DESARROLLO DE UN DETECTOR DE ANOMALÍAS CELULARES ASOCIADAS AL CÁNCER

LINDA ESPERANZA BERTEL GARAY

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE FÍSICA
BUCARAMANGA
2023

DESARROLLO DE UN DETECTOR DE ANOMALÍAS CELULARES ASOCIADAS AL CÁNCER

LINDA ESPERANZA BERTEL GARAY

Trabajo de Grado para optar al título de Doctora en física

Directores

David Alejandro Miranda Mercado, PhD.

Ciencia de Materiales Biológicos y Semiconductores (CIMBIOS)

José Miguel García-Martín, PhD.

Instituto de Micro y Nanotecnología, IMN-CNM, CSIC, España

Rogelio Ospina Ospina, PhD.

Ciencia de Materiales Biológicos y Semiconductores (CIMBIOS)

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE FÍSICA
BUCARAMANGA
2023

An	mi esposo, Jose Miguel Ayala Troconis
mecanismo del amor, lo interru siente?». José Arcadio le dio una temblor	xplicaba con muchos pormenores el umpió para preguntarle: «¿Qué se respuesta inmediata: —Es como un r de tierra." arcía Márquez. Cien años de soledad.

AGRADECIMIENTOS

El camino hacía obtener el título de Doctor(a) está lleno de aprendizaje y cooperación, un doctorado no se realiza solo, se necesita de otros investigadores, profesores y amigos que puedan aportarte ideas, conocimiento, materiales, equipos y, no menos importante, una palabra de ánimo cuando los experimentos no dan los resultados esperados. Así que, he aquí mis agradecimientos más profundos y sinceros a quienes hicieron parte de mi proceso de formación como doctora.

He contado con el mejor maestro de ciencias, pues El creó la ciencia, gracias a Dios por darme la vida y la pasión para investigar, por su respaldo y dirección en esta investigación, por darme la inspiración para escribir mis publicaciones y esta tesis doctoral.

A mis padres, Rocio Garay y Julio Bertel, a mis hermanos Danny y Julio Cesar por siempre creer en mí, por darme motivación y fortaleza en cada momento de mi vida.

A mi esposo, Jose Miguel Ayala, por acompañarme y ayudarme a superar cada obstáculo en este camino del doctorado, con su amor, sus ideas y comprensión cuando debí dedicar horas extras a mi trabajo en el laboratorio. El me ha motivado a ser cada vez mejor y más diligente en mi investigación.

Un agradecimiento profundo hacía mi director y amigo, David Miranda, porque he aprendido de el ciencia, disciplina, optimismo y trabajo en equipo, priorizando siempre la humanidad antes que los resultados. Gracias por todo el conocimiento y las conversaciones de ánimo y esperanza cuando los momentos fueron los más duros e inesperados.

Al profe Rogelio, le debo toda la paciencia, el acompañamiento y la formación en las técnicas de ablación láser, deposición por láser pulsado, en el análisis por XPS, y el trabajo en general en el laboratorio.

Al investigador Jose Miguel García, por enseñarme con tanto detenimiento y con fundamentos las técnicas de vacío y la microscopía de fuerza atómica. Por los consejos para mi crecimiento y desarrollo en el campo de la investigación y por todas las enseñanzas en la escritura y publicación de artículos. Por organizar los planes culturales en Madrid junto con las compañeras del grupo de investigación, de los cuales siempre aprendía un poco más de la cultura española.

A la profesora Stelia Mendez, por sus invaluables y oportunas asesorías en los temas bioquímicos y facilitarme los espacios, materiales y equipos del laboratorio 402 del parque tecnológico de Guatiguará.

A Sergio Rincón, por ayudarme con los montajes "pesados" que necesité en varias ocasiones, por todos los análisis por XPS y por las madrugadas para apoyarme con experimentos.

A Sandra Corzo y Edgar Pinzón, por aportarme sus conocimientos e ideas para el diseño de mis experimentos de electroquímica.

A los laboratorios de Ciencia de Superficies-SurfLab, de Espectroscopia y de Microscopia del parque Tecnológico de Guatiguará-UIS por los análisis de XPS, Raman e imágnes SEM, respectivamente.

A la Universidad Industrial de Santander y la escuela de Física, por la financiación prestada durante todos los semestres de mi doctorado a través del crédito condonable.

Al consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), España, por el programa ICOOP-2018, por medio del cuál pude realizar dos pasantías de investigación en el Instituto de Micro y Nanotecnología (IMN) en Tres Cantos, Madrid, tener financiación para materiales y servicios, y contar con la co-dirección de un investigador del CSIC en mi trabajo doctoral.

A las investigadoras, María Ujué González, Sahba Mobini, y Blanca Limones por haberme acogido tan bien durante mis pasantías en el IMN, por todo su apoyo y aportes para mi trabajo.

A María y Santiago, porque fueron mi familia en tierras lejanas, por abrirme las puertas de su casa y darme el apoyo que tanto necesité durante esos meses en Madrid, por mostrarme la cultura y esos lugares encantadores de la ciudad, por presentarme al "tinto de verano" y a "la tortilla de patatas" pero más importante, gracias por la amistad que quedará por siempre.

A Catalina García, mi líder espiritual por recordarme siempre la fidelidad de Dios y ayudarme a mantener la fe aun en los momentos más duros de mi doctorado.

Linda Bertel.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	22
1. ESTADO DEL ARTE	27
1.1. PREPARACIÓN DE NANOESTRUCTURAS DE TiO_2	29
1.1.1. Anodización electroquímica	29
1.1.2. Pulverización Catódica	31
1.1.3. Deposición por láser pulsado	33
1.2. DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA	36
1.2.1. Voltamétrica/Amperométrica	37
1.2.2. Potenciométrica	39
1.2.3. Impedimétrica	41
1.3. FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES DE TiO_2 CON BIOMOLÉC	ULAS 44
2. FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DELGADAS F	·UN-
CIONALIZADAS CON ÁCIDO FÓLICO	50
2.1. INTRODUCCIÓN	50
2.2. METODOLOGÍA	52
2.2.1. Deposición de películas delgadas por PLD reactivo	52
2.2.2. Funcionalización de películas delgadas con ácido fólico	54
2.2.3. Caracterización	54
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
2.3.1. Películas delgadas	56
2.3.2. Funcionalización de películas delgadas	65
2.4 CONCLUSIONES	70

3. APLICACIÓN DEL DETECTOR FABRICADO EN EL RECONOCIMIENTO	
DE RECEPTORES DE FOLATO	81
3.1. INTRODUCCIÓN	81
3.2. METODOLOGÍA	87
3.2.1. Mediciones de la Capacitancia electroquímica	87
3.2.2. Detección de receptores de folato por ECE	87
3.2.3. Especificidad del detector	89
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
3.3.1. Selección de la película delgada funcionalizada con ácido fólico para	
usarse como detector	90
3.3.2. Detección de receptores de folato por ECE	94
3.3.3. Especificidad del detector	100
3.4. CONCLUSIONES	101
4. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	103
BIBLIOGRAFÍA	105
ANEXOS	122

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Esquema de la configuración del proceso de anodización elec-	
troquímica para obtener NTs de TiO_2 . Tomado de Bertel y col. Sensors	
2021, 21, 6167.	30
Figura 2. Esquema del proceso de deposición por pulverización catódica. El	
campo magnético (generado por los imanes) produce una fuerza sobre	
los electrones, que los mantiene en una trayectoria helicoidal cerca del	
blanco, durante tiempos relativamente largos. Tomado de Bertel y col.	
Sensors 2021, 21, 6167.	32
Figura 3. Esquema del proceso de deposición por láser pulsado para obte-	
ner películas delgadas de TiO_2 .	35
Figura 4. Señales típicas obtenidas al utilizar diferentes biosensores elec-	
troquímicos (para cualquier detector, electrolito de soporte y molécula	
redox utilizada). Cuando se detecta un analito, (a) la curva característi-	
ca Corriente-Voltaje para un biosensor voltamétrico, (b) Corriente-tiempo	
para un biosensor amperométrico, (c) Voltaje-Tiempo para un biosensor	
potenciométrico, (d) Corriente-Voltaje para un biosensor conductimétrico,	
(e) Impedancia imaginaria-Impedancia real para un biosensor impedimé-	
trico o (f) Capacitancia imaginaria-Capacitancia real para un biosensor	
capacitivo. Tomado de Bertel y col. Sensors 2021, 21, 6167.	37

rigura 5. Dos reacciones tipicas entre el elemento de bio-reconocimiento y	
un analito, que ocurren en la superficie de un biosensor basado en NTs	
de TiO_2 . (a) Reducción de H_2O_2 catalizada por la hemoglobina inmovili-	
zada en el biosensor y (b) oxidación de glucosa catalizada por la glucosa	
oxidasa inmovilizada en el biosensor. Tomado de Bertel y col. Sensors	
2021, 21, 6167.	39
Figura 6. La reacción de hidrólisis catalítica enzimática en las proximidades	
del electrodo de Ti/ TiO_2 funcionalizado con ureasa. Tomado de Bertel y	
col. Sensors 2021, 21, 6167.	42
Figura 7. Montaje experimental del sistema de PLD indicando las partes	
más importantes. A la derecha se observa el proceso de deposición de	
la película por medio de la generación del plasma.	53
Figura 8. Imágenes AFM de PDTs depositadas a (a) 1.3, (b) 1.6, (c) 1.9,	
(d) 2.2 y (e) 2.5 J/cm^2 de fluencia de la luz láser. Estas imágenes fue-	
ron obtenidas con una Unidad SPM Multi-Función AFM5100N de Hitachi	
operado en modo contacto.	57
Figura 9. (a) Rugosidad $\Delta\delta_{RMS}$ y (b) Espesor de PDTs sobre sustrato de	
Si, obtenidas con cinco fluencias de luz láser diferentes.	58
Figura 10. Espectros XPS de (a) PDT preparadas con fluencias láser (2.2 y	
2.5 J/cm^2) y FA-PDT. Espectros XPS de alta resolución de (b) O 1s y (c)	
Ti 2p de una PDT preparada con una fluencia láser de 2.5 J/cm^2 .	60
Figura 11. Espectro Raman de PDT fabricada a 2.5 J/cm^2 .	61
Figura 12. Imagen AFM de una PDTW. Esta imagen fue obtenida con una	
Unidad SPM Multi-Función AFM5100N de Hitachi operado en modo no	
contacto.	62
Figura 13. Espectros XPS de alta resolución (a) O 1s, (b) Ti 2p y (c) W 4f de	
una PDTW.	64

Figura 14. Espectro Raman de la	a PDTW.	65
Figura 15. Imágenes AFM de (a) PDT y (B) AF-PDT. Tenga en cuenta que	
la diferencia en la escala de	color es debida a la altura. Estas imágenes	
fueron obtenidas usando un r	microscopio Bruker Dimension Icon operado	
en modo no contacto.		67
Figura 16. Espectros Raman de	(a) AF en estado sólido y de (b) AF adsorbi-	
do en una PDT.		68
Figura 17. Posibles modos de u	ınión del grupo -COOH en nanopartículas	
de TiO_2 : (a) Atracción electr	ostática, (b, c) Enlace tipo puente de H, (d)	
Monodentado (enlace tipo é	ster), (e) Puente bidentado y (f) Quelante	
bidentado. Adaptada de Qu y	col. Langmuir 2010, 26, 9539–9546.	71
Figura 18. Espectros XPS de alta	a resolución (a) C 1s y (b) N 1s para la PDT,	
(c) C 1s y (d) N 1s para la FA	a-PDT, y finalmente, (e) C 1s y (f) N 1s para	
el AF.		72
Figura 19. Imágenes de muestra	as en experimentos de ángulo de contacto	
para (a) PDT, ángulo de cor	itacto de $65^o \pm 7^o$ y (b) AF-PDT, ángulo de	
contacto de $40^o \pm 4^o$.		73
Figura 20. Imágenes AFM de (a	PDTW, y de diferentes regiones de la AF-	
PDTW con rugosidades RMS	3 de (b) 2.9, (c) 5 y (d) 7.8 nm. Estas imáge-	
nes fueron obtenidas con una	a Unidad SPM Multi-Función AFM5100N de	
Hitachi operando en modo no	o contacto.	75
Figura 21. Espectros XPS de a	lta resolución (a) C 1s y (b) N 1s para la	
PDTW, (c) C 1s y (d) N 1s pa	ara la FA-PDTW, y finalmente, (e) C 1s y (f)	
N 1s para el AF.		76
Figura 22. Esquema del proceso	de modificación de una PDTW con AF por	
una estrategia solvotérmica.	Adaptada de Qu y col. Langmuir 2010, 26,	
9539–9546		77

Figura 23. Espectros XPS de alta resolución (a) Ti 2p y (b) W 4f para la AF-PDTW.

78

Figura 24. Imágenes de muestras en experimentos de ángulo de contacto para (a) PDTW, ángulo de contacto de $73^o \pm 2^o$ y (b) AF-PDTW, ángulo de contacto de $32^o \pm 0^o$.

79

Figura 25. Representación esquemática de interfaces electrodo-electrolito. En (a) se muestra la situación más simple de un electrodo sumergido en un electrolito modelado por la capacitancia de doble capa electroquímica, donde ocurre el proceso no faradaico, y en (b) la superficie del electrodo se encuentra cubierta con moléculas redox que desplazan la doble capa iónica para dar lugar a un proceso faradaico.

84

Figura 26. Montaje experimental para las mediciones de ECE. (a) Computador con el software Nova para adquisición de datos, un potenciostato PGSTAT204 de Autolab y una caja de Faraday, dentro de la cual se encuentra la celda electroquímica con los tres electrodos. (b) Cabina de flujo laminar para la preparación de muestras y realización de la interacción entre el detector y los RDF de forma estéril.

89

Figura 27. Gráfica de Nyquist para el espectro de capacitancia electroquímica de tres mediciones consecutivas de la PDT (curvas de color azul, naranja y verde que se sobreponen completamente) y de la AF-PDT (curvas de color rojo, violeta y marrón). Para cada curva de las tres mediciones consecutivas se obtuvo una circunferencia (líneas punteadas) que se ajusta a los datos. El electrolito soporte utilizado fue PBS (pH=7.4), las medidas se hicieron alrededor de V_{OCP} entre $0.1\ [MHz]$ y $0.1\ [Hz]$ con voltaje pico-pico de $10\ [mV]$.

92

- Figura 28. Gráfica de Nyquist para el espectro de capacitancia electroquímica de tres mediciones consecutivas de la PDTW (curvas de color azul, naranja y verde que se sobreponen completamente) y de la AF-PDTW (curvas de color rojo, violeta y marrón que también se sobreponen). Para cada curva de las tres mediciones consecutivas se obtuvo una circunferencia (líneas punteadas) que se ajusta a los datos. El electrolito soporte utilizado fue PBS (pH=7.4), las medidas se hicieron alrededor de V_{OCP} entre $0.1\ [MHz]$ y $0.1\ [Hz]$ con voltaje pico-pico de $10\ [mV]$.
- Figura 29. Gráfica de Nyquist para el espectro de capacitancia elctroquímica del detector en presencia del blanco y de las diferentes concentraciones de RDF. El electrolito soporte utilizado fue PBS (pH=7.4), las medidas se hicieron alrededor de V_{OCP} entre $0.1\ [MHz]$ y $0.1\ [Hz]$ con voltaje picopico de $10\ [mV]$.

93

95

96

- Figura 30. (a) Representación esquemática de los sitios activos de la PDTW y (b) del modelo circuital de su interfaz cuando no se ha adicionado el analito (RDF), situación que corresponde a la medición del blanco. (c) Representación de la situación cuando se han adicionado los RDF, los cuales generan una disminución de sitios activos TiO_2 - WO_3 , y (d) muestra el modelo circuital para su interfaz, donde cada elemento circuital gris representa un sitio activo que ha sido bloqueado. Rs es la resistencia en serie, que es la suma de las resistencias de la solución y del contacto eléctrico del detector.
- Figura 31. Curva de calibración obtenida para la detección de RDF, utilizando la dureza química como respuesta del detector. Se grafica $\frac{1}{C_{\mu}} \frac{1}{C_{\mu,0}}$ en función de la concentración de RDF [X]. Cada dato se midió por triplicado y la línea punteada es la recta que mejor se ajusta a la media de los datos. 97

do los datos al modelo de Langmuir. Se grafica $\frac{[X]}{S}$ versus $[X]$. Cada dato	
se midió por triplicado y la línea punteada es la recta que mejor se ajusta	
a la media de los datos.	100
Figura 33. Bertel, L, Ospina, R, García-Castro, AC, Quintero-Orozco, JH, Mi-	
randa, DA. Synthesis of CdM (M = Se, O) micro and nanoparticles by	
pulsed laser ablation in water. Surf Interface Anal. 2021; 53: 550-558.	
https://doi.org/10.1002/sia.6942	135
Figura 34. Bertel L, Miranda DA, García-Martín JM. Nanostructured Tita-	
nium Dioxide Surfaces for Electrochemical Biosensing. Sensors. 2021;	
21(18):6167. https://doi.org/10.3390/s21186167	136
Figura 35. Bertel L, Ospina R, García-Martín JM, Miranda DA. Experimen-	
tal analysis of folic acid adsorption on TiO2 thin-films. Journal of Vacuum	
Science Technology A. 2022; 40(3): 033411. https://doi.org/10.1116/6.000	1762137
Figura 36. Bertel L, Ospina R, Quintero JH, Miranda DA. Characterization	
of CdSe nanoparticles prepared by Pulsed Laser Ablation. 6° Congre-	
so Nacional de Ingeniería Física- VI CNIF y El 1st International Applied	
Physics, Engineering and Innovation. Ponencia oral. Bucaramanga, Co-	
lombia. 2018.	139
Figura 37. Bertel L, García-Martín JM, Ospina R, Miranda DA. Deposición	
por Láser Pulsado de películas delgadas de TiO_2 y su funcionalización	
con ácido fólico. 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ2020,	
el XVIII COLACRO, el X COCOCRO, el SPAE y el IV C2B2. Modalidad	
Virtual. Cartagena, Colombia. 2021.	140

Figura 32. Curva de calibración obtenida para la detección de RDF, ajustan-

	Depos	ition of TiO_2 thin film and their functionalization with folic acid. 3rd	
C	Coatin	g and interfaces Confere (CIC2021). Modalidad Virtual. Barcelona,	
S	Spain.	2021.	141
Figura	ı 39.	Bertel L, Miranda DA, Ospina R, García-Martín JM. "DEVELOP-	
N	MENT	OF A BIOSENSOR FOR THE RECOGNITION OF FOLATE RE-	
C	CEPTO	ORS". 1st Innovative Technologies for Medical Applications (1st IT-	
٨	ИΑ). В	Bucaramanga, Colombia. 2022.	142

Figura 38. Bertel L, Miranda DA, Ospina R, García-Martín JM. Pulsed Laser

LISTA DE TABLAS

			pág.
Tabla	a 1.	Biosensores Voltamétricos/Amperométricos basados en STON. To-	
	mado	de Bertel y col. Sensors 2021, 21, 6167.	40
Tabla	a 2.	Biosensores impedimétricos basados en STON. Tomado de Bertel	
	y col.	. Sensors 2021, 21, 6167.	44
Tabla	a 3.	Porcentaje de fracciones atómicas elementales obtenidas por XPS	
	de Pl	DTs fabricadas con cinco fluencias diferentes (F_1 a F_5 en J/cm^2) de	
	la luz	láser.	58
Tabla	a 4.	Porcentaje de fracciones atómicas elementales obtenidas por XPS	
	para	la PDTW.	63
Tabla	a 5.	Asignaciones observadas y tentativas de los desplazamientos de	
	las fr	ecuencias Raman del AF. Esta tabla utiliza las siguientes abreviatu-	
	ras: p	ot, pteridina; paba, ácido p-aminobenzoico; Glu, ácido glutámico.	69
Tabla	a 6.	Valores de la $C_{\bar{\mu}}$ obtenida para tres mediciones de ECE consecuti-	
	vas p	para cada tipo de película, PDT y PDTW.	91
Tabla	a 7.	Valores de la $C_{\bar{\mu}}$ obtenida al evaluar la capacidad de detección de	
	la PD	OTW frente al blanco y a las diferentes concentraciones de RDF. Las	
	medi	ciones que se indican son consecutivas.	101

LISTA DE ANEXOS

		pág
Anexo A.	Jupiter Notebook para el análisis de datos	122
Anexo B.	Publicaciones	135

GLOSARIO DE SIGLAS

AF Ácido fólico.

BCs Biomarcadores del Cáncer.

ELISA *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

RDF Receptores de folato.

AFM *Atomic Force Microscopy* o microscopia de fuerza atómica.

XPS *X-ray Photoelectron Spectroscopy* o espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X.

STON Superficies de TiO_2 Nanoestructuradas

NTs Nanotubos.

 T^a Temperatura ambiente.

SILAR *Successive Ionic Layer Adsorption and Reaction* o reacción y adsorción de capas iónicas sucesivas.

OAD Oblique Angle Deposition o deposición en ángulo oblicuo.

XRD *X-Ray Diffraction* o difracción de rayos X.

DC *Direct Current* o corriente continua.

NCs Nanocolumnas.

PLD *Pulsed Laser Deposition* o deposición por láser pulsado.

PDT Película Delgada de TiO_2 .

PDTW Película Delgada de TiO_2 - WO_3 .

WE Working Electrode o electrodo de trabajo.

CE *Counter Electrode* o contraelectrodo.

RE Reference Electrode o electrodo de referencia.

Hb Hemoglobina.

LoD *Limit of Detection* o Limite de detección.

LoQ *Limit of Quantification* o Limite de cuantificación.

EIS *Electrochemical Impedance Spectroscopy* o espectroscopia de impedancia electroquímica.

APTES (3-Aminopropil) Trietoxisilano.

APTMS (3-Aminopropil) Trimetoxisilano.

PEG Polietilenglicol.

ALD Atomic Layer Deposition o deposición de capas atómicas.

HER2 Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

pt Porción pteridina del AF.

Glu Porción del ácido glutámico del AF.

paba Porción del ácido p-aminobenzoico del AF.

ECE Espectrocopia de capacitancia electroquímica.

RESUMEN

TÍTULO: DESARROLLO DE UN DETECTOR DE ANOMALÍAS CELULARES ASOCIADAS AL CÁNCER *

AUTOR: LINDA ESPERANZA BERTEL GARAY **

PALABRAS CLAVE: BIOSENSOR, PELÍCULA DELGADA, RECEPTORES DE FOLATO, ÁCIDO FÓLICO, CAPACITANCIA.

DESCRIPCIÓN:

La sobre-expresión de receptores de folato en la superficie celular está relacionada con una anomalía asociada al cáncer epitelial. En este sentido, se desarrolló un detector capacitivo que utiliza el ácido fólico como elemento de bio-reconocimiento para la detección de receptores de folato. El detector consiste principalmente en una película delgada de TiO_2 - WO_3 conjugada al ácido fólico, que funciona como electrodo de trabajo en una configuración de celda electroquímica de tres electrodos, junto con un electrodo de referencia de Ag/AgCl [3M] y un contraelectrodo de oro. Las interacciones entre el detector y el receptor de folato fueron estudiadas por medio de la determinación de la capacitancia electroquímica. La película delgada de TiO_2 - WO_3 se fabricó mediante el método de deposición por láser pulsado y posteriormente, se funcionalizó con ácido fólico. La caracterización de la película antes y después de la funcionalización se realizó por medio de AFM, XPS, Raman y ángulo de contacto. Los ensayos de reconocimiento de receptores de folato usando el detector fabricado mostraron que la señal de respuesta del detector, la dureza química (en términos de la capacitancia electroquímica), es selectiva y directamente proporcional a la concentración de receptores de folato, con un límite de detección de $0.2\,$ nM. Este resultado es prometedor en la aplicación de este tipo de detector para el reconocimiento de receptores de folato, especialmente para análisis en el sitio de cuidado.

^{*} Trabajo de grado

Facultad de Ciencias. Escuela de Física. Directores: David Alejandro Miranda Mercado PhD, José Miguel García-Martín PhD, Rogelio Ospina Ospina PhD

ABSTRACT

TITLE: DEVELOPMENT OF A DETECTOR OF CELL ANOMALIES ASSOCIATED WITH CANCER

AUTHOR: LINDA ESPERANZA BERTEL GARAY **

KEYWORDS: BIOSENSOR, THIN FILM, FOLATE RECEPTORS, FOLIC ACID, CAPACITANCE.

DESCRIPTION:

The overexpression of folate receptors on the cell surface is related to an abnormality associated with epithelial cancer. In this sense, a capacitive detector was developed that uses folic acid as a recognition molecule for the detection of folate receptors. The detector consists mainly of a TiO_2 - WO_3 thin film conjugated to folic acid, which functions as a working electrode in a three-electrode electrochemical cell configuration, together with an Ag/AgCl [3M] reference electrode and a gold counter electrode. The interactions between the detector and the folate receptor were studied by means of the determination of the electrochemical capacitance. TiO_2 - WO_3 thin film was fabricated by the pulsed laser deposition method and subsequently functionalized with folic acid. The characterization of the film before and after functionalization was performed by means of AFM, XPS, Raman, and contact angle. Folate receptor recognition assays using the fabricated detector showed that the detector response signal, chemical hardness (in terms of electrochemical capacitance), is selective and directly proportional to the concentration of folate receptor, with a detection limit of 0.2 nM. This result is promising in the application of this type of detector for the recognition of folate receptors, especially for analysis at the point of care.

Doctoral Thesis

Facultad de Ciencias. Escuela de Física. Directors: David Alejandro Miranda Mercado Ph.D., José Miguel Garca-Martn Ph.D., Rogelio Ospina Ospina PhD

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte, con aproximadamente 10 millones en 2020, y una gran amenaza contra la esperanza de vida en todos los países del mundo¹. En la búsqueda de la solución a esta gran problemática mundial, la investigación enfocada en el diagnóstico y tratamiento del cáncer ha venido en aumento. Sin embargo, es fundamental la detección temprana del cáncer, en una etapa donde no han iniciado los síntomas e idealmente antes de la metástasis, para lograr mayores tasas de curación². El cáncer se caracteriza por el crecimiento celular descontrolado y el desarrollo de metástasis³. La metástasis consiste en el desplazamiento de las células cancerosas desde su sitio primario hasta el desarrollo de tumores secundarios en una parte del cuerpo más lejana⁴.

Hasta la fecha, existen pocas pruebas de detección para algunos tipos de cáncer, tales como la colonoscopia, el antígeno prostático específico, la mamografía, y la citología cervical, algunas de las cuales han sido cuestionadas en cuanto a su efi-

Hyuna Sung y col. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries". En: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71.3 (2021), págs. 209-249. DOI: https://doi.org/10.3322/caac.21660. eprint: https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.3322/caac.21660.

Joshua D. Schiffman, Paul G. Fisher y Peter Gibbs. "Early Detection of Cancer: Past, Present, and Future". En: *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 35 (2015). PMID: 25993143, págs. 57-65. DOI: 10.14694/EdBook_AM.2015.35.57. eprint: https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2015.35.57.

³ Sibaji Sarkar y col. "Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview". eng. En: *International journal of molecular sciences* 14.10 (2013). 24152442[pmid], págs. 21087-21113. DOI: 10.3390/ijms141021087.

Jawad Fares y col. "Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited". En: Signal Transduction and Targeted Therapy 5.1 (2020), pág. 28. DOI: 10.1038/s41392-020-0134-x.

cacia, teniendo en cuenta que la mayoría de los pacientes no siguen las pautas médicas para realizar el proceso de detección⁵. Además, la mayoría de los tipos de cáncer no cuentan con un método de detección temprana no invasiva eficaz⁵. De esta manera, se hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias para la detección temprana del cáncer, que sean más económicas, sencillas, de fácil acceso y eficaces.

Una estrategia que se ha venido implementando para la detección del cáncer consiste en identificar la presencia de marcadores biológicos, también llamados biomarcadores del cáncer (BCs)⁶. Los biomarcadores son definidos por la Organización Mundial de la Salud como "cualquier sustancia, estructura o proceso que pueda medirse en el cuerpo o sus productos e influir o predecir la incidencia de un resultado o enfermedad" ⁶. En este sentido, la identificación de estos BCs en fluidos corporales (sangre, orina, suero, plasma y células tumorales) puede garantizar la detección temprana de varios tipos de cáncer, la evaluación de riesgos y el seguimiento de la terapia. Los BCs pueden ser genes, productos genéticos, ADN, ARN, proteínas, enzimas, hormonas y células específicas que, por lo general, son liberadas cuando ocurre una alteración genética y la división celular⁶.

Entre algunos de los métodos convencionales más usados para detectar BCs con alta sensibilidad en fluidos biológicos, se encuentran aquellos basados en inmunoensayos con anticuerpos, como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzi-

-

Xingdong Chen y col. "Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test". En: *Nature Communications* 11.1 (2020), pág. 3475. DOI: 10.1038/s41467-020-17316-z.

M.R. Hasan y col. "Recent development in electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection". En: *Biosensors and Bioelectronics: X* 8 (2021), pág. 100075. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biosx.2021.100075.

mas (en inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), y otras técnicas como radioinmunoensayo, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de masas, y cromatografía; sin embargo, estas técnicas requieren profesionales capacitados y laboratorios con equipos robustos, lo que se traduce en un aumento en tiempo y costos para llevar a cabo la detección⁷.

Una gran cantidad de estudios acerca de la aplicación de biosensores en cáncer realizados en esta última década, han mostrado que estos son una opción más confiable, rápida y precisa para la detección de BCs⁶, y a la vez, se enfocan en obtener sistemas de reconocimiemto con alta selectividad, precisión y bajo costo. Un biosensor está conformado por un elemento de bio-reconocimiento y un transductor, el primero, es una biomolécula específica que se inmoviliza en la superficie del transductor y presenta gran afinidad hacía el biomarcador a detectar, y el segundo, se encarga de transformar las señales biológicas resultantes de la interacción entre el BC y las moléculas de bio-reconocimiento en señales medibles, que pueden ser eléctricas, mecánicas, ópticas, etc.⁶. Los biosensores de BCs, particularmente los electroquímicos, tienen ventajas sobre los métodos clínicos convencionales, tales como, el rápido procesamiento de datos, la flexibilidad en su uso, la posibilidad de realizar múltiples análisis en una sola muestra, la reducción en los costos de análisis, y además, pueden ser usados para la detección temprana de la enfermedad⁷.

Los receptores de folato (RDF) son biomarcadores de cáncer epitelial que presentan gran afinidad hacía las moléculas de ácido fólico (AF). El AF, también conocido como vitamina B9, es esencial para la síntesis de purinas y timidina, y para la meti-

-

Bruno P. Crulhas y col. "Review—Recent Advances Based on a Sensor for Cancer Biomarker Detection". En: ECS Journal of Solid State Science and Technology 10.4 (2021), pág. 047004. DOI: 10.1149/2162-8777/abf757.

lación de ADN, proteínas y lípidos dentro de la célula⁸⁹. Por esta razón, este trabajo doctoral se enfocó en el desarrollo de un detector o biosensor de una anomalía celular asociada al cáncer, relacionada a la presencia de los RDF, donde el elemento de reconocimiento está conformado por moléculas de AF ancladas en la superficie de una película delgada de TiO_2 .

Esta tesis doctoral contiene avances significativos, desde el punto de vista fisico-químico, en el proceso de funcionalización de la superficie de la película delgada de TiO_2 con moléculas de AF, logrando dos tipos de interacciones entre el AF y la superficie de TiO_2 , una electrostática y la otra, covalente. Además, vale la pena mencionar que los estudios publicados acerca de la funcionalización de películas delgadas de TiO_2 con AF son escasos y no hacen una caracterización detallada de la funcionalización. Desde el punto de vista físico, esta tesis aporta los fundamentos para el desarrollo de un detector electroquímico basado en una película delgada de TiO_2 - WO_3 cuya capacitancia electroquímica responde a cambios de la concentración de RDF. El detector electroquímico propuesto presenta la ventaja de no requerir una sonda redox en la solución analítica, y tampoco requiere unir una etiqueta al analito, haciendo de este un sistema de detección experimentalmente simple.

Las principales propiedades por las cuales se seleccionó la superficie de TiO_2 como transductor, son expuestas en el capítulo (1), junto con los principales métodos para

-

Chen Chen y col. "Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors". eng. En: *Nature* 500.7463 (2013). 23851396[pmid], págs. 486-489. DOI: 10.1038/nature12327.

Grant L. Zwicke, G. Ali Mansoori y Constance J. Jeffery. "Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics". En: *Nano Reviews* 3.1 (2012). PMID: 23240070, pág. 18496. DOI: 10.3402/nano.v3i0.18496. eprint: https://doi.org/10.3402/nano.v3i0.18496.

la fabricación de superficies nanoestructuradas de TiO_2 y los fundamentos acerca de la inmovilización de biomoléculas en estas superficies de TiO_2 . Por otra parte, el capitulo (2) describe los métodos, materiales y equipos usados para la obtención de las películas delgadas de TiO_2 y su posterior funcionalización con AF, también se presenta una discusión de los resultados obtenidos basada en los análisis de microscopia de fuerza atómica (atomic force microscopy, AFM), Espectroscopia Raman, Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) y ángulo de contacto. En el capítulo (3) se encuentra la metodología, los resultados y análisis de la detección de RDF, y finalmente, en el capítulo (4) se presentan las conclusiones del trabajo. En los anéxos se encuentra información acerca del análisis de datos de la detección, y se detallan las publicaciones de los resultados obtenidos durante este trabajo en revistas y congresos internacionales.

1. ESTADO DEL ARTE

Los biosensores se usan para detectar selectivamente un analito de interés, el cual presenta gran afinidad hacía el elemento de bio-reconocimiento inmovilizado en la superficie del sensor¹⁰; algunos ejemplos de parejas que pueden ser utilizadas como analito y elemento de bio-reconocimiento debido a la alta afinidad que presentan entre ellas son: enzima-sustrato, ADN-ADN diana o anticuerpo-antígeno, entre otras¹¹.

En la fabricación de biosensores, se pueden implementar diferentes tipos de transductores para convertir el evento de biorreconocimiento en una señal medible como variables electroquímicas, ópticas u otras variables físicas¹⁰¹¹¹²¹³¹⁴. Los transductores electroquímicos se utilizan ampliamente en la fabricación de biosensores debido a la diversidad de configuraciones electroquímicas experimentales posibles, recopi-

Alessandra Aloisi y col. "Bio-Recognition in Spectroscopy-Based Biosensors for *Heavy Metals-Water and Waterborne Contamination Analysis". eng. En: *Biosensors* 9.3 (2019). 31366137[pmid], pág. 96. DOI: 10.3390/bios9030096.

Le Li y col. "Recent Advances in Immobilization Strategies for Biomolecules in Sensors Using Organic Field-Effect Transistors". En: *Transactions of Tianjin University* 26.6 (2020), págs. 424-440. DOI: 10.1007/s12209-020-00234-y.

Pedro Estrela y col. "Introduction to biosensors". En: Essays in Biochemistry 60.1 (jun. de 2016), págs. 1-8. DOI: 10.1042/EBC20150001. eprint: https://portlandpress.com/essaysbiochem/article-pdf/60/1/1/481070/bse0600001.pdf.

Tina Mavrič y col. "Chapter Three - Electrochemical Biosensor Based on TiO2 Nanomaterials for Cancer Diagnostics". En: ed. por Aleš Iglič, Michael Rappolt y Ana J. García-Sáez. Vol. 27. Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly. Academic Press, 2018, págs. 63 -105. DOI: https://doi.org/10.1016/bs.abl.2017.12.003.

Daniel R. Thévenot y col. "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification1International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical Chemistry).1". En: *Biosensors and Bioelectronics* 16.1 (2001), págs. 121-131. DOI: https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4.

lación de datos simple e interpretación robusta.

Los biosensores electroquímicos que utilizan superficies de TiO_2 nanoestructuradas (STON) como electrodo de trabajo, son de particular interés porque tienen un número más significativo de propiedades óptimas para esta aplicación, en comparación con otros materiales que también se utilizan como sensores, tales como biocompatibilidad, no toxicidad, resistencia a la corrosión, bajos costos de fabricación, alta área superficial, confinamiento cuántico, propiedades de carga electrónica eficiente y alta adhesión al sustrato 151617 . Estas STON pueden ser películas delgadas con una rugosidad característica o una superficie compuesta por matrices de nanoestructuras.

Otro factor que influye en la selección de STON para aplicaciones de biodetección es que la electroquímica del TiO_2 se ha estudiado ampliamente desde su nacimiento en 1969¹⁸. Este gran conocimiento de la electroquímica del TiO_2 es un punto clave para entender, mejorar y optimizar los fenómenos involucrados en el proceso de detección, el cual incluye: la generación de carga, inyección, separación, transporte

Jing Bai y Baoxue Zhou. "Titanium Dioxide Nanomaterials for Sensor Applications". En: *Chemical Reviews* 114.19 (2014), págs. 10131-10176. DOI: 10.1021/cr400625j.

Luis Miguel Anaya-Esparza y col. "Use of Titanium Dioxide (TiO2) Nanoparticles as Reinforcement Agent of Polysaccharide-Based Materials". En: *Processes* 8.11 (2020). DOI: 10.3390/pr8111395.

Shalini Reghunath, Dephan Pinheiro y Sunaja Devi KR. "A review of hierarchical nanostructures of TiO2: Advances and applications". En: *Applied Surface Science Advances* 3 (2021), pág. 100063. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2021.100063.

Thomas Berger y col. "The Electrochemistry of Nanostructured Titanium Dioxide Electrodes". En: ChemPhysChem 13.12 (2012), págs. 2824-2875. DOI: https://doi.org/10.1002/cphc. 201200073. eprint: https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cphc.201200073.

o acumulación en la nanoestructura¹⁸.

En los biosensores electroquímicos basados en STON, los electrones liberados durante la reacción entre el elemento de biorreconocimiento y el analito pueden recogerse por el TiO_2 gracias a su carácter de aceptor de electrones; en consecuencia, se utilizan para detectar la reacción ¹⁵¹⁶. Además, cabe señalar que estas STON son excelentes candidatas para el ensamblaje de diferentes tipos de moléculas de biorreconocimiento como anticuerpos, enzimas o receptores¹³.

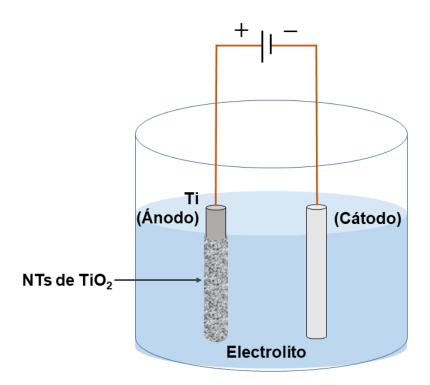
1.1. PREPARACIÓN DE NANOESTRUCTURAS DE TiO_2

En esta sección se muestran las características principales de algunas técnicas de fabricación de películas nanoestructuradas de TiO_2 , una de ellas empleada en este trabajo de investigación, la deposición por láser pulsado.

1.1.1. Anodización electroquímica La anodización es una técnica ampliamente utilizada para la obtención de nanotubos (NTs) de TiO_2 organizados ya que permite un excelente control de los parámetros de crecimiento (potencial, tiempo, temperatura y tipo de electrolito)¹⁹. En general, los NTs de TiO_2 (con fase anatasa) se fabrican mediante la anodización electroquímica, en dos pasos, de una lámina metálica de Ti en una solución de fluoruro de amonio (NH_4F) -etilenglicol (ver Figura 1). La lámina de Ti sirve como ánodo y una lámina o alambre de grafito o platino como cátodo, aplicando potencial eléctrico a temperatura ambiente (T^a) . Finalmente, las muestras anodizadas se sometieron a un proceso de recocido a 350–500 °C y una velocidad

Negin Pishkar y col. "Study of the highly ordered TiO2 nanotubes physical properties prepared with two-step anodization". En: *Results in Physics* 9 (2018), págs. 1246-1249. DOI: https://doi.org/10.1016/j.rinp.2018.02.009.

Figura 1. Esquema de la configuración del proceso de anodización electroquímica para obtener NTs de TiO_2 . Tomado de Bertel y col. Sensors 2021, 21, 6167.



de calentamiento constante 1920.

Otro proceso de fabricación interesante fue reportado por Gualdrón-Reyes y col., quienes implementaron un método de anodización para obtener membranas de NTs de TiO_2 tridopadas con boro, nitrógeno o flúor, que luego se adhirieron a vidrio conductor de óxido de indio-estaño y se sensibilizaron con diferentes cargas de puntos cuánticos de CdSe utilizando el método de reacción y adsorción de capas iónicas sucesivas (SILAR). La técnica de deposición SILAR consiste en un ciclo de inmersión

Liangsheng Hu y col. "Recyclable and High-Sensitivity Electrochemical Biosensing Platform Composed of Carbon-Doped TiO2 Nanotube Arrays". En: Analytical Chemistry 83.21 (2011), págs. 8138-8144. DOI: 10.1021/ac201639m.

del sustrato de NTs de TiO_2 en soluciones de precursores catiónicos y aniónicos $(3CdSO_48H_2O\ y\ SeO_2)$, lavado y reacción. Esta superficie se fabricó para estudiar sus propiedades fotoquímicas, fotoelectroquímicas y semiconductoras 21 . Aunque el método de anodizado típicamente produce NTs a partir de Ti, se ha encontrado que la geometría del TiO_2 puede modificarse para obtener pilas de tubos, bambú y tubos de doble pared y doble capa anfifílicos, a través de variaciones en el voltaje de anodizado, la duración de la anodización, y la composición de la solución electrolítica 15 .

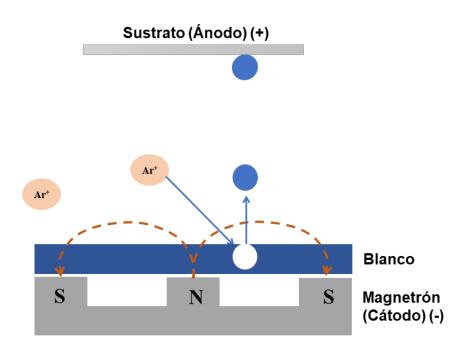
1.1.2. Pulverización Catódica La pulverización catódica con magnetrón permite la deposición de átomos con alta uniformidad y buena adherencia al sustrato. Cuando el blanco y el sustrato están paralelos (ver figura 2), se obtienen películas delgadas y planas, mientras que si se utiliza la deposición en ángulo oblicuo (Oblique Angle Deposition, OAD), se pueden obtener películas corrugadas o incluso nanocolumnas dependiendo del ángulo de inclinación y las condiciones de pulverización catódica.

Comert y col. prepararon una película delgada de TiO_2 sobre un sustrato de n-Si mediante la técnica de pulverización catódica con magnetrón de radiofrecuencia, utilizando un blanco de TiO_2 , dirigido con un ángulo de inclinación de deposición de 45°, una presión base de 2 × 10^6 Torr, una potencia de radiofrecuencia de 150 W y una temperatura del sustrato de 100 °C. Por último, esta película fue recocida desde 500 a 1000 °C²². El análisis de difracción de rayos X (*X-Ray diffraction*, XRD)

Andrés F. Gualdrón-Reyes y col. "The role of boron in the carrier transport improvement of CdSesensitized B,N,F-TiO2 nanotube solar cells: A synergistic strategy". En: *New Journal of Chemistry* 42.17 (2018), págs. 14481-14492. DOI: 10.1039/c8nj02716a.

Buse Comert y col. "Titanium Dioxide Thin Films as Methane Gas Sensors". En: *IEEE Sensors Journal* 16.24 (2016), págs. 8890-8896. DOI: 10.1109/JSEN.2016.2619860.

Figura 2. Esquema del proceso de deposición por pulverización catódica. El campo magnético (generado por los imanes) produce una fuerza sobre los electrones, que los mantiene en una trayectoria helicoidal cerca del blanco, durante tiempos relativamente largos. Tomado de Bertel y col. Sensors 2021, 21, 6167.



permitió determinar que para temperaturas de recocido 600 ℃, las películas permanecen en la fase anatasa (presente en las películas depositadas a 100 ℃); a 700 ℃ se evidencia una mezcla de anatasa y rutilo, mientras que a temperaturas más altas (800 ℃) se obtienen películas con estructura en fase rutilo. Además, mediante análisis AFM se observó que un aumento en la temperatura de recocido condujo a un aumento en la rugosidad de la superficie (los valores cuadráticos medios de la rugosidad de la superficie evolucionaron de 0.2 a 7.4 nm), asociado con un aumento en el tamaño del grano (de 13.20 a 122.50 nm), donde la forma de los granos cambió de columnar a difusa.

La OAD de TiO_2 por pulverización catódica reactiva con magnetrón de DC (corriente

continua) produce películas de TiO_2 amorfas y porosas con una estructura columnar, utilizando un blanco de Ti, una potencia de 385 W, una relación de gas Ar/O_2 de 0.02, una presión de trabajo de 12 mTorr y un ángulo de inclinación de 60° entre el sustrato y el blanco. Después de obtener la película por pulverización catódica, se sometió a un proceso de recocido al aire a 450 °C para lograr la transición de estructura amorfa a anatasa²³. Sin embargo, Hu y col. lograron fabricar nanocolumnas (NCs) de TiO_2 bien definidas, en sustratos compactos de óxido de estaño dopado con flúor recubiertos de TiO_2 mediante un proceso de dos pasos: (i) deposición oblicua de conjuntos de NCs de Ti mediante pulverización catódica con magnetrón de DC y (ii) oxidación térmica posterior de las nanocolumnas de Ti para transformarlas en TiO_2 . La deposición oblicua se realizó con un ángulo de inclinación entre el sustrato y el blanco superior a 60°, en particular 75°, utilizando argón como gas de pulverización, 0.15 Pa de presión y 300 W de potencia (descarga de corriente continua). Luego, las NCs de Ti se sometieron a un proceso de oxidación térmica (500 °C) para finalmente obtener las NCs de TiO_2 con un diámetro y una longitud promedio de 89 ± 18 nm y 254 ± 27 nm, respectivamente. Estas NCs presentan principalmente TiO_2 en la fase rutilo ²⁴.

1.1.3. Deposición por láser pulsado La técnica de deposición por láser pulsado (*pulsed laser deposition*, PLD) permite obtener películas delgadas, lisas y homogé-

Sebastian M. Waita y col. "Electron transport and recombination in dye sensitized solar cells fabricated from obliquely sputter deposited and thermally annealed TiO2 films". En: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 605.2 (2007), págs. 151-156. DOI: 10.1016/j.jelechem.2007.04.001.

Zhelu Hu y col. "TiO2 Nanocolumn Arrays for More Efficient and Stable Perovskite Solar Cells". En: ACS Applied Materials and Interfaces 12.5 (2020), págs. 5979-5989. DOI: 10.1021/acsami. 9b21628.

neas con alta reproducibilidad 25 . En PLD, son muchos los parámetros que afectan las propiedades de las películas fabricadas, tales como, el tipo de sustrato utilizado, la temperatura de deposición, la distancia sustrato-blanco, la frecuencia y fluencia del láser, la presión de la cámara y las especies de gas introducidas 2526 . Al igual que con otras técnicas de deposición, las fases formadas al preparar las películas delgadas de TiO_2 (PDTs) dependen en gran medida de la temperatura y la presión de la cámara durante la deposición 25 .

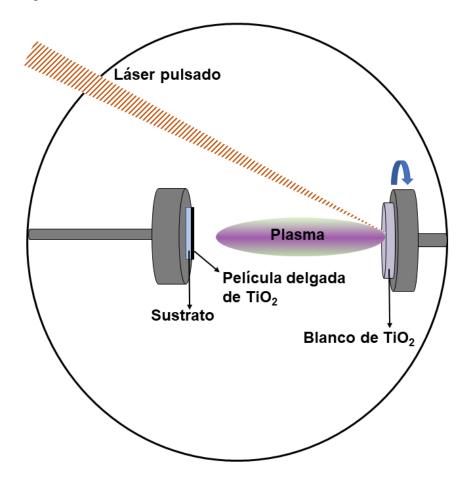
Para la fabricación de PDTs por PLD es posible partir de un blanco de TiO_2 (ver figura 3), o de Ti, cuando se trate de PLD reactivo en donde se incluye oxígeno en la cámara de deposición. En este sentido, Xu y col. fabricaron películas de TiO_2 mediante PLD reactivo, usando un blanco de Ti (en rotación) en presencia de gas O_2 ambiental, sustratos de vidrio mantenidos a una temperatura de 400 °C y un láser de excímero de KrF pulsado (λ =248 nm, tasa de repetición de 5 Hz, densidad de potencia de 2 J/cm^2)²⁷. El haz láser se enfocó mediante una lente sobre el objetivo en un ángulo de incidencia de 45°, mientras que el sustrato se ubicó a una distancia constante de 6 cm con respecto al objetivo. Se exigió que el espesor de las películas fuera siempre de 300 nm mediante el control del tiempo de deposición. Después de la deposición las películas se recocieron a 400 °C durante 10 minutos. Se obtuvieron películas de TiO_2 en fase anatasa casi pura bajo una presión de O_2 de 15 Pa, con

Akihiro Ishii y col. "Low-temperature preparation of high-n TiO2 thin film on glass by pulsed laser deposition". En: *Applied Surface Science* 347 (2015), págs. 528-534. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.04.125.

Simon N. Ogugua, Odireleng Martin Ntwaeaborwa y Hendrik C. Swart. "Latest Development on Pulsed Laser Deposited Thin Films for Advanced Luminescence Applications". En: *Coatings* 10.11 (2020). DOI: 10.3390/coatings10111078.

Yu Xu y Mingrong Shen. "Fabrication of anatase-type TiO2 films by reactive pulsed laser deposition for photocatalyst application". En: *Journal of Materials Processing Technology* 202.1 (2008), págs. 301-306. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2007.09.015.

Figura 3. Esquema del proceso de deposición por láser pulsado para obtener películas delgadas de TiO_2 .



tamaños de grano más pequeños con respecto a las películas depositadas bajo presiones de gas O_2 entre 5 y 30 Pa.

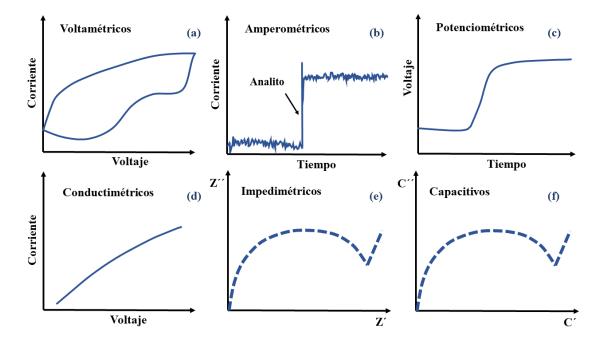
Por otro lado, Ishii y col. utilizaron la técnica de PLD para depositar PDTs sobre sustratos de vidrio, con el fin de obtener películas con alta transparencia y alto índice de refracción para su posible uso como revestimientos antirreflectantes²⁵. Para la ablación de un blanco de TiO_2 (preparado previamente al sinterizar polvo de rutilo a 1300 °C durante 10 h) un láser de excímero de KrF (λ =248 nm) incidió a una frecuencia de 5 Hz a una energía de 300 mJ. Para obtener las PDTs entre 100 y 150 nm de

espesor se necesitó un tiempo de deposición de 20 minutos. Durante el proceso de depósito, la presión de la cámara de PLD se ajustó a un alto vacío $(1x10^{-5} \text{ Pa})$ o a una P_{O_2} controlada de 1–9 Pa. La temperatura de deposición se controló desde temperatura ambiente hasta $600 \circ \text{C}$ mediante un calentador de lámpara infrarroja y una placa de Si utilizada como medio transmisor de calor. La distancia entre el objetivo y el sustrato se mantuvo en 50 mm en todos los casos. Las mejores propiedades ópticas (con índice de refracción de 3.14 y coeficiente de extinción menor a 0.05 a $\lambda = 400$ nm) se obtuvieron para una PDT de tipo rutilo monofásico depositada sobre un sustrato de vidrio a temperatura ambiente en vacío y posteriormente sometida a un proceso de recocido a $450 \, ^{\circ}\text{C}$ en aire.

1.2. DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA

En la detección electroquímica se mide una señal relacionada con la interacción del analito con un electrodo. Las medidas se llevan a cabo usando diferentes configuraciones, que incluyen un potenciostato y dos o tres electrodos. Las medidas se pueden realizar de diferentes formas: (a) relacionando la corriente y el voltaje, es decir, biosensores voltamétricos y conductimétricos; (b) corriente o voltaje versus tiempo, es decir, amperométricos o potenciométricos, respectivamente; (c) impedancia para varias frecuencias de excitación, que se suelen representar con diagramas de Nyquist donde se grafica la parte imaginaria versus parte real de la impedancia, es decir, impedimétricos y (d) capacitancia compleja para varias frecuencias de excitación, es decir, capacitivos. La figura 4 esquematiza la señal característica de cada tipo de detección. A continuación se describen los tipos de detección electroquímica que han sido más exploradas en el desarrollo de biosensores electroquímicos basados en STON.

Figura 4. Señales típicas obtenidas al utilizar diferentes biosensores electroquímicos (para cualquier detector, electrolito de soporte y molécula redox utilizada). Cuando se detecta un analito, (a) la curva característica Corriente-Voltaje para un biosensor voltamétrico, (b) Corriente-tiempo para un biosensor amperométrico, (c) Voltaje-Tiempo para un biosensor potenciométrico, (d) Corriente-Voltaje para un biosensor conductimétrico, (e) Impedancia imaginaria-Impedancia real para un biosensor impedimétrico o (f) Capacitancia imaginaria-Capacitancia real para un biosensor capacitivo. Tomado de Bertel y col. Sensors 2021, 21, 6167.



1.2.1. Voltamétrica/Amperométrica En la detección voltamétrica se mide la corriente eléctrica entre un electrodo de trabajo (*Working electrode*, WE) y un contraelectrodo (*counter electrode*, CE) estableciendo variaciones del potencial a una velocidad determinada. En la configuración amperométrica, la corriente se mide en función del tiempo a un potencial constante. Un tercer electrodo actúa como referencia en la medición y controla el potencial del WE, por lo tanto, se denomina electrodo de referencia (*reference electrode*, RE). La corriente medida depende de las reacciones de oxidación o reducción entre el analito y el elemento de bio-reconocimiento en el WE. Los sensores con este principio operativo detectan la transferencia de

electrones entre el analito y el WE o entre una sonda redox (p. ej., ferricianuro ferroceno) en una solución electrolítica y el WE¹³²⁸. Las mediciones son directamente proporcionales a la concentración del analito en rangos lineales²⁹.

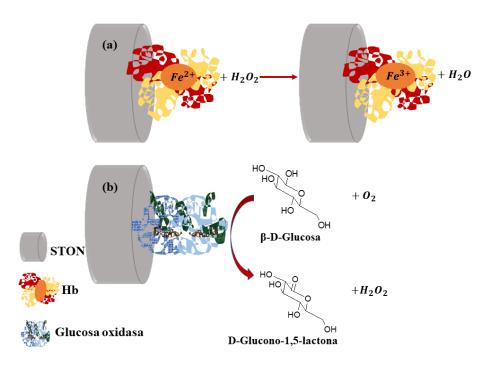
La detección voltamétrica/amperométrica es la más utilizada en el desarrollo de biosensores, proporcionando una herramienta sencilla con excelentes resultados para la detección. En cuanto a los materiales, los NTs de TiO_2 se utilizan para fabricar biosensores debido a su excelente biocompatibilidad (que permite preservar la naturaleza biomolecular) y alta hidrofilia (esencial para inmovilizar biomoleculas). Por lo tanto, los NTs de TiO_2 son excelentes sustratos para "capturar" o "atrapar" biomoléculas. Sin embargo, su uso como biosensores electroquímicos se ve obstaculizado debido a la baja conductividad de los NTs de TiO_2 . Por esta razón, es necesario utilizar mediadores redox como en el trabajo de Kafi y col., donde diseñaron un biosensor de H_2O_2 consistente en NTs de TiO_2 modificado con hemoglobina (Hb) sobre un electrodo de carbón vítreo, utilizando azul de metileno como mediador redox para mejorar la conexión eléctrica entre la Hb y el electrodo³⁰. Encontraron que la Hb inmovilizada en los NTs de TiO_2 presenta una alta actividad catalítica para la reducción de H_2O_2 y conserva su bioactividad a pesar del proceso utilizado para su anclaje a los NTs (ver figura 5). Es de destacar que los biosensores de H_2O_2 se han estudiado ampliamente ya que la detección sensible de H_2O_2 es importante

Allen J. Bard y Larry R. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2nd. Wiley, 2001.

Nekane Reta y col. "Nanostructured Electrochemical Biosensors for Label-Free Detection of Water- and Food-Borne Pathogens". En: *ACS Applied Materials & Interfaces* 10.7 (2018), págs. 6055-6072. DOI: 10.1021/acsami.7b13943.

A. K.M. Kafi y col. "Highly sensitive amperometric H2O2 biosensor based on hemoglobin modified TiO2 nanotubes". En: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 662.1 (2011), págs. 64-69. DOI: 10.1016/j.jelechem.2011.03.021.

Figura 5. Dos reacciones típicas entre el elemento de bio-reconocimiento y un analito, que ocurren en la superficie de un biosensor basado en NTs de TiO_2 . (a) Reducción de H_2O_2 catalizada por la hemoglobina inmovilizada en el biosensor y (b) oxidación de glucosa catalizada por la glucosa oxidasa inmovilizada en el biosensor. Tomado de Bertel y col. Sensors 2021, 21, 6167.



para muchos campos, como el análisis ambiental, el procesamiento de alimentos, las industrias química, bioquímica y farmacéutica. En la tabla 1 se resumen algunos trabajos de biosensores voltamétricos/amperométricos con sus respectivos límites de detección (*Limit of Detection*, LoD).

1.2.2. Potenciométrica En los detectores potenciométricos, se mide la diferencia de potencial entre WE y RE, esta diferencia de potencial está determinada por una reacción en la celda bajo un flujo de corriente cercano a cero¹³. De esta manera esta diferencia de potencial es dependiente de la concentración del analito en la solución.

Tabla 1. Biosensores Voltamétricos/Amperométricos basados en STON. Tomado de Bertel y col. Sensors 2021, 21, 6167.

STON y aditivos	Elemento de bio- reconocimiento	Analito	$\begin{array}{ c c c c c } \textbf{LoD} & [\mu M] \\ \hline \end{array}$
NTs de TiO_2 / Azul de Prusia / Au^{31}	Glucosa oxidasa	glucosa	5
NTs de TiO_2 / Azul de metileno / Quitosano ³²	Hb	H_2O_2	0.08
NTs de TiO_2 -Carbono ³³	Hb	H_2O_2	0.031
NTs de TiO_2 / albúmina de suero bovino / glutaraldehí-do ³⁴	Glucosa oxidasa	Glucosa	3.8
PDT / Nafion ³⁵	Lacasa	Catecol	0.75
Nanobarras de TiO_2 - Ti^{3+36}	Nafion / Peroxida- sa de rábano	H_2O_2	0.008
PDT-Pt / Glutaraldehído ³⁷	Lactato oxidasa	Ácido láctico	3
PDT / NTs de Carbono / Azul de Prusia ³⁸	Peroxidasa de rá- bano	H_2O_2	810

Chen y col. desarrollaron un biosensor de urea utilizando una celda electroquímica con un electrodo de calomelano saturado como RE y un electrodo de película nanoporosa de TiO_2 con ureasa inmovilizada como WE³⁹. Estas PDTs (con fase anatasa) funcionalizadas con ureasa se fabricaron en la superficie de hilos de Ti mediante el proceso de sol-gel de superficie. El cambio significativo en la respuesta potenciométrica del electrodo, cuando se agregaron cantidades sucesivas de urea a la celda electroquímica, se debió al cambio en el pH de la solución asociado a la reacción de hidrólisis de la urea mediada por el catalizador, enzima ureasa (ver figura 6). El biosensor de urea mostró un tiempo de respuesta rápido (25 s), además sus pruebas clínicas confirmaron la viabilidad de detectar urea en muestras de

Xin Chen, Zhengpeng Yang y Shihui Si. "Potentiometric urea biosensor based on immobilization of urease onto molecularly imprinted TiO2 film". En: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 635.1 (2009), págs. 1-6. DOI: 10.1016/j.jelechem.2009.07.005.

orina. La detección de urea en los fluidos humanos es importante debido a que permite identificar o prevenir algunas enfermedades. En este sentido, se conoce que el aumento de la concentración de urea en fluidos humanos patológicos como la sangre (el rango normal es de 15 a 40 mg/dL) y la orina provoca obstrucción del tracto urinario, deshidratación e insuficiencia renal. Por el contrario, los niveles bajos de urea pueden estar relacionados con insuficiencia hepática, caquexia y síndrome nefrítico⁴⁰.

1.2.3. Impedimétrica La espectroscopia de impedancia electroquímica (*Electrochemical impedance spectroscopy*, EIS) es una herramienta analítica interfacial usada ampliamente debido a su alta sensibilidad, demanda mínima de hardware, fácil producción y bajo costo⁴¹. El procesamiento de datos de EIS proporciona diferentes respuestas de funciones eléctricas como impedancia¹⁰, admitancia, capacitancia compleja⁴², dureza química experimental⁴³ y otras. En términos generales EIS es una técnica que permite conocer las propiedades resistivas y capacitivas (dieléctricas) de los sistemas electroquímicos midiendo el cambio de impedancia cuando

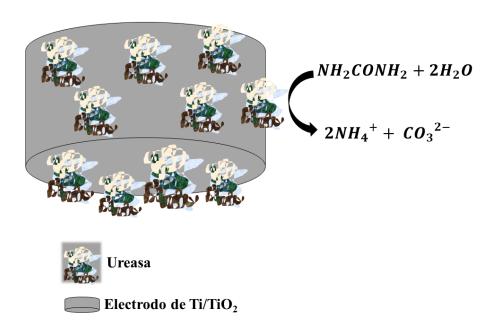
Reza Rahmanian y col. "Development of sensitive impedimetric urea biosensor using DC sputtered Nano-ZnO on TiO2 thin film as a novel hierarchical nanostructure transducer". En: Sensors and Actuators, B: Chemical 256 (2018), págs. 760-774. DOI: 10.1016/j.snb.2017.10.009.

Adriano Santos. "Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors". En: *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques* S7.012 (2014). DOI: 10.4172/2155-9872.s7-016.

Paulo R. Bueno, Giulia Mizzon y Jason J. Davis. "Capacitance Spectroscopy: A Versatile Approach To Resolving the Redox Density of States and Kinetics in Redox-Active Self-Assembled Monolayers". En: *The Journal of Physical Chemistry B* 116.30 (2012), págs. 8822-8829. DOI: 10.1021/jp303700f.

David A. Miranda y Paulo R. Bueno. "Chemical Hardness of Mesoscopic Electrochemical Systems Directly Analyzed from Experimental Data". En: *The Journal of Physical Chemistry C* 123.34 (2019), págs. 21213-21223. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b04020.

Figura 6. La reacción de hidrólisis catalítica enzimática en las proximidades del electrodo de ${\rm Ti}/{\rm Ti}O_2$ funcionalizado con ureasa. Tomado de Bertel y col. Sensors 2021, 21, 6167.



Fuente:

Linda Bertel, David A. Miranda y José Miguel García-Martín. "Nanostructured Titanium Dioxide Surfaces for Electrochemical Biosensing". En: *Sensors* 21.18 (2021). DOI: 10.3390/s21186167

se someten a un flujo de corriente alterna 1341 . Existen dos configuraciones que permiten medir el espectro de impedancia: potenciométrica y galvanométrica. En la configuración potenciométrica, el sistema se perturba por una señal de voltaje sinusoidal con amplitud V_0 , frecuencia f y un voltaje continuo; luego se mide la respuesta de corriente, con amplitud I_0 y un cierto desfase, respecto al voltaje de excitación, ϕ . Por otro lado, en la configuración galvanostática, una corriente sinusoidal con una compensación adecuada excita el sistema y se mide la respuesta de voltaje. La impedancia (Z) está definida por la Ecuación (I):

$$Z = \frac{V_0}{I_0} e^{-i\phi} \tag{1}$$

donde ϕ es la fase entre la corriente y el voltaje. La medición de Z a diferentes frecuencias en un amplio rango de valores de intensidad de corriente se conoce como espectros de impedancia¹³⁴¹. Como ejemplo de otra respuesta de función eléctrica, la capacitancia compleja C^* se define mediante la Ecuación (2):

$$C^* = \frac{1}{i\omega Z} = \frac{I_0}{i\omega V_0} e^{i\phi} \tag{2}$$

donde $\omega=2\pi f$ es la frecuencia angular. Además, la medida de la dureza química experimental se ha definido como la inversa de la capacitancia⁴³⁴⁴. La elección de la función eléctrica a representar depende de la naturaleza eléctrica del detector; si el comportamiento es principalmente capacitivo, la capacitancia compleja o la dureza química es la elección correcta, mientras que la impedancia debe seleccionarse en caso de una respuesta principalmente resistiva. Por lo general, un biosensor impedimétrico requiere una sonda redox, una solución electrolítica y el uso de una celda de tres electrodos. Un ejemplo de esta configuración lo presentaron Wang y col. donde el WE consistía en nanocompuestos de TiO_2 (Nb,V)/quitosano depositados en óxido de indio y estaño (ITO) y luego modificados con sonda de ADN (ssDNA), el CE era de Pt, el RE era de Ag/AgCl y la solución electrolítica fue una solución de PBS con una sonda redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-45}$. Aquí, la fase de TiO_2 , verificada por análisis XRD, era rutilo. Una curva característica de EIS para biosensores impedimétricos es el diagrama de Nyquist, que se obtiene trazando la componente imaginaria (Z") frente a la componente real (Z') de la impedancia compleja (Z). La parte semicircular

S P Corzo, P R Bueno y D A Miranda. "The experimental chemical hardness in the interaction between -tubulin and epothilone B". En: *Journal of Physics: Conference Series* 1403 (2019), pág. 012016. DOI: 10.1088/1742-6596/1403/1/012016.

Yu Wang y col. "Sensitive impedimetric DNA biosensor based on (Nb,V) codoped TiO2 for breast cancer susceptible gene detection". En: *Materials Science and Engineering: C* 77 (2017), págs. 867 -873. DOI: https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.260.

Tabla 2. Biosensores impedimétricos basados en STON. Tomado de Bertel y col. Sensors 2021, 21, 6167.

STON y aditivos	Elemento de bio- reconocimiento	Analito	LOD
Nanofibras de TiO_2 -Carbono / Espuma de grafito ⁴⁶	Anti-ErbB2	ErbB2 antígeno	1.0 fM
PDT-Nanopartículas de Au/3- Aminopropyltriethoxysilane ⁴⁷	Hb	H_2O_2	10 μ M
PDT-(Nb,V) / Quitosano ⁴⁸	sonda de DNA	Gen susceptible al cáncer de mama	0.109 fM
PDT-Oxido de Grafeno reducido ⁴⁹	Aptámero de ADN	Antígeno prostáti- co específico	29.4 fM
PDT / 3- Aminopropyltriethoxysilane / Grafeno carboxílico ⁵⁰	Glucosa oxidasa	Glucosa	24 μM

del diagrama de Nyquist representa un proceso limitado de transferencia de electrones. Su diámetro es igual a la resistencia de transferencia de electrones, Rct, que controla la cinética de transferencia de electrones de la sonda redox en la interfaz del electrodo. Para el biosensor TiO_2 -(Nb,V)/quitosano/ITO/ssDNA en presencia de diferentes concentraciones de ADN diana (un gen asociado al cáncer de mama), las curvas de Nyquist mostraron que a medida que aumentaba la concentración del ADN diana, el diámetro del semicírculo también aumentaba (Rct).

En la tabla 2 se muestran algunos trabajos de biosensores basados en STON, representativos de la detección impedimétrica, también se indican sus LOD.

1.3. FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES DE TiO_2 CON BIOMOLÉCULAS

Las interacciones entre las biomoléculas y la superficie de TiO_2 pueden ocurrir por procesos de fisisorción (donde no hay formación de enlaces y la interacción es ne-

tamente electrostática) o quimisorción (donde puede darse la formación de enlaces covalentes)⁵¹. La deposición en multicapa, desordenada debido a reacciones o interacciones rápidas, o la unión de monocapa autoensamblada (*self-assembled monolayer*, SAM), ordenada y en equilibrio termodinámico, son los dos enfoques que permiten la modificación de la superficie de los sustratos. La formación de múltiples capas o de SAMs depende de las condiciones del método utilizado, por ejemplo, el tiempo de deposición, el tipo de interacción entre la superficie y la biomolécula, y la estructura de la biomolécula⁵².

Los óxidos del tipo MOx, en los que M puede ser un metal (por ejemplo, Al, Fe, Ti) o un semiconductor (por ejemplo, Si), tienen el potencial de ser funcionalizados a través de la reactividad de los grupos -OH en sus superficies, que actúan como puntos de anclaje covalentes para varios grupos funcionales (silanos, fosfonatos, carboxilatos, catecoles, alquenos/alquinos y aminas) de moléculas específicas ⁵².

Los alquilsilanos son los compuestos más utilizados en la preparación de monocapas sobre óxidos debido a la rápida formación de enlaces covalentes entre las superficies que contienen grupos -OH y los grupos de anclaje silano⁵². El (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) se usa comúnmente para obtener monocapas en superficies

_

Sh. Nadzirah y col. "State-of-the-Art on Functional Titanium Dioxide-Integrated Nano-Hybrids in Electrical Biosensors". En: *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 52.3 (2022). PMID: 32997522, págs. 637-648. DOI: 10.1080/10408347.2020.1816447. eprint: https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1816447.

Sidharam P. Pujari y col. "Covalent surface modification of oxide surfaces". En: *Angewandte Chemie - International Edition* 53.25 (2014), págs. 6322-6356. DOI: 10.1002/anie.201306709.

de TiO_2 terminadas en aminas⁵³, que luego permiten la adhesión de anticuerpos⁵⁴, receptores celulares⁵⁵ y superficie de grafeno carboxílico⁵⁶.

Meroni y col. funcionalizaron una película de TiO_2 con APTES haciendo un proceso de inmersión de la película en una solución de APTES 2 M en tolueno, contenida en una botella de vidrio, bajo una atmósfera de N_2^{53} . El sistema se sometió a 80 °C durante 2 h. Finalmente, la película se sonicó en tolueno durante 15 min y luego se secó con un flujo de gas N_2 .

En general, este tipo de modificación superficial por alquilsilanos se puede realizar empleando reacciones en solución (generalmente a T^a) o en fase vapor (a altas temperaturas, hasta 120 °C). En el proceso de modificación por reacciones en solución, la viscosidad del solvente, la polaridad y la cantidad de agua para hidrolizar las moléculas de silano son factores determinantes⁵², mientras que, para la estrategia en fase vapor, el tiempo de reacción entre el silano y la superficie es muy importante y puede ser de varias horas o días⁵².

En este sentido, Trino y col. modificaron películas delgadas de TiO_2 con (3-aminopropil)

Daniela Meroni y col. "A close look at the structure of the TiO2-APTES interface in hybrid nanomaterials and its degradation pathway: An experimental and theoretical study". En: *Journal of Physical Chemistry C* 121.1 (2017), págs. 430-440. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b10720.

M. K. Md Arshad y col. "Field-Effect Transistor-Integration with TiO2 Nanoparticles for Sensing of Cardiac Troponin I Biomarker". En: *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 18.8 (2018), págs. 5283-5291. DOI: 10.1166/jnn.2018.15419.

Jin Xie y col. "Targeting and photodynamic killing of cancer cell by nitrogen-doped titanium dioxide coupled with folic acid". En: *Nanomaterials* 6.6 (2016). DOI: 10.3390/nano6060113.

Miloš Ognjanović y col. "TiO2/APTES cross-linked to carboxylic graphene based impedimetric glucose biosensor". En: *Microchemical Journal* 158.June (2020), pág. 105150. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105150.

trimetoxisilano (APTMS) por inmersión de la película en una solución de APTMS durante 1 min a T^{a57} .

Por otra parte, Wang y col. desarrollaron un biosensor de antígeno SCC-Ag que consiste en un electrodo interdigitado recubierto de TiO_2 , modificado con APTES para inmovilizar anticuerpos SCC-Ag unidos a nanoestrellas de oro⁵⁸. El antígeno del carcinoma de células escamosas (SCC-Ag) es un biomarcador tumoral sérico circulante, y los niveles altos de este en los pacientes se han asociado con la presencia de cáncer de cabeza y cuello. Para la funcionalización del electrodo se depositaron unas gotas de una solución de APTES al 3% en etanol sobre la superficie de TiO_2 y se mantuvieron durante 3 h a temperatura ambiente. La superficie se lavó con etanol para eliminar los residuos de APTES no anclados. El anticuerpo unido a nanoestrellas de oro se depositó sobre la superficie de TiO_2 -APTES y el proceso de inmovilización tuvo lugar en 1 hora. Luego, la superficie se lavó con una solución tampón de PBS para completar la eliminación de los anticuerpos no unidos. Para detectar el SCC-Ag, se utilizó una solución de etanolamina 1 M para enmascarar las áreas de superficie libres de anticuerpos y se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se trató el electrodo con SCC-Ag y se midieron las respuestas de corriente antes y después de la adición de SCC-Ag. Para los experimentos se utilizó un voltaje de barrido lineal de 0 a 2 V con un paso de voltaje de 0.01 V. El LOD alcanzado fue de 10 fM, y se llevaron a cabo experimentos de control con dos proteínas diferentes (serpina y albúmina) que no podían ser recono-

-

Luciana D. Trino y col. "Surface Physicochemical and Structural Analysis of Functionalized Titanium Dioxide Films". En: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 546.March (2018), págs. 168-178. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2018.03.019.

Yu Wang y col. "Nanodetection of Head and Neck Cancer on Titanium Oxide Sensing Surface". En: *Nanoscale Research Letters* 15.1 (2020). DOI: 10.1186/s11671-020-3262-x.

cidas por anti-SCC-Ag, lo que sugiere una detección selectiva de SCC-Ag.

El enlace carboxilato-metal es uno de los enfoques más antiguos que se han estudiado para obtener SAM 52 . Las nanopartículas de TiO_2 modificadas con ácido carboxílico se pueden obtener utilizando un método solvotérmico a partir de la solución de la molécula con el grupo carboxílico 59 . Las nanopartículas de TiO_2 en presencia de ácido carboxílico (ácido p-bromobenzoico) en etanol/agua (1/4 en volumen) se mezclaron en una autoclave y se calentaron a 100 $^{\circ}$ C durante 24 h. Adicionalmente, Trino y col., inmovilizaron ácido 3-(4aminofenil)propiónico en una PDT mediante una metodología sencilla 57 . La PDT se sumergió durante 5 min en una solución de Ácido 3-(4-aminofenil)propiónico (2 mM, en etanol) preparada previamente y se calentó hasta 40 $^{\circ}$ C.

Otras estrategias empleadas para la modificación de la superficie de NTOS incluyen el uso de atrapamiento de polímeros como polietilenglicol (PEG) 57 o ácido polipirrol propílico 60 para inmovilizar biomoléculas en sustratos. Venkatasubbu y col. anclaron AF a la superficie de nanopartículas de TiO_2 recubiertas con PEG, para el transporte de paclitaxel a las células cancerosas 61 . La mezcla de nanopartículas de TiO_2 y solución de PEG (en una proporción de masa de 1:1) se agitó a 750 rpm durante la noche. Para la unión del AF a las nanopartículas-PEG, se activó el grupo carboxílico

Qiyun Qu y col. "Chemically Binding Carboxylic Acids onto TiO2 Nanoparticles with Adjustable Coverage by Solvothermal Strategy". En: *Langmuir* 26.12 (2010). PMID: 20345108, págs. 9539-9546. DOI: 10.1021/la100121n. eprint: https://doi.org/10.1021/la100121n.

Yung-Ming Chu y col. "TiO2 nanowire FET device: Encapsulation of biomolecules by electro polymerized pyrrole propylic acid". En: *Biosensors and Bioelectronics* 26.5 (2011), págs. 2334-2340. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.10.006.

G. Devanand Venkatasubbu y col. "Folate targeted PEGylated titanium dioxide nanoparticles as a nanocarrier for targeted paclitaxel drug delivery". En: *Advanced Powder Technology* 24.6 (2013), págs. 947-954. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apt.2013.01.008.

del AF usando diciclohexil carbodiimida y se formó isourea. Por otra parte, los tioles sobre óxidos no se han estudiado de forma intensiva⁵². Sin embargo, la formación del enlace STi se estudió por Trino y col. en la funcionalización de PDT con ácido 3-mercaptopropiónico, donde la caracterización de la superficie por XPS indicó una funcionalización exitosa⁵⁷.

2. FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DELGADAS FUNCIONALIZADAS CON ÁCIDO FÓLICO

2.1. INTRODUCCIÓN

Las películas delgadas de TiO_2 (PDTs) se pueden depositar mediante una gran variedad de técnicas, tales como la pulverización catódica con magnetrón²²²³, deposición física de vapor por haz de electrones⁶²⁶³, deposición por láser pulsado (PLD)⁶⁴²⁵, deposición de capas atómicas (*Atomic Layer Deposition*, ALD)⁶⁵, solgel³⁹⁶⁶, pirólisis por pulverización,⁶⁷ y deposición química de vapor⁶⁸. PLD es un método ampliamente utilizado ya que permite controlar el espesor de las películas

Manuel Salado y col. "1-dimensional TiO2 nano-forests as photoanodes for efficient and stable perovskite solar cells fabrication". En: *Nano Energy* 35.November 2016 (2017), págs. 215-222. DOI: 10.1016/j.nanoen.2017.03.034.

⁶³ Lola González-García y col. "Correlation lengths, porosity and water adsorption in TiO 2 thin films prepared by glancing angle deposition". En: *Nanotechnology* 23.20 (2012). DOI: 10.1088/0957-4484/23/20/205701.

⁶⁴ Bingpan Gao y col. "Femtosecond pulsed laser deposition of nanostructured TiO2 films in atmosphere". En: AIP Advances 7.9 (2017). DOI: 10.1063/1.4997398.

Luting Liu, Ritwik Bhatia y Thomas J. Webster. "Atomic layer deposition of nano-TiO2 thin films with enhanced biocompatibility and antimicrobial activity for orthopedic implants". En: *International Journal of Nanomedicine* 12 (2017), págs. 8711-8723. DOI: 10.2147/IJN.S148065.

Nelcy Della Santina Mohallem y col. "Pure and Nanocomposite Thin Films Based on TiO2 Prepared by Sol-Gel Process: Characterization and Applications". En: *Titanium Dioxide*. Ed. por Dongfang Yang. Rijeka: IntechOpen, 2018. Cap. 4. DOI: 10.5772/intechopen.74335.

Hafida Attouche y col. "Precursor nature and molarities effect on the optical, structural, morphological, and electrical properties of TiO2 thin films deposited by spray pyrolysis". En: *Optik* 203 (2020), pág. 163985. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2019.163985.

Wenjiao B. Wang y col. "Chemical vapor deposition of TiO2 thin films from a new halogen-free precursor". En: *Journal of Vacuum Science & Technology A* 32.6 (2014), pág. 061502. DOI: 10. 1116/1.4894454. eprint: https://doi.org/10.1116/1.4894454.

con buena homogeneidad y reproducibilidad.

Por otro lado, la funcionalización de PDTs con biomoléculas ha hecho posible el desarrollo de biosensores de $H_2O_2^{69}$, glucosa⁷⁰, ácido láctico⁷¹, urea³⁹, antígeno prostático específico⁷², receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)⁷³, entre otros. Sin embargo, existen pocos trabajos donde se realice un estudio de la adsorción de biomoléculas en la superficie de TiO_2 .

En este capítulo se dan los detalles experimentales para la fabricación de PDTs, usando el método de PLD, y su posterior funcionalización con AF. Además, se muestra la caracterización de estas películas prístinas y funcionalizadas por diferentes técnicas como AFM, espectrocopia Raman, XPS, y ángulo de contacto.

⁶⁹ L. Andrés Guerrero y col. "Peroxide Electrochemical Sensor and Biosensor Based on Nanocomposite of TiO2 Nanoparticle/Multi-Walled Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrode". En: *Nanomaterials* 10.1 (2020). DOI: 10.3390/nano10010064.

Wei Wang y col. "Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized on unhybridized titanium dioxide nanotube arrays". En: *Microchimica Acta* 181.3-4 (2014), págs. 381-387. DOI: 10.1007/s00604-013-1121-5.

Qingui Yang y col. "Electrochemical Biosensor Based on Nano TiO2 Loaded with Highly Dispersed Photoreduced Nano Platinum". En: *Journal of The Electrochemical Society* 165.13 (2018), B610-B615. DOI: 10.1149/2.1041813jes.

Masoud Karimipour y col. "A glassy carbon electrode modified with TiO2(200)-rGO hybrid nanosheets for aptamer based impedimetric determination of the prostate specific antigen". En: *Microchimica Acta* 186.1 (2019), págs. 1-9. DOI: 10.1007/s00604-018-3141-7.

Md. Azahar Ali y col. "Microfluidic Immuno-Biochip for Detection of Breast Cancer Biomarkers Using Hierarchical Composite of Porous Graphene and Titanium Dioxide Nanofibers". En: *ACS Applied Materials & Interfaces* 8.32 (2016). PMID: 27442623, págs. 20570-20582. DOI: 10.1021/acsami.6b05648. eprint: https://doi.org/10.1021/acsami.6b05648.

2.2. METODOLOGÍA

2.2.1. Deposición de películas delgadas por PLD reactivo

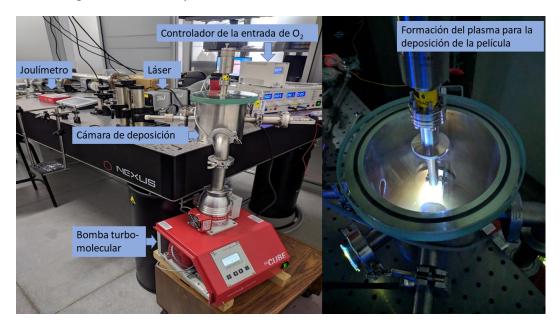
Película delgada de TiO_2 A partir de una oblea, se cortaron placas de Si intrínseco con medidas de aproximadamente 2.2 cm de largo y 1 cm de ancho, para usarse como sustratos en la deposición de TiO_2 . Estas placas se lavaron con 2-propanol y se secaron con aire justo antes de ser cargadas a la cámara de deposición.

Se realizó la ablación de un blanco de Ti metálico giratorio (a 28 rpm) utilizando el tercer armónico de un láser Nd: YAG (Q-smart 850, Quantel), 355 nm. El haz láser se enfocó a 45° sobre el blanco de Ti. La frecuencia de repetición del láser pulsado fue de 10 Hz con un ancho de pulso de 6 ns, y la fluencia de la luz láser sobre el blanco se varió de 1.3 a 2.5 J/cm^2 . Una bomba turbomolecular evacuó la cámara de deposición de acero inoxidable a una presión base del orden de 7×10^{-3} Pa. Las PDTs se depositaron a T^a sobre los sustratos de Si, con una distancia blanco-sustrato de 5 cm, bajo una presión de oxígeno de 4.6 Pa durante 5 min. En la figura 7 se muestra el montaje experimental usado para fabricar las películas delgadas en esta investigación.

Estas muestras tienen toda su superficie cubierta con TiO_2 , por lo que el contacto eléctrico (para las mediciones electroquímicas) se realizó sobre el depósito de TiO_2 .

Película delgada de $TiO_2 - WO_3$ Se cortaron placas de Si intrínseco con medidas de aproximadamente 2.2 cm de largo y 1 cm de ancho. Estas placas se lavaron con 2-propanol y se secaron con aire, para posteriormente colocar máscaras (con cinta kapton) en un extremo de la muestra, dejando 1.3 cm del largo del sustrato

Figura 7. Montaje experimental del sistema de PLD indicando las partes más importantes. A la derecha se observa el proceso de deposición de la película por medio de la generación del plasma.



descubierto para el depósito de $TiO_2 - WO_3$.

Para el proceso de deposición se utilizaron las mismas condiciones que en la deposición de las PDTs (descrito anteriormente), excepto, que se usó un blanco de Ti-W (10:90 wt%) y que la fluencia de la luz láser fue de $14.2\ J/cm^2$. Las películas delgadas de $TiO_2 - WO_3$ (PDTWs) se depositaron a T^a sobre los sustratos de Si con máscaras en uno de sus extremos, con una distancia blanco-sustrato de 4.5 cm, bajo una presión de oxígeno de 4.6 Pa durante 5 min.

Después del depósito se retiraron las máscaras de las muestras para usar esta región de Si como el contacto eléctrico del detector.

2.2.2. Funcionalización de películas delgadas con ácido fólico

Funcionalización no covalente de películas delgadas de TiO_2 Se preparó una solución de AF (Merck) 2mM en agua tipo I agitando la solución sobre una plancha magnética durante 5 min; la concentración de AF utilizada fue de 2 mM para RS, AFM y ángulo de contacto; en los experimentos XPS, la concentración de FA fue mayor, 50 mM, para detectar un cambio significativo en la señal de N 1s. Para la disolución completa y para ajustar el pH de la solución entre 10 y 11, se añadió gota a gota una solución de NaOH 1M. Esta solución de AF se calentó hasta 50 °C y se detuvo el calentamiento. La PDT preparada a 2.5 J/cm^2 se sumergió durante 30 min en la solución de AF. La PDT funcionalizada con AF (AF-PDT) se lavó con agua tipo I y se secó con gas N_2 .

Funcionalización covalente de películas delgadas de TiO_2-WO_3 Se preparó una solución de AF 2 mM en etanol/agua 1:4, agitando la solución sobre una plancha magnética durante 5 min. La concentración de AF utilizada para funcionalizar la película que fue analizada por XPS fue mayor, 50 mM, para detectar un cambio significativo en la señal de N 1s. Para la disolución completa y para ajustar el pH de la solución entre 10 y 11, se añadió gota a gota una solución de NaOH 1M. Esta solución de AF se calentó, cuando se alcanzaron los 54 °C, la PDTW se sumergió durante 30 min en la solución de AF conservando la temperatua al rededor de los 54 °C. La PDTW funcionalizada con AF (AF-PDTW) se lavó con agua tipo I y se secó con gas N_2 .

2.2.3. Caracterización El espesor de las PDTs y PDTWs se obtuvo midiendo un escalón en una imagen AFM. Adicionalmente, se estudió la rugosidad y morfo-

logía de PDT, PDTW, y FA-PDTW mediante imágenes AFM obtenidas a través de una Unidad SPM Multi-Función AFM5100N de Hitachi operando en modo contacto y no contacto con sondas comerciales Veeco DNP-S10 y Nanoprobe FIB2-100S, respectivamente. Para el cálculo tanto de los valores de rugosidad como del espesor de las películas delgadas, se analizaron dos imágenes diferentes de cada muestra. Las imágenes AFM para el estudio de funcionalización de las PDTs se realizaron utilizando un microscopio Bruker Dimension Icon que opera en Modo no contacto y sondas comerciales (Nanosensors, tipo PPP-FM).

Se realizaron mediciones de espectroscopía Raman para analizar las siguientes muestras: PDT obtenida a $2.5\ J/cm^2$ de fluencia del láser, PDTW, AF sólido y AF-PDT. Los espectros Raman se adquirieron utilizando un LabRam HR evolution científico de Horiba (Yobim Yvon, EE. UU.). Cada espectro se recolectó utilizando un objetivo de larga distancia de trabajo de 100X y el tiempo de adquisición fue de 5 s para 20 acumulaciones promediadas. Se utilizó una excitación del láser de 532nm y una rejilla de difracción de 600 líneas mm^{-1} .

Los experimentos XPS se registraron utilizando la plataforma de caracterización de superficies XPS / ISS / UPS- A Centeno construida por SPECS (Alemania). La plataforma está equipada con un analizador de energía PHOIBOS 150 2D-DLD. Durante el análisis, la presión en la cámara de análisis fue de $1\times 10^{-9}Pa$. Para las mediciones, una fuente de rayos X monocromática Al K α (FOCUS 500) operó a $100\,W$ y se fijó como energía de paso $100\,eV$ para espectros generales y $15-20\,eV$ para espectros de alta resolución. La compensación de la carga superficial se controló mediante un cañón de inundación (FG 15/40-PS FG 500), operado a $40-58\,\mu A$ y $1.8-3.7\,eV$. Las muestras (solución de AF 50 mM en un sustrato de Si, PDTs fabricadas a diferentes fluencias, PDTW, FA-PDT y FA-PDTW) se montaron en cinta

conductora de cobre en portamuestras de metal de acero inoxidable, proporcionado por SPECS, para su análisis. Para el análisis de los espectros XPS se utilizó el software CasaXPS. Como patrón de calibración interna, para la calibración de energía, se utilizó la energía de enlace del nivel de fotoelectrones C 1s (284.6 eV). Se implementó el fondo Shirley para el análisis de todos los picos. Los valores de los factores de sensibilidad relativa (R.S.F.) utilizados fueron 1, 2.93, 7.81, 1.8 y 3.5 para C 1s, O 1s, Ti 2p, N 1s y W 4f, respectivamente.

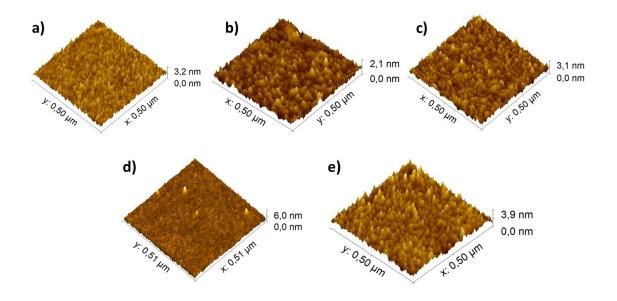
El ángulo de contacto se determinó mediante la técnica de gota sésil y se utilizó agua tipo I. Se depositaron al menos tres gotas en diferentes posiciones de las muestras y se midió el ángulo de contacto, usando el See sofware 6.0 para el caso de las PDT y AFPDT, o el equipo DSA25E (KRÜSS) para el análisis de las muestras PDTW y AF-PDTW. Las mediciones se realizaron a T^a .

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Películas delgadas

Película delgada de TiO_2 Las PDTs depositadas en sustrato de Si a cinco fluencias de láser diferentes se caracterizaron mediante AFM, ver la figura 8. Los experimentos de AFM indican que a medida que aumenta la fluencia de la luz láser, la rugosidad aumenta como se muestra en los valores de rugosidad de la raíz cuadrática media (RMS), $\Delta \delta_{RMS}$, en la figura 9. Los valores $\Delta \delta_{RMS}$ se midieron en toda el área de la imagen AFM correspondiente (figura 8) para cada película delgada. El espesor de la película δ se determinó mediante el análisis AFM de un escalón entre el límite de la película y el sustrato, que fue realizado usando una máscara, ver figura 9. Para un tiempo de depósito de $5\,min$, el espesor de la película δ aumenta con

Figura 8. Imágenes AFM de PDTs depositadas a (a) 1.3, (b) 1.6, (c) 1.9, (d) 2.2 y (e) $2.5\ J/cm^2$ de fluencia de la luz láser. Estas imágenes fueron obtenidas con una Unidad SPM Multi-Función AFM5100N de Hitachi operado en modo contacto.



la fluencia del láser, es decir, a mayor fluencia del láser, el espesor de la película δ aumenta.

El aumento observado en el espesor δ y la rugosidad $\Delta\delta_{RMS}$ con la fluencia del láser puede explicarse con el proceso de ablación que tiene lugar cuando los pulsos del láser impactan en el blanco de Ti. Los átomos de Ti eliminados del blanco de Ti por el proceso de ablación se depositan en el sustrato de Si junto con átomos de O, como lo confirma el análisis XPS, consulte la tabla 3. Cuanta más energía tenga el pulso láser, este elimina más átomos de Ti del blanco, entonces, una mayor fluencia implica más átomos de Ti depositados en el sustrato.

Los espectros XPS representativos de PDTs preparadas en solo dos fluencias láser diferentes (2.2 y 2.5 J/cm^2) se muestran en la figura 10a porque los espectros de las

Figura 9. (a) Rugosidad $\Delta \delta_{RMS}$ y (b) Espesor de PDTs sobre sustrato de Si, obtenidas con cinco fluencias de luz láser diferentes.

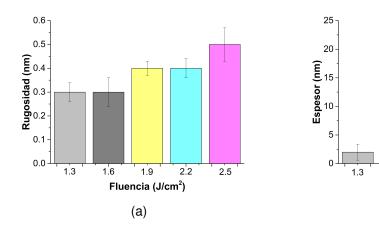


Tabla 3. Porcentaje de fracciones atómicas elementales obtenidas por XPS de PDTs fabricadas con cinco fluencias diferentes (F_1 a F_5 en J/cm^2) de la luz láser.

1.6

1.9

Fluencia (J/cm²)
(b)

2.2

2.5

	$F_1 \ 1.3 \ J/cm^2$	$F_2 \ 1.6 \ J/cm^2$	$F_3 \ 1.9 \ J/cm^2$	$F_4 \ 2.2 \ J/cm^2$	$F_5 \ 2.5 \ J/cm^2$
O 1s [%]	69	68	68	68	67
Ti 2p [%]	31	32	32	32	33

cinco películas preparadas mostraron la presencia de los mismos picos correspondientes a Ti 2s, O 1s, Ti 2p, C 1s, Ti 3s, Ti 3p y O 2s. Además de oxígeno y titanio, fue posible notar la presencia de carbono, que se relaciona con la contaminación orgánica cuando las muestras se exponen a las condiciones ambientales. Las composiciones elementales de las superficies de las películas se indican en la tabla 3. El espectro O 1s de una PDT fabricada a $2.5\ J/cm^2$ se muestra en la figura 10b como una representación de los espectros del resto de los películas delgadas preparadas ya que el espectro O 1s de todas las muestras evidenció dos contribuciones; la principal (cerca de 529 eV) se asoció con el enlace Ti-O del TiO_2 y la segunda contribución (cerca de 531 eV) se relacionó con el enlace O-H⁵⁷. La presencia de la señal de oxígeno a la energía de 531 eV confirma la presencia de grupos hidroxilo

en la superficie de TiO_2 . La existencia de estos grupos -OH puede ser debida a la exposición de las películas delgadas con el medio ambiente; Una vez que se fabrica la PDT, se expone a las condiciones ambientales, luego, la superficie del óxido reacciona rápidamente con las moléculas de vapor de agua contenidas en el aire y se cubre con grupos hidroxilo (grupos OH terminales y OH puente en cantidades iguales); este mecanismo ha sido descrito por Hanawa y col.⁷⁴. El espectro de Ti 2p para la PDT fabricada a $2.5\ J/cm^2$ se muestra en la figura 10c como representación de los espectros del resto de las películas delgadas preparadas, ya que las posiciones máximas de $Ti2p_{3/2}$ y los valores de la diferencia entre las señales $Ti2p_{1/2}-2p_{3/2}$ para el óxido de Ti (IV) para todas las muestras concuerdan bien con la literatura (458.66 y 5.66 eV respectivamente)⁷⁵.

El espectro Raman de la PDT obtenida a 2.5 J/cm^2 de fluencia láser, figura 11, permite identificar la banda característica de la fase anatasa a 147 cm^{-1} debido al modo E_g (cercano al valor reportado a 143 cm^{-1})⁷⁶. Además, se observan las bandas de la fase rutilo, tales como 233, 433, 620 y 822 cm^{-1} , que se deben a los modos de dispersión de dos fonones⁷⁶, E_g^{7677} , A_{1g}^{7677} y B_{2g}^{77} , respectivamente. Estos resulta-

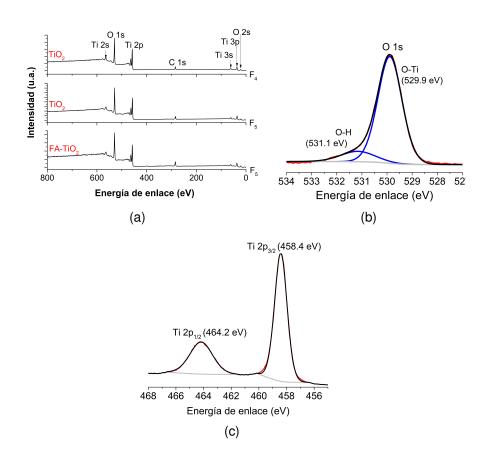
Takao Hanawa. "A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium". eng. En: *Journal of periodontal & implant science* 41.6 (2011). 22324003[pmid], págs. 263-272. DOI: 10.5051/jpis.2011.41.6.263.

Mark C Biesinger y col. "Applied Surface Science Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn". En: *Applied Surface Science* 257.3 (2010), págs. 887-898. DOI: 10.1016/j.apsusc.2010.07.086.

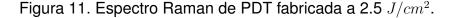
Weiguang Su y col. "Surface Phases of TiO2 Nanoparticles Studied by UV Raman Spectroscopy and FT-IR Spectroscopy". En: *The Journal of Physical Chemistry C* 112.20 (2008), págs. 7710-7716. DOI: 10.1021/jp7118422. eprint: https://doi.org/10.1021/jp7118422.

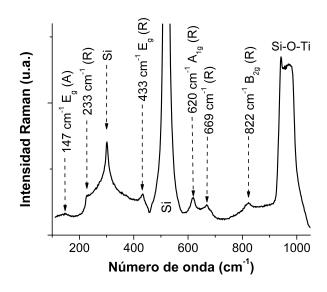
Aniruddha Mondal y col. "Electrical properties of vertically oriented TiO2 nanowire arrays synthesized by glancing angle deposition technique". En: *Electronic Materials Letters* 9.2 (2013), págs. 213-217. DOI: 10.1007/s13391-012-2136-5.

Figura 10. Espectros XPS de (a) PDT preparadas con fluencias láser (2.2 y 2.5 J/cm^2) y FA-PDT. Espectros XPS de alta resolución de (b) O 1s y (c) Ti 2p de una PDT preparada con una fluencia láser de 2.5 J/cm^2 .



dos indican que una mezcla de las fases anatasa y rutilo está presente en la PDT obtenida. Se intentó verificar esta información por medio de mediciones XRD $\theta-2\theta$ convencional y en ángulo rasante; sin embargo no es posible observar las señales del TiO_2 , esto indica que posiblemente el tamaño de grano cristalino del TiO_2 es menor que la longitud de coherencia de los rayos X. Por otro lado, las señales a 300 cm^{-1} y 520 cm^{-1} en el espectro se deben al Si-Si en el sustrato de Si⁷⁷. La banda ancha alrededor de 950 cm^{-1} indica la presencia del enlace Si-O-Ti debido a





la unión estable entre la PDT y el sustrato⁷⁸.

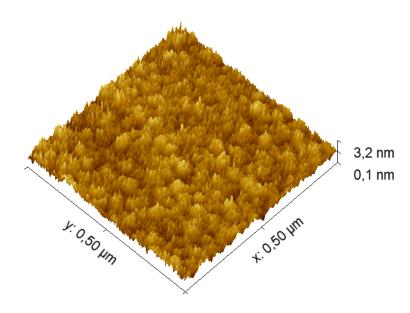
Película delgada de $TiO_2 - WO_3$ Con base en los estudios realizados de la deposición de PDTs sobre sustratos de Si, se realizó la deposición de una película delgada de TiO_2 -W (PDTW) de aproximadamente 6 nm de espesor, a una fluencia del láser de 14.2 J/cm^2 . En la figura 12 se muestra una imagen AFM de una PDTW.

El espectro XPS de O 1s de una PDTW fabricada se muestra en la figura 13a en donde se pueden determinar tres contribuciones. El pico a 533.6 eV se asoció a especies O_2 adsorbidas⁷⁹, el pico a 531.9 eV a grupos hidroxilos (O-H) superficiales

M. Subramanian y col. "Effect of cobalt doping on the structural and optical properties of TiO2 films prepared by sol-gel process". En: *Thin Solid Films* 516.12 (2008), págs. 3776-3782. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tsf.2007.06.125.

⁷⁹ Junhua Hu y col. "Construction of solid-state Z-scheme carbon-modified TiO2/WO3 nanofibers

Figura 12. Imagen AFM de una PDTW. Esta imagen fue obtenida con una Unidad SPM Multi-Función AFM5100N de Hitachi operado en modo no contacto.



y/o enlaces C= O^{6480} , mientras que la contribución a 530.4 eV puede atribuirse al enlace del oxígeno reticular con W y Ti⁸¹⁶⁴. La presencia de los grupos -OH, unidos a Ti o W, se explica nuevamente por la exposición de las películas delgadas a condiciones ambientales. Por otra parte, el espectro de Ti 2p para la PDTW fabricada (ver figura 13b) presenta los dos picos representativos del Ti (IV) del TiO_2 , 458.7 y 464.6 eV, que se corresponden muy bien con los datos reportados en la literatura⁷⁵.

with enhanced photocatalytic hydrogen production". En: *Journal of Power Sources* 328 (2016), págs. 28-36. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.08.001.

S. Ghayeb Zamharir, M. Ranjbar y H. Salamati. "Excimer laser treatment of TiO2/WO3 thin films for self-cleaning gasochromic applications: Preparation and characterization". En: Solar Energy Materials and Solar Cells 130 (2014), págs. 27-35. DOI: https://doi.org/10.1016/j.solmat. 2014.06.029.

M. Vargas y col. "Effect of W–Ti target composition on the surface chemistry and electronic structure of WO3–TiO2 films made by reactive sputtering". English. En: *Applied Surface Science* 353.C (2015), págs. 728-734. DOI: 10.1016/j.apsusc.2015.06.097.

Tabla 4. Porcentaje de fracciones atómicas elementales obtenidas por XPS para la PDTW.

O 1s [%]	Ti 2p [%]	W 4f [%]
87	7	5

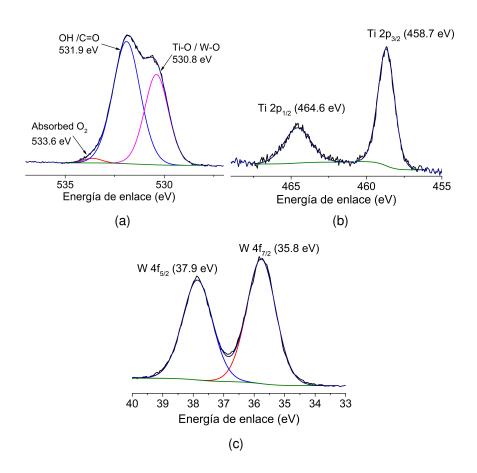
En la figura 13c se muestra el espectro XPS de alta resolución de W 4f de la PDTW, donde se pueden identificar dos picos ubicados a 37.9 y 35.8 eV, relacionados a las señales $W4f_{5/2}$ y $W4f_{7/2}$, respectivamente⁸². La posición y la forma de estos picos son representativas de los átomos de W con un estado de oxidación de +6, como se espera para el WO_3^{83} . La composición elemental obtenida por los análisis XPS indican que el Ti se encuentra en mayor proporción que el W, ver tabla 4 . Esto se debe a que el punto de fusión del W (3422 °C) es mucho más alto que el del Ti (1668 °C), haciendo posible evaporar más átomos de Ti que de W con la fluencia del láser usada.

El espectro Raman de la PDTW se muestra en la figura 14. De manera similar a la PDT, en el espectro Raman de esta PDTW se pueden observar, tanto la banda característica de la fase anatasa a 147 cm^{-1} , como las bandas de la fase rutilo 233, 433, 620 y 822 cm^{-1} . Estos resultados indican que la PDTW fabricada tiene una mezcla de fases anatasa y rutilo. Adicionalmente, también se encuentran presentes las señales a 300 cm^{-1} y 520 cm^{-1} debidas al Si-Si en el sustrato de Si, y la banda

Francesca Riboni y col. "WO3–TiO2 vs. TiO2 photocatalysts: effect of the W precursor and amount on the photocatalytic activity of mixed oxides". En: *Catalysis Today* 209 (2013). SELECTED CONTRIBUTIONS OF THE 7th EUROPEAN MEETING ON SOLAR CHEMISTRY AND PHOTOCATALYSIS: ENVIRONMENTAL APPLICATIONS (SPEA 7), págs. 28-34. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cattod.2013.01.008.

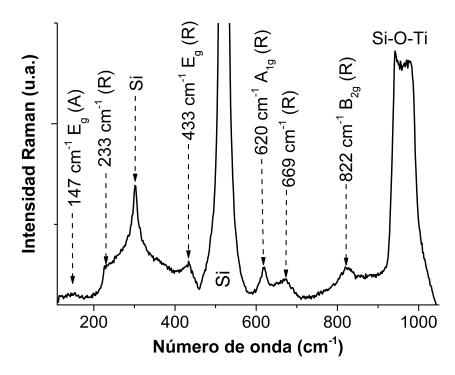
M. Vasilopoulou y col. "Hydrogenated under-stoichiometric tungsten oxide anode interlayers for efficient and stable organic photovoltaics". En: *J. Mater. Chem. A* 2 (6 2014), págs. 1738-1749. DOI: 10.1039/C3TA13975A.

Figura 13. Espectros XPS de alta resolución (a) O 1s, (b) Ti 2p y (c) W 4f de una PDTW.



alrededor de 950 cm^{-1} atribuidas al enlace Si-O-Ti.





2.3.2. Funcionalización de películas delgadas

Funcionalización no covalente de películas delgadas de TiO_2 Para los estudios de interacción con AF se seleccionó la PDT fabricada a 2.5 J/cm^2 de fluencia láser por ser la muestra que presenta mayor rugosidad y homogeneidad en el recubrimiento. Se conoce que una mayor nano-rugosidad tiene el efecto de aumentar

la capacidad de absorción de las biomoléculas⁸⁴⁸⁵⁸⁶. Yang y col. encontraron que la adsorción de albúmina de suero bovino en una selección de superficies de dióxido de titanio, con superficies casi idénticas en composición química pero diferente rugosidad RMS (0.26, 1.4, 1.5, 2.58 y 2.67 nm), fue más rápido en superficies con mayor rugosidad RMS y se obtuvo un mayor espesor de película de proteína en la saturación⁸⁶.

En la figura 15 se muestran las imágenes AFM de PDT con y sin ácido fólico. La figura 15a muestra la superficie de PDT con una topografía homogénea y una rugosidad RMS de 0.5 nm. La imagen de AFM en la figura 15b muestra un recubrimiento de AF no homogéneo en la superficie, donde los puntos grandes en la superficie de TiO_2 pueden ser agregados de AF, lo que da como resultado una rugosidad RMS de 1.0 nm.

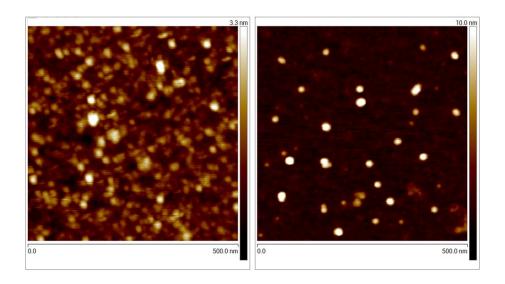
_

K. Rechendorff y col. "Enhancement of Protein Adsorption Induced by Surface Roughness". En: Langmuir 22.26 (2006). PMID: 17154557, págs. 10885-10888. DOI: 10.1021/la0621923. eprint: https://doi.org/10.1021/la0621923.

Tugba Akkas y col. "Which is more effective for protein adsorption: surface roughness, surface wettability or swelling? Case study of polyurethane films prepared from castor oil and poly(ethylene glycol)". En: *Polymer International* 62.8 (2013), págs. 1202-1209. DOI: https://doi.org/10.1002/pi.4408. eprint: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/pi.4408.

Yu Yang y col. "Protein Adsorption at Nanorough Titanium Oxide Surfaces: The Importance of Surface Statistical Parameters beyond Surface Roughness". En: *Nanomaterials* 11.2 (2021). DOI: 10.3390/nano11020357.

Figura 15. Imágenes AFM de (a) PDT y (B) AF-PDT. Tenga en cuenta que la diferencia en la escala de color es debida a la altura. Estas imágenes fueron obtenidas usando un microscopio Bruker Dimension Icon operado en modo no contacto.



Los espectros Raman del AF y AF-PDT en la región de 600 a 1800 cm^{-1} (figura 16) se analizaron haciendo la asignación de picos usando los datos publicados⁸⁷⁸⁸⁸⁹, ver Tabla 5. Algunos cambios significativos en el espectro indican que el AF interactúa con la superficie de TiO_2 . Los cambios y aumentos relativos de las bandas en 1678,

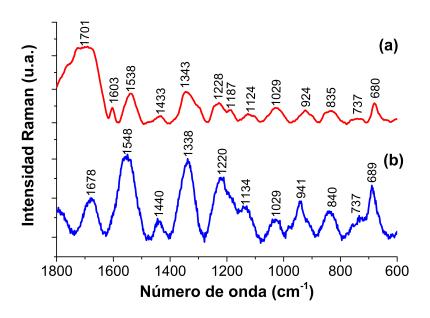
John J. Castillo y col. "Adsorption and vibrational study of folic acid on gold nanopillar structures using surface-enhanced raman scattering spectroscopy". En: *Nanomaterials and Nanotechnology* 5.1 (2015). DOI: 10.5772/61606.

Raïssa Ainsworth Rustichelli Teixeira y col. "Tracking chemical interactions of folic acid on gold surface by SERS spectroscopy". En: *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 223 (2019). DOI: 10.1016/j.saa.2019.117305.

Albta Kokaislová y col. "Spectroscopic studies of folic acid adsorbed on various metal substrates: does the type of substrate play an essential role in temperature dependence of spectral features?" En: *Journal of Raman Spectroscopy* 45 (2014), págs. 750-757.

1548 y 689 cm^{-1} , asignados a la vibración de flexión de NH_2 y a las vibraciones de tensión de C=N de la porción pteridina (pt)⁸⁷, permiten inferir que la porción pt está cerca de la superficie de TiO_2 . La banda ancha en 1220 cm^{-1} (asignada a las vibraciones de balanceo de los grupos NH y OH de la porción de ácido glutámico (Glu))⁸⁷, y los corrimientos y aumento en intesidad de las bandas en 1338 y 1440 cm^{-1} asignadas a las vibraciones de balanceo de los grupos CH, NH y OH del Glu⁸⁷, podrían indicar que la porción del Glu del AF interactúa con la superficie de TiO_2 . Estos resultados sugieren que las moléculas de AF pueden unirse a la superficie de TiO_2 a través del anillo de pteridina y la porción de ácido glutámico.

Figura 16. Espectros Raman de (a) AF en estado sólido y de (b) AF adsorbido en una PDT.



Los espectros XPS de alta resolución de C 1s y N 1s para las PDT, AF-PDT y AF se muestran en la figura 18.El espectro C 1s de la PDT (figura 18) presenta los picos a 284.4, 285.3, y 288.1 eV, atribuidos a los contaminantes orgánicos del medio

Tabla 5. Asignaciones observadas y tentativas de los desplazamientos de las frecuencias Raman del AF. Esta tabla utiliza las siguientes abreviaturas: pt, pteridina; paba, ácido p-aminobenzoico; Glu, ácido glutámico.

AF	AF-	Asignaciones propuestas
(cm^{-1})	PDT	
	(cm^{-1})	
1603	1678	pt: tijereteo (NH_2), tensión (C=N) 90 ; paba: ten-
		sión (C=C), balanceo (CH) ⁹¹
1538	1548	pt:tijereteo (NH_2) , tensión (C=N), balanceo
		(CH) ⁹² ; paba: tensión (C=C), balanceo (NH) ⁹³
1433	1440	Glu: balanceo (NH)(OH) 94 , tijereteo (CH_2) 95 ; pa-
		ba: tensión (C=C) ⁹⁶
1343	1338	paba: aleteo $(CH_2)^{97}$; Glu: balanceo (CH)(OH) 98
1228	1220	Glu: balanceo (NH)(OH), aleteo $(CH_2)^{99}$
1187	-	Glu: flexión (CH_2), flexión (OH) ¹⁰⁰
680	689	pt: tensión (C=N) ¹⁰¹ ; paba: tensión (C=C) ¹⁰²

ambiente, y se asignan a los grupos C-C/C=C¹⁰³, C-H/C-O-C¹⁰³, y O=C-O ¹⁰⁴, respectivamente. El espectro C 1s de la AF-PDT evidencia la presencia de AF en la superficie de TiO_2 ya que está presente el pico a 287.5 eV (señal del grupo C=O/C-N)¹⁰³¹⁰⁴, ver figura 18c. De esta manera, la señal a 288.3 eV en el espectro C 1s de FA-PDT podría deberse principalmente a la presencia de contaminantes orgánicos en la muestra, ya que esta señal no se observa en el espectro C 1s del AF.

Se identificaron los picos a 398.8 y 399.3 eV en el espectro N 1s del AF, figura 18f, debidas a los grupos C=N y C-N¹⁰⁵ respectivamente. Hayashi y col. reportaron que

Xuewei Zhao y col. "Folic acid-conjugated carbon dots as green fluorescent probes based on cellular targeting imaging for recognizing cancer cells". En: RSC Adv. 7 (67 2017), págs. 42159-42167. DOI: 10.1039/C7RA07002K.

Yue Wang y col. "Synthesis, characterization and in vitro anticancer activity of the biomolecule-based coordination complex nanotubes". En: *J. Mater. Chem. B* 3 (2 2015), págs. 296-305. DOI: 10.1039/C4TB01135J.

¹⁰⁵ Qingyang Wang y col. "Blue luminescent amorphous carbon nanoparticles synthesized by micro-

las bandas a 399.8 y 398.9 eV en los espectros N 1s de AF-β-nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas funcionalizadas con ciclodextrina se deben al N amida y otros N del AF, respectivamente¹⁰⁶. El espectro N 1s de AF-PDT (figura 18d) presenta un pico bien definido e intenso a 399.7 eV, lo que sugiere que podría descomponerse en dos picos; sin embargo, la resolución del pico es deficiente y no permite una asignación adecuada. El espectro N 1s de la PDT no muestra una señal significativa; esta pequeña señal puede deberse a moléculas fisisorbidas que contienen nitrógeno, que provienen de las condiciones ambientales. Los resultados anteriores indican que el AF se unió a la superficie de la PDT, tal vez a través de los grupos carboxílicos de la porción Glu, dejando libre la porción pteridina. El pH de la solución de AF (10-11) en la que se sumergió la PDT proporciona las condiciones para que los dos grupos carboxílicos de la porción Glu del AF se desprotonen y, por lo tanto, estén disponibles para anclarse a la superficie de TiO_2 . En este sentido, la adsorción puede ocurrir a través de una reacción ácido-base dejando la base conjugada $-COO^-$ (de la porción Glu de AF) unida a TiO_2 (que actúa como ácido de Lewis)⁵², ver figura 17a.

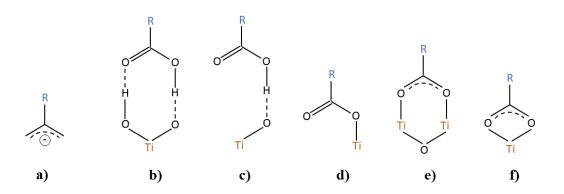
Otra evidencia de la interacción de PDT con el AF a través del grupo carboxílico del AF, es la presencia del pico a 287.5 eV (asociado con grupos C=O)¹⁰³ en el espectro C 1s para AF-PDT (ver figura 18c), que concuerda con la señal observada para el AF a 287.4 eV. Además, esto coincide con el hecho de que las bandas asignadas a

-

plasma processing of folic acid". En: *Plasma Processes and Polymers* 15.1 (2018), pág. 1700088. DOI: https://doi.org/10.1002/ppap.201700088. eprint: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ppap.201700088.

Koichiro Hayashi y col. "High-Frequency, Magnetic-Field-Responsive Drug Release from Magnetic Nanoparticle/Organic Hybrid Based on Hyperthermic Effect". En: ACS Applied Materials & Interfaces 2.7 (2010). PMID: 20568697, págs. 1903-1911. DOI: 10.1021/am100237p. eprint: https://doi.org/10.1021/am100237p.

Figura 17. Posibles modos de unión del grupo -COOH en nanopartículas de TiO_2 : (a) Atracción electrostática, (b, c) Enlace tipo puente de H, (d) Monodentado (enlace tipo éster), (e) Puente bidentado y (f) Quelante bidentado. Adaptada de Qu y col. Langmuir 2010, 26, 9539–9546.

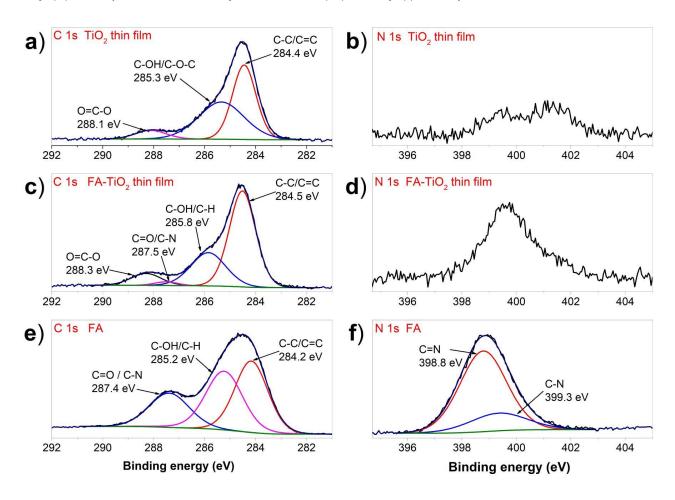


los grupos OH de la porción Glu del AF (1220, 1338 y 1440 cm^{-1}) en los espectros Raman experimentan cambios cuando el AF interactúa con la superficie de TiO_2 .

Qu y col. reportaron un trabajo sobre las diferentes formas en que los grupos carboxílicos se unen a la superficie de TiO_2 , como se muestra en la figura 17^{59} . Cuando se lleva a cabo el proceso de modificación convencional, que consiste en sumergir el TiO_2 en una solución que contiene el agente funcionalizante con grupos carboxílicos, similar al método utilizado aquí, se produce una unión débil e inestable de los grupos carboxílicos con la superficie de TiO_2 , se trata de una simple adsorción (atracción electrostática y puentes de hidrógeno). Por otro lado, cuando se lleva a cabo un proceso de modificación a través de una reacción solvotérmica, los grupos carboxílicos se pueden unir a TiO_2 por adsorción química (enlace éster, puente y quelación)⁵⁹.

Para estudiar la adhesión de las moléculas de AF sobre superficies de TiO_2 , se

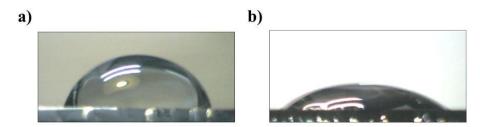
Figura 18. Espectros XPS de alta resolución (a) C 1s y (b) N 1s para la PDT, (c) C 1s y (d) N 1s para la FA-PDT, y finalmente, (e) C 1s y (f) N 1s para el AF.



midió el ángulo de contacto utilizando agua tipo I. La figura 19 muestra el ángulo de contacto del agua para la PDT y la AF-PDT. La funcionalización de la superficie con AF aumentó la hidrofilicidad de la película delgada, lo que puede atribuirse a los grupos libres de amina $(-NH_2)$ y ácido carboxílico (-COOH) en la superficie. Esto es similar al trabajo de Gomes y col., donde se encontró que la funcionalización de la PDT con ácido 3-(4-minofenil)propiónico o ácido 3-mercaptopropiónico conduce a un aumento en la hidrofilicidad del material (reflejada en una disminución del án-

gulo de contacto) y un ligero aumento en la energía superficial¹⁰⁷. Estos resultados sugieren que el proceso de funcionalización de la superficie de la PDT se logró con éxito.

Figura 19. Imágenes de muestras en experimentos de ángulo de contacto para (a) PDT, ángulo de contacto de $65^o \pm 7^o$ y (b) AF-PDT, ángulo de contacto de $40^o \pm 4^o$.



Además, los resultados de XPS mostraron un aumento en la intensidad de C 1s para la muestra funcionalizada en comparación con la PDT (figura 18), seguida por la presencia de N, lo que indica el éxito en el proceso de funcionalización de acuerdo con las mediciones de ángulo de contacto. El análisis XPS de la PDT no funcionalizada mostró la presencia de contaminantes que contenían C y N. Estos contaminantes orgánicos no parecen interferir en el momento de la funcionalización de la película con AF, como lo demuestra el hecho de que la hidrofilicidad de la PDT aumenta cuando se funcionaliza con AF, según las mediciones de ángulo de contacto, lo que indica que los grupos funcionales libres del AF están facilitando la interacción de la película con las moléculas de agua. La posible ausencia de contaminantes tras la funcionalización se puede explicar a partir de la hipótesis de Gomes y col., que señala que las moléculas de AF han ocupado el lugar de los contaminantes en una reacción termodinámicamente favorable o simplemente, las moléculas de contaminantes de contamin

Orisson P. Gomes y col. "3-Mercaptopropionic acid functionalization of titanium dioxide thin films". En: *Materials Chemistry and Physics* 223 (2019), págs. 32-38. DOI: https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.10.041.

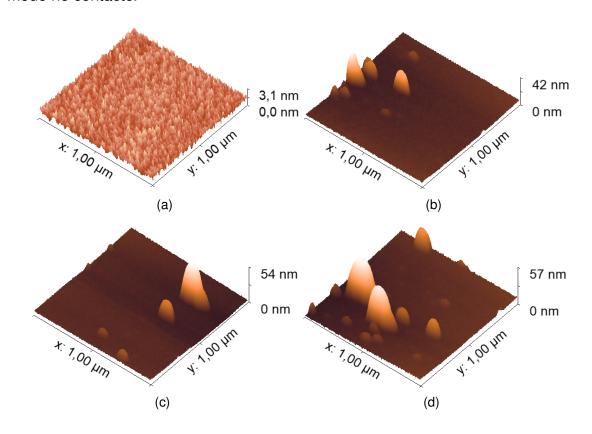
nantes son arrastradas durante la funcionalización 107.

Funcionalización covalente de películas delgadas de $TiO_2 - WO_3$ Se estudió la topografia de la PDTW antes y después de la funcionalización con AF mediante el análisis de imágenes AFM. En la figura 20a se puede observar la homogeneidad de una PDTW sin funcionalizar, con rugosidad RMS de 0.4 nm. Sin embargo, después del proceso de funcionalización de esta película, la rugosidad RMS aumenta (2.9, 5 y 7.8 nm) debido a la presencia de las moléculas de AF y de posibles aglomerados de AF, que se logran apreciar como puntos grandes en las imágenes AFM de tres zonas diferentes de la FA-PDTW (figuras 20b-d). Este análisis de la topografia de la AF-PDTW permitió comprender que la disposición de las moléculas de AF sobre la PDTW no es uniforme en toda su superficie.

Los espectros XPS de alta resolución de C 1s y N 1s para las PDTW, AF-PDTW y AF se muestran en la figura 21. En la figura 21a, que corresponde al espectro C 1s de la PDTW, se identificaron los picos a 284.6, 286.1 y 288.3 eV atribuidos a los contaminantes orgánicos provenientes de las condiciones ambientales, y se asignan a los grupos C-C/C=C¹⁰³, C=O (o O=C-O)¹⁰⁴, y O=C-O ¹⁰⁴, respectivamente. El espectro C 1s de la AF-PDTW evidencia la presencia de AF, dado que la señal a 287.8 eV del grupo C=O/C-N¹⁰³¹⁰⁴ del AF está presente, ver figura 21c y e. En segundo lugar, en el espectro de C 1s de la AF-PDTW la señal a 288.4 eV (atribuida principalmente a la presencia de contaminantes orgánicos en la muestra) no se encuentra presente. Este resultado podría ser debido a que las moléculas de AF toman el lugar de los contaminantes o simplemente, a que las moléculas de los contaminantes se desanclan de la superficie de TiO_2 durante la funcionalización¹⁰⁷.

El espectro N 1s de AF-PDTW (figura 21d) presenta una señal con dos contribucio-

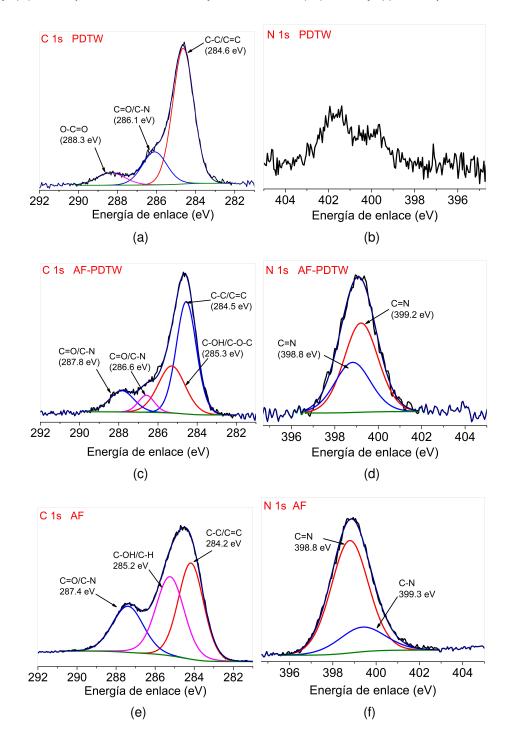
Figura 20. Imágenes AFM de (a) PDTW, y de diferentes regiones de la AF-PDTW con rugosidades RMS de (b) 2.9, (c) 5 y (d) 7.8 nm. Estas imágenes fueron obtenidas con una Unidad SPM Multi-Función AFM5100N de Hitachi operando en modo no contacto.



nes a 399.2 y 398.8 eV, tal como en el espectro del AF, debidas a los grupos C=N y C-N¹⁰⁵ respectivamente. El espectro N 1s de la PDTW muestra una pequeña señal que puede deberse a moléculas que contienen nitrógenos provenientes de las condiciones ambientales y que se fisisorbieron en la muestra, en concordancia con la señal debida a enlaces C-N (a 286.1 o 286.6 eV) tanto en el espectro C 1s de la PDTW como en el de la AF-PDTW. Estas observaciones obtenidas de los análisis de XPS indican que el AF se unió a la superficie de la PDTW, probablemente a través de los grupos carboxílicos de la porción Glu, dejando libre la porción pteridina.

Qu y col. sugieren que el ácido p-bromobenzoico se une a la superficie de nanopar-

Figura 21. Espectros XPS de alta resolución (a) C 1s y (b) N 1s para la PDTW, (c) C 1s y (d) N 1s para la FA-PDTW, y finalmente, (e) C 1s y (f) N 1s para el AF.



tículas de TiO_2 mediante dos pasos claves: primero, la formación de dobles enlaces de puente de hidrógeno entre el ácido p-bromobenzoico y el TiO_2 en el mismo sitio de Ti y, segundo, la coordinación a la temperatura solvotérmica por deshidratación de los puentes de hidrógeno⁵⁹. En este sentido, se propone un mecanismo de unión del AF a la superficie de la PDTW similar al presentado por Qu y Col., ver figuras 17f y 22^{59} , donde se forman enlaces químicos en modo quelante bidentado.

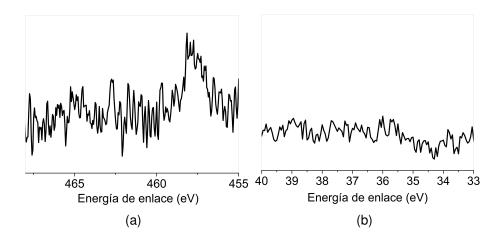
Figura 22. Esquema del proceso de modificación de una PDTW con AF por una estrategia solvotérmica. Adaptada de Qu y col. Langmuir 2010, 26, 9539–9546.

Otra evidencia de la interacción de PDTW con el AF a través del grupo carboxílico del AF, es la presencia del pico a 287.8 eV (asociado con grupos C=O)¹⁰³ en el espectro C 1s para AF-PDTW (ver figura 21c), que concuerda con la señal observada para el AF a 287.4 eV.

En el caso de la AF-PDTW, los análisis de XPS de alta resolución Ti 2p mostraron una disminución en la resolución de los dos picos, ver figura 23a. Sin embargo, en

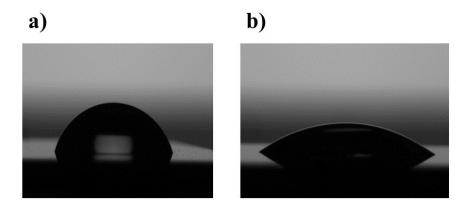
el espectro W 4f de la AF-PDTW no se observan los dos picos correspondientes a $W4f_{5/2}$ y $W4f_{7/2}$ (figura 23b). Estos resultados para los espectros de Ti 2p y W 4f pueden indicar que las moléculas de AF han cubierto la superficie de la película en gran proporción, quedando los átomos de Ti y W cubiertos, y por ende se ve disminuida la resolución de las señales de estos dos elementos (que además se conoce que se encontraban en proporciones muy bajas en la PDTW, ver tabla 4).

Figura 23. Espectros XPS de alta resolución (a) Ti 2p y (b) W 4f para la AF-PDTW.



Adicionalmente, la unión del AF a la superficie de la PDTW se verificó a través de análisis del ángulo de contacto para la PDTW y AF-PDTW, que se presentan en la figura 24. El ángulo de contacto de la película funcionalizada se redujo a menos de la mitad del ángulo de contacto de la PDTW, indicando un aumento de la hidrofilicidad de la película debido a los grupos libres de amina $(-NH_2)$ y ácido carboxílico (-COOH) del AF.

Figura 24. Imágenes de muestras en experimentos de ángulo de contacto para (a) PDTW, ángulo de contacto de $73^o \pm 2^o$ y (b) AF-PDTW, ángulo de contacto de $32^o \pm 0^o$.



2.4. CONCLUSIONES

Fue posible fabricar PDTs y PDTWs, para las cuales el TiO_2 se encuentra tanto en fase rutilo como anatasa, utilizando el método PLD reactivo. Además, estas películas pudieron funcionalizarse con AF por medio de dos tipos de interacción diferentes, electrostática y covalente.

Para la AF-PDT los análisis Raman y XPS permitieron inferir que es posible que el AF se una a la superficie de la película a través de los grupos carboxílicos de la porción de ácido glutámico o a través de la porción pteridina, por medio de interacciones electrostáticas.

En el caso de la AF-PDTW, el análisis XPS de N 1s muestra con claridad el pico carácteristico del AF para los enlaces propios de los grupos que contienen nitrógeno, esto podría indicar que el AF se une preferencialmente a través de los grupos carboxílicos dejando libre la porción pterina que es fácilmente detectada por el análisis XPS. Para la AF-PDTW se considera que el modo de unión del grupo -COOH sobre

la PDTW es del tipo quelante bidentado.

Los análisis AFM mostraron que el proceso de funcionalización tiene el efecto de aumentar la rugosidad de las películas, mostrando la formación de posibles agregados de AF. La disposición del AF sobre la superficie de las películas es irregular, siendo más notorio en la AF-PDTW.

3. APLICACIÓN DEL DETECTOR FABRICADO EN EL RECONOCIMIENTO DE RECEPTORES DE FOLATO

3.1. INTRODUCCIÓN

El uso de estructuras mesoscópicas para la detección electroquímica se ha fundamentado en la determinación de la capacitancia electroquímica $C_{\mu}^{\ 108109}$. Una estructura mesoscópica es aquella cuyo tamaño se encuentra en la escala comprendida entre unos pocos nanometros y micrometros¹¹⁰, y por tanto, se ubica entre los régimenes de la mecánica clásica y la cuántica¹⁰⁸. Los sistemas mesoscópicos, tales como una monocapa de moléculas con centros redox¹⁰⁸ o semiconductores inorgánicos a nanoescala (con espesor menor a 10 nm)¹⁰⁹, permiten contar con un confinamiento electrónico necesario para obtener una señal capacitiva.

La $C_{\bar{\mu}}$ está definida como la variación de la carga (q) con respecto a la variación del

Sandra P. Corzo, Paulo R. Bueno y David A. Miranda. "Improving the Analytical Reproducibility of Electrochemical Capacitive Sensors Using the Chemical Hardness of the Interface". En: *IEEE Access* 9 (2021), págs. 166446-166454. DOI: 10.1109/ACCESS.2021.3135787.

Edgar F. Pinzón, Adriano dos Santos y Paulo R. Bueno. "Density of States of a Nanoscale Semiconductor Interface as a Transduction Signal for Sensing Molecules". En: ACS Applied Electronic Materials 3.8 (2021), págs. 3411-3417. DOI: 10.1021/acsaelm.1c00387. eprint: https://doi.org/10.1021/acsaelm.1c00387.

E. K. H. Salje. "Multi-scaling and mesoscopic structures". eng. En: *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 368.1914 (2010). 20123752[pmid], págs. 1163-1174. DOI: 10.1098/rsta.2009.0266.

potencial eléctrico $(\phi)^{111}$, así:

$$C_{\bar{\mu}} = \frac{dq}{d\phi} \tag{3}$$

Para efectos de las condiciones de medición de un detector electroquímico, es conveniente usar el concepto de potencial electroquímico $\bar{\mu}$ definido según la siguiente ecuación¹¹¹⁴³:

$$\bar{\mu} = \mu + q\phi \tag{4}$$

Donde μ es el potencial químico, potencial interno del sistema que regula el intercambio de partículas (electrónes), y ϕ es el potencial eléctrico externo, impuesto por el potenciostato, que se usa para modificar las condiciones electrónicas del detector para dar lugar a la $C_{\bar{\mu}}$.

Considerando un μ y una temperatura (T) constantes, y que $q=q_ez$ (q_e es la carga del electrón y z es el número de electrones que interactuan con ϕ), de las ecuaciones 3 y 4 se obtiene que:

$$C_{\bar{\mu}} = q_e z \frac{dq}{d\bar{\mu}} \tag{5}$$

Ahora, las cargas disponibles en la superficie mesoscópica del detector se modelan usando la distribución de Fermi- Dirac¹¹¹. De esta manera, se tiene que:

$$q = q_e \bar{n}_{FD} \tag{6}$$

Paulo R. Bueno y David A. Miranda. "Conceptual density functional theory for electron transfer and transport in mesoscopic systems". En: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (8 2017), págs. 6184-6195. DOI: 10.1039/C6CP02504H.

Al incluir la ecuación 6 en la ecuación 5 queda que:

$$C_{\bar{\mu}} = q_e^2 z \left(\frac{\partial \bar{n}_{FD}}{\partial \bar{\mu}}\right)_{\nu} \tag{7}$$

Donde \bar{n}_{FD} es el número medio de electrónes con energía entre E y E+dE, dado por la distribución de Fermi-Dirac, la cual se expresa en términos del $\bar{\mu}$ así:

$$\bar{n}_{FD} = \frac{1}{e^{\frac{(E-\bar{\mu})}{k_B T}} + 1} \tag{8}$$

Derivando la ecuación 8 con respecto al $\bar{\mu}$ e incluyendo esta derivada en la ecuación 7 se obtiene la siguiente ecuación para la $C_{\bar{\mu}}^{111}$:

$$C_{\bar{\mu}} = \frac{q_e^2 z^2}{k_B T} \bar{n}_{FD} (1 - \bar{n}_{FD}) \tag{9}$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann.

Para detectores electroquímicos, la $C_{\bar{\mu}}$ se determina como la combinación en serie de las capacitancias electrostática C_e y cuántica (química) C_q , descritas según la siguiente ecuación:

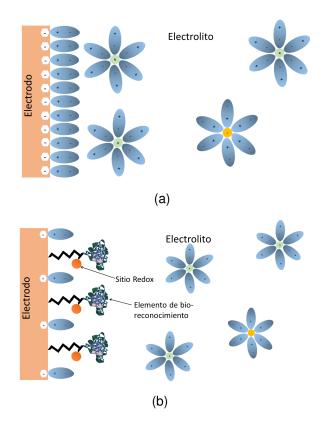
$$\frac{1}{C_{\bar{\mu}}} = \frac{1}{C_e} + \frac{1}{C_q} \tag{10}$$

Donde, la C_e (no faradaica), llamada también capacitancia iónica¹¹², está relacionada con las interacciones Coulombicas. El modelo más simple para describir la C_e es conocido como capacitancia de la doble capa electroquímica (ver figura 25a). La capacitancia de doble capa electroquímica es una característica de electrodos polarizados inmersos en una solución electrolítica. Cuando un potencial determinado se

Beatriz L. Garrote, Adriano Santos y Paulo R. Bueno. "Label-free capacitive assaying of biomarkers for molecular diagnostics". En: *Nature Protocols* 15.12 (2020), págs. 3879-3893. DOI: 10.1038/s41596-020-0390-9.

aplica al electrodo, su superficie se cargará positiva o negativamente según sea el caso, y los iones de carga opuesta serán atraídos a la superficie generando la capacitancia de doble capa electroquímica, cantidad físicamente medible que resulta muy sensible a los cambios de la interfaz⁴¹.

Figura 25. Representación esquemática de interfaces electrodo-electrolito. En (a) se muestra la situación más simple de un electrodo sumergido en un electrolito modelado por la capacitancia de doble capa electroquímica, donde ocurre el proceso no faradaico, y en (b) la superficie del electrodo se encuentra cubierta con moléculas redox que desplazan la doble capa iónica para dar lugar a un proceso faradaico.



Por otro lado, la C_q es la contribución faradaica, que tiene lugar específicamente cuando se carga una estructura nanométrica, ocurriendo cambios en el potencial químico⁴¹. Cuando se tiene una interfaz metal-electrolito polarizada, con su respec-

tiva capacitancia de doble capa electroquímica, y luego se modifica el electrodo con una capa molecular en presencia de una especie redox (figura 25b), que puede cargarse faradaicamente, entonces, está presente un elemento de carga adicional comunmente llamada en electroquímica como capacitancia cuántica $(C_q)^{41}$. En este tipo de sistemas las magnitudes de las dos contribuciones de la $C_{\bar{\mu}}$ (C_e y C_q) son altamente sensibles a las características de la superficie y a la composición de la solución, y en general, la C_q es la contribución que predomina⁴¹.

Experimentalmente, la $C_{\bar{\mu}}$ se mide a través de la espectroscopía de capacitancia electroquímica (ECE) derivada de la EIS, siguiendo la relación matemática:

$$C^*(\omega) = \frac{1}{i\omega Z^*(\omega)} \tag{11}$$

Donde $Z^*(\omega)$ es la impedancia eléctrica, $\omega=2\pi f$ es la frecuencia angular e i es el número complejo, $i=\sqrt{-1}$. $C^*(\omega)$ es una función de capacitancia compleja que puede expresarse en términos de sus componentes real e imaginaria, así:

$$C^*(\omega) = C' - iC'' \tag{12}$$

C' y C" se obtienen directamente de las mediciones por EIS siguiendo las siguientes dos ecuaciones:

$$C' = \frac{-Z''}{\omega |Z|^2} \tag{13}$$

$$C'' = \frac{Z'}{\omega |Z|^2} \tag{14}$$

Donde $|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2}$ es el módulo de la impedancia. La $C_{\bar{\mu}}$ se obtiene como el diámetro del semicírculo del espectro de capacitancia en el diagrama de Nyquist¹¹².

Para monocapas redox-activas o estructuras nanométricas se cumple la aproximación $C_e >> C_q$, y por tanto de la ecuación 10 resulta que $C_{\bar{\mu}} \sim C_q$, así se demuestra que la inversa de C_q está directamente asociada con la energía química. Además, partiendo de la teoría conceptual del funcional de la densidad ($Density\ functional\ theory$, DFT), se deduce que la variación en $\frac{1}{C_q}$ en función de la ocupación está relacionada con la dureza química de la interfaz⁴⁴⁴³. La dureza química η es un importante índice de reactividad química que puede ser usado experimentalmente en la detección de un analito de interés, mediante la siguiente definición matemática 1134443.

$$\eta pprox rac{\gamma}{C_{ar{\mu}}}$$
 (15)

Donde, γ es una constante que contiene el volumen del sistema, el cuadrado de la carga eléctrica fundamental y el número de oxidación del sistema.

Este capítulo trata de la caracterización por ECE de las PDT, AF-PDT, PDTW y AF-PDTW con el objetivo de seleccionar la película adecuada para ser usada como detector de receptores de folato (RDF). Además, se describe el protocolo usado para la detección de RDF y los resultados de la detección en téminos del límite de detección (Limit of Detection, LoD), Límite de cuantificación (Limit of Quantification, LoQ), constante de afinidad (K_a) y especificidad del detector.

86

-

Joshua Lehr y col. "Label-free Capacitive Diagnostics: Exploiting Local Redox Probe State Occupancy". En: *Analytical Chemistry* 86.5 (2014). PMID: 24491045, págs. 2559-2564. DOI: 10.1021/ac403727h. eprint: https://doi.org/10.1021/ac403727h.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Mediciones de la Capacitancia electroquímica Todas las mediciones electroquímicas se realizaron usando un potenciostato PGSTAT-204 de Metrohm - Autolab equipado con modulo FRA-32M, controlado por el sofware NOVA 1.11 (ver figura 26a). Se utilizó una configuración de celda de tres electrodos con un electrodo de trabajo conformado por una película delgada (PDT/PDTW/AF-PDT/AF-PDTW), un contra-electrodo de alambre de oro y un electrodo de referencia Ag/AgCl (KCl 3M). La celda electroquímica se ubicó dentro de una caja de Faraday para evitar interferencias debidas a campos externos (ver figura 26a). Los espectros de impedancia se obtuvieron en una solución de PBS (pH 7.4) al potencial de cirtuito abierto de la película (alrededor de 0 V) y en un rango de frecuencias desde 0.1 MHz hasta 0,1 Hz con una amplitud de 10 mV (pico a pico). Mediante una programación de las medidas en NOVA 1.11 se pudo estudiar la naturaleza capacitiva de las interfaces, convirtiendo los espectros de impedancia electroquímica en espectros de capacitancia electroquímica usando las ecuaciones (11), (13) y (14).

Los datos de ECE se graficaron en el plano complejo, C' Vs C'', donde, las curvas obtenidas se pueden describir como un semicírculo. Para obtener los parámetros de la semicircunferencia con mejor ajuste a los datos experimentales se aplicó un modelado inverso haciendo uso de la librería *semiCirclesEISModel* de python, escrita por David A. Miranda, Ph.D., e implementada en el Jupyter Notebook del anexo A.

3.2.2. Detección de receptores de folato por ECE En la figura 26 se presenta el montaje experimental para las mediciones de ECE y para los ensayos de detección de RDF, empleando una cabina de flujo laminar para la preparación de la celda electroquímica antes de la medición de ECE y así garantizar condiciones de esteri-

lidad para las soluciones de PBS, RDF, y durante el momento de la incubación del detector funcionalizado con AF en la solución de RDF. Se usaron receptores de folato (RDF) recombinantes, extraídos de células derivadas de ovario de hámster chino, adquiridos de Merck.

Inicialmente, se realizó la medida del voltaje de circuito abierto (V_{OCP}) de la PDTW para realizar las medidas de ECE a este potencial. Se obtuvieron los espectros de capacitancia para la AF-PDTW después de su incubación en $50\mu L$ de PBS (pH 7.4) durante 30 min, como medida blanco. Se prepararon soluciones de RDF en PBS de diferentes concentraciones (0.1, 1.3, 4.5, 13 y 26 nM). Luego de la medida del blanco, la interfaz se colocó en $50\mu L$ de solución de RDF 0.1 nM durante 30 minutos, transcurrido este tiempo, la superficie del detector se lavó en solución de PBS y se secó con gas N_2 para su posterior análisis por ECE. Se hicieron tres réplicas de la medición del espectro de capacitancia. Al terminar las medidas se lavó nuevamente la superficie con PBS y se secó con N_2 para realizar este mismo experimento con las siguientes concentraciones en orden ascedente.

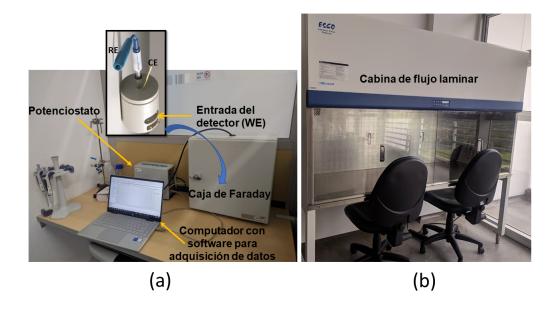
Después del cálculo de los valores de $C_{\bar{\mu}}$ para cada medición, los datos se ajustaron a una curva de calibración. Los LoD y LoQ se determinaron siguiendo la metodología de la IUPAC¹¹⁴. El valor de la constante de afinidad (K_a) se determinó ajustando los datos a una isoterma de Lagmuir para construir una curva de calibración graficando $\frac{[X]}{S}$ versus [X], donde S es la señal de medición del detector y [X] es la

_

Gary L. Long y J. D. Winefordner. "Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition". En: *Analytical Chemistry* 55.07 (1983). PMID: 22857433, 712A-724A. DOI: 10.1021/ac00258a724. eprint: https://doi.org/10.1021/ac00258a724.

concentración de analito¹¹⁵.

Figura 26. Montaje experimental para las mediciones de ECE. (a) Computador con el software Nova para adquisición de datos, un potenciostato PGSTAT204 de Autolab y una caja de Faraday, dentro de la cual se encuentra la celda electroquímica con los tres electrodos. (b) Cabina de flujo laminar para la preparación de muestras y realización de la interacción entre el detector y los RDF de forma estéril.



3.2.3. Especificidad del detector Como experimento control se utilizó una PDTW sin funcionalizar con AF como detector y se determinaron las medidas del blanco y de las diferentes concentraciones de RDF, de la manera como se describió anteriormente para el detector (AF-PDTW).

Para evaluar la especificidad interfacial, se realizaron mediciones de ECE usando

Flávio C.B. Fernandes y col. "Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures". En: *Biosensors and Bioelectronics* 57 (2014), págs. 96-102. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.01.044.

AF-PDTW en una solución de PBS (pH 7.4), como electrolito soporte, después de incubar la superficie del detector en Suero Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum, FBS) durante 30 min. Se realizó la medida de ECE por triplicado.

Para comparar los resultados obtenidos usando FBS como posibles interferencias y el obtenido en la detección de los RDF, se calculó el porcentaje de la respuesta de $C_{\bar{\mu}}^{113}$, así:

$$R(\%) = \frac{100(C_{\bar{\mu}} - C_{\bar{\mu},0})}{C_{\bar{\mu},0}} \tag{16}$$

Donde $C_{\bar{\mu}}$ es la respuesta a una concentración de interferencia o analito determinada y $C_{\bar{\mu},0}$ es la señal del blanco.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Selección de la película delgada funcionalizada con ácido fólico para usarse como detector — Al comparar el valor de la capacitancia electroquímica determinada tanto para la PDT como para la PDTW, ver figuras 27 y 28 y la tabla 6, se pudo conocer que la PDTW tiene valores más altos de $C_{\bar{\mu}}$. Este resultado puede explicarse por el hecho de que el W contribuye con electrones que aumentan la densidad electrónica, en comparación con solo Ti; de esta manera, el término \bar{n}_{FD} también es mayor, haciendo que la $C_{\bar{\mu}}$ aumente (según la ecuación 9). Es por esta razón que se escogió la PDTW como electrodo de trabajo para la detección de los RDF. Además, se conoce que la alta conductividad electrónica, rápida inserción/des-inserción de iones, rendimiento electroquímico superior y versatilidad son propiedades de las películas delgadas de WO_3 , que las convierten en un mate-

Tabla 6. Valores de la $C_{\bar{\mu}}$ obtenida para tres mediciones de ECE consecutivas para cada tipo de película, PDT y PDTW.

Medición	PDT	AF-PDT	PDTW	AF-PDTW	
de $C_{ar{\mu}}$	μFcm^{-2}	μFcm^{-2}	μFcm^{-2}	$[\mu Fcm^{-2}]$	
1	1.13	3.96	2.84	0.83	
2	1.13	3.55	2.85	0.82	
3	1.13	3.29	2.86	0.81	

rial muy prometedor para fabricar electrodos de supercapacitores¹¹⁶. Por otro lado, Hai y col. han demostrado la mejora del rendimiento capacitivo de películas ultrafinas de WO_3 al funcionalizarlas con nanopartículas de TiO_2 para su aplicación como electrodos de supercondensadores¹¹⁶.

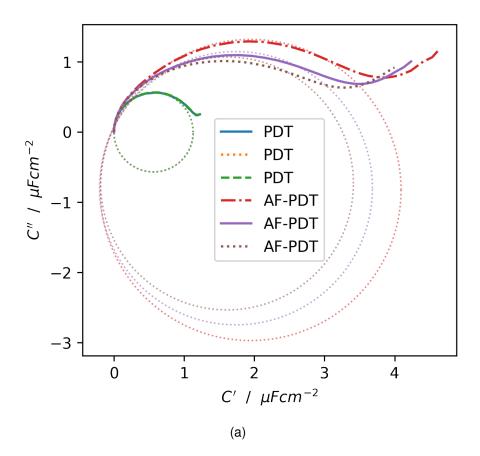
Otro factor importante en el desarrollo del detector de RDF es la unión estable de las moléculas de AF a la superfice de la PDTW, razón por la cual se seleccionó el proceso de funcionalización covalente.

Inicialmente, se ensayó una metodología de inmersión de la PDT en una solución acuosa de AF 2mM para estudiar la interacción que ocurría entre las moléculas de AF y la superficie de la PDT. La caracterización realizada de la funcionalización de las PDT por este método de inmersión (detallada en el capítulo 2) permitió obtener evidencias de una interacción electrostática entre el AF y la PDT.

Por su parte, las tres mediciones sucesivas por ECE de la AF-PDT (curvas de color rojo, violeta y marrón en la figura 27) mostraron que la $C_{\bar{\mu}}$ es mayor (3.96, 3.55 y

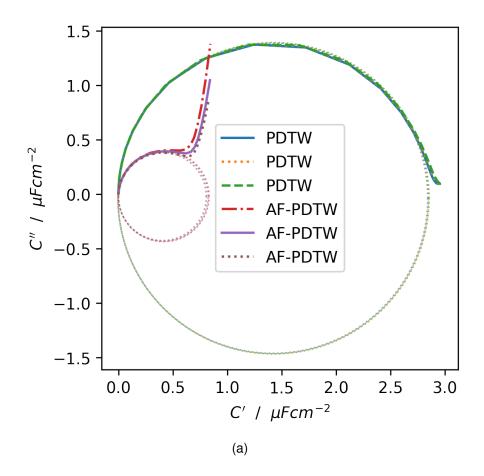
Zhenyin Hai y col. "TiO2 nanoparticles-functionalized two-dimensional WO3 for high-performance supercapacitors developed by facile two-step ALD process". En: *Materials Today Communications* 12 (2017), págs. 55-62. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2017.06.006.

Figura 27. Gráfica de Nyquist para el espectro de capacitancia electroquímica de tres mediciones consecutivas de la PDT (curvas de color azul, naranja y verde que se sobreponen completamente) y de la AF-PDT (curvas de color rojo, violeta y marrón). Para cada curva de las tres mediciones consecutivas se obtuvo una circunferencia (líneas punteadas) que se ajusta a los datos. El electrolito soporte utilizado fue PBS (pH=7.4), las medidas se hicieron alrededor de V_{OCP} entre 0.1 [MHz] y 0.1 [Hz] con voltaje pico-pico de 10 [mV].



 $3.29~\mu Fcm^{-2}$) que la de la PDT antes de ser funcionalizada (donde las tres mediciones sucesivas por ECE, en la figura 27, permitieron determinar el mismo valor de $1.13~\mu Fcm^{-2}$ para la $C_{\bar{\mu}}$). Este aumento de capacitancia puede ser debido a que las moléculas de AF fisisorbidas, con sus grupos carboxílicos en su forma de carboxilato ($-COO^-$), aumentan la carga en la superficie. Adicionalmente, es de notar que el valor de la $C_{\bar{\mu}}$ para las tres mediciones consecutivas de AF-PDT decrece a medida

Figura 28. Gráfica de Nyquist para el espectro de capacitancia electroquímica de tres mediciones consecutivas de la PDTW (curvas de color azul, naranja y verde que se sobreponen completamente) y de la AF-PDTW (curvas de color rojo, violeta y marrón que también se sobreponen). Para cada curva de las tres mediciones consecutivas se obtuvo una circunferencia (líneas punteadas) que se ajusta a los datos. El electrolito soporte utilizado fue PBS (pH=7.4), las medidas se hicieron alrededor de V_{OCP} entre $0.1\ [MHz]$ y $0.1\ [Hz]$ con voltaje pico-pico de $10\ [mV]$.



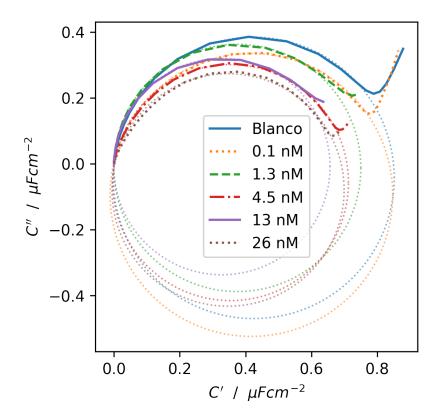
que transcurre el tiempo (en la figura 27 se observa que las curvas para las mediciones consecutivas para la AF-PDT son diferentes, donde el diametro del semicírculo va disminuyendo tras cada medición), indicando posiblemente que las moléculas de AF se van alejando de la superficie de la PDT debido a que su interacción con la superficie es débil.

Como consecuencia de los resultados obtenidos en estos primeros experimentos, se concluye que el detector debe fabricarse usando la PDTW, debido a su mejor comportamiento capacitivo, y que era necesario implementar otra metodología de funcionalización para la PDTW que permitiera una interacción estable entre el AF y la superficie del detector.

El estudio descrito en el capítulo 2 acerca de la AF-PDTW mostró evidencias de una interacción covalente entre el AF y la superficie, y por su parte, la caracterización por ECE demuestra que la unión del AF a la superficie de la película es estable, ya que el valor de la $C_{\bar{\mu}}$ de la AF-PDTW para las tres mediciones sucesivas en el tiempo se mantiene constante (en la figura 28 se observa que las curvas para las mediciones consecutivas para la AF-PDTW son similares, donde el diametro del semicírculo no cambia significativamente tras cada medición). Pero principalmente, se aprecia una reducción significativa de la $C_{\bar{\mu}}$ de la PDTW después de su funcionalización, indicando que las moléculas de AF se han unido químicamente a la superficie de la película apantallando a la superficie de TiO_2 - WO_3 .

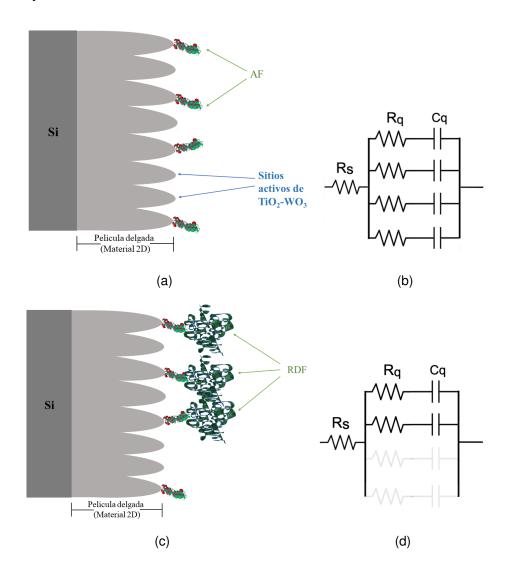
3.3.2. Detección de receptores de folato por ECE — Se funcionalizó la PDTW con AF para conferirle la capacidad de reconocer en su superficie a los RDF. Al hacer interactuar la AF-PDTW con el blanco y las diferentes concentraciones de RDF, y determinar los espectros capacitivos, se obtuvo una tendencia a disminuir la $C_{\bar{\mu}}$ de la AF-PDTW a medida que se ensayaban concentraciones más altas de analito, ver figura 29. Este resultado está en concordancia con los obtenidos para la detección de diferentes analitos siguiendo esta estrategia de la determinación de la $C_{\bar{\mu}}^{108113}$. Para explicar este resultado, se tomó como base el modelo circuital propuesto por Corzo y col. Para este trabajo, se establece que cada sitio activo de la superficie de TiO_2 -W O_3 (capaz de intercambiar electrones con la solución electrolítica) se

Figura 29. Gráfica de Nyquist para el espectro de capacitancia elctroquímica del detector en presencia del blanco y de las diferentes concentraciones de RDF. El electrolito soporte utilizado fue PBS (pH=7.4), las medidas se hicieron alrededor de V_{OCP} entre $0.1\ [MHz]$ y $0.1\ [Hz]$ con voltaje pico-pico de $10\ [mV]$.



representa por un elemento circuital compuesto por una combinación en serie de una resistencia cuántica (R_q) y una capacitancia cuántica (C_q) . Para el caso de la obtención de la señal del blanco, en ausencia de RDF, se puede construir el modelo circuital de la figura 30b, para el cual se tiene un número de sitios activos N y una capacitancia cuántica total de NC_q . Cuando los RDF interactúan con el AF del detector (figura 30c) el número de sitios activos accesibles (N_a) disminuye $(N_a < N)$, disminuyendo la cantidad de capacitancias cuánticas, y por ende, la capacitancia cuántica total disminuye a $N_a C_q$.

Figura 30. (a) Representación esquemática de los sitios activos de la PDTW y (b) del modelo circuital de su interfaz cuando no se ha adicionado el analito (RDF), situación que corresponde a la medición del blanco. (c) Representación de la situación cuando se han adicionado los RDF, los cuales generan una disminución de sitios activos TiO_2 - WO_3 , y (d) muestra el modelo circuital para su interfaz, donde cada elemento circuital gris representa un sitio activo que ha sido bloqueado. Rs es la resistencia en serie, que es la suma de las resistencias de la solución y del contacto eléctrico del detector.



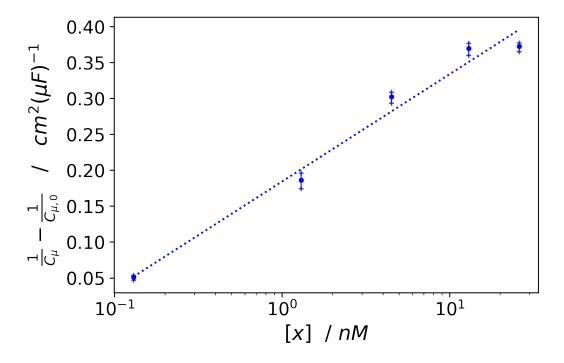
Para poder detectar una concentración específica de RDF, se construyó una curva de calibración (ver figura 31) que relaciona la señal de respuesta del detector, S en

términos de la dureza química, versus la concentración de los RDF, [X], donde la señal de medición está definida por la siguiente expresión:

$$S = \frac{\eta}{\gamma} - \frac{\eta_0}{\gamma} = \frac{1}{C_{\bar{\mu}}} - \frac{1}{C_{\bar{\mu},0}} \tag{17}$$

Aquí, η_0 y $C_{\bar{\mu},0}$ son los valores de dureza química y capacitancia electroquímica, respectivamente, cuando no se ha adicionado el analito al sistema de detección.

Figura 31. Curva de calibración obtenida para la detección de RDF, utilizando la dureza química como respuesta del detector. Se grafica $\frac{1}{C_{\mu}} - \frac{1}{C_{\mu,0}}$ en función de la concentración de RDF [X]. Cada dato se midió por triplicado y la línea punteada es la recta que mejor se ajusta a la media de los datos.



Se obtuvo una respuesta lineal para el sistema AF-PDTW en la detección de RDF al graficar la señal de medición S, según la ecuación 17 (usando la $C_{\bar{\mu}}$ normalizada por el área superficial del detector) versus la concentración. El LoD y LoQ fueron respectivamente de 0.2 y 0.7 nM, valores que indican que la detección de recep-

tores de folato usando este tipo de detectores es prometedora, además, están de acuerdo con los obtenidos para otros detectores basados en la determinación de la $C_{\bar{\mu}}^{115}$. Sin embargo, se esperaba poder igualar o superar el resultado obtenido por Fan y col. (LoD = 5.3 fM) para un detector fotoelectroquímico formado por nanotubos de TiO_2 conjugados a AF-PEG-polidopamina¹¹⁷ en la detección de RDF. Se considera que el límite de detección puede mejorar si se fabrica un detector constituido por nanoestructuras de TiO_2 con valores de $C_{\bar{\mu}}$ en el orden de 10^2Fcm^{-2} , como los reportados para detectores electroquímicos basados en la medición de la $C_{\bar{\mu}}^{108113}$.

Para evaluar la capacidad de este sistema de detección, basado en mediciones ECE, de medir la constante de afinidad de unión molecular entre el AF (anclado al detector) y los RDF, se hizo un ajuste de los datos al modelo de la isoterma de adsorción de Langmuir para determinar la K_a . Al utilizar la isoterma de Langmuir, se definen dos posibles situaciones independientes y no correlacionadas: i) sitios de AF desocupados (A) y ii) ocupados (AX). A representa el sitio de AF disponible para la unión al RDF (X). La unión de los RDF X a los sitios A, en un equilibrio dinámico según el modelo de Langmuir, se describe mediante la relación: $A + X \rightleftharpoons AX$ y la constante de afinidad se define como 115 :

$$K_a = \frac{[AX]}{[A][X]} \tag{18}$$

Donde los [] se refieren a concentración. Ahora, asumiendo un porcentaje de ocupación de cobertura de superficie dado por θ y un porcentaje de sitios disponibles

_

Bobo Fan y col. "Polydopamine-PEG-Folic Acid Conjugate Film Engineered TiO2 Nanotube Arrays for Photoelectrochemical Sensing of Folate Binding Protein". En: *ACS Applied Materials & Interfaces* 12.1 (2020). PMID: 31816239, págs. 1877-1884. DOI: 10.1021/acsami.9b17630. eprint: https://doi.org/10.1021/acsami.9b17630.

como $1 - \theta$, la ecuación 18 se puede reescribir como:

$$K_a[X] = \frac{\theta}{1 - \theta} \tag{19}$$

Resolviendo la ecuación 19 para θ se obtiene:

$$\theta = \frac{K_a[X]}{1 + K_a[X]} \tag{20}$$

Una cobertura de superficie biomolecular, Γ ($molcm^{-2}$), es proporcional a θ . Entonces, se puede asumir que $\Gamma = \theta \Gamma_m$, donde Γ_m es la cantidad máxima de adsorción cuando θ se acerca a la unidad, así:

$$\Gamma = \frac{\Gamma_m K_a[X]}{1 + K_a[X]} \tag{21}$$

La ecuación 21 linealizada se escribe así:

$$\frac{[X]}{\Gamma} = \frac{[X]}{\Gamma_m} + \frac{1}{K_a \Gamma_m} \tag{22}$$

Como un incremento en Γ implica un incremento proporcional de la señal de medición S, la ecuación 22 se puede expresar de otra manera, así:

$$\frac{[X]}{S} = \frac{[X]}{S_m} + \frac{1}{K_a S_m} \tag{23}$$

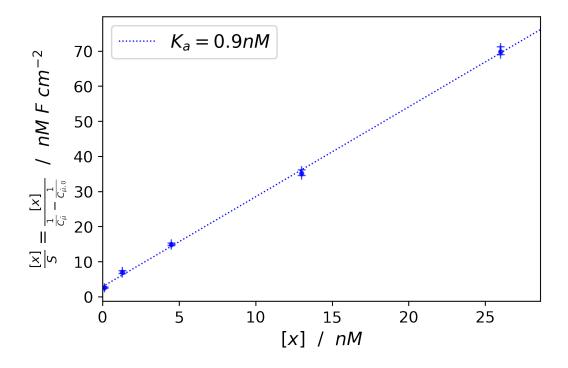
Donde $S=\frac{1}{C_{\bar{\mu}}}-\frac{1}{C_{\bar{\mu},0}}$, $C_{\bar{\mu}}$ es la capacitancia electroquímica para determinada concentración de analito, $C_{\bar{\mu},0}$ es la capacitancia electroquímica de la interfaz antes de adicionar alguna cantidad de analito, y S_m es el valor de la señal de respuesta del detector para la adsorción máxima sobre el detector.

La K_a se determinó haciendo $y=\frac{[X]}{S},\, x=[X],$ de tal manera que los datos experi-

mentales se ajustaron a y=mx+b; al comparar con la ecuación (23) se encuentra que el cociente entre la pendiente (m) y el intercepto (b) es $\frac{m}{b}=K_a$.

En la figura 32 se presenta la curva de calibración ($\frac{[X]}{S}$ versus [X]) que permitió determinar el valor de la K_a de 0.9 nM. Debido a que este resultado se encuentra dentro de los márgenes teóricos ($K_a \approx 10^{-9} M$)⁶¹ se considera que este sistema de detección está fundamentado en la interacción específica entre el AF y los RDF.

Figura 32. Curva de calibración obtenida para la detección de RDF, ajustando los datos al modelo de Langmuir. Se grafica $\frac{[X]}{S}$ versus [X]. Cada dato se midió por triplicado y la línea punteada es la recta que mejor se ajusta a la media de los datos.



3.3.3. Especificidad del detector El experimento control en donde se evaluó la PDTW sin funcionalizar con AF, en la detección de RDF, permitió conocer que la $C_{\bar{\mu}}$ de esta película no es dependiente de la concentración de RDF, es decir, no

tiene capacidad de sensado. Lo anterior se puede evidenciar en la tabla 7, donde se muestran los valores de la $C_{\bar{\mu}}$ obtenida para las mediciones del blanco (PDTW incubada con PBS por 30 min) y para las diferentes concentraciones de RDF. Es de notar que el valor de la $C_{\bar{\mu}}$ es muy cercano entre mediciones, con una media de 2.74 $\mu F cm^{-2}$ y desviación estándar de 0.03 $\mu F cm^{-2}$. Este resultado evidencia que la superficie AF-PDTW responde específicamente a los RDF (figura 29) .

Tabla 7. Valores de la $C_{\bar{\mu}}$ obtenida al evaluar la capacidad de detección de la PDTW frente al blanco y a las diferentes concentraciones de RDF. Las mediciones que se indican son consecutivas.

Medición de $C_{ar{\mu}}$	Blanco	0.1 nM	1.3 nM	4.5 nM	13 nM	26 nM
$[\mu Fcm^{-2}]$						
1	2.681	2.751	2.732	2.755	2.744	2.758
2	2.682	2.744	2.728	2.753	2.740	2.754
3	2.688	2.745	2.728	2.767	2.741	2.761

Para estudiar la respuesta del detector propuesto ante posibles interferencias, se evaluó la selectividad usando FBS. Por un lado, con miras a evaluar al detector en muestras biológicas tomadas de un paciente, el FBS, al ser un medio de cultivo célular, presenta una mezcla compleja de proteínas que también estarían presentes en las muestras biológicas. El porcentaje de la respuesta de $C_{\bar{\mu}}$ para el FBS fue de 4.30 %, para una concentración mucho mayor que la concentración más alta de RDF (26 nM) evaluada en este trabajo con un valor de R(%) del 21 %. Por lo tanto, la selectividad de la interfaz AF-PDTW por los RDF está presente.

3.4. CONCLUSIONES

Cuando se fabrican PDTWs donde se combinan TiO_2 y WO_3 se logra mejorar el valor de la $C_{\bar{\mu}}$ que se obtenía para PDT, dado a un aumento en la cantidad de elec-

trónes (portadores de carga) suministrados por el WO_3 .

El tipo de funcionalización de las películas delgadas con el AF pudo caracterizarse por ECE. Se observó que la funcionalización no covalente es inestable, ya que el AF parece desanclarse de la superficie tras mediciones ECE consecutivas. Además, se nota que, tras la funcionalización de la PDT, la $C_{\bar{\mu}}$ aumenta con respecto a la $C_{\bar{\mu}}$ de la película antes de ser funcionalizada, debido a la acumulación de las moléculas de AF con sus grupos carboxílicos en su forma carboxilato en la superficie de la película. Por otro lado, para la funcionalización covalente ocurre una disminución de la $C_{\bar{\mu}}$ de la PDTW luego de la funcionalización, debido posiblemente a que las moléculas de AF bloquean los sitios activos de la superficie de TiO_2 - WO_3 . Adicionalmente, se observa que las moléculas de AF se mantienen unidas a la superficie tras mediciones ECE sucesivas.

El detector fabricado basado en una AF-PDTW mostró una respuesta lineal con respecto a la concentración de RDF, demostrando capacidad de sensado. Los valores obtenidos de LoD=0.2nM y LoQ=0.7nM indican resultados prometedores para la detección de RDF usando STON funcionalizadas con AF como biosensores electroquímicos capacitivos. La determinación de la Ka=0.9nM, acorde al dato de la literatura, permite confirmar que la respuesta del detector es debida a la interacción AF-RDF. Además, la superficie AF-PDTW mostró una señal de respuesta específica hacía los RDF.

4. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En la búsqueda de estrategías viables para la detección temprada del cáncer se ha evidenciado la necesidad de fabricar biosensores altamente sensibles y específicos, cuya implementación sea experimentalmente simple, de tal manera que, pueda ser usado en el sitio de cuidado y por cualquier operario. En este trabajo doctoral se propuso el desarrollo de un detector electroquímico (sin sonda redox en la solución electrolítica) basado en una película delgada de TiO_2 funcionalizada con ácido fólico, para la detección específica de receptores de folato sin etiquetas, debido a que los receptores de folato son biomarcadores del cáncer epitelial que presentan gran afinidad hacía el ácido fólico.

En esta tesis se logró la fabricación de películas delgadas de TiO_2 (6-15 nm) y películas delgadas de $TiO_2 - WO_3$ (6 nm) con espesores de unos pocos nanómetros debidamente caracterizadas por XPS, AFM, Raman y ángulo de contacto. Por medio de la Espectroscopía de Capacitancia Electroquímica, se pudo determinar que la película delgada de $TiO_2 - WO_3$ presentó mejor respuesta capacitiva (mayor valor de capacitancia electroquímica, $C_{\bar{\mu}}$) que la película delgada de TiO_2 , razón por la cual se seleccionó la película delgada de $TiO_2 - WO_3$ para fabricar el detector de receptores de folato.

Se fabricó un detector selectivo de receptores de folato fundamentado en la determinación de la $C_{\bar{\mu}}$, mediante la funcionalización covalente de la superficie de una película delgada de $TiO_2 - WO_3$ con ácido fólico.

Se encontró que el límite de detección y de cuantificación del detector (película delgada de $TiO_2 - WO_3$ funcionalizada con ácido fólico) presentan valores adecuados para aplicaciones de biosensores. Además, se encontró que la afinidad bioquímica (K_a) concordaba con el valor teórico de la afinidad entre el ácido fólico y los receptores de folato, y por ende, se demostró que el sistema de detección propuesto depende fundamentalmente de la afinidad de interacción entre el ácido fólico y los receptores de folato.

El enfoque de este biosensor capacitivo depende de la cantidad de sitios activos de TiO_2 - WO_3 , y su respuesta de $C_{\bar{\mu}}$ se ve afectada por el bloqueo de esta superficie tras la funcionalización con ácido fólico, y luego, con la llegada de los receptores de folato. Este detector capacitivo tiene una ventaja importante debido al hecho de que no necesita una sonda redox en la solución, lo que ayuda a minimizar la manipulación de la muestra y, por lo tanto, lo hace ideal para los análisis en el punto de atención. Sin embargo, se recomienda para investigaciones futuras ensayar otro tipo de nanoestructuras de TiO_2 y TiO_2 - WO_3 , con el fin de obtener valores de $C_{\bar{\mu}}$ en el orden de $10^2~\mu Fcm^{-2}$, que podrían mejorar los resultados del límite de detección y cuantificación para el detector desarrollado en este trabajo.

Por otro lado, en investigaciones futuras este detector fabricado debería someterse a ensayos con células *HeLa* para evaluar su potencial en la detección de los receptores de folato sobre-expresados en la superficie de estas células, y adicionalmente, se recomienda estudiar la reproducibidad de la detección usando películas diferentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Akkas, Tugba y col. "Which is more effective for protein adsorption: surface roughness, surface wettability or swelling? Case study of polyurethane films prepared from castor oil and poly(ethylene glycol)". En: *Polymer International* 62.8 (2013), págs. 1202-1209. DOI: https://doi.org/10.1002/pi.4408. eprint: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/pi.4408 (vid. pág. 66).
- Al-Fuijan, Mohannad Saleh Hammadi y col. "Improvement in sensing performance of H2o2 biosensor electrodes through modification of anatase TiO2 nanorods and pretreatment of electrochemical reduction". En: *Sensors and Materials* 29.1 (2017), págs. 95-103. DOI: 10.18494/SAM.2017.1418 (vid. pág. 40).
- Ali, Md. Azahar y col. "Microfluidic Immuno-Biochip for Detection of Breast Cancer Biomarkers Using Hierarchical Composite of Porous Graphene and Titanium Dioxide Nanofibers". En: *ACS Applied Materials & Interfaces* 8.32 (2016). PMID: 27442623, págs. 20570-20582. DOI: 10.1021/acsami.6b05648. eprint: https://doi.org/10.1021/acsami.6b05648 (vid. págs. 44, 51).
- Aloisi, Alessandra y col. "Bio-Recognition in Spectroscopy-Based Biosensors for *Heavy Metals-Water and Waterborne Contamination Analysis". eng. En: *Biosensors* 9.3 (2019). 31366137[pmid], pág. 96. DOI: 10.3390/bios9030096 (vid. págs. 27, 41).
- Anaya-Esparza, Luis Miguel y col. "Use of Titanium Dioxide (TiO2) Nanoparticles as Reinforcement Agent of Polysaccharide-Based Materials". En: *Processes* 8.11 (2020). DOI: 10.3390/pr8111395 (vid. págs. 28, 29).

- Arshad, M. K. Md y col. "Field-Effect Transistor-Integration with TiO2 Nanoparticles for Sensing of Cardiac Troponin I Biomarker". En: *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 18.8 (2018), págs. 5283-5291. DOI: 10.1166/jnn.2018.15419 (vid. pág. 46).
- Attouche, Hafida y col. "Precursor nature and molarities effect on the optical, structural, morphological, and electrical properties of TiO2 thin films deposited by spray pyrolysis". En: *Optik* 203 (2020), pág. 163985. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2019.163985 (vid. pág. 50).
- Bai, Jing y Baoxue Zhou. "Titanium Dioxide Nanomaterials for Sensor Applications". En: *Chemical Reviews* 114.19 (2014), págs. 10131-10176. DOI: 10.1021/cr400625j (vid. págs. 28, 29, 31).
- Bard, Allen J. y Larry R. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2nd. Wiley, 2001 (vid. pág. 38).
- Benvenuto, Paul, A. K.M. Kafi y Aicheng Chen. "High performance glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase onto modified titania nanotube arrays". En: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 627.1-2 (2009), págs. 76-81. DOI: 10.1016/j.jelechem.2008.12.022 (vid. pág. 40).
- Berger, Thomas y col. "The Electrochemistry of Nanostructured Titanium Dioxide Electrodes". En: *ChemPhysChem* 13.12 (2012), págs. 2824-2875. DOI: https://doi.org/10.1002/cphc.201200073. eprint: https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cphc.201200073 (vid. págs. 28, 29).

- Bertel, Linda, David A. Miranda y José Miguel García-Martín. "Nanostructured Titanium Dioxide Surfaces for Electrochemical Biosensing". En: *Sensors* 21.18 (2021). DOI: 10.3390/s21186167 (vid. pág. 42).
- Biesinger, Mark C y col. "Applied Surface Science Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn". En: *Applied Surface Science* 257.3 (2010), págs. 887-898. DOI: 10.1016/j.apsusc.2010.07.086 (vid. págs. 59, 62).
- Bueno, Paulo R. y David A. Miranda. "Conceptual density functional theory for electron transfer and transport in mesoscopic systems". En: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (8 2017), págs. 6184-6195. DOI: 10.1039/C6CP02504H (vid. págs. 82, 83).
- Bueno, Paulo R., Giulia Mizzon y Jason J. Davis. "Capacitance Spectroscopy: A Versatile Approach To Resolving the Redox Density of States and Kinetics in Redox-Active Self-Assembled Monolayers". En: *The Journal of Physical Chemistry B* 116.30 (2012), págs. 8822-8829. DOI: 10.1021/jp303700f (vid. pág. 41).
- Castillo, John J. y col. "Adsorption and vibrational study of folic acid on gold nanopillar structures using surface-enhanced raman scattering spectroscopy". En: *Nanomaterials and Nanotechnology* 5.1 (2015). DOI: 10.5772/61606 (vid. págs. 67-69).
- Chen, Chen y col. "Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors". eng. En: *Nature* 500.7463 (2013). 23851396[pmid], págs. 486-489.

 DOI: 10.1038/nature12327 (vid. pág. 25).
- Chen, Xin, Zhengpeng Yang y Shihui Si. "Potentiometric urea biosensor based on immobilization of urease onto molecularly imprinted TiO2 film". En: *Journal of*

- Electroanalytical Chemistry 635.1 (2009), págs. 1-6. DOI: 10.1016/j.jelechem. 2009.07.005 (vid. págs. 40, 50, 51).
- Chen, Xingdong y col. "Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test". En: *Nature Communications* 11.1 (2020), pág. 3475. DOI: 10.1038/s41467-020-17316-z (vid. pág. 23).
- Chu, Yung-Ming y col. "TiO2 nanowire FET device: Encapsulation of biomolecules by electro polymerized pyrrole propylic acid". En: *Biosensors and Bioelectronics* 26.5 (2011), págs. 2334-2340. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bios.2010. 10.006 (vid. pág. 48).
- Comert, Buse y col. "Titanium Dioxide Thin Films as Methane Gas Sensors". En: *IEEE Sensors Journal* 16.24 (2016), págs. 8890-8896. DOI: 10.1109/JSEN.2016. 2619860 (vid. págs. 31, 50).
- Corzo, S P, P R Bueno y D A Miranda. "The experimental chemical hardness in the interaction between -tubulin and epothilone B". En: *Journal of Physics: Conference Series* 1403 (2019), pág. 012016. DOI: 10.1088/1742-6596/1403/1/012016 (vid. págs. 43, 86).
- Corzo, Sandra P., Paulo R. Bueno y David A. Miranda. "Improving the Analytical Reproducibility of Electrochemical Capacitive Sensors Using the Chemical Hardness of the Interface". En: *IEEE Access* 9 (2021), págs. 166446-166454. DOI: 10.1109/ACCESS.2021.3135787 (vid. págs. 81, 94, 98).
- Crulhas, Bruno P. y col. "Review—Recent Advances Based on a Sensor for Cancer Biomarker Detection". En: *ECS Journal of Solid State Science and Technology* 10.4 (2021), pág. 047004. DOI: 10.1149/2162-8777/abf757 (vid. pág. 24).

- Devanand Venkatasubbu, G. y col. "Folate targeted PEGylated titanium dioxide nanoparticles as a nanocarrier for targeted paclitaxel drug delivery". En: *Advanced Powder Technology* 24.6 (2013), págs. 947-954. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apt.2013.01.008 (vid. págs. 48, 100).
- Estrela, Pedro y col. "Introduction to biosensors". En: Essays in Biochemistry 60.1 (jun. de 2016), págs. 1-8. DOI: 10.1042/EBC20150001. eprint: https://portlandpress.com/essaysbiochem/article-pdf/60/1/1/481070/bse0600001.pdf (vid. pág. 27).
- Fan, Bobo y col. "Polydopamine-PEG-Folic Acid Conjugate Film Engineered TiO2

 Nanotube Arrays for Photoelectrochemical Sensing of Folate Binding Protein".

 En: ACS Applied Materials & Interfaces 12.1 (2020). PMID: 31816239, págs. 1877-1884.

 DOI: 10.1021/acsami.9b17630. eprint: https://doi.org/10.1021/acsami.

 9b17630 (vid. pág. 98).
- Fares, Jawad y col. "Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited". En: *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5.1 (2020), pág. 28. DOI: 10.1038/s41392-020-0134-x (vid. pág. 22).
- Fernandes, Flávio C.B. y col. "Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures". En: *Biosensors and Bioelectronics* 57 (2014), págs. 96-102. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.01.044 (vid. págs. 89, 98).
- Gao, Bingpan y col. "Femtosecond pulsed laser deposition of nanostructured TiO2 films in atmosphere". En: *AIP Advances* 7.9 (2017). DOI: 10.1063/1.4997398 (vid. págs. 50, 62).

- Garrote, Beatriz L., Adriano Santos y Paulo R. Bueno. "Label-free capacitive assaying of biomarkers for molecular diagnostics". En: *Nature Protocols* 15.12 (2020), págs. 3879-3893. DOI: 10.1038/s41596-020-0390-9 (vid. págs. 83, 85).
- Gomes, Orisson P. y col. "3-Mercaptopropionic acid functionalization of titanium dioxide thin films". En: *Materials Chemistry and Physics* 223 (2019), págs. 32-38. DOI: https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.10.041 (vid. págs. 73, 74).
- González-García, Lola y col. "Correlation lengths, porosity and water adsorption in TiO 2 thin films prepared by glancing angle deposition". En: *Nanotechnology* 23.20 (2012). DOI: 10.1088/0957-4484/23/20/205701 (vid. pág. 50).
- Gualdrón-Reyes, Andrés F. y col. "The role of boron in the carrier transport improvement of CdSe-sensitized B,N,F-TiO2 nanotube solar cells: A synergistic strategy". En: *New Journal of Chemistry* 42.17 (2018), págs. 14481-14492. DOI: 10.1039/c8nj02716a (vid. pág. 31).
- Guerrero, L. Andrés y col. "Peroxide Electrochemical Sensor and Biosensor Based on Nanocomposite of TiO2 Nanoparticle/Multi-Walled Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrode". En: *Nanomaterials* 10.1 (2020). DOI: 10.3390/nano10010064 (vid. págs. 40, 51).
- Hai, Zhenyin y col. "TiO2 nanoparticles-functionalized two-dimensional WO3 for high-performance supercapacitors developed by facile two-step ALD process". En: *Materials Today Communications* 12 (2017), págs. 55-62. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2017.06.006 (vid. pág. 91).

- Halim, Nur Hamidah Abdul y col. "Mediatorless impedance studies with titanium dioxide conjugated gold nanoparticles for hydrogen peroxide detection". En: *Biosensors* 7.3 (2017). DOI: 10.3390/bios7030038 (vid. pág. 44).
- Hanawa, Takao. "A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium". eng. En: *Journal of periodontal & implant science* 41.6 (2011). 22324003[pmid], págs. 263-272. DOI: 10.5051/jpis.2011.41.6.263 (vid. pág. 59).
- Hasan, M.R. y col. "Recent development in electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection". En: *Biosensors and Bioelectronics: X* 8 (2021), pág. 100075.

 DOI: https://doi.org/10.1016/j.biosx.2021.100075 (vid. págs. 23, 24).
- Hayashi, Koichiro y col. "High-Frequency, Magnetic-Field-Responsive Drug Release from Magnetic Nanoparticle/Organic Hybrid Based on Hyperthermic Effect". En: *ACS Applied Materials & Interfaces* 2.7 (2010). PMID: 20568697, págs. 1903-1911. DOI: 10.1021/am100237p. eprint: https://doi.org/10.1021/am100237p (vid. pág. 70).
- Hu, Junhua y col. "Construction of solid-state Z-scheme carbon-modified TiO2/WO3 nanofibers with enhanced photocatalytic hydrogen production". En: *Journal of Power Sources* 328 (2016), págs. 28-36. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.08.001 (vid. pág. 61).
- Hu, Liangsheng y col. "Recyclable and High-Sensitivity Electrochemical Biosensing Platform Composed of Carbon-Doped TiO2 Nanotube Arrays". En: *Analytical Chemistry* 83.21 (2011), págs. 8138-8144. DOI: 10.1021/ac201639m (vid. pág. 30).

- Hu, Zhelu y col. "TiO2 Nanocolumn Arrays for More Efficient and Stable Perovskite Solar Cells". En: *ACS Applied Materials and Interfaces* 12.5 (2020), págs. 5979-5989. DOI: 10.1021/acsami.9b21628 (vid. pág. 33).
- Ishii, Akihiro y col. "Low-temperature preparation of high-n TiO2 thin film on glass by pulsed laser deposition". En: *Applied Surface Science* 347 (2015), págs. 528-534.

 DOI: https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.04.125 (vid. págs. 34, 35, 50).
- Kafi, A. K.M. y col. "Highly sensitive amperometric H2O2 biosensor based on hemoglobin modified TiO2 nanotubes". En: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 662.1 (2011), págs. 64-69. DOI: 10 . 1016 / j . jelechem . 2011 . 03 . 021 (vid. págs. 38, 40).
- Karimipour, Masoud y col. "A glassy carbon electrode modified with TiO2(200)-rGO hybrid nanosheets for aptamer based impedimetric determination of the prostate specific antigen". En: *Microchimica Acta* 186.1 (2019), págs. 1-9. DOI: 10.1007/s00604-018-3141-7 (vid. págs. 44, 51).
- Kokaislová, Albta y col. "Spectroscopic studies of folic acid adsorbed on various metal substrates: does the type of substrate play an essential role in temperature dependence of spectral features?" En: *Journal of Raman Spectroscopy* 45 (2014), págs. 750-757 (vid. págs. 67, 69).
- Lehr, Joshua y col. "Label-free Capacitive Diagnostics: Exploiting Local Redox Probe State Occupancy". En: *Analytical Chemistry* 86.5 (2014). PMID: 24491045, págs. 2559-2564. DOI: 10.1021/ac403727h. eprint: https://doi.org/10.1021/ac403727h (vid. págs. 86, 90, 94, 98).

- Li, Le y col. "Recent Advances in Immobilization Strategies for Biomolecules in Sensors Using Organic Field-Effect Transistors". En: *Transactions of Tianjin University* 26.6 (2020), págs. 424-440. DOI: 10 . 1007 / s12209 020 00234 y (vid. pág. 27).
- Liu, Luting, Ritwik Bhatia y Thomas J. Webster. "Atomic layer deposition of nano-TiO2 thin films with enhanced biocompatibility and antimicrobial activity for orthopedic implants". En: *International Journal of Nanomedicine* 12 (2017), págs. 8711-8723. DOI: 10.2147/IJN.S148065 (vid. pág. 50).
- Liu, Meichuan y col. "Direct Electrochemistry of Hemoglobin on Vertically Aligned Carbon Hybrid TiO2 Nanotubes and Its Highly Sensitive Biosensor Performance". En: *Chinese Journal of Chemistry* 31.2 (2013), págs. 215-220. DOI: 10.1002/cjoc.201200883. eprint: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cjoc.201200883 (vid. pág. 40).
- Long, Gary L. y J. D. Winefordner. "Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition". En: *Analytical Chemistry* 55.07 (1983). PMID: 22857433, 712A-724A. DOI: 10.1021/ac00258a724. eprint: https://doi.org/10.1021/ac00258a724 (vid. pág. 88).
- Mavrič, Tina y col. "Chapter Three Electrochemical Biosensor Based on TiO2 Nanomaterials for Cancer Diagnostics". En: ed. por Aleš Iglič, Michael Rappolt y Ana J. García-Sáez. Vol. 27. Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly. Academic Press, 2018, págs. 63 -105. DOI: https://doi.org/10.1016/bs.abl. 2017.12.003 (vid. págs. 27, 29, 38, 39, 42, 43).
- Meroni, Daniela y col. "A close look at the structure of the TiO2-APTES interface in hybrid nanomaterials and its degradation pathway: An experimental and theore-

- tical study". En: *Journal of Physical Chemistry C* 121.1 (2017), págs. 430-440. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b10720 (vid. pág. 46).
- Miranda, David A. y Paulo R. Bueno. "Chemical Hardness of Mesoscopic Electrochemical Systems Directly Analyzed from Experimental Data". En: *The Journal of Physical Chemistry C* 123.34 (2019), págs. 21213-21223. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b04020 (vid. págs. 41, 43, 82, 86).
- Mohallem, Nelcy Della Santina y col. "Pure and Nanocomposite Thin Films Based on TiO2 Prepared by Sol-Gel Process: Characterization and Applications". En: *Titanium Dioxide*. Ed. por Dongfang Yang. Rijeka: IntechOpen, 2018. Cap. 4. DOI: 10.5772/intechopen.74335 (vid. pág. 50).
- Mondal, Aniruddha y col. "Electrical properties of vertically oriented TiO2 nanowire arrays synthesized by glancing angle deposition technique". En: *Electronic Materials Letters* 9.2 (2013), págs. 213-217. DOI: 10.1007/s13391-012-2136-5 (vid. págs. 59, 60).
- Nadzirah, Sh. y col. "State-of-the-Art on Functional Titanium Dioxide-Integrated Nano-Hybrids in Electrical Biosensors". En: *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 52.3 (2022). PMID: 32997522, págs. 637-648. DOI: 10.1080/10408347.2020. 1816447. eprint: https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1816447 (vid. pág. 45).
- Ognjanović, Miloš y col. "TiO2/APTES cross-linked to carboxylic graphene based impedimetric glucose biosensor". En: *Microchemical Journal* 158.June (2020), pág. 105150. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105150 (vid. págs. 44, 46).

- Ogugua, Simon N., Odireleng Martin Ntwaeaborwa y Hendrik C. Swart. "Latest Development on Pulsed Laser Deposited Thin Films for Advanced Luminescence Applications". En: *Coatings* 10.11 (2020). DOI: 10.3390/coatings10111078 (vid. pág. 34).
- Pinzón, Edgar F., Adriano dos Santos y Paulo R. Bueno. "Density of States of a Nanoscale Semiconductor Interface as a Transduction Signal for Sensing Molecules". En: *ACS Applied Electronic Materials* 3.8 (2021), págs. 3411-3417. DOI: 10.1021/acsaelm.1c00387. eprint: https://doi.org/10.1021/acsaelm.1c00387 (vid. pág. 81).
- Pishkar, Negin y col. "Study of the highly ordered TiO2 nanotubes physical properties prepared with two-step anodization". En: *Results in Physics* 9 (2018), págs. 1246-1249. DOI: https://doi.org/10.1016/j.rinp.2018.02.009 (vid. págs. 29, 30).
- Pujari, Sidharam P. y col. "Covalent surface modification of oxide surfaces". En: *Angewandte Chemie International Edition* 53.25 (2014), págs. 6322-6356. DOI: 10.1002/anie.201306709 (vid. págs. 45, 46, 48, 49, 70).
- Qu, Qiyun y col. "Chemically Binding Carboxylic Acids onto TiO2 Nanoparticles with Adjustable Coverage by Solvothermal Strategy". En: *Langmuir* 26.12 (2010). PMID: 20345108, págs. 9539-9546. DOI: 10.1021/la100121n. eprint: https://doi.org/10.1021/la100121n (vid. págs. 48, 71, 77).
- Rahmanian, Reza y col. "Development of sensitive impedimetric urea biosensor using DC sputtered Nano-ZnO on TiO2 thin film as a novel hierarchical nanostructure transducer". En: *Sensors and Actuators, B: Chemical* 256 (2018), págs. 760-774. DOI: 10.1016/j.snb.2017.10.009 (vid. pág. 41).

- Rechendorff, K. y col. "Enhancement of Protein Adsorption Induced by Surface Roughness". En: *Langmuir* 22.26 (2006). PMID: 17154557, págs. 10885-10888. DOI: 10.1021/la0621923. eprint: https://doi.org/10.1021/la0621923 (vid. pág. 66).
- Reghunath, Shalini, Dephan Pinheiro y Sunaja Devi KR. "A review of hierarchical nanostructures of TiO2: Advances and applications". En: *Applied Surface Science Advances* 3 (2021), pág. 100063. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apsadv. 2021.100063 (vid. pág. 28).
- Reta, Nekane y col. "Nanostructured Electrochemical Biosensors for Label-Free Detection of Water- and Food-Borne Pathogens". En: *ACS Applied Materials & Interfaces* 10.7 (2018), págs. 6055-6072. DOI: 10.1021/acsami.7b13943 (vid. pág. 38).
- Riboni, Francesca y col. "WO3–TiO2 vs. TiO2 photocatalysts: effect of the W precursor and amount on the photocatalytic activity of mixed oxides". En: *Catalysis Today* 209 (2013). SELECTED CONTRIBUTIONS OF THE 7th EUROPEAN MEETING ON SOLAR CHEMISTRY AND PHOTOCATALYSIS: ENVIRONMENTAL APPLICATIONS (SPEA 7), págs. 28-34. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cattod.2013.01.008 (vid. pág. 63).
- Romero-Arcos, Mariana, Ma Guadalupe Garnica-Romo y Héctor Eduardo Martínez-Flores. "Electrochemical study and characterization of an amperometric biosensor based on the immobilization of laccase in a nanostructure of TiO2 synthesized by the sol-gel method". En: *Materials* 9.7 (2016), págs. 8-13. DOI: 10.3390/ma9070543 (vid. pág. 40).
- Salado, Manuel y col. "1-dimensional TiO2 nano-forests as photoanodes for efficient and stable perovskite solar cells fabrication". En: *Nano Energy* 35.Novem-

- ber 2016 (2017), págs. 215-222. DOI: 10.1016/j.nanoen.2017.03.034 (vid. pág. 50).
- Salje, E. K. H. "Multi-scaling and mesoscopic structures". eng. En: *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 368.1914 (2010). 20123752[pmid], págs. 1163-1174. DOI: 10.1098/rsta.2009.0266 (vid. pág. 81).
- Santos, Adriano. "Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors". En: *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques* S7.012 (2014). DOI: 10.4172/2155-9872.s7-016 (vid. págs. 41-43, 84, 85).
- Sarkar, Sibaji y col. "Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview". eng. En: *International journal of molecular sciences* 14.10 (2013). 24152442[pmid], págs. 21087-21113. DOI: 10.3390/ijms141021087 (vid. pág. 22).
- Schiffman, Joshua D., Paul G. Fisher y Peter Gibbs. "Early Detection of Cancer: Past, Present, and Future". En: *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 35 (2015). PMID: 25993143, págs. 57-65. DOI: 10.14694/EdBook_AM.2015.35.57. eprint: https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2015.35.57 (vid. pág. 22).
- Su, Weiguang y col. "Surface Phases of TiO2 Nanoparticles Studied by UV Raman Spectroscopy and FT-IR Spectroscopy". En: *The Journal of Physical Chemistry C* 112.20 (2008), págs. 7710-7716. DOI: 10.1021/jp7118422. eprint: https://doi.org/10.1021/jp7118422 (vid. pág. 59).
- Subramanian, M. y col. "Effect of cobalt doping on the structural and optical properties of TiO2 films prepared by sol–gel process". En: *Thin Solid Films* 516.12

- (2008), págs. 3776-3782. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tsf.2007.06.125 (vid. pág. 61).
- Sung, Hyuna y col. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries". En: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71.3 (2021), págs. 209-249. DOI: https://doi.org/10.3322/caac.21660.eprint: https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.3322/caac.21660 (vid. pág. 22).
- Teixeira, Raïssa Ainsworth Rustichelli y col. "Tracking chemical interactions of folic acid on gold surface by SERS spectroscopy". En: *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 223 (2019). DOI: 10.1016/j.saa.
 2019.117305 (vid. págs. 67, 69).
- Thévenot, Daniel R. y col. "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification1International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical Chemistry).1". En: *Biosensors and Bioelectronics* 16.1 (2001), págs. 121-131. DOI: https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4 (vid. pág. 27).
- Trino, Luciana D. y col. "Surface Physicochemical and Structural Analysis of Functionalized Titanium Dioxide Films". En: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 546.March (2018), págs. 168-178. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2018.03.019 (vid. págs. 47-49, 58).
- Vargas, M. y col. "Effect of W-Ti target composition on the surface chemistry and electronic structure of WO3-TiO2 films made by reactive sputtering". English. En:

- Applied Surface Science 353.C (2015), págs. 728-734. DOI: 10.1016/j.apsusc. 2015.06.097 (vid. pág. 62).
- Vasilopoulou, M. y col. "Hydrogenated under-stoichiometric tungsten oxide anode interlayers for efficient and stable organic photovoltaics". En: *J. Mater. Chem. A* 2 (6 2014), págs. 1738-1749. DOI: 10.1039/C3TA13975A (vid. pág. 63).
- Waita, Sebastian M. y col. "Electron transport and recombination in dye sensitized solar cells fabricated from obliquely sputter deposited and thermally annealed TiO2 films". En: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 605.2 (2007), págs. 151-156. DOI: 10.1016/j.jelechem.2007.04.001 (vid. págs. 33, 50).
- Wang, Qingyang y col. "Blue luminescent amorphous carbon nanoparticles synthesized by microplasma processing of folic acid". En: *Plasma Processes and Polymers* 15.1 (2018), pág. 1700088. DOI: https://doi.org/10.1002/ppap. 201700088. eprint: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ppap.201700088 (vid. págs. 69, 75).
- Wang, Wei y col. "Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized on unhybridized titanium dioxide nanotube arrays". En: *Microchimica Acta* 181.3-4 (2014), págs. 381-387. DOI: 10.1007/s00604-013-1121-5 (vid. págs. 40, 51).
- Wang, Wenjiao B. y col. "Chemical vapor deposition of TiO2 thin films from a new halogen-free precursor". En: *Journal of Vacuum Science & Technology A* 32.6 (2014), pág. 061502. DOI: 10.1116/1.4894454. eprint: https://doi.org/10.1116/1.4894454 (vid. pág. 50).

- Wang, Yu y col. "Nanodetection of Head and Neck Cancer on Titanium Oxide Sensing Surface". En: *Nanoscale Research Letters* 15.1 (2020). DOI: 10 . 1186 / s11671-020-3262-x (vid. pág. 47).
- Wang, Yu y col. "Sensitive impedimetric DNA biosensor based on (Nb,V) codoped TiO2 for breast cancer susceptible gene detection". En: *Materials Science and Engineering: C* 77 (2017), págs. 867 -873. DOI: https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.260 (vid. págs. 43, 44).
- Wang, Yue y col. "Synthesis, characterization and in vitro anticancer activity of the biomolecule-based coordination complex nanotubes". En: *J. Mater. Chem. B* 3 (2 2015), págs. 296-305. DOI: 10.1039/C4TB01135J (vid. págs. 69, 74).
- Xie, Jin y col. "Targeting and photodynamic killing of cancer cell by nitrogen-doped titanium dioxide coupled with folic acid". En: *Nanomaterials* 6.6 (2016). DOI: 10. 3390/nano6060113 (vid. pág. 46).
- Xu, Yu y Mingrong Shen. "Fabrication of anatase-type TiO2 films by reactive pulsed laser deposition for photocatalyst application". En: *Journal of Materials Processing Technology* 202.1 (2008), págs. 301-306. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2007.09.015 (vid. pág. 34).
- Yang, Qingui y col. "Electrochemical Biosensor Based on Nano TiO2 Loaded with Highly Dispersed Photoreduced Nano Platinum". En: *Journal of The Electrochemical Society* 165.13 (2018), B610-B615. DOI: 10.1149/2.1041813jes (vid. págs. 40, 51).

- Yang, Yu y col. "Protein Adsorption at Nanorough Titanium Oxide Surfaces: The Importance of Surface Statistical Parameters beyond Surface Roughness". En: *Nanomaterials* 11.2 (2021). DOI: 10.3390/nano11020357 (vid. pág. 66).
- Zamharir, S. Ghayeb, M. Ranjbar y H. Salamati. "Excimer laser treatment of TiO2/WO3 thin films for self-cleaning gasochromic applications: Preparation and characterization". En: *Solar Energy Materials and Solar Cells* 130 (2014), págs. 27-35. DOI: https://doi.org/10.1016/j.solmat.2014.06.029 (vid. pág. 62).
- Zhao, Xuewei y col. "Folic acid-conjugated carbon dots as green fluorescent probes based on cellular targeting imaging for recognizing cancer cells". En: *RSC Adv.* 7 (67 2017), págs. 42159-42167. DOI: 10.1039/C7RA07002K (vid. págs. 69, 70, 74, 77).
- Zwicke, Grant L., G. Ali Mansoori y Constance J. Jeffery. "Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics". En: *Nano Reviews* 3.1 (2012). PMID: 23240070, pág. 18496. DOI: 10.3402/nano.v3i0.18496. eprint: https://doi.org/10.3402/nano.v3i0.18496 (vid. pág. 25).

ANEXOS

Anexo A. Jupiter Notebook para el análisis de datos

Procesamiento de datos experimentales de Linda Bertel

David A. Miranda, PhD Linda E. Bertel, PhD(c) 2021

0. Cargar en servidor Colab

```
#@title
try:
    from google.colab import drive
    drive.mount('/content/drive')
    basepath = '/content/drive/MyDrive/3_LindaBertel_Docs/notebooks'
%cd $basepath
except:
    pass

Dhounted at /content/drive
/content/drive/.shortcut-targets-by-id/1wMJtUFHAAC0jddgoviPrXcDy0lCtszLX/3_LindaBertel_[]
```

▶ 1. Importar librerias

```
[ ] L, 1 celda oculta
```

2. Importar bitácora

```
bitacora_path = '../data/bitacora.xlsx'
bitacora = pd.read_excel(bitacora_path)
bitacora
```

	SW	Nombre del archivo	Directorio	Experimento	Número Exp	Fecha
0	False	Fe(CN)6 KCI_medicion 2.txt	/data/Mediciones Eléctricas/20201204/EAuChip	CV	NaN	2020 12-0 ²
1	False	Fe(CN)6 KCI.txt	/data/Mediciones Eléctricas/20201204/EAuChip	CV	NaN	2020 12-0 ²
2	False	Fe(CN)6 KCI_medicion 1.txt	/data/Mediciones Eléctricas/20201204/EAuChip	ECE	NaN	2020 12-0 ²
3	False	Fe(CN)6 KCl_medicion 1(1).txt	/data/Mediciones Eléctricas/20201204/EAuChip	ECE	NaN	2020 12-0 ²
4	False	Fe(CN)6 KCl_medicion 1(2).txt	/data/Mediciones Eléctricas/20201204/EAuChip	ECE	NaN	2020 12-0 ²
1043	True	M139+AF_PBS_phi- 0.369_BSA_30uM.txt	/data/Mediciones Eléctricas/20220606/Muestra	ECE	NaN	2022 06-0(
1044	True	M139+AF_PBS_phi- 0.369_BSA_30uM(2).txt	/data/Mediciones Eléctricas/20220606/Muestra	ECE	NaN	2022 06-0(
1045	True	M139+AF_PBS_phi- 0.369_Blanco(PBS).txt	/data/Mediciones Eléctricas/20220606/Muestra	ECE	NaN	2022 06-0(
		M120+AF DRS nhi	/data/Madicionas			აიაა

→ 3. Plot ECE spectra

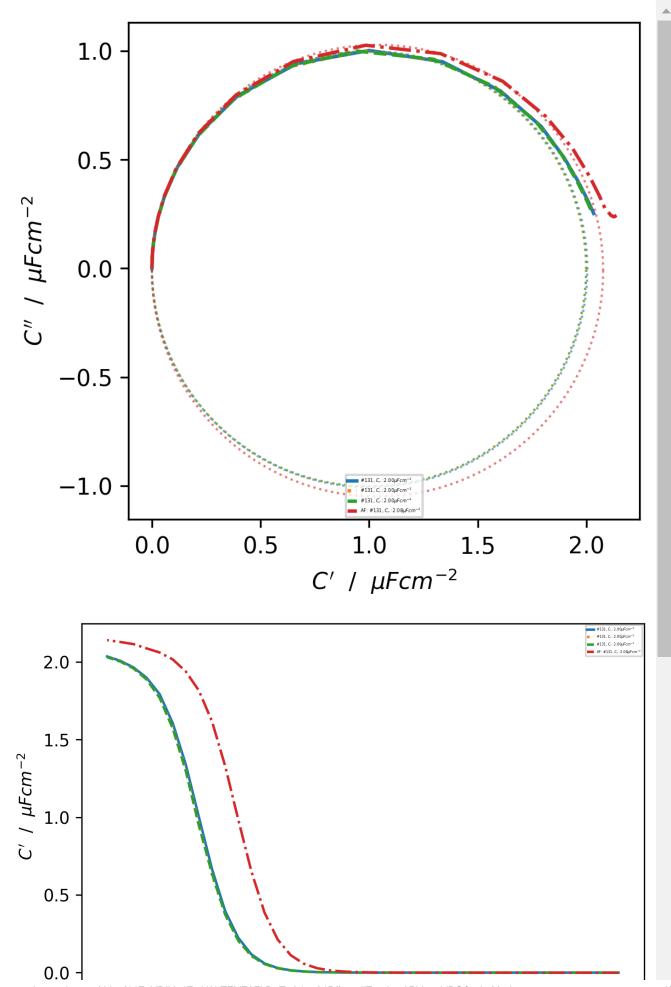
3.1. Métodos

1048 rows × 18 columns
path.append('../scripts/')
from nanoTiO2methods import *

▼ 3.2. Datos ECE y graficar

```
WE_to_plot = ['#131']
ece_data = bitacora.loc[bitacora['Experimento'] == 'ECE']
mask = ece_data['WE'].isin(WE_to_plot)
```

```
plot_ece(ece_data[mask],
    freq_range=[0.1, 1e6],
    f_circunference = [2, np.inf],
    circunference=True,
    legend_fontsize=2)
```



Haz doble clic (o pulsa Intro) para editar

▼ 3.3. Graficar ECE por fila de bitácora

```
indexes = [897, 898, 901, 904, 909, 912]
legends = ['Blanco', '0.1 nM', '1.3 nM', '4.5 nM', '13 nM', '26 nM']
frameon = True
ece data = bitacora.loc[bitacora['Experimento'] == 'ECE']
idxs = []
for k, i in enumerate(indexes):
   ref index = list(ece data.index)
   if i-2 in ref_index:
        idxs.append(i-2)
       row = ece_data.loc[[i-2]]
        print('%d: %s : %s' % (i, legends[k], row['Nombre del archivo'].values[0]))
plot ece(ece data.loc[idxs],
   freq_range =[1.8, 1e6],
   f circunference = [10, np.inf],
   circunference=True,
   legend fontsize=3)
for fig in plt.get_fignums():
   plt.figure(fig)
   if len(legends) > 0:
        lines = plt.gca().lines
        lines = lines if len(lines) == len(legends) else lines[0:len(lines):2]
        plt.legend(lines, legends, frameon=frameon)
```

897: Blanco: M128+AF_PBS_phi-0.449_Blanco(2).txt 898: 0.1 nM : M128+AF_PBS_phi-0.449_0.005RF.txt 901: 1.3 nM : M128+AF PBS phi-0.449 0.05RF.txt 904: 4.5 nM : M128+AF_PBS_phi-0.449_0.17RF.txt 909: 13 nM: M128+AF_PBS_phi-0.449_0.5RF(2).txt 912: 26 nM: M128+AF_PBS_phi-0.449_1.0RF(2).txt 0.4 0.2 Blanco $C'' / \mu F cm^{-2}$ 0.1 nM 0.0 1.3 nM 4.5 nM 13 nM -0.2 26 nM -0.4 0.2 0.0 0.4 0.6 0.8 C' / μ Fcm⁻² Blanco 8.0 0.1 nM 1.3 nM 4.5 nM 0.6 13 nM 26 nM 0.4



```
indexes = [1018, 1019, 1020, 1021, 1022, 1023]
ece_data = bitacora.loc[bitacora['Experimento'] == 'ECE']
idxs = []
for i in indexes:
    ref_index = list(ece_data.index)
    if i-2 in ref_index:
        idxs.append(i-2)
        row = ece_data.loc[[i-2]]
        print('%d: %s' % (i, row['Nombre del archivo'].values[0]))
plot_ece(ece_data.loc[idxs],
    freq_range =[1.8, 1e6],
    f_circunference = [10, np.inf],
    circunference=True,
    legend_fontsize=4
    )
```

1018: M141+AF_PBS_phi-0.187.txt 1019: M141+AF_PBS_phi-0.187(1).txt 1020: M141+AF PBS phi-0.187(2).txt 1021: M141+AF_PBS_phi-0.187_blanco(SFB).txt 1022: M141+AF_PBS_phi-0.187_blanco(SFB)(1).txt 1023: M141+AF_PBS_phi-0.187_blanco(SFB)(2).txt 0.75 0.50 0.25 0.00 -0.25-0.50AF: #141, C_r : 1.59 μ Fcm⁻² AF: #141, C_r : 1.60 μ Fcm⁻² -0.75AF: #141, C_r : 1.60 μ Fcm⁻² AF: #141, C_r : 1.67 μ Fcm⁻² AF: #141, C_r : 1.67 μ Fcm⁻² AF: #141, C_r : 1.67 μ Fcm⁻² 0.5 0.0 1.5 C' / $\mu F cm^{-2}$ 1.6 AF: #141, C_r: 1.59μFcm⁻ AF: #141, C_r: 1.60μFcm⁻² AF: #141, C_r : 1.60 μ Fcm⁻² AF: #141, C_r: 1.67μFcm⁻² 1.4 AF: #141, C_r: 1.67μFcm⁻² AF: #141, C_r : 1.67 μ Fcm⁻² 1.2 1.0 8.0 0.6

▼ 3.4. Los dos últimos ECE

rows = ece_data.iloc[-2:]

Anexo B. Publicaciones

En las figuras 33, 34 y 35 se muestran los artículos publicados acerca de la investigación realizada durante esta tesis doctoral.

Received: 16 July 2020 Revised: 10 February 2021 Accepted: 12 February 2021

DOI: 10.1002/sia.6942

RESEARCH ARTICLE



Synthesis of CdM (M = Se, O) micro and nanoparticles by pulsed laser ablation in water

Linda Bertel^{1,2} | Rogelio Ospina^{1,2} | Andres C. García-Castro^{1,2} | Jorge H. Quintero-Orozco^{1,2} | David A. Miranda^{1,2}

¹Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

²Centro de Investigación Científica y Técnológica en Materiales y Nanociencias (CMN), Ciencia de Materiales Biológicos y Semiconductores Research Group (CIMBIOS), Piedecuesta, Colombia

Correspondence

Jorge Heman Quintero, Universidad Industrial de Santander, km 2 vía Refugio, Piedecuesta, Colombia. Email: ihquinte@uis.edu.co

Funding information

Universidad Industrial de Santander, Grant/ Award Number: 2321

The pulsed laser is highly used in optics and material sciences, where the high energy of the laser pulse produces an ablation effect that is applied to the obtention of nanoparticles by impacting a target material. We present a complete methodology that includes the preparation of a CdSe target and the synthesis of CdM (M = Se, O) micro and nanoparticles in water by pulsed laser ablation from the previously prepared CdSe target. The laser energy lets to control the properties of particles; we obtain four CdM micro and nanoparticles samples with four different laser energies, that is, 10.25, 20.72, 30.38, and 39.72 mJ. The best result was achieved with 30.38 mJ; at this energy, we obtain nanoparticles with Z-average size below 100 nm, confirmed by analysis of dynamic light scattering (DLS). In the scanning electron microscopy (SEM) images of the particles obtained at 30.38 mJ, we observed polydispersity in the sample, in addition to irregularly shaped nanoparticles and particle agglomerations. The analysis of the characterization by UV-Vis, energy dispersive spectroscopy (EDS), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) suggests the presence of micro and nanoparticles of CdSe and CdO in the sample.

KEYWORDS

CdO nanoparticles, CdSe nanoparticles, DLS, EDS, elemental analysis, laser ablation, laser energy, sintering

Figura 33. Bertel, L, Ospina, R, García-Castro, AC, Quintero-Orozco, JH, Miranda, DA. Synthesis of CdM (M = Se, O) micro and nanoparticles by pulsed laser ablation in water. Surf Interface Anal. 2021; 53: 550–558. https://doi.org/10.1002/sia.6942





Review

Nanostructured Titanium Dioxide Surfaces for Electrochemical Biosensing

Linda Bertel 1, David A. Miranda 1 and José Miguel García-Martín 2,*

- 1 CMN-CIMBIOS Group, Escuela de Física, Universidad Industrial de Santander, Cra 27 Cll 9, Bucaramanga 680002, Colombia; linda.bertel@correo.uis.edu.co (L.B.); dalemir@uis.edu.co (D.A.M.)
- Instituto de Micro y Nanotecnología, IMN-CNM, CSIC (CEI UAM+CSIC), Isaac Newton 8, Tres Cantos, E-28760 Madrid, Spain
- * Correspondence: josemiguel.garcia.martin@csic.es

Abstract: TiO₂ electrochemical biosensors represent an option for biomolecules recognition associated with diseases, food or environmental contaminants, drug interactions and related topics. The relevance of TiO₂ biosensors is due to the high selectivity and sensitivity that can be achieved. The development of electrochemical biosensors based on nanostructured TiO₂ surfaces requires knowing the signal extracted from them and its relationship with the properties of the transducer, such as the crystalline phase, the roughness and the morphology of the TiO₂ nanostructures. Using relevant literature published in the last decade, an overview of TiO₂ based biosensors is here provided. First, the principal fabrication methods of nanostructured TiO₂ surfaces are presented and their properties are briefly described. Secondly, the different detection techniques and representative examples of their applications are provided. Finally, the functionalization strategies with biomolecules are discussed. This work could contribute as a reference for the design of electrochemical biosensors based on nanostructured TiO₂ surfaces, considering the detection technique and the experimental electrochemical conditions needed for a specific analyte.

Citation: Bertel, L.; Miranda, D.A.; García-Martín, J.M. Nanostructured Titanium Dioxide Surfaces for Electrochemical Biosensing. Sensors 2021, 21, 6167. https://doi.org/10.3390/s21186167

Keywords: electrochemical biosensors; nanostructured surfaces; titanium dioxide functionalization with biomolecules

Figura 34. Bertel L, Miranda DA, García-Martín JM. Nanostructured Titanium Dioxide Surfaces for Electrochemical Biosensing. Sensors. 2021; 21(18):6167. https://doi.org/10.3390/s21186167



Experimental analysis of folic acid adsorption on TiO₂ thin-films

Cite as: J. Vac. Sci. Technol. A 40, 033411 (2022); doi: 10.1116/6.0001762
Submitted: 19 January 2022 · Accepted: 12 April 2022 ·
Published Online: 27 April 2022

Linda Bertel, ¹ ® Rogelio Ospina, ¹ ® José Miguel García-Martín, ² ® and David A. Miranda ^{1,a)} ®

AFFILIATIONS

¹Universidad Industrial de Santander, Cra 27 CII 9, Bucaramanga 680002, Colombia ²Instituto de Micro y Nanotecnología, IMN-CNM, CSIC (CEI UAM+CSIC), Isaac Newton 8, Tres Cantos, Madrid E-28760, Spain

Note: This paper is a part of the Special Topic Collection: Celebrating the Early Career Professionals Contributing to the Advancement of Thin Films, Surfaces, Interfaces, and Plasmas.

a Author to whom correspondence should be addressed: dalemir@uisedu.co

ABSTRACT

TiO₂ thin-films functionalized with specific biomolecules have been used in the fabrication of highly sensitive and selective electrochemical biosensors focused on detecting a variety of diseases. Among the biosensors of scientific and technological interest are those obtained from the functionalization of nanomaterials with folic acid to recognize folate receptors; their importance lies in the fact that these receptors are overexpressed in most abnormal cells, and their identification can allow the detection of tumor cells and the photothermal treatment of cancer. This work presents a methodology for fabricating TiO₂ thin-films and functionalizing them with folic acid. X-ray photoelectron spectroscopy, atomic force microscopy, Raman spectroscopy, and contact angle measurements were used to examine the adsorption of folic acid on TiO₂ thin-film surfaces grown by pulsed laser deposition. XPS and Raman analysis indicated that the interaction of folic acid with the TiO₂ surface occurred either through the pteridine ring or through the carboxylic groups of the glutamic acid portion.

Published under an exclusive license by the AVS. https://doi.org/10.1116/6.0001762

Figura 35. Bertel L, Ospina R, García-Martín JM, Miranda DA. Experimental analysis of folic acid adsorption on TiO2 thin-films. Journal of Vacuum Science Technology A. 2022; 40(3): 033411. https://doi.org/10.1116/6.0001762

En las figuras 36, 37, 38 y 39 se muestran las ponencias presentadas en eventos internacionales, acerca de la investigación realizada durante esta tesis doctoral.



Figura 36. Bertel L, Ospina R, Quintero JH, Miranda DA. Characterization of CdSe nanoparticles prepared by Pulsed Laser Ablation. 6° Congreso Nacional de Ingeniería Física- VI CNIF y El 1st International Applied Physics, Engineering and Innovation. Ponencia oral. Bucaramanga, Colombia. 2018.



Figura 37. Bertel L, García-Martín JM, Ospina R, Miranda DA. Deposición por Láser Pulsado de películas delgadas de TiO_2 y su funcionalización con ácido fólico. 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ2020, el XVIII COLACRO, el X COCOCRO, el SPAE y el IV C2B2. Modalidad Virtual. Cartagena, Colombia. 2021.



Barcelona, 13 December 2021

Poster Presentation Certificate - Coatings 2021

To whom it may concern,

We would like to confirm that Linda E. Bertel participated in the "3rd Coatings and Interfaces Conference", held online on 24-26 November 2021.

We also confirm that Linda E. Bertel presented the following poster to the conference:

- Title: Pulsed Laser Deposition of TiO2 thin film and their functionalization with folic acid
- Authors: Linda E. Bertel*, David A. Miranda, Rogelio Ospina, Jose Miguel García-Martín

The conference poster was peer-reviewed by the field experts of the Scientific Committee.

Details on the conference for Coatings 2021 can be found online at: cic2021.sciforum.net

Best regards,

Elena González Gobartt Conference Organizer MDPI AG, Barcelona Office Avenida Madrid, 95, 1° - 3 08028 Barcelona Spain

This letter is written on behalf of the Coatings 2021 Organizing Committee: cic@mdpi.com

Figura 38. Bertel L, Miranda DA, Ospina R, García-Martín JM. Pulsed Laser Deposition of TiO_2 thin film and their functionalization with folic acid. 3rd Coating and interfaces Confere (CIC2021). Modalidad Virtual. Barcelona, Spain. 2021.



CERTIFICATION

The chairman of the Innovative Technologies for Medical Applications (1st ITMA) certifies that research work titled:

DEVELOPMENT OF A BIOSENSOR FOR THE RECOGNITION OF FOLATE RECEPTORS

Corresponding to the authors: LINDA BERTEL GARAY, ROGELIO OSPINA, JOSÉ MIGUEL GARCÍA MARTÍN, DAVID ALEJANDRO MIRANDA, was presented at the 1st ITMA workshop, held as an onsite presentation.

For its constancy, is signed in Bucaramanga, Colombia, on December 2, 2022.

Said Pertuz Chairman 1st ITMA E-mail: cps.info@uis.edu.co

https://foristom.org/itma/papers/certificadoPresentacion.jsp?id=16

Figura 39. Bertel L, Miranda DA, Ospina R, García-Martín JM. "DEVELOPMENT OF A BIOSENSOR FOR THE RECOGNITION OF FOLATE RECEPTORS". 1st Innovative Technologies for Medical Applications (1st ITMA). Bucaramanga, Colombia. 2022.