



BIOSENSORES MECÁNICOS EN EL ÁREA BIOLÓGICA Y ALIMENTARIA: UNA REVISIÓN

MECHANICAL BIOSENSORS IN BIOLOGICAL AND FOOD AREA: A REVIEW

A.G. Mendoza-Madrigal¹, J.J. Chanona-Pérez^{1*}, H. Hernández-Sánchez¹, E. Palacios-González², G. Calderón-Domínguez¹, J. V. Méndez-Méndez³, J. Blasco⁴ y L.A. Villa-Vargas⁵

¹*Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Plan de Ayala y Carpio s/n, Col. Santo Tomás, C.P. 11340, México, D.F.*

²*Laboratorio de Microscopía de Ultra Alta Resolución, Instituto Mexicano del Petróleo, Eje Central Lázaro Cárdenas 152, Col. San Bartolo Atepehuacan, C.P. 07730, México.*

³*Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías, Instituto Politécnico Nacional, Luis Enrique Erro s/n, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Col. Zacatenco, C.P. 07738, México, D.F.*

⁴*Centro de Agroingeniería. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, (IVIA). Cra. Moncada - Náquera km 5, 46113 Moncada, España.*

⁵*Centro de Investigación en Computación, Instituto Politécnico Nacional. Av. Juan de Dios Bátiz, Esq. Miguel Othón de Mendizábal, Col. Nueva Industrial Vallejo Delegación Gustavo A. Madero, C.P. 07738, México D.F.*

Recibido 20 de enero de 2013; Aceptado 13 de mayo de 2013

Resumen

Este trabajo presenta una revisión del estado del arte acerca de la estructura, funcionamiento y clasificación de biosensores aplicados al área biológica y alimentaria. Esta revisión se enfoca hacia biosensores mecánicos que usan mili, micro y nanocantilevers (vigas en voladizo), exponiendo los conceptos básicos de microscopía de fuerza atómica y sistemas ópticos usados como plataforma para la evaluación estos sensores. Se describen además las estrategias de funcionalización y las configuraciones geométricas más usadas, así como los métodos matemáticos para evaluar el desempeño de biosensores mecánicos en modo estático y dinámico, proporcionando ejemplos de aplicación. Se propone una descripción global del efecto de las variables de operación y diseño sobre la sensibilidad de los dispositivos. Se exponen brevemente los procesos de diseño y fabricación de cantilevers basados en la tecnología de silicio, así como información acerca de los BioMEMS y BioNEMS. Finalmente, se describen las tendencias globales de investigación, desarrollo y comercialización de biosensores, así como las posibles áreas de desarrollo para biosensores en alimentos. De esta forma, esta revisión proporciona un panorama global de los biosensores, que pretende servir como guía introductoria para ubicar los aspectos más importantes de esta tecnología.

Palabras clave: biosensores, cantilever, microscopía de fuerza atómica, alimentos.

Abstract

A review of state the art about the structure, classification and operation of biosensors applied in food and biological areas is presented. This review is focused to mechanical biosensors that use mili, micro and nanocantilevers. Basic concepts of atomic force microscopy and optical systems, used as testing platform of biosensors are described. The most functionalized strategies and geometrical configurations are also explained. Mathematical methods for evaluating the performance in static and dynamic mode of the mechanical biosensors are reviewed and examples of application in biological and food areas are provided. An overall description of the operational effect of operation conditions and design variables on the sensitivity devices is also proposed. A brief description of the design processes and manufacturing of cantilevers based silicon technology as well as information about BioMEMS and BioNEMS are provided. Finally, overall trends in research, development and commercialization of biosensors are described briefly as well as probable areas of development in food biosensors. Thereby, this review provides an overall view of biosensors, as an exploratory guide to identify the most important aspects of this technology.

Keywords: biosensors, cantilever, atomic force microscopy, foods.

*Autor para la correspondencia. E-mail: E-mail: jorge.chanona@hotmail.com
Tel.57-29-60-00 ext. 62552, Fax 62463

1 Introducción

La detección de contaminantes en alimentos, como microorganismos patógenos, compuestos químicos o toxinas, es crucial para evitar riesgos ambientales y de la salud. Actualmente, existen métodos tradicionales para evaluar la presencia o crecimiento de microorganismos, tales como cultivos celulares, cuenta en placa, técnicas inmunológicas, pruebas bioquímicas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o cromatografía de gases y líquidos acoplada a espectrometría de masas, que dependen de las técnicas de conteo y aislamiento de células viables. La detección de microorganismos incluye los siguientes pasos: enriquecimiento selectivo, recubrimiento selectivo, cribado bioquímico y confirmación serológica. Uno de los principales inconvenientes es que frecuentemente se requiere una serie completa de pruebas antes de que cualquier identificación sea confirmada, lo que requiere varios días para dar resultados confiables, ya que su detección se basa en poder cuantificar las colonias visibles. Por otra parte, la preparación del medio de cultivo, la inoculación de las placas y el conteo de colonias hace que estos métodos sean costosos en tiempo y recursos. La PCR, cuenta en placa o los métodos inmunológicos, son algunas herramientas comunes que se utilizan para la detección de patógenos, pero que implican el análisis de ADN, el recuento de bacterias y la detección de las interacciones antígeno-anticuerpo, respectivamente (Lazcka y col., 2007), aunque algunas veces estos métodos se combinan para proporcionar resultados más robustos. Las técnicas microbiológicas tradicionales para la detección de patógenos pueden requerir hasta siete días para identificar la especie, pero están limitados por el tiempo de ensayo debido al enriquecimiento inicial necesario para detectar bajas concentraciones de patógenos. Además la mayoría de las técnicas son costosas, requieren personal capacitado, alta tecnología y no permiten la monitorización frecuente de los contaminantes muestras sin purificación o preparación previa (Velusamy y col., 2010).

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos de detección que sean sensibles, sencillos, rápidos, rentables y portables para optimizar y validar métodos para la detección de los patógenos transmitidos por alimentos, sin necesidad de tratamientos previos o de personal de laboratorio especializado para preparación de muestras y la interpretación de resultados. Los biosensores tienen estas características y son ideales para el monitoreo ambiental y de alimentos con el potencial de acortar el intervalo de tiempo entre la captación de muestras y resultados. Sin embargo, se espera que los nuevos biosensores también puedan alcanzar selectividades y sensibilidades comparables a los métodos establecidos o de referencia, aunque estos ya se han igualado o superado en los biosensores actualmente desarrollados. Además de la detección de microorganismos, los biosensores tienen amplias aplicaciones en el monitoreo ambiental de gases, partículas contaminantes, aromas, toxinas, virus, enfermedades inmunológicas, procesos enzimáticos, bioconversiones, medición de otros analitos

como glucosa y otros mono y polisacáridos de importancia en los bioprocesos, así una plétora de aplicaciones en el área de los alimentos, biológica y médica se han llevado a cabo recientemente con el desarrollo de biosensores micro y nanométricos (Van Dorst y col., 2010). Por lo que este desarrollo ha sido vertiginoso en los últimos años, debido su alto valor de mercado y su amplio espectro de aplicación.

2 Biosensores

2.1 Definición

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define un biosensor como un dispositivo que, a través de las reacciones específicas de enzimas aisladas, sistemas inmunes, tejidos, organelos, o células enteras, sirve para detectar compuestos (McNaught y Wilkinson, 1997). Sin embargo, los biosensores se han definido recientemente como dispositivos analíticos que incorporan un material biológico y/o biomoléculas (tejidos, microorganismos, organelos celulares, enzimas, anticuerpos, antígenos, ácidos nucleicos, proteínas, aptámeros, compuestos biomiméticos, catalizadores sintéticos, biomoléculas conjugadas y polímeros impresos, entre otros) y que están asociados e integrados en un transductor fisicoquímico o microsistema de transducción que puede ser óptico, electroquímico o mecánico (Lazcka y col., 2007).

Un biosensor contiene un bioreceptor que reconoce un analito y convierte su respuesta biológica correspondiente en señales eléctricas, ópticas o mecánicas equivalentes por medio de un transductor. Los biosensores se han utilizado principalmente en tres áreas: biomédica, ambiental y alimentaria (Su y col., 2011; Vo-Dinh y col., 2001). La Fig. 1a muestra un diagrama de un biosensor donde el bioreceptor reconoce el analito y por medio del transductor convierte las respuestas en señales eléctricas medibles, posteriormente la señal amplificada y decodificada en el procesador de señal se puede almacenar, mostrar y analizar. Así, un biosensor consiste en un transductor físico y químico de una capa selectiva (Fig. 1b), que produce señales eléctricas medibles en respuesta a estímulos químicos (Lavrik y col., 2004). Algunos de los elementos utilizados para el reconocimiento biológico en la fabricación de biosensores son cofactores, enzimas, anticuerpos, microorganismos, organelos, tejidos o células (Mandal y col. 2011, Johnson y Mutharasan 2012).

2.2 Clasificación

Los biosensores se pueden clasificar de acuerdo al tipo en bioreceptores y transductores (Fig. 2), adicionalmente los biosensores puede emplear métodos de detección con marcaje y sin marcaje de acuerdo al diseño específico del biosensor, mayores detalles son descritos en la sección 2.2.3. (Kim y col., 2009, Velusamy y col., 2010, Waggoner y Craighead, 2007).

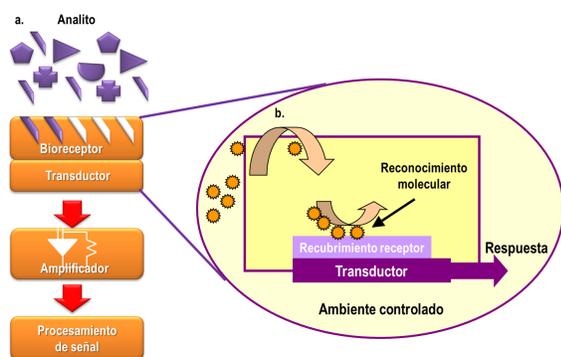


Fig. 1. a) Elementos estructurales de un biosensor, b) principio de funcionamiento del proceso de biodetección (Adaptada de Datskos y col. 2005).

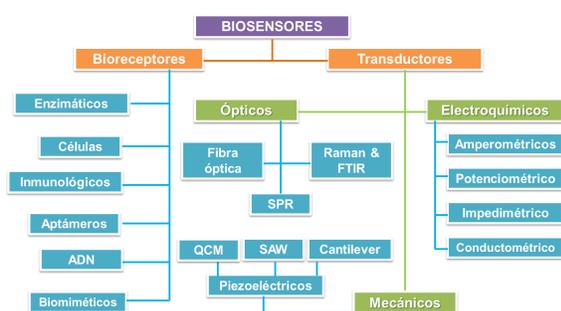


Fig. 2. Clasificación general de los tipos de biosensores, donde los bioreceptores se dividen en seis categorías, los transductores en 3 categorías (electroquímicos, mecánicos y ópticos) que a su vez se subdividen en otras subcategorías (Adaptada de Velusamy y col. 2010).

2.2.1. Bioreceptores

Los biosensores también se clasifican por el tipo de bioreceptor, que es la clave para su especificidad. Un bioreceptor es un elemento que utiliza un mecanismo químico o bioquímico para el reconocimiento y es el responsable de la unión del analito de interés. Los bioreceptores pueden clasificarse en seis categorías básicas: enzimáticos, células, aptámeros, compuestos inmunológicos, ADN y compuestos biomiméticos (Velusamy y col., 2010).

Las enzimas fueron los primeros elementos de reconocimiento de los biosensores (Clark y Lyons 1962). Estos miden la inhibición o la catálisis por medio de un analito específico y se usa para la detección de contaminantes en alimentos y en el ambiente (Li y col., 2009a, Van Dorst y col., 2010). Otros elementos de reconocimiento son bacterias, hongos, levaduras y células procariontas. A pesar de que los metabolitos de los microorganismos no son específicos, los biosensores microbianos pueden ser selectivos mediante el bloqueo

de interacciones no deseadas o por inducción de la ruta metabólica deseada, y mediante la adaptación de los microorganismos a un sustrato específico a través de condiciones de cultivo selectivas. Las células proporcionan sensibilidad a una amplia gama de estímulos bioquímicos, ya que contienen rutas bioquímicas específicas; asimismo las células sirven para ensayos funcionales para agentes bioquímicos, por ejemplo antibióticos. En la literatura se puede encontrar una gran variedad de ejemplos relacionados con el desarrollo de biosensores (Close y col., 2002; Gfeller y col., 2005; Nugaeva y col., 2005; Su y col., 2011).

Los anticuerpos también se encuentran entre los elementos de reconocimiento más usados debido a su alta sensibilidad y selectividad. Pueden emplearse anticuerpos policlonales, monoclonales o recombinantes, en función de sus propiedades selectivas y de síntesis. Generalmente se inmovilizan sobre un sustrato que puede ser la superficie del detector (Oh y col., 2005), localizador (Radke y Alcolija, 2005) o portador (Ivnitski y col., 2000). El antígeno par del anticuerpo se ajusta de manera específica, debido a que las estructuras tridimensionales de las moléculas del antígeno y el anticuerpo son muy afines en su estructura molecular (Byrne y col., 2009, Velusamy y col., 2010). En el caso de los sensores inmunológicos se ha preferido el uso de anticuerpos monoclonales frente a los policlonales debido su alta especificidad, variedad de anticuerpos disponibles y al progreso de las técnicas de hibridación que han reducido su costo y aumentado su disponibilidad (Velusamy y col., 2010).

Por otro lado, los aptámeros son moléculas funcionales derivadas de los ácidos nucleicos seleccionados *in vitro* que recientemente han atraído el interés para el desarrollo de biosensores. El término aptámero es derivado del latín “*aptus*” que significa “*adaptarse*”; los aptámeros también se denominan “*anticuerpos químicos*” debido a su proceso de obtención artificial *in vitro* que está basado en la metodología SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment* por sus siglas en inglés). Así, los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos de ARN y/o ADN que pueden unirse firme y específicamente a diversas moléculas blanco o diana. Los aptámeros tienen mayores ventajas como elementos de reconocimiento de los biosensor en comparación con los anticuerpos tradicionales, ya que son de tamaño pequeño, químicamente estables y de menor costo. Recientemente, la combinación de aptámeros con nuevos nanomateriales como nanotubos y nanoalambres mejora significativamente el desempeño y sensibilidad de los sensores basados en este tipo de bioreceptores. De manera particular, estos biosensores tienen mayores ventajas que los que utilizan receptores naturales tales como anticuerpos y enzimas, por ejemplo los aptámeros con alta especificidad y afinidad, puede seleccionar *in vitro* cualquier tipo de molécula blanco, que van desde moléculas pequeñas como péptidos, aminoácidos, medicamentos, iones metálicos hasta proteínas de gran tamaño e incluso células enteras o completas, lo que

permite su uso para detectar microorganismos patógenos en tiempo real y desarrollar una amplia gama de biosensores. Asimismo, pueden ser sintetizados con una alta reproducibilidad y pureza a partir de fuentes comerciales, por lo que su costo es menor en comparación con los anticuerpos tradicionalmente usados. También, en contraste con los anticuerpos basados en proteínas o enzimas, los aptámeros de ADN suelen ser muy estables químicamente. Finalmente, los aptámeros a menudo pueden tener cambios conformacionales significativos los que les permite adaptarse al destino de enlace o molécula blanco. Adicionalmente, los aptámeros pueden ser utilizados con diferentes tipos de transductores (ópticos, electroquímicos, mecánicos o basados en cambios de masa). Estas ventajas ofrecen una gran flexibilidad para el diseño de nuevos biosensores con alta sensibilidad de detección y selectividad. Por ello, actualmente los biosensores basados en aptámeros tienen amplias aplicaciones en el diagnóstico biomédico, control del medio ambiente, bioseguridad e inocuidad alimentaria (Song y col. 2008; Van Dorst y col. 2010).

Por otro lado, los fagos y los ácidos nucleicos son los elementos de reconocimiento más recientes y cada vez más importantes en el área de biosensores debido a su alta afinidad y especificidad para reconocer analitos con rapidez, rentabilidad, estabilidad y facilidad de modificación (Van Dorst y col., 2010). Debido a su amplia gama de actividades fisicoquímicas y biológicas, los biosensores basados en ácidos nucleicos se han usado para la detección de patógenos de alimentos como *E. coli* O157: H7 (Chen y col., 2008) y *Salmonella* spp. (Lermo y col., 2007). Los microarreglos de hibridación basados en ADN se han sugerido como una plataforma para la detección en tiempos cortos de varios microorganismos patógenos.

También los bacteriófagos se han empleado como elementos de reconocimiento para la identificación de microorganismos patógenos. Los bacteriófagos son virus que se unen a receptores específicos en la superficie bacteriana con el fin de inyectar su material genético que reconocen a los receptores bacterianos a través de las proteínas situadas en sus extremos. Debido a que el reconocimiento es muy específico se utilizan comúnmente para la tipificación de bacterias y han abierto un camino para tecnologías de detección de patógenos. Por ejemplo, se ha reportado la aplicación de bacteriófagos como elemento de reconocimiento para la detección de patógenos como la *E. coli* (Singh y col., 2009).

Los receptores biomiméticos son fabricados y diseñados para imitar la estructura conformacional de anticuerpos, enzimas, células o de ácidos nucleicos. Existen varios métodos de fabricación tales como el uso de ingeniería genética para la fabricación de biomoléculas, fabricación de membranas artificiales y la técnica de impresión molecular, que se ha convertido en uno de los métodos más atractivos y aceptados para el desarrollo de agentes de reconocimiento artificial. La impresión molecular es una técnica de producción de sitios artificiales de reconocimiento que

se basa en la formación de una estructura polimérica alrededor de una molécula que pueden ser utilizado como plantilla. Para ello se pueden utilizar polímeros de impresión molecular que en principio, pueden imitar la estructura de cualquier molécula analito o blanco con afinidad y especificidad similar a los elementos de reconocimiento biológicos. Sin embargo, el uso de polímeros de impresión molecular tiene ciertas desventajas como la eliminación por completo la plantilla ya que algunas veces el polímero impreso es insoluble, y aunque el molde contiene muchas cavidades impresas, sólo algunas pueden ser realmente útiles y que tengan una coincidencia adecuada con las moléculas blanco (Van Dorst y col. 2010; Velusamy y col. 2010).

Los sensores basados en polímeros biomiméticos son una plataforma adicional para la detección visual y espectroscópica de bacterias de importancia biológica y alimentaria, ya que se pueden usar polímeros cromáticos como el polidiacetileno funcionalizado con nanopartículas y fosfolípidos, en esta estrategia el polímero sufre cambios de coloración (de azul a rojo) y presenta una intensa emisión de fluorescencia durante el crecimiento de bacterias como *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus* y *E. coli*, las cuales secretan compuestos activos desde sus membranas y estos pueden ser detectados a simple vista por el cambio de coloración del polímero biomimético. Se ha propuesto que este tipo de sensor puede ser usado para la evaluación de frescura en alimentos y para el uso de polímeros conjugados biocrómicos, los cuales son diseñados para tener propiedades ópticas deseables para la biodetección, para ello se incorporaran al polímero componentes de la membrana de células biológicamente activos, este tipo de materiales imitan la membrana celular y permiten detectar la presencia de microorganismos patógenos mediante técnicas colorimétricas, también se ha usado para la detección de toxinas bacterianas y el virus de la gripe. Aunque en los últimos años se ha reportado varios trabajos relacionados a biosensores basados en compuesto biomiméticos, estos se ha enfocado para la detección directa de microorganismos patógenos y sólo muy pocos han sido aplicados directamente al control microbiológico de muestras alimentarias (Velusamy y col. 2010).

2.2.2. Transductores

Los biosensores se pueden clasificar por su método de transducción (Fig. 2). Los principales modos de transducción son electroquímicos, ópticos, y mecánicos (Lavrik y col., 2004, Velusamy y col., 2010). Las técnicas electroquímicas se pueden dividir en amperométricas (Akyilmaz y col., 2007), potenciométricas (Ercole y col., 2003), conductimétricas (Muhammad-Tahir y Alocija, 2003) e impedimétricas (Muñoz-Berbel y col., 2008); que son las que se utilizan en los biosensores para la detección de microorganismos. Aunque las técnicas electroquímicas tiene ventajas como bajo costo, capacidad de trabajar con muestras turbias y fácil miniaturización, su sensibilidad y selectividad son limitadas con respecto a la detección óptica

(Velusamy y col., 2010).

Por otra parte, la detección basada en transductores ópticos consiste en la medición del cambio en las propiedades ópticas después de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento. Estas propiedades se basan en la absorción, reflexión, refracción, dispersión, difusión, Raman, SERS (por sus siglas en inglés *Surface Enhanced Raman Scattering*), quimioluminiscencia, fluorescencia y fosforescencia (Kim y col., 2007). La selección de las técnicas ópticas depende de las características del analito, la sensibilidad deseada y la aplicación del biosensor. Entre las técnicas ópticas más empleadas se encuentra la resonancia de plasmón superficial (SPR ó *Surface Plasmon Resonance* por sus siglas en inglés) (Willems y Van Duyne 2007) y la fluorescencia (Ko y Grant 2006), por medio de SPR se ha medido la afinidad de biomoléculas empleando ADN como receptor, la hibridación de ADN, interacciones con moléculas pequeñas de ADN, inmunoensayos cuantitativos, interacciones proteína-fármaco, interacciones proteína-ligando y/o las interacciones anticuerpo-antígeno, entre otras (Englebienne y col., 2003, Nguyen y col., 2007).

Los sensores mecánicos son adecuados para detecciones muy sensibles, en el que la transducción se basa en cambios en la masa y/o deflexión. El medio principal del análisis de cambios en la masa es mediante materiales piezoeléctricos, que pueden hacerse vibrar a una frecuencia específica por medio de señal eléctrica. Cuando la superficie del material piezoeléctrico se recubre con un anticuerpo y se coloca en una solución que contiene patógenos, su unión da como resultado un aumento en la masa del sistema lo que provoca un desplazamiento de la frecuencia de resonancia. Este tipo de detección es fácil de usar, rentable, ofrece una detección libre de marcaje y proporciona un análisis con una mayor sensibilidad y especificidad en comparación con otros métodos. Los dos tipos principales de sensores de masa son la microbalanza de cristal de cuarzo (*quartz crystal microbalance* ó QCM por sus siglas en inglés) y la onda acústica de superficie (Länge y col., 2008). Entre los microorganismos patógenos comunes en los alimentos que se pueden detectar con esta técnica se encuentran *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* (Vaughan y col., 2001). Finalmente, los sensores basados en cantilevers (*vigas en voladizo*) son dispositivos piezoeléctricos que comprende una clase de sensores acústicos muy sensibles, libres de marcaje, que son capaces de realizar la medición cuantitativa en interacciones biomoleculares, siendo una plataforma adaptable para diversas aplicaciones en biosensores (Johnson y Mutharasan, 2012).

2.2.3. Detección basada en el tipo marcaje

Las biomoléculas, como proteínas y ácidos nucleicos, no pueden ser reconocidas directamente debido a su tamaño. Para el seguimiento y evaluación de su actividad, se pueden marcar sondas mediante la conjugación con un agente detectable, comúnmente un fluoróforo o enzimas que tienen

propiedades de radiactividad, cromogenicidad, fluorescencia o magnetismo (Kim y col., 2009). Algunas de ellas consisten en etiquetas fluorescentes (Liu y col., 2007), nanopartículas de oro (Huo y Worden 2007), nanopartículas magnéticas (Hsing y col., 2007) o puntos cuánticos (Jamieson y col., 2007).

Por otra parte, el método de detección sin marcaje tiene como finalidad evitar posibles alteraciones estructurales y funcionales de las moléculas analito, y al mismo tiempo proporcionar sensibilidad y selectividad. Algunas técnicas conocidas son resonancia de plasmón superficial (Jeong y col., 2012), microbalanza de cristal de cuarzo (Marx 2003), *cantilevers* (Sungkanak y col., 2010), nanoalambres (Zhang y col., 2008), nanotubos (Fan y col., 2005) y nanoporos (Stefureac y col., 2008).

3 Biosensores mecánicos

3.1 Cantilevers

Los sensores basados en *cantilevers* han tenido un desarrollo y aplicación importantes en los últimos años. La gran relación de área superficial con respecto al volumen hace que estos sensores sean extremadamente sensibles a la superficie de detección (Dufour y col., 2010). Los *cantilevers* se pueden utilizar como sensores mili, micro y nanomecánicos para la detección de moléculas, a través de interacciones electrostáticas o intermoleculares. Entre la superficie activa del *cantilever* y el medio donde se realizará la detección se puede registrar tensión, calor y masa, debido a interacciones físicas y químicas. En general, uno de los elementos de unión se coloca sobre un *cantilever* mientras que el resto de elementos están presentes en el medio ambiente (Lang y col., 2002). La caracterización de las fuerzas y la dinámica de las interacciones moleculares en este tipo de sensores ofrece una oportunidad para el desarrollo de dispositivos de alta sensibilidad, miniaturizados y libres de marcaje (Kim y col., 2009).

3.2 Modos de detección en biosensores basados en cantilevers

La microscopía fotónica (MF), microscopía electrónica de barrido y de transmisión (MEB y MET) y microscopía de fuerza atómica (MFA), se utilizan en los procesos de funcionalización y verificación de deposición física y química de las capas orgánicas o sustancias activas sobre los dispositivos, así como para obtener las señales para evaluar los cambios de masa o de deflexión en los sensores. Tradicionalmente, la MFA se ha utilizado para obtener imágenes topográficas de una superficie mediante un *cantilever* de punta fina que escanea línea por línea superficies en los ejes *xyz*; el escaneo se realiza con un piezoeléctrico como sistema actuador. Así, se puede obtener una imagen topográfica como un patrón rectangular o cuadrado de líneas paralelas de barrido (Fig. 3a).

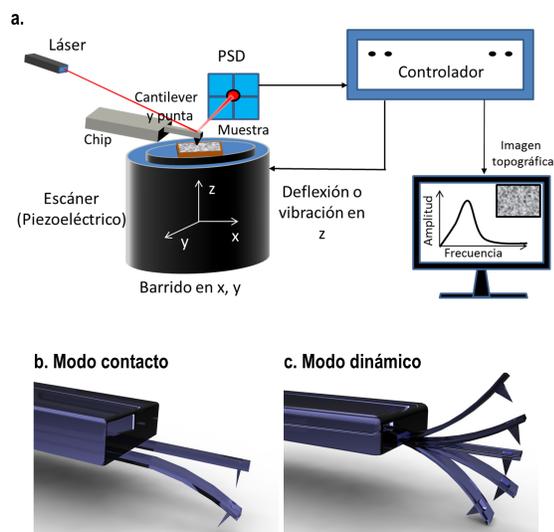


Fig. 3. a) Diagrama del principio de operación de un microscopio de fuerza atómica (MFA), el láser es reflejado desde la punta del *microcantilever* al fotodetector (PSD, por sus siglas en inglés *position sensitive photodetector*) que sigue los movimientos de la punta en los tres ejes cuando esta escanea la superficie de la muestra. El sistema escáner-controlador-computadora permite dirigir el barrido y obtener la imagen topográfica o la curva de frecuencia-amplitud. b) *Microcantilever* operando en modo estático y c) en modo dinámico.

Pero, más allá de la obtención de imágenes, la MFA es una plataforma útil para evaluar cambios de estrés, flexión, masa y térmicos, entre otras propiedades útiles para los procesos de detección. Existen dos modos de operación en los sensores basados en *cantilevers*; el estático (Fig. 3b) y el dinámico (Fig. 3c) (Lang y col., 2005, Sungkanak y col., 2010). Las interacciones moleculares en el modo estático originan una deflexión y un estrés diferencial en la superficie del *cantilever* debido a la unión de las moléculas, mientras que el modo dinámico o resonante se basa en los cambios de la frecuencia de resonancia inducidos por interacciones moleculares en el cantiléver. En este último caso, la unión química se detecta debido a que la frecuencia de resonancia es función de la masa en el *cantilever* (Johnson y Mutharasan 2012). Aquí, el *cantilever* se excita a una frecuencia de resonancia específica, pero esta sufre un desplazamiento negativo debido a la masa adicional depositada sobre el mismo en el momento de la interacción, mientras que si la masa se elimina del cantiléver se da un desplazamiento positivo. Así, los sensores basados en *cantilevers* se pueden considerar como microbalanzas capaces de medir cambios de masa desde nanogramos hasta zeptogramos ($1 \text{ zg} = 1 \times 10^{-21} \text{ g}$) (Lang y col., 2002; Yang y col., 2006).

En el modo estático, el ambiente puede no ser un factor limitante, siempre y cuando la deflexión en el *cantilever* se pueda medir con precisión, es decir, que el medio no sea

turbio o interfiera en la señal del PSD (*position sensitive detector* por sus siglas en inglés o detector sensible a la posición). En el modo dinámico, por el contrario, el medio de detección es una variable importante ya que la dinámica del *cantilever* puede estar influenciada por efectos como el amortiguamiento viscoso del fluido (Johnson y Mutharasan 2012). Estos sensores se han aplicado ampliamente debido a su versatilidad y sencillez, al hecho de que no requieren marcadores (*label-free*) y a su alta resolución y sensibilidad. La Fig. 4 muestra algunos ejemplos de biosensores que utilizan *cantilevers* como transductores de parámetros tales como: estrés, temperatura, masa, campo magnético y cambio de viscosidad en el medio.

En las primeras investigaciones Chen y col., (1995) reportaron el efecto de la humedad relativa sobre la constante de elasticidad (*spring constant*) y la frecuencia de resonancia de los *cantilevers* cubiertos con capas de gelatina y oro. Al exponerlos a diferentes gradientes de humedad y vapores de mercurio se indujo un desplazamiento positivo en la frecuencia de resonancia, ocasionado por procesos de adsorción de éstas moléculas en la superficie del *cantilever*. Aunque este comportamiento parece contradictorio a la generalización de que un incremento de masa produce un desplazamiento negativo de la frecuencia de resonancia. Los autores encontraron un desplazamiento positivo debido a un cambio en las propiedades mecánicas de los *cantilevers* debido a un efecto de estrés y cambios en la constante de elasticidad del material. Estos resultados fueron la base para el desarrollo de diversos sensores, principalmente de gases (Fig. 4a). Sensores basados en *cantilevers* bimetalícos han permitido detectar cambios de temperatura del orden de 10^{-5} K en aplicaciones térmicas (Fig. 4b). Además, se han propuesto otras aplicaciones de microcalorimetría para medir cambios de entalpía, transiciones de fase y para espectroscopía fototérmica con sensibilidades de hasta 150 fJ, con tiempos de respuesta de milisegundos (Raiteri y col., 2001, Kim y col., 2010). Otros biosensores son los magnéticos (Fig. 4c) que han servido para detectar *Salmonella typhimurium* directamente en la superficie de tomates empleando un biosensor milimétrico magnetoelástico recubierto con fagos como elemento de reconocimiento (Li y col., 2010). También, *cantilevers* recubiertos con polímeros orgánicos se han usado para medir el pH por deflexión (Bashir y col., 2002), lo que demuestra el amplio abanico de aplicaciones de los sensores basados en esta tecnología.

Una estrategia para evitar los efectos del estrés y de los cambios en las propiedades mecánicas de las vigas en voladizo cuando se quiere evaluar únicamente cambios de la masa, es focalizar la capa de detección en la punta del *cantilever* (Fig. 4d) (Datskos y col., 2005, Waggoner y Craighead 2007). Por ejemplo, (Gfeller y col., 2005) reportaron el caso particular de un biosensor de masa basado en *cantilevers* funcionalizados con una capa nutritiva de agar de alrededor de 200 nm, que sirvió para evaluar el crecimiento activo de *E. coli*. Los autores despreciaron

los cambios en la constante de elasticidad debido a la adhesión bacteriana y registraron un cambio negativo en la frecuencia de resonancia provocada por el crecimiento de la bacteria, a pesar de que la pérdida de masa puede ser promovida por la respiración aeróbica del microorganismo y el agotamiento de los nutrientes. De acuerdo con los resultados presentados, éstas pérdidas se compensaron con la absorción de agua en la capa nutritiva, de forma que el crecimiento del microorganismo pudo ser evaluado en aire saturado (Fig. 4d).

Para incrementar la especificidad de los biosensores se han empleado diferentes bioreceptores, como enzimas, anticuerpos, antígenos, aptámeros, moléculas de ADN o fagos. La Fig. 4e muestra un ejemplo ilustrativo para la interacción anticuerpo-antígeno, que son tal vez los sensores más usados para la detección de bacterias, esporas, hongos, levaduras, virus o toxinas (Gupta y col., 2004a, 2004b, Nugaeva y col., 2005, Ricciardi y col., 2010, Sungkanak y col., 2010, Li y col., 2010).

La sensibilidad de los *cantilevers* también se aprovecha

para medir la viscosidad en fluidos ya que la carga de la masa que proporciona el medio viscoso promueve un cambio de la frecuencia de resonancia (Raiteri y col., 2001). Estos efectos de amortiguación en la oscilación en el *cantilever* se pueden usar para crear micro-viscosímetros (Fig. 4f). El efecto de la viscosidad sobre la respuesta dinámica de palancas milimétricas se ha reportado para aire y polímeros viscosos variando la profundidad de inmersión; su respuesta se interpretó en términos de la masa añadida y de los coeficientes de amortiguamiento viscoso, y se detectó una disminución de la frecuencia de resonancia conforme la densidad del fluido se incrementó. Esto se ha propuesto para diseñar dispositivos capaces de medir la viscosidad de fluidos (Naik y col., 2003). Por otra parte, el efecto de amortiguación de *cantilevers* operados en fluidos se ha estudiado ampliamente en varios trabajos para estudios de microestructura en sistemas acuosos y biodetección (Minary-Jolandan y col., 2012, Lübbecke y col., 2010, Nnebe y col., 2004, Kim y col., 2010, Giessibl y col., 2003).

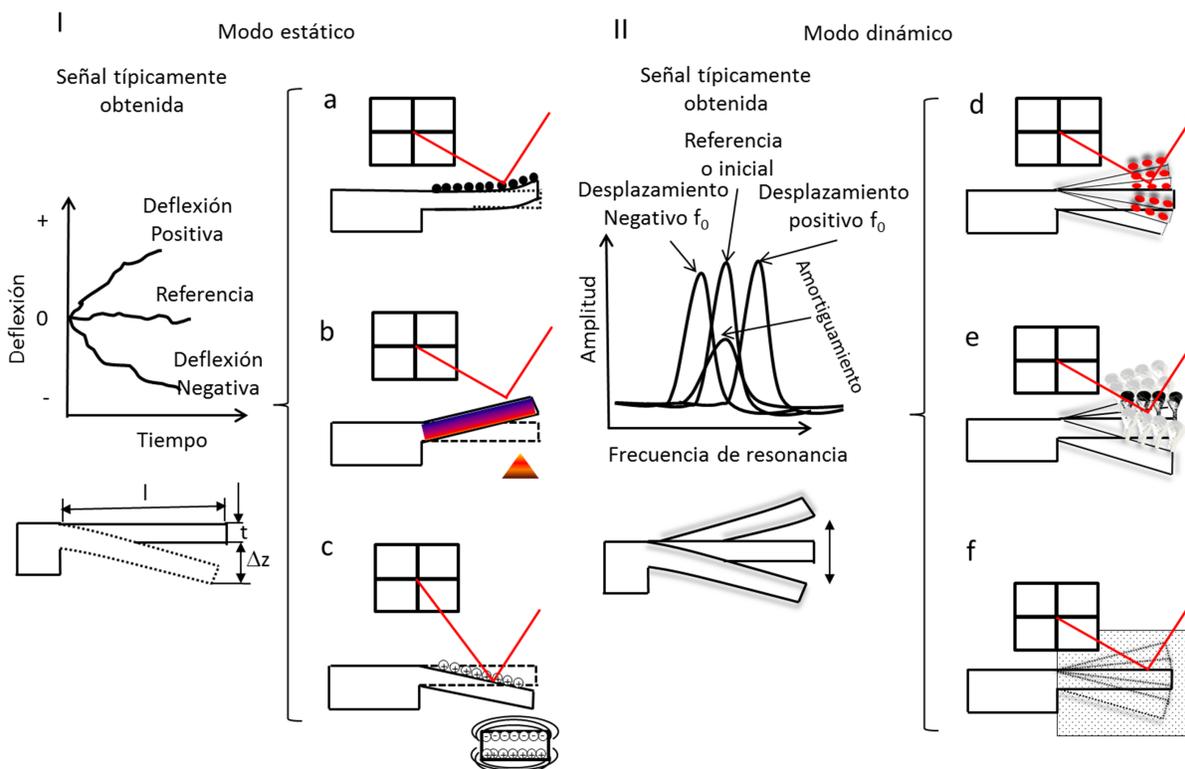


Fig. 4. Esquema de algunas aplicaciones de cantilevers usados como transductores en sensores operados I) en modo estático (deflexión) y II) en modo dinámico (frecuencia de resonancia). a) Sensor de masa por estrés, b) térmico, c) sensor magnético a través de superficies o partículas con carga, d) sensor de masa por cambio de frecuencia de resonancia, usado para evaluar el crecimiento de microorganismos en una capa nutritiva, e) Biosensor por interacción entre anticuerpos-antígenos o inmunosensor, f) micro-viscosímetro. En todos los casos la señal es obtenida por un medio óptico, por ejemplo a través de microscopia de fuerza atómica, los modos de detección pueden ser intercambiables para todos los sensores ejemplificados (Adaptada de Raiteri y col., 2001).

3.3 Modelos para evaluar el desempeño de sensores mecánicos

Dada la amplia aplicación de los biosensores basados en *cantilevers* como sistemas de detección sin marcaje, a continuación se describen los modelos matemáticos más usados para evaluar su desempeño. Aquellos basados en cambios de estrés o deflexión se ilustran en la Fig. 4-I, mientras que los sensores desarrollados para la detección basada en frecuencia de resonancia se muestran en la Fig. 4-II.

En el modo estático, la flexión se realiza selectivamente por el lado del *cantilever* funcionalizada con moléculas de reconocimiento. El otro lado está generalmente protegido con otra capa, por ejemplo albumina sérica bovina, para evitar interacciones no específicas (Sungkanak y col., 2010). Así, cuando se produce la detección ocurre un cambio en la energía libre de la superficie de la viga que genera cambios de tensión superficial, provocando una flexión del *cantilever* que se puede medir. Esta flexión se puede evaluar utilizando medios ópticos o medios eléctricos con elementos piezoresistores incorporados al borde fijo del cantiléver (Bashir, 2004). El fenómeno más común para describir los cambios de tensión en los voladizos son los de superficie, por ejemplo quimisorción, la cual puede ocurrir cuando se llevan a cabo interacciones químicas entre la superficie funcionalizada del *cantilever* y las moléculas a detectar. En este caso, los cambios en la tensión superficial se pueden atribuir a cambios en la energía libre de Gibbs asociados con procesos espontáneos de quimisorción impulsados por un exceso de la energía libre interfacial, que suele estar acompañado por una reducción de la tensión interfacial, y de ese modo las superficies tienden a expandirse como resultado de los procesos de adsorción (Datskos y col., 2005). En el sistema más simplificado, las deformaciones inducidas por procesos de adsorción se pueden evaluar teóricamente usando las ecuaciones propuestas por Stoney (1909) y von Preissig (1989):

$$\frac{1}{R} = \frac{6(1-\nu)}{Et^2} \Delta\sigma \quad (1)$$

Donde R es el radio de curvatura de la palanca, ν es la constante de Poisson, E es el módulo elástico o de Young del sustrato o *cantilever*, t es el espesor de viga, $\Delta\sigma$ es la diferencia de la tensión en la caras del cantiléver definida como $\Delta\sigma_1 - \Delta\sigma_2$ y corresponde a las tensiones en la superficie superior e inferior del *cantilever* respectivamente (Fig. 5). Si R es conocida, entonces es posible evaluar el desplazamiento o flexión (Δz) de un *cantiléver* con longitud l a través de:

$$\Delta z = \frac{1}{2} \frac{l^2}{R^2} = \frac{3l^2(1-\nu)}{Et^2} \Delta\sigma \quad (2)$$

Para superficies idealmente lisas o para recubrimientos muy delgados en comparación con el espesor de la viga en voladizo, la estimación del desplazamiento del *cantilever* basado en cambios de tensión en la superficie es directa

usando la Ec. (2). Alternativamente, si la deflexión del *cantilever* se evalúa en modo estático, por ejemplo a través de un método óptico (MFA), es posible calcular con la Ec. (2) la diferencia de la tensión superficial o estrés ($\Delta\sigma$) que se genera entre las caras opuestas de la viga en voladizo (Raiteri y col., 2001, Datskos y col., 2005). Más aun, es posible relacionar la curva de deflexión del cantilever con los procesos de adsorción y/o cambios de masa. Zang y Ji (2004) asociaron el proceso de adsorción de *E. coli* sobre un *cantilever* funcionalizado con anticuerpos a través del ajuste de la cinética de deflexión mediante un modelo no lineal de absorción de Langmuir, de donde determinaron la velocidad de absorción de microorganismos en la viga en voladizo. El principio descrito para un fenómeno de estrés causado por adsorción también se puede aplicar a flexiones debidas a cambios de masa, pero en este caso solo es necesario medir directamente la deflexión por un método óptico. Adicionalmente, la sensibilidad al estrés en los *cantilevers* se incrementa cuando la constante de elasticidad disminuye, mientras que el área superficial del *cantilever* determina el número de moléculas que se pueden unir a la superficie para causar un cambio de estrés o flexión.

El modo resonante o dinámico para evaluar los cambios de masa se han usado ampliamente porque muestra un mayor potencial para obtener mediciones más sensibles de las interacciones biomoleculares y datos cinéticos de biodetección (Johnson y Mutharasan 2012). En este modo, el *cantilever* se excita mecánicamente usando, por ejemplo, un actuador externo como el ruido ambiental o térmico (Gupta y col., 2004a, 2004b). Así, los *cantilevers* vibran a su frecuencia de resonancia característica que, como se ha mencionado, se puede medir antes y después de la interacción química o biológica ocurrida en el sensor mediante sistemas ópticos o eléctricos. De esta manera, el cambio de masa se puede detectar de forma indirecta midiendo el desplazamiento de la frecuencia de resonancia, asumiendo que la constante de elasticidad no cambia.

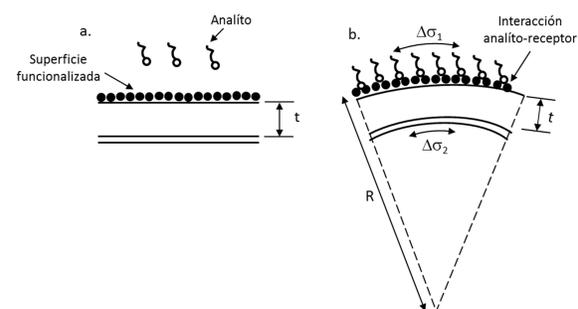


Fig. 5. Sección lateral de un microcantilever funcionalizado con moléculas receptoras antes a) y después b) de la interacción con el analito, por ejemplo debido a un proceso de quimisorción, esto causa un cambio diferencial de estrés $\Delta\sigma_1$ y $\Delta\sigma_2$ en ambos lados de la palanca, donde t es el espesor de la viga y R el radio de la curvatura (Adaptada de Datskos y col., 2005, Raiteri y col., 2001).

Así, es aceptado que los *cantilevers* son resonadores mecánicos que se pueden describir como osciladores armónicos con una frecuencia de resonancia (f_0) que puede estimarse desde (Chen y col., 1995):

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m^*}} \quad (3)$$

donde k es la constante de elasticidad y m^* es la masa efectiva del *cantilever* corregida para *cantilevers* rectangulares. Hay que destacar que $m^* = n(m_b)$, donde m_b es la masa de la palanca suspendida y n es el factor de corrección geométrico, para el caso de *cantilevers* rectangulares, ésta es igual a 0.24 (Chen y col., 1995). De manera general y cuando no hay efectos de disipación viscosa, k puede estimarse (Datskos y col., 2005):

$$k = \frac{Ewt^3}{4l^3} \quad (4)$$

Donde w es el ancho de la viga. Por otro lado, el valor de k para *cantilevers* comerciales es reportado por el fabricante en un amplio rango, debido a las variaciones que pueden tener las vigas por el proceso de fabricación. Sin embargo, para *cantilevers* no comerciales que son fabricados con una configuración específica y son usados como sensores, puede existir disipación viscosa debido al medio donde la viga está vibrando. En este caso, es necesario evaluar k desde sus características geométricas, propiedades físicas y mecánicas del material, medio y frecuencia de resonancia. El método más sencillo para evaluar k es el de Cleveland que propone la siguiente relación (Cleveland y col., 1993):

$$k = 2w(\pi lf)^3 \sqrt{\frac{\rho^3}{E}} \quad (5)$$

donde f es la frecuencia de resonancia de la viga en su modo fundamental (movimiento transversal), ρ es la densidad de la viga. Las dimensiones de los *cantilevers* se obtienen generalmente a partir de observaciones con MEB. Otro método ampliamente usado es el de Sader, que propone la siguiente relación empírica para *cantilevers* rectangulares (Sader 1998, Sader y col. 1999):

$$k = 0.1906\rho_f w^2 l Q \omega^2 \Gamma(\omega)_i \quad (6)$$

donde ρ_f es la densidad del fluido donde oscila el *cantilever*, Q y ω son el factor de calidad y la frecuencia de resonancia radial obtenidas en su modo fundamental de flexión, $\Gamma(\omega)_i$ es la parte imaginaria de la función hidrodinámica evaluada a la frecuencia de resonancia (ver ecuación 20 en Sader, 1998). Para implementar la fórmula se requiere conocer la densidad y viscosidad del fluido donde resuena el *cantilever*, ya que la función imaginaria emplea el número de Reynolds, y también evaluar experimentalmente la frecuencia de resonancia y la variable Q . El método es independiente del espesor de la viga y de las propiedades del material de construcción. La técnica ha sido extendida para evaluar constantes de elasticidad en el modo torsional en cualquier

material elástico y tipo de geometría (Sader y col., 2012). Una revisión más extensa de otros métodos para evaluar k puede consultarse en Burnham y col., (2003), y en Sader y col., (2012).

Cuando se agrega masa al cantiléver (Δm), si esta es pequeña en comparación con la masa del oscilador, el cambio en la frecuencia de resonancia se define como: $\Delta f = f_1 - f_0$, donde f_1 y f_0 son las frecuencias de resonancia antes y después de la interacción, respectivamente. Este desplazamiento puede ser descrito de la siguiente forma (Waggoner y Craighead 2007):

$$\Delta f = -\frac{1}{2} \frac{\Delta m}{m} f_0 \quad (7)$$

En este caso, m se puede estimar para palancas rectangulares como $m = \rho l w t$ (Johnson y Mutharasan, 2012). Durante los procesos de biodetección en modo dinámico ocurren cambios en la frecuencia de resonancia que pueden estar asociados a dos mecanismos; el cambio principal se debe a la interacción entre el analito y elemento de reconocimiento o receptor, que provoca la adición de masa al sensor, el otro es el cambio en la constante de elasticidad. Los efectos en la frecuencia de resonancia se han simplificadas en el trabajo de Chen y col., (1995) a través de la siguiente relación:

$$\Delta f = \frac{1}{2} f_0 \left(\frac{\Delta k}{k} - \frac{\Delta m}{m} \right) \quad (8)$$

A partir de la ecuación anterior es fácil observar que la frecuencia de resonancia (Δf) decrece a la par que la masa del *cantilever* aumenta. Esta relación supone que los cambios de masa o dureza ocurren uniformemente sobre toda la superficie del *cantilever*, lo que realmente no sucede en aplicaciones prácticas ya que, como se ha mencionado anteriormente, se prefiere localizar las zonas de biodetección en la punta del *cantilever* para evitar los efectos de cambios en la constante de elasticidad en la palanca y potenciar así la señal. Aunque la Ec. (8) es una simplificación de ambos efectos, es útil para interpretar la respuesta de los biosensores. Sin embargo, aunque se han reportado cambios en los valores de k debido a la modificación en la dureza de las vigas (Johnson y Mutharasan 2012), la mayoría de los trabajos indican que el mecanismo más importante detectado en los sensores en modo dinámico es el cambio de masa, atribuido a las interacciones analito-bioreceptor y disminuciones en la frecuencia de resonancia son típicamente reportadas en los trabajos de biosensores (Sungkanak y col., 2010, Johnson y Mutharasan, 2010, Nugaeva y col., 2005). De esta forma, es posible considerar despreciable el término que incluye los cambios de k en la Ec. (8) y esta se puede arreglar para definir la sensibilidad al cambio de masa del biosensor (σ_b):

$$\sigma_b = \frac{\Delta f}{\Delta m} = -\frac{1}{2} \frac{f_0}{m} \quad (9)$$

Aunque matemáticamente esta es la expresión para obtener la sensibilidad del biosensor, la sensibilidad se suele reportar

como el inverso de la Ec. (9) en términos de los valores de masa con respecto al cambio en la frecuencia de resonancia ($\Delta m/\Delta f$), que para micro y nanodispositivos es del orden de $\text{ng} \times \text{Hz}^{-1}$ y hasta $\text{fg} \times \text{MHz}^{-1}$, dependiendo de las dimensiones, sensibilidad y condiciones de operación del sensor (Johnson y Mutharasan, 2010, Waggoner and Craighead 2007).

De esta forma, para evaluar los cambios de masa en *cantilevers* rectangulares se han desarrollado otras ecuaciones para describir los cambios de masa (Chen y col., 1995, Nugaeva y col., 2005, Sungkanak y col., 2010):

$$\Delta m = \frac{k}{4\pi^2} \left(\frac{1}{f_1^2} - \frac{1}{f_0^2} \right) \quad (10)$$

Por otro lado, en *cantilevers* funcionalizados para el crecimiento de microorganismos, si se conoce la frecuencia de resonancia antes y después de iniciar una cinética, es posible asociar el desplazamiento de la frecuencia de resonancia con el crecimiento activo de los microorganismos. Una relación simplificada que asocia el desplazamiento de la frecuencia de resonancia con la masa agregada al *cantilever* debida al crecimiento microbiano es la siguiente (Gfeller y col., 2005):

$$\Delta f \propto m_{\text{agregada}} \quad (11)$$

Así, la clave para evaluar el desempeño de los sensores en modo dinámico está en la curva que relaciona la frecuencia de resonancia con respecto a la amplitud (espectro de resonancia). A partir de esta curva es posible evaluar casi todos los parámetros usados en los biosensores de resonancia y deflexión. El factor de calidad determina la sensibilidad absoluta de masa y resolución del desplazamiento de la frecuencia de resonancia. Para un sistema oscilante que disipa energía, Q se puede definir como la relación de la energía almacenada en el oscilador (W) y la energía disipada por ciclo (ΔW):

$$Q = \frac{2\pi W}{\Delta W} \quad (12)$$

Los *cantilevers* en modo dinámico se pueden analizar asumiendo que son osciladores armónicos disipativos o amortiguados, y su amplitud de respuesta ($A(f)$) o curva de frecuencia-amplitud se puede describir mediante funciones Lorentzianas (Giessibl y col., 2003; Gupta y col., 2004a; Lübbe y col., 2010; Minary-Jolandan y col., 2012):

$$A(f) = A_{dc} \frac{f_0^2}{\sqrt{(f_0^2 - f^2)^2 + \frac{f_0^2 f^2}{Q^2}}} \quad (13)$$

donde f es la frecuencia de excitación del resonador, f_0 es la frecuencia de resonancia a la máxima amplitud y A_{dc} es la amplitud del *cantilever* a cero de frecuencia. A partir del ajuste de la curva de frecuencia-amplitud es posible obtener f_0 y Q . De esta forma, las curvas con altos valores de Q están asociadas a picos estrechos que indican una alta sensibilidad del sensor (Minary-Jolandan y col., 2012; Ricciardi y col.,

2010; Datskos y col., 2005; Giessibl y col., 2003; Waggoner y Craighead 2007; Lübbe y col., 2010).

Los valores de Q dependen principalmente del material de construcción de la viga, su forma y la viscosidad del medio de resonancia. Durante su operación, los parámetros más importantes que pueden afectar los valores de Q son la fijación del *cantilever*, la pérdida de volumen, de soporte y de superficie, y la disipación termoelástica y viscosa debido al ambiente de resonancia. En vacío, los valores de Q son mayores que cuando el sistema opera en aire y mucho mayores que en líquidos (Minary-Jolandan y col., 2012; Ricciardi y col., 2010). Lübbe y col. (2010) reportaron para mediciones en ultra-alto vacío valores de Q mayores a 10000 unidades, mientras que Minary-Jolandan y col. (2012) encontraron valores alrededor de 450 unidades en aire a condiciones ambientales y de alrededor de 100 unidades para *cantilevers* oscilando en aire.

Adicionalmente, la curva de frecuencia (f)-amplitud (A) se puede ajustar con una función Lorentziana de tres parámetros y a través de ella obtener la amplitud máxima (A_{max}) en f_0 del pico principal y su valor correspondiente:

$$A = \frac{A_{max}}{1 + \left(\frac{f-f_0}{c}\right)^2} \quad (14)$$

donde c se define como la anchura completa a la mitad del máximo del pico de resonancia de la curva de amplitud-frecuencia (del inglés, *full-width at half maximum of the resonance frequency peak*). Como el factor de calidad se ha definido como $Q = f_0 \Delta f_{fwhm}^{-1}$ (Johnson y Mutharasan 2012), es sencillo obtener su valor y subsecuentemente los valores de Δf y Δm a través de las Ecs. (7) y (10), para poder evaluar la sensibilidad del sensor con la Ec. (9).

La Fig. 6 muestra un ejemplo obtenido por los autores del presente trabajo para estimar f_0 , Δf_{fwhm} y Q de *cantilevers* comerciales rectangulares (modelo MPP-11100-10, Brucker, USA, con $l = 125 \mu\text{m}$, $w = 50 \mu\text{m}$, $t = 5 \mu\text{m}$ y $k = 40 \text{ N/m}$), recubiertos con agarosa empleando capilares para la funcionalización (Gfeller y col., 2005) como experimentos control preliminares (sin microorganismos) para la detección de *L. plantarum* (microorganismo probiótico). Estos se obtuvieron en un microscopio de fuerza atómica (diMultiMode V, Veeco, USA, con un controlador NanoScope V) operado en modo dinámico en aire ($22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ and $72 \pm 5 \text{ \% HR}$) y en celda de fluidos (MTFML, Brucker, USA) en una solución de NaCl al 0.1 % a las mismas condiciones de temperatura y humedad. En la Fig. 6 se ve claramente como los valores de f_0 y de Q en líquido disminuyen con respecto a las condiciones en aire debido a la disipación viscosa.

Otra forma de evaluar la sensibilidad de un biosensor es mediante la estimación de la cantidad mínima de masa que es posible medir o límite de detección, conocido por el término LOD (limit of detection por sus siglas en inglés), el cual depende de la masa efectiva del sensor.

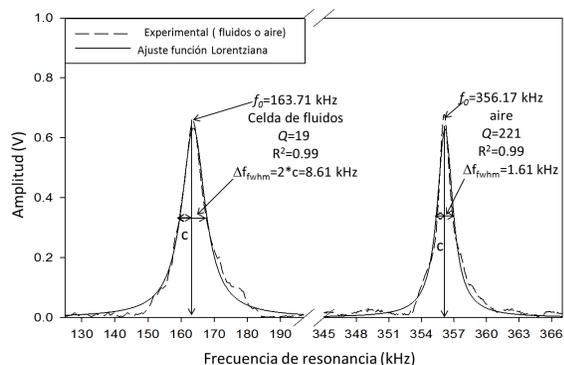


Fig. 6. Ejemplo de curvas de frecuencia de resonancia-amplitud en aire y en solución de NaCl al 0.1 % en celda de fluidos para evaluar los valores de f_0 , Δf_{FWHM} , R^2 y Q desde el ajuste de los valores experimentales con la función Lorentziana (Eq. 14).

La Ec. (9) puede ser resuelta para la mínima masa agregada detectable (Δm_{min}) y obtener el valor LOD al aplicar la definición del factor de calidad (Q) como se muestra en la siguiente relación:

$$LOD = \Delta m_{min} \alpha \frac{m}{Q} \quad (15)$$

Para obtener el LOD se requiere la evaluación experimental de la frecuencia de resonancia y de Q . La Ec. (15) es relativamente sencilla y se puede ver que si la masa inicial del sensor disminuye o se incrementa el factor de calidad, se reduce la mínima masa detectable por el sensor y por lo tanto se mejora su sensibilidad (Johnson y Mutharasan, 2012). Por ello, en la actualidad se intenta incrementar su sensibilidad a través de resonadores más pequeños y sensibles mediante NEMS (*nanoelectromechanical systems* por sus siglas en inglés). Este esquema de reducción de tamaño de los sensores que usan el modo resonante es contrario a la estrategia que se sigue en el modo estático donde lo que se busca es potenciar el radio de la curvatura a través del incremento en la longitud de la palanca para maximizar su sensibilidad. Asimismo, como la sensibilidad del sensor es inversamente proporcional a Q , los sensores que operen en vacío serán más sensibles que los que operan en aire y mucho más que los que operan en líquido, donde efectos de disipación viscosa provocan que el valor de Q se reduzca considerablemente. De hecho, algunos autores señalan que para algunos sistemas de detección en líquidos se prefiere el modo de operación de deflexión que el resonante (Raiteri y col., 2001, Waggoner y Craighead, 2007).

También es frecuente cuando se trabaja con microorganismos reportar el límite de detección en términos de UFC (unidades formadoras de colonias) o microorganismos detectables en el sensor, expresados como número o en términos de concentración (e.g. UFC/ml). Para realizar esto, se han probado diferentes concentraciones de microorganismos y se ha evaluado cuál de éstas es la mínima detectable (Sungkanak y col., 2010). Algunos

trabajos realizan el conteo de los microorganismos que crecieron o que se depositaron en la cara funcionalizada del sensor por medio de MEB de forma que, cómo es posible conocer la mínima masa detectable en el sensor, se puede estimar el peso de un solo microorganismo o decir cuántas células puede detectar el dispositivo (Gfeller y col., 2005, Nugaeva y col., 2005). Así, se han reportado trabajos con microcantilevers en donde es posible detectar una sola célula (Ricciardi y col., 2010, Ilic y col., 2000) o usando nanocantilevers hasta una partícula viral (Gupta y col., 2004b).

3.4 Tipos de funcionalización y cantilevers usados en biodetección

Como se ha visto, una etapa importante para la construcción de biosensores basados en *cantilevers* es la funcionalización de soportes inorgánicos con biomoléculas o elementos de reconocimiento. En la Fig. 7 se describen algunas opciones para funcionalizar un *cantilever*, como películas de agarosa, células completas, bacteriófagos, proteínas, ADN y anticuerpos. Algunos biosensores han logrado registrar una detección del orden de los zeptogramos y se emplean ampliamente en el área médica y alimentaria. Los fagos, ácidos nucleicos y polímeros de impresión molecular son los elementos más novedosos de reconocimiento basados en la afinidad y son cada vez más importantes debido a sus excepcionales características de afinidad y especificidad, su rápida y rentable producción y su estabilidad y facilidad para ser modificados. Recientemente, la tecnología de aptámeros permitió la extensión del uso de ácidos nucleicos a cualquier tipo de analito gracias a su estructura única tridimensional de moléculas unidas. Debido al reciente descubrimiento de esta tecnología se han empleado diversos aptámeros en la funcionalización de biosensores, incluyendo moléculas de bajo peso molecular, estructuras supramoleculares y microorganismos. Como se ha mencionado los aptámeros son ligados de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que se aíslan de librerías de oligonucleótidos por un proceso de selección *in vitro* (SELEX). Por ejemplo, se han empleado en el sector biomédico mediante electrodos de oro para la detección de teofilina por medio de una superficie de tiol modificada con aptámeros de ARN empleando voltametría cíclica con un límite de detección de $0.2 \mu\text{M}$ (Van Dorst y col. 2010).

Los *cantilevers* pueden ser de diferente material, tamaño y configuración geométrica. En cuanto a los materiales usados, lo más común es utilizar silicio y algunos derivados como dióxido de silicio; nitruro de silicio como base y en algunos casos se colocan películas ultradelgadas de oro del orden de los nanómetros en la parte del *cantilever* donde se realizará la detección, con la finalidad de hacer activa la superficie y adherir el bioreceptor (proteínas, anticuerpos, fagos). Cuando no se colocan películas de oro, el material base del *cantilever* se puede tratar empleando compuestos sililados para formar una monocapa auto-ensamblada que provea una superficie hidroxil-reactiva afín a grupos

hidroxilo como es el caso de la agarosa, que se ha empleado para la detección de *E. coli* (Gfeller y col. 2005); también se puede emplear NHS o Sulfo-NHS (N-hidroxisuccinamida) para preparar ésteres de aminas reactivas de grupos carboxilo para su marcaje, inmovilización o reticulación (Van der Hur y Evoy, 2013). Otra tendencia para mejorar la sensibilidad y especificidad es bloquear la parte posterior del *cantilever* donde no se lleva a cabo la detección utilizando PEG-silano (polietilenglicol silano) o BSA (albúmina sérica bovina o por sus siglas en inglés *bovine serum albumin*), evitando de esta manera interacciones inespecíficas en el medio (Sungkanak y col. 2010).

Por otro lado, existe una amplia gama de configuraciones geométricas disponibles a nivel comercial o que pueden ser fabricadas para un propósito específico de biodetección. La Fig. 8 muestra algunos de estos diseños. El más básico es el rectangular (Fig. 8a) que es tal vez la

configuración más usada en los biosensores mecánicos dada su facilidad de fabricación y bajo costo. Normalmente se diseñan para el modo resonante modificando su proporción de largo y ancho, o su espesor y longitud en el modo estático para maximizar su sensibilidad. Se han aplicado de forma generalizada para detectar el crecimiento activo de bacterias, hongos, esporas, virus y biomoléculas en general (Waggoner and Craighead, 2009; Johnson y Mutharasan, 2012). La Fig. 8b representa un *cantilever* que puede tener una capa aislante, ser bimetalico, o con una cubierta polimérica, que se puede emplear como sensor térmico y de gases (Lang y col., 2002, Datskos y col., 2005). Es frecuente también el uso de *cantilevers* múltiples o en arreglo (Fig. 8c), para detectar varios analitos de manera simultánea o secuenciada, o para tener *cantilevers* de referencia (tipo dual, no mostrado en la figura).

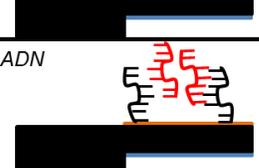
Bioreceptores	Aplicación y sensibilidad	Referencias
Microorganismos 	<i>Cantilevers</i> rectangulares a partir de silicio con longitud de hasta 500 μm . Se han empleado para la detección de <i>A. niger</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i> funcionalizando la superficie del <i>cantilever</i> con películas nutritivas o anticuerpos logrando una sensibilidad de hasta 50-140 pg/Hz.	Campbell y col., 2007 Gfeller y col., 2005. Nugaeva y col., 2005.
Proteínas 	<i>Cantilevers</i> triangulares (en forma de V) y rectangulares con longitud de hasta 300 μm se han empleado para la detección de antígeno prostático específico con una sensibilidad de 10 pg/mL; la detección de albúmina sérica bovina se ha realizado con una sensibilidad de 10^{-17} g/ μm^2 .	Hwang y col., 2004. Burg y Manalis 2003.
ADN 	<i>Cantilevers</i> de silicio rectangulares con longitud de 30-50 μm se han utilizado para la detección de hepatitis B por medio de 243 pares de bases empleando tiol para la funcionalización de la superficie con ADN; la sensibilidad fue del orden de fM.	Cha y col., 2009. Zheng y col., 2011.
Virus 	<i>Cantilevers</i> de silicio y metal con dimensiones mayores a 700 μm se han utilizado para detectar el virus del síndrome de las <i>manchas blancas</i> con una sensibilidad de 100 viriones/mL. En todos los casos descritos se bloquea la parte posterior del <i>cantilever</i> para evitar interacciones inespecíficas.	Capobianco y col., 2010.

Fig. 7. Algunos ejemplos de funcionalización de cantilevers usados como biosensores.

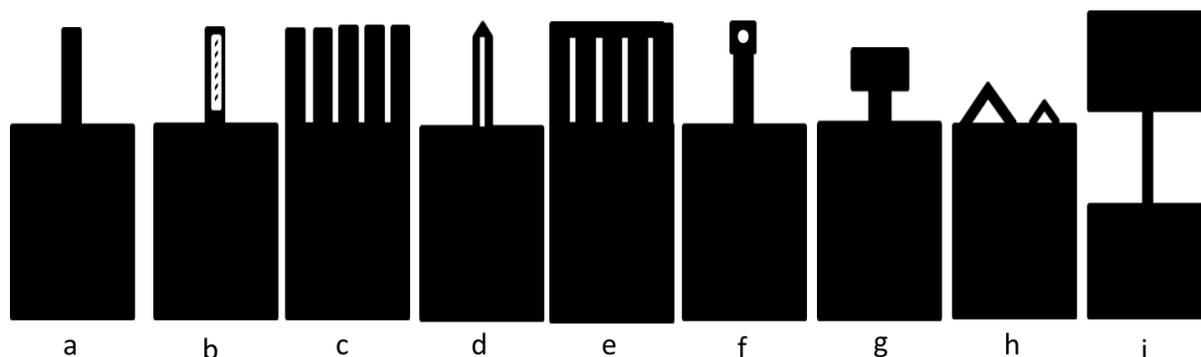


Fig. 8. Algunas configuraciones geométricas de cantilevers usados en biodetección a) Rectangular, b) Rectangular con capa polimérica o bimetalico, c) Arreglo de cantilevers rectangulares d) Rectangular en “U” o interdigitado, e) Arreglo de cantilevers interdigitados, f) Rectangular con cabeza y funcionalizado en la punta, g) En forma de “T” o de paleta, h) En forma de “V” o triangular, i) Resonador de doble soporte.

Se han llevado a cabo algunas investigaciones que emplean este tipo de arreglos para detectar gases, oligonucleótidos, ADN, aromas o microorganismos patógenos, entre otras aplicaciones (Lang y col., 2002, Raiteri y col., 2002, Jianrong y col., 2004, Ricciardi y col., 2010). También se emplean *cantilevers* interdigitados o tipo “U”, individuales o en arreglo (Fig. 8d y 8e). Este arreglo disminuye el ruido, mejora la conducción eléctrica y la sensibilidad en comparación con los convencionales, al igual que en los arreglos no interdigitados, también son útiles para realizar secuencias de biodetección con varios analitos de forma simultánea (Datskos y col., 2005, Manalis y col., 1996). La Fig. 8f representa un *microcantilever* fabricado específicamente para unir analitos cerca de la punta, lo que permite maximizar los efectos de la adición de masa y mejora su sensibilidad notablemente con respecto a los rectangulares. Es posible funcionalizar la punta, por ejemplo, con nanopartículas de oro como elemento receptor para detectar analitos en una zona específica del cantiléver. Este tipo de dispositivos se han fabricado en dimensiones nanométricas (4 μm largo, 500 nm ancho y 150 nm de espesor) y permitieron detectar hasta atogramos de moléculas de tiol (Ilic y col., 2004). Por su parte, los cantilevers tipo “T” o de paleta (Fig. 8g) se han utilizado para mejorar la sensibilidad ya que operan en diferentes modos de flexión y torsión, se ha logrado detectar vapores de isopropanol en el orden de los fentogramos (Xia y Li 2008, Pang y col., 2006). Los sensores tipo “V” o triangulares (Figura 8h) minimizan las deflexiones torsionales y se han aplicado para absorción de gases (Chen y col., 1995) y para la biodetección de *E. coli* (Zhan y Ji, 2004). Finalmente, los resonadores de doble soporte (Fig. 8i) se han fabricado en tamaños nanométricos (2,3 μm largo, 150 nm ancho y 70 nm de espesor) y han permitido detectar moléculas de N_2 en condiciones de alto vacío y ultra-alta frecuencia (alrededor de 190 MHz) con una sensibilidad de 7 zg, que equivale a la masa de 30 átomos de xenón o una molécula de 4 kDa (Yang y col., 2006).

3.5 Aplicaciones e influencia de las variables de operación y diseño

La Tabla 1 muestra una selección de diferentes biosensores mecánicos desarrollados para el área biológica y alimentaria, se han condensado algunos aspectos de interés de su operación y diseño como el tipo de biosensor, tamaño, geometría, elemento de reconocimiento, modo de operación y sensibilidad. En el caso de los sensores milimétricos se han reportado *cantilevers* rectangulares con dimensiones de aproximadamente 3 mm para la detección de *S. typhimurium*, *C. parvum* y *B. anthracis*, entre otros microorganismos. Dichos biosensores se evaluaron en aire y en medio líquido (Li y col., 2009b, Xu y Mutharasan 2010, Zhu y col., 2007) y para cada caso se muestra el factor de calidad (Q) que, como se ha mencionado, está asociado a su modo de operación y sensibilidad.

Los sensores micrométricos se han utilizado para evaluar microorganismos en alimentos capturados por medio de proteínas (Nugaeva y col., 2005), anticuerpos (Sungkanak y col., 2010) o recubrimientos nutritivos (Gfeller y col., 2005) que al unirse con su elemento afín promueven el cambio en la superficie del cantiléver. Este cambio se puede medir a través de MFA o un método óptico, alcanzando mayor sensibilidad que los *cantilevers* milimétricos. En el caso de los sensores nanométricos, se han empleado *cantilevers* que alcanzan mayores frecuencias de resonancia que los *cantilevers* mili y micrométricos, lo que ha permitido incrementar considerablemente su sensibilidad (Li y col. 2007).

Para el caso de los sensores nanométricos se han empleado *cantilevers* con propiedades excepcionales que alcanzan frecuencias de resonancia superiores a los *cantilevers* mili y micrométricos y que incrementa considerablemente su sensibilidad (Li y col. 2007).

Existe una amplia gama de biosensores mecánicos de tamaño mili, micro y nanométrico, la reducción de su tamaño aumenta su sensibilidad mientras que el medio de resonancia influencia fuertemente los valores de Q , la frecuencia de resonancia y la sensibilidad del dispositivo. De esta manera, basado en los trabajos encontrados para biosensores de masa se propone la Fig. 9, que muestra una generalización de las posibles dependencias entre la sensibilidad (S), tamaño de sensor (TS), frecuencia de resonancia (f), factor de calidad (Q), medio de resonancia (MR), además del medio de resonancia u operación del sensor. Así en la Fig. 9a se aprecia que se gana sensibilidad al disminuir el tamaño del sensor y la interferencia del medio de resonancia, debido a que a nivel nanométrico las frecuencias de resonancia se incrementan y el sensor puede monitorear un menor cambio de masa. Mientras que al cambiar el medio de resonancia, las oscilaciones o vibraciones del cantilever se ven menos impedidas en el vacío, ya que en el aire existe un mayor amortiguamiento, siendo este efecto mucho mayor en medio líquido, principalmente cuando la viscosidad del medio se incrementa. En la Fig. 9b, se ilustra como la disminución del tamaño del sensor incrementa la frecuencia de resonancia de los cantilevers, lo cual también se puede asociar con el medio de resonancia, generalmente los sensores micro y nanométricos se operan en aire y vacío, mientras que los milimétricos son usados en para detecciones en medios líquidos y proveen bajas frecuencias de resonancia. En el caso de la Fig. 9c, se relacionaron la sensibilidad y el parámetro Q del sensor, con respecto al medio de resonancia y el tamaño del dispositivo. Tanto la sensibilidad como Q , se incrementan conforme el tamaño del dispositivo es reducido, pues los sensores nanométricos generalmente son capaces de detectar masas del orden de atogramos y hasta zeptogramos, dependiendo la configuración geométrica y el medio de resonancia. Asimismo, los *microcantilevers* que operan al vacío, usualmente tienen curvas de frecuencia de resonancia muy estrechas, que pueden proporcionar valores

de Q mayores a las 1000 unidades. Estos valores pueden ser aún mayores para *nanocantilevers*, dependiendo de su geometría y si estos se operan al vacío o en aire. Esto proporciona un panorama muy global de que variables influyen el diseño y operación de los sensores de masa y que se deben de tener en cuenta para iniciar el desarrollo

de un dispositivo de biodetección, considerando, además, la aplicación específica a la que va dirigido. Como la Fig. 9 es una generalización, debe verse con precaución y no debe tomarse como regla, ya que solo es un resumen basado en los datos revisados en la literatura.

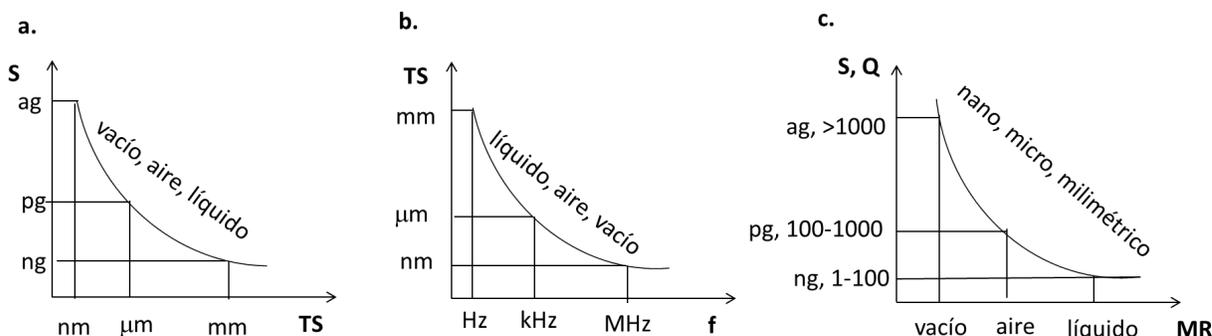


Fig. 9. Muestra las tendencias globales entre: a) el tamaño del sensor (TS), sensibilidad (S) y medio de resonancia (MR), b) frecuencia de resonancia (f) esperada con respecto a TS y MR, c) relaciones entre la sensibilidad y factor de calidad (Q) con respecto al MR y TS. Las escalas son arbitrarias y es la descripción desde una aproximación general.

Tabla 1. Selección de ejemplos de biosensores mecánicos aplicados en el área biológica y de los alimentos.

Tipo de biosensor, tamaño, geometría	Aplicación o elemento de reconocimiento	Modo de operación	Sensibilidad	Referencia
<i>Cantilever</i> rectangular cubierto con oro con una longitud de 0.7 mm y una punta de vidrio de 2.7 mm recubierta de oro	Detección de <i>Salmonella typhimurium</i> empleando un zirconato-titanato de plomo (PZT)	Detección eléctrica, 90% de humedad relativa, 1 y 1.5 mm de profundidad de inmersión de la punta en una suspensión sin aislar eléctricamente el PZT. Líquido, ($Q=20-25$)	Sensibilidad en la detección de masa de $\Delta m/\Delta f \sim 5 \times 10^{-11}$ g/Hz Límite de detección de 1×10^3 y 500 células/mL para 1 y 1.5 mm de profundidad respectivamente.	Zhu, y col. (2007)
<i>Cantilever</i> piezoeléctrico de silicio con una longitud de 3 mm	Detección de <i>Cryptosporidium parvum</i> oocistos, agente infeccioso protozoal transmitida por el agua	Película activa piezoeléctrica, se utilizó impedancia como método de detección en medio líquido ($Q=15$)	La sensibilidad: 100 oocistos/mL	Xu y Mutharasan (2010)
<i>Cantilever</i> rectangular metálico magnetoelástico de 3 mm de longitud	Detección de <i>B. anthracis</i> , bacteria gram positiva de interés alimentario y médico.	Película activa magnetostrictiva, el método de detección fue magnético en medio líquido ($Q=20$).	La sensibilidad reportada fue de 10^5 UFC/mL	Li y col. (2009b)
<i>Cantilever</i> rectangular 500 μm x 100 μm x 7 μm (largo, ancho, espesor)	Detección de <i>Escherichia coli</i> por medio de la evaluación del cambio en la frecuencia de resonancia	Película de agarosa recubierta con <i>E. coli</i> , detección en aire empleando un detector óptico. Aire, Q no especificado, constante.	La sensibilidad de masa calculada fue de ~ 140 pg/Hz	Gfeller y col. (2005)
<i>Cantilevers</i> rectangulares con y sin recubrimiento de oro	<i>Cantilevers</i> se funcionalizaron con concanavalina A, fibronectina o IgG para la detección de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Se empleó un MFA para medir la respuesta del cambio de frecuencia de resonancia durante la excitación del <i>cantilever</i> . Aire, $Q=116$ y 108 para <i>S. cerevisiae</i> y <i>A. niger</i> respectivamente.	La sensibilidad de los <i>cantilevers</i> en modo fundamental fue de 1.9 pg/Hz y 0.2 pg/Hz en el segundo modo.	Nugaeva y col. (2005)
<i>Microcantilevers</i> rectangulares recubiertos con oro	Detección de <i>Vibrio cholerae</i> O1 (causante de enfermedades gastrointestinales). Se inmovilizaron <i>cantilevers</i> con anticuerpos monoclonales (anti- <i>V. cholerae</i> O1)	Se empleó MFA para la detección evaluando el cambio en la frecuencia de resonancia debido al cambio de masa en el <i>cantilever</i> . Aire, Q no especificado.	El límite de detección fue de $\sim 1 \times 10^3$ UFC/mL y la sensibilidad $\Delta m/\Delta f \sim 146.5$ pg/Hz	Sungkanak y col. (2010)
<i>Nanocantilevers</i> rectangulares con propiedades de resonancia mecánica para alcanzar muy altas frecuencias (VHF)	Estos dispositivos usan transductores electrónicos integrados de desplazamiento basados en películas metálicas piezoresistivas, permitiendo un nanodispositivo de lectura sencilla y óptima	Temperatura ambiente y en vacío. La transducción no óptica permite usar este nanosensor en las aplicaciones que requieren alta sensibilidad. Q entre 1000-20 dependiendo la presión (30-1000 torr)	La detección de las vibraciones de 127 MHz se demuestra con una sensibilidad de desplazamiento termomecánico de $39 \text{ fg Hz}^{-1/2}$	Li y col. 2007.
<i>Cantilevers</i> de silicio de 4-5 μm x 1-2 μm x 20-30 nm (largo, ancho, espesor) como microresonadores	Detección de la masa de un virus individual. Las partículas de virus que se utilizaron fueron de vaccinia virus que es un miembro de la familia <i>Poxviridae</i>	Se utilizó un vibrómetro láser Doppler en condiciones ambientales para medir el cambio en la frecuencia de resonancia como función de la masa del virus unida al <i>cantilever</i> . Aire, $Q=5$	La detección de una partícula de virus fue en promedio de 9.5 fg	Gupta y col. 2004

4 Dispositivos integrados

Un microbiosensor es un MEMS (*microelectromechanical systems* por sus siglas en inglés) que a su vez es una estructura mecánica miniaturizada de geometrías y materiales diversos que convierte y acondicionan unas señales de entrada como presión, temperatura o concentraciones de sustancias químicas, en señales eléctricas. En el caso de un transductor MEMS, las señales eléctricas resultantes se acondicionan, ya sea para seguir procesándose o para exhibirse adecuadamente para su interpretación o lectura. Por consiguiente, un MEMS no sólo desempeña la función de detectar (microsensor), sino también de acondicionar respuestas (circuitos integrados) y genera acciones (microactuadores) (Leija, 2009). Los MEMS integran estructuras muy diversas, tales como: palancas (*cantilevers*), membranas o motores, entre otros, dando por resultado sensores, actuadores o una combinación de ambos (sistemas inteligentes o *smart sensors*). La miniaturización de los MEMS permite aumentar la resolución y reducir el tiempo de respuesta, el consumo de energía y los costos de producción, características que los convierten en productos de gran interés industrial. Esta tendencia a la miniaturización ha dado origen a los NEMS, en los que las dimensiones van desde las centenas de nanómetro hasta unidades de nanómetro, y donde generalmente se usan otros tipos de estructuras diferentes a los *cantilevers*, como nanotubos o nanoalambres, aunque con las técnicas actuales de simulación, nanolitografía y nanomaquinado se han podido obtener *nanocantilevers* que se han aplicado como sensores de gases y de virus (Li y col., 2007; Gupta y col., 2004b).

Para diseñar y fabricar un sensor basado en tecnología MEMS, se puede proponer un procedimiento simplificado que implica el diseño, simulación, fabricación y verificación del dispositivo. La Fig. 10, muestra un ejemplo de posibles etapas a seguir para fabricar un *cantilever* que puede ser usado como un MEMS. El diseño inicial involucra el uso de programas de diseño asistido por computadora comúnmente conocidos como plataformas CAD (por sus siglas en inglés *Computer Aided Design*). Programas como SUMMIT V permiten realizar el diseño inicial (Fig. 10a) y establecer las capas de polisilicio que se requerirán en el proceso de fabricación, así como realizar el modelo 3D para visualizar el modelo final (Fig. 10c). Para mejorar los diseños, se pueden usar otras herramientas que permitan tener una mayor sensibilidad, como las de simulación basada en dinámica computacional de fluidos (CFD por sus siglas en inglés *computational fluid dynamics*) (Fig. 10b). Programas como ANSYS y COMSOL son útiles para este propósito.

En el micromecanizado de superficie, los elementos se definen sobre capas depositadas o crecidas previamente sobre el sustrato de partida. La Fig. 10d muestra un esquema en sección de las etapas más significativas de las dos posibilidades de implementación de micromecanizado de superficie (Villarroya, 2005). Los procesos correspondientes a una o dos máscaras se refieren a los niveles necesarios

para definir la forma de la capa estructural. En el proceso de una máscara (Fig. 10d izquierda) en primer lugar se crece una primera capa sacrificial sobre el sustrato, que se eliminará posteriormente, y sobre esta capa se crece una capa estructural, que será la que forma la microestructura. Finalmente, mediante un ataque húmedo se elimina la capa sacrificial y así se libera la estructura.

En el proceso de dos máscaras (Fig. 10d izquierda), primero se deposita la capa sacrificial y sobre esta se define un patrón que será el contacto de la capa estructural con el sustrato y a la vez hará de anclaje de la estructura. A continuación, se deposita la capa estructural sobre la que se define la estructura. Después, se libera la estructura con el mismo procedimiento que en el proceso anterior (Villarroya, 2005). Para la fabricación de MEMS se requieren áreas de trabajo especiales, por ejemplo cuartos limpios también conocidos como salas blancas. Uno de los procesos más usados es la fotolitografía, que involucra la deposición de la fotoresina, horneado, alineación y exposición a rayos ultravioleta. Esto se puede realizar de forma automática pudiendo fabricar cientos o miles de diseños o unidades en una sola oblea. La Fig. 10e muestra un ejemplo de esto y una microfotografía de un *microcantilever* construido sobre una oblea.

Una vez construidos los elementos mecánicos de transducción, se pueden funcionalizar con biomoléculas e integrarse a los elementos de detección, amplificación de señal y actuadores en un sistema encapsulado o aislado, formando así el MEMS. Pero cuando se usan elementos biológicos en la fabricación de estos dispositivos, son entonces llamados BioMEMS (*biological or biomedical microelectromechanical systems* por sus siglas en inglés), siendo en la actualidad un tema de investigación en fuerte desarrollo y con importantes aplicaciones biomédicas, incluida el área de alimentos (Dong y col., 2010, Kim y col., 2009, Staples y col., 2006). Los BioMEMS son definidos como dispositivos o sistemas construidos por medio de técnicas inspiradas en procesos de microfabricación, que se pueden usar en funciones de procesamiento, transporte, manipulación, análisis, diagnóstico (biodectección), o construcción de sistemas biológicos o químicos (Bashir 2004; Sósol-Fernández y col., 2012). Los BioMEMS dedicados a eventos de biodectección también se conocen como lab-on-a-chip y en menor manera mediante el término mTAS (*micro-total analysis systems por sus siglas en inglés*). Generalmente, en el diseño y fabricación de BioMEMS se busca que sean portables o con el tamaño de un microcircuito estándar. En el pasado, muchos prototipos eran sistemas que requerían elementos periféricos para la detección de señal, inyección de muestra, control ambiental entre otros elementos que no permitían hacerlos portables (Fig. 11a).

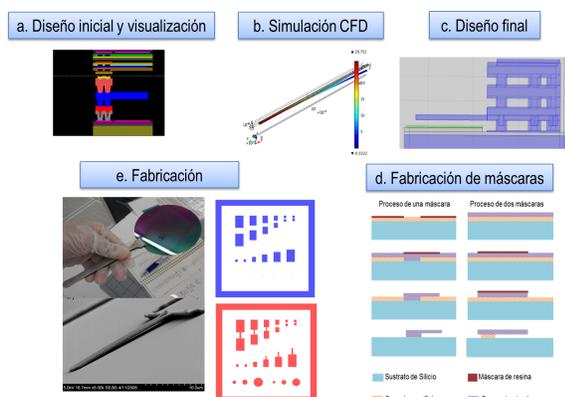


Fig. 10. Etapas para el diseño, simulación y fabricación de un cantilever para su uso como biosensor.

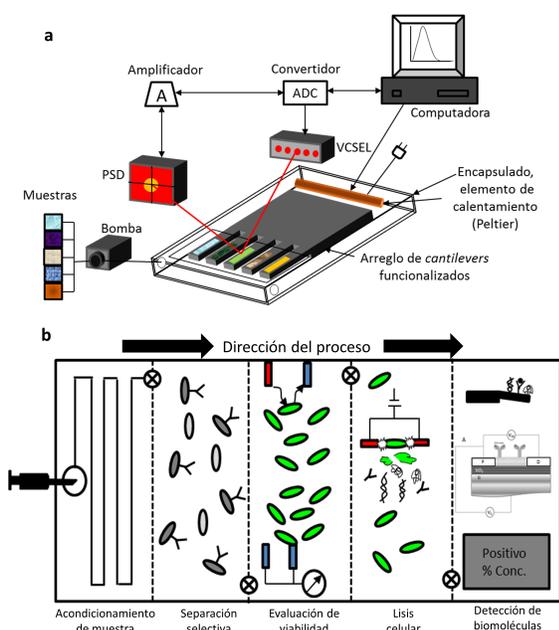


Fig. 11. a) BiOMEMS semi-portable para la detección simultánea de múltiples analitos, PSD (*position sensitive photodetector*), A (amplificador), ADC (*analog-to-digital converter*), VCSEL (*vertical cavity surface emitting laser* por sus siglas en inglés). b) Propuesta de un BiOMEMS o lab-on-a-chip en bloques funcionales para la detección de microorganismos o biomoléculas, se indican las posibles etapas acopladas para una secuencia de biodetección desde una muestra no purificada. (Adaptada de Lang y col. 2005 y Bashir 2004).

En la actualidad, los sistemas que se desarrollan son totalmente portables, aprovechando los avances que se tienen en micromaquinado, microelectrónica, microfluídica, procesos de separación, biodetección, genómica y proteómica, entre otras áreas (Lapizco-Encinas, 2008; Camarillo-Escobedo y col., 2012). Hoy en día se busca a

toda costa integrar en un solo dispositivo todas las etapas que están involucradas en el proceso de biodetección, como son el manejo de la muestra, preparación, mezclado, separación, lisis celular y la detección. En la Fig. 11b se pueden observar las etapas de preparación de la muestra requeridas para aislar y concentrar la célula o muestra de otros elementos que pueden interferir en la detección, lo cual podría hacerse por electroforesis, microfiltros o tamices moleculares, entre otras herramientas de purificación. Posteriormente para la separación de las especies patógenas se puede realizar bioconjugación con anticuerpos y si se desea ver qué células son viables se pueden usar técnicas de fluorescencia, marcaje o técnicas electroquímicas. Algunas posibles técnicas que se usan para liberar el analito blanco son métodos on-chip-PCR, *cantilevers*, nanosensores fabricados con nanotubos o nanoalambres. El proceso de transporte de la muestra a través del BioMEMS se puede realizar por gradientes osmóticos, eléctricos o diferencial de presión (Bashir 2004; Sósol-Fernández y col. 2012). Al final, el usuario no experto en técnicas de biodetección recibe el resultado de la prueba en una pantalla de cristal líquido, tal como sucede actualmente con los glucómetros que son los biosensores más conocidos y de mayor comercialización.

La tendencia actual es alcanzar un mayor nivel de sensibilidad en la detección a través del uso de componentes nanométricos como nanotubos, nanoalambres, nanopartículas o *quantum dots*. Cuando estos elementos son usados en un dispositivo, el nombre que generalmente reciben es el de BioNEMS (*biological or biomedical nanoelectromechanical systems* por sus siglas en inglés).

Conclusiones y tendencias futuras

La tendencia actual para el desarrollo de biosensores está dirigida principalmente a: mejorar su sensibilidad, especificidad, funcionalidad, portabilidad y costo, lo que se ha logrado a través de reducir su tamaño con el uso de elementos micro y nanométricos, optimizando las condiciones de operación, modificando su geometría, empleando nuevos materiales con mayor biocompatibilidad y más económicos (elastómeros y biopolímeros biodegradables), también se han mejorado los procesos de micromaquinado y métodos para la detección de señales empleando biomoléculas específicas, multiarreglos para detección simultánea de analitos, estudios cinéticos, diagnósticos no invasivos y libres de dolor, entre otras áreas de donde ahora se han enfocado los esfuerzos de investigación y desarrollo. Una de las posibles explicaciones de la intensa actividad que existe en el desarrollo e investigación de los biosensores es su alto valor de mercado que, de acuerdo con el último reporte de GIA (Global Industry Analysts), predice que para el 2015 el mercado de los biosensores alcanzara los 12 billones de dólares americanos, siendo Norteamérica, Europa y Asia-Pacífico las áreas de mayor consumo, inversión y desarrollo. Sin embargo, el mayor crecimiento sigue estando en el área

biomédica para problemas de monitoreo de diabetes y obesidad. Así, los sensores de glucosa dominan el mercado desde ya hace varios años, pero otras aplicaciones empiezan a ser importantes como la detección y análisis de drogas o sustancias prohibidas en sangre (dopaje), analizadores completos de la química sanguínea y sensores portables en tiempo real para el cuidado de la salud, pruebas de colesterol, urea, cáncer, kits compactos, portables y amigables para todo tipo de análisis, entre otros diversos ejemplos.

El desarrollo en biosensores está impulsado actualmente por el uso de la micro y nanotecnología. Sin embargo, otras áreas diferentes a la biomédica requieren una mayor atención, como es el caso de los alimentos, donde existe un rezago importante. Por ejemplo, en alimentos se han usado pocos microbiosensores directamente sobre las muestras; solamente dos de los casos revisados se han aplicado directamente sobre tomate para detectar *S. typhimurium*, y aunque las sensibilidades alcanzadas hasta el momento son suficientes y superan las pruebas tradicionalmente usadas para el control de la inocuidad alimentaria, se requiere una mayor portabilidad, reducción del costo, capacidad de reutilización y que permitan evaluar muestras en medio líquido y sin tratamiento previo. Por ello, se visualiza un área de oportunidad para el desarrollo e investigación de biosensores de uso específico en alimentos para la detección de aromas, microorganismos en la superficie o dentro de productos frescos, pesticidas, contaminantes, fertilizantes, genes, estimación de madurez y vida de anaquel, uso de aditivos o detección de metales pesados entre otras aplicaciones. Todas éstas aplicaciones se pueden desarrollar aprovechando el avance ya realizado en otras áreas, por lo que es posible que estos desarrollos lleguen a ser muy pronto de uso cotidiano también en el área agroalimentaria.

Esta revisión del estado del arte de los biosensores para aplicaciones biológicas y alimentarias, se presenta como una guía general e introductoria que intenta cubrir los aspectos más relevantes de esta tecnología, haciendo énfasis en los biosensores mecánicos ya que tienen un importante potencial de aplicación, y también como ejemplo para ilustrar los métodos para evaluar el desempeño de microbiosensores aprovechando plataformas accesibles como por ejemplo la microscopía de fuerza atómica y el uso de *microcantilevers* como elemento de transducción.

Agradecimientos

Angélica Gabriela Mendoza Madrigal agradece a CONACyT y COFAA-IPN por las becas proporcionadas para la realización de sus estudios. La investigación fue financiada a través de los proyectos 20121001 y 20130333 del Instituto Politécnico Nacional y de la “Cátedra Coca-Cola para jóvenes investigadores 2011” (Coca-Cola CONACyT). El autor de correspondencia también agradece al CONACYT y a la Secretaría Académica por el soporte financiero de la estancia y año sabático (agosto de 2012 a agosto 2013).

Nomenclatura

<i>A</i>	amplificador
ADC	analog-to-digital converter
A_{dc}	amplitud del cantilever a cero de frecuencia, V
$A(f)$	amplitud de respuesta, V
<i>ag</i>	attogramos
A_{max}	amplitud máxima, V
BioMEMS	biological or biomedical microelectromechanical systems
BioNEMS	biological or biomedical nanoelectromechanical systems
BSA	bovine serum albumin
<i>c</i>	constante de ajuste, Hz
CAD	computer aided design
CFD	computational fluid dynamics
<i>E</i>	módulo de Young del <i>cantilever</i> , kg/m ²
<i>f</i>	frecuencia de resonancia fundamental de la viga, Hz
<i>f</i>	frecuencia de excitación del resonador, Hz
f_0	frecuencia de resonancia inicial, Hz
f_1	frecuencia de resonancia después de la interacción
<i>fg</i>	femtogramos
GIA	Global Industry Analysts
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<i>k</i>	constante de elasticidad de la viga, N/m
K	grados Kelvin
<i>l</i>	longitud del <i>cantilever</i> , m
LOD	límite de detección, kg
<i>m</i>	masa del <i>cantilever</i> , kg
m^*	masa efectiva del <i>cantilever</i> , kg
m_b	masa de la palanca suspendida, kg
MEB	microscopía electrónica de barrido
MEMS	microelectromechanical systems
MF	microscopía fotónica
MFA	microscopía de fuerza atómica
<i>MR</i>	medio de resonancia
mTAS	micro-total analysis systems
<i>N</i>	factor de corrección geométrico, adimensional
NEMS	nanoelectromechanical systems
ng	nanogramos
PEG	polietilenglicol
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PSD	position sensitive detector
<i>Q</i>	factor de calidad, adimensional
QCM	quartz crystal microbalance
<i>R</i>	radio de curvatura de la palanca, m
R^2	coeficiente de correlación
<i>S</i>	sensibilidad
SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SERS	surface enhanced Raman scattering
<i>S PR</i>	surface plasmon resonance

t	espesor del <i>cantilever</i> , m
TS	tamaño del sensor
UFC	unidades formadoras de colonias, adimensional
VCSEL	vertical cavity surface emitting laser
w	ancho del <i>cantilever</i> , m
W	energía almacenada, $\text{kg m}^2/\text{s}^3$
zg	zeptogramos

Símbolos griegos

Δf	desplazamiento de la frecuencia de resonancia, Hz
Δf_{fwhm}	ancho del pico de resonancia principal, Hz
Δk	cambio en la constante de elasticidad, N/m
Δm	masa agregada o cambio, kg
Δm_{min}	mínima masa agregada detectable, kg
$\Delta\sigma$	diferencia de tensión en la caras de la viga, kg/m^2
$\Delta\sigma_2$	tensiones en la superficie inferior de la viga, kg/m^2
$\Delta\sigma_1$	tensiones en la superficie superior de la viga, kg/m^2
ΔW	energía disipada, $\text{kg m}^2/\text{s}^3$
Δz	desplazamiento o flexión del <i>cantilever</i> , m
$\Gamma(\omega_i)$	parte imaginaria de la función hidrodinámica, adimensional
ρ	densidad de la viga, kg/m^3
ρ_f	densidad del fluido (aire o líquido), kg/m^3
σ_b	sensibilidad del biosensor, Hz/kg
ν	constante de Poisson, adimensional
ω	frecuencia de resonancia radial, Hz

Referencias

- Akyilmaz, E., Erdogan, A., Öztürk, R., Yasa, I. (2007). Sensitive determination of L-lysine with a new amperometric microbial biosensor based on *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 1055-1060
- Bashir R. (2004). BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 1565-1586.
- Bashir, R., Hilt, J. Z., Elibol, O., Gupta, A., Peppas, N. A. (2002). Micromechanical *cantilever* as an ultrasensitive pH microsensor. *Applied Physics Letters* 81, 3091- 3093.
- Burg, T. P., Manalis, S. R. (2003). Suspended microchannel resonators for biomolecular detection. *Applied Physics Letters* 83, 2698-2700.
- Burnham, N. A., Chen, X., Hodges, C. S., Matei, G. A., Thoreson, E. J., Roberts, C. J., Davies, M. C., Tendler, S. J. B. (2003). Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy *cantilever*. *Nanotechnology* 14, 1-6.
- Byrne, B., Stack, E., Gilmartin, N., O'Kennedy, R. (2009). Antibody-based sensors: Principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. *Sensors* 9, 4407-4445.
- Camarillo-Escobedo, R. M., Valdés-Perezgasga, F., Alonso-Chamarro, J. (2012). Desarrollo de un sistema hidrodinámico para sistemas de análisis de flujo miniaturizados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 299-307.
- Campbell, G., Uknalis, J., Tu, S-I., Mutharasan, R. (2007). Detect of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef samples using piezoelectric excited millimeter-sized *cantilever* (PEMC) sensors. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 1296-1302.
- Capobianco, J. A., Shih, W. H., Leu, J. H., Lo, G. C. F., Shih, W. Y. (2010). Label free detection of white spot syndrome virus using lead magnesium niobate-lead titanate piezoelectric microcantilever sensors. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 964-969.
- Cha, B. H., Lee, S. M., Park, J. C., Hwang, K. S., Kim, S. K., Lee, Y. S., Ju, B. K., Kim, T. S. (2009). Detection of Hepatitis B Virus (HBV) DNA at femtomolar concentrations using a silica nanoparticle-enhanced microcantilever sensor. *Biosensors and Bioelectronics* 25, 130-135.
- Chen G. Y., Thundat, T., Wachter, E. A., Warmack, R. J. (1995). Adsorption-induced surface stress and its effects on resonance frequency of microcantilevers. *Journal of Applied Physics* 77, 3618-3622.
- Chen, S. H., Wu, V. C. H., Chuang, Y. C., Lin, C. S. (2008). Using oligonucleotide-functionalized Au nanoparticles to rapidly detect foodborne pathogens on a piezoelectric biosensor. *Journal of Microbiology Methods* 73, 7-17.
- Clark, L. C. Jr.; Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* 102, 29-45.
- Cleveland, J. P., Manne, S., Bocek, D, Hansma, P. K. (1993). A nondestructive method for determining the spring constant of cantilever for scanning force microscopy. *Review of Scientific Instruments* 64, 403-405.
- Close, D. M., Ripp, S., Sayler, G. S. (2009). Reporter proteins in whole-cell optical bioreporter detection systems, biosensor integrations, and biosensing applications. *Sensors* 9, 9147-9174.
- Datskos, P. G., Lavrik, N. V., Sepaniak, M. J. (2005). Chemical and biological sensors based on microcantilevers. Chapter 11 en: *Smart Sensors and MEMS* (Yurish S. Y. y Gomes M.T.S.R.), Pp. 331-379. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Dong, H., Fang, J., Zhou, B., Qin, J. Wan, S. (2010). Review of atomic MEMS: driving technologies and challenges. *Microsystem Technology* 16, 1683-1689.

- Dufour, I., Josse, F., Heinrich, S., Lucat, C., Ayela, C., Méné, F., Brand, O. (2010). Unconventional uses of *cantilever* for chemical sensing in gas and liquid environments. *Procedia Engineering* 5, 1021-1026.
- Englebienne, P., Hoonacker, A. V., Verhas, M. (2003). Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. *Spectroscopy* 17, 255-273.
- Ercole, C., Del Gallo, M., Mosiello, L., Baccella, S., Lepidi, A. (2003). *Escherichia coli* detection in vegetable food by a potentiometric biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 91, 163-168.
- Fan, R., Karnik, R., Yue, M., Li, D., Majumdar, A., Yang, P. (2005). DNA translocation in inorganic nanotubes. *Nano Letters* 5, 1633-1637.
- Gfeller, K. Y., Nugaeva, N., Herner, M. (2005). Micromechanical oscillators as rapid biosensor for the detection of active growth of *Escherichia coli*. *Biosensors and Bioelectronics* 21, 528-533.
- Giessibl, F.J. (2003). Advances in atomic force microscopy. *Reviews of Modern Physics* 75, 949-983.
- Global Industry Analysts. Biosensors in Medical Diagnostics: A Global Strategic Business Report. http://www.strategyr.com/Biosensors_in_Medical_Diagnostics_Market_Report.asp. Último acceso 18 de enero del 2013.
- Gupta, A., Akin, D., Bashir, R. (2004a). Detection of bacterial cells and antibodies using surface micromachined thin silicon *cantilever* resonators. *Journal of Vacuum Science & Technology B* 22, 2785.
- Gupta, A., Akin, D., Bashir, R. (2004b). Single virus particle mass detection using microresonators with nanoscale thickness. *Applied Physics Letters* 84, 1976-1978.
- Hsing, I. M., Xu, Y., Zhao, W. (2007). Micro and nano magnetic particles for applications in biosensing. *Electroanalysis* 19, 755-768.
- Huo, Q., Worden, J. G. (2007). Monofunctional gold nanoparticles: synthesis and applications. *Journal of Nanoparticles Research* 9, 1013-1025.
- Hwang, K., S., Lee, J. H., Park, J., Yoon, D.S., Park, J. H., Kim, T. S. (2004). In situ quantitative analysis of prostate-specific antigen (PSA) using nanomechanical PZT *cantilever*. *Lab on a Chip* 4, 547-552.
- Ilic, B., Craighead, H.G., Krylov, S., Senaratne, W. Ober, C., Neuzil, P. (2004). Attogram detection using nano electromechanical oscillators. *Journal of Applied Physics* 95, 3694-3703.
- Ilic, B., Czaplowski, D., Craighead, H. G., Neuzil, P., Campagnolo, C., Batt, C. (2000). Mechanical resonant immunospecific biological detector. *Applied Physics Letters* 77, 450-452.
- Ivinski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P., Wilkins, E., Stricker, S. (2000). Application of electrochemical biosensors for detection of food pathogenic bacteria. *Electroanalysis* 12, 317-325.
- Jamieson, T., Bakhshi, R., Petrova, D., Pocock, R., Imani, M., Seifalian, A. M. (2007). Biological applications of quantum dots. *Biomaterials* 28, 4717-4732.
- Jeong, H-H., Erdene, N., Park, J-H., Jeong, D-H. (2012). Real-time label-free immunoassay of interferon-gamma and prostate-specific antigen using a Fiber-Optic Localized Surface Plasmon Resonance sensor. *Biosensors and Bioelectronics* 39, 346-351.
- Jianrong C., Yuqing, M., Nongyue H., Xiaohua W., Sijiao, L. (2004). Nanotechnology and biosensors. *Biotechnology Advances* 22, 505-518.
- Johnson, B. N., Mutharasan, R. (2012). Biosensing using dynamic-mode *cantilever* sensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics* 32, 1-18.
- Kim, J., Junkin, M., Kim, D. H., Kwon, S., Shin, Y. S., Wong, P. K., Gale, B. K. (2009). Applications, techniques, and microfluidic interfacing for nanoscale biosensing. *Microfluidics and Nanofluidics* 7, 149-167.
- Kim, S., Kihm, K. D., Thundat, T. (2010). Fluidic applications for atomic force microscopy (AFM) with microcantilever sensors. *Experiments in Fluids* 48, 1-16.
- Kim, S., Kim, K. C., Kihm, K. D. (2007). Near-field thermometry sensor based on the thermal resonance of a microcantilever in aqueous medium. *Sensors* 7, 3156-3165.
- Ko, S. H., Grant, S. A. (2006). A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium*. *Biosensors and Bioelectronics* 21, 1283-1290.
- Lang, H. P., Hegner, M., Gerber, C. (2005). *Cantilever* array sensors. *Materials Today* 30-36.
- Lang, H. P., Hegner, M., Meyer, E., Gerber, C. (2002). Nanomechanics from atomic resolution to molecular recognition based on atomic force microscopy technology. *Nanotechnology* 13, R29-R36.
- Länge, K., Rapp, B. E., Rapp, M. (2008). Surface acoustic wave biosensors: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 1509-1519.
- Lapizco-Encinas, B. H. (2008). Aplicaciones de microfluídica en bioseparaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 7, 205-214.
- Lavrik, N. V., Sepaniak, M. J., Datskos, P. G. (2004). *Cantilever* transducers as a platform for chemical and biological sensors. *Review of Scientific Instruments* 75, 2229-2253.

- Lazcka, O., Del Campo, F. J., Muñoz, F. X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 1205-1217.
- Leija, L. (2009). *Métodos de Procesamiento Avanzado e Inteligencia Artificial en Sistemas Sensors y Biosensores*. Editorial Reverté. Pp: 13-34, 67-85, 127-143, 219-248.
- Lermo, A., Campoy, S., Barbe, J., Hernandez, S., Alegret, S., Pividori, M. (2007). In situ DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 2010-2017.
- Li, H., Liu, S., Dai, Z., Bao, J., Yang, X. (2009a). Applications of nanomaterials in electrochemical enzyme biosensors. *Sensors* 9, 8547-8561.
- Li, Mo., Tang, X., Roukes, M. L. (2007). Ultra-sensitive NEMS-based *cantilever* for sensing, scanned probe and very high-frequency applications. *Nature Nanotechnology* 2, 114-120.
- Li, S., Fu, L., Barbaree, J. M., Cheng, Z.-Y. (2009b). Resonance behavior of magnetostrictive micro/millimetric *cantilever* and its application as a biosensor. *Sensors & Actuators: B. Chemical* 137, 692-699.
- Li, S., Li, Y., Chen, H., Horikawa, S. Shen, W. Simonian, A. Chin, B. A. (2010). Direct detection of Salmonella typhimurium on fresh produce using phage-based magnetoelastic biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 1313-1319.
- Liu, B., Archer, C. T., Burdine, L., Gillette, T. G., Kodadek, T. (2007) Label transfer chemistry for the characterization of protein-protein interactions. *Journal of the American Chemical Society* 129, 12348-12349.
- Lübbe, J., Tröger, L., Torbrügge, S., Bechstein, R., Richter, C. Kühnle, A. and Reichling, M. (2010) Achieving high effective Q-factors in ultra-high vacuum dynamic force microscopy. *Measurement Science and Technology* 21, 1-9.
- Manalis, S.R., Minne, S. C., Atalar, A., Quate, C. F. (1996) Interdigital *cantilever* for atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* 6, 3944-3946.
- Mandal, P. K., Biswas, A. K., Choi, K., Pal, U.K. (2011). Methods for rapid detection of foodborne pathogens: An overview. *American Journal of Food Technology* 6, 87-102.
- Marx, K. A. (2003). Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution-Surface Interface. *Biomacromolecules* 4, 1099-1120.
- McNaught, A. D., Wilkinson, A. (1997). IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Minary-Jolandan, M., Tajik, A., Wang N. and Yu, M-F (2012). Intrinsically high-Q dynamic AFM imaging in liquid with a significantly extended needle tip. *Nanotechnology* 23, 235704.
- Muhammad-Tahir, Z., Alocilja, E. C. (2003). A conductometric biosensor for biosecurity. *Biosensors and Bioelectronics* 18, 813-819.
- Munoz-Berbel, X., Vignes, N., Jenkins, A. T., Mas, J., Munoz, F. J. (2008). Impedimetric approach for quantifying low bacteria concentrations based on the changes produced in the electrode-solution interface during the pre-attachment stage. *Biosensors and Bioelectronics* 23, 1540-1546.
- Naik, T., Longmire, E. K., Mantell, S. C. (2003). Dynamic response of a cantilever in liquid near a solid wall. *Sensors and Actuators A* 102, 240-254.
- Nguyena, B., Tanioua, F. A., Wilson, W. D. (2007). Biosensor-surface plasmon resonance: quantitative analysis of small molecule-nucleic acid interactions. *Methods* 42, 150-161.
- Nnebe I. and Schneider J. W. (2004). Characterization of Distance-Dependent Damping in Tapping-Mode Atomic Force Microscopy Force Measurements in Liquid. *Langmuir* 20, 3195-3201.
- Nugaeva, N., Gfeller, K. Y., Backmann, N., Lang, H. P., Düggelin, M., Hegner, M. (2005). Micromechanical *cantilever* array sensors for selective fungal immobilization and fast growth detection. *Biosensors and Bioelectronics* 21, 849-856.
- Oh, B-K., Lee, W., Chun, B. S., Bae, Y. M., Lee, W. H., Choi, J-W. (2005). The fabrication of protein chip based on surface plasmon resonance for detection of pathogens. *Biosensors and Bioelectronics* 20, 1847-1850.
- Pang, W. Yan, L. Zhang, H. Yu, H. Kim, E. S., Tang, W. C. (2006). Femtogram mass sensing platform based on lateral extensional mode piezoelectric resonator. *Applied Physics Letters* 88, 243503.
- Radke, S. M., Alocija, E. C. (2005). A high density microelectrode array biosensor for detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics* 20, 1662-1667.
- Raiteri, R., Grattarola, M., Berger R. (2002). Micromechanics senses biomolecules. *Materials Today*, 23-29.
- Raiteri, R., Grattarola, M., Butt, H. J., Sklǎdal, P. (2001). Micromechanical *cantilever*-based biosensor. *Sensors and Actuators B* 79, 115-126.
- Ricciardi, C., Canavese, G., Castagna, R., Digregorio, G., Ferrante, V., Marasso, S. Ricci, A., Alessandria V., Rantsiou, K., Cocolin. L. (2010). Online Portable Microcantilever Biosensors for *Salmonella enterica* Serotype *Enteritidis* Detection. *Food Bioprocess Technology* 3, 956-960.

- Sader, J. E., Sanelli, J. A., Adamson, B. D., Monty, J. P., Wei, X., Crawford, S. A., Friend, J. R., Marusic, I., Mulvaney, P., Bieske E. J. (2012). Spring constant calibration of atomic force microscope cantilever of arbitrary shape. *Review of Scientific Instruments* 83, 103705.
- Sader, J.E., (1998). Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to atomic force microscope. *Journal Applied Physics* 84, 64-76.
- Sader, J.E., Chon, J.W.M., Mulvaney, P., (1999). Calibration of rectangular atomic force microscope cantilever. *Review of Scientific Instruments* 70, 3967-3969.
- Singh, A., Glass, N., Tolba, M., Brovko, L., Griffiths, M., Evoy, S. (2009). Immobilization of bacteriophages on gold surfaces for the specific capture of pathogens. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 3645-3651.
- Song, S., Wang, L. Li, J., Zhao, J., Fan, C. (2008). Aptamer-based biosensors. *Trends in Analytical Chemistry* 27, 108-117.
- Sósol-Fernández, R.E., Marín-Lizárraga, V.M., Rosales-Cruzaley, E., Lapizco-Encinas, B.H. (2012). Análisis de células en dispositivos microfluídicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 227-248.
- Staples, M., Daniel, K., Cima, M. J., Langer R. (2006). Application of Micro- and Nano-Electromechanical Devices to Drug Delivery. *Pharmaceutical Research* 23, 843-863.
- Stefureac, R., Waldner, L., Howard, P., Lee, J. S. (2008). Nanopore analysis of a small 86-residue protein. *Small* 4, 59-63.
- Stoney G. G. The Tension of Metallic Films Deposited by Electrolysis. *Proceedings of the Royal Society of London A* 1909, 172-177.
- Su, L., Jia, W., Hou, C., Lei, Y. (2011). Microbial biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 1788-1799.
- Sungkanak, U., Sappat, A., Wisitsoraat, A., Promptmas, C., Tuantranon, A. (2010). Ultrasensitive detection of *Vibrio cholera* O1 using microcantilever-based biosensor with dynamic force microscopy. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 784-789.
- Van der Hurk, R., Evoy S. (2013). Deflection cantilever detection of interferon gamma. *Sensors and Actuators B: Chemical* 176, 960-965.
- Van Dorst, B., Mehta, J., Bekaert, K., Rouah-Martin, E. De Coen, W., Dubruel, P., Blust, R., Robbens, J. (2010). Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 1178-1194.
- Vaughan, R. D., O'Sullivan, C. K., Guilbault, G. G. (2001). Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Enzyme and Microbial Technology* 29, 635-638.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., Adley, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances* 28, 232-254.
- Villarroya, M. (2005). *Diseño y fabricación de sistemas micro/nano electromecánicos integrados monolíticamente para aplicaciones de sensores de masa y sensores biológicos con palancas como elementos transductores*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Vo-Dinh, T., Cullum, B. M., Stokes, D. L. (2001). Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics. *Sensors and Actuators* 74, 2-11.
- von Preissig, F. J. (1989). Applicability of the Classical Curvature-Stress Relation for Thin Films on Plate Substrates. *Journal of Applied Physics* 66, 4262.
- Waggoner, P. and Craighead, H. (2007). Micro- and nanomechanical sensors for environmental, chemical, and biological detection. *Lab on a Chip* 7, 1238-1255.
- Willets, K. A., Van Duyne, R. P. (2007). Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annual Review Physical Chemistry* 58, 267-297.
- Xia X, Li X. (2008). Resonance-mode effect on microcantilever mass-sensing performance in air. *Review of Scientific Instruments* 79, 074301.
- Xu, S. Mutharasan, R. (2010). Detection of *Cryptosporidium parvum* in buffer and in complex matrix using PEMC sensors at 5 oocysts/mL. *Analytical Chemistry Acta* 669, 81-86.
- Yang, Y.T., Callegari, C., Feng, X. L., Ekinci, K. L., Roukes M. L. (2006). Zeptogram-Scale Nanomechanical Mass Sensing. *Nano Letters* 6, 583-586.
- Zhang, G-J., Zhang, G., Chua, J. H., Chee, R-E., Wong, E. H., Agarwal, A., Buddharaju, K. D., Singh, N., Gao, Z., Balasubramanian, N. (2008). DNA sensing by silicon nanowire: charge layer distance dependence. *Nano Lettres* 8, 1066-1070.
- Zhang, J, Ji, H-F. (2004). An anti *E. coli* O157:H7 antibody-immobilized microcantilever for detection of *Escherichia Coli* (*E. coli*). *Analytical Sciences* 20, 585-587.
- Zhu, Q. Shih, W. Y., Shih, W-H. (2007). In situ, in-liquid, all-electrical detection of *Salmonella typhimurium* using lead titanate/zirconate/gold-coated glass cantilever at any dipping depth. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 3132-3138.