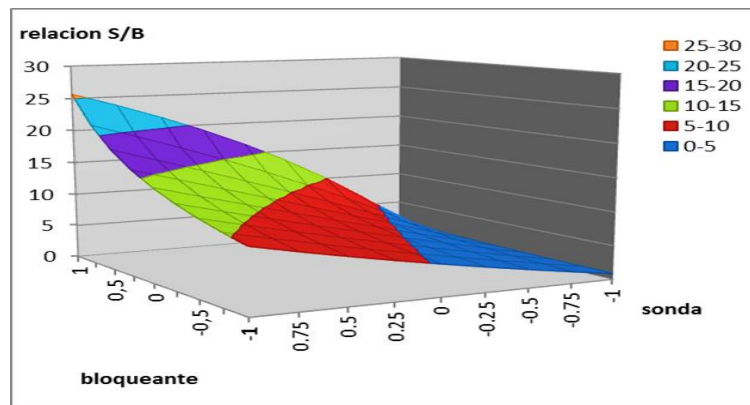
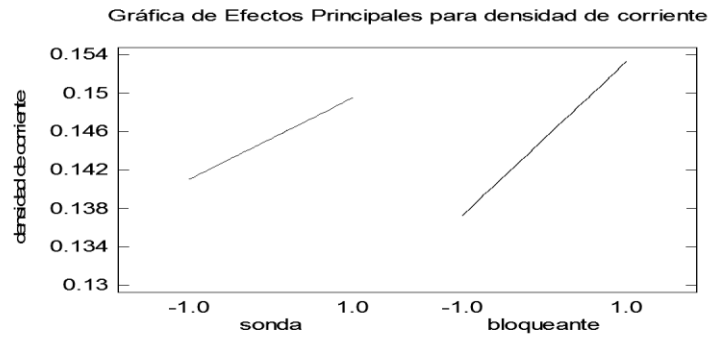
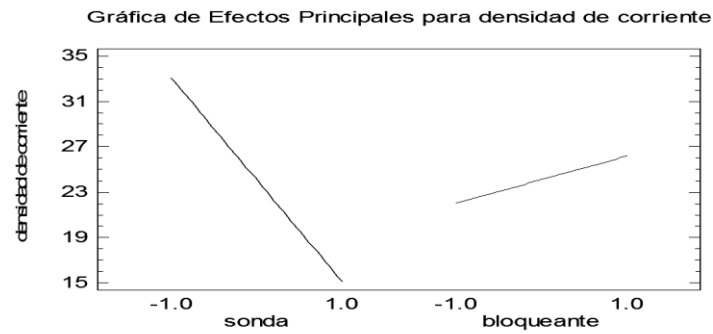


Figura 17. Relación señal/blanco del rango 0.01 a 0.1 μM de sonda de captura y 0.01 a 0.1 mM de bloqueante.

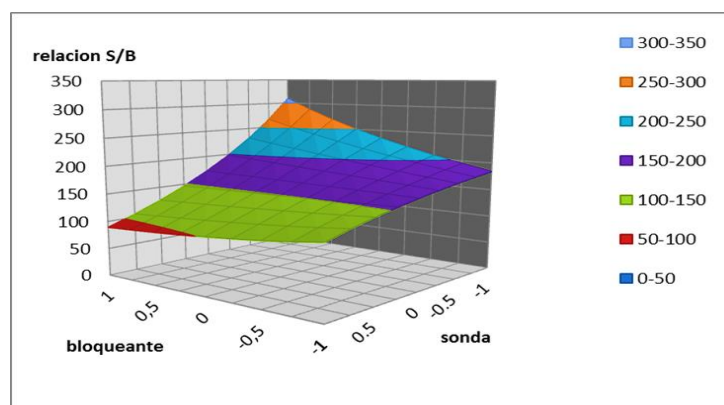
Del mismo modo se hace un estudio de la influencia de los factores en el intervalo de concentraciones 0.1 a 1 μM de sonda de captura y 0.1 a 1 mM de bloqueante (intervalo 2). No se observa en este intervalo de concentraciones un efecto significativo de ambos factores sobre el blanco, midiéndose una variación máxima de 0.02 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$.



A)



B)



C)

Figura 18. Análisis de la influencia de factores en el rango 0.1 a 1 μ M de sonda de captura y 0.1 a 1 mM de bloqueante. **A)** Blanco. **B)** Analito. **C)** Relación señal/blanco.

En la **Figura 18 B)** destaca la influencia que tiene sobre la señal la concentración de la sonda inmovilizada en el oro. Un aumento de la concentración tiene un efecto muy negativo, contrario al observado para el mismo factor en el intervalo 1) de concentraciones de sonda de captura. Estos datos nos indican que una saturación de sonda de captura dificulta la hibridación y perjudica el ensayo.

La relación señal/blanco para una concentración de analito 0.5 nM alcanza en este intervalo un valor extraordinariamente alto (300), para una concentración de sonda de captura 0.1 μM y 1 mM de bloqueante.

La interacción entre ambos factores para el blanco en este intervalo es muy significativa, el efecto principal AB es mayor que A y B y ejerce mayor influencia sobre la señal. Este efecto se puede ver con claridad en la **Figura 19**.

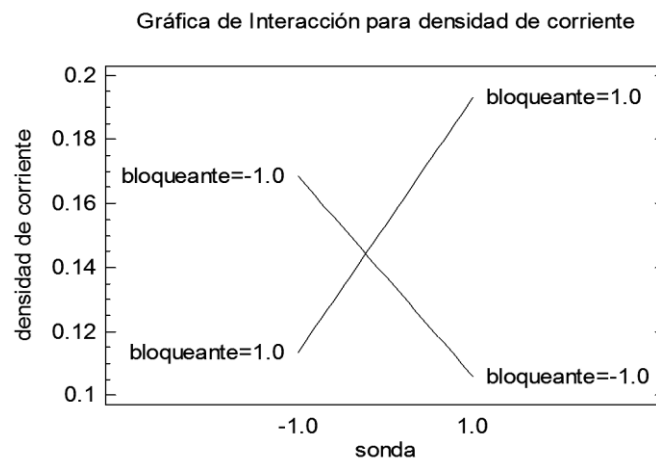
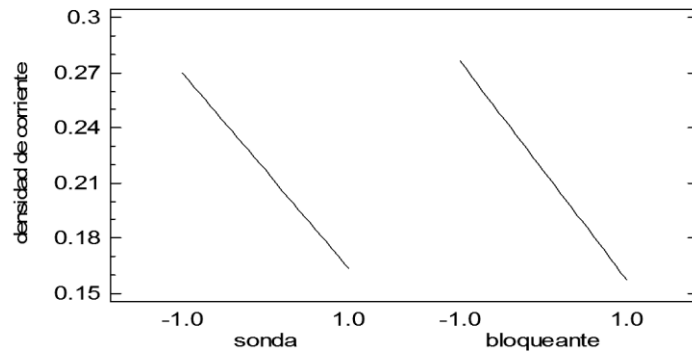


Figura 19. Interacción entre ambos factores para el intervalo 2).

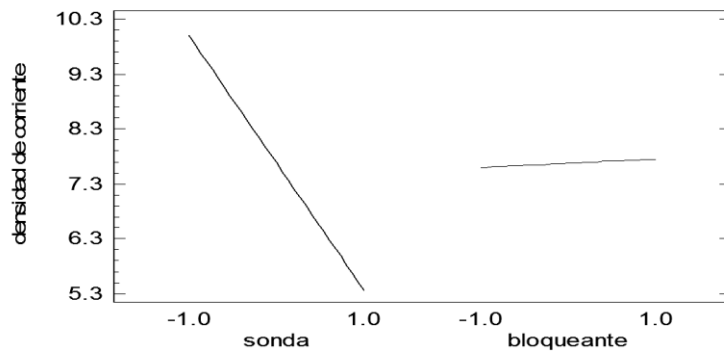
El estudio en el intervalo de concentraciones 0.5 a 5 μM de sonda de captura y 0.5 a 5 mM de bloqueante que se muestra en la **Figura 20** confirma el estudio anterior, viéndose la tendencia en la **Figura 18 B)**. De nuevo en este intervalo se pone de manifiesto que el aumento de las concentraciones de sonda tiene un efecto negativo muy significativo sobre la señal de analito, siendo el efecto del bloqueante despreciable.

Gráfica de Efectos Principales para densidad de corriente

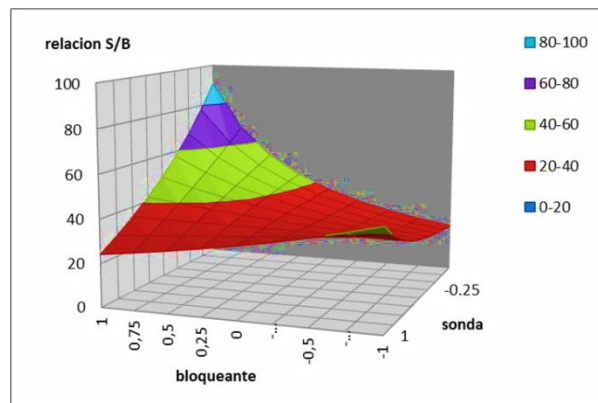


A)

Gráfica de Efectos Principales para densidad de corriente



B)



C)

Figura 20. Análisis del intervalo 0.5 a 5 μM de sonda de captura y 0.5 a 5 mM de bloqueante.

A) Blanco. **B)** Analito. **C)** Relación señal/blanco.

La relación señal/blanco es aproximadamente de 90, obteniéndose un máximo para la concentración más baja dentro del intervalo. La interacción entre factores es de nuevo significativa para el blanco como muestra la **figura 21**.

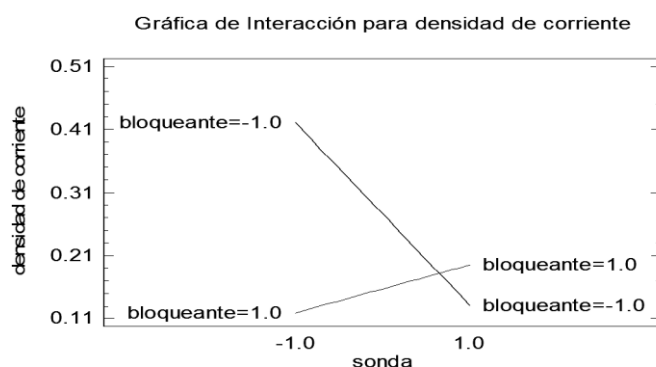


Figura 21. Interacción para ambos factores en el intervalo 3.

Por tanto, del estudio se puede concluir que:

- Las interacciones entre factores dentro de los intervalos estudiados influyen más en los valores medidos para los blancos.
- A concentraciones saturantes de sonda de captura, la hibridación está más impedida con el aumento de sondas inmovilizadas, en cambio, a concentraciones menores el aumento de ésta produce un aumento de la señal.
- Se establece un óptimo de concentraciones en 0.1 μM de sonda de captura y 1 mM de 4-ATP, obteniéndose en estas condiciones una relación señal blanco de más de 300 para 0.5 nM de analito.

4.5. Características analíticas del genosensor

Una vez seleccionadas las condiciones de diseño más adecuadas de la fase sensora con el objetivo, con el objetivo de obtener la máxima relación señal/blanco, se procedió a caracterizar su respuesta. Se hicieron medidas para concentraciones crecientes de analito para establecer la sensibilidad, la linealidad y la reproducibilidad del método desarrollado.

Todas las medidas se hicieron por triplicado con sensores construidos utilizando una concentración 0,1 μM de sonda de captura y 1mM de 4-ATP.

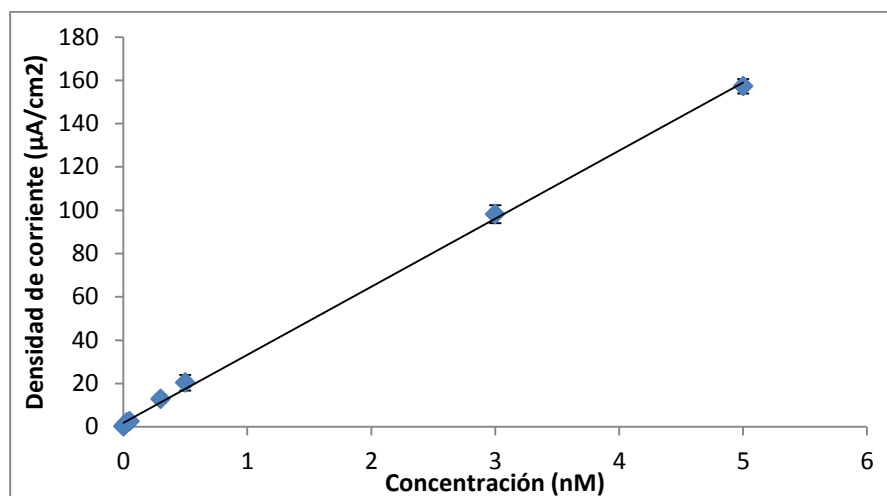


Figura 24. Respuesta del sensor a la concentración de secuencia analito.

La ecuación de calibración es:

$$\text{Densidad de corriente } (\mu\text{A}/\text{cm}^2) = (31.4 \pm 0.5)[\text{analito}]/\text{nM} + (1.9 \pm 0.9)$$

$$r^2=0.999 \quad n=3$$

Por tanto podemos concluir que las características de respuesta del genosensor desarrollado son:

Intervalo lineal: El ensayo tiene un intervalo de linealidad de 3 órdenes de magnitud en el rango de concentraciones estudiadas (0.005-5 nM).

Reproducibilidad: Para niveles de concentración bajos el sensor muestra una reproducibilidad aceptable y puede considerarse buena a niveles altos. La desviación estándar relativa de la respuesta expresada como coeficiente de variación (CV) es de 37.1 % y de 2.2 % al nivel de concentración 5 nM.

Límite de detección: Para determinar la sensibilidad del genosensor se tuvieron únicamente en cuenta los tres últimos puntos del calibrado. Se calculó multiplicando tres veces la desviación del blanco dividido entre la pendiente de la recta, obteniéndose un valor de 3.1 pM.

5. CONCLUSIONES

1) La fabricación de electrodos de oro a partir de sensores de SPR reciclados ha demostrado ser una operación relativamente sencilla (12 minutos por pieza) y válida para su uso en la preparación de genosensores electroquímicos. Se ha caracterizado la superficie electródica resultante mediante técnicas electroquímicas y microscopía de fuerza atómica (AFM), observándose una rugosidad mucho menor de la presentada por los electrodos serigrafiados de oro, utilizados habitualmente para el mismo fin.

2) La relación señal/blanco obtenida en el genoensayo fue de 170 utilizando estos electrodos de oro y de 14,2 utilizando electrodos de oro serigrafiados en igualdad de condiciones experimentales. La señal obtenida en promedio de 5 mediciones y expresada en densidad de corriente referida al área proyectada fue 3,5 veces superior en los electrodos descritos en este trabajo, en comparación con los serigrafiados.

3) En el estudio del comportamiento del 4-aminotiofenol como agente bloqueante, las imágenes de AFM muestran una pérdida de relieve de la superficie del oro, disminuyendo la rugosidad. En el estudio electroquímico comparativo con el 6-mercapto-1-hexanol como bloqueante se llegó a la conclusión de que el 4-aminotiofenol es más efectivo, disminuyendo la señal del blanco por un factor de 5,8 en comparación con el bloqueante alifático.

4) Se ha evaluado el efecto de la concentración de la sonda de captura y del bloqueante sobre la señal mediante un estudio factorial 2^2 . En los intervalos de concentraciones altas el aumento de la concentración de sonda de captura disminuye la señal, mientras que a concentraciones bajas dicho aumento de sonda es beneficioso. Con este estudio se obtuvo un valor óptimo de relación señal/blanco a 0.1 μM de sonda de captura y 1mM de 4-ATP.

5) El genosensor propuesto muestra un intervalo dinámico lineal hasta 5 nM, una reproducibilidad buena para niveles de concentración de analito altos y aceptable para bajos, además presenta un límite de detección de 3.1 pM.

6.REFERENCIAS

- [1] D. G. Newell, M. Koopmans, L. Verhoef, E. Duizer, A. Aidara-Kane, H. Sprong, M. Opsteegh, M. Langelaar, J. Threfall, F. Scheutz, J. van der Giessen, H. Kruse, *International Journal of Food Microbiology* **2010**, *139 Suppl 1*, S3-15.
- [2] I.C.M.S.F. Foods, *Microorganisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens*, Springer, **1996**.
- [3] A. W. W. Association, *Waterborne pathogens*, American Water Works Assoc., **2006**.
- [4] S. Susmel, G. G. Guilbault, C. K. O'Sullivan, *Biosensors and Bioelectronics* **2003**, *18*, 881-889.
- [5] A. P. Suárez, *Trabajo Fin de Máster "Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas"*, Universidad de Oviedo **2012**.
- [6] S. D. Saroj, R. Shashidhar, M. Karani, J. R. Bandekar, *Molecular and cellular probes* **2008**, *22*, 201-206.
- [7] P.-Y. Cheung, K. M. Kam, *Food Research International* **2012**, *45*, 802-808.
- [8] (a) H. Kuang, G. Cui, X. Chen, H. Yin, Q. Yong, L. Xu, C. Peng, L. Wang, C. Xu, *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, *14*, 8603-8610; (b) L. Wang, C. S. Wu, X. Fan, A. Mustapha, *International Journal of Food Microbiology* **2012**, *156*, 83-87.
- [9] F. G. Banica, *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*, Wiley, **2012**.
- [10] (a) N. González-Escalona, E. W. Brown, G. Zhang, *Food Research International* **2012**, *48*, 202-208; (b) L. Belloy, L. Decrausaz, P. Boujon, H. Hachler, A. S. Waldvogel, *Veterinary microbiology* **2009**, *138*, 373-377; (c) G. Carpini, F. Lucarelli, G. Marrazza, M. Mascini, *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, *20*, 167-175.
- [11] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, a. G. M. Whitesides, *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 1103-1169.
- [12] (a) S. Ferretti, S. Paynter, D. A Russell, K. E. Sapsford, D. J. Richardson, *Trends in analytical chemistry* **2000**, *19*, 530-540; (b) N. K. Chaki, K. Vijayamohan, *Biosensors & Bioelectronics* **2002**, *17*, 1-12; (c) J. J. Gooding, G. C. King, *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15*, 4876; (d) S. K. Arya, P. R. Solanki, M. Datta, B. D. Malhotra, *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *24*, 2810-2817.
- [13] (a) K. Kerman, D. Ozkana, P. Kara, B. Meric, J. J. Gooding, M. Ozsoz, *Analytica Chimica Acta* **2002**, *462*, 39-47; (b) A. Bardea, A. Dagan, I. Willner, *Analytica Chimica Acta* **1999**, *385*, 33-43; (c) X. Sun, P. He, S. Liu, J. Ye, Y. Fang, *Talanta* **1998**, *47*, 487-495.
- [14] R. Levicky, T. M. Herne, M. J. Tarlov, a. S. K. Satija, *Journal of American Chemical Society* **1998**, *120*, 9787-9792.
- [15] T. M. Herne, M. J. Tarlov, *Journal of American Chemical Society* **1997**, *119*, 8916-8920.
- [16] R. Lao, S. Song, H. Wu, L. Wang, Z. Zhang, L. He, C. Fan, *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 6475-6480.
- [17] M. Yang, M. E. McGovern, M. Thompson, *Analytica Chimica Acta* **1997**, *346*, 259-275.
- [18] S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, L. D. McPherson, A. B. Potter, E. M. Spain, M. J. Allen, M. G. Hill, *Langmuir* **1998**, *14*, 6781-6784.
- [19] F. Ricci, R. Y. Lai, A. J. Heeger, K. W. Plaxco, J. J. Sumner, *Langmuir* **2007**, *23*, 6827-6834.
- [20] J. Zhang, H. Qi, Y. Li, J. Yang, Q. Gao, C. Zhang, *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 2888-2894.
- [21] Base de datos del Centro Nacional para la información biotecnológica. National Center for biotechnology Information (NCBI), (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)
- [22] M. Zucker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res.*, 2003, *31*, p: 3406-3415
- [23] O. Y. Henry, J. G. Perez, J. L. Sanchez, C. K. O'Sullivan, *Biosensors & Bioelectronics* **2010**, *25*, 978-983.
- [24] D. Lallemand, M. H. Rouillat, V. Dugas, Y. Chevolut, E. Souteyrand, M. Phaner-Goutorbe, *Journal of Physics: Conference Series* **2007**, *61*, 658-662.

- [25] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications 2nd Ed.* John Wiley & Sons, **2001**, 167.
- [26] S. E. Creager, K. G. Olsen, *Analytica Chimica Acta* **1995**, *307*, 277-289.
- [27] Y. Bardavid, J. Ghabboun, D. Porath, A. B. Kotylar, S. Yitzchaik, *Polymer* **2008**, *49*, 2217-2222.
- [28] A. Liu, K. Wang, S. Weng, Y. Lei, L. Lin, W. Chen, X. Lin, Y. Chen, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2012**, *37*, 101-111.
- [29] M. Iglesias de la Arada, *Trabajo Fin de Máster "Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas"*, Universidad de Oviedo **2012**.

ANEXO I

Efecto principal A	$A = \frac{(y_2+y_4)-(y_1+y_3)}{2n}$
Efecto principal B	$B = \frac{(y_3+y_4)-(y_1+y_2)}{2n}$
Efecto principal AB	$AB = \frac{(y_4-y_3)-(y_2-y_1)}{2n}$

Figura 1. Ecuaciones empleadas para obtener los datos numéricos de la **tabla 7**. Siendo n el número de réplicas del ensayo, y_4 es la combinación de concentraciones (+1,+1), y_2 (+1,-1), y_3 (-1,+1) y y_1 (-1,-1).

$$x_1 = \frac{[CP] - \left\{ \frac{[CP]_{BAJA} + [CP]_{ALTA}}{2} \right\}}{\left\{ \frac{[CP]_{ALTA} + [CP]_{BAJA}}{2} \right\}}$$

$$x_2 = \frac{[BLOQ] - \left\{ \frac{[BLOQ]_{BAJA} + [BLOQ]_{ALTA}}{2} \right\}}{\left\{ \frac{[BLOQ]_{ALTA} + [BLOQ]_{BAJA}}{2} \right\}}$$

Figura 2. Ecuaciones empleadas para el cálculo de las concentraciones reales a partir de las variables cifradas.