ISSN 1390-

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA

Volumen: 1, Nro. 1: 2012

Loja - Ecuador

2012

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

Volumen: 1, Nro. 1

Año: 2012

ISSN: 1390-7573

IEPI: CUE-000967

COMITE EDITORIAL:

Dr. Rómulo Chávez Valdivieso, Ph. D.
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN - UNL
Ing. Iván Granda Mora, Mg. Sc.,
DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

COMITÉ DE REVISIÓN:

Aminael Sánchez Rodríguez, Ph.D.,
Roldán Torres Gutiérrez, Ph.D.
Klever Iván Granda Mora, Mg. Sc.

EDITOR:

Rómulo Chávez Valdivieso, Ph.D.
DIRECCION: Ciudad Universitaria "Guillermo Falconí Espinosa", Sector "La Argelia"
EMAIL: centrobiotecnologia@unl.edu.ec

César Sandoya V.
RESPONSABLE DE COMUNICACIÓN INSTITUCIONAL

Byron Gutiérrez Q.
DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN - UNL

Loja – Ecuador

CONTENIDOS

I. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

6 **RECURSOS GENÉTICOS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN**
Autor: Ing. Aníbal Homero Ruiz Sánchez.

14 **BIOLOGÍA DE SISTEMAS Y BIOINFORMÁTICA: ESTUDIO DE INTERACCIONES FITOPATOLÓGICAS**
Autores: Ing. Marlon Pineda Escobar, Dr. Ph.D. Aminael Sánchez Rodríguez

23 **MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS Y SU CONTRIBUCIÓN A LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO**
Autores: Ing. Klever Iván Granda Mora, M.Sc., Biólogo. Santiago Erazo Sotomayor.

34 **USO DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS Y SUSTANCIAS NATURALES COMO UNA ALTERNATIVA ECOLÓGICA EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN CULTIVOS**
Autor: Ing. Ángel Rolando Robles Carrión, M.Sc.

44 **MARCADORES MOLECULARES GENERADOS PARA SOLANUM SECCIÓN LYCOPERSICON**
Autora: Ing. María Natalia Morales Palacio Mg.Sc.

50 **NANOESTRUCTURAS POLIMÉRICAS PARA LA DETECCIÓN DE ADN**
Autor: Ing. Iván Burneo Saavedra Mg. Sc.

II. RESUMEN DE PROYECTOS:

64 **"ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PATÓGENO-PATÓGENO, QUE SE ESTABLECEN DURANTE EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE LA MARCHITEZ VASCULAR EN EL BABACO (VASCONCELLEA HELBORNII VAR. PEN-TAGONA)"**
Autor: Ing. Marlon Pineda Escobar

64 **"PRODUCCIÓN DE UN BIOINOCULANTE EFICIENTE PARA EL CULTIVO DE LEGUMINOSAS: MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS"**
Autor: Ing. Kléver Iván Granda Mora, M.Sc

65 **"MARCADORES MOLECULARES GENERADOS PARA SOLANUM SECCIÓN LYCOPERSICON"**
Autor: Ing. María Natalia Morales Palacio, Mg.Sc

65 **"AMPLIACIÓN Y ESPECIALIZACIÓN DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA, PRIORIZANDO LEGUMINOSAS DE LA ZONA 7 DEL ECUADOR"**
Autor: Ing. Aníbal Homero Ruiz Sánchez.

66 **"DESARROLLO DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS "LABEL-FREE" MEDIANTE EL USO DE MATERIALES NANOESTRUCTURADOS PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA Y RÁPIDA DE CÁNCER".**
Autor: Ing. Iván Burneo Saavedra Mg. Sc.

66 **PRODUCCIÓN DE BACTERINAS INACTIVADAS PARA PREVENIR LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS DE ORIGEN BACTERIANO EN COBAYOS (Cavia porcellus) DE LA PROVINCIA DE LOJA.**
Autora: Med. Vet. Vanessa Herrera Yunga

III. INFORMATIVO

68 **INFORMATIVO DEL CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA - 2011**

EDITORIAL

El Centro de Biotecnología (CB) de la Universidad Nacional de Loja, se creó como una entidad responsable de la investigación científica aplicada, innovación biotecnológica y docencia, con el objetivo de impulsar la Biotecnología en beneficio de la colectividad, con especial énfasis en lo productivo y social, por lo tanto el CB considera las necesidades de los sectores agrícola, ambiental, pecuario, de salud pública, y apoyo a la investigación para la vida, el desarrollo y la legislación, siendo esta unidad académica un referente para la región sur y el Ecuador, que ofertará alternativas tecnológicas, y se proyecta a desarrollar estudios de Posgrado y de Maestría en Ciencias Biotecnológicas en coordinación con las Áreas Académicas de la Universidad Nacional de Loja y otras entidades públicas y privadas nacionales y externas.

El Centro de Biotecnología cuenta con instalaciones y equipamiento para realizar estudios, exploración y manipulación de genes de animales, plantas, y microorganismos de interés económico y ecológico, así como para desarrollar biotecnologías competitivas, con enfoque multi e interdisciplinario

La presente publicación abarca artículos de revisión sobre las temáticas biotecnológicas referentes a los proyectos de investigación propuestos a desarrollar en el Centro de Biotecnología, en los que se proporciona en forma resumida y analítica el Estado del Arte con la información actualizada generada por centros e investigadores del mundo científico. En la segunda sección se proporciona un resumen de los proyectos de generación biotecnológica que han sido formulados y elaborados por el personal de investigadores del Centro de Biotecnología y se han sometido al análisis de pares externos y a captación de financiamiento para su ejecución. Finalmente se describe las actividades vinculadas con la gestión del centro y cumplidas durante el año 2011.

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS:

Dr. Gustavo Villacís Rivas, Mg.Sc.,
RECTOR

Dr. Ernesto González Pesantes, Mg.Sc.,
VICERRECTOR

Dr. Rómulo Chávez Valdivieso, Ph.D.
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN - UNL

COMITÉ DIRECTIVO DEL CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA:

Dra. Graciela Yépez de Ruíz,
DIRECTORA DEL ÁREA JURÍDICA, SOCIAL Y ADMINISTRATIVA (E)

Dr. Edgar Benítez González, Mg.Sc.,
DIRECTOR DEL ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

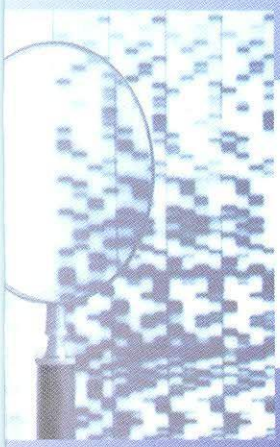
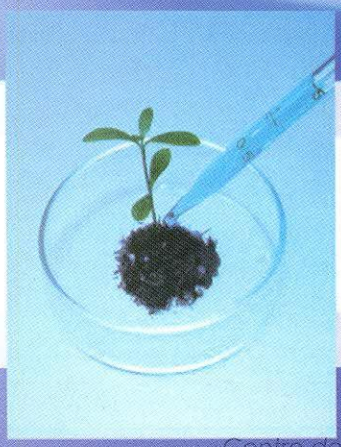
Dr. César León Aguirre,
DIRECTOR DEL ÁREA DE LA EDUCACIÓN, EL ARTE Y LA COMUNICACIÓN (E)

Dr. Jorge Reyes Jaramillo,
DIRECTOR DEL ÁREA DE LA SALUD HUMANA (E)

Ing. José Ochoa Alfaro,
DIRECTOR DEL ÁREA DE LA ENERGÍA, LAS INDUSTRIAS Y LOS RECURSOS NATURALES RENOVABLES

Dr. Tito Muñoz Guarnizo, Mg. Sc.,
DIRECTOR DEL CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA

I. Artículos de revisión

Centro de biotecnología. E-mail: centrobiotec

NANOESTRUCTURAS POLIMÉRICAS PARA LA DETECCIÓN DE ADN

Iván Burneo Saavedra1,

Programa de Máster en Nanociencia y Nanotecnología
Centro de Biotecnología
Universidad Nacional de Loja

Supervisores: Olivier Henry[1*], Ciara K. O'Sullivan1*, ‡
1Nanobiotechnology and Bioanalysis Group, Department of Chemical Engineering, Universitat Rovira I Virgili, Avinguda Paisos Catalans, 26, 43007, Tarragona, Spain,
‡ Institucio Catalana de Recerca i Estudis Avancats, Passeig Lluis Companys 23, 08010 Barcelona, Spain
e-mail: olivier.henry@urv.cat, ciara.osullivan@urv.cat

RESUMEN

El desarrollo de nuevos métodos de detección sigue siendo un tema de investigación muy activo en el campo de los biosensores ópticos o electroquímicos. La perspectiva de un análisis rápido requiere el procesamiento y manejo de las muestras en pocos pasos; esto unido a una detección rápida permitiría diagnósticos más económicos y la obtención de resultados más rápidamente. El uso de filmes nanoestructurados en biodetección es una herramienta versátil para desarrollar y satisfacer los requerimientos de tamaño de muchas tecnologías lab-on-a-chip. Para lograr este objetivo, se preparó films de block-copolímeros que contienen espacios cilíndricos sobre sustratos de oro, producidos por

revestimiento por centrifugado, mediante eliminación de la fase de poli(metil-metacrilato) (PMMA) de la capa de poli(estireno-b-metilmetacrilato) (PS-b-PMMA), usando el método de degradación UV y grabado químico con ácido acético. Las condiciones de la operación de revestimiento por centrifugación fueron optimizadas para preparar filmes de 10-20 nm de espesor, medido por reflectometría de Rayos X. La morfología de las películas fue caracterizada mediante microscopia de fuerza atómica (AFM) y las técnicas electroquímicas tales como voltametría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) se usaron para evaluar el comportamiento electroquímico de los electrodos nanoestructurados resultantes para la fabricación de sensores electroquímicos de ADN.

Palabras clave: Diblock copolímeros, nanoporos, bisoensores electroquímicos de ADN.

ABSTRACT

The development of new detection methods remains a very active research topic in the field of optical and electrochemical biosensors. The prospect of a rapid analysis requires processing and handling of samples in a few steps, and this coupled with rapid screening diagnoses would enable a more economic and obtain results faster. The use of nanostructured films in biosensing is a versatile tool to develop and meet the re-quirements size of many lab-on-a-chips. To achieve this goal, we prepared films of block-copolymers containing cylindrical spaces gold substrates produced by spin coating, by eliminating the phase of poly (methyl methacrylate) (PMMA) layer of poly (styrene-b-methyl methacrylate) (PS-b-PMMA), using the method of UV degradation and etching with acetic acid. The conditions of the coating operation by centrifugation were optimized to prepare films of 10-20 nm thickness, measured by X-ray reflectometry The morphology of the films was characterized by atomic force microscopy (AFM) and electrochemical techniques such as cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used to evaluate the electrochemical behavior of nanostructured electrodes resulting in the manufacture of electrochemical sensors DNA.

Key words: Diblock copolymers, nanopores, DNA electrochemical bisoensozres.

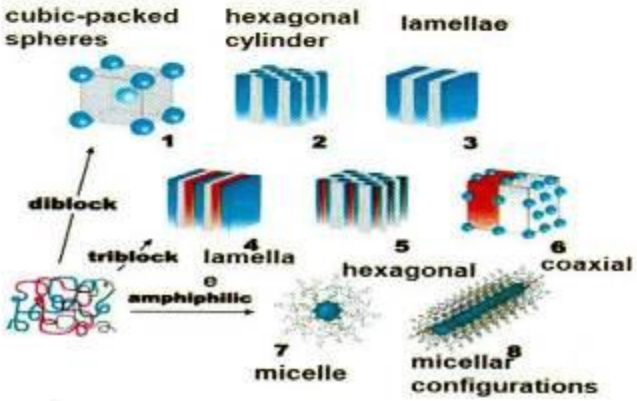
1. INTRODUCCIÓN

La consecución de patrones nanoscópicos funcionales regulares y el control de estructuras superficiales a la escala nanométrica son esenciales para el desarrollo de superficies con propiedades nuevas y útiles[1, 2]. Los filmes porosos han sido usados para la fabricación de materiales nanoestructurados que tienen aplicaciones potenciales en catálisis y nanolitografía, en electrónica, óptica y magnetismo, así como en biosensores [1, 3-5]. Los materiales nanoestructurados constituyen nuevas plataformas para la detección biomolecular que pueden proporcionar una mayor sensibilidad y susceptibilidad a la miniaturización [4, 5]. Los nuevos métodos de modelado basados en "top-down", incluyen varios enfoques litográficos que emplean UV, rayos X, interferencia, zone plane array, scanning óptico de campo cercano, haz de iones focalizados, haz de electrones, dip-pen y nano-impresión [6] para obtener nanoestructuras altamente ordenadas. Sin embargo, estas tecnologías siguen siendo caras y con limitaciones intrínsecas.

Como alternativa, la auto-organización de macromoléculas es una técnica emergente, promisoria y flexible [2], que se caracteriza por la formación espontánea de dominios de escala nanométrica que exhiben un alto grado de ordenamiento [7]. En este sentido, los block copolímeros (BCPs) son materiales ideales debido a la conectividad de las dos cadenas químicamente distintas en morfologías ordenadas con una escala de tamaño limitado por la dimensiones moleculares de las cadenas del polímero. Además, el tamaño y forma de los nanodominios pueden ser convenientemente controlados simplemente cambiando sus pesos molecula-

res y su composición [6, 8]. Los filmes delgados nanoporosos de BCPs son el centro de una intense investigación debido a su alto impacto para fabricar matrices de alta densidad para el almacenamiento de datos, la electrónica, la separación molecular, la química combinatoria, o la detección de ADN [5, 9-11].

Los blocopolímeros pueden ser considerados como dos o más fragmentos químicamente homogéneos de polímeros, es decir, cadenas de homopolímeros, unidas por enlaces covalentes para formar macromoléculas más complejas tales como los copolímeros lineales, di-, tri, o multibloque, y arquitecturas no lineales como multibrazo, starblock o graft copolímeros [12].



Esquema 1. Representación de varias clases de BCPs y los nanodominios formados. Adaptado de Lazarri et al. [12].

Los enfoques para controlar la orientación de los microdominios de blocopolímeros incluyen el uso de vapores de solventes, campos eléctricos, sustratos químicamente modelados, grafo epitaxia, cristalización epitaxial, control de interacciones interfacial, gradientes térmicos y zone casting [13]. Una vez fundida, se producirá la separación de fases entre los distintos bloques lo que se traduce en la formación de dominios laminares o cilíndricos como se representa en el Esquema 1. El espesor del film, el tiempo y la temperatura de annealing pueden ayudar a controla la uniformidad y la orientación del las películas auto-organizadas, mientras que el peso molecular del polímero y la variación de la longitud del bloque controlan el tamaño y la separación de los diferentes dominios. [7,14]. Para la fabricación de nanoestructuras, se remueve, posteriormente, uno de los bloques usando plasma o grabado químico [15]. Los filmes ultra delgados (<100 nm de espesor) de nanoelectrodos se prepararon por spin-coating de una capa de poliestireno-b-polimetil metacrilato (PS-b-PMMA) sobre sustratos de oro. Bajo condiciones óptimas, los bloques se auto-organizan para formar dominios cilíndricos perpendiculares a la superficie. Los bloques de PMMA pueden ser grabados por simple exposición a luz ultravioleta y ácido acético para exponer la superficie de oro.

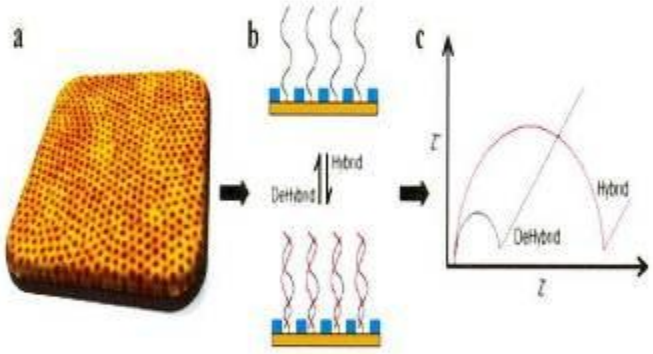
La razón principal para el uso de nanoelectrodos es el beneficio obtenido por la transferencia de masa mejorada debido al dominio de la difusión radial, disminución de las corrientes de carga y reducción de los efectos deletéreos debidos a la resistencia de la solución [16]. Como el electrodo disminuye en tamaño, la difusión radial se vuelve predominante y dando como resultado un transporte de masa más rápido y mejor sensibilidad, tiempos de respuesta más rápidos, y respuestas independientes de convección en comparación con los electrodos de tamaño macro. [14, 16,17].

El uso de filmes porosos nanoestrucurados en biodetección aparece como una herramienta versátil para desarrollar y satisfacer los requerimientos de tamaño de muchas tecnologías lab-on-a-chip [6]. Los sensores de ADN basados en nanomateriales pueden detector la presencia de genes o la mutación de genes asociados a enfermedades humanas hereditarias y pueden usarse directamente para el monitoreo directo de los eventos de hibridación [18]. Muchas técnicas que incluyen la fluorescencia, espectrometría de masa, electroquímica, espectroscopia de resonancia de plasmones de superficie y microbalanza de cristal de cuarzo, se han desarrollado para la detección de ADN [19]. Sin embargo, las técnicas electroquímicas ofrecen grandes ventajas debido a su simplicidad, rapidez, bajo costo y alta sensibilidad. Muchas metodología se han propuesto para el monitoreo electroquímico de la hibridización del ADN [19, 20] de acuerdo a como se haga la medición eléctrica, por ejemplo, voltametría, amperometría/culombimetría, o espectroscopia de impedancia [21, 22].

La espectroscopia de impedancia (EIS) se usa ampliamente en el campo de la investigación biomédica [23]. El potencial de la EIS se basa en que la impedancia del sistema puede ser escaneado en un amplio rango de frecuencias para determinar las propiedades electrónicas de las varias interfaces que lo componen, por lo general se describe como un circuito equivalente de las resistencias, los condensadores e inductores en paralelo o en serie. Los modelos de los circuitos equivalentes son útiles para la interpretación del espectro de impedancia, y como tal la EIS es una técnica valiosa para la investigación de la cinética y la morfología de los electrodos, de polímeros, de semiconductores, de sensores bioquímicos, de tejidos animales y vegetales [24]. El principal motivo para el estudio de sensores de impedancia es su capacidad para realizar detecciones label-free [21, 23, 25].

Esta técnica junto con indicadores electroactivos como el ferrocianuro de potasio, ha sido usada frecuentemente para caracterizar cadenas simples o dobles de ADN [24], para el seguimiento de la hibridización del ADN [26, 27] y para la detección de polimorfirmos de un solo nucleótido [28] usando electrodos modificados.

En este trabajo, presentamos los resultados tras el estudio de superficies de electrodos de oro modificados con nanoestructuras que de superficies de nanogaps poliméricos ultradelgados preparados mediante auto-organización de blocopolímeros de PS-b-PMMA de longitud de bloque variable para la fabricación de matrices de nanoelectrodos.



Esquema 2. Schematic of (a) surface nanostructure (top view), (b) effect of hybridisation and de-hybridisation event on the blocking of the pore structure and (c) read out of resulting surface impedance variation due to hybridisation and blocking of the pore structure.

Estos electrodos se usaron posteriormente para preparar sensores electroquímicos de ADN, inmovilizando cortas secuencias de ADN tiolado dentro de los poros poliméricos y monitoreando el evento de hibridización con una cadena de ADN complementario utilizando espectroscopia de impedancia electroquímica. La combinación de EIS y las matrices de nanoelectrodos podría ofrecer un método electrónico de detección simple basado en el aumento de la resistencia interfacial de la transferencia de electrones, asociada con el bloqueo de los poros seguido por la formación de un aducto de ADN, como se muestra en el Esquema 2.

La voltametría cíclica junto con la EIS se usó para monitorear la calidad del graba químico de los dominios de PMMA tanto como la detección de los eventos de hibridización después de la funcionalización de los electrodos con cadenas cortas de ADN, de 20 bases de longitud. La secuencia Exon 16, presente en el gen BRCA1 del cáncer de mama se usó como sistema modelo de ADN. Para caracterizar la morfología y el espesor de los films nanoporosos se usó Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) and y reflectometría de rayos-X. El presente trabajo demuestra que las estructuras de nanoporos permiten al sustrato de oro subyacente mantener la actividad electroquímica y ser usadas en la detección de ADN.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiales.

Ferrocianuro de potasio (III), tetrahidrofurano, tolueno y tampón fosfato salino pH 7.4 con Tween 20 (PBS-T) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (España), Sodio hexacianoferrato (II) decahidratado, cloruro de potasio, ácido sulfúrico, cloroformo y acetona fueron adquiridos de Scharlau Chemie (Barcelona, España), ácido acético glacial fue adquirido de Panreac (Barcelona, España). Se usó agua ultrapura (18 MΩ cm) obtenida con un

sistema Milli-Q RG (Barcelona, España). Los oligonucleótidos fueron comprados a Eurogentec (Eurogentec, España) y a Biomers.net GmbH (Ulm, Alemania). Las secuencias de oligonucleótidos empleadas en este trabajo se enumeran a continuación:

DNA-SH target (Exon 16): 5'-SH-AG-GGT-CAT-CAG-AGA-AGA-GG-3'
Sonda complementaria (Exon 16 A): 5'-CCT-CTT-CTC-TGA-TGA-CCC-T-3'

Los blocopolímeros (BCP) poli(estireno-block-metil metacrilato) (PS-b-PMMA) fueron comprados a Polymers Source Inc. (Montreal,Canada) y usados como fueron recibidos. Los sistema de blocopolímeros usados en este trabajos fueron PS(24 KDa)-b-PMMA(11.5 KDa) with Mw/Mn= 1.06, PS(39.8 KDa)-b-PMMA(17 KDa) with Mw/Mn= 1.06, PS(68 KDa)-b-PMMA(33.5 KDa) with Mw/Mn= 1.08, y PS(140 KDa)-b-PMMA(60 KDa) with Mw/Mn= 1.08.

Muchas técnicas que incluyen la fluorescencia, espectrometría de masa, electroquímica, espectroscopia de resonancia d plasmones de superficie y microbalanza de cristal de cuarzo, se han desarrollado para la detección de ADN.

La obleas de silicio de 4" de diámetro y 525 µm de espesor, recubiertas con 10 nm de titanio y 100 nm de oro fueron adquiridos a Platypus Technologies (Madison, USA), fueron usados como sustrato a menos que se indique lo contrario. Se obtuvo chips de 2 x 2 cm2 usando un lápiz de diamante a partir de las obleas de silicio (RS electronics, Michigan,USA), luego lavadas en agua milipore, acetona y secadas bajo flujo de nitrógeno, y finalmente limpiadas usando ozono con el sistema PSD-UVT ozone (Novascan Technologies, USA) durante 10 minutos.

2.2. Métodos

2.2.1. Fabricación de filmes poliméricos delgados. Los blocopolímeros PS-b-PMMA fueron disueltos en THF o tolueno para formar soluciones stock de 1 % w/v. Los films delgados fueron preparados por revestimiento por centrifugación en chips de silicio-oro 2 x 2 cm2 centrifugados a velocidades de 4000 rpm y cocidos a 170°C por 72 horas para obtener dominios cilíndricos. Los dominios de PMMA se degradaron usando una lámpara UV (350 W) durante 10 min, que consiste en el entrecruzamiento de la matriz de PS y la degradación de los dominios cilíndricos de PMMA. Posteriormente, la degradación dominios de PMMA se elimina por lavado con ácido acético glacial durante 5 min.

2.2.2. Caracterización

Medición del espesor de los films. El espesor de las películas de PS-b-PMMA se determinó utilizando reflectometría de rayos-X (XRR) antes de la radiación UV, las mediciones se realizaron con un difractómetro de rayos-x D-500 (Siemens, Alemania)

Morfología de las películas poliméricas. Se usó Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) para caracterizar la morfología de los films preparados. Se usó un 5400 Scanning Probe Microscope (SPM)/Atomic Force Microscope para obtener imagines de microscopía de fuerza atómica en modo tapping (Agilent Technologies, USA). Cantiléveres de silicio con constantes elásticas de resorte entre 5 y 40 N.m-1 y frecuencias de resonancia de 150 y 300 Hz se usaron para obtener las imágenes. El radio típico de los tips fue inferior de 10 nm. El análisis de las imágenes de AFM fue realizado usando el software WSxM (Nanotec Electrónica, España).

Voltametría cíclica y Espectroscopía de Impedancia. Los ensayos de voltametría cíclica (CV) y Espectroscopía de Impedancia (EIS) se realizaron usando un potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT controlado con los softwares General Purpose Electrochemical System (GPES) y Frequency Response Analyser (FRA) (Eco Chemie B.V., Holanda). Las mediciones se llevaron a cabo en una sola celda electroquímica en un arreglo de tres electrodos que consiste en filmes copoliméricas/DNA como electrodos de trabajo, un alambre de Ag/AgCl como electrodo de referencia y un alambre de Pt como electrodo de conteo. Los electrodos de

trabajo fueron chips cuadrados (2 cm × 2 cm) de silicio-oro. El diámetro de los electrodos de trabajo se definió por un agujero circular perforado en una máscara de plástico adhesivo de 6 mm de diámetro. El electrolito usado fue 10 mM Fe (CN)63-/10mM Fe(CN)64- en solución acuosa 0,1 M de KCl. Todos los potenciales se registraron con respecto al electrodo de referencia.

2.2.3. Ensayos analíticos

Inmovilización del AND. La inmovilización de las cadenas sencillas de ADN tiolado (HS-ssDNA) en la matriz de nanoelectrodos se logró mediante absorción química [29]. En resumen, 50 µL de una solución 1µM de la sonda tiolada, recién preparada en 1 µM KH2PO4 se depositó sobre la superficie del electrodo y se inmovilizó durante toda la noche en una cámara húmeda para evitar la evaporación. Luego los electrodos fueron lavados en una solución de PBS-Tween durante 5 min para eliminar las sondas no adsorbidas.

Hibridización. La hibridación se llevó a cabo a través de la adición de 50 µL (100 nM) de la sonda complementaria. El la secuencia de ADN blanco, Exon 16, se añadió a la superficie del electrodo de trabajo, seguido por un periodo de incubación de al menos una hora en una cámara húmeda, el electrodo fue lavado con PBS Tween por 5 minutos para remover cualquier secuencia no hibridada. La regeneración de los electrodos se logró por lavados con una solución acuosa de 20 mM Nao durante 5 min, seguido por enjuague con PBS 600 por 10 min, y finalmente con agua Milli-Q. Los procesos de hibridización fueron realizados dos veces. Los niveles de inmovilización, hibridización, y deshibridización fueron medidos usando voltametría cíclica y EIS.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología de los films delgados di-block-copoliméricos por Microscopía de Fuerza Atómica.

Se realizaron una serie de experimentos en los cuales se varió sistemáticamente los parámetros de procesamiento (temperatura de annealing y tiempo de grabado) con el fin de optimizar el proceso de auto-organización. Para caracterizar la morfología de los films resultantes, se analizó la distribución de perímetros de poros observados por de AFM, como una medida indirecta de la distribución del tamaño del poro.

Efecto del espesor del film

Todas las películas de block-copolímero en los sustratos de oro se prepararon por recubrimiento por rotación a diferentes velocidades de giro. Utilizando Reflectometría de Rayos-X (XRR), se estimó el espesor de las películas fabricadas a velocidades de 2000, 3000 y 4000 rpm se estimó su espesor en 49, 36 y 16 nm, respectivamente.

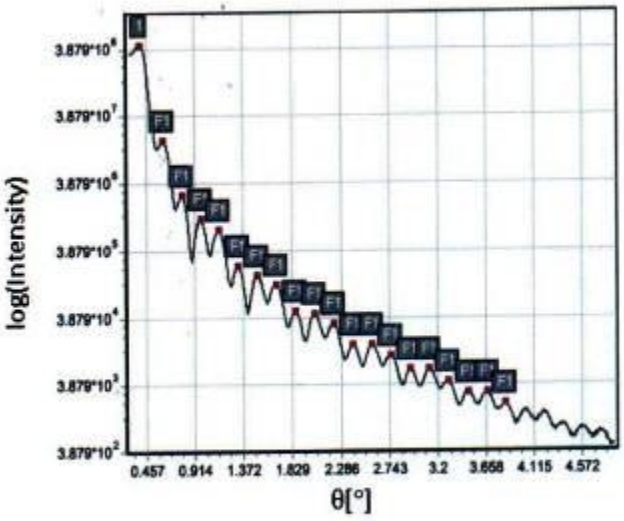


Figura 1. Espectros de reflectometría de rayos X (XRR) utilizados en la determinación del espesor de películas delgadas de blocopolímeros recubiertos por centrifugación a 4000 rpm.

En la determinación del espesor (Figura 1), el ángulo de incidencia del haz de rayos X utilizado es mayor que el ángulo crítico θ_c. La medida resultante consiste en un patrón de interferencia entre el haz incidente y el haz reflejado, que consta de un patrón periódico de fase lo que puede estar relacionado con el espesor total de la capa de en cuestión. El espesor se determinó usando la ecuación 1.

$$d \approx \frac{\lambda}{2}\frac{1}{\theta_{m+1}-\theta_m}, \quad \theta_m \gg \theta_c \qquad \text{E. 1}$$

donde d es el espesor de la película delgada, λ es la longitud de onda del rayo-x, y $\theta_{m+1} - \theta_m$ es la diferencia entre el ángulo de incidencia de dos máximos y mínimos cercanos [30].

El auto-ensamblaje de las plantillas ordenadas depende en gran medida del espesor películas de polímeros, como se muestra en la Figura 2. Está bien establecido que la morfología de las películas de blocopolímeros depende en gran medida el grosor de la superficie debido a las interacciones tienen lugar dentro de las películas [15].

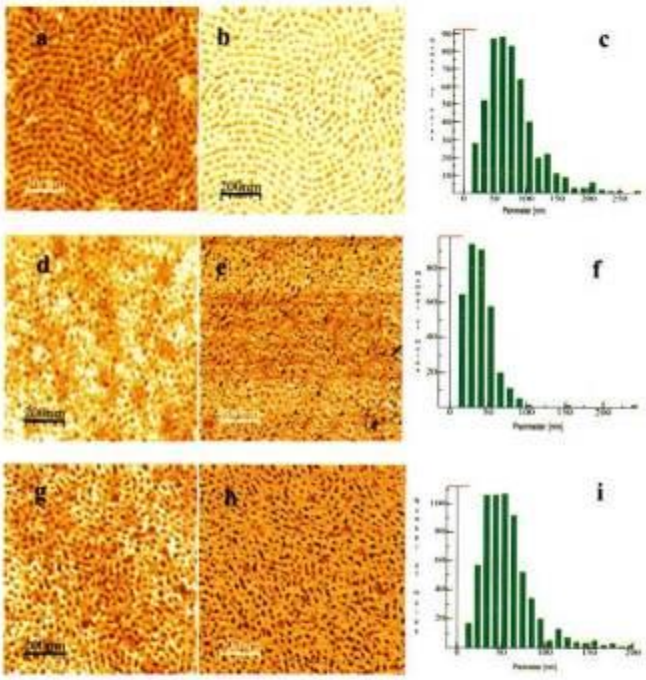


Figura 2. Análisis del efecto del espesor de PS-b-PMMA en el procesamiento de películas delgadas. Imágenes de altura y fase, y distribución del perímetro de los poros de la PS (39.8kDa)-b-PMMA (17kDa) 1% (w / v) en THF, a-c) girar a 2000 rpm,. d-f) 3000 rpm, y g i) 4.000 rpm.

La película más gruesa, de 49 nm centrifugada a 2000 rpm demostró una distribución ordenada y homogénea del tamaño de poro (Fig. 2a-c). Las películas más delgadas de 36 nm y 16 mostraron grandes distribuciones de tamaño de los poros con muy poco orden (Fig. 2d-i). Todas las películas se prepararon a una temperatura fija (165 ° C) durante 48 horas, que fue suficiente para asegurar la formación de una estructura equilibrada y mostraron una morfología que consta de poros redondeados y una orientación perpendicular. Las figuras 2c, 2f y 2i, muestran la distribución del perímetro de los poros. Se puede observar que el valor medio de los poros fue de aproximadamente 20 nm, suponiendo poros circulares, y la distancia entre poros más cercanos fue de 34 nm. Sin embargo, frente a la fabricación de películas delgadas como plataformas para el desarrollo de sensores de ADN, se prefirió las superficies ordenadas entre 10 y 20 nm de espesor a fin de evitar la limitación de la difusión del ADN presente en la muestra a través de los huecos en el ADN inmovilizado. Por tanto, se seleccionó una velocidad de revestimiento por centrifugado de 4000 rpm para el trabajo futuro.

Efecto de la naturaleza del sustrato

Las interacciones interfaciales entre los bloques de polímero determinan tanto el sustrato y las interfaces de superficie y, en consecuencia, la orientación de los microdominios dentro de la película [31].

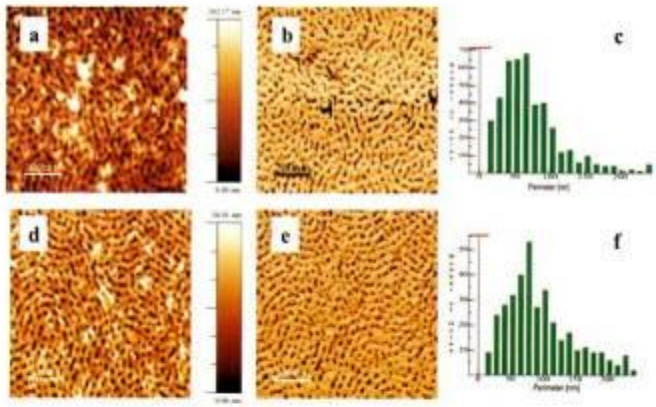


Figura 3. Análisis del efecto de la interacción de la superficie de silicio nativo y obleas de silicio con recubrimiento de oro, en películas delgadas de PS-b-PMMA. Imágenes de altura y fase, y de distribución del perímetro de los poros de PS (39.8kDa)-b-PMMA (17kDa) 1% en THF centrifugado a 2000 rpm, 10 min exposición UV y 2 min ataque químico con ácido acético glacial. a-b) imágenes de topografía y fase en la obleas recubiertas de oro, d-e) imágenes de topografía y fase en obleas de Si nativo, y c-f) distribución de perímetros de poro sobre el oro y Si, respectivamente.

Como tal, ya que la mayoría de los informes de películas delgadas de copolímeros en bloque patrón se han desarrollan en sustratos de silicio, se investigó también la influencia de los sustratos, es decir, en obleas

de silicio con recubrimiento de de oro y obleas de silicio nativo, sobre la morfología y orientación de las estructuras porosas. Las imágenes AFM de la figura 3 presentan la morfología de las películas sobre los dos sustratos. Las películas de las soluciones de PS (39.8kDa)-b-PMMA (17) fueron revestidas por centrifugado a 2.000 rpm, y cocidas a 165 ° C durante 48 h. Se puede observar que, esencialmente, la morfología en ambos sustratos es la misma, debido a las similares interacciones polímero-sustrato. Sin embargo, se puede observar patrones ligeramente más ordenados en las películas centrifugadas sobre sustratos de Si nativo. La relación del área- perímetro y la distancia de primer vecino, que representan el diámetro de poro y el espaciamiento de los poros [7], fueron de 34,5 nm y 3,6 nm para películas sobre sustratos de silicio y 38 nm y 5,4 nm para las películas en Au. Estos resultados sugieren una mejor distribución de los poros, una mejora en el espaciamiento y poros más grandes.

Efecto de las condiciones de post procesamiento

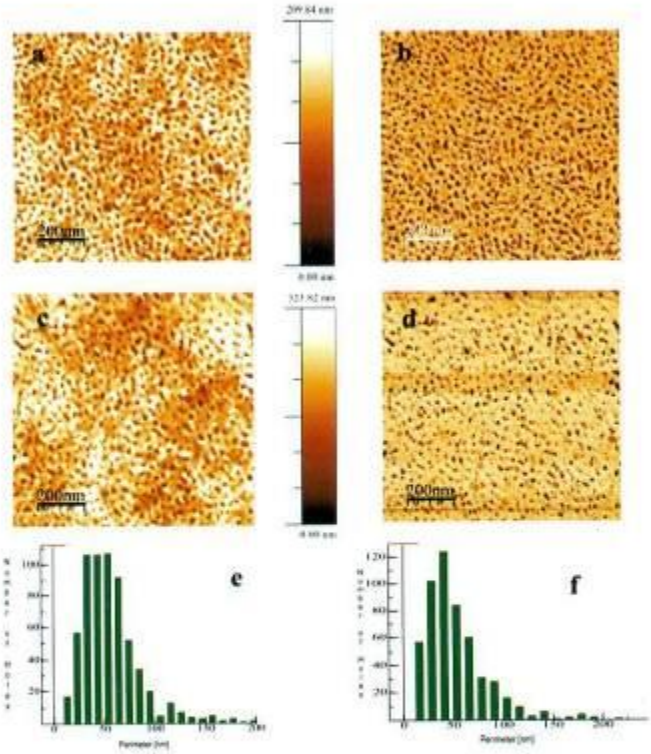


Figura 4. Análisis del efecto del tiempo de grabado usando ácido acético glacial, en películas delgadas de PS-b-PMMA. Las imágenes de altura y fase, y distribución del perímetro de los poros de PS (39.8kDa)-b-PMMA (17kDa) 1% en THF centrifugado a 4000 rpm. a-b) 3 minutos de tiempo de grabado, c-d) 5 minutos, y e-f) distribución de perímetros de poros de 3 min y 5 min, respectivamente.

Se investigó también la evolución de la morfología de los poros como una función del tiempo de grabado. La figura 4 muestra las imágenes de AFM de las películas después de 3 y 5 minutos de grabado usando ácido acético glacial seguido por cocido térmico a 165 ° C durante 48 horas.

Para todos los tiempos de grabado utilizados, las superficies observadas fueron consistentes con una orientación perpendicular cilíndrica. La morfología resultante no mostró diferencias entre 3 y 5 minutos, y, en general la distribución de los poros son iguales con un valor medio del perímetro de los poros de 50 nm, aproximadamente 16 nm de tamaño de poro. Además, se observó que los tiempos de grabado más cortos de 2 minutos no son suficientes para completar la eliminación de los microdominios de PMMA.

El efecto del campo externo también fue utilizado en un intento de alinear microdominios de los blocopolímeros siguiendo varios informes de Thurn-Albrecht et al. [8, 32], que afirman que un campo eléctrico podría orientar películas de hasta 1μm de espesor.

El cocido del diblock-copolímero se llevó a cabo durante 14 horas a 165 ° C, por encima de la temperatura de transición vítrea de los dos componentes (105 ° C para el PS y 115 ° C durante PMMA) bajo la aplicación de un campo eléctrico [32].

El tiempo de recocido se extendió a 48 horas sin detectar cambios en la morfología y la orientación como se puede observar en la Figura 5, que presenta las imágenes topográficas y de fase posteriores a la exposición ultravioleta y la eliminación de los dominios de PMMA degradado por lavado con ácido acético.

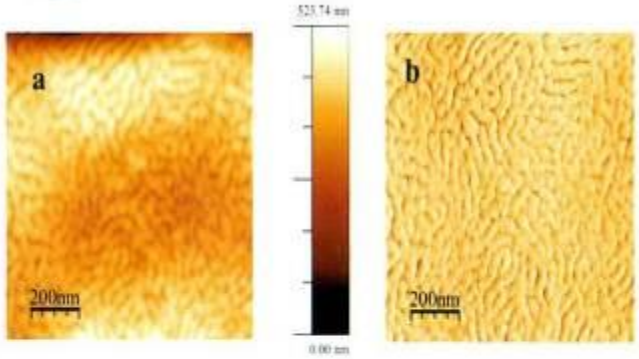


Figura 5. Imágenes de AFM de la orientación de películas delgadas aplicando un campo eléctrico. PS (39.8kDa)-b-de PMMA (17kDa) 1% en tolueno, centrifugadas a 2000 rpm. a) Topografía y b) imágenes de fase.

Efecto del Tiempo de annealing en atmósfera de solvente.

En el proceso de solvent-annealing, la movilidad de las cadenas de copolímeros se ve reforzada por la presencia del disolvente y la reorganización del copolímero, conduciendo a la recuperación de estructuras ordenadas cilíndricas [33].

Tras la exposición a vapor saturado de cloroformo en una cámara sellada a temperatura ambiente durante diferentes períodos de tiempo, las muestras de películas delgadas de recubiertos con PS (39.8kDa)-b-de PMMA (17kDa) fueron llevadas a atmósfera ambiente y secadas rápidamente.

El efecto del tiempo de recocido disolvente se presenta en la Figura 6. Después de 24 h (Figura 6), la película muestra una estructura muy desordenada con señales de separación de las microfase.

La exposición prolongada al vapor saturado de cloroformo (48 h, en la figura 6b) conduce a una estructura ordenada porosa con una relación área-perímetro de aproximadamente 6 nm y la distancia de primer vecino de 35 nm.

La ampliación de la duración del disolvente tratamiento de vapor (> 72 horas, la figura 6c, d), dio lugar a franjas y morfología laminar, de acuerdo con Xuan et al, 2004 [10].

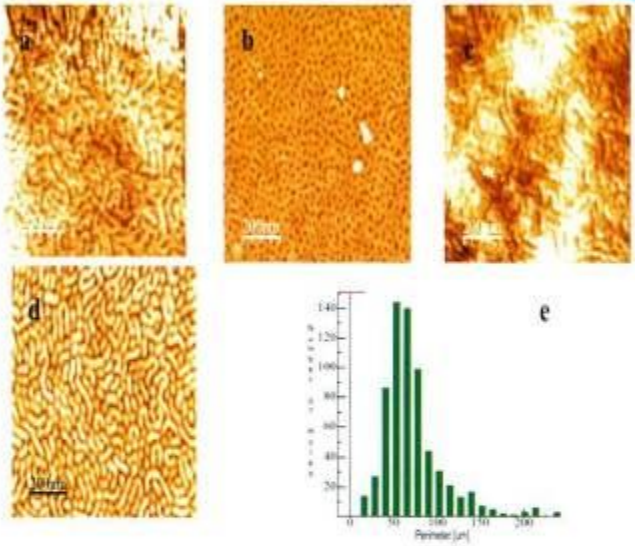


Figura 6. Análisis del efecto del tiempo de solvent annealing utilizando cloroformo. Altura y distribución del perímetro de los poros de PS (39.8kDa)-b-de PMMA (17kDa) 1% en THF centrifugadas a 2000 rpm. a) 24 h, b) 48, c) 72, d) 92 h y e) distribución del perímetro sobre sustratos de oro.

Caracterización electroquímica de los filmes delgados de matrices de nanoelectrodos por Voltametría Cíclica

En la caracterización de la profundidad de los poros por AFM, las incertidumbres en las mediciones son demasiado grandes para la conclusión definitiva de que los poros de penetrar la película por completo. Los métodos electroquímicos constituyen una forma sencilla para la caracterización de electrodos nanoporosos. Los informes anteriores han demostrado que los nanoelectrodos presentan una dependencia scan-rate [14], como se ve en la Figura 7., los voltamogramas cíclicos fueron tomados a velocidades de barrido diferentes (Figura 7), y las intensidades de los picos se representa en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Figura 7b). Una relación lineal entre la corriente y la raíz cuadrada de las tasas de exploración muestran que el proceso electroquímico está limitado sólo por la difusión habitual de las especies electroactivas en la proximidad del electrodo [1]. Sin embargo, a velocidades de barrido bajas, los voltamogramas de la sonda de ferricianuro de potasio redox presenta un pico de forma sigmoidea, característica de un perfil de difusión radial de la sonda redox para los dominios nano-poros, mientras que las tasas de exploración se in-

crementan, los voltamogramas se vuelven más sinusoidales, característica de la difusión esencialmente no lineal. Estas observaciones indican que la nanoelectrodos se comportan casi de forma independiente el uno del otro, aunque a velocidades de barrido mayor sus perfiles de difusión se superponen [14].

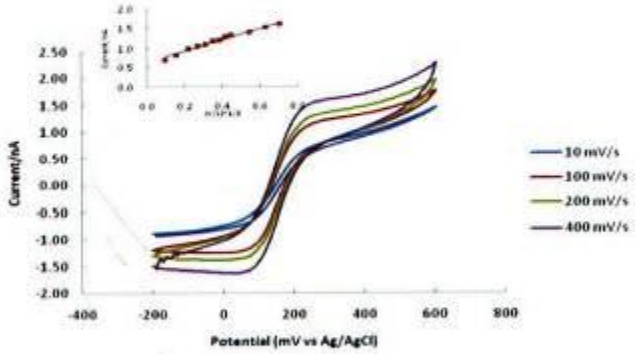


Figura 7. Voltamogramas cíclicos a velocidades de barrido (10, 50, 100, 150, 200, 300, 400 y 500 mV / s) de Fe (CN) 63 - / Fe (CN) 64 - en sustratos de oro después de cubrir con película delgada de PS (39.8kDa)-b-PMMA(17kDa). Recuadro: Relación lineal entre la intensidad de pico y la raíz cuadrada de la velocidad de exploración.

Un análisis cuantitativo de los datos de la cinética facilitó la estimación de la superficie real del oro subyacente utilizando la ecuación de Randles-Sevcik [34]:

$$i_p = (2.69 \cdot 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \qquad \text{Eq. 2}$$

donde: i_p es la corriente máxima (A), A es el área de los electrodos (cm^2), D es el coeficiente de difusión ($cm2\ s^{-1}$), C es la concentración ($mol\ cm^{-3}$) y v es la velocidad de barrido ($V\ s^{-1}$). El coeficiente de difusión del ferricianuro potásico se determinó primero utilizando un electrodo de área conocida, A. Los voltamogramas fueron adquiridos a velocidades de barrido diferentes (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400 y 500 mV/s), y la i_p resultante se graficó contra $v^{1/2}$. El coeficiente de difusión se calculó a partir de la pendiente de la recta resultante como

$$D = \left[\frac{m}{(2.687 \times 10^5) n^{\frac{3}{2}} A C}\right]^2 \qquad \text{Eq. 3}$$

Los datos de la figura 7 se extrajeron para estimar la superficie real en un 2.16×10^{-7} cm2, es decir, aproximadamente tres órdenes de magnitud menor que la geometría real del electrodo.

Prueba de concepto del sensor electroquímico de ADN por voltametría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica.

Las películas nanoporosas de blocopolímeros sobre sustratos de oro, y la electroactividad de las sales de ferri/ferrocianuro de potasio ($Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$) se probaron utilizando voltametría cíclica después de la inmovilización de las sondas de ADN tiolado, la hibridación con la secuencia complementaria y la regeneración de los electrodos, es decir, dehibridación (Esquema 2). Un ejemplo típico se presenta en la Figura 8. La intensidad de la señal es proporcional a la concentración de las moléculas que sufren oxidación/reducción, y la diferencia entre el potencial máximo está relacionado con la cinética del proceso electroquímico [1].

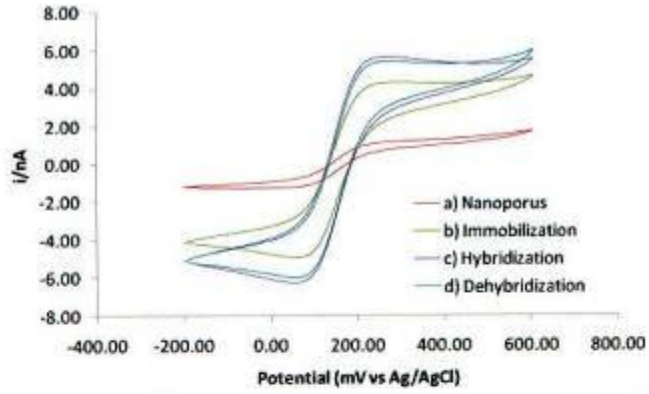


Figura 8. Voltamogramas cíclicos a una velocidad de barrido de 100 mV/s de la Fe $(CN)_6^3$ - / Fe (CN)64 - en sustratos de oro después del recubrimiento con PS (39.8kDa)-b-PMMA (17kD). a) Película delgada, b) después de la inmovilización, c) después de la hibridación, d) regeneración (dehibridización) y e) segunda hibridación.

Tras la inmovilización, la corriente máxima medida aumentó considerablemente de 1,15 nA para la matriz de electrodos desnudos hasta 4,22 nA. Tras la hibridación, la corriente aumentó, además, a 5,38 nA y disminuyó a 5,26 nA después de la hibridación. Este comportamiento es muy diferente de los senso-

res de ADN electroquímico preparados sobre electrodos de oro puro, donde por lo general, el ADN monocapa forma corrientes de pico que disminuyen debido a la obstrucción parcial de los sitios de los electrodos activos. Sin embargo, en la hibridación, la corriente puede aumentar [36] o disminuir [37] dependiendo de la configuración de los electrodos y monocapas inmovilizadas. En todos los casos, tras la re-generación, la señal del sensor se volvió a la registrada antes de la hibridación. A raíz de los resultados reportados por los grupos de investigación de Gooding et al. y Barton et al., se puede sugerir que a la inmovilización y la hibridación o la transducción de carga a través del ADN ocurrido o que de iones de puertas abiertas [37, 38]. Las gráficas de EIS después de cada derivatización etapas brindan una visión más clara de los resultados obtenidos [21]. Como se indica en los diagramas de Nyquist en la Figura 9, la impedancia total del sistema en gran medida el aumento de 3.200Ω a más de 12.000Ω en la inmovilización siguiente.

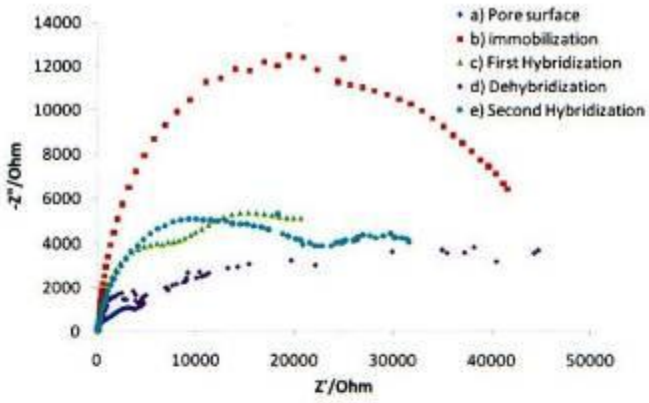


Figura 9. a) Resultados de impedancia electroquímica sobre sustratos de oro después del recubrimiento con película delgada PS(39.8kDa)-b-PMMA(17kDa). b) Después de la inmovilización, c) después de la hibridación, d) regeneración (dehibridización) y e) segunda hibridación.

Sin embargo, en la hibridación la resistencia a la transferencia de carga disminuye a aproximadamente 20.000Ω. Después de la hibridación, la resistencia a la transferencia de carga casi volvió a su valor inicial, aunque se observa la contribución de un componente capacitivo. A partir de estos resultados existe cierta preocupación de que el ADN inmovilizado podría haber removido de la superficie. Sin embargo, después de una segunda hibridación, la impedancia aumentó hasta un valor similar a la medida después de la primera hibridación, es decir, un aumento de la impedancia de aproximadamente 6 veces, lo que confirma la presencia de sondas de ADN inmovilizado y la funcionalidad del sensor.

La inmovilización del ADN y los eventos hibridación aumentan la carga global negativa de la superficie del electrodo debido a las cargas negativas presentes en el esqueleto de fosfato del ADN, y limitan aún más la difusión del ferricianuro con carga negativa a la superficie del electrodo, lo que resulta en un aumento de la impedancia. La impedancia inicialmente alta después de la inmovilización por tanto, podría atribuirse a la interacción no específica del ADN tiolada con los patrones de poliestireno, la mayoría de los cuales se lavó después de la hibridación y la regeneración con hidróxido de sodio [21].

La inmovilización de la sonda de ADN tiolada en la superficie de oro con una densidad óptima, el radio y el espaciamiento óptimo para la hibridación eventual son técnicas claves para mejorar la eficiencia de detección de ADN. Todos estos parámetros se puede mejorar mediante el desarrollo de una plataforma porosos bien ordenada que permita una inmovilización tiolada ADN fácil y bien orientada.

5. CONCLUSIONES

En conclusión, hemos analizado la calidad de auto-ensamblado de las películas delgadas de blocopolímero, se caracterizó la uniformidad y el grado de orden mediante microscopía de fuerza atómica, y se extrajo información sobre la distribución de los poros y el parámetro de distancia poro a poro (distancia al primer vecino) . Hemos demostrado maneras convenientes de ordenar películas de blocopolímeros, cambiando las condiciones de elaboración y el uso de diferentes enfoques, tales como thermal annealing, campos eléctricos y solvent annealing. Otros enfoques de proceso también fueron considerados, tales

como recubrimiento por inmersión, pero el mejor resultado se logra mediante spin-coating.

Los experimentos se realizaron usando dos solventes diferentes, tolueno y tetrahidrofurano, y se encontró un incremento ligero en el ordenamiento usando el primer solvente, debido a una mayor reactividad del solvente en la formación de los puentes de hidrógeno.

Las mejores ordenadas basadas en películas delgadas de blocopolímeros se lograron usando solvent y thermal annealing, mientras que el espesor de las películas pudo ser controlado variando la velocidad de centrifugación. Mostramos que usando solvent annealing se puede conseguir microdominios cilíndricos porosos, ordenados y orientados en las películas, y que su morfología se mantiene estable después del annealing.

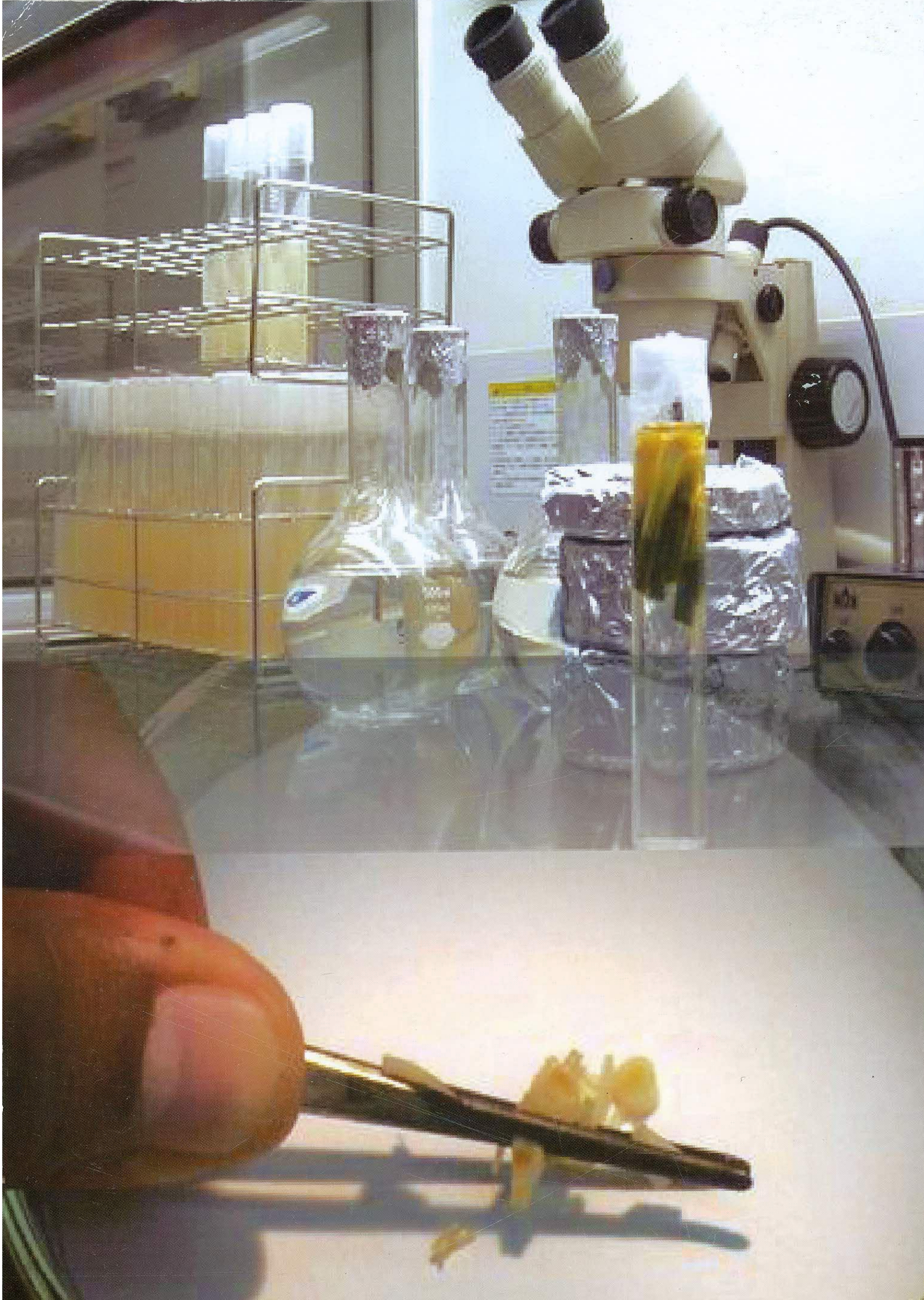
Además, la caracterización de las superficies por espectroscopía de impedancia y voltametría cíclica mostraron que, el ADN tiolado puede ser inmovilizado en oro desnudo dentro de los poros y el sensor de ADN resultante puede usarse para detectar la unión del ADN complementario mediante la medición de los cambios en la impedancia. Estos resultados prometedores de la funcionalización inicial, indican el potencial de las matrices de nanoelectrodos porosos para la detección de ADN. Sin embargo, se requieren trabajos adicionales para controlar el tamaño de los poros y su distribución como requisitos cruciales para estudiar de forma fiable y mejorar el rendimiento del sensor, en parámetros como selectividad, sensibilidad, límite de detección y la reproducibilidad.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue llevado a cabo con la ayuda financiera del Séptimo Programa Marco de la Comisión Europea (FP7/2007-2013) bajo el acuerdo FP7-IEF-221198.

Por otra parte, agradezco a la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia Tecnología e Innovación (SENESCYT), por la beca otorgada para realizar los estudios de Máster en Nanociencia y Nanotecnología en la Universidad Rovira y Virgili, Tarragona, España.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Laforgue, A., C.G. Bazuin, and R.E. Prud'homme, A. Macromolecules, **2006**, 39, 6473-6482.
2. Krishnamoorthy, S., et al., Advanced Functional Materials, **2006**, 16, 1469-1475.
3. Lee, J.I., et al., Nano Letters, **2008**, 8, 2315-2320.
4. Gasparac, R., et al., Journal of the American Chemical Society, **2004**, 126, 12270-12271.
5. Sidorenko, A., et al., Journal of the American Chemical Society, **2003**. 125, 12211-12216.
6. Park, C., J. Yoon, and E.L. Thomas, Polymer, **2003**, 44, 6725-6760.
7. Guarini, K.W., C.T. Black, and S.H.I. Yeung, Advanced Materials, **2002**, 14, 1290-1294.
8. Thurn-Albrecht, T., et al., Advanced Materials, **2000**, 12, 787-791.
9. Takmakov, P., I. Vlassiouk, and S. Smirnov, Analyst, **2006**, 131, 1248-1253.
10. Xuan, Y., et al., Macromolecules, **2004**, 37, 7301-7307.
11. Jeong, U., et al., Advanced Materials, **2004**, 16, 533-536.
12. Lazzari, M. and M.A. Lopez-Quintela,. Advanced Materials, **2003**, 15, 1583-1593.
13. Park, S., et al., ACS Nano, **2008**, 2, 766-772.
14. Jeoung, E., et al., Langmuir, **2001**, 17(21): p. 6396-6398.
15. Wang, H., et al., Thin Solid Films, **2005**, 488, 329-336.
16. Arrigan, D.W.M., Analyst, **2004**, 129, 1157-1165.
17. Huang, X.J., A.M. O'Mahony, and R.G. Compton, Small, **2009**, 5, 776-788.
18. Marrazza, G., I. Chianella, and M. Mascini, Biosensors and Bioelectronics, **1999**, 14, 43-51.
19. Liu, S.-f., et al., Biosensors and Bioelectronics, **2005**, 21, 789-795.
20. Beni, V., et al., Electrochemistry Communications, **2007**, 9, 1833-1839.
21. Daniels, J. and N. Pourmand, Electroa-

nalysis, **2007**, 19, 1239-125
22. Takashi, I., A.A. Audi, and G.P. Dible, Analytical Chemistry, **2006**, 78, 7048-7053.
23. Van Grinsven, B., et al., Physica Status Solidi, **2010**, 207, 919-923.
24. Guan, J.-G., Y.-Q. Miao, and Q.-J. Zhang, The Society for Biotechnology, Japan, **2004**, 97, 219-226.
25. Park, J.-Y. and S.-M. Park, **2009**, 9th Edition, 9513-9532.
26. Gautier, C., et al., Biosensors and Bioelectronics, **2007**, 22, 2025-2031.
27. Malcovati, P., et al., Sensors and Microsystems. **2010**, Springer Netherlands, p. 181-184.
28. Long, Y.-T., et al., Analytical Chemistry, **2004**, 76, 4059-4065.
29. Herne, T.M. and M.J. Tarlov, Journal of the American Chemical Society, **1997**, 119, 8916-8920.
30. Institute of Physics (IA) of the RWTH Aachen University. The X-ray-reflectometry (XRR). **2010** [cited 2010 08 31]; Available from: http://ia.physik.rwth-achen.de/methods/xray/www-xray-eng.pdf.
31. Li, M., C. Coenjarts, and C. Ober, Block Copolymers II. **2005**. p. 183-226.
32. Thurn-Albrecht, T., et al., Science, **2000**, 290, 2126-2129.
33. Tung, S.-H. and T. Xu, Macromolecules, **2009**. 42, 5761-5765.
34. Li, Y., H.C. Maire, and T. Ito, Langmuir, **2007.** 23, 12771-12776.
35. Katz, E. The Randles-Sevcik equation. **2009** [cited 2010 25-08]; Available from: http://people.clarkson.edu/~ekatz/randles_sevcik_equation.htm
36. Gooding, J. J. et al., Chemical Communications, **2003**, 15, 1938-1939
37. Pan, J., Biochemical engineering journal, **2007**, 35, 183-190
38. Kelley, S.O., et al., Nucleic acid research, **1999,** 27, 4830-4837