



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y
del Medio Natural

Desarrollo de un modelo de inmunoensayo heterogéneo utilizando soportes de fibra de vidrio con hidrofobicidad modulada mediante silanización

TRBAJO FIN DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

Curso académico 2018/2019

Autor: Mauro Castelló Sanjuán

Tutoras: Pilar Aragón Revuelta y Patricia Noguera Murray

Licencia Creative Commons By-Nc

Valencia, julio 2019

Desarrollo de un modelo de inmunoensayo heterogéneo utilizando soportes de fibra de vidrio con hidrofobicidad modulada mediante silanización

En el presente trabajo se propone el empleo de fibras de vidrio como un soporte sólido para reacciones de reconocimiento molecular, en especial interacciones proteína-proteína. Para el presente trabajo se toma como base los estudios previos realizados en el grupo de investigación con la interacción biotina-estreptavidina y se adaptará a un inmunoensayo heterogéneo indirecto típico. Inicialmente, se modificará la hidrofobicidad de superficies de microfibra empleando diversos alqueniilsilanos con diversa longitud de cadena, bien sea individualmente o mezclados con un fluoroalqueniilsilano a diferentes porcentajes. A continuación, se fijarán a la superficie matrices de gotas de una biotina tiolada mediante la reacción fotoquímica del tiol-eno. Posteriormente se hará reaccionar un anticuerpo policlonal antibiotina de conejo con la biotina tiolada fijada a las superficies por la reacción tiol-eno y, finalmente, se aplicará un anticuerpo secundario anticonejo marcado con Alexa-fluor 647. La imagen de los puntos de fluorescencia obtenidos será apropiadamente tratada para obtener la intensidad, tamaño y SNR (señal sobre ruido) de los mismos.

Los resultados nos permitirán estudiar cómo la hidrofobicidad afecta a las señales obtenidas en las diferentes superficies, aumentando la calidad de los puntos según las superficies se vuelven más hidrofóbicas, debido bien al uso de un silano más hidrofóbico (cadena más larga) o bien a la adición del fluoroalqueniilsilano.

Los valores del ángulo de contacto (WCA), la intensidad de la señal y su SNR nos permitirán comparar diferentes tratamientos y comprobar su viabilidad en procesos de reconocimiento molecular. Los resultados permitirán estudiar cómo la hidrofobicidad afecta a las señales conseguidas en las diferentes superficies examinadas, mostrando cómo estas pueden ser usadas en aplicaciones biológicas.

Palabras clave: Inmunoensayo; alqueniilsilanos; fibra de vidrio; hidrofobicidad

Alumno: Mauro Castelló Sanjuán

Valencia, julio de 2019

Tutoras: Pilar Aragón Revuelta y Patricia Noguera Murray

Licencia Creative Commons By-Nc

Desenvolupament d'un model d'immunoassaig heterogeni utilitzant suports de fibra de vidre amb hidrofobicitat modulada amb silanes

En el present treball es proposa l'ús de fibres de vidre com un suport sòlid per a reaccions de reconeixement molecular, especialment interaccions proteïna-proteïna. Per al present treball es prenen com a base els estudis previs realitzats en el grup d'investigació amb la interacció biotina-estreptavidina i s'adaptarà a un immunoassaig heterogeni indirecte típic. Inicialment, es modificarà la hidrofobicitat de superfícies de microfibra emprant diversos alquenilsilans amb diversa longitud de cadena, bé siga individualment o barrejats amb un fluoroalquenilsilà a diferents percentatges. A continuació, es fixaran a la superfície matriu de gotes d'una biotina tiolada mitjançant la reacció fotoquímica del tiol-alqué. Posteriorment es farà reaccionar un anticòs policlonal antibiotina de conill amb la biotina tiolada fixada a les superfícies per la reacció tiol-alqué i, finalment, s'aplicarà un anticòs secundari anticonill marcat amb Alexa-*fluor 647. La imatge dels punts de fluorescència obtinguts serà apropiadament tractada per a obtindre la intensitat, grandària i SNR (senyal sobre soroll) d'aquests.

Els resultats ens permetran estudiar com la hidrofobicitat afecta a les senyals obtingudes en les diferents superfícies, augmentant la qualitat dels punts segons les superfícies es tornen més hidrofòbiques, degut bé a l'ús d'un silà més hidrofòbic (cadena més llarga) o bé a l'addició del fluoroalquenilsilà.

Els valors de l'angle de contacte (WCA), la intensitat del senyal i el seu SNR ens permetran comparar diferents tractaments i comprovar la seua viabilitat en processos de reconeixement molecular. Els resultats permetran estudiar com la hidrofobicitat afecta als senyals aconseguits en les diferents superfícies examinades, mostrant com aquestes poden ser usades en aplicacions biològiques.

Paraules clau: Immunoassaig; alquenilsilans; fibra de vidre; hidrofobicitat

Alumne: Mauro Castelló Sanjuán

València, juliol de 2019

Tutores: Pilar Aragón Revuelta i Patricia Noguera Murray

Llicència Creative Commons By-Nc

Heterogeneous immunoassay development using glass fiber supports with hydrophobicity modulated by silanization

In this project, the use of glass-fibre based supports is proposed as a solid basement for molecular recognition reactions, specifically, protein-protein interactions. The conducted research is based on previous studies performed by the research group with biotin-streptavidin interactions and were adapted to an indirect heterogenic immunoassay. To begin with, the hydrophobicity of the glass-fibre supports was modified using different alkenylsilanes with different chain lengths, either individually or mixed with a fluoroalkenylsilane at different percentages. Then, at the surface of the supports, arrays of a thiol-biotin derivative were anchored by means of the photochemical click thiol-ene reaction on the surfaces. Following, a polyclonal anti-biotin antibody (from rabbit) was spread throughout the surface to bind the previously anchored biotin. Finally, a secondary antibody (anti-rabbit) tagged with Alexa-fluor 647 was applied. The resulting image of fluorescence was properly treated and analysed on parameters such as intensity, size and SNR (signal to noise ratio).

Results allow the study of the effect of hydrophobicity on the obtained signals, increasing the quality of the spots observed on the surfaces as they became more hydrophobic. Whether caused by the use of a long chain silane (more hydrophobic) or because of the addition of the fluoroalkenylsilane.

The values of the water contact angles (WCA), the intensity of the signal, and their SNR, enable the comparison between different treatments and the study of their viability as molecular recognition processes. Results allow the comparison of different surface treatments and show their feasibility in biomolecular recognition events.

Key words: Immunoassay; alkenylsilanes; glass fibre; hydrophobicity

Student: Mauro Castelló Sanjuán

Valencia, July 2019

Tutors: Pilar Aragón Revuelta and Patricia Noguera Murray

License Creative Commons By-Nc

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas aquellas personas e instituciones que de una forma u otra me han ayudado en la realización de este trabajo fin de grado.

Al grupo SyM (Señal y Medida) del Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), por permitirme tanto trabajar en una de sus líneas sobre la modulación de la mojabilidad en superficies de vidrio.

A mis tutoras, Pilar y Patricia, por su implicación, por la confianza depositada en mí y por crear un buen clima de trabajo en el que he podido aprender mucho.

A todos mis amigos y amigas que durante estos cuatro años no han dejado de mostrarme su apoyo, estando aquí o desde lejos. Siempre me sentí acompañado por sus gestos y sus palabras. Por las pausas de los cafés, las charlas para darnos ánimos y la camaradería creada durante todo este camino.

A mi familia, en especial mis padres y mi hermana, por estar ahí siempre, por motivarme cuando me vine abajo, por sentir como suyos mis esfuerzos y victorias, por todo el apoyo recibido siempre, por hacerme reír, por su cariño y su preocupación.

A todos los que me han ayudado a crecer.

Gracias.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Biosensores y reconocimiento molecular	1
1.2. Inmunoensayos	2
1.3. La microfibra de vidrio como soporte del inmunoensayo heterogéneo.....	3
1.3.1. Mojabilidad	4
1.3.2. Modulación de la mojabilidad mediante el uso de alcoxisilanos.....	4
1.3.3. Reacción de tiol-eno.....	5
1.4. Reacciones de reconocimiento de la biotina	6
1.5. Transducción de la señal	7
2. Objetivos.....	8
3. Materiales y métodos	9
3.1. Materiales	9
3.2. Silanización de superficies.....	9
3.3. Caracterización de las superficies	11
3.4. Fijación de la biotina tiolada a las superficies.....	11
3.5. Reacción de reconocimiento de la biotina	12
3.6. Tratamiento de imagen.....	12
3.7. Tratamiento estadístico de datos	13
4. Resultados.....	14
4.1. Estudios preliminares.....	14
4.1.1. Silanización de los chips.....	14
4.1.2. Optimización del sistema de lavado y de aplicación	17
4.1.3. Reducción de la adsorción inespecífica	18
4.2. Resultados del inmunoensayo	20
4.3. Caracterización de los sistemas desarrollados	21
5. Conclusiones	31
6. Bibliografía	32

Índice de figuras

Figura 1. Ilustración de los componentes básicos de un inmunoensayo: un analito (rojo), un anticuerpo (verde), y un marcador detectable (amarillo).	2
Figura 2. Estructura química de un alcoxisilano con cadena lateral de 4 carbonos.	4
Figura 3. Funcionalización de la superficie con un alcoxisilano.....	5
Figura 4. Esquema de la reacción tiol-eno con un silano genérico.....	6
Figura 5. Esquema del proceso completo. Primeramente, la reacción tiol-eno, seguidamente el reconocimiento mediante anticuerpos.	6
Figura 6. Silanos empleados una vez son anclados al soporte.....	9
Figura 7. Estructura química y degradación del silano C-04.	10
Figura 8. Distribución de la matriz de puntos sobre la superficie del chip.	11
Figura 9. Media del WCA y su desviación estándar por cada tratamiento realizado. Resultados gráficos del análisis ANOVA simple por tratamientos.....	15
Figura 10. Media del WCA y su desviación estándar por cada silano utilizado. Resultados gráficos del análisis ANOVA multifactorial por silano y adición de fluorado.	16
Figura 11. Media del WCA y su desviación estándar para aquellos tratamientos que contienen un 1% de alcoxisilano fluorado C-10F* con respecto del silano empleado y para los que solamente fueron tratados con el silano. Resultados gráficos del análisis ANOVA multifactorial por adición de fluorado y silano.	16
Figura 12. Resultado de la realización del ensayo mediante el lavado por inmersión (izquierda) y a chorro (derecha).....	17
Figura 13. Resultados obtenidos de los tratamientos sin adición de BSA y con adición de BSA, sobre C-11. El tratamiento con BSA es a su vez estudiado con dos temperaturas de incubación, a temperatura ambiente (aproximadamente).	18
Figura 14. Resultados de realizar la etapa de incubación de la BSA individualmente o conjuntamente con el Ab1 sobre C-11.	19
Figura 15. Resultados obtenidos de la combinación de la incubación independiente de la BSA y el lavado por inmersión sobre C-11.	19
Figura 16. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-04 (abajo izqda.) y los parámetros calculados (abajo dcha.).	22
Figura 17. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-04*F (abajo izqda.) y los parámetros calculados (abajo dcha.).	23
Figura 18. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-08 (abajo izqda.) y los parámetros calculados (abajo dcha.).	24
Figura 19. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-08*F (abajo izqda.) y los parámetros calculados (abajo dcha.).	25
Figura 20. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-11 (abajo izqda.) y los parámetros calculados (abajo dcha.).	26
Figura 21. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-11*F (abajo izqda.) y los parámetros calculados (abajo dcha.).	27
Figura 22. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-22 (abajo izqda.) y los parámetros calculados (abajo dcha.).	28
Figura 23. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-22*F (abajo izqda.) y los parámetros calculados (abajo dcha.).	29

Índice de tablas

Tabla 1. Media del WCA para cada nivel de Tratamiento y el error estándar de cada media. Letras diferentes indican diferencias significativas al 95% entre las medias utilizando el procedimiento de LSD de Fisher.	15
Tabla 2. Resultados de los chips revelados con IgG-AF647.	20

Abreviaturas

Ab: Anticuerpo

Ab1: Anticuerpo primario (antibiotina)

BSA: Albúmina de suero bovino

BT: Biotina tiolada

C-02: Viniltrimetoxisilano

C-03: Aliltrimetoxisilano

C-04: Butiltrietoxisilano

C-08: 7-Octenilmetoxisilano

C-10*F: 1,1,2,2-Perfluorodeciltrietoxisilano

C-11: 10-Undeceniltrimetoxisilano

C-22: Docoseniltrietoxisilano

IgG-AF647: Anticuerpo anticonjeto marcado con el fluoróforo Alexa-Fluor-647

IT: Intervalo de trabajo

LD: Límite de detección

LL: Límite de linealidad

LQ: Límite de cuantificación

SNR: Relación señal-ruido

WCA: Ángulo de contacto del agua

1. Introducción

1.1. Biosensores y reconocimiento molecular

El reconocimiento molecular es una interacción específica entre una molécula hospedadora y una molécula huésped complementaria, que resulta en un complejo huésped-hospedador. La denominación de las moléculas como “huésped” u “hospedadoras” es normalmente arbitraria. Las moléculas son capaces de reconocer a sus complementarias mediante interacciones no covalentes y la aplicación principal de este tipo de reacciones de reconocimiento es la construcción de sensores moleculares. Algunos de los modelos de reconocimiento supramoleculares desarrollados son “bio-inspirados” o “bio-miméticos” ya que emulan algunas de las funciones de los sistemas biológicos (de Moraes y Caseli, 2017).

Los biosensores son dispositivos analíticos que convierten una respuesta biológica en una señal eléctrica analizable. Por antonomasia, estos deben ser altamente específicos, independientes de parámetros físicos ambientales como el pH y la temperatura, y, a ser posible, reutilizables (Mehrotra, 2016).

El reconocimiento de biomoléculas resulta de gran interés tanto en la investigación científica, como en la industria. Algunos de los sectores que se benefician del avance en la tecnología de biosensores son la industria alimentaria, donde se utilizan sensores con el fin de realizar controles de calidad y sanitarios, y la ingeniería metabólica, para monitorizar los niveles de los metabolitos celulares. Los biosensores también presentan un papel importante en las industrias biomédica y farmacéutica, como para la rápida detección de interleukina-10 y su papel en enfermedades cardíacas, o para la detección del virus del papiloma humano, entre otros. Concretamente, los biosensores fluorescentes son clave en el descubrimiento de nuevos fármacos y en el cáncer. Otros campos que se pueden beneficiar del desarrollo de los biosensores incluyen defensa, el sector clínico o el ambiental, como es el caso de algunas aplicaciones marinas (Mehrotra, 2016).

Uno de los tipos de biosensores más utilizados son los que se basan en el empleo de proteínas unidas a fluoróforos, los cuales actúan como transductores de la reacción de reconocimiento, generando una señal lumínica que es detectable por un sensor óptico. Encontramos, pues, dos grandes grupos de biosensores basados en proteínas fluorescentes. El primero, está formado por aquellos biosensores en los que la proteína de interés se codifica unida al fluoróforo directamente, resultando de gran utilidad en ensayos *in vivo*. En el otro gran grupo entran todos aquellos sistemas que han sido obtenidos mediante síntesis química, en los que la proteína de interés, sea natural o recombinante, se une a moléculas fluorescentes sintéticas *in vitro* (Wang *et al.*, 2009).

Al trabajar con la unión del fluoróforo *in vitro*, es de vital importancia asegurarse de que la unión realizada ocurra en un punto donde la funcionalidad de la proteína no se vea afectada, lo que a menudo causa que se descarten métodos simples como las reacciones químicas específicas de ciertos tipos de aminoácidos, debido a que no es posible garantizar en cuántos o en qué cantidad de estos se va a realizar la unión. Por ello, se deben emplear

estrategias más complejas como técnicas químicas de marcaje de proteínas, conocidas también como *protein-labeling*, o la mutagénesis dirigida con el fin de obtener uniones covalentes, específicas y reproducibles (Wang *et al.*, 2009).

1.2. Inmunoensayos

Los inmunoensayos se definen como una prueba que utiliza la unión de los anticuerpos con antígenos para identificar y medir ciertas sustancias. Por ejemplo, los inmunoensayos pueden ser utilizados para diagnosticar enfermedades u otorgar información sobre ciertas enfermedades que puede ser utilizada para pensar en un mejor abordaje terapéutico (como es el caso de los receptores de estrógeno medidos en cáncer de mama) (National cancer institute, 2019).

Los inmunoensayos presentan tres componentes básicos: el antígeno, el anticuerpo (Ab, que se unirá al antígeno), y un marcador detectable (Figura 1.). Entre los años 1995 y 2017, se han desarrollado una gran cantidad de inmunoensayos con el fin de obtener detecciones de analitos cuantitativas, semicuantitativas o cualitativas. La detección precisa de los analitos es un requerimiento esencial para diagnosticar, seguir y tratar con precisión, la salud de los pacientes. Además, grandes avances en los formatos de los inmunoensayos, plataformas bioanalíticas, sistemas inmunoanalíticos, y tecnologías complementarias han llevado a diversos formatos de inmunoensayos emergentes (Vashist y Luong, 2018).

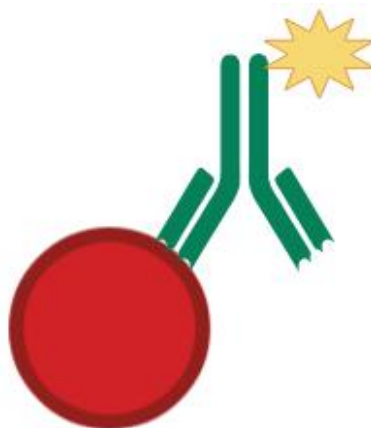


Figura 1. Ilustración de los componentes básicos de un inmunoensayo: un analito (rojo), un anticuerpo (verde), y un marcador detectable (amarillo).

El auge de los inmunoensayos se debe, en parte, a su gran aplicabilidad en ámbitos del conocimiento muy diversos y en la industria, por lo que se requieren de mejoras continuas en esta tecnología.

Es necesario desarrollar diversos sistemas de inmunoensayos para controlar las sustancias contaminantes, tales como agentes químicos perniciosos (pesticidas, mercurio, arsénico, etc.), toxinas, o agentes de guerra biológica. Un ejemplo de esto es el de las esporas de *Ántrax* como agente de guerra biológica, el cual conlleva grandes preocupaciones de seguridad (Vashist y Luong, 2018).

La industria alimentaria también se nutre del desarrollo en los inmunoensayos, que son utilizados para la detección de adulterantes, toxinas o sustancias peligrosas para el consumo humano. El ejemplo más ilustrativo de la aplicación de los inmunoensayos en estas industrias es la detección de alérgenos, que es una de las preocupaciones principales de la sociedad occidental (Taylor *et al.*, 2009).

En el ámbito clínico, un gran número de enfermedades son diagnosticadas exclusivamente basándose en la determinación de la concentración de biomarcadores de las diferentes enfermedades mediante inmunoensayos. El seguimiento y abordaje de la enfermedad, junto con la efectividad de los tratamientos, son también llevados a cabo mediante inmunoensayos. Por lo que los inmunoensayos resultan cruciales en la toma de decisiones (Vashist y Luong, 2018).

Cabe mencionar que, actualmente, uno de los campos de los inmunoensayos en la que se prevé un auge importante en su desarrollo es el campo de la medicina personalizada (Vashist y Luong, 2016). En este campo, la creación de inmunoensayos en soportes desechables permitiría el estudio personalizado de ciertos parámetros importantes en la salud del paciente. Hay inmunoensayos desarrollados recientemente que permiten el seguimiento de analitos en cuestión de unos pocos minutos, y con un procedimiento fácil de seguir. El desempeño bioanalítico de estos inmunoensayos es comparable, o incluso mejor, al de los inmunoensayos realizados en laboratorios centrales con instrumentos avanzados (Vashist y Luong, 2018).

1.3. La microfibra de vidrio como soporte del inmunoensayo heterogéneo

Realizar reacciones de biodetección sobre superficies sólidas en formatos de *microarray* es un procedimiento ampliamente empleado, debido al alto rendimiento de escrutinio obtenido; así que los estudios orientados hacia una mayor comprensión y mejora de la actuación del reconocimiento biomolecular sobre superficies es algo siempre bienvenido. El objetivo principal de estos estudios es maximizar la unión entre el ligando y minimizar interacciones no deseadas del ligando o terceras especies (Mehrotra , 2016). Claramente, la elección de una superficie adecuada y la posterior inmovilización de las muestras a la misma pueden decidir el resultado del sensor y su aplicabilidad.

La elección del soporte más adecuado para el desarrollo del inmunoensayo, así como sus características, atenderá a varios factores como la mojabilidad, la capacidad de anclar otras moléculas, la reproducibilidad y el coste. De entre los posibles soportes sólidos, el vidrio tiene la ventaja de su bajo coste, además es desechable y puede utilizarse como soporte sólido sobre el que desarrollar nuevos inmunoensayos en formato chip (Aragón *et al.*, 2018).

Durante los últimos años, se han empezado a utilizar soportes con estructura tridimensional para el desarrollo de sistemas de reconocimiento. Ejemplo de ello son las reacciones sobre papel (López-Marzo y Merkoci, 2016).

1.3.1. Mojabilidad

Tal y como se ha indicado, al desarrollar un nuevo sistema de reconocimiento molecular, como un nuevo biosensor, se debe maximizar la interacción específica deseada y minimizar cualquier otra interacción no específica. Una forma de alcanzar este objetivo es mediante la modulación de la mojabilidad de la superficie, es decir, la propensión a mantener el contacto entre la superficie y el agua cuando se establece el equilibrio mecánico sólido-líquido-aire por acción de las fuerzas adhesivas y cohesivas. La mojabilidad puede afectar a la tendencia de las moléculas de interés a estar en el lugar apropiado para el proceso de reconocimiento biomolecular, ya que se encontrarían presentes en el líquido, por lo que su modulación resulta de interés primordial. Por ejemplo, en el caso en que se pretenda detectar un analito en una muestra acuosa, se puede emplear una superficie hidrofóbica sobre la que estén dispuestos puntos o agrupaciones de una sonda más hidrofílica (como una inmunoglobulina), con lo que se reducirá la adsorción inespecífica fuera de las zonas con sondas, en las cuales se concentrará la reacción de reconocimiento molecular (Zhang *et al.*, 2008).

1.3.2. Modulación de la mojabilidad mediante el uso de alcoxisilanos

La mojabilidad depende de la naturaleza del material de partida, así como del tratamiento o funcionalización al que éste sea sometido. Un método sencillo para variar la mojabilidad de algunas superficies es mediante el uso de alcoxisilanos.

Los alcoxisilanos (en adelante, simplemente silanos) son moléculas sintéticas compuestas por un átomo de silicio unido a una cadena carbonada. Los tres electrones de valencia restantes del átomo de silicio se encuentran unidos mediante átomos de oxígeno a grupos alquilo, generalmente metilos o etilos (Figura 2). Su hidrofobicidad dependerá de la longitud y de los grupos funcionales presentes en la cadena lateral (de Barutell, 2018).

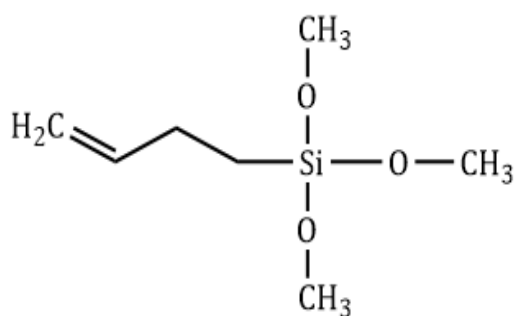


Figura 2. Estructura química de un alcoxisilano con cadena lateral de 4 carbonos.

Con el fin de funcionalizar una superficie de vidrio (o microfibras de vidrio) con silanos, el primer paso a realizar es la activación de la superficie. Esto es, generar radicales libres en la misma a los cuales los silanos se puedan unir mediante el establecimiento de enlaces de tipo covalente con el átomo de silicio (Escorihuela *et al.*, 2012). Para realizar esto, hay dos posibles estrategias que podemos seguir: la primera, la vía “húmeda”, consiste en la

inmersión en un medio extremadamente oxidante, como la conocida como “disolución piraña”, consistente en una mezcla de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y la segunda, la vía “seca”, que consiste en exponer el material a radiación ultravioleta. Esta segunda estrategia resulta mucho más sencilla, barata (debido a que solamente necesita electricidad) y respetuosa con el medio ambiente e incluso reproducible, al estar los tiempos de exposición totalmente automatizados (de Barutell, 2018) (Figura 3).

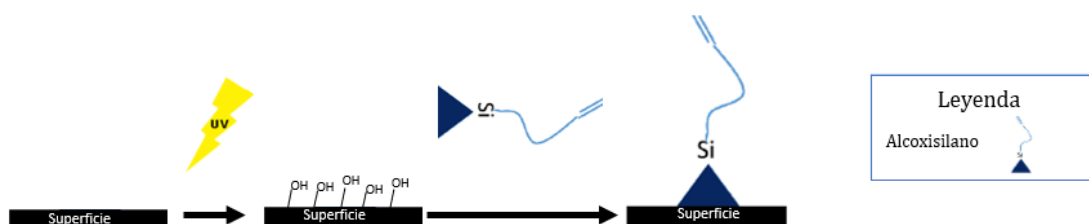


Figura 3. Funcionalización de la superficie con un alcóxido de silicio.

Estudios previos en la modulación de la mojabilidad en chips de vidrio, realizada mediante la funcionalización de la superficie con distintos alcóxidos de silicio, concluyeron que, una elevada hidrofobicidad podía aumentar la relación señal-ruido (SNR), en un orden de magnitud respecto a una superficie de mojabilidad moderada (Aragón *et al.*, 2018). Esto incrementa la densidad óptica (relación señal/área) de los puntos, además de reducir la señal de fondo.

1.3.3. Reacción de tiol-eno

Es posible encontrar gran variedad de reacciones que permitan anclar una molécula de interés a un determinado material o superficie. La técnica que se vaya a emplear depende de la estructura química de ambos elementos. En el caso de realizar una funcionalización de superficies con silanos con un doble enlace terminal ($R-CH=CH_2$) se presentan dos ventajas: la amplia reactividad química que el doble enlace otorga y el control de la hidrofobicidad, ya que el uso de silanos de diferente longitud de cadena permitirá variar la hidrofobicidad de las superficies y mejorar las reacciones de biorreconocimiento.

Las moléculas que incorporan un grupo tiol en el extremo ($R-SH$), pueden reaccionar con el doble enlace terminal de los silanos y formar un enlace covalente, mediante lo que se conoce como la reacción del tiol-eno (Figura 4), y se trata de una de las reacciones principales en la denominada *Click Chemistry*, una rama de la química extendida por el premio nobel K. B. Sharpless, dedicada a la búsqueda de un set de reacciones rápidas, potentes, específicas, sencillas y reproducibles que permitan obtener rápidamente nuevos compuestos al generar enlaces heterodinámicos ($C-X-C$) (Kolb *et al.*, 2001). Esta reacción no sucede de manera espontánea a velocidad apreciable y por ello debe ser catalizada, para lo que surgen dos posibles abordajes: el primero consiste en la exposición de ambos compuestos en contacto a radiación ultravioleta; la segunda, llamada adición de Michael, se añade una base, que actúa como catalizador (de Barutell, 2018). Resulta preferible el uso de

la radiación ultravioleta, por ser más barata, sencilla (al no usar reactivos químicos) y reproducible.

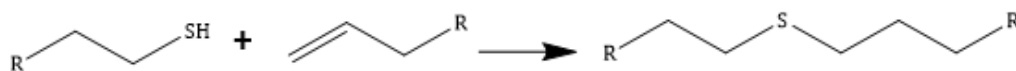


Figura 4. Esquema de la reacción tiol-eno con un silano genérico.

Al realizar una reacción del tioleno con una biotina tiolada se consigue que la biotina actúe como sonda, permitiendo la realización de diferentes biorreacciones. La biotina tiolada (BT), al actuar como el biorreceptor inmovilizado o “sonda”, constituye el eje central de este biosensor, ya que actúa como *linker* o puente entre todo el complejo, que se anclará a la superficie al estar unida a los diferentes silanos (Figura 5).

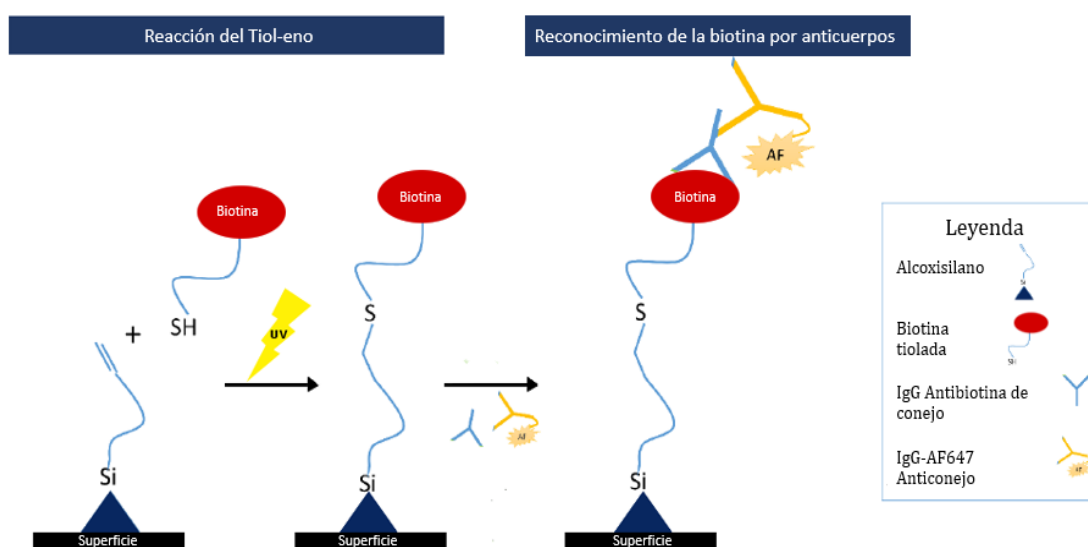


Figura 5. Esquema del proceso completo. Primeramente, la reacción tiol-eno, seguidamente el reconocimiento mediante anticuerpos.

1.4. Reacciones de reconocimiento de la biotina

La biotina es una molécula ampliamente utilizada en el desarrollo de nuevos sistemas de reconocimiento, debido a que se halla involucrada en múltiples reacciones de reconocimiento molecular. La primera de estas reacciones fue con la avidina, descubierta a mediados del siglo XX, y se estableció una K_a de 10^{15} mol^{-1} (Green, 1963), constituyendo la interacción no-covalente más fuerte conocida, y esto se debe a la formación de ocho puentes de hidrógeno y a la actuación de fuerzas electroestáticas, causadas por la elevada hidrofobicidad del sitio activo de la avidina. En 1964 se descubrió la estreptavidina, un análogo funcional de origen bacteriano (Chaiet y Wolf, 1964) con una K_a de aproximadamente 10^{14} mol^{-1} . La estreptavidina y la avidina se han utilizado desde entonces para poner a prueba nuevos sistemas de reconocimiento molecular, dado que su elevada afinidad permite obtener resultados incluso en condiciones previas a la optimización (Howarth *et al.*, 2006).

Además, dado que la biotina es una biomolécula tan ampliamente utilizada, se ha desarrollado una amplia gama de anticuerpos antibiotina. Empresas del calibre de Biolegend, Abcam, Sigma-Aldrich o ThermoFisher Scientific producen múltiples preparados, mono o policlonales, obtenidos en ratón, conejo o cabra. Podemos encontrar en sus catálogos también anticuerpos conjugados con fluoróforos o metales nobles, lo que también nos indica la popularidad de la biotina en los inmunoensayos (normalmente siendo utilizada como marcador).

1.5. Transducción de la señal

Como se ha comentado con anterioridad, uno de los requisitos de un biosensor, para ser considerado como tal, es que produzca algún tipo de señal que se pueda transducir a una señal eléctrica. Los biosensores basados en proteínas de fluorescencia son dispositivos integrados que convierten un evento de reconocimiento molecular en una señal fluorescente (Wang *et al.*, 2009), donde la señal obtenida mediante un sensor óptico es codificada principalmente en dos tipos de archivo: en un archivo que recoja solamente la intensidad total de la fluorescencia detectada por el sensor (muy sencillo, pero útil para procesos automatizados), o en una imagen del área escaneada, en la que cada píxel viene definido por unas coordenadas espaciales y está asociada la intensidad alcanzada en ese punto. La imagen es normalmente producida por un tipo de sensor óptico denominado lector de fluorescencia de superficie (SFR, por sus siglas en inglés: *Surface Fluorescence Reader*), que es dirigido por software especializado desde un PC. La imagen resultante, además de permitir trabajar con un *array*, permite determinar una serie de importantes parámetros para caracterizar adecuadamente el sensor.

2. Objetivos

En este trabajo se propone el uso de fibras de vidrio como soporte para la realización de reacciones de biodetección. Por ello se propone la realización de un inmunoensayo heterogéneo sobre fibras de vidrio comerciales.

El objetivo principal del presente Trabajo Fin de Grado consiste en el desarrollo de un biosensor fluorescente basado en un inmunoensayo heterogéneo indirecto que emplea dos anticuerpos, utilizando como sustrato material una matriz de microfibras de vidrio, la cual será funcionalizada con distintos alcoxisilanos con el fin de alterar su mojabilidad. Posteriormente sobre la superficie se ancla una proteína, concretamente una biotina tiolada mediante la reacción del tiol-eno.

Como objetivos secundarios, se desarrollarán estrategias tales que optimicen el consumo de tiempo y recursos (reactivos, instrumental de uso común, etc.) y den lugar a las mejores prestaciones, como por ejemplo la reducción de la adsorción inespecífica y el aumento de la sensibilidad especialmente, del sistema final a aplicar.

Este proyecto se enmarca en una línea de trabajo sobre la modulación de la mojabilidad en superficies de vidrio realizado por el grupo SyM (Señal y Medida) del Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM).

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

Como superficies modulables se han empleado filtros de microfibras de vidrio GF/C de 90 mm, con un diámetro de poro de 1,2 μm (Whatman plc. Maidstone, UK).

Los silanos estudiados en este trabajo han sido: viniltrimetoxisilano (C-02), butiltrietoxisilano (C-04), 7-octenilmetoxisilano (C-08), 10-undeceniltrimetoxisilano (C-11), docoseniltrimetoxisilano (C-22) y 1,1,2,2-perfluorodeciltrimetoxisilano (C-10F), suministrados por Gelest, Inc. (Morrisville, PA, USA) (Figura 6).

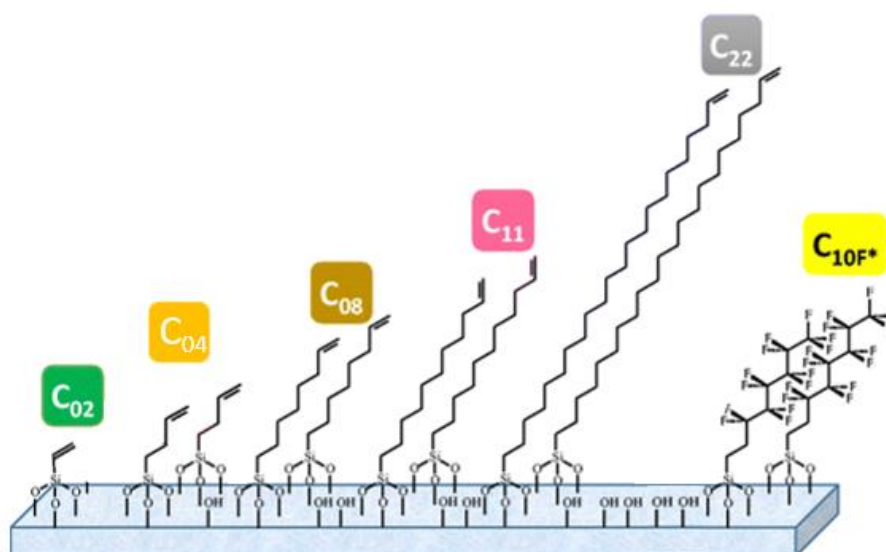


Figura 6. Silanos empleados una vez son anclados al soporte.

Además, se han empleado los siguientes biorreactivos: biotina tiolada (síntesis propia del grupo de investigación siguiendo el protocolo de Weinrich *et al.*, 2009), Albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-aldrich, Darmstadt, Alemania), Inmunoglobulina G antibiotina de conejo (Abcam plc, Cambridge CB4 0FL, Reino Unido), e Inmunoglobulina G anticonejo de cabra fusionado al fluoróforo Alexa-Fluor-647 (Eugene, Oregón, E.E.U.U.).

Los tampones empleados han sido PBS (Na_3PO_4 10mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM, pH 7,4), PBS-G (PBS con 5% de glicerol) y PBS-T (PBS con 0,05% de Tween 20). Como disolventes se ha empleado tolueno en grado de síntesis, isopropanol y agua Milli-Q® (*Milli-Q® water*).

3.2. Silanización de superficies

Los filtros de microfibras se recortaron en fragmentos rectangulares (“chips”) de unos 20x12 mm, de los que la esquina superior derecha se recortó en arcos de mantener en todo momento la correcta orientación del chip. En primer lugar, se procede a la activación de la superficie, para lo cual los chips se introdujeron en la cámara ultravioleta UV-OH 150 Lab (FHR, Ottendorf-Okrilla, Alemania) y se irradiaron durante 5 minutos por ambas caras.

La silanización se realizó por vía húmeda, para lo cual se preparó una disolución del silano correspondiente al 1% en tolueno. La mojabilidad de la superficie resultante dependerá de la longitud de cadena del silano empleado. Todos los silanos se presentan en estado líquido a temperatura ambiente a excepción del silano C-22 (docoseniltrióxidosilano) que, debido a su elevado peso molecular, está en estado sólido.

Los silanos, por acción de la humedad ambiental se degradan, reduciéndose la adhesión a la superficie. Esto es debido a que, en presencia de agua, los grupos metilos/etilos se liberan formando metanol, y el átomo de silicio queda unido a grupos hidroxilo, sin la capacidad de reaccionar con los radicales de la superficie (Figura 7) (Arkles *et al.*, 2014). Los viales que los contienen deben rellenarse de argón (gas noble de alta densidad) y se sellan con Parafilm tan pronto se ha extraído la alícuota que se va a emplear. Por otro lado, una vez realizadas las disoluciones correspondientes de los silanos, está establecido que se dispone de unas dos horas hasta que el silano quede inservible por degradación. Esto limita la cantidad de repeticiones que se pueden realizar en serie con una misma alícuota.

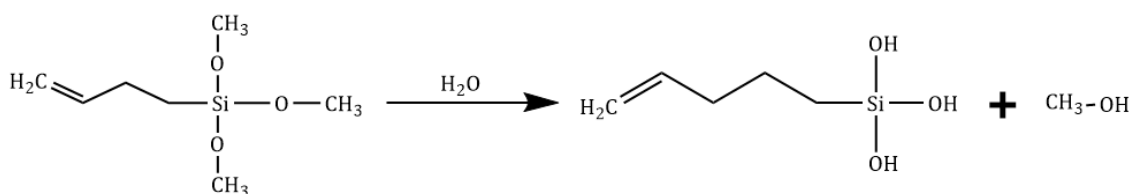


Figura 7. Estructura química y degradación del silano C-04.

La silanización se realizó en viales de 50mL, en cada uno de los cuales se depositó un chip, en el que permaneció durante 15 minutos en la disolución. Posteriormente, se realizó el lavado con isopropanol, para lo cual se realiza un lavado a chorro. Finalmente, las superficies se dejaron secar al aire y se introdujeron en estufa a 150°C toda la noche (Noguera *et al.*, 2017).

Paralelamente, y con el fin de aumentar la hidrofobicidad de las superficies, también se silanizaron algunas réplicas adicionando el silano fluorado 1,1,2,2-perfluorodeciltrióxidosilano (C-10*F) en concentración 1/10.000 v/v. Dado que la disolución del silano no fluorado en tolueno es al 1%, una vez concluida la silanización el C-10*F quedará al 1% de concentración en relación con el silano no fluorado (y así se nombrará en adelante). Este silano no puede realizar la reacción tiol-eno al carecer de doble enlace (C=C) terminal, por lo que no se le puede anclar la molécula de biotina tiolada, pero puede unirse covalentemente a la superficie, al igual que los otros silanos, contribuyendo a la modulación de la misma (Figura 6). También se prepararon réplicas de chips testigos tratados solo con tolueno, y otras con tolueno más 1/10000 de C-10*F. Cada tratamiento se llevó a cabo sobre 4 chips.

3.3. Caracterización de las superficies

Para evaluar la mojabilidad de las superficies se midió el ángulo de contacto estático con gotas de agua Milli-Q® (WCA) usando el equipo Attension Theta Lite (Biolin Scientific AB) junto al software OneAttension, en el que se programa un sistema de medición automático.

El procedimiento seguido para examinar este parámetro consistió en colocar 2 gotas de 3 μ L medidas sobre cada una de 3 réplicas de cada superficie. Para ello, el programa detecta la caída de la gota y cuando se deposita sobre la superficie inicia una cuenta atrás de 3 segundos (tiempo para que la gota se estabilice), tras lo que se graban imágenes de la gota durante 4 segundos a 26 fps (fotogramas por segundo). Una vez establecida la línea de la superficie, el programa estima el ángulo medio, su desviación típica y el volumen aproximado de la gota empleando la ecuación de Young-Laplace.

3.4. Fijación de la biotina tiolada a las superficies

Con el fin de inmovilizar los chips en la etapa de anclaje de la biotina tiolada al silano, fueron fijados sobre un portaobjetos de vidrio empleando adhesivo en cinta de dos caras libre de disolventes.

A continuación, empleando un Biodot AD1500 (Biodot Inc., Alton Pkwy, Irvine, CA, E.E.U.U.) se depositaron gotas de 50 nL (8 líneas) de biotina tiolada (capaz de realizar la reacción tiol-eno) en PBS-G. Para ello se realizaron diluciones seriadas a 1/3 desde 50mM hasta 0,023mM (8 diluciones \equiv 8 líneas) generando una matriz de puntos. La distancia entre puntos y líneas se fijó en 1,5mm. Asimismo, entre las filas 3 y 4 (5,56-1,85mM) se dejó un espacio equivalente a una línea vacía (no se imprimió); esta línea permite posteriormente obtener el fondo y le confiere asimetría a la matriz para confirmar que la orientación del chip es correcta (Figura 8).

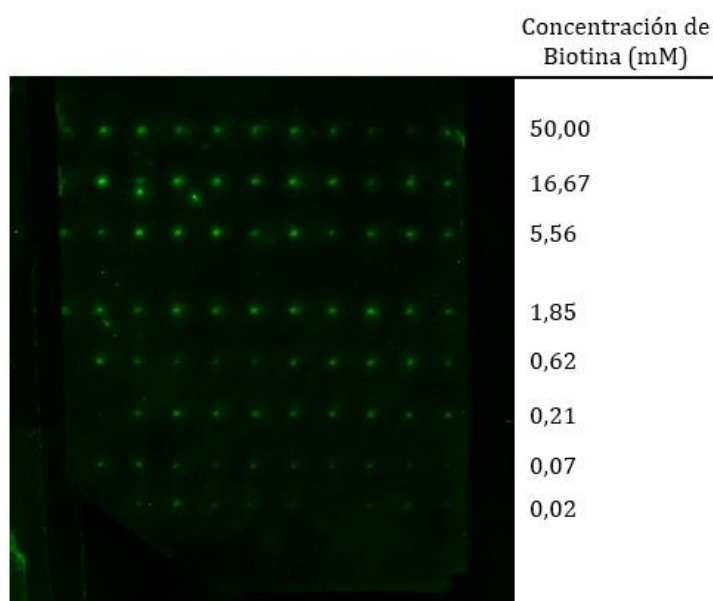


Figura 8. Distribución de la matriz de puntos sobre la superficie del chip.

Seguidamente, y para que la reacción del tiol-eno se produjera, uniéndose la BT covalentemente al silano de los chips, éstos se introdujeron en la cámara ultravioleta UV-OH 150 Lab y se irradiaron durante 30 segundos, de este modo se activa la propia reacción del tiol-eno por fotocatalisis. Tras esto, se dejaron 10 minutos en oscuridad para que la reacción se completara y se eliminó el exceso de biotina mediante dos lavados sucesivos con PBS-T y otro con agua destilada.

3.5 Reacción de reconocimiento de la biotina

Para reconocer el array de biotina fijada sobre la superficie, se preparó una disolución con el anticuerpo anti-biotina de conejo a 0,5 mg/l en PBS-T, con la que se recubrió el chip, utilizando el método del “plastón”. Este método consiste en la aplicación de una gota de 35µl en el centro del chip, que será repartida sobre la superficie del mismo al colocarse un cubreobjetos de 25mm x 25mm, y se deja incubar durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados sucesivos, según el procedimiento optimizado en este trabajo, con PBS-T a chorro y un último lavado con agua destilada, a chorro también, para eliminar el exceso de anticuerpo no unido.

A continuación, se preparó otra disolución con un anticuerpo anticonejo marcado con el fluoróforo Alexa-Fluor-647 (IgG-AF647) a 5 mg/l y se recubrió el chip con ella (plastón), incubándolo una hora en oscuridad hasta que la reacción se completó (Figura 5). Transcurrido este tiempo, se sucedieron de nuevo tres lavados con PBS-T seguidos de un lavado con agua destilada.

Finalmente, la fluorescencia obtenida se registró mediante un lector de fluorescencia de superficie (SFR, *Surface Fluorescence Reader*) de fabricación propia (Mira *et al.*, 2004). Las imágenes se obtuvieron tras 5 segundos de exposición a un valor de ganancia de 5.

3.6. Tratamiento de imagen

De las imágenes obtenidas se tomó una matriz de 8x9 puntos que se trataron empleando el programa TotalLab™ Quant v13.2 para de cuantificar la señal de los puntos obtenidos con las distintas concentraciones de biotina tiolada. Las imágenes se analizaron con el fin de obtener determinados valores como la intensidad de la señal, el fondo producido por la superficie y especialmente el SNR (*signal-to-noise ratio* o relación señal/ruido), obtenido al dividir la intensidad de los puntos por la desviación típica del fondo producido por el chip (Johnson, 2006). Como norma general, en los artículos relacionados con los biosensores se exige una SNR superior a 10 para considerar que se está produciendo una señal detectable. Como se está poniendo a prueba una plataforma nueva, se ha optado por incrementar dicho umbral hasta una SNR de 20, obteniendo así mayor fiabilidad. Aquellos puntos que distaban de 3 veces la desviación típica se eliminaron, calculando, nuevamente el valor medio y su desviación típica.

3.7. Tratamiento estadístico de datos

Se utilizó el test Q para eliminar los datos anómalos del WCA en las diferentes superficies. Los datos que entonces, no quedaron descartados fueron analizados consecuentemente para caracterizar nuestra superficie.

Los resultados obtenidos del WCA se han analizado mediante análisis de varianza multifactorial y univariante. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si se observan diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$). Se utilizó una prueba de rango múltiple para comparar los valores medios. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Los grupos homogéneos se representan mediante letras distintas (a, b, c, d, etc.), no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una letra identificativa del grupo homogéneo.

Finalmente, con el fin de caracterizar en mayor detalle determinados tratamientos en los que se hubiera obtenido una SNR significativa, se ajustaron los resultados obtenidos a una curva logística (sigmoideal) de 4 parámetros (Ec. 1) empleando el programa SigmaPlot (2009).

$$y(x) = \min + \frac{(\max - \min)}{\left(1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^{-p}\right)} \quad (\text{Ec. 1})$$

Como variable Y se tomó la fluorescencia detectada y como variable X la concentración de biotina de dicha fluorescencia. Además, para visualizar la curva correctamente, el eje X se ha de expresar en forma logarítmica, de tal forma que, al mantener una misma ratio de disolución (por ejemplo, $\frac{1}{2}$), los puntos queden regularmente espaciados. Esto obliga a sustituir el blanco ([BT]=0) por un valor cuasi nulo, habiéndose escogido 10^{-4} mM.

La curva obtenida se normaliza estableciendo el valor 0 mínimo y 1 al máximo, y se despejan los parámetros, definidos como la concentración de analito (en este trabajo, biotina tiolada) en el que se alcanza un determinado percentil. Así, se pueden obtener diferentes parámetros de calidad del método desarrollado, como el límite de detección, que se define como la concentración de BT para la cual se alcanza EC10, es decir, el 10% de la señal máxima, el límite de cuantificación al alcanzar EC20, el límite superior como EC80, el intervalo de trabajo como el intervalo entre los dos anteriores (EC20, EC80), y la sensibilidad como EC50.

4. Resultados

4.1. Estudios preliminares

El material (fibra de vidrio) fue estudiado con anterioridad como soporte en el que realizar reacciones de reconocimiento molecular de biotina (de Barutell, 2018), pero no se ha caracterizado en profundidad para su uso como soporte de inmunoensayos. Al tratarse de un material novedoso en el que realizar los inmunoensayos, requirió de la adaptación de los protocolos, así de como la optimización de los diferentes procesos.

4.1.1. Silanización de los chips

Como punto de partida en este trabajo se prepararon chips de microfibra de vidrio silanizados con los alcoxisilanos indicados en el apartado 3.1. de materiales y métodos (C-02, C-02*F, C-04, C-04*F, C-08, C-08*F, C-11, C-11*F, C-22, C-22*F); preparando tres réplicas de cada tratamiento. También se prepararon réplicas de chips testigos tratados solo con tolueno, y otras con C-10*F (al 1%).

La caracterización de las diferentes superficies obtenidas se llevó a cabo midiendo el WCA como se indica en el apartado 3.3 de materiales y métodos. Una vez eliminados los datos anómalos (test Q), el resto fue analizado consecuentemente para caracterizar la superficie. Para ello se realizó un análisis de varianza multifactorial (variable: tratamiento) para el WCA. Comparando los valores medios de WCA para los 12 diferentes niveles de Tratamiento. La prueba-F en la tabla ANOVA determinó que sí que se observan diferencias significativas entre las medias.

En esta primera aproximación se asignó un valor de WCA=0 a aquellos casos en los que la gota de agua Mili-Q fue absorbida rápidamente por tratarse de superficies hidrófilas y con estructura tridimensional.

Una vez observado que existían diferencias significativas, se realizó un nuevo estudio ANOVA univariante, eliminando los datos de los tratamientos hidrófilos, en los que la gota fue absorbida, y se realizó la prueba de rango múltiple que evidenció qué medias son significativamente diferentes de otras. En la Tabla 1 se presentan los resultados de las medias con su error estándar por cada tratamiento.

Tabla 1. Media del WCA para cada nivel de Tratamiento y el error estándar de cada media. Letras diferentes indican diferencias significativas al 95% entre las medias utilizando el procedimiento de LSD de Fisher.

Tratamiento	Casos	Media
C-04	5	120,6 ± 1,9 ^a
C-04*F	6	128,9 ± 1,8 ^b
C-08	6	132,3 ± 1,8 ^{b c}
C-08*F	6	137,5 ± 1,8 ^{d e}
C-11	6	134,1 ± 1,8 ^{c d}
C-11*F	6	134,0 ± 1,8 ^{c d}
C-22	6	139,3 ± 1,8 ^e
C-22*F	6	138,2 ± 1,8 ^{d e}

En la Figura 9 se observa que conforme la cadena de carbonos del silano utilizado es más larga, el WCA aumenta poniendo de manifiesto que la superficie es más hidrófoba, independientemente de si está fluorado o no, hasta llegar a un alto grado de hidrofobicidad (valores superiores a 130°) donde ya no se aprecian grandes diferencias en los valores medios, e incluso en los valores para el silano C-11 se aprecia un leve descenso del valor medio con respecto al C-08*F.

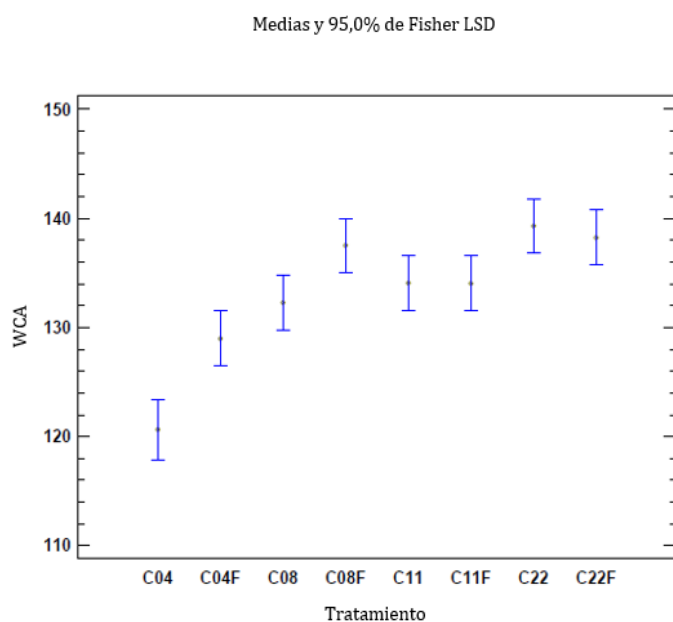


Figura 9. Media del WCA y su desviación estándar por cada tratamiento realizado. Resultados gráficos del análisis ANOVA simple por tratamientos.

Del mismo modo, se realizó un ANOVA multifactorial estudiando dos factores: tipo de silano y adición de silano fluorado (C-10*F). Nuevamente se observaron diferencias significativas ($p= 0,0000$), entre los diferentes silanos utilizados (Figura 10), a pesar de incluir datos correspondientes a la adición o no de C-10*F. Esto fue debido fundamentalmente al menor WCA del tratamiento C-04, incluso en presencia de C-10*F.

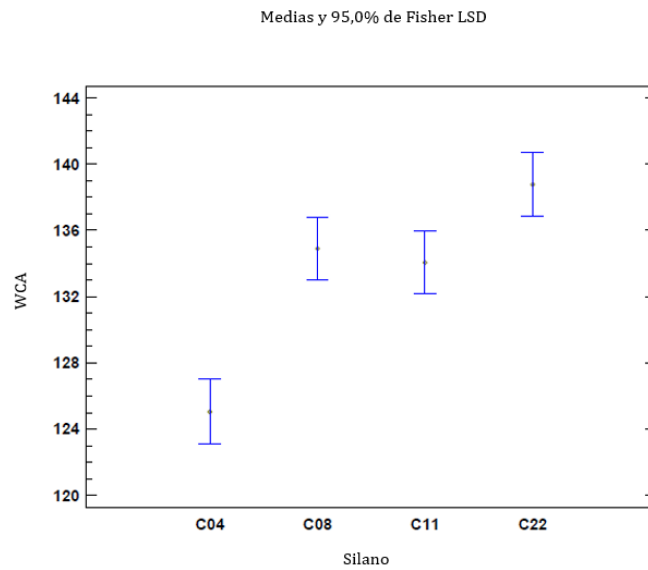


Figura 10. Media del WCA y su desviación estándar por cada silano utilizado. Resultados gráficos del análisis ANOVA multifactorial por silano y adición de fluorado.

También resultó significativa ($p=0,0311$) la adición de fluorado (1% de alcoxisilano fluorado C-10*F independientemente del silano empleado). Aumentando significativamente el valor del WCA (Figura 11).

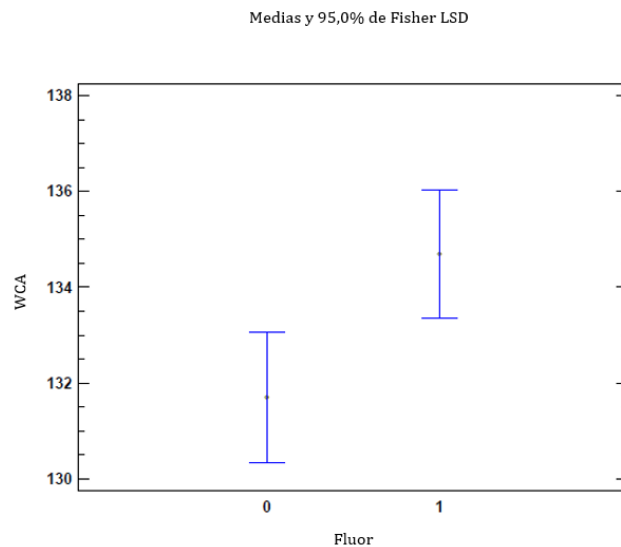


Figura 11. Media del WCA y su desviación estándar para aquellos tratamientos que contienen un 1% de alcoxisilano fluorado C-10F* con respecto del silano empleado y para los que solamente fueron tratados con el silano. Resultados gráficos del análisis ANOVA multifactorial por adición de fluorado y silano.

Una vez obtenida la modulación de la hidrofobicidad utilizando superficies silanizadas, se ensayó sobre cada superficie funcionalizada un inmunoensayo biotina-antibiotina-Alexafluor-647 siguiendo las etapas descritas en los apartados 3.4. y 3.5. de materiales y métodos, obteniéndose imágenes de fluorescencia correspondientes a las matrices de puntos donde se depositó la biotina tiolada.

Puesto que el objetivo era establecer un inmunoensayo sensible, con baja adsorción inespecífica sobre las superficies funcionalizadas, se procedió a optimizar el método. En los siguientes apartados se muestran, de forma abreviada, los criterios seguidos para mejorar el rendimiento del inmunoensayo, el procedimiento de aplicación de los biorreactivos y el protocolo de lavado.

4.1.2. Optimización del sistema de lavado y de aplicación

A continuación, con el fin de eluir todo el reactivo no unido covalentemente para reducir el ruido de fondo, se evaluaron dos estrategias: lavado de inmersión en agitación y lavado a chorro.

La primera consiste tres lavados sucesivos por inmersión en PBS-T (el primero de 5 minutos, y los dos siguientes de 10 minutos) y un último lavado, también por inmersión, en agua destilada (10 minutos).

La segunda estrategia consiste en una serie de lavados a chorro sobre el chip (3 de PBS-T y 1 de agua destilada), que es sujetado con pinzas y se aplica un chorro continuado (aprox. 20 mL), cuidando de lavar bien ambas caras, pasando por toda la superficie. De modo que se redujera al máximo posible el ruido de fondo que aparece tras aplicar el anticuerpo marcado con Alexafluor 647.

Aunque los chips lavados por inmersión lograron una mayor eliminación del ruido de fondo en aquellos chips altamente hidrofóbicos, también se apreció un efecto “mojado”. Por muy hidrófobo que sea el chip cuando está inmerso en la disolución de lavado, el líquido penetra en cierta medida en la estructura tridimensional del material, siendo de difícil eliminación y causando que frente a la aplicación de las disoluciones de anticuerpos, los chips se comporten como sus homólogos más hidrofílicos y absorban la disolución en el centro del chip, sin lograr una distribución homogénea por el chip (Figura 12).

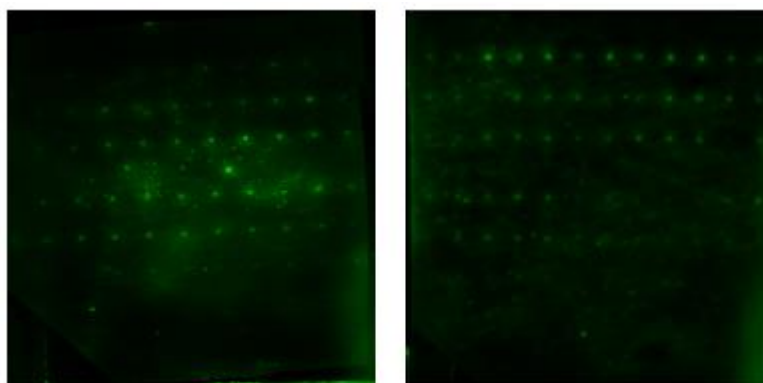


Figura 12. Resultado de la realización del ensayo mediante el lavado por inmersión (izquierda) y a chorro (derecha).

Se observó que el lavado “a chorro” es más rápido y ofrece mejores resultados al no observarse el denominado “efecto mojado”, y que permite la aplicación de los reactivos mediante el método del “plastón”. En este método, cuando el chip es hidrófilo o se comporta

como tal (debido al efecto “mojado”), el reactivo se absorbe mayoritariamente en la parte central del chip, y aparece una estructura de halo alrededor del punto de aplicación (Figura 12).

La disolución se incubaría de este modo con el cubreobjetos y luego se lavaría. Este método de aplicación nos permite un ahorro de inmunoreactivos, ya que consigue, con volúmenes reducidos, la obtención de resultados analizables y reproducibles.

4.1.3. Reducción de la adsorción inespecífica

Inicialmente, con el objetivo de disminuir la adsorción inespecífica y mejorar a su vez la definición de los puntos en el array del chip, se consideró la adición de un paso previo a la aplicación del anticuerpo primario: el bloqueo con BSA en PBS-T al 1%. Para estudiar su efecto, se realizó el mismo ensayo a dos temperaturas diferentes: temperatura ambiente y a 4°C, durante 1 hora de incubación. A su vez, se compararon con chips en los que no se había aplicado BSA (Figura 13).

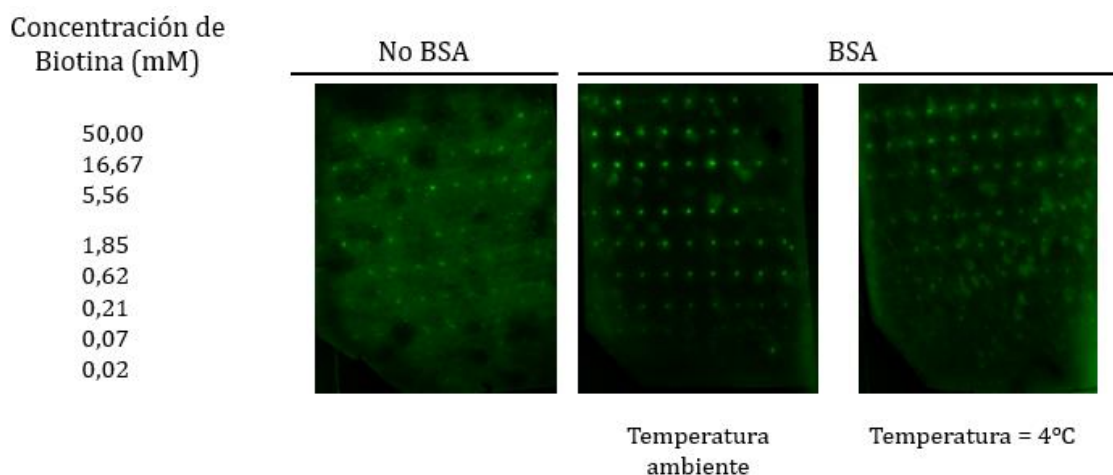


Figura 13. Resultados obtenidos de los tratamientos sin adición de BSA y con adición de BSA, sobre C-11. El tratamiento con BSA es a su vez estudiado con dos temperaturas de incubación, a temperatura ambiente (aproximadamente).

En los resultados se pudo observar que el uso de BSA proporciona unos resultados más nítidos, tanto por la reducción del ruido de fondo como por la mejora en la definición de los puntos (Figura 13). A su vez, parece que el hecho de realizar el ensayo a temperatura ambiente da lugar a resultados ligeramente mejores en lo que a ruido de fondo respecta. La matriz de puntos se observa claramente en todos los chips tratados con BSA permitiendo así un bloqueo efectivo.

Así mismo, se estudió si la adición de BSA se debe realizar en una etapa específica o si, por lo contrario, pudiera hacerse simultáneamente a la adición del anticuerpo primario (Figura 14).

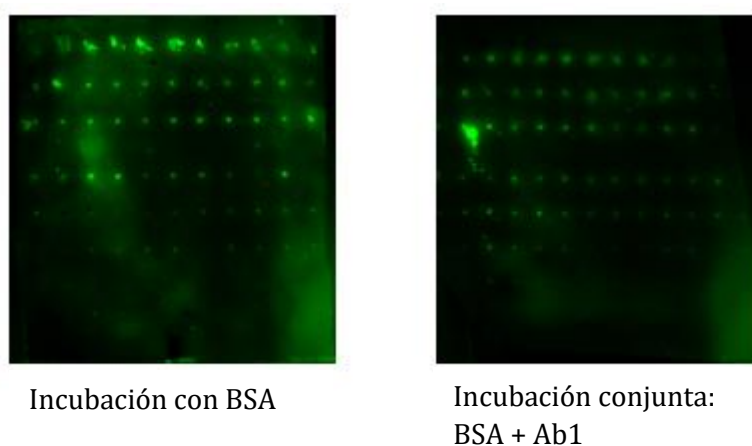


Figura 14. Resultados de realizar la etapa de incubación de la BSA individualmente o conjuntamente con el Ab1 sobre C-11.

De los resultados obtenidos, se pudo observar que el tratamiento en que se incuban a la vez el Ab1 y la BSA es efectivo. La incubación conjunta no solamente nos permite el ahorro en PBS-T, también presenta una reducción del tiempo total de realización del inmunoensayo y unos buenos resultados reproducibles. Se observó también un efecto mojado agudo en aquellos chips en los que la incubación con BSA se realizó en una etapa independiente, a la vez que el método de lavado fue el de inmersión. En estos chips, la matriz de puntos no era prácticamente distinguible (Figura 15). Se decidió pues, realizar el inmunoensayo empleando la incubación conjunta de la BSA y el Ab1, utilizando el método de lavado a chorro.

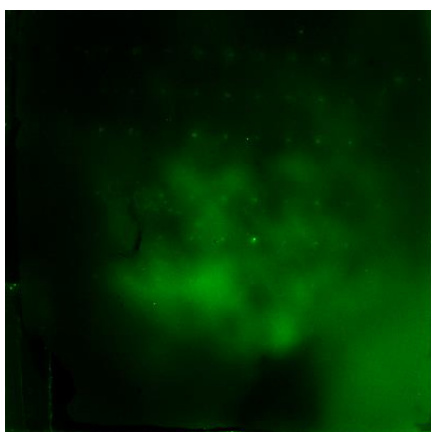


Figura 15. Resultados obtenidos de la combinación de la incubación independiente de la BSA y el lavado por inmersión sobre C-11.

4.2. Resultados del inmunoensayo

Tras la optimización del proceso de preparación del inmunoensayo, se aplicó el sistema a cuatro chips de cada uno de los tratamientos estipulados previamente (T, T*F, C-02, C-02*F, C-04, C-04*F, C-08, C-08*F, C-11, C-11*F, C-22, C-22*F). Los resultados se muestran resumidos en la Tabla 2. Las 8 concentraciones de biotina tiolada corresponden a una disolución inicial de 50mM y sus siguientes diluciones seriadas con un factor de 1/3. De todas estas concentraciones, se seleccionó como valor representativo la de 0,21mM, que se encuentra en la sexta fila desde arriba, obteniéndose la media de las 9 repeticiones de esa fila. Se ha elegido esta concentración de 0,21mM debido a que el valor de dicha concentración se encuentra dentro del intervalo de trabajo de todos los tratamientos efectivos obtenidos.

Tabla 2. Resultados de los chips revelados con IgG-AF647.

Silano	C-10*F (%)	Menor [BT] detectada [1] (mM)	Área del punto (mm ²) [2]	Intensidad de la señal (píxel*10 ⁶) [2]	SNR [2]	Intensidad/área (píxel*10 ⁶ /mm ²) [2]	WCA (°)
T	0	-	-	2,34 E+04	0,48	-	-
T	1	-	-	3,29 E+04	0,26	-	-
C-02	0	-	0,543	3,25 E+05	1,89	1441	-
C-02	1	-	-	2,07 E+05	1,42	-	-
C-04	0	0,62	0,717	3,77 E+05	19,72	2450	120,6 ± 1,9
+C-04	1	-	0,543	3,95 E+05	6,51	1350,68	128,9 ± 1,8
C-08	0	50,00	0,347	6,72 E+05	4,54	5305	132,3 ± 1,8
C-08	1	1,85	0,066	6,15 E+05	9,01	7328,12	137,5 ± 1,8
C-11	0	0,07	0,049	8,58 E+05	58,27	17477	134,1 ± 1,8
C-11	1	0,07	0,110	5,49 E+05	46,82	8381,70	134,0 ± 1,8
C-22	0	0,02	0,087	7,56 E+05	95,42	9387	139,3 ± 1,8
C-22	1	0,02	0,066	5,75 E+05	149,92	10191,48	138,2 ± 1,8

[1] Concentración de BT más baja detectada con SNR>20.

[2] Datos para puntos con [BT]= 0,21mM

En primer lugar, observamos que en los ensayos testigo del tolueno obtenemos una señal de ruido de fondo debida a las adsorciones inespecíficas de los anticuerpos, ya que al no haber silano al que se pueda anclar la biotina, esta es lavada, y los anticuerpos penetrarían en la estructura tridimensional del material. Estos Ab son de difícil eliminación, debido a la elevada adsorción inespecífica de la inmunoglobulina G a superficies hidrófilas, descrita en multitud de estudios sobre diversas superficies, en ocasiones dedicados en exclusiva a este aspecto (You y Lowe, 1996). Este hecho se observa también en el C-02 pese a estar tratado con un silano.

Aunque se pueden observar puntos en la superficie, los chips hidrófilos no presentan SNRs aceptables (>20) ya que, al aplicar los reactivos, estos chips absorbían la gota del plastón con rapidez, efecto que no sucedía en los chips de mayor hidrofobicidad, causando una distribución de los anticuerpos más difusa y aumentando el ruido de fondo.

En los chips con silanos muy hidrófilos como C-02, la adsorción inespecífica de los anticuerpos es tan elevada que las señales de biotina quedan ligeramente enmascaradas y por ello no se pueden observar todas las filas con claridad. Conforme la hidrofobicidad aumenta, se reduce la adsorción inespecífica.

En los chips hidrófobos encontramos que el área de los puntos es menor y la intensidad de la señal mayor con respecto a la de los hidrófilos. En este último caso se debe a que al aplicar las gotas de biotina tiolada, las gotas se esparcían más.

Observamos también, cómo la adición de fluorado ofrece mejoras en los resultados obtenidos, tanto de SNR como de intensidad por mm^2 . Sin embargo, esto no es así para los chips tratados con C-04 y 1% de C-10*F, y esto puede deberse a que el fluorado afecte a la unión de la biotina tiolada al silano si este es de cadena corta.

4.3. Caracterización de los sistemas desarrollados

A partir de los datos obtenidos para cada uno de los sistemas de inmunoensayo heterogéneo desarrollados sobre las distintas superficies silanizadas, se obtienen las correspondientes ecuaciones de la curva logística, cuyo ajuste se evalúa mediante el test Chi-cuadrado (R^2). Tal y como se ha comentado en materiales y métodos, de esta curva se pueden determinar rápidamente los siguientes parámetros de calidad del método: límite de detección (LD), límite de cuantificación (LQ), límite de linealidad (LL) (se ha mantenido este término “LL” para definir el límite superior del intervalo de trabajo por analogía con la definición de dicho intervalo en las rectas de calibrado), intervalo de trabajo (IT), y la sensibilidad. Las características de la curva logística determinan que un mayor intervalo de trabajo suele conllevar un EC50 mayor (una sensibilidad peor), por lo que generalmente lo mejor es conseguir un compromiso entre ambos parámetros.

Las figuras expuestas a continuación (Figura 16-23) muestran chips impresos con *arrays* de biotina tiolada (50-0.023 mM) y utilizando los dos anticuerpos referenciados en materiales y métodos (IgG de conejo antibiotina + IgG-AF647 de cabra anticonejo). Gracias a la optimización del proceso, fue posible cuantificar los resultados obtenidos de aquellos chips tratados con C-04, C-08, C-11, C-22 y sus respectivos fluorados; permitiendo el ajuste de los datos a una curva sigmoideal de 4 parámetros.

Estos parámetros son solamente representativos del método de reconocimiento de la biotina empleado en este trabajo sobre la superficie en la que se han obtenido estos datos (fibra de vidrio), sin poder extenderse a otros protocolos o aplicaciones.

Conforme el chip presentaba una mayor hidrofobicidad, las inmunoglobulinas G presentaban menor tendencia a la adhesión inespecífica, obteniendo fondos muy limpios que permiten una mejor determinación de la intensidad de los puntos.

El silano C-04 conforma el caso más hidrofílico de las superficies estudiadas cuyos resultados han permitido estimar la curva del sensor (Figura 16). Se observó que las concentraciones de biotina tiolada se ajustaban bien a la curva logística ($R^2=0,9115$). Se obtuvieron otros parámetros de relevancia, con el fin de compararlos con los estudios siguientes, como un LD de 0,105 mM y un LQ de 0,139 mM, junto a un intervalo de trabajo de (0,139-0,392 mM). La sensibilidad, de 0,234 mM era mayor a la del mismo silano fluorado (Figura 17), sin embargo, este tratamiento no resultaría el más idóneo debido a la mayor dificultad de aplicación del plastón en el mismo, motivado por su baja hidrofobicidad.

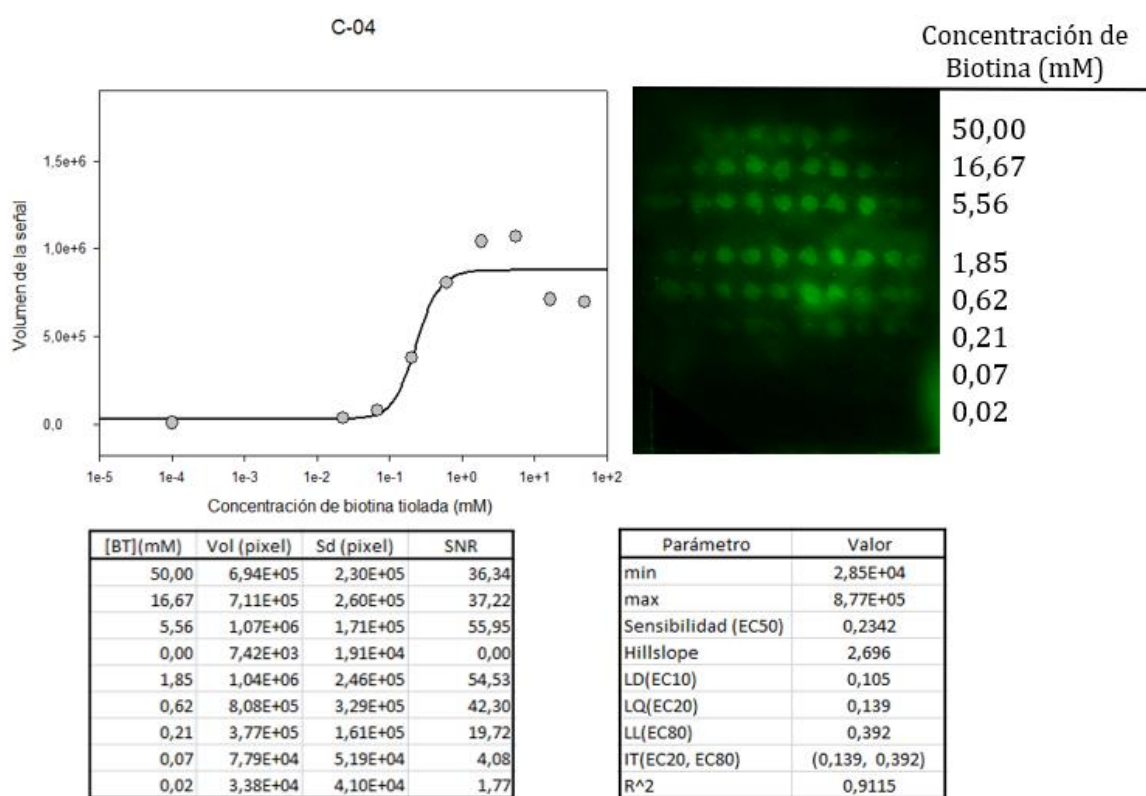


Figura 16. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-04 (abajo izqda.) y los parámetros calculados (abajo dcha.).

El tratamiento con C-04*F se ajustaba bien a la curva ($R^2=0,9709$) (Figura 17), pero presenta unos valores de SNR bajos, esto se debe al elevado ruido de fondo obtenido en este tratamiento, no obteniendo ninguna concentración que superara los valores de SNR considerados como aceptables (>20). Por este motivo este tratamiento no es el adecuado para llevar a cabo el inmunoensayo, aunque se obtiene una sensibilidad (EC50) baja (0,137mM), y un IT de (0,046-0,418).

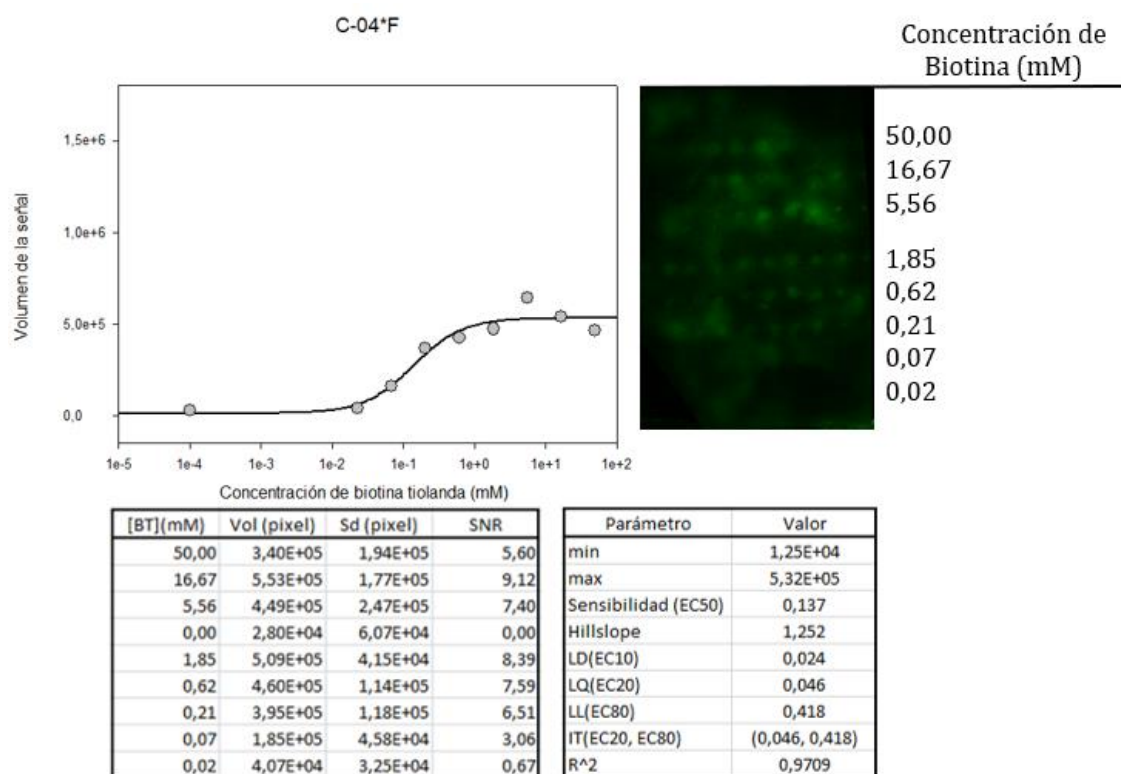


Figura 17. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-04*F (abajo izqda.) y los parámetros calculados (abajo dcha.).

El tratamiento con C-08 se ajustaba a la curva ($R^2=0,9365$) (Figura 18), pero presentaba unos valores de SNR bajos, siendo aceptable solamente aquel correspondiente a la mayor concentración de biotina tiolada. Esto se debe al ruido de fondo obtenido en este tratamiento combinado con una desproporcionada luminiscencia en la fila de mayor concentración con respecto de las otras concentraciones. Se obtiene una sensibilidad (EC50), de 0,185mM, unos valores de LD 0,027mM y LQ de 0,056mM con un intervalo de trabajo de (0,056-0,610mM). Debido a sus bajos valores de SNR, junto con el intervalo de trabajo y la sensibilidad, consideramos que este chip no es el adecuado para llevar a cabo nuestro inmunoensayo.

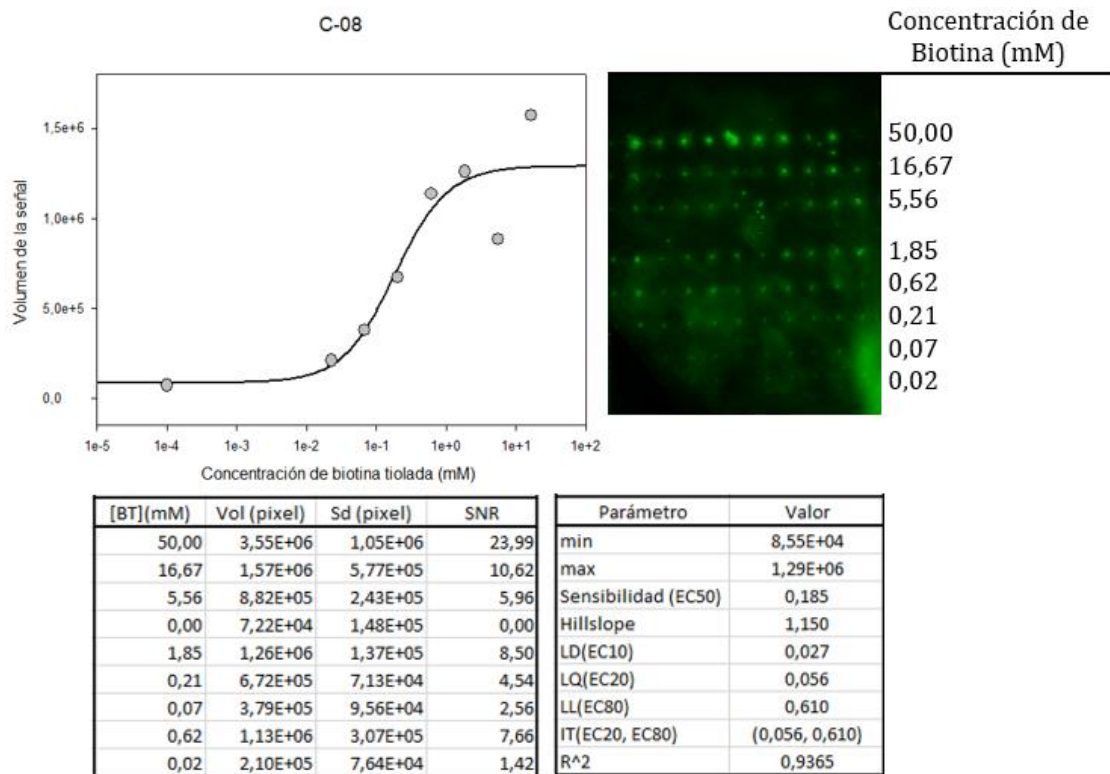


Figura 18. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-08 (abajo izqda.) y los parámetros calculados (abajo dcha.).

Sin embargo, el tratamiento con C-08*F, en el que la hidrofobicidad del chip se encontraba significativamente aumentada (Figura 9), se encuentran valores de SNR más elevados (Figura 19), lo que mejora claramente el ensayo.

La curva obtenida con el tratamiento C-08*F se ajusta correctamente ($R^2=0,9888$), y presenta una buena sensibilidad (0,260 mM). Presenta un LD de 0,139 mM, un LQ de 0,173 mM. Sin embargo, el intervalo de trabajo (0,173-0,392 mM) es demasiado estrecho, menor de un orden de magnitud (como ocurría en los anteriores casos), lo que obliga a muchas diluciones de las futuras muestras para garantizar que alguna señal esté incluida en el intervalo y sea correctamente cuantificada. Puesto que su sensibilidad no se ve acompañada de un amplio intervalo de trabajo, ni de altos valores de SNR, el tratamiento no es adecuado para nuestro sistema de reconocimiento.

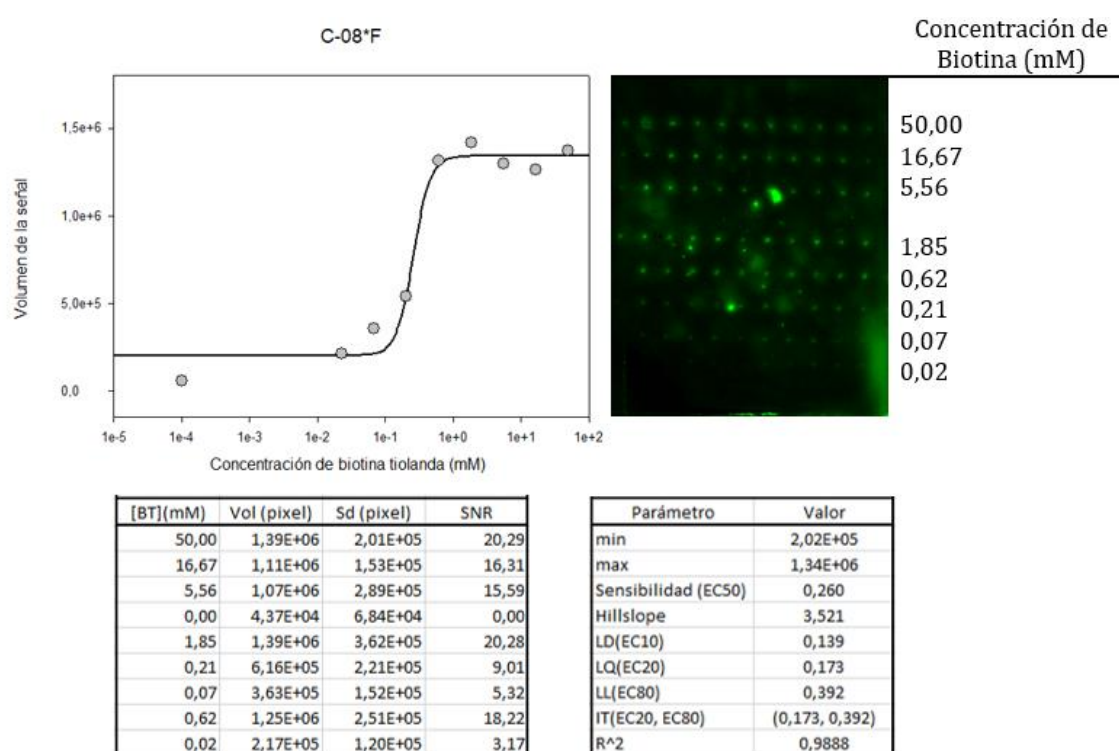


Figura 19. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-08*F (abajo izqda.) y los parámetros calculados (abajo dcha.).

El tratamiento con C-11 (Figura 20) reduce el ruido de fondo causado por adsorciones inespecíficas. La curva se ajusta correctamente ($R^2=0,9888$), y ofrece una sensibilidad de 0,227mM, con un LD= 0,017mM y un amplio IT, de dos órdenes de magnitud (0,049-2,017mM). Los valores de SNR son aceptables para todas las concentraciones que cubren el IT (>20). Es un tratamiento pues, que ofrece resultados satisfactorios para la realización del inmunoensayo y muchas posibilidades para la aplicación de este material a nuevos métodos.

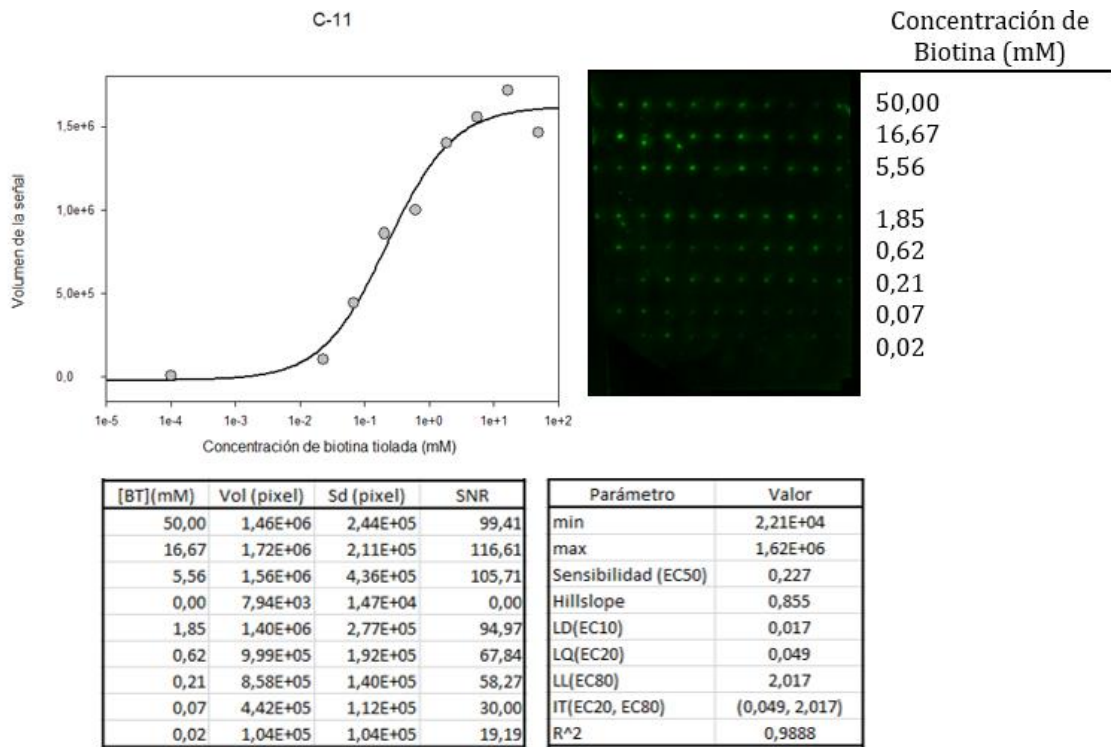


Figura 20. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-11 (abajo izqda.) y los parámetros calculados (abajo dcha.).

El C-11*F, presenta los puntos de la curva casi sobre la misma, obteniendo un ajuste casi perfecto (Figura 21).

Como hemos comentado, el ajuste de esta curva es muy certero ($R^2=0,9990$), y presenta valores de LD de 0,041 mM y LQ de 0,084 mM. Su intervalo de trabajo es también bueno (0,084-1,009 mM), y presenta una sensibilidad de 0,293mM, similar al tratamiento con C-11. Además, el C-11*F, presenta valores de SNR elevados (>20) para todas las concentraciones de biotina tiolada que cubren el IT. Es un tratamiento pues, que ofrece resultados satisfactorios para la realización de nuestro inmunoensayo.

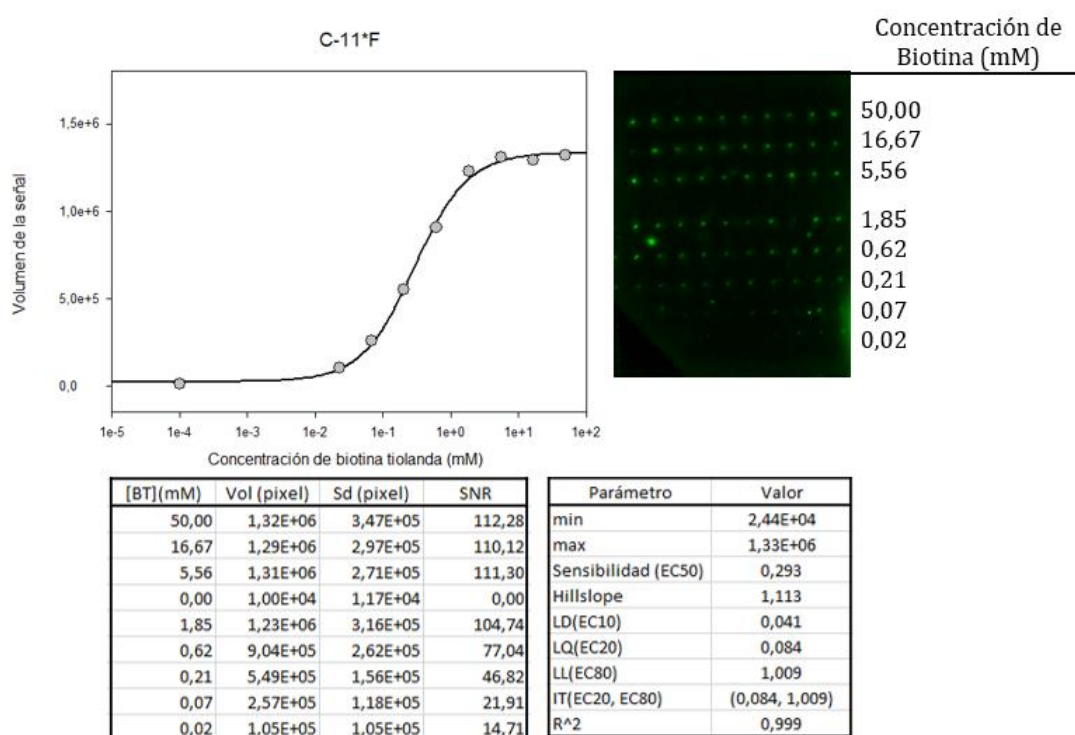


Figura 21. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-11*F (abajo izqda.) y los parámetros calculados (abajo dcha.).

En los ensayos con C-22 (Figura 22) se observa una muy buena sensibilidad del ensayo (0,141mM), presentando un LD= 0,021mM y un LQ= 0,043mM. La curva se ajusta correctamente ($R^2=0,9899$) y con un IT de un orden de magnitud (0,043-0,474mM). Es destacable que en este caso todas las concentraciones de biotina tiolada presentan valores de SNR aceptables, incluso aquellas más cercanas al límite de detección. Es un tratamiento que ofrece resultados satisfactorios para la realización de nuestro inmunoensayo.

En el caso del ajuste de esta curva, los datos para la concentración de biotina de 50mM, fueron claramente alejados del límite superior del IT, y se descartaron ya que disruptían el ajuste correcto de la curva sigmoideal.

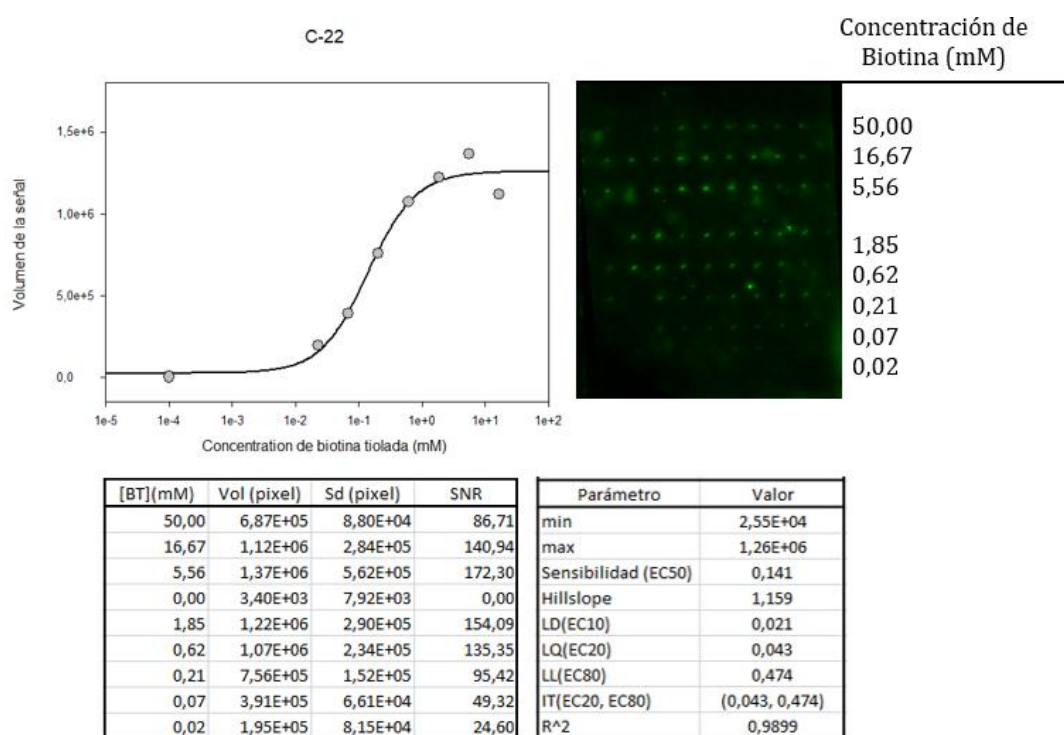


Figura 22. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-22 (abajo izquierda.) y los parámetros calculados (abajo derecha.).

En la Figura 23 se presenta el estudio del tratamiento con C-22*F, donde se observa que los datos se ajustan correctamente a la curva ($R^2=0,9899$). También en este caso, se descartaron los datos correspondientes a biotina de 50mM. Ofrece muy buena sensibilidad (0,141mM), acompañada de unos Límites de detección y cuantificación muy pequeños (0,022 mM y 0,043 mM, respectivamente). Presenta un IT de un orden de magnitud (0,043-0,460mM), y los valores de SNR son aceptables para todas las concentraciones incluso para la concentración de 0,02mM, que se encuentra muy cercana al límite de detección. Es, por tanto, un tratamiento que ofrece resultados satisfactorios para la realización de nuestro inmunoensayo.

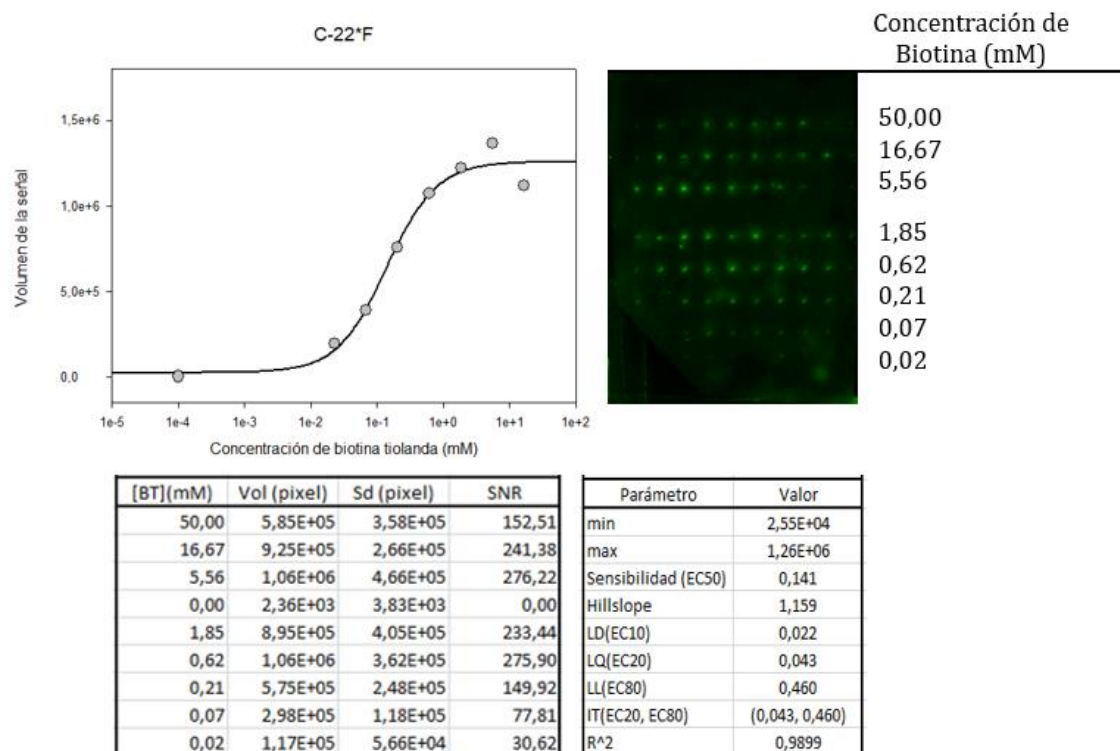


Figura 23. Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C-22*F (abajo izquierda) y los parámetros calculados (abajo derecha).

A modo de resumen podemos decir que todas las superficies excepto C-02 y C-04 presentan alta hidrofobicidad con ángulos de contacto por encima de 130° que permitieron realizar inmunoensayos heterogéneos.

A pesar de que el C-04 con adición de fluorado permitió WCA muy cercanos a 130°, no se generó un inmunoensayo heterogéneo adecuado. Tampoco fueron adecuados los inmunoensayos obtenidos con C-08, con valores de SNR bajos en el caso del C-08 sin adición de fluorado y en el caso del C-08*F se obtuvo un intervalo de trabajo muy estrecho.

Los sistemas sensores con mejores prestaciones se han obtenido con C-11 y C-22, con o sin adición de fluorado, por lo que se recomienda para futuros ensayos funcionalizar las superficies con silanos de cadena lateral larga, de al menos 11 carbonos.

El mejor límite de cuantificación (0,04 mM) y la mejor sensibilidad (0,14 mM), se obtuvieron con el inmunoensayo heterogéneo sobre C-22, solo o con la adición de fluorado.

Es interesante destacar que los ensayos con silano C-11 presentaron un intervalo de trabajo de 2 órdenes de magnitud, con un bajo límite de cuantificación (0,05 mM) y una buena sensibilidad (0,23mM).

Se ha comprobado que es viable el uso de la fibra de vidrio como soporte para reacciones de biorreconocimiento molecular. Además, el uso de matrices tridimensionales de vidrio permitirá, poder realizar este tipo de reacciones en flujo, ampliando el campo de aplicación.

5. Conclusiones

El método inicial para desarrollar el inmunoensayo se mejoró utilizando el lavado a chorro para eliminar el exceso de reactivos tras las incubaciones.

La adsorción inespecífica de los reactivos del inmunoensayo fue reducida por adición de la proteína BSA, en PBS-T al 1%, como bloqueante e incubando a temperatura ambiente. La incubación se lleva a cabo de forma conjunta a la adición del anticuerpo primario antibiotina.

Todas las superficies excepto viniltrimetoxisilano y butiltrietoxisilano presentan alta hidrofobicidad con ángulos de contacto del agua por encima de 130° que permitieron probar inmunoensayos heterogéneos.

Se recomienda para futuros ensayos funcionalizar las superficies con silanos de cadena lateral larga, de al menos once carbonos.

Los sistemas sensores con mejores prestaciones se han obtenido con 10-undeceniltrimetoxisilano y docoseniltriethoxisilano, con o sin adición de fluorado. Siendo el docoseniltriethoxisilano el que mejor límite de cuantificación y mejor sensibilidad presentó, independientemente de la adición de silano fluorado, y el 10-undeceniltrimetoxisilano el que presentó el intervalo de trabajo más amplio.

Se ha comprobado que la fibra de vidrio que es viable como soporte para reacciones de biorreconocimiento molecular pudiendo aplicarse en un futuro a las reacciones en flujo.

6. Bibliografia

ARAGÓN, P., NOGUERA, P., BAÑULS, M., PUCHADES, R., MAQUIEIRA, Á., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M. (2018). Modulating receptor-ligand binding in biorecognition by setting surface wettability. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410, 5723-5730.

ARKLES, B., MADDOX, A., SINGH, M., ZAZYCZNY, J., MATISONS, J. (2014). silane coupling agents: connecting across boundaries. 3rd ed. [eBook] Morrisville, PA: Gelest, Inc, p.3. Available at: <https://www.gelest.com/wp-content/uploads/Goods-PDF-brochures-couplingagents.pdf> [Acceso el 1 Jul. 2019].

CHAIET, L., WOLF, F. (1964). The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by Streptomyces. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 106, 1-5.

DE BARUTELL, C. Modulación de la hidrofobicidad de superficies de fibra de vidrio como mejora para el desarrollo de inmunoensayos heterogéneos [Grado]. Universitat Politècnica de València; 2018.

DE MORAES, M., CASELI, L. (2017). Supramolecular systems. *Nanostructures.*: Da Róz, A.L., de Lima Leite, F., Ferreira, M., Oliveira, O. N. São Paulo, 272, 33-52.

ESCORIHUELA, J., BAÑULS, M.J., PUCHADES R., MAQUEIRA, A. (2012). DNA Microarrays on silicon surfaces through thiol-ene chemistry. *Chem. Commun.* 48, 21162118.

GREEN, N. (1963). Avidin 1. The use of [¹⁴C]Biotin for kinetic studies and for assay. *Biochemical Journal*, 89(3), 585-591.

HOWARTH, M., CHINNAPEN, D., GERROW, K., DORRESTEIN, P., GRANDY, M., KELLEHER, N., EL-HUSSEINI, A., TING, A. (2006). A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. *Nature Methods*, 3, 267-273.

JOHNSON, D. H. (2006) Signal-to-noise ratio. *Scholarpedia*, 1:2088.

KOLB, H., FINN, M., SHARPLESS, K. (2001). Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40, 2004-2021.

LÓPEZ-MARZO A, MERKOÇI A. (2016). Paper-based sensors and assays: a success of the engineering design and the convergence of knowledge areas. *Lab on a Chip-Royal Society of Chemistry*. 16, 3150-3176.

MEHROTRA, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6,153-159.

MIRA, D., LLORENTE, R., MORAIS, S., PUCHADES, R., MAQUIEIRA, A., MARTI, J. (2004). High-throughput screening of surface-enhanced fluorescence on industrial standard digital recording media. *Optically Based Biological and Chemical Sensing for Defence*. 5617, 364-373.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (2019). NCI Dictionary of cancer terms. [online] Available at: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/immunoassay> [Accessed 25 Jun. 2019].

NOGUERA, P., ARAGÓN, P., GONZÁLEZ MARTÍNEZ, M., BAÑULS, M., PUCHADES, R., MAQUEIRA, Á. (2017). Surface biosensing improvement by wettability modulation. [Poster] Valencia: *XI International Workshop on Sensors and Molecular Recognition*.

SIGMAPLOT. (2009). San Jose, California, USA, Systat software inc.

STATGRAPHICS CENTURION XVII. (2018). The Plains, Virginia 20198, USA, Statgraphics technologies, inc.

TAYLOR, S. L., NORDLEE, J. A., NIEMANN, L. M., LAMBRECHT, D. M. (2009). Allergen immunoassays-considerations for use of naturally incurred standards, *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 83-92.

TOTALLAB™ QUANT. (2018). Keel House, Garth Heads, Newcastle upon Tyne NE1 2JE, UK: Totallab ltd.

VASHIST, S.K., LUONG J.H.T. (2016), Trends in in vitro diagnostics and mobile healthcare, *Biotechnol. Adv.* 34, 137-138.

VASHIST, S. K., LUONG, J. H.T. (2018). *Handbook of immunoassay technologies*. Eds. Sandeep K. Vashist and John H.T. Luong, 1-14.

WANG, H., NAKATA, E., HAMACHI, I. (2009). Recent progress in strategies for the creation of protein-based fluorescent biosensors. *ChemBioChem*, 10, 2560-2577.

WEINRICH, D., KÖHN, M., JONKHEIJM, P., WESTERLIND, U., DEHMELT, L., ENGELKAMP, H., CHRISTIANEN, P., KUHLMANN, J., MAAN, J., NÜSSE, D., SCHRÖDER, H., WACKER, R., VOGES, E., BREINBAUER, R., KUNZ, H., NIEMEYER, C., WALDMANN, H. (2009). Preparation of biomolecule microstructures and microarrays by thiol-ene photoimmobilization. *ChemBioChem*, 11, 235-247.

YOU, H., LOWE, C. (1996). AFM Studies of protein adsorption: 2. Characterization of immunoglobulin g adsorption by detergent washing. *Journal of Colloid and Interface Science*, 182, 586-601.

ZHANG, X., SHI, F., NIU, J., JIANG, Y., WANG, Z. (2008). Superhydrophobic surfaces: from structural control to functional application. *J. Mater. Chem.*, 18, 621-633.