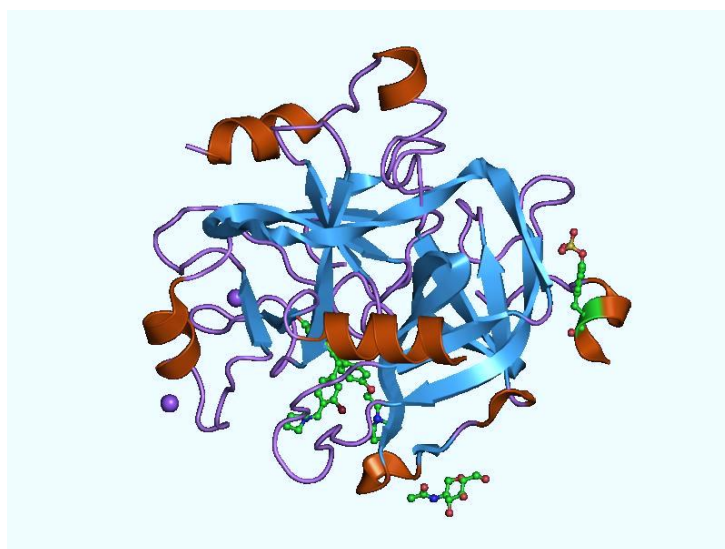




UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**SISTEMA DE BIOSENSADO FOTÓNICO PARA LA DETECCIÓN DE
TROMBINA, ALÉRGENOS Y PATÓGENOS.
FUNCIONALIZACIÓN QUÍMICA DE CHIPS FOTÓNICOS BASADOS
EN ESTRUCTURAS DE ANILLOS RESONANTES.**



Tesis presentada por:
Carlos Sánchez Sánchez

Directores de Tesis:
Javier Martí Sendra
Josep Redón i Mas
Sergio Peransí Llopis

Valencia, 2019

“Que les coses siguin d'una manera no vol dir que no es puguin canviar.”

Merlí Bergeron

A mi família, al amor de mi vida, a mis amigos...

AGRADECIMIENTOS

Desde que era tan solo un niño, mi inquietud por aprender, experimentar, sentir y preguntarme el porqué de las cosas, aumentó a lo largo de mi vida. Fue la química de la vida cotidiana la que me llamó la atención y empecé a darme cuenta de que todo lo que me rodeaba estaba relacionado con ella. A partir de entonces, supe que si algún día tenía la oportunidad de formarme como científico, esa sería mi vocación.

Ahora, después de diez años de formación entre la Licenciatura de Ciencias Químicas, el Máster en Nanociencia y Nanotecnología Molecular y el Doctorado en Química en la Universidad Politécnica de Valencia, ha surgido la oportunidad de presentar mi Tesis y al fin poder recoger los frutos que un día sembré y ver mi sueño hecho realidad.

Quiero agradecer al Instituto de Salud Carlos III por el contrato i-PFIS concedido, al INCLIVA por la gestión y por haber recibido un importante soporte a nivel clínico, a la empresa LUMENSIA Sensors por acogerme todos estos años durante el trabajo predoctoral realizado. Gracias a ellos, ha sido posible realizar satisfactoriamente la presente Tesis.

También agradecer a mis directores de Tesis, el Profesor Doctor Javier Martí y el Profesor Doctor Josep Redon, por orientarme en este trabajo, por todos los consejos que he recibido, por su sabiduría y por la disponibilidad que siempre me han facilitado para resolver problemas.

Al director general de LUMENSIA Sensors Santiago Simón, por darme la oportunidad de trabajar con ellos durante los cuatro años de mi doctorado y recibir un trato inmejorable.

A mi supervisor y compañero, el Doctor Sergio Peransí, por todo el tiempo dedicado y por la ayuda incondicional prestada durante la tesis. Gracias por el apoyo recibido a lo largo del doctorado y sobre todo en la fase final de este trabajo, que no hubiese sido posible sin él.

A Alex Hernández por llegar justo en el último momento, por ayudarme en la recta final, por el compañerismo, los *coffee break* y sobre todo por hacerme reír y sacar lo mejor de mí.

A todo el equipo de LUMENSIA Sensors y compañeros de trabajo. Agradezco la ayuda que me han dado en esta maravillosa etapa que nunca olvidaré.

A todos los compañeros del NTC que he conocido estos años, por los momentos únicos y divertidos que he podido disfrutar y compartir junto a vosotros.

A Lorena y Susana del IBMCP por todo el tiempo dedicado en ayudarme con las medidas de fluorescencia y el equipo de impresión.

Al profesor Francesco de Angelis, coordinador del grupo de plasmónica del Instituto Italiano de Tecnología (IIT), por darme la oportunidad de trabajar en su equipo y enriquecerme de nuevos conocimientos.

A Matteo Ardini, supervisor y compañero durante mi estancia en el IIT, por todo el tiempo que compartimos juntos y por enseñarme todo lo que aprendí aquellos seis meses. Grazie Mille.

A mi familia, a mis amigos y sobre todo quiero agradecer el apoyo y el cariño que he recibido por parte de mi gran amor durante todos estos años. *T'estime Paula.*

RESUMEN

En este trabajo se ha realizado la detección de analitos implicados en el sector sanitario (trombina) e industria alimentaria (alérgenos y patógenos), mediante el uso de un sistema de biosensado fotónico. Este sistema desarrollado por el equipo de LUMENSIA Sensors, emplea la tecnología de chips fotónicos de nitruro de silicio (Si_3N_4), basados en estructuras de anillos resonantes (RR).

Las estrategias de funcionalización química e inmovilización de biomoléculas como aptámeros (fragmentos de ADN de cadena sencilla) y anticuerpos, se han realizado sobre superficies planas de Si_3N_4 para la detección de analitos, como paso previo a las medidas fotónicas. Por tanto, estas estrategias se han implementado en la preparación del chip fotónico para las medidas en un entorno de laboratorio (*set-up*). En cuanto a la estrategia aplicada, ésta consiste en la activación química de la superficie del sensor. Después sobre los RR del chip, cuyo tamaño es del orden de las micras, se inmoviliza la sonda de captura (anticuerpo o aptámero), siendo ésta la encargada de reconocer específicamente al analito de interés (trombina, alérgeno o patógeno).

En los resultados obtenidos de trombina, se ha elaborado un estudio para la detección de trombina en el seno de diferentes matrices biológicas sobre superficies planas de Si_3N_4 , además del control sobre la activación de una muestra de sangre mediante el uso de factor tisular (TF) y cloruro de calcio (CaCl_2). Estos resultados han servido como un estudio preliminar a la optimización del aptámero empleado como sonda de captura, específico de la trombina para su detección sobre chips fotónicos. En lo referente a la detección de alérgenos, se han empleado dos estrategias claramente diferenciadas. Por un lado, la utilización de aptámeros como sondas de captura en la detección del Ovomucoide (OVO) y la Gliadina (GLN) sobre superficies planas Si_3N_4 . Por otro lado, la implementación de anticuerpos monoclonales como moléculas biológicas de captura sobre chips fotónicos, se ha llevado a cabo en la detección de los alérgenos Gliadina (GLN) y caseína (CAS), cuyos resultados han dado lugar a una recta de calibrado. Asimismo, se ha realizado un ensayo para la detección de GLN en muestra real, procedente de un extracto cárnico con gluten de trigo.

En cuanto a la detección de patógenos, se han utilizado dos tipos de estrategias, al igual que para los alérgenos. En primer lugar, el uso de aptámeros como sondas de captura han dado como resultado la detección de dos cepas de carácter no patogénico de la bacteria *E.coli* (Origami y XL1BLUE) sobre superficies planas de Si_3N_4 . En segundo lugar, la utilización de un anticuerpo policlonal como sonda de captura, se ha inmovilizado sobre la superficie del chip fotónico para la detección del Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) en un estudio realizado sobre la dosis dependencia del virus a diferentes factores de dilución.

Finalmente, el desarrollo de una plataforma de sensado para la detección de los analitos (trombina, alérgenos y patógenos) y donde se vayan a implementar los diferentes biosensores está en proceso.

Palabras clave: biosensor, detección, trombina, alérgenos, patógenos, chip fotónico.

ABSTRACT

In this work the detection of analytes involved in the health sector (thrombin) and food industry (allergens and pathogens) has been carried out, through the use of a photonic biosensing system. This system, developed by the LUMENSIA Sensors team, uses the technology of silicon nitride (Si_3N_4) photonic chips, based on resonant ring structures (RR).

The strategies of chemical functionalization and immobilization of biomolecules such as aptamers (single chain DNA fragments) and antibodies, have been performed on flat surfaces of Si_3N_4 for the detection of analytes, as a previous step to photonic measurements. Therefore, these strategies have been implemented in the preparation of the photonic chip for measurements in a laboratory environment (set-up). Referring to the strategy applied, it consists of the chemical activation of the sensor surface. Then on the RR of the chip, whose size is of the order of microns, the capture probe (antibody or aptamer) is immobilized, being the one in charge of specifically recognizing the analyte of interest (thrombin, allergen or pathogen).

In the results obtained from thrombin, a study for the detection of thrombin in different biological matrices on flat surfaces of Si_3N_4 has been developed, in addition to the control on the activation of a blood sample through the use of tissue factor (TF) and calcium chloride (CaCl_2). These results have served as a preliminary study to the optimization of the aptamer used as a capture probe, specific for thrombin for detection on photonic chips. Regarding the detection of allergens, two clearly differentiated strategies have been used. On the one hand, the use of aptamers as capture probes in the detection of Ovomuroid (OVO) and Gliadin (GLN) on Si_3N_4 flat surfaces. On the other hand, the implementation of monoclonal antibodies as biological capture molecules on photonic chips has been carried out in the detection of the allergens Gliadina (GLN) and casein (CAS), whose results have resulted in a calibration line. Likewise, an assay for the detection of GLN in real sample, from a meat extract with wheat gluten, has been carried out.

As for the detection of pathogens, two types of strategies have been used, as for allergens. First, the use of aptamers as capture probes has resulted in the detection of two non-pathogenic strains of the E.coli bacteria (Origami and XL1BLUE) on flat surfaces of Si_3N_4 . Secondly, the use of a polyclonal antibody as a capture probe has been immobilized on the surface of the photonic chip for the detection of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) in a study on the dose dependence of the virus at different dilution factors.

Finally, the development of a sensing platform for the detection of analytes (thrombin, allergens and pathogens) and where the different biosensors are going to be implemented is in process.

Keywords: biosensor, detection, thrombin, allergens, pathogens, photonic chip.

RESUM

En aquest treball s'ha realitzat la detecció d'analits implicats en el sector sanitari (trombina) i indústria alimentària (al·lergògens i patògens), mitjançant l'ús d'un sistema de biosensat fotònic. Aquest sistema desenvolupat per l'equip de LUMENSIA Sensors, empra la tecnologia de xips fotònics de nitrur de silici (Si_3N_4), basats en estructures d'anells ressonants (RR).

Les estratègies de funcionalització química i immobilització de biomolècules com aptàmers (fragments d'ADN de cadena senzilla) i anticossos, s'han realitzat sobre superfícies planes de Si_3N_4 per a la detecció d'analits, com a pas previ a les mesures fotòniques. Per tant, aquestes estratègies s'han implementat en la preparació del xip fotònic per a les mesures en un entorn de laboratori (*set-up*). Quant a l'estratègia aplicada, aquesta consisteix en l'activació química de la superfície del sensor. Després sobre els RR del xip, la grandària del qual és de l'ordre de les micres, s'immobilitza la sonda de captura (anticòs o aptàmer), sent aquesta l'encarregada de reconèixer específicament a l'analit d'interès (trombina, al·lergogen o patogen).

En els resultats obtinguts de trombina, s'ha elaborat un estudi per a la detecció de trombina en el si de diferents matrius biològiques sobre superfícies planes de Si_3N_4 , a més del control sobre l'activació d'una mostra de sang mitjançant l'ús de factor tissular (TF) i clorur de calci (CaCl_2). Aquests resultats han servit com un estudi preliminar a l'optimització del aptàmer emprat com sonda de captura, específic de la trombina per a la seua detecció sobre xips fotònics. Referent a la detecció d'al·lergògens, s'han emprat dues estratègies clarament diferenciades. D'una banda, la utilització d'aptàmers com sondes de captura en la detecció del Ovomucoide (OVO) i la Gliadina (GLN) sobre superfícies planes Si_3N_4 . D'altra banda, la implementació d'anticossos monoclonals com a molècules biològiques de captura sobre xips fotònics, s'ha dut a terme en la detecció dels al·lergògens Gliadina (GLN) i caseïna (CAS), els resultats de la qual han donat lloc a una recta de calibrat. Així mateix, s'ha realitzat un assaig per a la detecció de GLN en mostra real, procedent d'un extracte càrnic amb gluten de blat.

Quant a la detecció de patògens, s'han utilitzat dos tipus d'estratègies, igual que per als al·lergògens. En primer lloc, l'ús d'aptàmers com sondes de captura han donat com a resultat la detecció de dos ceps de caràcter no patogènic del bacteri *E.coli* (Origami i XL1BLUE) sobre superfícies planes de Si_3N_4 . En segon lloc, la utilització d'un anticòs policlonal com sonda de captura, s'ha immobilitzat sobre la superfície del xip fotònic per a la detecció del Circovirus Porcí tipus 2 (PCV2) en un estudi realitzat sobre la dosi dependència del virus a diferents factors de dilució.

Finalment, el desenvolupament d'una plataforma de sensat per a la detecció dels anàlits (trombina, al·lergògens i patògens) i on es vagen a implementar els diferents biosensors està en procés.

Paraules clau: biosensor, detecció, trombina, al·lergògens, patògens, xip fotònic.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
RESUM.....	vii
ÍNDICE GENERAL	ix
ESQUEMA DE LA TESIS	xiii
1 CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Biosensores	3
1.1.1 Descripción	3
1.1.2 Características.....	4
1.1.3 Desarrollo	5
1.1.4 Aplicaciones	5
1.2 Clasificación de los biosensores	6
1.2.1 Bioreceptores.....	7
1.2.2 Sistemas de transducción	9
1.2.3 Estrategias de Inmovilización	13
1.2.4 Procesos de reconocimiento	14
1.3 Métodos de detección	14
1.3.1 Detección indirecta (uso de marcadores)	14
1.3.2 Detección directa (libre de marcaje).....	15
1.4 Biosensores ópticos sin marcaje.....	16
1.4.1 Descripción	16
1.4.2 Parámetros de rendimiento	16
1.4.3 Biosensores ópticos basados en tecnología PIC	17
2 CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	21
2.1 Detección trombina y control del estado de la coagulación.....	21
2.2 Detección de alérgenos en alimentos.....	21
2.3 Detección de patógenos en cerdos y alimentos.....	21
2.4 Objetivo global	21
3 CAPÍTULO 3: EXPERIMENTAL	25
3.1 Instalaciones.....	25
3.2 Equipos y softwares	25
3.2.1 Escáner de fluorescencia GenePix 4100A Microarray.....	25
3.2.2 Equipo de microimpresión Microgrid II (BioRobotics)	25
3.2.3 Equipo de microimpresión SCIENION.....	26
3.2.4 Espectrofotómetro de microgota NanoDrop	26

3.2.5	Softwares adicionales.....	26
3.3	Materiales	26
3.3.1	Substratos.....	26
3.3.2	Disolventes	26
3.3.3	Reactivos	27
3.3.4	Agentes de bloqueo	27
3.3.5	Reactivos conjugados.....	27
3.3.6	Disoluciones tampón.....	27
3.3.7	Solución Piraña	28
3.3.8	Organosilanos	28
3.3.9	Agentes de entrecruzamiento	28
3.3.10	Sondas biológicas.....	29
3.3.11	Analitos.....	30
3.4	Metodología	30
3.4.1	Fase de diseño y fabricación.....	30
3.4.2	Fase de caracterización	32
3.4.3	Fase de biofuncionalización.....	33
3.4.4	Fase de biodetección.....	33
3.5	Procedimiento experimental.....	35
3.5.1	Ensayos trombina.....	35
3.5.2	Ensayos sangre completa	44
3.5.3	Ensayos alérgenos.....	45
3.5.4	Ensayos patógenos.....	55
4	CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS	65
4.1	Trombina	65
4.1.1	Detección de trombina sobre superficies de nitruro de silicio plano	65
4.1.2	Detección de trombina sobre chip fotónico	76
4.1.3	Estudio de la activación del proceso de coagulación de la sangre completa ..	80
4.2	Alérgenos	81
4.2.1	Detección de alérgenos sobre superficies de nitruro de silicio plano	82
4.2.2	Control de inmovilización de los anticuerpos específicos contra alérgenos ...	86
4.2.3	Detección de alérgenos con anticuerpos sobre chip fotónico	88
4.3	Patógenos.....	96
4.3.1	Detección de la bacteria E.coli sobre superficies de nitruro de silicio plano ..	96
4.3.2	Control de inmovilización del anticuerpo policlonal PCV2 (pAb-PCV2)	99
4.3.3	Detección del Circovirus Porcino PCV2 sobre chip fotónico	103
5	CHAPTER 5: CONCLUSIONS.....	113
5.1	General conclusions.....	113

5.2	Future expectation	113
6	ANEXO: Estancia del Doctorado	117
6.1	Actividades realizadas	117
6.2	Objetivos alcanzados	117
6.3	Experimental	118
6.4	Caracterización de las muestras	119
6.4.1	Espectro UV-Visible	119
6.4.2	Microscopías SEM/TEM	119
6.4.3	Espectroscopia RAMAN	120
7	APÉNDICE	125
7.1	Acrónimos	125
7.2	Índice de figuras	127
7.3	Índice de tablas	130
7.4	Índice de ecuaciones	130
8	BIBLIOGRAFÍA	133

ESQUEMA DE LA TESIS

El presente trabajo consta de 5 capítulos, un pequeño resumen de cada uno de ellos se describe a continuación:

Capítulo 1:

En este primer capítulo, se hace una introducción general al mundo de los biosensores, sus propiedades más características, sus aplicaciones, su clasificación según la composición y los métodos de detección con y sin el uso de marcadores. De forma más específica, para finalizar el capítulo se describen algunos de los biosensores ópticos sin marcaje y su implementación en la tecnología de chips fotónicos nanoestructurados.

Capítulo 2:

En este capítulo, se presentan los principales objetivos de la tesis y su descripción detallada según la estrategia necesaria para alcanzarlos. Se clasifican principalmente en la detección de trombina en sangre y la determinación de alérgenos y patógenos en alimentos.

Capítulo 3:

La parte experimental realizada en este trabajo viene descrita en este capítulo. En primer lugar, se describen las instalaciones utilizadas, los equipos requeridos y los materiales necesarios para el desarrollo de los experimentos elaborados. En segundo lugar, se describe la metodología empleada y cómo se clasifica por fases según la temática desarrollada. Por último, se describe el procedimiento experimental de los ensayos efectuados en el laboratorio.

Capítulo 4:

En este capítulo, la discusión de los resultados se trata de forma razonada, expresando el sentido de los resultados experimentales obtenidos del capítulo anterior.

Capítulo 5:

Las conclusiones alcanzadas durante el trabajo se describen en este capítulo final, donde se exponen de forma detallada la resolución de los resultados alcanzados.

Además de los 5 capítulos descritos previamente, la Tesis presenta un anexo donde se describe el trabajo realizado durante la estancia del doctorado, además de un listado de las abreviaturas empleadas. Por último, al final de la memoria se expone un listado de la bibliografía utilizada.

Capítulo 1: Introducción

1 CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Biosensores

Los métodos de análisis y determinación de muestras han experimentado constantemente cambios importantes a lo largo de su existencia, desde la primera aplicación hasta la producción actual. Estos métodos pueden clasificarse por un lado en las técnicas analíticas tradicionales y por otro, en los sistemas de biosensado.

En el primer caso, las técnicas analíticas que se han utilizado tradicionalmente presentan baja especificidad y valores de sensibilidad limitados para la determinación de trazas. El análisis de muestras mediante métodos convencionales, precisa de un proceso muy laborioso llevado a cabo por personal altamente cualificado, donde se requieren largos tiempos de espera para la obtención de un resultado y por tanto se trata de técnicas de un elevado coste como son la espectrometría de masas, cromatografía y la electroforesis capilar¹.

Sin embargo, en cuanto al segundo caso, los **biosensores** resultan ser una interesante alternativa a las técnicas analíticas convencionales, ya que se obtienen resultados en menor tiempo, son dispositivos pequeños y de menor coste. El gran progreso en los últimos años de la tecnología de dispositivos involucrados en el desarrollo de biosensores, ha dado lugar a numerosas publicaciones científicas en diferentes campos de trabajo, tales como la investigación farmacéutica², la detección de contaminantes³, el diagnóstico de enfermedades⁴ o la guerra bacteriológica⁵, permitiendo la detección y cuantificación de analitos. Gracias al interés por el uso de estas metodologías, se ha producido un considerable incremento de su producción.

1.1.1 Descripción

Los biosensores se definen como dispositivos analíticos de detección que constan de un elemento de reconocimiento biológico o **bioreceptor** (anticuerpo, aptámero, enzima, etc.) encargado de reconocer el analito de interés con el suficiente grado de especificidad en el seno de una muestra. Éste se encuentra unido a un dispositivo **transductor**, el cual es capaz de modificar la respuesta tras producirse la biodetección como resultado de la interacción analito/bioreceptor, en una determinada señal cuantificable por el detector. La interacción específica entre el analito (**diana**) y el bioreceptor (**sonda**) genera una respuesta que puede ser de carácter fisicoquímico como el cambio de pH, transferencia de electrones, o de carácter óptico, como el cambio de índice de refracción. Esta respuesta es recogida por el transductor, convirtiendo la información recibida en una señal cuantificable por el detector y enviada a un procesador⁶ (**Figura 1**).

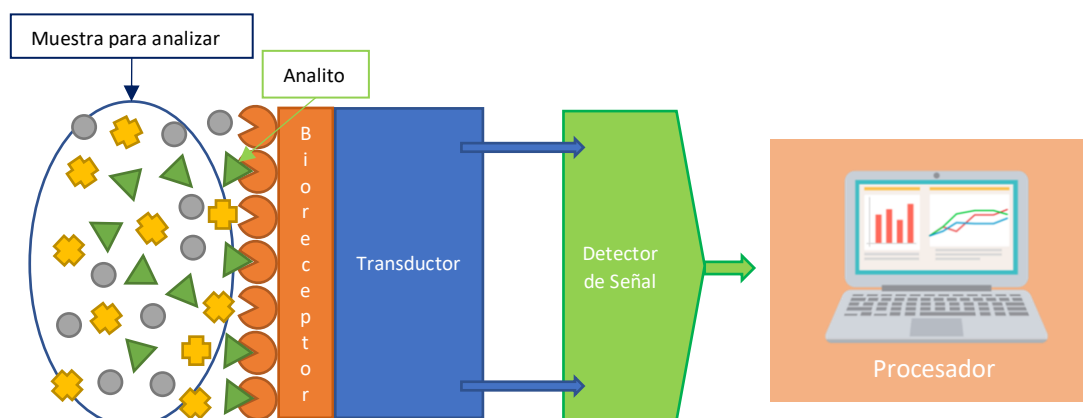


Figura 1. Esquema de funcionamiento y principio en el que se basa un biosensor.

1.1.2 Características

Los biosensores constan de dos partes fundamentales: el bioreceptor y el transductor. Ambas partes pueden estar conectadas entre sí por un enlace covalente o por absorción física, ofreciendo al sistema unas **características excelentes**, en cuanto a **selectividad y sensibilidad**. Además, existen otras características, no menos importantes, que hacen de ellos unos dispositivos únicos y con grandes **ventajas** respecto a otras técnicas analíticas convencionales como la cromatografía. Estas notables características son: un **bajo** límite de detección (**LOD**), tiempo de respuesta **rápido**, **estabilidad** a largo plazo y un amplio **tiempo de vida** media.

El biosensor requiere, por una parte, que los receptores bioquímicos utilizados sean capaces de reconocer específicamente los analitos de interés y, por otra parte, que la unión entre el bioreceptor y el transductor del sistema sea óptima. Por tanto, el bioreceptor es el responsable de la **selectividad y especificidad** del biosensor. Igualmente, los ensayos analíticos que se llevan a cabo con los dispositivos de reconocimiento biológico permiten la detección de analito a concentraciones muy bajas. Podemos hablar de partes por millón (ppm = µg/mL) e incluso en algunos casos partes por billón (ppb = ng/mL), de ahí su baja **sensibilidad** y **LOD**.

El diseño de los sistemas de transducción ofrece un **tiempo de respuesta** inmediato, otorgando un mejor control de la cinética de interacción analito/bioreceptor. Del mismo modo, los biosensores presentan también una gran **estabilidad** del sistema durante su periodo de **vida media** y sin ninguna alteración significativa de las propiedades. Un resumen de estas características se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características de los biosensores vs. técnicas convencionales.

	BIOSENSORES	TÉCNICAS CONVENCIONALES
Selectividad	Alta	Alta
Sensibilidad	Alta	Alta
Tiempo de análisis	A tiempo real (rápido)	Tiempos largos (lento)
Coste del análisis	Bajo	Elevado
Automatización	Si (en algunos casos)	Manuales

Un paso determinante para el correcto funcionamiento del biosensor es la apropiada inmovilización del bioreceptor sobre la superficie de detección del transductor. La estabilidad de algunas de las sondas biológicas empleadas, como los anticuerpos o las enzimas, condicionan bastante la vida media del biosensor. La alternativa a esta desventaja es el uso de aptámeros (fragmentos de ADN de cadena simple o fragmentos de ARN) como bioreceptores en lugar de anticuerpos menos estables para el reconocimiento biomolecular. A continuación, se indican las principales características que definen a cada una de las sondas biológicas expuestas (**Tabla 2**).

Tabla 2. Características de las sondas biológicas.

	ANTICUERPOS	APTÁMEROS	ENZIMAS
Estabilidad	Estables en condiciones fisiológicas, pero pueden desnaturalizarse de forma irreversible en condiciones extremas.	Pueden perder su conformación óptima para el reconocimiento en condiciones extremas. Pero este cambio es reversible.	Estables durante la reacción enzimática. Pero como proteínas, pueden desnaturalizarse en condiciones extremas.
Tiempo de desarrollo	4 Meses a 1 Año	4 Meses a 1 Año.	La mayoría ya están presentes en el organismo. Pero también se pueden producir específicamente.
Modo de producción	Inmunización en seres vivos	Producción inmediata mediante síntesis química, empleando el método SELEX, una vez conocida la secuencia.	Son sintetizadas tanto por seres Autótrofos como Heterótrofos.
Tamaño	Mediano (≈150KDa)	Pequeño (≈30KDa)	Variable (≈100 -40KDa)

1.1.3 Desarrollo

Durante el desarrollo de un biosensor se deben cumplir una serie de requisitos a fin de obtener el mejor resultado posible.

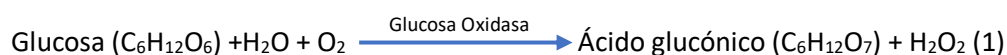
- 1) Correcta identificación del analito (fragmento de proteína, conformación...).
- 2) Elección y desarrollo del bioreceptor.
- 3) Diseño y fabricación del transductor.
- 4) Estrategia de inmovilización del bioreceptor sobre la superficie del transductor.
- 5) Optimización del funcionamiento del biosensor (sensibilidad, selectividad, medida tiempo respuesta, etc.).
- 6) Correcta comunicación del biosensor (interfaz de usuario).

1.1.4 Aplicaciones

El continuo desarrollo de la tecnología y el diseño de los **biosensores** ha permitido su uso en un número elevado de **aplicaciones** de gran interés en los principales sectores del mercado: salud, seguridad alimentaria, medio ambiente y riesgos biológicos.

1.1.4.1 Salud

Los primeros biosensores comenzaron su desarrollo en los años 60⁷, una de las primeras aplicaciones del sector sanitario, fue la determinación de glucosa en sangre que se llevó a cabo inicialmente por Clark y Lyons en 1962⁸ empleando un biosensor enzimático. El dispositivo constaba de una **enzima glucosa oxidasa** (bioreceptor) incorporada a un **electrodo selectivo** (transductor) para oxígeno. Durante el proceso de oxidación de la glucosa, la reacción venía catalizada por la enzima, mientras que la concentración de oxígeno iba disminuyendo con el tiempo. Esta variación de la concentración de O₂ era detectada por el electrodo dando lugar a la siguiente **Ecuación 1**:



Ecuación 1. Oxidación de la glucosa catalizada por la enzima glucosa oxidasa.

Estos dispositivos, estaban enfocados principalmente a la realización de ensayos clínicos, obteniéndose un elevado beneficio en este sector y llegando a comercializarse posteriormente. Desde entonces y hasta la actualidad, la evolución de los biosensores ha permitido que los mismos se hayan transformado en dispositivos versátiles e incluso de uso doméstico como es en el caso del glucómetro, aparato encargado de medir el nivel de azúcar en sangre de nuestro organismo de forma inmediata, utilizado por personas diabéticas⁹.

Otra aplicación más reciente en el sector sanitario consiste en el diagnóstico de enfermedades infecciosas del tracto urinario (**UTI**, por sus siglas en inglés), mediante el uso de un biosensor desarrollado por el grupo de Mach *et al.*¹⁰. Este tipo de infecciones bacterianas es una de las enfermedades nosocomiales de mayor incidencia en hospitales y requiere de una significativa atención clínica para el cuidado del paciente. Previamente al desarrollo de este biosensor, la obtención de resultados correspondientes a las analíticas llevaba unos días y, por tanto, el tratamiento médico consistía en el uso de antibióticos de amplio espectro, aumentando así la resistencia bacteriana.

Por último, el biosensor enzimático térmico de sistemas micro-electromecánicos (MEMS) desarrollado por el grupo de Wang *et al.*¹¹, consta de una termopila que se encarga de convertir la energía térmica en energía eléctrica. La energía térmica es generada por las reacciones enzimáticas que se producen cuando la sonda interacciona con el analito en disolución que se inyecta al sistema. Esto permite controlar de forma precisa e inmediata la composición bioquímica del análisis, como la glucosa y otros metabolitos del paciente *in situ* y determinar su diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

1.1.4.2 Seguridad Alimentaria

La alimentación para los seres humanos es una necesidad fisiológica básica, por eso se precisa de una inspección controlada diariamente en la calidad de los productos alimentarios antes de su distribución en los comercios. Para ello, se emplean técnicas analíticas que permitan certificar todas las normativas vigentes para su correcto cumplimiento¹².

Los biosensores utilizados en este campo tienen diversas aplicaciones. Por ejemplo, una de ellas es la determinación de sustancias xenobióticas, constituidas por agentes externos al organismo y perjudiciales para la salud, que se han originado de forma natural o sintética como son los fertilizantes, plaguicidas, fármacos, aditivos, etc.¹³ Otro de los usos de estos dispositivos es la determinación de alérgenos (huevo, leche, gluten), patógenos (bacterias, virus, etc.) y biotoxinas en alimentos.

En el caso de la detección de alérgenos, el uso de un biosensor basado en la tecnología de resonancia de plasmón superficial localizado (**LSPR**, por sus siglas en inglés), se ha empleado en la industria láctea¹⁴. Este inmunosensor consta de un sustrato de nanopartículas recubiertas de oro para la detección de **caseína**, que es uno de los alérgenos presentes en la leche.

En cuanto a la detección de patógenos, el grupo de Ercole *et al.*¹⁵ propone el uso de un biosensor potenciométrico empleando anticuerpos como bioreceptores capaces de reconocer a la **bacteria** *Escherichia coli* (*E. coli*) en hortalizas. Este microorganismo actúa como agente indicador de contaminación bacteriana en los vegetales. Este sistema se encarga de medir la variación de pH, cuando se genera amoníaco (NH₃) tras la detección de la bacteria por el anticuerpo anti-*E. coli* que está conjugado con la enzima ureasa.

Un ejemplo de identificación de biotoxinas es la detección del ácido domoico (**DA**) o toxina amnésica de mariscos (**ASP**). El DA es una **neurotoxina** producida por las algas, que son ingeridas por los mariscos (moluscos y crustáceos), quedando así contaminados. Continuando con la cadena alimentaria, otros animales marinos cuyo sustento se fundamenta en dichos mariscos intoxicados, quedan a su vez infectados. Por lo que se han producido intoxicaciones en humanos debido a su consumo. El desarrollo de un biosensor electroquímico capaz de detectar el ácido domoico ha sido realizado por Mohd Syaifudin *et al.*¹⁶.

1.1.4.3 Medio ambiente

Una de las principales inquietudes a nivel mundial es el cambio climático y el control de la contaminación del medio ambiente. La mejora en la calidad de vida de los seres vivos se ha vuelto una prioridad de máxima importancia. El uso de biosensores para la monitorización ambiental del aire, agua y tierra desarrollado por el grupo de Justino¹⁷, ha permitido la detección de agentes tóxicos para la salud como son los pesticidas, metales pesados, además del control de calidad de las aguas de consumo humano para determinar la presencia de bacterias.

1.1.4.4 Riesgos biológicos

Los biosensores empleados en aplicaciones militares se utilizan para la Defensa Nuclear, Radiológica, Biológica y Química (abreviado **NRBQ**) en prevención contra ataques biológicos, químicos, etc que requieren de una detección rápida y eficiente. El objetivo vital de estos biosensores es la capacidad de reconocer de forma rápida y selectiva a los agentes de guerra biológica (**BWA**), tales como, toxinas, bacterias y virus¹⁸. Asimismo, el grupo de Yue *et al.*¹⁹ ha descrito un sensor basado en la resonancia de plasmón superficial (SPR) con nanopartículas de oro (AuNP), capaz de detectar agentes de guerra química (**CWA**) tales como agentes nerviosos, pulmonares o sofocantes.

1.2 Clasificación de los biosensores

Los mecanismos básicos para el reconocimiento biológico se pueden clasificar según el tipo de **receptor**: elemento biológico (enzima, anticuerpo...) o compuesto biomimético (aptámero, ácido nucleico ADN o ácido ribonucleico ARN) y del sistema de **transducción** (métodos ópticos,

electroquímicos, térmicos y piezoeléctricos). De igual modo, existe una clasificación según la estrategia de **inmovilización** utilizada (adsorción física, enlace covalente...) y la naturaleza de la interacción bioreceptor/analito como son los procesos de **afinidad** (inmunoensayos) o procesos **catalíticos** (interacción enzima/sustrato). Asimismo, según el modo en que se monitoriza dicha interacción, se pueden clasificar en métodos de detección indirectos (fluorescencia, colorimetría...) o directos (índice de refracción, absorción óptica...).

El número de bioreceptores y sistemas de transducción existentes es considerable, siendo las combinaciones entre ellos muy diversas. La optimización del biosensor depende de los elementos escogidos para su desarrollo, siendo el conjunto del **bioreceptor** y del **transductor** seleccionado el encargado de determinar las características finales del sistema de biosensado.

1.2.1 Bioreceptores

El **bioreceptor** es el encargado de capturar y/o unirse de forma específica al analito durante el proceso de bio-detección. Los ejemplos más conocidos de bioreceptores son las enzimas, los anticuerpos y los aptámeros. A continuación, se describe en detalle el funcionamiento de cada uno de ellos.

1.2.1.1 Enzimas

Las **enzimas**, biomoléculas de naturaleza proteica, son las encargadas de catalizar las reacciones químicas de los seres vivos. Este tipo de proteínas, son funcionales cuando se encuentran en su estado de estructura cuaternaria, la cual alberga un **centro activo** que sirve como sitio de unión específico para un sustrato en particular, dando lugar a un complejo enzima/sustrato. En ese momento, la enzima cambia su conformación para catalizar la reacción, dando lugar a los productos que se desprenden del centro activo (**Figura 2**). Un control apropiado de temperatura y pH del entorno de la proteína permite mantener una elevada actividad enzimática durante el proceso.

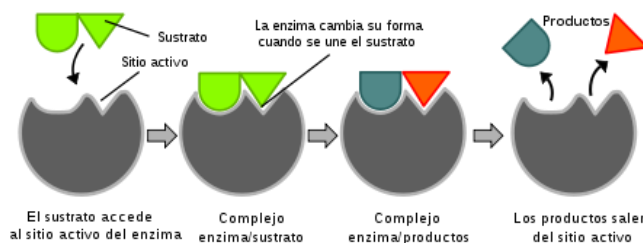


Figura 2. Esquema representativo de un enzima como elemento de reconocimiento.

Fuente (biotecnologiauniversidad.blogspot.com).

Las enzimas son uno de los bioreceptores más recurrentes en el área de los biosensores y pueden ser implementadas sobre cualquier tipo de transductor, ya sea óptico, electroquímico, térmico, etc.

1.2.1.2 Anticuerpos

Los anticuerpos (**Ab**) o inmunoglobulinas (**Ig**), son glucoproteínas que reconocen de manera específica a los antígenos (analitos). La interacción reversible entre ambas moléculas se produce debido al reconocimiento entre el **epítipo** del analito o determinante antigénico y el **parótopo** del anticuerpo. Los anticuerpos pueden clasificarse en diferentes estructuras o isotipos: los monómeros (IgG, IgD y IgE) presentan una unidad estructural con forma de "Y", que está constituida por cuatro cadenas polipeptídicas (dos ligeras y dos pesadas), el dímero IgA y el pentámero IgM. (**Figura 3**).

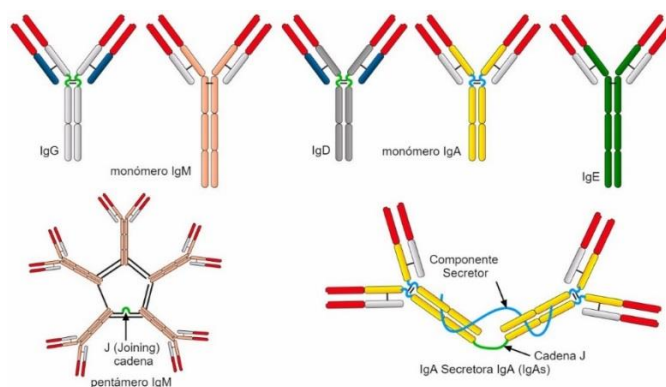


Figura 3. Representación gráfica de la estructura de un anticuerpo y sus isotipos.

Fuente (www.3tres3.com/articulos/inmunidad-humoral-especifica-1-2-ig-tipos-y-estructura).

Existen dos tipos de anticuerpos utilizados en los inmunoensayos: los monoclonales (**mAb**) que reconocen el mismo epítipo del analito y los policlonales (**pAb**), que cada uno reconoce a un epítipo diferente del mismo analito. Por tanto, los mAb son un grupo de moléculas idénticas entre sí que proceden del mismo clon, mientras que los pAb son un conjunto de moléculas producidas a partir de células diferentes. Estas características permiten que los pAb tengan una alta sensibilidad, pero menor especificidad que los mAb, por lo que según el tipo de inmunoensayo que se quiera desarrollar se escogerá un tipo de anticuerpo u otro.

1.2.1.3 Aptámeros

Los **aptámeros** son fragmentos de ácido nucleico (ADN o ARN), que están formados por una secuencia de oligonucleótidos de cadena simple sintetizada mediante el método de Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX)²⁰. Se trata de una técnica de química combinatorial utilizada en biología molecular la cual permite la obtención del aptámero. Éste permite reconocer al analito de interés con una alta especificidad y afinidad. Un ejemplo de ello es el aptámero de la trombina (ApTHR) que adopta una conformación óptima para el reconocimiento específico del analito trombina (THR), formando una estructura tridimensional en forma de silla (**Figura 4**).

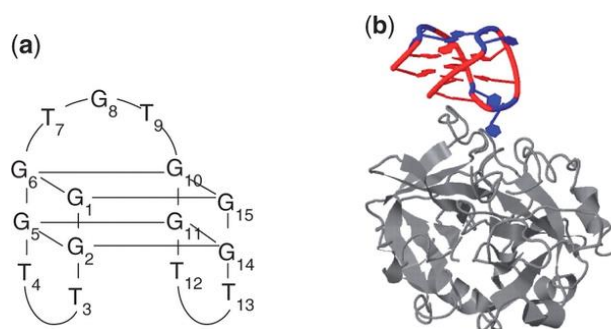


Figura 4. Representación del ApTHR en su forma de silla (a) e interacción entre la THR en gris con el ApTHR en rojo y azul (b). Fuente (www.researchgate.net/figure/Quadruplex-structure).

Estos elementos **biomiméticos** tienen la facilidad de modificar su conformación en el espacio al someterlos a ciclos de calentamiento/enfriamiento o procesos de estructuración. Esta propiedad les ofrece una característica de termoestabilidad, ya que son capaces de recuperar su funcionalidad por completo (proceso reversible)²¹ y una ventaja respecto a otros bioreceptores como los anticuerpos o enzimas, que se desnaturalizan al calentarse (proceso irreversible). Por tanto, la finalidad de estructurar el aptámero es la de alcanzar el nivel de conformación óptimo, para una mayor afinidad por el analito de interés. Sin embargo, un cambio de temperatura no controlado puede hacer que pierdan dicha conformación y por tanto su capacidad para la identificación del analito. De ello depende la estructura que adquiera el aptámero según la temperatura de trabajo aplicada, pH y fuerza iónica.

1.2.2 Sistemas de transducción

Los transductores son los encargados de convertir la respuesta correspondiente a la interacción bioreceptor/analito en una señal cuantificable por el detector. En ocasiones, los sistemas de biodetección requieren el uso de un software especializado para interpretar la señal recibida. Los principales sistemas de transducción se pueden clasificar en métodos ópticos, electroquímicos, térmicos y piezoeléctricos como se muestra en el esquema de la **Figura 5**.

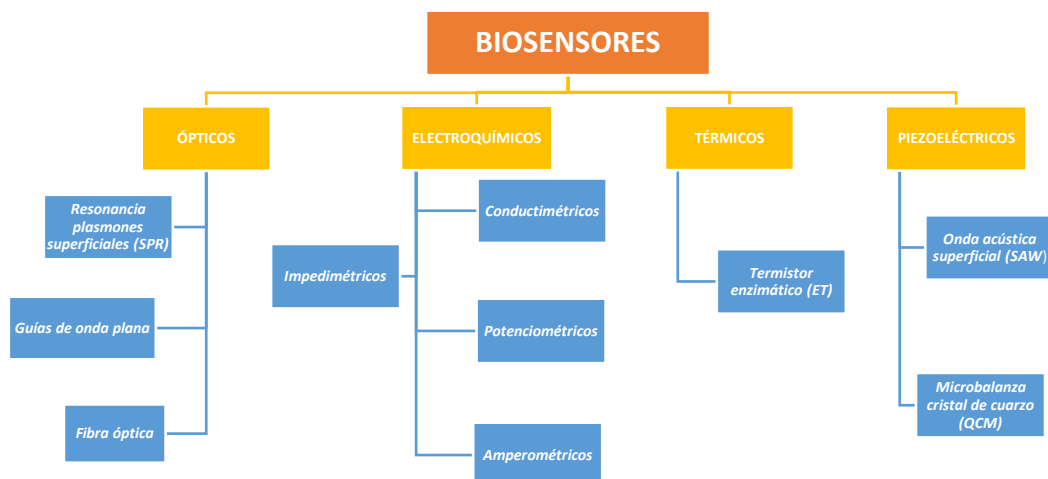


Figura 5. Clasificación de los biosensores según el sistema de transducción.

1.2.2.1 Ópticos

Los sistemas de transducción óptica constan de un elemento de reconocimiento biológico unido a un soporte, una fuente de luz y un detector. Son los responsables de medir los cambios originados en la propagación de la luz debido a la interacción entre el analito y la sonda del biosensor. Algunos ejemplos de transductores ópticos son los sensores de resonancia de plasmones superficiales (**SPR**), guías de onda plana y fibra óptica.

1.2.2.1.1 Resonancia de plasmones superficiales (SPR)

La resonancia de plasmones superficiales (**SPR**) es un fenómeno óptico donde la luz polarizada pasa de un medio de mayor índice de refracción n_1 (prisma) a otro medio de menor índice n_2 (metal), donde los plasmones son oscilaciones conjuntas de los electrones de conducción de un metal. En el caso de un biosensor, la zona metálica se encuentra situada entre el prisma y la muestra (**Figura 6**).

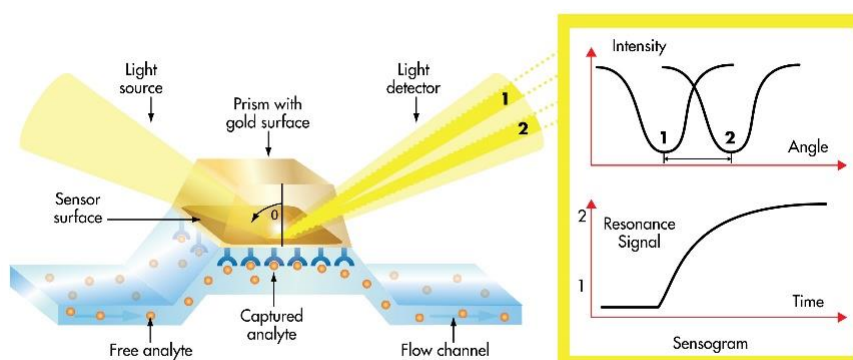


Figura 6. Esquema representativo del funcionamiento de un transductor SPR.

Fuente (www.bruker.com/de/products/surface-plasmon-resonance).

INTRODUCCIÓN

La luz incidente entre el metal y el prisma genera la excitación de un plasmón superficial a un determinado ángulo conocido como el **ángulo de resonancia**. Este ángulo, depende mucho del índice de refracción del medio próximo al metal, ya que las diferencias que se originen en el mismo serán manifestadas como cambios del ángulo de resonancia, el cual es proporcional a la concentración del analito detectado por el bioreceptor inmovilizado. Cuando se da la interacción bioreceptor/analito, se produce un cambio de índice de refracción sobre la superficie del metal y por tanto un desplazamiento del ángulo de resonancia. Este método permite la detección de los analitos de forma directa y sin marcaje en tiempo real.

1.2.2.1.2 Guías de onda plana

En un transductor de guías de onda plana, la luz viaja a través de una guía por reflexión interna total (**TIR**) generando un campo electromagnético denominado onda evanescente. El fenómeno TIR se produce cuando el índice de refracción del medio donde incide la luz (n_2) es menor al del medio en el que se encuentra (n_1), en este caso la luz se refleja de forma que no es capaz de atravesar la superficie entre los dos medios reflejándose totalmente (**Figura 7**).

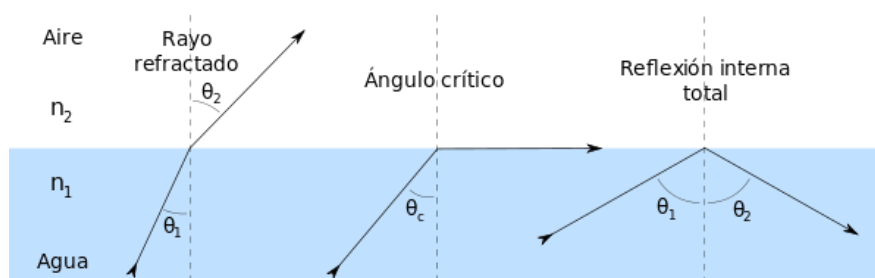


Figura 7. Fenómeno de reflexión interna total. Fuente (wikipedia.org/wiki/TIR).

Un ejemplo de transductor por guía de onda plana son los sensores de anillos resonantes (**RR**), en los que la interacción molecular que se produce entre el bioreceptor inmovilizado sobre la superficie del anillo y el analito, provoca un cambio del índice de refracción de la luz propagada a través de la guía. Este cambio permite relacionar la concentración del analito capturado con la magnitud de la señal, permitiendo una detección directa y libre de marcaje en tiempo real con la selectividad que permite el bioreceptor inmovilizado.

Qavi y Bailey²² describieron la detección multiplexada y la cuantificación sin marcaje de microARN usando matrices de microanillos resonadores fotónicos de silicio. El microARN se trata de cadenas de ARN cortas de 19 a 24 nucleótidos. La resonancia existe también sin necesidad de hibridación, por ejemplo, un anillo acopla luz y resuena. En este caso, lo que sucede es que, al hibridar con una hebra de ARN la frecuencia de la resonancia varía respecto el estado inicial (**Figura 8**).

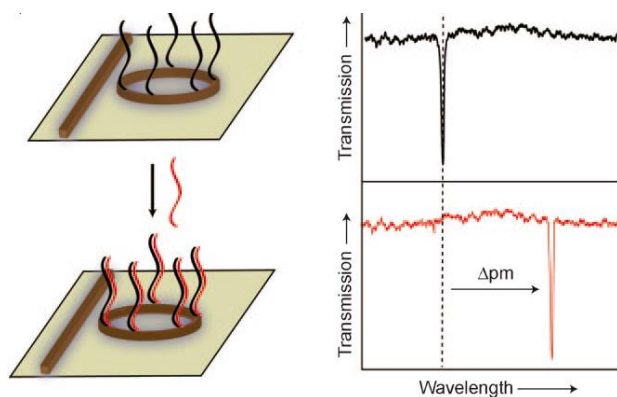


Figura 8. Desplazamiento de la señal al hibridar una secuencia de ARN sobre RR. Fuente (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20491114).

Otro ejemplo de transductor basado en esta tecnología es el caso del interferómetro de Mach-Zehnder (**MZI**). La propagación de la luz en estos sensores se divide en dos brazos, en uno de ellos se encuentra el bioreceptor inmovilizado, mientras que el otro actúa de referencia. Ambos brazos o guías se vuelven a unir tras recorrer un trayecto de algunos milímetros, recombinándose de esta forma la luz a la salida. La interacción entre el bioreceptor y el analito provoca cambios en el campo evanescente, que está relacionado proporcionalmente con la concentración del analito de la muestra (**Figura 9**).

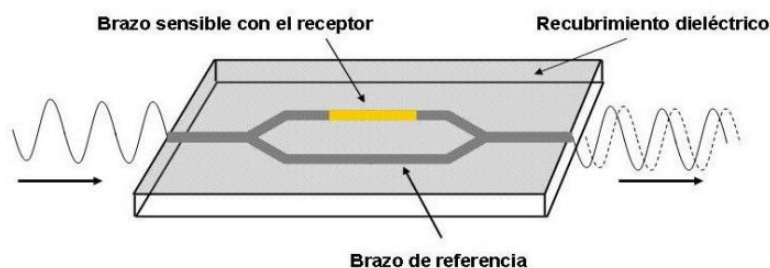


Figura 9. Esquema del sensor del interferómetro Mach-Zehnder.
Fuente (www.uv.es/materomo/resources/g5.pdf).

1.2.2.1.3 Fibra óptica

La fibra óptica es una guía de ondas dieléctrica y se emplea como medio de transmisión en telecomunicaciones. Cada guía o filamento se compone de un núcleo central de vidrio (SiO_2) con un índice de refracción (n_1), que está a su vez rodeado por una capa de revestimiento de un material con un índice de refracción menor (n_2), como en el ejemplo de la **Figura 10**.

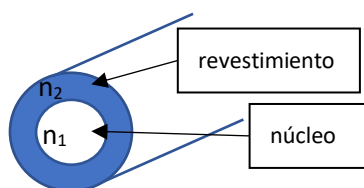


Figura 10. Esquema de la sección de una fibra óptica.

Cuando la luz que viaja en el interior de la guía por el núcleo y llega a la interfaz de la capa de revestimiento, ésta se refleja totalmente ya que $n_1 > n_2$, produciéndose así el fenómeno TIR dentro de la fibra. De esta manera, se puede guiar la luz sin pérdidas a larga distancias y transferir datos a través de la guía desde el láser hasta el detector (**Figura 11**).

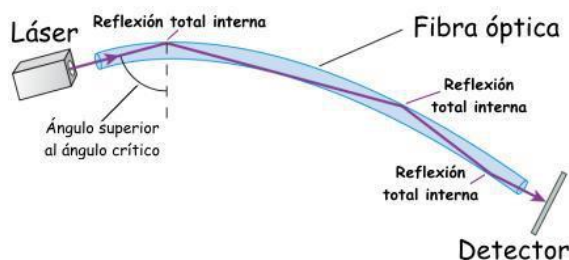


Figura 11. Esquema de un transductor de fibra óptica.
Fuente (demulacion.blogspot.com/2019/05).

Los sistemas de transducción basados en este tipo de tecnología constan de una fibra óptica sobre la cual se inmoviliza un bioreceptor. Cuando este elemento inmovilizado sobre la fibra interacciona con el analito, se produce un cambio del índice de refracción que modula las propiedades ópticas del biosensor (longitud de onda e intensidad), que son recibidas por el detector y que a su vez están relacionadas con la concentración del analito capturado. Un ejemplo de transductor óptico basado en *gratings* de fibra óptica (**OFG**) se propuso por el grupo de Chiavaioli *et al.*²³.

1.2.2.2 Electroquímicos

Los transductores electroquímicos se suelen aplicar a procesos biocatalíticos, donde el transductor se encarga de convertir la señal obtenida de la interacción entre el electrodo y el analito en una señal eléctrica. Estos sistemas de transducción se pueden clasificar en amperométricos (miden la intensidad de corriente resultante de los procesos red-ox al aplicar un potencial), potenciométricos (miden la diferencia de potencial eléctrico debida a una reacción electroquímica entre un electrodo y un electrodo de referencia), impedimétricos (miden el cambio de impedancia eléctrica, debido a la variación de las propiedades resistiva y capacitiva, producida en la superficie del transductor) y conductimétricos (miden la variación de la conductividad).

Un ejemplo de transductor electroquímico es la pila eléctrica descrita en la **Figura 12**. Este dispositivo es capaz de transformar la energía química (reacciones red-ox) en energía eléctrica y está formado por una célula que contiene los siguientes elementos: un recipiente con sulfato de zinc en disolución (izquierda), donde se encuentran disueltos iones zinc (Zn^{2+}) e iones sulfato (SO_4^{2-}) y un recipiente que contiene sulfato de cobre en disolución (derecha), con iones cobre (Cu^{2+}) e iones sulfato (SO_4^{2-}) disueltos. Un electrodo de zinc sumergido en el recipiente de la izquierda y un electrodo de cobre sumergido en el recipiente de la derecha, ambos unidos por un hilo conductor. Finalmente, un puente salino que conecta ambas disoluciones, el cual contiene en este caso cloruro de sodio (iones Na^+ y Cl^-), permitiendo mantener constante el equilibrio de las cargas en disolución.

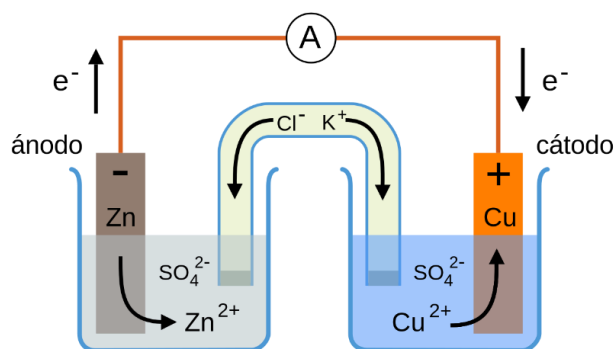


Figura 12. Ejemplo de un transductor electroquímico (pila eléctrica).
Fuente (www.lifeder.com/anodo-y-catodo).

El electrodo que libera electrones (oxidación) se denomina **ánodo** y por tanto el zinc se oxida, mientras que el electrodo que los recibe (reducción), se denomina **cátodo** y el cobre se reduce. Por tanto, cuando el ánodo se conecta al cátodo mediante un amperímetro, los iones de cobre (Cu^{2+}) que se encuentran en disolución reciben los dos electrones del zinc y se incorporan al electrodo en forma de átomos de cobre (Cu^0), por lo que se crea una corriente eléctrica. Las reacciones de los procesos de oxidación/reducción de la pila se describen en la **Figura 13**.

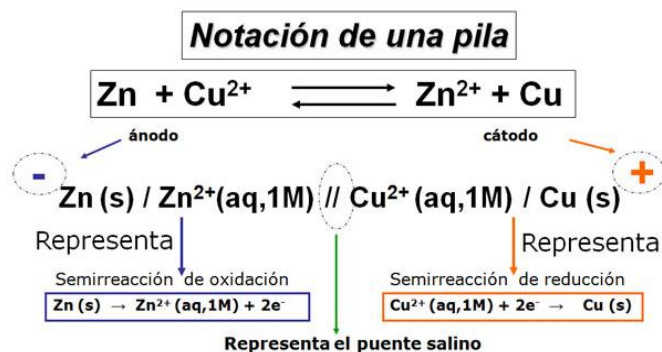
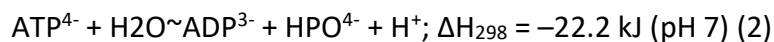


Figura 13. Reacción de oxidación y reducción en una pila electroquímica.
Fuente (fq.iespm.es/documentos/diego_navarrete/2_quimica/8.pdf).

1.2.2.3 Térmicos

Los transductores térmicos o calorimétricos se pueden clasificar en procesos endotérmicos (absorben calor) y exotérmicos (ceden calor), según la reacción química que se produzca. La medida de la entalpía de reacción (ΔH) a diferentes temperaturas permite calcular la entropía (ΔS) y energía libre de Gibbs (ΔG) para una determinada reacción. Un ejemplo de molécula cuya ΔH es de interés en biología, es la del adenosín trifosfato (ATP). Durante su hidrólisis, la reacción es exotérmica ya que el valor de ΔH es negativo y por lo tanto desprenderá calor (**Ecuación 2**).



Ecuación 2. Hidrólisis del ATP: reacción exotérmica

Uno de los ejemplos más conocidos de transductor térmico, es el termistor enzimático. Estos biosensores se basan en el principio termométrico, los cambios de calor producidos durante la reacción enzimática se miden con un calorímetro, donde la variación de temperatura es proporcional a la concentración de sustrato²⁴.

1.2.2.4 Piezoeléctricos

Los transductores piezoeléctricos o sistemas másicos constan de un elemento piezoeléctrico como soporte que genera una señal eléctrica cuando se produce un cambio de masa debido a la acumulación del analito sobre el detector. Algunos de los ejemplos más conocidos son: la onda acústica superficial (**SAW**), que ofrece una superficie sensible a los cambios de masa y la microbalanza de cristal de cuarzo (**QCM**), que se utiliza para medir cambios muy pequeños de masa, del orden de picogramos.

Un ejemplo de QCM, es el desarrollado por el grupo de Ozalp *et al.*²⁵ donde se ha inmovilizado aptámeros sobre la superficie del sensor que son capaces de detectar la presencia de bacterias en alimentos. Esta tecnología presenta una gran sensibilidad para el análisis específico de bacterias a la vez que permite la monitorización en tiempo real.

1.2.3 Estrategias de Inmovilización

Para la elaboración de un biosensor, un requerimiento importante es que la inmovilización del bioreceptor se realice de forma óptima sobre el sistema de transducción. Algunos de los métodos de inmovilización más conocidos son:

1.2.3.1 Adsorción física

La unión del elemento de reconocimiento biológico a la superficie del sensor del transductor se puede producir de forma inespecífica mediante adsorción física, gracias a las fuerzas intermoleculares débiles: Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, electrostáticas e hidrofóbicas entre ambos elementos, siendo este proceso reversible. Este tipo de estrategias son sencillas y de bajo coste. El prolema es que como el bioreceptor no está unido a la superficie del transductor de forma covalente, cuando se pretende romper la interacción analito/bioreceptor se rompe también la interacción transductor/bioreceptor. Para evitar que esto suceda, se puede emplear una alternativa como es la fijación química por unión covalente.

1.2.3.2 Fijación química

La inmovilización por fijación química mediante la formación de enlaces covalentes entre el bioreceptor y la superficie del transductor se puede producir por alguna de las siguientes estrategias, empleando algunos de los siguientes agentes de entrecruzamiento. Por una parte, el uso de la pareja EDC/NHS, que activa al ácido carboxílico de la superficie del transductor, en el caso que éste se haya modificado previamente usando, por ejemplo, el organosilano CTES y que se favorece así la unión con una amina del bioreceptor, dando lugar a un enlace peptídico (unión covalente). Por otra parte, el uso del glutaraldehído, que da lugar a la unión entre dos aminas de forma covalente.

INTRODUCCIÓN

1.2.4 Procesos de reconocimiento

Los procesos de reconocimiento biológico se pueden clasificar en dos grupos según el tipo de mecanismo de interacción entre analito y bioreceptor: procesos de **afinidad** en los que intervienen anticuerpos o aptámeros como bioreceptores y **catalíticos** donde operan enzimas.

1.2.4.1 Reconocimiento por bioafinidad

Los procesos de reconocimiento por bioafinidad (inmunoensayos), se caracterizan por la interacción específica entre el **anticuerpo** (bioreceptor) y el **antígeno** (analito), originando una situación de estabilidad entre ambos, formando un complejo. Sin embargo, también existen otros ejemplos como la interacción entre un elemento de reconocimiento biomimético (**aptámero**) y el analito para el que ha sido desarrollado.

1.2.4.2 Reconocimiento biocatalítico

Los procesos biocatalíticos son los más conocidos y de mayor interés comercial²⁶. Una de las características más destacadas, es la de usar catalizadores como bioreceptores para aumentar la velocidad de la reacción química sin necesidad de ser consumidos en el proceso (**Figura 14**).

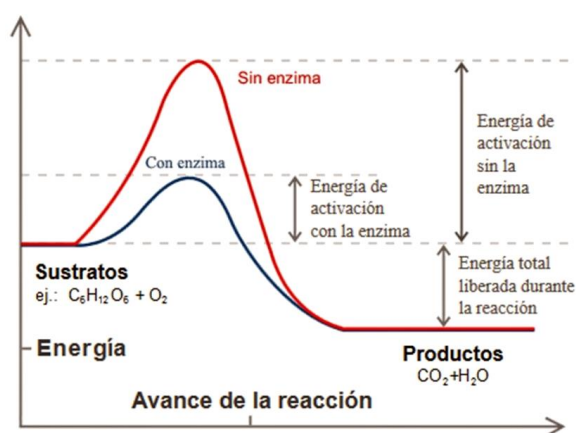


Figura 14. Gráfica representativa de un proceso catalítico.

Fuente (apuntesbioquimicageneral.blogspot.com).

1.3 Métodos de detección

Los métodos de detección encargados de evaluar la interacción analito/bioreceptor se pueden clasificar en procesos **indirectos** (fluorescencia, luminiscencia...) y **directos** (cambio índice de refracción, absorción óptica...). Los métodos indirectos, necesitan la introducción de marcadores y de pasos intermedios durante el ensayo para determinar si hay o no detección. Mientras que los métodos directos son aquellos que permiten detectar al analito sin necesidad de otros medios, como el uso de marcadores.

1.3.1 Detección indirecta (uso de marcadores)

La detección mediante el uso de compuestos marcados es uno de los métodos más utilizados debido a su versatilidad. Por ejemplo, el grupo de Wu *et al.*, ha desarrollado un biosensor basado en aptámeros usando nanopartículas para detectar la presencia de antibióticos.²⁷ Otros ensayos inmunológicos utilizan un sustrato cromogénico como la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (**TMB**) que permite monitorizar la reacción gracias a su combinación con otras proteínas enzimáticas como la peroxidasa de rábano picante (**HRP**),²⁸ y la fosfatasa alcalina (**ALP**)²⁹, las cuáles se encargan de catalizar la reacción colorimétrica o luminiscente.

Hay una variedad de moléculas fluorescentes (fluoróforos) en el mercado que cubren un amplio rango del espectro electromagnético dentro del UV-Visible. Los fluoróforos comerciales se pueden conjugar mediante enlace covalente a cualquier otra molécula que tenga un grupo amino, carboxilo o aldehído, siendo fáciles de conjugar a polímeros biológicos tales como proteínas o ácidos nucleicos³⁰.

1.3.2 Detección directa (libre de marcaje)

Existe una serie de fenómenos físicos utilizados como herramienta de medida para los experimentos de detección libre de marcaje, como son el índice de refracción (**RI**) y la absorción óptica.

1.3.2.1 Índice de refracción (RI)

En los sistemas ópticos de detección, el cambio de índice de refracción (RI) se origina en el área sensible del biosensor, cuando la interacción entre el analito y el bioreceptor tiene lugar. Por ejemplo, el índice de refracción de una disolución que contiene el analito es diferente al de la disolución sin el analito (disolución de proteína RI=1.5 > disolución acuosa tamponada RI=1.33). La **Figura 15** muestra la configuración genérica de un biosensor óptico sin marcaje basado en la detección por cambios en el índice de refracción (RI).

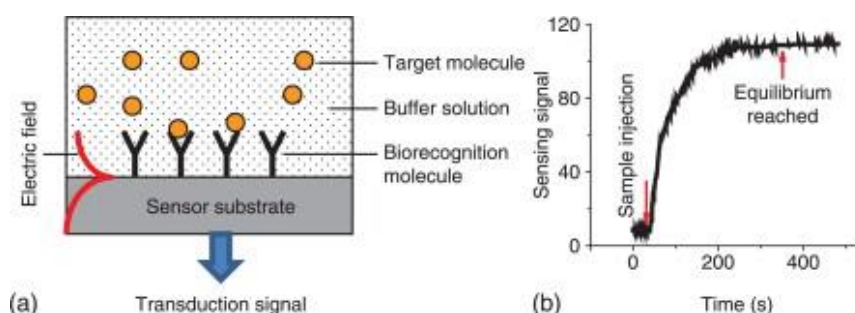


Figura 15. Esquema de un biosensor óptico libre de marcaje, detección cambios de RI.

Fuente (www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/refraction-index).

La detección mediante la variación del índice de refracción es ampliamente utilizada para monitorizar procesos químicos. Su implementación en circuitos fotónicos integrados (**PIC**) ha sido una gran solución para el desarrollo de sensores portables de bajo coste para análisis en tiempo real.

1.3.2.2 Absorción óptica

La absorción de la radiación electromagnética es la manera por la cual la energía de un fotón es absorbida por la materia. Cuando este proceso transcurre dentro del rango de luz visible, recibe el nombre de **absorción óptica**. El uso de un dispositivo óptico acoplado a una sistema fluídico a microescala capaz de medir la absorción óptica en reacciones enzimáticas, se ha llevado a cabo por el grupo de Nitkowski *et al.*³¹ (**Figura 16**).

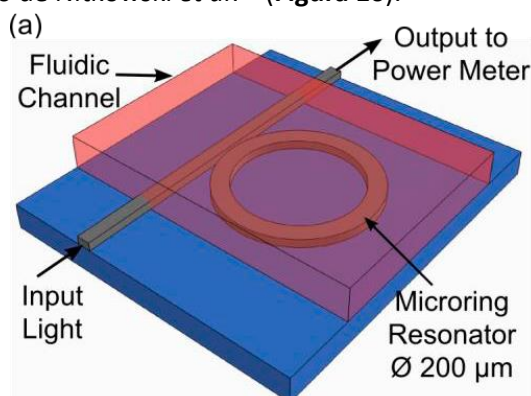


Figura 16. Diseño del dispositivo para un microanillo resonador cubierto por un canal microfluídico.

Fuente (www.osapublishing.org/boe/abstract.cfm?uri=boe-2-2-271).

Este dispositivo es capaz de detectar pequeños cambios de intensidad, los cuáles se producen cuando la enzima HRP convierte las moléculas del sustrato TMB en un producto coloreado. En este caso, la enzima está conjugada al anticuerpo específico del analito que se desea detectar.

1.4 Biosensores ópticos sin marcaje

El biosensor óptico es el producto de la unión de varias disciplinas como la bioquímica, la fotónica, la microfluídica y la electrónica. Una de las ventajas de los biosensores ópticos es la simplificación del proceso, es decir, se reduce el volumen de la muestra, la detección es directa sin necesidad de utilizar marcadores y permite la monitorización de la medida en tiempo real. Además, las nuevas tecnologías de nanofabricación permiten realizar ensayos multi-analito.

1.4.1 Descripción

Los biosensores ópticos están formados por tres bloques esenciales: el transductor óptico, un subsistema microfluídico y el bioreceptor. La muestra en disolución es conducida a través del subsistema microfluídico desde un reservorio inicial hasta la superficie del transductor donde se encuentra inmovilizado el bioreceptor. Cuando tiene lugar la interacción entre bioreceptor y analito, la señal óptica varía permitiendo obtener una señal fácilmente medible.

1.4.2 Parámetros de rendimiento

Los principales parámetros que definen el rendimiento de este tipo de biosensores son:

- **Sensibilidad (S)**: es la magnitud de la señal de transducción del biosensor en respuesta a los cambios en la concentración del analito.
- **Límite de detección (LOD)**: se define como la concentración mínima de analito que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado (**Ecuación 3**):

$$LOD = \frac{\sigma}{S} \quad (3)$$

Ecuación 3. Límite de detección (LOD)

El LOD se proporciona en términos de unidades del índice de refracción (RIU, por sus siglas en inglés). Siendo RIU la unidad estándar para la comparación entre este tipo de biosensores. El uso de estas unidades es difícil de relacionar con la concentración de la muestra, pero dado que cada analito induce un RIU diferente, esta unidad es válida como estándar a la hora de una comparación. En el caso de la biodetección, las unidades del LOD serían de ng/ml o de nM.

- **Rango espectral libre (FSR)**, es el espaciado en frecuencia óptica o longitud de onda entre dos máximos o mínimos sucesivos de intensidad óptica reflejada o transmitida de un interferómetro o anillos resonantes (**Ecuación 4**).

$$FSR = \Delta\lambda = \frac{2\pi}{L} \left(\frac{\partial\beta}{\partial\lambda} \right)^{-1} \approx \frac{\lambda^2}{n_{eff}L'} \quad (4)$$

Ecuación 4. Rango espectral libre (FSR)

Donde

$$\lambda = \frac{2\pi r * n_{eff}}{m} \quad (5)$$

Ecuación 5. Longitud de onda (λ)

- **Relación de extinción (ER)**, es la proporción de dos niveles de potencia óptica (P_0 y P_1) de una señal generada por el sensor. La relación de extinción se puede expresar como una fracción, en dB o como un porcentaje. Puede ser dado por la **Ecuación 6**:

$$ER = \frac{P_1}{P_0} \quad (6)$$

Ecuación 6. Relación de extinción (ER)

- **Ancho de banda (Bandwidth)** para señales analógicas, es la longitud de la extensión de frecuencias en la que se concentra la mayor potencia de la señal.

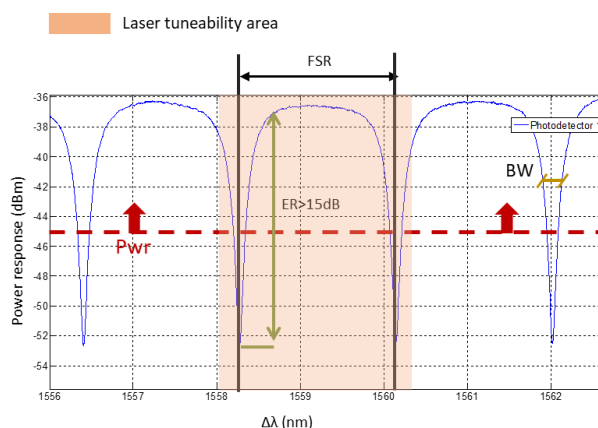


Figura 17. Gráfica del sensograma para la identificación de los parámetros de rendimiento de un RR.

1.4.3 Biosensores ópticos basados en tecnología PIC

Una de las características a destacar de los circuitos integrados fotónicos (PIC), es que no requieren el uso de marcadores fluorescentes para su utilización como biosensores. La tendencia actual en biosensores es la simplificación del proceso de detección y la robustez del sistema. La detección sin marcaje propone mejoras en el protocolo, en la reducción del uso de reactivos (menor volumen y masa requeridos) y también en la complejidad del proceso para su automatización, mejorando así su fiabilidad.

Existen varios diseños y configuraciones descritos en la literatura, como el anillo resonante (RR)³², resonancia de plasmón de superficie (SPR)³³, el interferómetro Mach-Zehnder³⁴, el interferómetro Young³⁵ o los cristales fotónicos³⁶. Sin embargo, el enfoque fotónico empleado en esta Tesis hace referencia al uso de los biosensores basados en la tecnología de anillos resonantes (RR) debido a gran interés en el desarrollo de este trabajo.

1.4.3.1 Biosensores ópticos de anillos resonantes (RR)

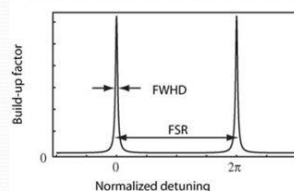
Para el desarrollo de los biosensores ópticos RR, se ha empleado la tecnología compatible mediante el uso de un material semiconductor de óxido de metal complementario (CMOS). La luz que se propaga por los RR, lo hace en forma de onda de galería susurrante (**WGM**)³⁷. Este fenómeno ocurre en superficies cóncavas como las cúpulas de algunas catedrales. Asimismo, la longitud efectiva de la interacción luz/analito de un RR viene determinada por el número de vueltas que da la luz en el anillo. Esto se caracteriza por el factor de calidad (Q -factor) y la longitud efectiva (L_{eff}) que es directamente proporcional al Q -factor (**Figura 18**). Además, diferentes mecanismos con varios anillos resonantes permiten una fuerte mejora de la sensibilidad utilizando, por ejemplo, filtros o efectos de Vernier³⁸.

- **Quality factor:** Sharpness of the resonance. Ratio of the operation wavelength and the resonant line width. Stored energy divided by the power lost per optical cycle. (typically: $10^4 - 10^9$)

$$Q = \frac{\lambda}{2\delta\lambda}$$

- L_{eff} : Effective light-matter interaction length.

$$L_{\text{eff}} = \frac{Q\lambda}{2\pi n}$$



- **Free Spectral Range (FSR):** Distance between resonance peaks.
- **Extinction Ratio (ER):** The ratio of the intensity on resonance to the intensity off resonance.

Figura 18. Esquema RR con los parámetros Q -Factor, L_{eff} , FSR y ER.

Fuente (slideplayer.com/slide/10775470/).

INTRODUCCIÓN

1.4.3.1.1 Propiedades

El estrecho confinamiento de la luz en las estructuras integradas conduce a una mayor interacción luz/materia, permitiendo un aumento considerable de la sensibilidad del biosensor. Los anticuerpos inmovilizados sobre la superficie del PIC como sondas de captura, son capaces de reconocer específicamente moléculas biológicas. Acto seguido, la luz transmitida a través de la guía de onda detecta un cambio de índice de refracción debido a la interacción analito/sonda, cambiando en ese instante las propiedades ópticas del sistema fotónico (**Figura 19**).

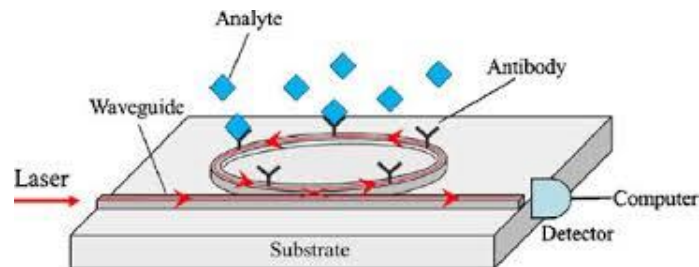


Figura 19. Imagen del RR utilizado en la detección.

Fuente (link.springer.com/article/10.1007/s00216-010-4237-z).

Estas son las aproximaciones tecnológicas más representativas en el campo de los circuitos integrados fotónicos (PIC). En todos los casos, el cambio del índice de refracción se debe a la presencia del analito, aunque debe mencionarse que las sustancias interferentes o las condiciones ambientales también pueden producir un cambio en el índice de refracción. Esto es algo muy común en los sistemas de detección y se pueden encontrar muchas estrategias para minimizar la interferencia. Por un lado, los receptores bioquímicos altamente selectivos reducen considerablemente la interferencia de otras sustancias. Además, se pueden emplear varias estrategias en el diseño para mejorar la señal. El uso de señales de referencia o sistemas de detección en paralelo o en serie³⁹, para deshacerse de los efectos de temperatura o absorción no específica es muy común, especialmente en sistemas donde la integración permite la implementación de múltiples análisis y matrices en un solo chip con un bajo coste.

Capítulo 2: OBJETIVOS

2 CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

Los objetivos principales de esta tesis son la detección del factor de coagulación trombina en muestra real y la detección de alérgenos y patógenos en alimentos. Con la finalidad de alcanzar los objetivos principales propuestos, se han planteado los siguientes subobjetivos específicos de cada uno de los tres bloques generales:

2.1 Detección trombina y control del estado de la coagulación

- Desarrollo y optimización de las estrategias de funcionalización química.
- Detección del analito trombina en el seno de diferentes matrices.
- Control en la activación de la coagulación para muestras de sangre completa.
- Detección de trombina sobre chips fotónicos.

2.2 Detección de alérgenos en alimentos

- Desarrollo y optimización de las estrategias de funcionalización química.
- Detección de los alérgenos Ovomucoide y Gliadina: vía aptámeros.
- Detección de los alérgenos Gliadina y Caseína: vía anticuerpos.
- Detección de alérgenos procedentes del huevo, leche y gluten en alimentos.

2.3 Detección de patógenos en cerdos y alimentos

- Desarrollo y optimización de las estrategias de funcionalización química.
- Detección de la bacteria *Escherichia coli* (E.coli).
- Detección del patógeno Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2).

2.4 Objetivo global

-Desarrollo de un biosensor basado en tecnología fotónica (anillos resonantes) para ser integrado en el conjunto de una plataforma de sensado para la detección de los analitos de trombina, alérgenos y patógenos.

Capítulo 3: EXPERIMENTAL

3 CAPÍTULO 3: EXPERIMENTAL

En este capítulo, se presentan las instalaciones, los equipos requeridos, el software necesario, los materiales utilizados para los ensayos y se describe de forma detallada el procedimiento experimental que se ha seguido durante este trabajo.

3.1 Instalaciones

Sala limpia: instalación donde se fabrican las estructuras fotónicas sobre nitruro de silicio.

Laboratorio preparación de superficies: en este espacio se encuentra la cabina de químicos, donde se lleva a cabo la funcionalización química de las superficies de nitruro de silicio.

Laboratorio de medida fotónica: laboratorio de trabajo donde se encuentra el *set-up* optoelectrónico acoplado a un sistema microfluídico, el cual es utilizado en su conjunto para la caracterización de los experimentos de biosensado. Este dispositivo consta de los siguientes compuestos: láser sintonizable, placa base de control (láser y adquisición de la señal), placa que contiene los fotodetectores y los microposicionadores.

3.2 Equipos y softwares

Los equipos utilizados para la caracterización e impresión de superficies se describen a continuación, junto al software asociado en cada caso.

3.2.1 Escáner de fluorescencia GenePix 4100A Microarray

El escáner de fluorescencia GenePix 4100A Microarray que se muestra en la **Figura 20** tiene dos láseres, uno con una longitud de onda de 635nm y otro a 532nm. Se ha utilizado para escanear superficies de nitruro de silicio plano, sobre las que se ha depositado una matriz de gotas para los ensayos con marcadores fluorescentes. El análisis de las imágenes se realiza con el software asociado al equipo (GenePix® Pro 6.0).



Figura 20. Escáner de fluorescencia GenePix 4100A Microarray.

3.2.2 Equipo de microimpresión MicroGrid II (BioRobotics)

El equipo de microimpresión MicroGrid II (**Figura 21**) se ha empleado para imprimir en las superficies de los chips planos de 1cm x 1cm el aptámero de captura en los ensayos para el reconocimiento de la E.coli.



Figura 21. Equipo de microimpresión MicroGrid II (BioRobotics).

EXPERIMENTAL

3.2.3 Equipo de microimpresión SCIENION

El equipo de microimpresión SCIENION S1 que se muestra en la **Figura 22** se ha utilizado para imprimir sobre la superficie de chips fotónicos el anticuerpo de captura utilizado en los inmunoensayos realizados.

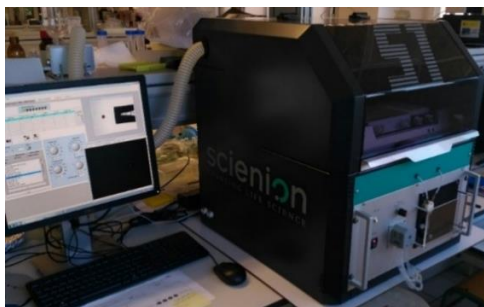


Figura 22. Equipo de microimpresión SCIENION S1.

3.2.4 Espectrofotómetro de microgota NanoDrop

El equipo de NanoDrop es un espectrofotómetro UV-Visible (**Figura 23**), el cual permite en poco tiempo una medición rápida, fiable y reproducible de proteínas en volúmenes del orden de los microlitros, mostrando todo el espectro. En este trabajo, se ha utilizado para medir la concentración de una muestra de GLN disuelta parcialmente en EtOH al 60% empleada en los ensayos para la detección de alérgenos sobre superficies planas de nitruro de silicio.



Figura 23. Espectrofotómetro de microgota Nanodrop.

3.2.5 Softwares adicionales

El software utilizado en este trabajo para el análisis y tratamiento de datos de las medidas fotónicas, ha sido desarrollado íntegramente por LUMENSIA.

3.3 Materiales

Descripción del material utilizado durante el proceso de funcionalización química de las superficies de nitruro de silicio e inmovilización de las sondas biológicas.

3.3.1 Substratos

-Nitruro de Silicio: obleas de nitruro de silicio plano de 6" sobre las que se fabrican las estructuras fotónicas.

3.3.2 Disolventes

- Agua desionizada (DIW).
- Etanol (EtOH).
- Isopropanol (iPrOH).

3.3.3 Reactivos

- Cloruro de calcio (CaCl_2).
- Fragmento de proteína del factor tisular humano (TF).
- Hidróxido de sodio (NaOH).
- Cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN).
- Ácido clorhídrico 37% (HCl).
- Ácido acético glacial (CH_3COOH).
- Peróxido de hidrogeno (H_2O_2), solución 30% (110 vol).

3.3.4 Agentes de bloqueo

- Albúmina de suero bovino (BSA).
- Albúmina de huevo en polvo (OVA).
- Gelatina de piel de pescado de agua fría (GF).
- Etanolamina (MEA).
- Tampón de bloqueo 10x que contiene caseína (BB 10x)

3.3.5 Reactivos conjugados

Los reactivos conjugados son utilizados como reactivo de cierre del inmunoensayo y están marcados con biotina o con un fluoróforo.

- Anticuerpo secundario policlonal contra ratón, desarrollado en cabra y marcado con Alexa Fluor 647 \rightarrow pAb^{2*}-GAM
- Anticuerpo secundario policlonal contra conejo, desarrollado en cabra y marcado con Alexa Fluor 647 \rightarrow pAb^{2*}-GAR
- Aptámero que reconoce E.coli, marcado con Cy5 en el extremo 3' \rightarrow ApE.coli 3-Cy5 (88pb)
- Aptámero que reconoce Ovomucoide, marcado con Cy5 en el extremo 5' \rightarrow ApOVO3.9.B
- Aptámero que reconoce Ovomucoide, marcado con Cy5 en el extremo 5' \rightarrow ApOVO3.11.B
- Aptámero que reconoce Gliadina, marcado con Cy5 en el extremo 5' \rightarrow ApGLN9F-Cy5
- Estreptavidina marcada con Cy5 (ZyMAX™ Grade) \rightarrow Spt-Cy5

3.3.6 Disoluciones tampón

- HEPES \rightarrow Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico.

Este reactivo en disolución forma el equilibrio mostrado en la **Figura 24**.

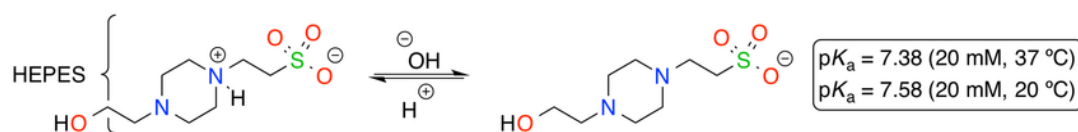


Figura 24. Equilibrio ácido base para una disolución de HEPES.

- MES \rightarrow Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato.

Este reactivo en disolución forma el equilibrio mostrado en la **Figura 25**.

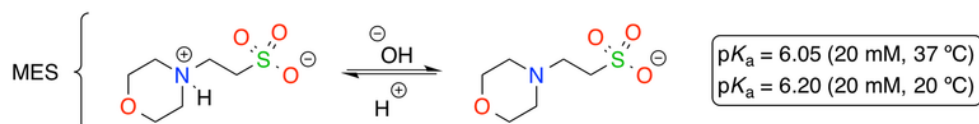


Figura 25. Equilibrio ácido base para una disolución de MES.

- Tampón carbonato/bicarbonato (CB):
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) y bicarbonato de sodio (NaHCO_3).
- Solución salina 10x tamponada con fosfato (PBS 10x).

EXPERIMENTAL

-Solución salina 10x tamponada con tris (TBS 10x).

-Tween 20 → Polisorbato 20 o monolaurato de polioxietilen(20)sorbitano (**Figura 26**).

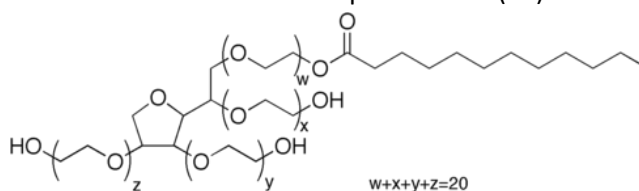


Figura 26. Estructura del polisorbato 20.

-Solución salina 1x tamponada con fosfato al 0.05% v/v de Tween20 (PBST).

3.3.7 Solución Piraña

La disolución piraña es una mezcla en proporción 3:1 de ácido sulfúrico concentrado 16M (H_2SO_4) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30% vol. Las precauciones a tener en cuenta para la preparación de esta solución son: utilizar un recipiente de vidrio de borosilicato Pyrex, evitando el uso de materiales de plástico y añadir el peróxido lentamente sobre el ácido, nunca al revés.

3.3.8 Organosilanos

La utilización de los organosilanos, es una estrategia química muy común para la funcionalización de las superficies de nitruro de silicio, aprovechando la capa de óxido nativo que se forma espontáneamente sobre la superficie. A continuación, se presentan los compuestos utilizados en este trabajo:

-APTES → 3-aminopropiltriethoxisilano

-CTES → Carboxietilsilanotriol, sal disódica, 25% en agua

3.3.9 Agentes de entrecruzamiento

Los agentes reticulantes son utilizados para acoplar de forma covalente dos compuestos entre sí. A continuación, se presentan los reactivos utilizados:

-GLUT → Glutaraldehído ó 1,5-Pentanodial, solución al 25% (**Figura 27**).

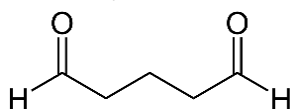


Figura 27. Estructura del glutaraldehído.

-EDC → *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida hidroclicloruro.

-NHS → *N*-Hidroxisuccinimida.

-La pareja EDC/NHS es utilizada para favorecer la formación de enlaces peptídicos, mediante la activación del ácido carboxílico de uno de los compuestos con la EDC, la formación de un buen grupo saliente mediante la interacción con NHS y por último la interacción con los grupos amino del segundo compuesto. Formando una conjugado estable (**Figura 28**).

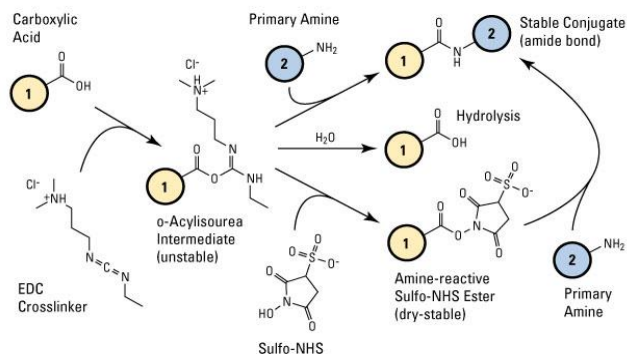


Figura 28. Reacción de formación de enlace covalente mediante la pareja de reticulantes EDC/NHS. Fuente (www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning).

3.3.10 Sondas biológicas

Las sondas o elementos de reconocimiento biológico se inmovilizan sobre la superficie del sustrato y son las encargadas de interactuar o capturar el analito de interés. En este caso se han utilizado anticuerpos y aptámeros, ambos se indican en los siguientes apartados:

3.3.10.1 Anticuerpos

Los anticuerpos empleados en este trabajo se clasifican en monoclonales y policlonales. El conjunto de los cuatro anticuerpos monoclonales (mAb-GLN, mAb-CAS, mAb-OVA y mAb-BLG), son específicos contra los alérgenos de gluten, ovoalbúmina, caseína y β -lactoglobulina respectivamente y han sido cedidos por la empresa INGENASA (ingenasa.eurofins-technologies.com) en una colaboración entre empresas. Asimismo, se encuentra el anticuerpo pAb-PCV2 específico contra el CircoVirus Porcino tipo 2 (PCV2), el cual ha sido proporcionado por el Instituto de Ciencia de los Alimentos perteneciente al Consejo Nacional de Investigación Italiano (CNR) (www.isa.cnr.it; www.cnr.it). Y los anticuerpos de la THR, el mAb-THR y el pAb-THR. Estos anticuerpos se describen a continuación:

•Monoclonales:

- Anticuerpo contra trombina humana desarrollado en ratón → mAb-THR
- Anticuerpo contra gliadina, secalina y hordeína desarrollado en ratón → mAb-GLN
- Anticuerpo contra ovoalbúmina desarrollado en ratón → mAb-OVA
- Anticuerpo contra caseína desarrollado en ratón → mAb-CAS
- Anticuerpo contra β -lactoglobulina desarrollado en ratón → mAb-BLG

•Policlonales:

- Anticuerpo contra la trombina humana y de ratón desarrollado en oveja → pAb-THR
- Anticuerpo contra el Circovirus Porcino tipo 2 desarrollado en conejo → pAb-PCV2

3.3.10.2 Aptámeros

Los aptámeros utilizados en este trabajo son comerciales y se han empleado para la detección de la Trombina (THR), la bacteria *Escherichia coli* (E.coli) y los alérgenos de Ovomucoide y Gliadina. Estos últimos, han sido seleccionados por la compañía Aptus Biotech (aptusbiotech.com) y sintetizados por la empresa IBA lifesciences (www.iba-lifesciences.com):

Aptámero de captura frente Trombina (THR):

El aptámero de captura para la detección de Trombina está descrito en la bibliografía⁴⁰ y ha sido sintetizado por la empresa Merck/Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com). Esta sonda posee en su extremo 5' un grupo amino (NH₂) y un espaciador de veinte timinas (20T).

- Aptámero anti Trombina con 15 pares de base → AptmTHR-NH₂ (15pb)
- Secuencia del aptámero → 5'-NH₂-20T-GGTTGGTGTGGTTGG-3'

Aptámeros de captura frente *Escherichia coli* (E.coli):

Los aptámeros de captura para la detección de E.coli han sido desarrollados por los autores descritos en la bibliografía^{41,42} y sintetizados por la empresa IBA lifesciences. Estas sondas poseen en su extremo 5' un grupo amino (NH₂) y un espaciador de timinas, veinte para el ApE.coli 1 (20T) y doce en el caso del ApE.coli 2 (12T).

- Aptámero anti E.coli 1 con 85 pares de base → ApE.coli 1-NH₂ (85pb)
- Aptámero anti E.coli 2 con 88 pares de base → ApE.coli 2 -NH₂ (88pb)

Aptámeros de captura frente Ovomucoide:

Los aptámeros de captura para la detección de Ovomucoide poseen ambos en su extremo 5' un grupo amino (NH₂) y un espaciador de veinte timinas (20T).

- Aptámero anti Ovomucoide 3.9.A con 76 pares de base → ApOVO3.9.A-NH₂ (76pb)
- Aptámero anti Ovomucoide 3.11.A con 76 pares de base → ApOVO3.11.A-NH₂ (76pb)

Aptámeros de captura frente Gliadina:

Los aptámeros de captura para la detección de Gliadina poseen ambos en su extremo 5' un grupo amino (NH₂) y un espaciador de veinte timinas (20T).

-Aptámero anti Gliadina 1F con 77 pares de base → ApGLN1F-NH₂ (77pb)

-Aptámero anti Gliadina 6F con 76 pares de base → ApGLN6F-NH₂ (76pb)

3.3.11 Analitos

Los analitos de interés empleados en este trabajo son: por una parte, la trombina como factor de coagulación, que se genera durante el proceso de activación de la sangre. Por otra parte, los alérgenos α -caseína, gliadina y ovomucoide y los patógenos E. coli y el Circovirus Porcino tipo 2.

3.3.11.1 Trombina

-La trombina empleada es comercial y ha sido distribuida por ThermoFisher Scientific (www.thermofisher.com). Los dos tipos de analitos en concreto son:

- α -Trombina (humana) (DFP) Proteína nativa.

- α -Trombina (humana) Proteína Nativa conjugada con biotina.

3.3.11.2 Alérgenos

Los alérgenos comerciales utilizados en este trabajo se describen a continuación:

- α -Caseína de leche bovina, Merck/Sigma-Aldrich (C6780-250MG) → CAS

-Gliadina de trigo, Merck/Sigma-Aldrich (G3375) → GLN

-Gliadina como sustancia referencia disuelta en EtOH al 60% y que proviene del *Prolamin Working Group* (PWG) descrito en la bibliografía⁴³. → GLN PWG

-Ovomucoide proteína nativa del pollo, Mybiosource (MBS5303672) → OVO

3.3.11.3 Patógenos

Los patógenos utilizados en este trabajo, están totalmente inactivados. La bacteria E.coli ha sido facilitada por Aptus Biotech, mientras que el virus PCV2 ha sido facilitado por la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de Budapest (www.healthcarestudies.es).

-***Escherichia coli* (E.coli)**: bacteria cuyo carácter patogénico depende de la cepa de origen. En los ensayos realizados con E.coli durante este trabajo, se han utilizado las siguientes cepas:

-E.coli Origami y E.coli XL1-Blue.

-**Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2)**: es una especie de virus del género circovirus cuyo material genético está formado por ADN. El virus perjudica al ganado porcino, provocándole una serie de enfermedades infecciosas, como la neumonía o el complejo respiratorio porcino.

3.4 Metodología

La metodología empleada en este trabajo se clasifica en las siguientes fases:

3.4.1 Fase de diseño y fabricación

Una de las fases más importantes en la metodología de este trabajo, es la del diseño y la fabricación de chips fotónicos, al igual que la del sistema microfluídico.

3.4.1.1 Diseño y fabricación de estructuras fotónicas basadas en la tecnología de silicio.

Por una parte, el **diseño** de los chips fotónicos nanoestructurados se lleva a cabo por el equipo de LUMENSIA Sensors. En este trabajo se han empleado dos diseños diferentes, el V1 de 1cmx1cm y el V2 de 1cmx0.3cm. Ambos tipos de chips como plataforma de sensado, para la detección de los analitos de trombina, alérgenos y patógenos (**Figura 29**).

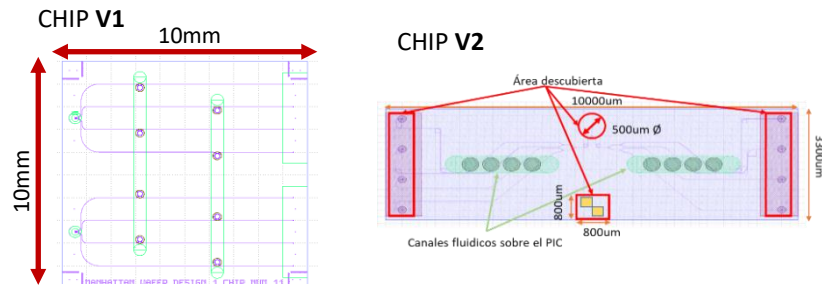


Figura 29. Diseños fotónicos de los chips V1 y V2

Por otra parte, la **fabricación** de los chips fotónicos se realiza en la sala limpia de las instalaciones del Centro de Tecnología Nanofotónica (NTC, www.ntc.upv.es) de la Universitat Politècnica de València (UPV, www.upv.es). El sustrato sobre el que se realizan los procesos de fabricación es una oblea de nitruro de silicio a partir de la cual se obtienen los chips fotónicos (Figura 30).

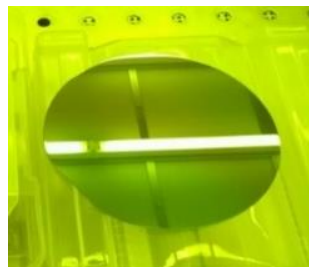
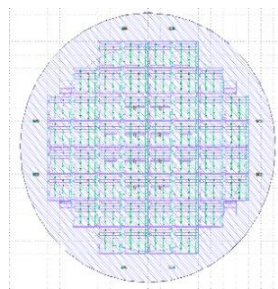


Figura 30. Imagen de una oblea de silicio con una dimensión de 6 pulgadas.

A partir de una única oblea se pueden obtener 52 chips en el caso de una oblea de 4 pulgadas (chips V1) y 498 chips para una oblea de 6 pulgadas (chips V2), como se muestra en la **Figura 31**. Por una parte, las superficies de nitruro de silicio plano se obtienen al cortar la oblea inicial y son los utilizados en el control de inmovilización de sondas biológicas e inmunoensayos con marcadores fluorescentes. Por otra parte, se pueden fabricar chips fotónicos a partir de la oblea inicial, los cuales requieren una serie de técnicas de fabricación como la litografía para aplicar la impresión de las nanoestructuras sobre la superficie de la oblea de nitruro de silicio.

Oblea de Si_3N_4 de 4" (52 chips)



Oblea de Si_3N_4 de 6" (498 chips)

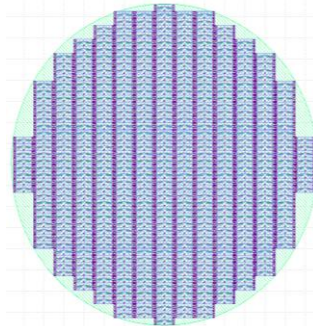


Figura 31. (Izq) Oblea de 4" para chips fotónicos V1. (Dcha) Oblea de 6" para chips fotónicos V2.

La técnica utilizada para la fabricación de chips nanoestructurados es la **fotolitografía**. Esta técnica permite transferir la información de la estructura diseñada sobre la máscara hacia la oblea. El proceso consiste en tres etapas y que se describen a continuación:

- 1.-En primer lugar, se cubre la oblea con una resina, que consiste en un material fotosensible.
- 2.-Después, se coloca la máscara sobre la oblea y se proyecta un haz de luz ultravioleta para endurecer o reblandecer la resina aplicada.

3.-Finalmente, se ataca la superficie con disolventes. Si la resina empleada es positiva, la zona irradiada (naranja) se eliminará con el disolvente. Sin embargo, si la resina es negativa, sucede lo contrario y es la zona no irradiada (azul) la que se elimina con el disolvente (**Figura 32**).

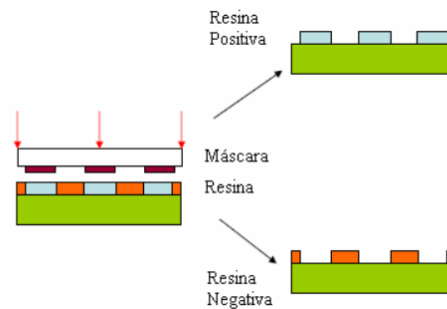


Figura 32. Esquema de los tipos de resina fotosensible durante el proceso de fotolitografía.

Fuente (docplayer.es/76668955).

En cuanto a las **máscaras**, se pueden clasificar en dos tipos según su proyección. Las que no tienen contacto directo con la oblea, pero existe el inconveniente de poseer un elevado coste de fabricación, además de problemas de difracción y las que están en contacto directo sobre el sustrato, donde la máscara se sitúa encima de la oblea. En este caso, se reducen el problema de la difracción y por tanto se consigue una mayor resolución, a cambio de tener una vida media menor.

Algunas de las alternativas para solucionar los problemas derivados de la fotolitografía son: el uso de un haz de luz de mayor frecuencia, como los rayos X ($>30 \times 10^{15}$ Hz) o el empleo de la técnica de **nanolitografía** por haz de electrones (E-beam), donde se consigue una mayor resolución, sin tener que usar máscara, pero a cambio de ser un proceso lento y con un elevado coste.

El proceso de oxidación es una reacción química que ocurre sobre la oblea de nitruro de silicio (Si_3N_4), donde el óxido se puede formar de manera natural (óxido nativo) o también puede ser depositado térmicamente como protección de las estructuras (óxido depositado). En el caso de los chips fotónicos empleados en este trabajo, las guías y anillos son de Si_3N_4 (**Figura 33**).

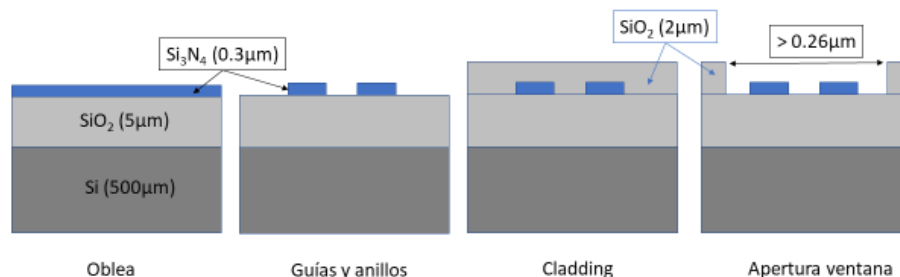


Figura 33. Esquema de las etapas del proceso de fabricación de las capas de un chip fotónico.

3.4.1.2 Diseño y fabricación del sistema microfluidico.

El diseño y fabricación del sistema microfluidico se lleva a cabo por la empresa microLIQUID (www.microliquid.com).

3.4.2 Fase de caracterización

La caracterización de estructuras fotónicas se clasifica de la siguiente forma:

- Caracterización física mediante equipos de SEM y AFM (NTC-UPV).
- Caracterización óptica mediante *set-up* óptico (LUMENSIA).
- Caracterización óptica mediante *set-up* optofluídico de chip biofuncionalizado (LUMENSIA).

3.4.3 Fase de biofuncionalización

La fase de biofuncionalización se lleva a cabo íntegramente por el equipo BIO de la empresa LUMENSIA Sensors. Los dos puntos a destacar en este apartado son:

- Optimización del proceso de biofuncionalización sobre estructura plana de silicio.
- Biofuncionalización de estructuras fotónicas, utilizando la estrategia óptima obtenida a partir de las superficies de nitruro de silicio plano para la activación química e inmovilización de biomoléculas.

3.4.4 Fase de biodetección

La fase de biodetección, se realiza por el grupo BIO al igual que la fase anterior. Las medidas fotónicas se han implementado en un entorno de laboratorio con el *set-up* optoelectrónico, el cual está conectado a un sistema microfluídico (bomba peristáltica, holder con canalizaciones y lámina microfluídica). La microfluídica consiste en una lámina de material polimérico, en cuyo interior existen unos conductos de entrada y otros de salida. Sobre esta pieza se ensambla el chip fotónico, dando lugar al conjunto chip más fluidica el cual se encuentra integrado al sistema de biosensado fotónico por donde se fluye la disolución. El flujo viene controlado por la bomba peristáltica, a una velocidad de $30\mu\text{L}/\text{min}$ (**Figura 34**).

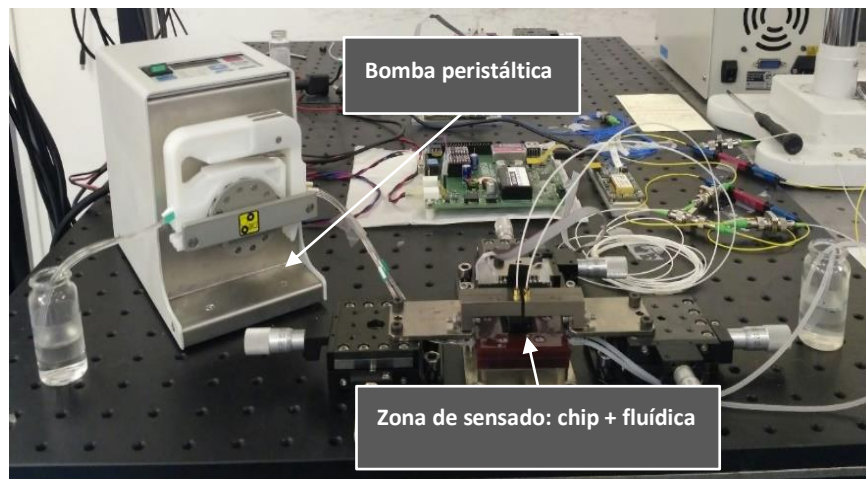


Figura 34. Bomba peristáltica y conjunto chip fotónico/microfluídica del *set-up* de laboratorio.

En una medida fotónica, inicialmente se fluye una disolución tampón a través de los canales microfluídicos del sistema, atravesando la zona de sensado y pasando por encima de los anillos resonantes (RR) del chip fotónico hasta que la respuesta de la resonancia de los RR se estabiliza (línea base). Estos RR se clasifican en dos grupos, el primero de ellos se corresponde a los RR sobre los que se ha inmovilizado la sonda de captura (RRfunc.), mientras que los del otro grupo se dejan de referencia (RRref.). La frecuencia para uno de los RRfunc. frente a su potencia en dB, se muestra en la **Figura 35**.

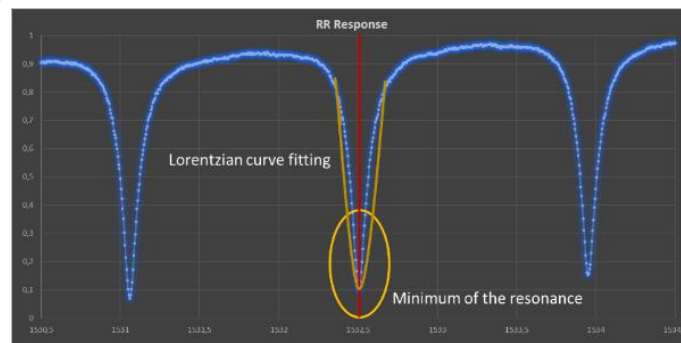


Figura 35. Identificación de la resonancia de la respuesta del RR a la disolución tampón.

EXPERIMENTAL

Después se fluye la muestra disuelta en el tampón, cuando ésta llega a los RR van desplazando poco a poco las moléculas de la disolución tampón por otras del analito a detectar que se encuentra disuelto en la muestra y que está siendo capturado por la sonda inmovilizada de los RRfunc., produciendo a su vez una variación del cambio de índice de refracción (RI). Este cambio es monitorizado a tiempo real, obteniendo una gráfica en la que se representa la frecuencia frente a la potencia en dB (**Figura 36**).



Figura 36. Desplazamiento a tiempo real de la resonancia del RR al producirse el cambio de RI.

Por último, se vuelve a fluir la disolución tampón inicial hasta que la señal se estabiliza. La diferencia obtenida entre la señal final de los RRfunc. (azul) respecto a los RRref. (naranja), nos muestra que la respuesta del sensado correspondiente al desplazamiento de la longitud de onda, medido en picómetros (pm), ha dado un resultado positivo y por tanto nos indica que la sonda ha capturado con éxito al analito de interés, como se representa en la **Figura 37**.

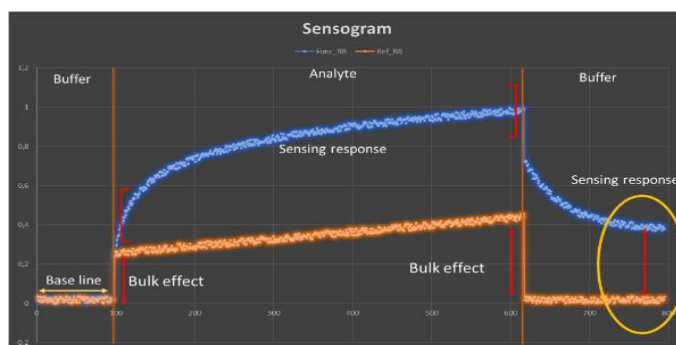


Figura 37. Sensograma a tiempo real frente al desplazamiento de la longitud de onda (pm) de los RR.

El desplazamiento de la señal alcanzado está relacionado directamente con la concentración del analito como se muestra en la **Figura 38**.

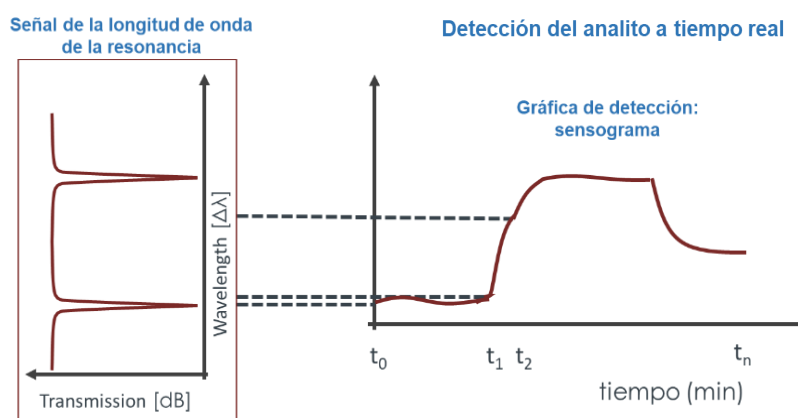


Figura 38. Gráfica de sensado donde se relacionan la resonancia de los anillos junto al sensograma.

3.5 Procedimiento experimental

El procedimiento experimental consta de dos fases. La primera de ellas es la fase de **biofuncionalización**, en esta parte se activan químicamente las superficies de nitruro de silicio, después se inmovilizan las sondas de captura como los aptámeros o anticuerpos y finalmente se cubre la superficie con un agente de bloqueo (BSA, OVA, etc.). La segunda consiste en la fase de **biodetección**, en la cual se origina el reconocimiento entre el analito en disolución y la sonda de captura inmovilizada dando lugar al inmunoensayo. La activación química de la superficie de nitruro de silicio se ha preparado en base al protocolo definido en la bibliografía⁴⁴.

Los diferentes experimentos realizados en esta tesis se pueden clasificar en dos partes. Por un lado, ensayos en la detección de **trombina** y estudios sobre la coagulación de la sangre completa. Por otro lado, ensayos en la determinación de **alérgenos** y **patógenos**. El diseño experimental para la detección de cada uno de los analitos se ha llevado a cabo inicialmente sobre **superficies de nitruro de silicio plano** para la optimización del proceso de activación química e inmovilización de la sonda de captura. Una vez caracterizada la superficie, se transfieren los resultados de plano a **chips fotónicos** basados en la tecnología de anillos resonantes (RR), sobre los que se han realizado las medidas fotónicas mediante la utilización del *set-up* optoelectrónico de laboratorio conectado a un sistema microfluídico.

3.5.1 Ensayos trombina

Los experimentos para la detección de trombina se clasifican en dos grupos. Por una parte, los ensayos realizados sobre superficies de nitruro de silicio (Si_3N_4) plano, donde se lleva a cabo la detección de trombina patrón en disolución tampón, así como en diferentes matrices biológicas provenientes de muestras reales (sangre completa, plasma sanguíneo y suero). Por otra parte, la realización de ensayos de detección de trombina realizados sobre chips fotónicos.

3.5.1.1 Ensayos para la detección de trombina sobre superficies de Si_3N_4 plano

La primera parte de los ensayos para la detección de trombina, se realizan sobre superficies de Si_3N_4 plano. En este apartado se ha logrado la optimización del proceso de activación química de las superficies además de la realización de controles de inmovilización para diferentes sondas como aptámeros y anticuerpos. Asimismo, se han realizado ensayos para la detección de trombina como disolución patrón y en muestras reales.

3.5.1.1.1 Estrategias de funcionalización química: ensayos detección de trombina

Los experimentos para la detección de trombina se han llevado a cabo sobre superficies planas de Si_3N_4 con el fin de optimizar la inmovilización de la sonda de captura y la capacidad de detección en el inmunoensayo. Los protocolos de funcionalización química que se han llevado a cabo se detallan a continuación:

Protocolo químico A

En este protocolo se ha inmovilizado como sonda de captura el aptámero de trombina (ApTHR) para el ensayo tipo 1 y el anticuerpo monoclonal anti-trombina desarrollado en ratón (mAb-THR) para el ensayo tipo 2. Se ha utilizado la trombina biotinilada (THR-biot) como analito y la estreptavidina como proteína marcada con el fluoróforo Cy5 (Spt-Cy5) (**Figura 39**).

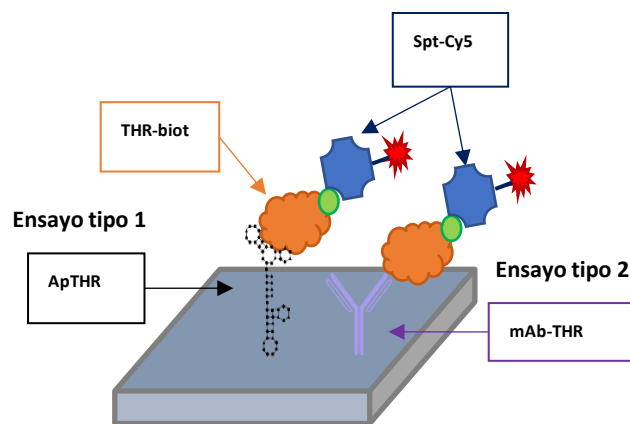


Figura 39. Ensayos tipo 1 y 2 para la detección de trombina sobre superficies de Si_3N_4 plano.

Fase de biofuncionalización:

1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio

-Limpiar y oxidar la superficie de Si_3N_4 con disolución piraña [3:1 (v/v) $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 60 min. a 100°C .

-Lavar las superficies con agua desionizada (DIW) y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

-Silanizar la superficie con el organosilano 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES) al 5% en 2-propanol (iPrOH). Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución de APTES durante 2 horas a temperatura ambiente ($T^\circ\text{amb}$).

-Lavar las superficies con iPrOH y secar con corriente de aire a presión.

-Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Agente de entrecruzamiento glutaraldehído

-Adicionar glutaraldehído (GLUT) al 2.5% en PBS sobre la superficie. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 2 horas a $T^\circ\text{amb}$.

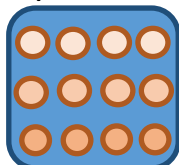
-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie de nitruro de silicio plano

-Inmovilizar el aptámero específico anti-trombina (**ApTHR**) a $10\mu\text{M}$ (F1), el anticuerpo secundario policlonal anti-ratón ($\text{pAb}^{2*}\text{-GAM}$) a 100ppm (F2) y el anticuerpo monoclonal anti-trombina (**mAb-THR**) a 100ppm (F3), disueltos todos en PBS. A estas disoluciones hay que añadir el reductor NaBH_3CN , disuelto en NaOH 1M, a una concentración final de 5mM.

-Realizar una matriz de 3x4 gotas con micropipeta, depositada a mano y con un volumen de $0.2\mu\text{L}$ /gota. Aplicar sobre las cuatro superficies a partir de las disoluciones anteriores, según el esquema que se muestra en la **Figura 40**.

Superficies 1, 2, 3 y 4



→ F1: 4 gotas del ApTHR a $10\mu\text{M}$ en PBS y NaBH_3CN a 5mM (ensayo tipo 1)

→ F2: 4 gotas del $\text{pAb}^{2*}\text{-GAM}$ a 100ppm en PBS y NaBH_3CN a 5mM (control)

→ F3: 4 gotas del mAb-THR a 100ppm en PBS y NaBH_3CN a 5mM (ensayo tipo 2)

Figura 40. Esquema de la matriz depositada sobre Si_3N_4 plano para la inmovilización de las sondas.

-Incubar las superficies durante 2h. a $T^\circ\text{amb}$., en condiciones de humedad controlada.

-Dejar secar las gotas de la matriz durante 2 minutos, tras el periodo de incubación.

1.5. Bloqueo de la superficie

-Bloquear las superficies con $50\mu\text{L}$ de etanolamina (MEA) a 0.1M en tampón carbonato (CB) durante 1h. a $T^\circ\text{amb}$., bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.6. Escaneo de la superficie tras la fase de biofuncionalización: control del Alexa 647

-Escanear las superficies con el equipo de fluorescencia Gene Pix 4100A Microarray.

Este equipo posee dos láseres, uno con emisión a 635nm y otro a 532nm. Como las longitudes de onda de excitación y emisión del fluoróforo Alexa Fluor 647 del pAb^{2*}-GAM son Ex. 650nm y Em. 665nm, se emplea el láser que emite a una $\lambda = 635\text{nm}$. Para el escaneo de las superficies de Si₃N₄ plano, el procedimiento a seguir es el siguiente:

-Depositar las superficies sobre un portaobjetos, insertarlo en el equipo y escanear a 635nm.

-Analizar los resultados obtenidos de la señal de fluorescencia con el software GenePix[®] Pro 6.0 asociado al equipo.

Fase de biodetección:

1.7. Captura del analito: detección de trombina

-Aplicar 50 μL de THR-biot a 10ppm en PBS sobre las superficies 1 y 2.

-Aplicar 50 μL de THR-biot a 10ppm en HEPES 10mM sobre las superficies 3 y 4.

-Incubar las superficies 1 y 3 a 4°C y las superficies 2 y 4 a 23 °C (T^a amb.) durante 1h. bajo condiciones de humedad controlada y protegidas de la luz directa.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.8. Adición del conjugado estreptavidina-Cy5

-Aplicar 50 μL de Spt-Cy5 a 10ppm en PBS sobre las cuatro superficies.

-Incubar las superficies 1 y 3 a 4°C y la 2 y la 4 a 23 °C (T^a amb.) durante 1h. bajo condiciones de humedad controlada y protegidas de la luz directa para evitar el deterioro del Cy5.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.9. Escaneo de las superficies tras la fase de biodetección: control del Cy5

-Escanear las superficies con el equipo de fluorescencia Gene Pix 4100A Microarray.

Este equipo posee dos láseres, uno con emisión a 635nm y otro a 532nm. Como las longitudes de onda de excitación y emisión del fluoróforo Cy5 de la estreptavidina son Ex. 650nm y Em. 670nm, se emplea el láser que emite a una $\lambda = 635\text{nm}$. Para el escaneo de las superficies de Si₃N₄ plano, el procedimiento a seguir es el siguiente:

-Depositar las superficies sobre un portaobjetos, insertarlo en el equipo y escanear a 635nm.

-Analizar los resultados obtenidos de la señal de fluorescencia con el software GenePix[®] Pro 6.0 asociado al equipo.

Protocolo químico B

En este protocolo se ha inmovilizado como sonda de captura el ApTHR para el ensayo tipo 3 y el anticuerpo policlonal anti-trombina desarrollado en oveja (pAb-THR) para el ensayo tipo 4. Se ha utilizado trombina (THR) como analito, el mAb-THR como anticuerpo de detección y el anticuerpo secundario policlonal anti-ratón desarrollado en cabra (pAb^{2*}-GAM) conjugado con el fluoróforo Alexa-647 como cierre del inmunoensayo (**Figura 41**).

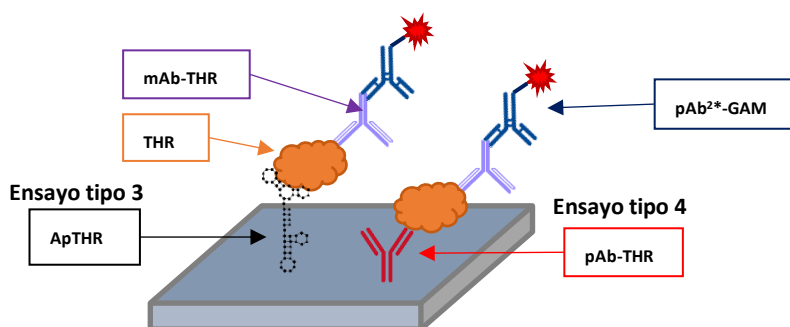


Figura 41. Ensayos tipo 3 y 4 para la detección de trombina sobre superficies de Si₃N₄ plano.

Además, en este protocolo se han realizado controles en la fase de biofuncionalización, que serán descritos a continuación:

Fase de biofuncionalización: controles

1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio

-Limpiar y oxidar la superficie de Si₃N₄ con disolución piraña [3:1 (v/v) H₂SO₄:H₂O₂]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 60 min. a 100°C.

-Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

-Silanizar la superficie con el organosilano APTES: sumergir las superficies 1 y 3 en 2mL de APTES al 5% en iPrOH y las superficies 2 y 4 en 2mL de iPrOH (controles). Sumergir durante 2 horas a T^a amb.

-Lavar las superficies con iPrOH y secar con corriente de aire a presión.

-Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Agente de entrecruzamiento glutaraldehído

-Adicionar glutaraldehído (GLUT) al 2.5% en PBS sobre las superficies 1 y 2, mientras que las superficies 3 y 4 se sumergen en PBS (controles). Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución correspondiente durante 2 horas a T^a amb.

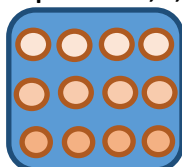
-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie de nitruro de silicio plano

-Inmovilizar el ApTHR a 10µM (F1), el pAb^{2*}-GAM a 100ppm (F2) y el pAb-THR a 100ppm (F3), disueltos todos en PBS. A estas disoluciones hay que añadir el reductor NaBH₃CN, disuelto en NaOH 1M, a una concentración final de 5mM.

-Realizar una matriz de 3x4 gotas con micropipeta, depositada a mano y con un volumen de 0.2µL/gota. Aplicar sobre las cuatro superficies a partir de las disoluciones anteriores, según el esquema que se muestra en la **Figura 42**.

Superficies 1, 2, 3 y 4.



→ F1: 4 gotas del ApTHR a 10µM en PBS y NaBH₃CN a 5mM (ensayo tipo 3)

→ F2: 4 gotas del pAb^{2*}-GAM a 100ppm en PBS y NaBH₃CN a 5mM (control)

→ F3: 4 gotas del pAb-THR a 100ppm en PBS y NaBH₃CN a 5mM (ensayo tipo 4)

Figura 42. Esquema de la matriz depositada sobre Si₃N₄ plano para la inmovilización de las sondas.

-Incubar las superficies durante 2h. a T^a amb., en condiciones de humedad controlada.

-Dejar secar las gotas de la matriz durante 2 minutos, tras el periodo de incubación.

1.5. Bloqueo de la superficie

-Bloquear las superficies con 50µL de MEA a 0.1M en CB durante 1h a T^a amb., bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

Fase de biodetección:

1.6. Etapa de captura: detección de trombina

-Aplicar 50µL de THR a 10ppm en PBS sobre la superficie de los cuatro chips.

-Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.7. Adición del anticuerpo monoclonal anti-trombina

-Aplicar 50µL de mAb-THR a 10ppm en PBS sobre las cuatro superficies.

-Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.8. Adición del anticuerpo secundario policlonal anti-ratón conjugado con Alexa-647

-Aplicar 50µL de pAb^{2*}-GAM a 10ppm en PBS sobre las cuatro superficies.

-Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada y protegidas de la luz directa para evitar el deterioro del Alexa 647.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.9. Escaneo de la superficie tras la fase de biofuncionalización: control del Alexa 647

-Escanear las superficies con el equipo de fluorescencia Gene Pix 4100A Microarray.

-Depositar las superficies sobre un portaobjetos, insertarlo en el equipo y escanear a 635nm.

-Analizar los resultados obtenidos de la señal de fluorescencia con el software GenePix[®] Pro 6.0 asociado al equipo.

Protocolo químico C

En este protocolo se ha inmovilizado como sonda de captura el ApTHR para el ensayo tipo 3 optimizado. Se ha utilizado THR como analito, el mAb-THR como anticuerpo de detección y el pAb^{2*}-GAM como anticuerpo de cierre del inmunoensayo (Figura 43).

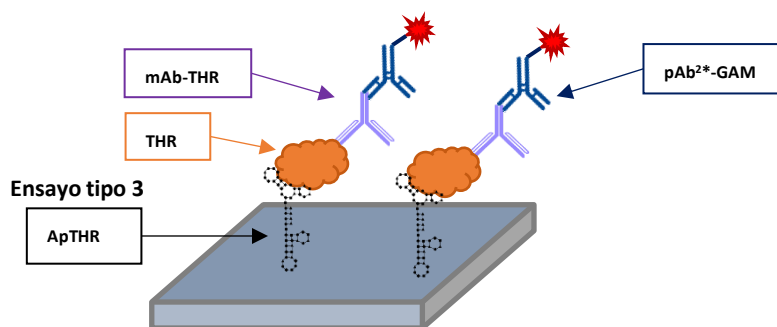


Figura 43. Esquema del protocolo C para la detección de trombina sobre superficies de Si₃N₄ plano.

En este protocolo se ha optimizado el ensayo tipo 3 del protocolo B, además de los controles realizados en la fase de biodetección que se describen a continuación:

Fase de biofuncionalización:

1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio

-Limpiar y oxidar la superficie de Si₃N₄ con disolución piraña [3:1 (v/v) H₂SO₄:H₂O₂]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 60 min. a 100°C.

-Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

-Silanizar la superficie con el organosilano APTES al 1% en Etanol 95% [95:5 (v/v) EtOH:DIW]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución de APTES durante 2horas a T^a amb.

-Lavar las superficies con la mezcla EtOH:DIW al 95% y secar con corriente de aire a presión.

-Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Agente de entrecruzamiento glutaraldehído

-Adicionar glutaraldehído (GLUT) al 2.5% en PBS sobre la superficie. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 2 horas a T^a amb.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie de nitruro de silicio plano

-Inmovilizar el ApTHR a 10µM en PBS y NaBH₃CN en NaOH 1M a una concentración de 5mM.

-Realizar una matriz de 4x4 gotas con micropipeta, depositada a mano y con un volumen de 0.2µL/gota. Aplicar sobre las cuatro superficies para inmovilizar el ApTHR de la disolución con reductor, según el esquema que se muestra en la **Figura 44**.

Superficies 1, 2, 3 y 4

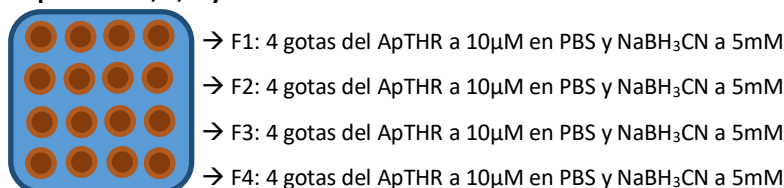


Figura 44. Esquema de la matriz depositada sobre Si₃N₄ plano para la inmovilización del ApTHR.

-Incubar las superficies durante 2h. a T^a amb., en condiciones de humedad controlada.
 -Dejar secar las gotas de la matriz durante 2 minutos, tras el periodo de incubación.

1.5. Bloqueo de la superficie

-Bloquear las superficies con 50µL de BSA 1% en PBS durante 1h a T^a amb., bajo condiciones de humedad controlada.
 -Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

Fase de biodetección: controles

1.6. Etapa de captura: detección de trombina

-Aplicar 50µL de THR a 10ppm en PBS sobre las superficies 1 y 3.
 -Aplicar 50µL de PBS sobre las superficies 2 y 4 (controles).
 -Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada.
 -Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.7. Adición del anticuerpo monoclonal anti-trombina

-Aplicar 50µL de mAb-THR a 10ppm en PBS sobre las superficies 1 y 2.
 -Aplicar 50µL de PBS sobre las superficies 3 y 4 (controles).
 -Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada.
 -Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.8. Adición del anticuerpo secundario policlonal anti-ratón conjugado con Alexa-647

-Aplicar 50µL de pAb^{2*}-GAM a 10ppm en PBS sobre las cuatro superficies.
 -Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada y protegidas de la luz directa para evitar el deterioro del Alexa 647.
 -Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.9. Escaneo de la superficie tras la fase de biofuncionalización: control del Alexa 647

-Escanear las superficies con el equipo de fluorescencia Gene Pix 4100A Microarray.
 -Depositar las superficies sobre un portaobjetos, insertarlo en el equipo y escanear a 635nm.
 -Analizar los resultados obtenidos de la señal de fluorescencia con el software GenePix[®] Pro 6.0 asociado al equipo.

3.5.1.1.2 Optimización del protocolo C: variación sobre la concentración de la sonda de captura

De los tres protocolos presentados en el apartado anterior, se ha tomado el protocolo C como el más adecuado para realizar la detección de trombina. En este apartado, se ha realizado la optimización de la concentración de la sonda de captura ApTHR.

Protocolo químico C: variación de la concentración de la sonda de captura

Fase de biofuncionalización:

1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio

-Limpiar y oxidar la superficie de Si₃N₄ con disolución piraña [3:1 (v/v) H₂SO₄:H₂O₂]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 60 min. a 100°C.

-Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

-Silanizar la superficie con el organosilano APTES al 1% en Etanol 95% [95:5 (v/v) EtOH:DIW]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución de APTES durante 2horas a T^a amb.

-Lavar las superficies con la mezcla EtOH:DIW al 95% y secar con corriente de aire a presión.

-Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Agente de entrecruzamiento glutaraldehído

-Adicionar glutaraldehído (GLUT) al 2.5% en PBS sobre la superficie. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 2 horas a T^a amb.

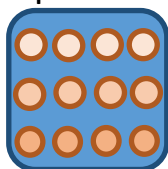
-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie de nitruro de silicio plano

-Inmovilizar el ApTHR a diferentes concentraciones: 1, 2, 4, 5, 8 y 10μM en PBS y NaBH₃CN en NaOH 1M a una concentración de 5mM.

-Realizar una matriz de 3x4 gotas con micropipeta, depositada a mano y con un volumen de 0.2μL/gota. Aplicar sobre las dos superficies para inmovilizar el ApTHR correspondiente de las disoluciones anteriores, según el esquema mostrado en la **Figura 45**.

Superficie 1

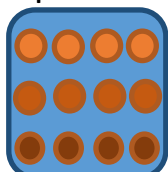


→ F1: 4 gotas del ApTHR a 1μM en PBS y NaBH₃CN a 5mM

→ F2: 4 gotas del ApTHR a 2μM en PBS y NaBH₃CN a 5mM

→ F3: 4 gotas del ApTHR a 4μM en PBS y NaBH₃CN a 5mM

Superficie 2



→ F4: 4 gotas del ApTHR a 5μM en PBS y NaBH₃CN a 5mM

→ F5: 4 gotas del ApTHR a 8μM en PBS y NaBH₃CN a 5mM

→ F6: 4 gotas del ApTHR a 10μM en PBS y NaBH₃CN a 5mM

Figura 45. Esquema de la matriz depositada sobre Si₃N₄ plano para la inmovilización del ApTHR a diferentes concentraciones.

-Incubar las superficies durante 2h. a T^a amb., en condiciones de humedad controlada.

-Dejar secar las gotas de la matriz durante 2 minutos, tras el periodo de incubación.

1.5. Bloqueo de la superficie

-Bloquear las superficies con 50μL de BSA 1% en PBS durante 1h a T^aamb., bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

Fase de biodetección:

1.6. Etapa de captura: detección de trombina

-Aplicar 50μL de THR a 10ppm en PBS sobre las superficies 1 y 2.

-Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.7. Adición del anticuerpo monoclonal anti-trombina

-Aplicar 50μL de mAb-THR a 10ppm en PBS sobre las superficies 1 y 2.

-Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.8. Adición del anticuerpo secundario policlonal anti-ratón conjugado con Alexa-647

-Aplicar 50μL de pAb^{2*}-GAM a 10ppm en PBS sobre las superficies 1 y 2.

--Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada y protegidas de la luz directa para evitar el deterioro del Alexa 647.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.9. Escaneo de la superficie de los chips con el GenePix

-Escanear las superficies con el equipo de fluorescencia Gene Pix 4100A Microarray.

-Depositar las superficies sobre un portaobjetos, insertarlo en el equipo y escanear a 635nm.

-Analizar los resultados obtenidos de la señal de fluorescencia con el software GenePix[®] Pro 6.0 asociado al equipo.

3.5.1.1.3 Detección de trombina en el seno de muestras clínicas

Los ensayos para detección de trombina en el seno de diferentes matrices biológicas (sangre completa, plasma sanguíneo y suero), se ha llevado a cabo siguiendo los pasos del protocolo químico C con la finalidad de evaluar el efecto que tiene la matriz sobre la detección del analito.

Protocolo químico C: detección de trombina en el seno de muestras reales

Fase de biofuncionalización:

La fase de biofuncionalización es común para las tres matrices utilizadas en el ensayo.

1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio

-Limpiar y oxidar la superficie de Si₃N₄ con disolución piraña [3:1 (v/v) H₂SO₄:H₂O₂]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 60 min. a 100°C.

-Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

-Silanizar la superficie con el organosilano APTES al 1% en Etanol 95% [95:5 (v/v) EtOH:DIW]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución de APTES durante 2horas a T^a amb.

-Lavar las superficies con la mezcla EtOH:DIW al 95% y secar con corriente de aire a presión.

-Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Agente de entrecruzamiento glutaraldehído

-Adicionar glutaraldehído (GLUT) al 2.5% en PBS sobre la superficie. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 2 horas a T^a amb.

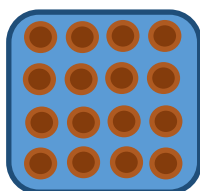
-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie de nitruro de silicio plano

-Inmovilizar el ApTHR a 10μM en PBS y NaBH₃CN en NaOH 1M a una concentración de 5mM.

-Realizar una matriz de 4x4 gotas con micropipeta, depositada a mano y con un volumen de 0.2μL/gota. Aplicar sobre las veintisiete superficies para inmovilizar el ApTHR de la disolución con reductor, según el esquema que se muestra en la **Figura 46**.

Superficies de la 1 a la 27



→ F1: 4 gotas del ApTHR a 10μM en PBS y NaBH₃CN a 5mM

→ F2: 4 gotas del ApTHR a 10μM en PBS y NaBH₃CN a 5mM

→ F3: 4 gotas del ApTHR a 10μM en PBS y NaBH₃CN a 5mM

→ F4: 4 gotas del ApTHR a 10μM en PBS y NaBH₃CN a 5mM

Figura 46. Esquema de la matriz depositada sobre Si₃N₄ plano para la inmovilización del ApTHR.

-Incubar las superficies durante 2h. a T^a amb., en condiciones de humedad controlada.

-Dejar secar las gotas de la matriz durante 2 minutos, tras el periodo de incubación.

1.5. Bloqueo de la superficie

-Bloquear las superficies con 50μL de BSA al 1% en PBS durante 1h a T^a amb., bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

Fase de biodetección:**1.6. Etapa de captura: detección del analito trombina en el seno de diferentes matrices**

La etapa de captura del analito trombina (THR) a distintas concentraciones (0, 5.5 y 11ppm), se lleva a cabo en el seno de diferentes matrices biológicas: sangre completa (WB), plasma sanguíneo (BP) y suero sanguíneo (BS) a tres porcentajes de matriz en PBS (0, 50 y 100%).

Las superficies preparadas para el experimento se clasifican según el esquema de la **Tabla 3**.

Tabla 3. Esquema de las superficies empleadas en los experimentos de muestras reales biológicas.

	Matriz Sangre completa			Matriz Plasma sanguíneo			Matriz Suero sanguíneo		
	0%	50%	100%	0%	50%	100%	0%	50%	100%
[THR] = 0ppm	Sup. 1	Sup.4	Sup.7	Sup.10	Sup.13	Sup.16	Sup.19	Sup.22	Sup.25
[THR] = 5,5ppm	Sup.2	Sup.5	Sup.8	Sup.11	Sup.14	Sup.17	Sup.20	Sup.23	Sup.26
[THR] = 11ppm	Sup.3	Sup.6	Sup.9	Sup.12	Sup.15	Sup.18	Sup.21	Sup.24	Sup.27

- Aplicar 50µL de cada una de las 27 disoluciones sobre la superficie correspondiente.
- Incubar las superficies durante 90 seg. a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada.
- Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.7. Adición del anticuerpo monoclonal anti-trombina

- Aplicar 50µL de mAb-THR a 10ppm en PBS sobre todas las superficies.
- Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada.
- Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.8. Adición del anticuerpo secundario policlonal anti-ratón conjugado con Alexa-647

- Aplicar 50µL de pAb^{2*}-GAM a 10ppm en PBS sobre todas las superficies.
- Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada y protegidas de la luz directa para evitar el deterioro del Alexa 647.
- Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.9. Escaneo de la superficie tras la fase de biofuncionalización: control del Alexa 647

- Escanear las superficies con el equipo de fluorescencia Gene Pix 4100A Microarray.
- Depositar las superficies sobre un portaobjetos, insertarlo en el equipo y escanear a 635nm.
- Analizar los resultados obtenidos de la señal de fluorescencia con el software GenePix[®] Pro 6.0 asociado al equipo.

3.5.1.2 Ensayo para la detección de trombina sobre chip fotónico

La segunda parte de los experimentos empleados para la detección de trombina, se han realizado sobre chips fotónicos basados en la tecnología de anillos resonantes (RR). Este ensayo, ha servido para validar los protocolos de activación química utilizados sobre superficies planas de Si₃N₄, además de las medidas fotónicas realizadas con el *set-up* optoelectrónico de laboratorio conectado a un sistema microfluídico. La activación de la superficie de Si₃N₄ de los chips fotónicos, se ha realizado siguiendo la fase de biofuncionalización del protocolo C aplicado en superficies planas. En este caso, sobre los RR de la superficie del chip fotónico se inmoviliza la sonda de captura en los RRfunc. mientras que en los demás RR que no han sido funcionalizados, se toman como referencia RRref. La detección de trombina se ha llevado a cabo bajo el siguiente protocolo:

Protocolo C: detección de trombina sobre chip fotónico**Fase de biofuncionalización:****1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio del chip fotónico**

EXPERIMENTAL

-Limpiar y oxidar la superficie de Si_3N_4 con disolución piraña [3:1 (v/v) $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 60 min. a 100°C .

-Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada del chip fotónico

-Silanizar la superficie con el organosilano APTES al 1% en Etanol 95% [95:5 (v/v) EtOH:DIW]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución de APTES durante 2 horas a $T^\circ\text{amb}$.

-Lavar las superficies con la mezcla EtOH:DIW al 95% y secar con corriente de aire a presión.

-Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Agente de entrecruzamiento glutaraldehído

-Adicionar glutaraldehído (GLUT) al 2.5% en PBS sobre la superficie. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 2 horas a $T^\circ\text{amb}$.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie de Si_3N_4 del chip fotónico

-Inmovilizar el ApTHR a $10\mu\text{M}$ en PBS y NaBH_3CN en NaOH 1M a una concentración final de 5mM sobre los RRfunc. 1, 2, 5 y 8.

-Aplicar $50\mu\text{L}$ de PBS sobre los RRref. 3, 4, 6 y 7.

-Depositar una gota de $0.2\mu\text{L}$ a mano con la micropipeta, de las disoluciones anteriores del ApTHR y el PBS sobre los RR de la superficie del chip fotónico, según el esquema mostrado en la **Figura 47**.

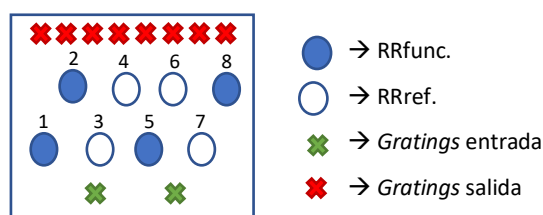


Figura 47. Esquema del chip fotónico V1 con la distribución de los RR sobre la superficie.

-Incubar las superficies durante 2h. a $T^\circ\text{amb}$., en condiciones de humedad controlada.

-Dejar secar las gotas de la matriz durante 2 minutos, tras el periodo de incubación.

1.5. Bloqueo de la superficie

-Bloquear las superficies con $50\mu\text{L}$ de BSA al 1% en PBS durante 1h a $T^\circ\text{amb}$., bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

Fase de biodetección: medida fotónica

-Fluir durante 10 minutos a una velocidad constante de $30\mu\text{L}/\text{min}$ la disolución tampón PBS por el canal microfluídico hasta que la señal de la medida se estabiliza (línea base).

El flujo se mantiene constante durante todo el experimento a $30\mu\text{L}/\text{min}$.

1.6. Etapa de captura: detección de trombina

-Fluir la disolución de THR a 1ppm en PBS durante 10min.

1.7. Etapa de lavado: sensado

-Fluir de nuevo PBS 10min. a $30\mu\text{L}/\text{min}$.

1.8. Etapa de análisis: tratamiento de datos

-Analizar los datos obtenidos de la medida fotónica con el software asociado al equipo.

3.5.2 Ensayos sangre completa

El ensayo realizado en este apartado empleando una muestra de sangre completa (WB) anticoagulada con citrato trisódico, tiene la finalidad de estudiar el comportamiento de la misma

al ser activada por los agentes *trigger* del proceso de coagulación, como son el factor tisular (TF), el cloruro cálcico (CaCl_2) y la propia trombina.

3.5.2.1.1 Activación de la sangre completa: vía extrínseca

En este ensayo, se ha activado una muestra de WB anticoagulada situada en el eppendorf 1, añadiéndole una concentración de TF a 1.5pM y una de CaCl_2 a 50mM (*trigger*). En ese instante ($t=0s$), se hace fluir la muestra recién activada a través de un tubo TYGON LMT-55 de 0.44mm de diámetro interno hacia el eppendorf 2 con la ayuda de una bomba peristáltica de laboratorio a una velocidad de flujo constante a 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. (**Figura 48**).



Figura 48. Esquema de la bomba peristáltica para experimento de una muestra de WB activada.

Con este experimento, se quiere calcular el tiempo que tarda en fluir la muestra activada del eppendorf 1 al eppendorf 2, a diferentes concentraciones de sangre completa anticoagulada.

Las muestras empleadas en el experimento se prepararon de la siguiente forma:

-Muestra 1 → Sangre completa al 25%

Concentraciones finales:

[WB] = 25%; [TF] = 1.5pM y [CaCl₂] = 50mM

-Muestra 2 → Sangre completa al 50%

Concentraciones finales:

[WB] = 50%; [TF] = 1.5pM y [CaCl₂] = 50mM

-Muestra 3 → Sangre completa al 75%

Concentraciones finales:

[WB] = 75%; [TF] = 1.5pM y [CaCl₂] = 50mM

-Muestra 4 → Sangre completa al 85.8%

Concentraciones finales:

[WB] = 85.8%; [TF] = 1.5pM y [CaCl₂] = 50mM

En la muestra 4, para llegar a un porcentaje de sangre superior habría que reducir la dilución de los reactivos *trigger* adicionados, lo que permitiría adicionarlos en un menor volumen.

3.5.3 Ensayos alérgenos

Los ensayos para la detección de alérgenos se clasifican en dos grupos. En primer lugar, los ensayos realizados sobre superficies planas de Si_3N_4 para la detección de los alérgenos OVO y GLN vía aptámeros. En segundo lugar, se ha realizado el control de inmovilización de los anticuerpos específicos de los alérgenos GLN, CAS, OVA y BLG como paso previo a los ensayos de detección de GLN sobre chips fotónicos.

3.5.3.1 Ensayos para la detección de alérgenos sobre Si_3N_4 plano: vía aptámeros.

Los ensayos realizados en este apartado consisten en la inmovilización de aptámeros como sondas de captura para el reconocimiento específico de alérgenos sobre superficies de Si_3N_4 plano. En este ensayo, se ha inmovilizado sobre la superficie del sustrato un aptámero de

captura específico del alérgeno en cuestión, finalmente como cierre de este se ha empleado otro aptámero también específico del alérgeno, pero marcado con el fluoróforo Cy5 (**Figura 49**).

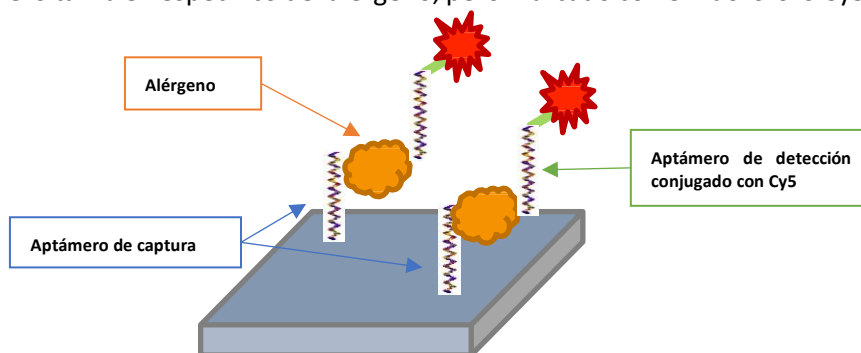


Figura 49. Esquema del ensayo empleado para la detección de alérgenos.

3.5.3.1.1 Detección de Ovomucoide (OVO)

Los aptámeros empleados en los experimentos para el reconocimiento del OVO se nombran con el siguiente código:

- 1) ApOVO3.9A y ApOVO3.11A: aptámeros de captura con modificación NH_2
- 2) ApOVO3.9B y ApOVO3.11B: aptámeros de detección marcados con Cy5

Donde la **A** se corresponde con el grupo amino ($-\text{NH}_2$) y la **B** con el conjugado fluoróforo (**Cy5**). La combinación de aptámeros para los ensayos sobre chips planos son:

Ensayo 1: pareja 1 \rightarrow ApOVO3.9A / ApOVO3.9B y pareja 3 \rightarrow ApOVO3.11A / ApOVO3.9B.

Ensayo 2: pareja 2 \rightarrow ApOVO3.9A / ApOVO3.11B y pareja 4 \rightarrow ApOVO3.11A / ApOVO3.11B.

Protocolo químico D: detección de OVO

Para la detección de OVO se han planteado dos ensayos tipo ALISA, empleado el protocolo D descrito en este apartado como estrategia de activación química. En ambos ensayos se han inmovilizado los aptámeros de captura ApOVO3.9A y ApOVO3.11A. Sin embargo, en el ensayo 1 se ha empleado el aptámero ApOVO3.9B como elemento de cierre, mientras que en el ensayo 2 se ha utilizado el aptámero ApOVO3.11B. El esquema de estos ensayos sobre superficies planas de Si_3N_4 se muestra en la **Figura 50**.

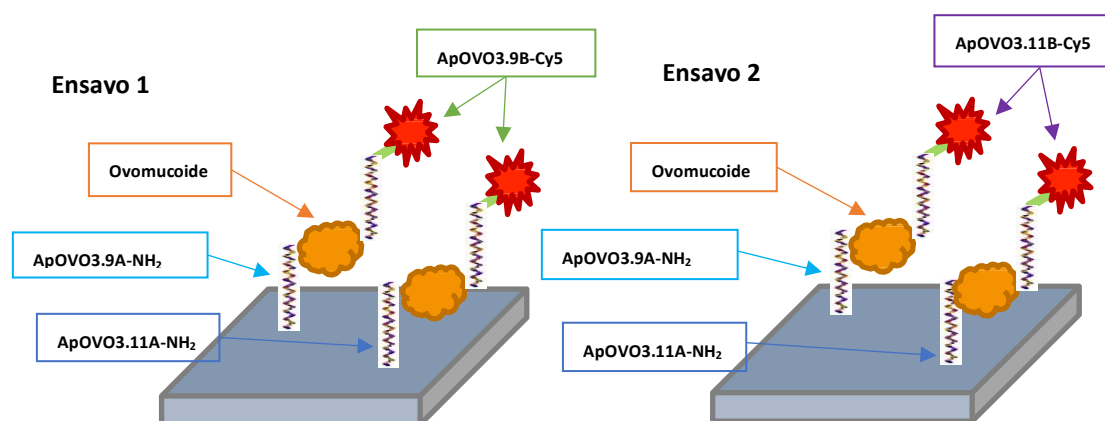


Figura 50. Esquema de los ensayos para la detección de OVO sobre superficies planas de Si_3N_4 .

Fase de biofuncionalización:

1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio

-Limpiar y oxidar la superficie de Si_3N_4 con disolución piraña [3:1 (v/v) H_2SO_4 : H_2O_2]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 60 min. a 100°C .

-Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

-Silanizar la superficie con el organosilano APTES al 1% en Etanol 95% [95:5 (v/v) EtOH:DIW]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución de APTES durante 2horas a T^a amb.

-Lavar las superficies con la mezcla EtOH:DIW al 95% y secar con corriente de aire a presión.

-Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Agente de entrecruzamiento glutaraldehído

-Adicionar glutaraldehído (GLUT) al 2.5% en PBS sobre la superficie. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 2 horas a T^a amb.

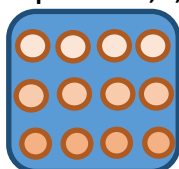
-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie de nitruro de silicio plano

-Inmovilizar los ApOVO a 1μM en PBS y NaBH₃CN en NaOH 1M a una concentración de 5mM.

-Realizar una matriz de 3x4 gotas con micropipeta, depositada a mano y con un volumen de 0.2μL/gota. Aplicar sobre las cuatro superficies a partir de las disoluciones anteriores, según el esquema que se muestra en la **Figura 51**.

Superficies 1, 2, 3 y 4



→ F1: 4 gotas de PBS y NaBH₃CN a 5mM (control)

→ F2: 4 gotas de ApOVO3.9A a 1μM en PBS y NaBH₃CN a 5mM

→ F3: 4 gotas de ApOVO3.11A a 1μM en PBS y NaBH₃CN a 5mM

Figura 51. Esquema de la matriz depositada sobre Si₃N₄ plano para la inmovilización de las sondas.

-Incubar las superficies durante 2h. a T^a amb., en condiciones de humedad controlada.

-Dejar secar las gotas de la matriz durante 2 minutos, tras el periodo de incubación.

1.5. Estructuración de los aptámeros de captura inmovilizados

-Sumergir cada una de las cuatro superficies en 4mL de MgCl₂ 1mM/PBS.

-Calentar a 95°C durante 10 min sobre placa calefactora.

-Enfriar en nevera a 4°C durante 10min.

-Lavar con una disolución de MgCl₂ 1mM/PBS, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.6. Bloqueo de la superficie

-Bloquear las superficies con 50μL de BSA 1% en PBS durante 1h a T^a amb., bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

Fase de biodetección:

1.7. Etapa de captura: detección de OVO

-Aplicar 50μL de MgCl₂ 1Mm/PBS sobre las superficies 1 y 3 (blanco).

-Aplicar 50μL de OVO a 10ppm en MgCl₂ 1Mm/PBS sobre las superficies 2 y 4.

-Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con MgCl₂ 1Mm/PBS, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.8. Estructuración de los aptámeros de detección conjugados con Cy5

-Estructurar los ApOVO-Cy5 a 1μM en MgCl₂ 1mM/PBS en un eppendorf.

-Calentar la disolución a 95°C en baño maría sobre placa calefactora durante 10 min.

-Enfriar seguidamente ambos eppendorf a 4°C en nevera 10 min.

1.9. Adición del aptámero estructurado marcado con Cy5

-Aplicar 50μL del ApOVO3.9B-Cy5 estructurado sobre las superficies 1 y 2.

-Aplicar 50μL del ApOVO3.11B-Cy5 estructurado sobre las superficies 3 y 4.

EXPERIMENTAL

-Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada y protegidas de la luz directa para evitar el deterioro del Cy5.

-Lavar las superficies con MgCl₂ 1mM/PBS, DIW y secar con corriente de aire a presión

1.10. Escaneo de la superficie tras la fase de biodetección: control del Cy5

-Escanear las superficies con el equipo de fluorescencia Gene Pix 4100A Microarray.

-Depositar las superficies sobre un portaobjetos, insertarlo en el equipo y escanear a 635nm.

-Analizar los resultados obtenidos de la señal de fluorescencia con el software GenePix® Pro 6.0 asociado al equipo.

3.5.3.1.2 Detección de Gliadina (GLN)

Los aptámeros empleados en los experimentos para el reconocimiento de la GLN se nombran con el siguiente código:

1) ApGLN1F y ApGLN6F: aptámeros de captura con modificación NH₂

2) ApGLN9F: aptámero de detección marcado con Cy5

Los aptámeros empleados para la captura del alérgeno, se inmovilizan sobre la superficie plana de Si₃N₄, mientras que el de detección es un oligo marcado con un fluoróforo utilizado como cierre del inmunoensayo. La combinación de aptámeros para los ensayos sobre plano es:

Ensayo GLN: pareja 1 → ApGLN1F / ApGLN9F y pareja 2 → ApGLN6F / ApGLN9F

Protocolo químico D: detección de GLN

El ensayo 3 se ha propuesto para la detección de GLN, empleando el protocolo D como estrategia de funcionalización química. En este ensayo se han inmovilizado los aptámeros de captura ApGLN1F y ApGLN6F como sondas sobre la superficie plana de Si₃N₄. Además del aptámero de detección ApGLN9F como cierre del ensayo. El esquema definido del ensayo 3 se muestra en la **Figura 52**.

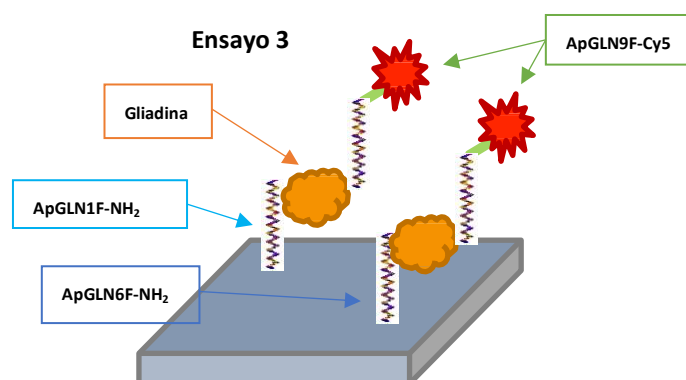


Figura 52. Esquema del ensayo realizado para la detección de GLN sobre superficies planas de Si₃N₄.

Fase de biofuncionalización:

1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio

-Limpiar y oxidar la superficie de Si₃N₄ con disolución piraña [3:1 (v/v) H₂SO₄:H₂O₂]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 60 min. a 100°C.

-Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

-Silanizar la superficie con el organosilano APTES al 1% en Etanol 95% [95:5 (v/v) EtOH:DIW]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución de APTES durante 2horas a T^a amb.

-Lavar las superficies con la mezcla EtOH:DIW al 95% y secar con corriente de aire a presión.

-Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Agente de entrecruzamiento glutaraldehído

- Adicionar glutaraldehído (GLUT) al 2.5% en PBS sobre la superficie. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 2 horas a T^a amb.
- Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Estructuración de los aptámeros de captura de GLN

- Estructurar el ApGLN1F y ApGLN6F a 1 μ M en MgCl₂ 1mM/PBS en un eppendorf.
- Calentar las disoluciones a 95°C en baño maría sobre placa calefactora durante 10 min.
- Enfriar seguidamente los eppendorf a 4°C en nevera 10 min.

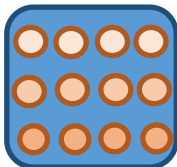
1.5. Estructuración del aptámero de detección de GLN

- Estructurar el ApGLN9F a 1 μ M en MgCl₂ 1mM/PBS en un eppendorf.
- Calentar la disolución a 95°C en baño maría sobre placa calefactora durante 10 min.
- Enfriar seguidamente el eppendorf a 4°C en nevera 10 min.

1.6. Inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie de nitruro de silicio plano

- Inmovilizar los ApGLN de captura a 0.9 μ M en MgCl₂ 1mM/PBS y NaBH₃CN en NaOH 1M a una concentración de 5mM.
- Realizar una matriz de 3x4 gotas con micropipeta, depositada a mano y con un volumen de 0.2 μ L/gota. Aplicar sobre las dos superficies a partir de las disoluciones anteriores, según el esquema que se muestra en la **Figura 53**.

Superficies 1 y 2



- F1: 4 gotas de ApGLN1F a 0.9 μ M en MgCl₂ 1mM/PBS y NaBH₃CN a 5mM
- F2: 4 gotas de MgCl₂ 1mM/PBS y NaBH₃CN a 5mM (control)
- F3: 4 gotas de ApGLN6F a 0.9 μ M en MgCl₂ 1mM/PBS y NaBH₃CN a 5mM

Figura 53. Esquema de la matriz depositada sobre Si₃N₄ plano para la inmovilización de las sondas.

- Incubar las superficies durante 2h. a T^a amb., en condiciones de humedad controlada.
- Dejar secar las gotas de la matriz durante 2 minutos, tras el periodo de incubación.

1.7. Bloqueo de la superficie

- Bloquear las superficies con 50 μ L de BSA 1% en PBS durante 1h a T^a amb., bajo condiciones de humedad controlada.
- Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

Fase de biodetección:

1.8. Etapa de captura: detección de GLN

En primer lugar, se ha procedido a la disolución parcial de la GLN en EtOH al 60% obteniendo disoluciones del analito a un nivel de concentración de 650ppm en promedio.

-Preparar la disolución stock de GLN:

- Triturar la muestra sólida con la punta de la espátula
- Añadir 1mL de **EtOH 60%/DIW** a 1mg de GLN → [GLN]_{teórica} = 1mg/mL = 1000ppm
- Determinar la concentración real de la GLN en disolución:
- Vortex fuerte 1min. seguido de rotación en horno de hibridación durante 2h.
- Centrifugar a 10000rpm durante 10 min.

Medir la concentración con un equipo NanoDrop, de la GLN disuelta en el sobrenadante.

[GLN]_{disuelta} = 650ppm → 65% de GLN disuelta de los 1000ppm iniciales

- Aplicar 50 μ L de PBS sobre la superficie 1 (blanco).
- Aplicar 50 μ L de GLN a 10ppm en PBS sobre la superficie 2.
- Incubar a 25°C en estufa durante 1h, bajo condiciones de humedad controlada.
- Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.9. Adición del aptámero estructurado marcado con Cy5

- Aplicar 50µL del ApGLN9F estructurado sobre las superficies 1 y 2.
- Incubar las superficies durante 1h a 25°C en estufa, bajo condiciones de humedad controlada y protegidas de la luz directa para evitar el deterioro del Cy5.
- Lavar los chips con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.10. Escaneo de la superficie tras la fase de biodetección: control del Cy5

- Escanear las superficies con el equipo de fluorescencia Gene Pix 4100A Microarray.
- Depositar las superficies sobre un portaobjetos, insertarlo en el equipo y escanear a 635nm.
- Analizar los resultados obtenidos de la señal de fluorescencia con el software GenePix® Pro 6.0 asociado al equipo.

3.5.3.2 Ensayos para la detección de alérgenos sobre chip fotónico

Los ensayos realizados sobre el chip fotónico V2 (**Figura 29**), se clasifican en dos grupos. En primer lugar, se describen los experimentos elaborados para la detección de los alérgenos GLN y CAS como disolución patrón. En segundo lugar, se presenta el ensayo correspondiente a la detección del alérgeno GLN en muestras cárnica dopada con gluten. Cabe destacar que, como paso previo a estas medidas fotónicas, se ha realizado el control de inmovilización de los siguientes anticuerpos monoclonales.

3.5.3.2.1 Control de inmovilización de los anticuerpos monoclonales

El protocolo E empleado en este apartado consiste en el control de inmovilización de los anticuerpos monoclonales (mAb-GLN, mAb-CAS, mAb-OVA y mAb-BLG) específicos de los alérgenos GLN, CAS, OVA y BLG respectivamente sobre superficies planas de Si₃N₄. La finalidad de este ensayo es la comprobación de la inmovilización de los mAb mediante el uso de un anticuerpo secundario policlonal conjugado con Alexa 647 (pAb^{2*}-GAM). Como los anticuerpos mAb están desarrollados en ratón, es necesario que el anticuerpo de verificación pAb^{2*}-GAM sea anti-ratón. El ensayo referente al control de inmovilización se ha practicado para los cuatro mAb. El esquema del ensayo empleado se muestra en la **Figura 54**.

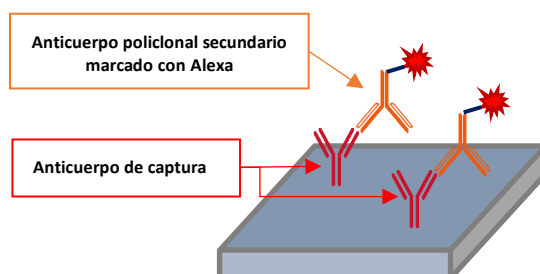


Figura 54. Esquema del ensayo para el control de inmovilización del anticuerpo monoclonal.

Protocolo químico E: control de inmovilización de los mAb de GLN, CAS, OVA y BLG

Fase de biofuncionalización:

1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio

- Limpiar y oxidar la superficie de Si₃N₄ con disolución piraña [3:1 (v/v) H₂SO₄:H₂O₂]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 30 min. a 100°C.
- Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

- Silanizar la superficie con el organosilano CTES al 1% en DW ácida, ajustando el pH a 5 mediante la adición de ácido acético 0.2M. Sumergir cada superficie en 500µL de la disolución de CTES durante 2horas a T^a amb. agitando suavemente en una placa agitadora a 75 rpm.
- Lavar las superficies con DIW ácida y secar con corriente de aire a presión.
- Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

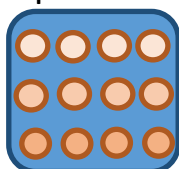
1.3. Activación de la superficie con los agentes de entrecruzamiento (EDC/NHS)

- Activar el grupo carboxílico del CTES mediante la adición de una mezcla EDC/NHS preparada en tampón MES 0.1M a pH 4.
- Sumergir las superficies 1, 3, 5 y 7 en 500μL de MES 0.1M (blancos).
- Sumergir las superficies 2, 4, 6 y 8 en 500μL de EDC/NHS en MES 0.1M.
- Incubar durante 30 minutos a T^a amb., agitando suavemente en placa agitadora a 75 rpm.
- Lavar las superficies con MES 0.1M, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda sobre la superficie de nitruro de silicio plano

- Inmovilizar los mAb a 100ppm (F1) y 50ppm (F2) en PBS sobre la superficie correspondiente, además del anticuerpo policlonal anti trombina (pAb-THR) como control inespecífico (F3).
- Realizar una matriz de 3x4 gotas con micropipeta, depositada a mano y con un volumen de 0.2μL/gota. Aplicar sobre las ocho superficies a partir de las disoluciones anteriores, para inmovilizar el mAb-GLN sobre las superficies 1 y 2, el mAb-OVA sobre la 3 y 4, el mAb-CAS sobre las 5 y 6 y el mAb-BLG sobre la 7 y 8, según el esquema que se muestra en la **Figura 55**.

Superficies de la 1 a la 8



- F1: 4 gotas del mAb en PBS a 100ppm
- F2: 4 gotas del mAb en PBS a 50ppm
- F3: 4 gotas del pAb-THR en PBS a 100ppm

Figura 55. Esquema de la matriz depositada sobre Si₃N₄ plano para la inmovilización de los mAb.

- Incubar las superficies durante 2h. a T^a amb., en condiciones de humedad controlada.
- Lavar las superficies con PBS, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.5. Bloqueo de la superficie

- Bloquear las superficies con 50μL de BSA 1% en PBS durante 24h a 4°C, bajo condiciones de humedad controlada.
- Lavar las superficies con PBS y realizar el control de inmovilización.

Fase de biodetección: control de inmovilización

1.6. Adición del anticuerpo secundario policlonal anti-ratón conjugado con Alexa 647

- Aplicar 50μL de pAb^{2*}-GAM a 5ppm en PBS sobre las ocho superficies.
- Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada y protegidas de la luz directa para evitar el deterioro del Alexa 647.
- Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.7. Escaneo de la superficie tras el control de inmovilización

- Escanear las superficies con el equipo de fluorescencia Gene Pix 4100A Microarray.
- Depositar las superficies sobre un portaobjetos, insertarlo en el equipo y escanear a 635nm.
- Analizar los resultados obtenidos de la señal de fluorescencia con el software GenePix[®] Pro 6.0 asociado al equipo.

3.5.3.2.2 Ensayos para la detección de alérgenos como disolución patrón

En este primer apartado, se describen los experimentos realizados sobre chips fotónicos para la detección de los alérgenos GLN y CAS como disolución patrón. La fase de biofuncionalización del protocolo E, para el control de inmovilización se ha empleado en este apartado.

3.5.3.2.2.1 Detección de Gliadina (GLN)

El procedimiento experimental empleado para la detección de GLN como disolución patrón sobre chips fotónicos, se corresponde al protocolo E que se describe a continuación. Las medidas fotónicas se han realizado en un entorno de laboratorio a diferentes concentraciones para la determinación de una curva de calibrado.

Protocolo químico E: detección del alérgeno GLN

Fase de biofuncionalización:

1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio

-Limpiar y oxidar la superficie de Si₃N₄ con disolución piraña [3:1 (v/v) H₂SO₄:H₂O₂]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 30 min. a 100°C.

-Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

-Silanizar la superficie con el organosilano CTES al 1% en DW ácida, ajustando el pH a 5 mediante la adición de ácido acético 0.2M. Sumergir cada superficie en 500µL de la disolución de CTES durante 2horas a T^a amb. agitando suavemente en una placa agitadora a 75 rpm.

-Lavar las superficies con DIW ácida y secar con corriente de aire a presión.

-Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Activación de la superficie con los agentes de entrecruzamiento (EDC/NHS)

-Activar el grupo carboxílico del CTES mediante la adición de una mezcla EDC/NHS preparada en tampón MES 0.1M a pH 4. Sumergir la superficie en 500µL de EDC/NHS en MES 0.1M.

-Incubar durante 30 minutos a T^a amb., agitando suavemente en placa agitadora a 75 rpm.

-Lavar la superficie con MES 0.1M, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie del chip fotónico

-Inmovilizar el mAb-GLN a 200ppm en PBS sobre los RRfunc. 1, 2, 5 y 6.

-Imprimir la disolución del mAb-GLN sobre los RRfunc. indicados, mediante el equipo de microimpresión SCIENION S1. Se depositan 10 gotas por anillo de 500pL por gota **Figura 56**.

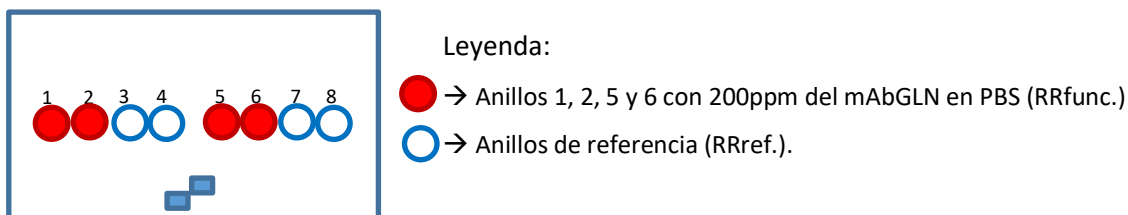


Figura 56. Esquema del chip fotónico V2 para la detección de GLN.

-Incubar las superficies durante 2h. a T^a amb., en condiciones de humedad controlada.

-Lavar la superficie con PBS y bloquear.

1.5. Bloqueo de la superficie

-Bloquear las superficies con 20µL de BSA 1% en PBS durante 1h a T^a amb., bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBS, DIW y secar con corriente de aire a presión.

Fase de biodetección: medida fotónica

-Fluir durante 10 min. a una velocidad constante de 30µL/min la disolución de PBST al 7.5% de EtOH por los dos canales, hasta que la señal de la medida se estabilice (línea base).

El flujo se mantiene constante durante todo el experimento a 30µL/min.

1.6. Etapa de captura: detección de GLN

-Fluir por los dos canales la disolución de GLN PWG a diferentes concentraciones (1.25, 2.5 y 5ppm), en PBST al 7.5% EtOH 10min para la recta de calibrado.

1.7. Etapa de lavado: sensado

-Fluir por ambos canales de nuevo la disolución tampón PBS durante 10 min. a 30µL/min.

3.5.3.2.2.2 Detección de Caseína (CAS)

El procedimiento experimental empleado para la detección de CAS como disolución patrón sobre chips fotónicos, se corresponde al protocolo E que se describe a continuación. Las medidas fotónicas se han realizado en un entorno de laboratorio a diferentes concentraciones para la determinación de una curva de calibrado.

Protocolo químico E: detección del alérgeno CAS

Fase de biofuncionalización:

1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio

-Limpiar y oxidar la superficie de Si_3N_4 con disolución piraña [3:1 (v/v) $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 30 min. a 100°C .

-Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

-Silanizar la superficie con el organosilano CTES al 1% en DW ácida, ajustando el pH a 5 mediante la adición de ácido acético 0.2M. Sumergir cada superficie en $500\mu\text{L}$ de la disolución de CTES durante 2horas a T^a amb. agitando suavemente en una placa agitadora a 75 rpm.

-Lavar las superficies con DIW ácida y secar con corriente de aire a presión.

-Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Activación de la superficie con los agentes de entrecruzamiento (EDC/NHS)

-Activar el grupo carboxílico del CTES mediante la adición de una mezcla EDC/NHS preparada en tampón MES 0.1M a pH 4. Sumergir la superficie en $500\mu\text{L}$ de EDC/NHS en MES 0.1M.

-Incubar durante 30 minutos a T^a amb., agitando suavemente en placa agitadora a 75 rpm.

-Lavar la superficie con MES 0.1M, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie del chip fotónico

-Inmovilizar el mAb-CAS a 100ppm en PBS sobre los RRfunc. 1, 2, 5 y 6.

-Imprimir la disolución del mAb-GLN sobre los RRfunc. indicados, mediante el equipo de microimpresión SCIENION S1. Se depositan 10 gotas por anillo de 500pL por gota **Figura 57**.

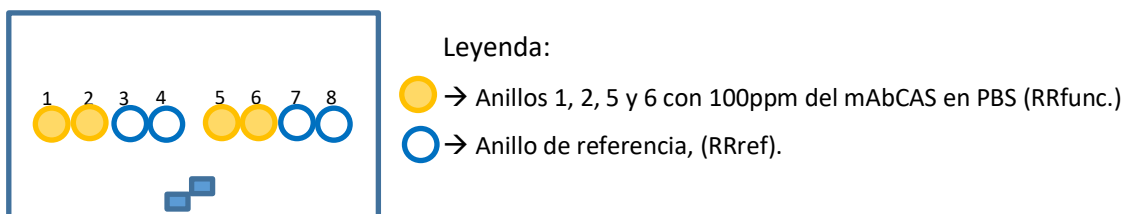


Figura 57. Esquema del chip fotónico V2 para la detección de CAS.

-Incubar las superficies durante 2h. a T^a amb., en condiciones de humedad controlada.

-Lavar la superficie con PBS y bloquear.

1.5. Bloqueo de la superficie

--Bloquear las superficies con $20\mu\text{L}$ de BSA 1% en PBS durante 1h a T^a amb., bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBS, DIW y secar con corriente de aire a presión.

Fase de biodetección: medida fotónica

-Fluir durante 10 min. a una velocidad constante de $30\mu\text{L}/\text{min}$ la disolución de PBST por los dos canales, hasta que la señal de la medida se estabilice (línea base).

El flujo se mantiene constante durante todo el experimento a $30\mu\text{L}/\text{min}$.

1.8. Etapa de captura: detección de CAS

-Fluir por los dos canales la disolución de CAS a 5ppm en PBST 10min.

1.9. Etapa de lavado: sensado

-Fluir por ambos canales de nuevo la disolución tampón PBST durante 10 min. a 30μL/min.

3.5.3.2.3 Ensayo para la detección del alérgeno GLN: muestra cárnica

El procedimiento experimental empleado para la detección de GLN procedente de una muestra cárnica, dopada con gluten de trigo sobre chips fotónicos, se corresponde a la fase de biofuncionalización del protocolo E.

Protocolo químico E: detección del alérgeno GLN

Fase de biofuncionalización:

1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio

-Limpiar y oxidar la superficie de Si₃N₄ con disolución piraña [3:1 (v/v) H₂SO₄:H₂O₂]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 30 min. a 100°C.

-Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

-Silanizar la superficie con el organosilano CTES al 1% en DW ácida, ajustando el pH a 5 mediante la adición de ácido acético 0.2M. Sumergir cada superficie en 500μL de la disolución de CTES durante 2horas a T^a amb. agitando suavemente en una placa agitadora a 75 rpm.

-Lavar las superficies con DIW ácida y secar con corriente de aire a presión.

-Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Activación de la superficie con los agentes de entrecruzamiento (EDC/NHS)

-Activar el grupo carboxílico del CTES mediante la adición de una mezcla EDC/NHS preparada en tampón MES 0.1M a pH 4. Sumergir la superficie en 500μL de EDC/NHS en MES 0.1M.

-Incubar durante 30 minutos a T^a amb., agitando suavemente en placa agitadora a 75 rpm.

-Lavar la superficie con MES 0.1M, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie del chip fotónico

-Inmovilizar el mAb-GLN a 200ppm en PBS sobre los RRfunc. 1, 2, 5 y 6.

-Imprimir la disolución del mAb-GLN sobre los RRfunc. indicados, mediante el equipo de microimpresión SCIENION S1. Se depositan 10 gotas por anillo de 500pL por gota (**Figura 58**).

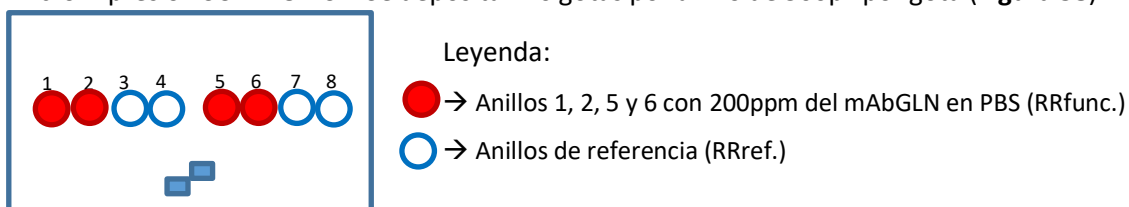


Figura 58. Esquema del chip fotónico V2 para la detección de GLN.

-Incubar las superficies durante 2h. a T^a amb., en condiciones de humedad controlada.

-Lavar la superficie con PBS y bloquear.

1.5. Bloqueo de la superficie

-Bloquear las superficies con 20μL de BSA 1% en PBS durante 1h a T^a amb., bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBS, DIW y secar con corriente de aire a presión.

Fase de biodetección: medida fotónica

-Fluir durante 10 min. a una velocidad constante de 30μL/min la disolución de PBST al 7.5% de EtOH por los dos canales, hasta que la señal de la medida se estabilice (línea base).

El flujo se mantiene constante durante todo el experimento a 30μL/min.

1.6. Etapa de captura: detección de GLN del gluten, extracto cárnico

Realizar una extracción sólido/líquido de una muestra de carne dopada con 30ppm de gluten:

- Homogeneizar la muestra cárnica en una sola masa.
- Pesar la carne para obtener una ratio R10 (0.10g carne/1mL solvente).
- Mezclar la muestra de carne en un tubo con una una disolución de EtOH al 60%.
- Agitar en placa la mezcla durante 60 min. a T^a amb. para extraer la GLN del gluten.
- Centrifugar la muestra 10min. a 10000rpm y T^a amb.
- Descartar el *pellet* y trasvasar el sobrenadante a un tubo limpio.
- Filtrar el sobrenadante con un filtro de jeringa de 1mL.
- Recoger el extracto del alérgeno GLN disuelto en EtOH al 60%.
- Diluir el extracto con PBST hasta una disolución final de EtOH al 7.5%.
- Fluir por los dos canales la disolución del extracto en PBST al 7.5% EtOH 10min.

1.7. Etapa de lavado: sensado

- Fluir por ambos canales de nuevo la disolución tampón de PBS durante 10 min. a 30μL/min.

3.5.4 Ensayos patógenos

Los ensayos empleados para la detección de patógenos, se han realizado sobre superficies de nitruro de silicio plano para pruebas de detección de la bacteria *Escherichia coli* (E.coli) y control de inmovilización de los anticuerpos específicos para el reconocimiento del Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2), con la finalidad de optimizar la inmovilización de la sonda y mejorar la capacidad de captura. Además, las estrategias de activación química empleadas en superficies de Si₃N₄ plano se han transferido a chips fotónicos, para realizar medidas fotónicas con el *set-up* optoelectrónico de laboratorio conectado a un sistema microfluídico.

3.5.4.1 Ensayo para la detección de la bacteria E.coli sobre Si₃N₄ plano: vía aptámeros

Para este ensayo se han inmovilizado sobre la superficie plana de Si₃N₄, los aptámeros de captura ApE.coli 1 y ApE.coli 2 específicos de la bacteria E.coli. Asimismo, como cierre del ensayo se ha empleado el aptámero ApE.coli 3 el cual está modificado en su extremo 3' con el fluoróforo Cy5, además este aptámero de detección es también específico de la E.coli (**Figura 59**).

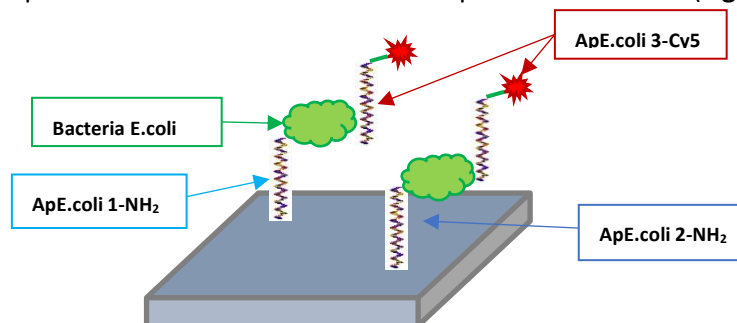


Figura 59. Esquema del ensayo para la detección de E.coli sobre superficies de Si₃N₄ plano.

Esta estrategia se ha utilizado para la detección del patógeno E.coli, empleando los dos tipos de aptámeros sobre superficies planas de Si₃N₄. Por un parte los de captura, que poseen en su extremo 5' un grupo amino (NH₂) y un espaciador de timinas, veinte para el ApE.coli 1 (20T) y doce en el caso del ApE.coli 2 (12T):

- Aptámero anti E.coli 1 con 85 pares de base → ApE.coli 1-NH₂ (85pb)
- Aptámero anti E.coli 2 con 88 pares de base → ApE.coli 2-NH₂ (88pb)

Por otra parte, los aptámeros de detección, que cierran el ensayo tipo ALISA:

- Aptámero de E.coli 3 marcado con Cy5 en el extremo 3' → ApE.coli 3-Cy5 (88pb)
- Aptámero de E.coli 4 marcado con Cy5 en el extremo 5' → ApE.coli 4-Cy5 (85pb)

La combinación de aptámeros para los ensayos sobre superficies de Si₃N₄ plano son:

Ensayos 1 y 2: pareja 1 → ApE.coli 1 / ApE.coli 3 y pareja 2 → ApE.coli 2 / ApE.coli 3.

Protocolo químico D: detección de la bacteria E.coli

En este experimento se han realizado dos tipos de ensayo, siguiendo las pautas del protocolo químico D. Para el ensayo 1, las superficies 1, 2 y 3 se han sumergido durante 24 horas en una disolución de GLUT al 2.5%, mientras que para el ensayo 2, las superficies 4, 5 y 6 se han sumergido durante 2 horas. Además, se han utilizado dos cepas no patogénicas de la bacteria: Origami y XL1BLUE a una concentración de 20ufc/μL. Siendo ufc el número de unidades formadoras de bacterias E.coli sobre la superficie, como se emplean 50μL por superficie, se tienen un total de 1000ufc.

Fase de biofuncionalización:

1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio

-Limpiar y oxidar la superficie de Si₃N₄ con disolución piraña [3:1 (v/v) H₂SO₄:H₂O₂]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 60 min. a 100°C.

-Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

-Silanizar la superficie con el organosilano APTES al 1% en Etanol 95% [95:5 (v/v) EtOH:DIW]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución de APTES durante 2horas a T^a amb.

-Lavar las superficies con la mezcla EtOH:DIW al 95% y secar con corriente de aire a presión.

-Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Agente de entrecruzamiento glutaraldehído

-Adicionar glutaraldehído (GLUT) al 2.5% en PBS sobre la superficie. Sumergir cada una de ellas en 2mL de GLUT durante 2h para las del ensayo 1 y 24h para las del ensayo 2 a T^a amb.

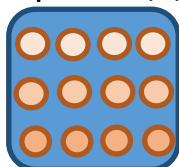
-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie de nitruro de silicio plano

-Inmovilizar los ApE.coli a 9μM en PBS y NaBH₃CN en NaOH 1M a una concentración de 5mM.

-Realizar una matriz de 3x4 gotas con micropipeta, depositada a mano y con un volumen de 0.2μL/gota. Aplicar sobre las seis superficies a partir de las disoluciones anteriores, según el esquema que se muestra en la **Figura 60**.

Superficies 1, 2, 3, 4, 5 y 6



→ F1: 4 gotas de PBS y NaBH₃CN a 5mM (control)

→ F2: 4 gotas de ApE.coli 1 a 9μM en PBS y NaBH₃CN a 5mM

→ F3: 4 gotas de ApE.coli 2 a 9μM en PBS y NaBH₃CN a 5mM

Figura 60. Esquema de la matriz depositada sobre Si₃N₄ plano para la inmovilización de las sondas.

-Incubar las superficies durante 24h. a 4°C, en condiciones de humedad controlada.

-Dejar secar las gotas de la matriz durante 2 minutos, tras el periodo de incubación.

1.5. Estructuración de los aptámeros de captura inmovilizados

-Sumergir cada una de las seis superficies en 4mL de MgCl₂ 1mM/PBS.

-Calentar a 95°C durante 10 min sobre placa calefactora.

-Enfriar en nevera a 4°C durante 10min.

-Lavar con una disolución de MgCl₂ 1mM/PBS, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.6. Bloqueo de la superficie

-Bloquear las superficies con 50μL de BSA 1% en PBS durante 1h a T^a amb., bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

Fase de biodetección:**1.7. Etapa de captura: detección de E.coli**

- Aplicar 50µL de MgCl₂ 1mM/PBS sobre las superficies 1 y 4 (blanco).
- Aplicar 50µL de la cepa Origami a 2ufc/µL en MgCl₂ 1mM/PBS sobre las superficies 2 y 5.
- Aplicar 50µL de la cepa XL1BLUE a 2ufc/µL en MgCl₂ 1mM/PBS sobre las superficies 3 y 6.
- Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada.
- Lavar las superficies con MgCl₂ 1Mm/PBS, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.8. Estructuración del aptámero de detección conjugados con Cy5

- Estructurar el ApE.coli 3-Cy5 a 1µM en MgCl₂ 1mM/PBS en un eppendorf.
- Calentar la disolución a 95°C en baño maría sobre placa calefactora durante 10 min.
- Enfriar seguidamente ambos eppendorf a 4°C en nevera 10 min.

1.9. Adición del aptámero estructurado marcado con Cy5

- Aplicar 50µL del ApE.coli 3-Cy5 estructurado sobre todas las superficies.
- Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada y protegidas de la luz directa para evitar el deterioro del Cy5.
- Lavar las superficies con MgCl₂ 1mM/PBS, DIW y secar con corriente de aire a presión

1.10. Escaneo de la superficie tras la fase de biodetección: control del Cy5

- Escanear las superficies con el equipo de fluorescencia Gene Pix 4100A Microarray.
- Depositar las superficies sobre un portaobjetos, insertarlo en el equipo y escanear a 635nm.
- Analizar los resultados obtenidos de la señal de fluorescencia con el software GenePix® Pro 6.0 asociado al equipo.

3.5.4.2 Ensayo para la detección del virus PCV2 sobre chip fotónico

Los ensayos realizados para la detección de patógenos sobre el chip fotónico V2 (**Figura 29**) de una superficie de 0.3cm², se clasifican en dos etapas. En primer lugar, como paso previo a las medidas fotónicas se ha realizado el control de inmovilización del anticuerpo pAb-PCV2. En segundo lugar, se describen los experimentos elaborados para la detección del Circovirus Porcino de tipo 2 (PCV2) sobre superficies de chips fotónicos basados en anillos resonantes (RR).

3.5.4.2.1 Control de inmovilización del anticuerpo policlonal anti-PCV2

El protocolo F empleado en este apartado consiste en el control de inmovilización del anticuerpo policlonal pAb-PCV2 específico del Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) sobre superficies planas de Si₃N₄. La finalidad de este ensayo es la comprobación de la inmovilización del pAb-PCV2 mediante el uso de un anticuerpo secundario policlonal (pAb^{2*}-GAR) conjugado con Alexa 647. Como el anticuerpo pAb-PCV2 se ha desarrollado en conejo, el anticuerpo de control pAb^{2*}-GAR ha de ser anti-conejo. El esquema del ensayo empleado se muestra en la **Figura 61**.

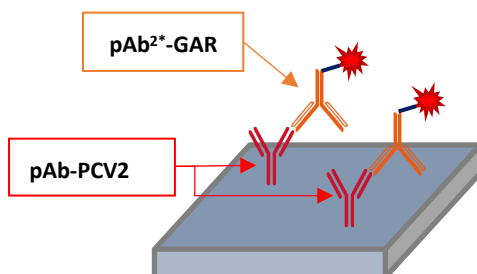


Figura 61. Esquema del ensayo para el control de inmovilización del anticuerpo policlonal pAb-PCV2.

Protocolo químico F: control de inmovilización del pAb-PCV2**Fase de biofuncionalización:****1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio**

-Limpiar y oxidar la superficie de Si_3N_4 con disolución piraña [3:1 (v/v) $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 30 min. a 100°C .

-Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

-Silanizar la superficie con el organosilano CTES al 1% en DIW ácida, ajustando el pH a 5 mediante la adición de ácido acético 0.2M. Sumergir cada superficie en $500\mu\text{L}$ de la disolución de CTES durante 2horas a $T^\circ\text{amb}$. agitando suavemente en una placa agitadora a 75 rpm.

-Lavar las superficies con DIW ácida y secar con corriente de aire a presión.

-Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Activación de la superficie con los agentes de entrecruzamiento (EDC/NHS)

-Activar el grupo carboxílico del CTES mediante la adición de una mezcla EDC/NHS preparada en tampón MES 0.1M a pH 4.

-Sumergir las superficies 1, 3, 5, 7, 9 y 11 en $500\mu\text{L}$ de MES 0.1M (blancos).

-Sumergir las superficies 2, 4, 6, 8, 10 y 12 en $500\mu\text{L}$ de EDC/NHS en MES 0.1M.

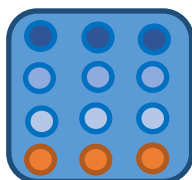
-Incubar durante 30 minutos a $T^\circ\text{amb}$. agitando suavemente en placa agitadora a 75 rpm.

-Lavar las superficies con MES 0.1M, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda sobre la superficie de nitruro de silicio plano

-Inmovilizar el pAb-PCV2 a 200ppm (F1), 100ppm (F2), 50ppm (F3) en PBS sobre la superficie correspondiente, además del anticuerpo pAb-THR como control inespecífico (F4).

-Realizar una matriz de 4x3 gotas con micropipeta, depositada a mano y con un volumen de $0.2\mu\text{L/gota}$. Aplicar sobre las doce superficies a partir de las disoluciones anteriores, según el esquema que se muestra en la **Figura 62**.

Superficies de la 1 a la 12

→ F1: 3 gotas del pAb-PCV2 a 200ppm en PBS

→ F2: 3 gotas del pAb-PCV2 a 100ppm en PBS

→ F3: 3 gotas del pAb-PCV2 a 50ppm en PBS

→ F4: 3 gotas del pAb-THR a 100ppm en PBS

Figura 62. Esquema de la matriz depositada sobre Si_3N_4 plano para la inmovilización de los pAb.

-Incubar las superficies durante 2h. a $T^\circ\text{amb}$. en condiciones de humedad controlada.

-Lavar todas las superficies con PBS, después con DIW la 7 y 8 y con CB la 9 y 10.

1.5. Bloqueo de la superficie

-Bloquear las superficies con $50\mu\text{L}$ de una de las siguientes disoluciones:

BSA 1% en PBS → Superficies 1 y 2

OVA 1% en PBS → Superficies 3 y 4.

GF 1% (Gelatina Fish) en PBS → Superficies 5 y 6.

BB 1x (Blocking Buffer) en DIW → Superficies 7 y 8.

MEA 0.1M (Etanolamina) en CB → Superficies 9 y 10.

Sin bloqueo, solo PBS → Superficies 11 y 12.

-Incubar durante 24h a 4°C , bajo condiciones de humedad controlada.

-Lavar las superficies con PBS y realizar el control de inmovilización.

Fase de biodetección: control de inmovilización**1.6. Adición del anticuerpo secundario policlonal anti-conejo conjugado con Alexa 647**

- Aplicar 50µL de pAb^{2*}-GAR a 5ppm en PBS sobre las doce superficies.
- Incubar las superficies durante 1h a T^a amb. bajo condiciones de humedad controlada y protegidas de la luz directa para evitar el deterioro del Alexa 647.
- Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.7. Escaneo de la superficie tras el control de inmovilización

- Escanear las superficies con el equipo de fluorescencia Gene Pix 4100A Microarray.
- Depositar las superficies sobre un portaobjetos, insertarlo en el equipo y escanear a 635nm.
- Analizar los resultados obtenidos de la señal de fluorescencia con el software GenePix[®] Pro 6.0 asociado al equipo.

3.5.4.2.2 Ensayo para la detección del PCV2: medida fotónica

El procedimiento experimental para la detección del PCV2, se ha realizado empleando el anticuerpo policlonal pAb-PCV2 como sonda de captura sobre chips fotónicos. La fase de biofuncionalización del protocolo F, utilizado en el control de inmovilización del pAb-PCV2, se ha utilizado para activar la superficie en la realización de los siguientes experimentos. Por una parte, se ha realizado la optimización de la sonda de captura y el tipo de bloqueo. Por otra parte, se ha elaborado un estudio de la dosis dependencia del PCV2 a diferentes factores de dilución.

3.5.4.2.2.1 Detección del PCV2: optimización de la sonda de captura y bloqueo

En este primer apartado, se describe el procedimiento experimental llevado a cabo sobre chips fotónicos para la detección del PCV2 a diferentes concentraciones de sonda de captura y agentes de bloqueo.

Protocolo químico F: detección del virus PCV2**Fase de biofuncionalización:****1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio**

- Limpiar y oxidar la superficie de Si₃N₄ con disolución piraña [3:1 (v/v) H₂SO₄:H₂O₂]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 30 min. a 100°C.
- Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

- Silanizar la superficie con el organosilano CTES al 1% en DIW ácida, ajustando el pH a 5 mediante la adición de ácido acético 0.2M. Sumergir cada superficie en 500µL de la disolución de CTES durante 2horas a T^a amb. agitando suavemente en una placa agitadora a 75 rpm.
- Lavar las superficies con DIW ácida y secar con corriente de aire a presión.
- Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Activación de la superficie con los agentes de entrecruzamiento (EDC/NHS)

- Activar el grupo carboxílico del CTES mediante la adición de una mezcla EDC/NHS preparada en tampón MES 0.1M a pH 4. Sumergir la superficie en 500µL de EDC/NHS en MES 0.1M.
- Incubar durante 30 minutos a T^a amb. agitando suavemente en placa agitadora a 75 rpm.
- Lavar la superficie con MES 0.1M, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie del chip fotónico

- Inmovilizar el pAb-PCV2 a 200 y 400ppm en PBS sobre los RR 1, 2, 5 y 6 del chip fotónico.
- Imprimir la disolución del pAb-PCV2 sobre los RR indicados, mediante el equipo de microimpresión SCIENION S1. Se depositan 10 gotas por anillo de 500pL por gota (**Figura 63**).

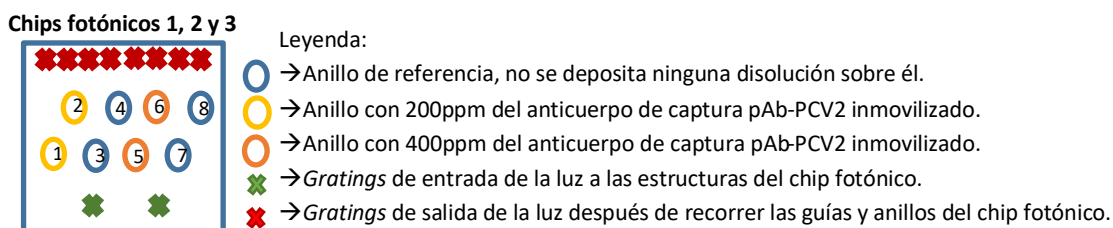


Figura 63. Esquema del chip fotónico V1 con la distribución de los RR para la detección de PCV2.

- Incubar las superficies durante 2h. a Tª amb., en condiciones de humedad controlada.
- Lavar la superficie con PBS y bloquear.

1.5. Bloqueo de la superficie

- Bloquear las superficies con 50µL de una de las siguientes disoluciones:

BSA 1% en PBS → Chip fotónico 1

OVA 1% en PBS → Chip fotónico 2

GF 1% (Gelatina de pescado) en PBS → Chip fotónico 3

- Incubar durante 24h a 4°C, bajo condiciones de humedad controlada.
- Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

Fase de biodetección: medida fotónica

- Fluir durante 10 min. a una velocidad constante de 30µL/min la disolución de PBST por los dos canales, hasta que la señal de la medida se estabilice (línea base).

El flujo se mantiene constante durante todo el experimento a 30µL/min

1.6. Etapa de captura: detección del PCV2

- Fluir por los dos canales la dilución 1/100 del PCV2 en PBST 10min.

1.7. Etapa de lavado: sensado

- Fluir por ambos canales de nuevo la disolución tampón PBST durante 10 min. a 30µL/min.

3.5.4.2.2.2 Detección del PCV2: relación dosis dependencia

En este segundo apartado, se describe el procedimiento experimental llevado a cabo sobre chips fotónicos para la detección del PCV2 a diferentes factores de dilución.

Protocolo químico F: detección del virus PCV2

Fase de biofuncionalización:

1.1. Activación química de la superficie de nitruro de silicio

- Limpiar y oxidar la superficie de Si₃N₄ con disolución piraña [3:1 (v/v) H₂SO₄:H₂O₂]. Sumergir cada superficie en 2mL de la disolución durante 30 min. a 100°C.

- Lavar las superficies con DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.2. Silanización de la superficie de nitruro de silicio activada

- Silanizar la superficie con el organosilano CTES al 1% en DIW ácida, ajustando el pH a 5 mediante la adición de ácido acético 0.2M. Sumergir cada superficie en 500µL de la disolución de CTES durante 2horas a Tª amb. agitando suavemente en una placa agitadora a 75 rpm.

- Lavar las superficies con DIW ácida y secar con corriente de aire a presión.

- Tratar térmicamente la superficie silanizada durante 10min. a 110°C y atemperar en un ambiente en ausencia de humedad durante 10min.

1.3. Activación de la superficie con los agentes de entrecruzamiento (EDC/NHS)

- Activar el grupo carboxílico del CTES mediante la adición de una mezcla EDC/NHS preparada en tampón MES 0.1M a pH 4. Sumergir la superficie en 500µL de EDC/NHS en MES 0.1M.

- Incubar durante 30 minutos a Tª amb. agitando suavemente en placa agitadora a 75 rpm.

- Lavar la superficie con MES 0.1M, DIW y secar con corriente de aire a presión.

1.4. Inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie del chip fotónico

- Inmovilizar el pAb-PCV2 a 200 y 400ppm en PBS sobre los RR 1, 2, 5 y 6 del chip fotónico.
- Imprimir la disolución del pAb-PCV2 sobre los RR indicados, mediante el equipo de microimpresión SCIENION S1. Se depositan 10 gotas por anillo de 500pL por gota (**Figura 64**).

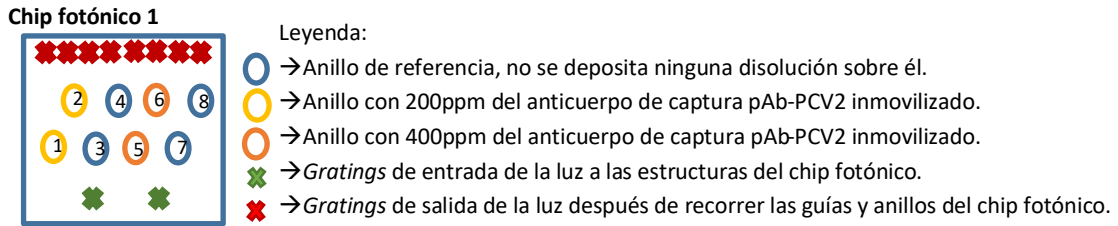


Figura 64. Esquema del chip fotónico V1 con la distribución de los RR para la detección de PCV2.

- Incubar las superficies durante 2h. a Tª amb., en condiciones de humedad controlada.
- Lavar la superficie con PBS y bloquear.

1.5. Bloqueo de la superficie

- Bloquear las superficies con 50µL de GF 1% en PBS durante 1h a Tª amb., bajo condiciones de humedad controlada.
- Incubar durante 24h a 4°C, bajo condiciones de humedad controlada.
- Lavar las superficies con PBST, DIW y secar con corriente de aire a presión.

Fase de biodetección: medida fotónica

- Fluir durante 10 min. a una velocidad constante de 30µL/min la disolución de PBST por los dos canales, hasta que la señal de la medida se estabilice (línea base).
- El flujo se mantiene constante durante todo el experimento a 30µL/min

1.6. Etapa de captura: detección del PCV2

Para cada una de las medidas, se fluye una concentración diferente de PCV2, de la más diluida (1/5000) a la más concentrada (1/100), pasando por las diluciones intermedias de 1/2000, 1/1000 y 1/500. Con un total de cinco diluciones diferentes.

- Fluir por los dos canales la dilución correspondiente del PCV2 en PBST 10min.

1.7. Etapa de lavado: sensado

- Fluir por ambos canales de nuevo la disolución tampón PBST durante 10 min. a 30µL/min.

Capítulo 4: DISCUSIÓN
GENERAL DE LOS RESULTADOS

4 CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

En el presente capítulo, se describen y comentan los resultados obtenidos durante esta tesis. En la primera parte se presentan los resultados alcanzados para la detección de **trombina** y en la segunda parte, los resultados para la detección de **alérgenos** y **patógenos**. Como sondas de captura se han utilizado aptámeros y anticuerpos.

Los ensayos desarrollados para la detección de trombina, alérgenos y patógenos se han realizado en primer lugar, sobre superficies planas de nitruro de silicio para validar la inmovilización de la sonda de captura. Posteriormente, las estrategias de activación química aplicadas sobre superficies planas se han transferido a chips fotónicos para realizar medidas utilizando el *set-up* optoelectrónico del laboratorio.

4.1 Trombina

La trombina es una de las enzimas que interviene en el proceso de coagulación de la sangre. Se forma a partir de la interacción entre protrombina, catión calcio (II) y tromboplastina tras la activación de la cascada a partir de una de sus tres vías. Esta enzima provoca la transformación del fibrinógeno a fibrina, la cual presenta un papel fundamental para el proceso de coagulación debido a la propiedad que tiene para formar agregados con otras moléculas de fibrina, dando lugar a una red tridimensional o coágulo blando evitando de esta forma el sangrado (**Figura 65**).

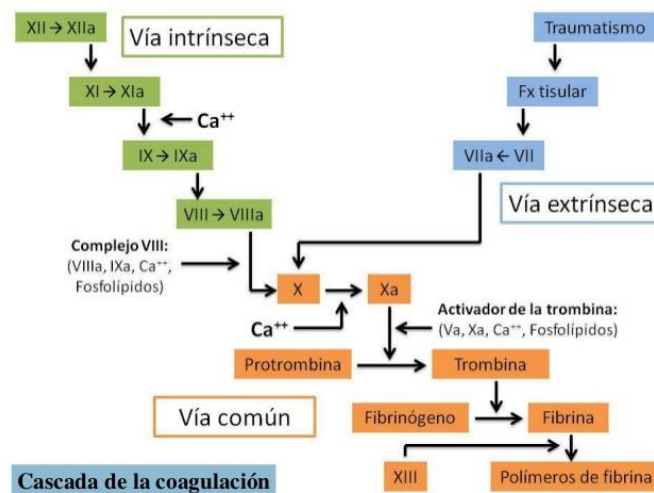


Figura 65. Esquema de las tres vías para la activación de la coagulación: generación de la fibrina.
Fuente (slideshare.net/AleRdzgarcia/coagulacion-sanguinea-40174483/4).

4.1.1 Detección de trombina sobre superficies de nitruro de silicio plano

Los experimentos para la detección de trombina realizados sobre superficies de nitruro de silicio plano han servido para optimizar las estrategias de funcionalización química y la concentración de sonda inmovilizada. Por otro lado, la detección de trombina en el seno de diferentes matrices biológicas de muestras clínicas como la sangre completa, el plasma sanguíneo o el suero, ha permitido realizar un estudio sobre el posible efecto que tienen las diferentes matrices sobre la detección del analito trombina.

4.1.1.1 Estrategias de funcionalización química

La optimización de las estrategias de funcionalización química aplicadas sobre superficies de nitruro de silicio plano ha permitido la obtención de unos resultados favorables para la detección de trombina. Los protocolos empleados, el A, B y C, se describen a continuación.

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

4.1.1.1.1 Detección de trombina: protocolo A

El protocolo A se ha utilizado como estrategia de funcionalización química de la superficie de nitruro de silicio plano para determinar la capacidad de captura de la sonda a inmovilizar. En la fase de biofuncionalización, la inmovilización del aptámero específico de la trombina (ApTHR) se ha empleado para el ensayo tipo 1, mientras que el anticuerpo monoclonal anti-trombina (mAb-THR) se ha empleado para el ensayo tipo 2 (**Figura 39**). En la fase de biodetección, la incubación de la trombina se ha realizado en una disolución tampón de PBS a un pH de 7.4 y en otra de HEPES a un pH de 8. Además de emplear dos temperaturas de incubación distintas, 4°C en refrigerador y 23°C por la Tª amb. del laboratorio. Finalmente, la estreptavidina empleada (Spt-Cy5) para el cierre del ensayo se ha incubado en PBS a pH 7.4 a las mismas temperaturas (4°C y 23°C). Bajo estas condiciones, se ha realizado un estudio para evaluar el efecto de la salinidad de la disolución tampón empleada junto al pH de cada una de ellas y de la temperatura de incubación aplicada para la detección del analito. El cuadro resumen de este experimento se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Esquema de las superficies preparadas para la detección de trombina: protocolo A.

Superficie 1	Superficie 2	Superficie 3	Superficie 4
Fase de Biofuncionalización			
1-PIRAÑA 1h	1-PIRAÑA 1h	1-PIRAÑA 1h	1-PIRAÑA 1h
2-APTES 5%/iPrOH 2h	2-APTES 5%/iPrOH 2h	2-APTES 5%/iPrOH 2h	2-APTES 5%/iPrOH 2h
3-GLUT 2.5%/PBS 2h	3-GLUT 2.5%/PBS 2h	3-GLUT 2.5%/PBS 2h	3-GLUT 2.5%/PBS 2h
4-Inmovilización 2h:	4-Inmovilización 2h:	4-Inmovilización 2h:	4-Inmovilización 2h:
(F1) ApTHR/PBS + NaBH ₃ CN	(F1) ApTHR/PBS + NaBH ₃ CN	(F1) ApTHR/PBS + NaBH ₃ CN	(F1) ApTHR/PBS + NaBH ₃ CN
(F2) pAb ^{2*} -GAM/PBS + NaBH ₃ CN	(F2) pAb ^{2*} -GAM/PBS + NaBH ₃ CN	(F2) pAb ^{2*} -GAM/PBS + NaBH ₃ CN	(F2) pAb ^{2*} -GAM/PBS + NaBH ₃ CN
(F3) mAb-THR/PBS + NaBH ₃ CN	(F3) mAb-THR/PBS + NaBH ₃ CN	(F3) mAb-THR/PBS + NaBH ₃ CN	(F3) mAb-THR/PBS + NaBH ₃ CN
5-Block MEA 0.1M/CB 1h	5-Block MEA 0.1M/CB 1h	5-Block MEA 0.1M/CB 1h	5-Block MEA 0.1M/CB 1h
Fase de Biodetección			
6-THR-biot (PBS, 4°C) 1h	6-THR-biot (PBS, 23°C) 1h	6-THR-biot (HEPES, 4°C) 1h	6-THR-biot (HEPES, 23°C) 1h
7-Stp-Cy5 (PBS, 4°C) 1h	7-Stp-Cy5 (PBS, 23°C) 1h	7-Stp-Cy5 (PBS, 4°C) 1h	7-Stp-Cy5 (PBS, 23°C) 1h
Inmunoensayo completo	Inmunoensayo completo	Inmunoensayo completo	Inmunoensayo completo

Después de la fase previa de biofuncionalización, las superficies se han escaneado con el equipo **GenePix 4100A Microarray** y se han analizado los resultados con el software **GenePix® Pro 6.0** asociado a este equipo. Las imágenes de fluorescencia obtenidas tras el escaneo de las superficies se muestran en la **Figura 66**. La señal intensa de fluorescencia de la fila 2, se corresponde al anticuerpo secundario policlonal marcado con Alexa Fluor 647 (**pAb^{2*}-GAM**). Lo que se pretende con la introducción del anticuerpo secundario marcado, es comprobar que se ha inmovilizado sobre la superficie correctamente y de forma covalente. En este caso el resultado ha sido positivo para el control de inmovilización del pAb^{2*}-GAM de la fila 2 sobre la superficie, dándonos a entender que la activación química ha funcionado debidamente para todas las capas orgánicas aplicadas.

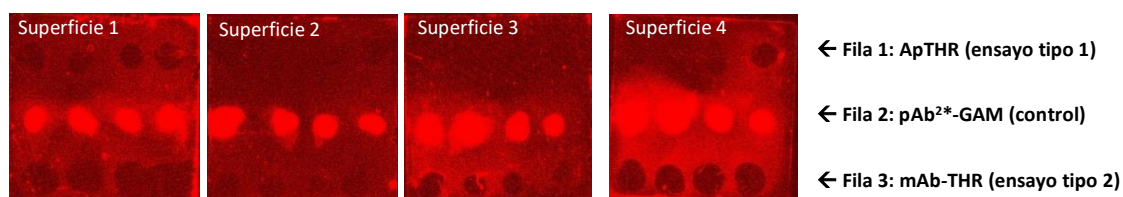


Figura 66. Imagen de las superficies planas de nitruro de silicio, escaneadas tras la fase de biofuncionalización.

Finalmente, tras la fase de biodetección, las superficies se han escaneado de nuevo con el mismo equipo y se han analizado los resultados con el software asociado al escáner. Las imágenes obtenidas tras el escaneo de las superficies se muestran en la **Figura 67**.

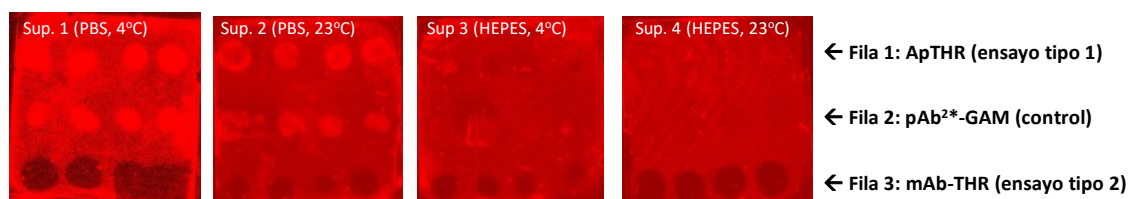


Figura 67. Imagen de las superficies planas de nitruro de silicio, escaneadas tras la fase de biodetección.

Los resultados obtenidos muestran una señal de fluorescencia muy intensa para la fila 1 de las superficies 1 y 2 (ensayo tipo 1). Esta señal, se corresponde al fluoróforo Cy5 de la estreptavidina utilizada para el cierre del ensayo. Esto nos indica que la sonda de captura ApTHR se ha inmovilizado sobre la superficie correctamente, además de ser capaz de reconocer favorablemente a la THR durante su incubación y que efectivamente el ensayo completo ha funcionado debidamente.

De los datos analizados, se pueden obtener dos parámetros fundamentales haciendo uso del software GenePix® Pro 6.0 asociado al escáner. Por un lado, la intensidad de la señal de cada punto (F) y por otro la intensidad de fondo (B). La diferencia entre la señal media de todos los puntos de la matriz menos el valor medio del fondo de la superficie nos da como resultado la señal neta del ensayo (F-B). Asimismo, del cociente entre la señal neta media ($S = F-B$) y la desviación estándar del fondo (R), se obtiene la relación señal ruido (S/R) que nos indica como de buena es la medida. Como resultado del tratamiento de los datos de fluorescencia a partir de los valores de las superficies 1 y 2, la señal neta (F-B) y la relación señal ruido (S/R) se muestran en la gráfica de la **Figura 68**.

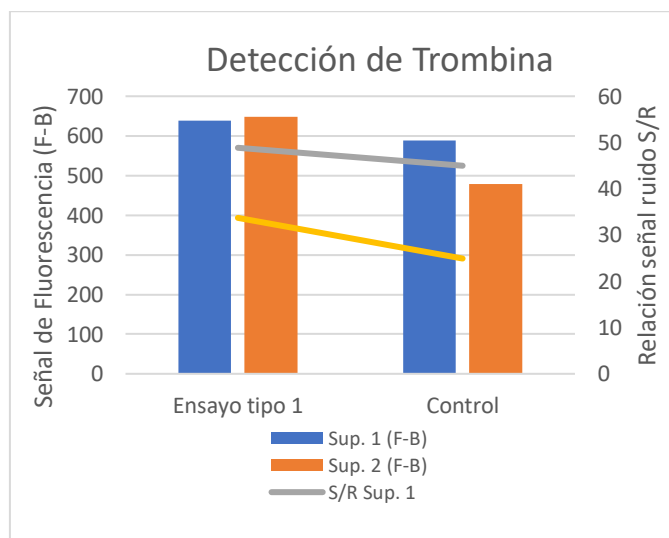


Figura 68. Gráfica del F-B y S/R de las superficies 1 y 2 del ensayo para la detección de trombina.

Los valores de F-B del ensayo tipo 1 para las superficies 1 y 2 son 639 y 648 respectivamente. Como ambos valores son muy parecidos, podemos asumir que la temperatura aplicada en las superficies 1 y 2 (4°C y 23°C) durante la incubación del analito no afecta al reconocimiento de la THR durante el inmunoensayo.

El tampón fosfato salino (PBS) utilizado, se corresponde a una solución salina que es empleada en la mayoría de los inmunoensayos para la investigación bioquímica. Las propiedades de salinidad referentes a las concentraciones de iones cloruro (Cl^-), sodio (Na^+) y potasio (K^+) son muy semejantes a las del líquido extracelular de los mamíferos.

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

Además, los grupos fosfatos (PO_4^{3-}) en disolución se encargan de mantener un pH estable a 7.4, ideal para los inmunoensayos realizados. Sin embargo, para las superficies 3 y 4 donde la incubación de la THR se ha realizado en una disolución de HEPES a pH 8, el ensayo no ha funcionado correctamente a ninguna de las dos temperaturas aplicadas (4°C y 23°C). La discrepancia entre ambos resultados se debe a la diferencia de salinidad entre el PBS y el HEPES.

Por último, para el ensayo tipo 2 correspondiente a la inmovilización del mAb-THR de la fila 3, los resultados no han sido los esperados. La señal de fluorescencia ha sido nula para todas las superficies.

4.1.1.1.2 Detección de trombina: protocolo B

El protocolo B se ha utilizado como estrategia de funcionalización química para validar la capacidad de captura del anticuerpo policlonal anti-trombina (pAb-THR) como sonda inmovilizada para la detección de trombina (THR). En la fase de biofuncionalización, para el ensayo tipo 3, se ha utilizado de nuevo el aptámero específico de la trombina (ApTHR), mientras que para el ensayo tipo 4, se ha empleado el anticuerpo policlonal anti-trombina (pAb-THR), siendo ambas sondas específicas para la detección de la THR como se muestra en la **Figura 41**.

Asimismo, se han realizado controles en la fase de biofuncionalización. Estos controles consisten en eliminar uno o dos pasos durante la activación química, para poder estudiar la importancia que tiene la presencia de las mismas. Sobre la superficie 2 no se ha silanizado con APTES, en la superficie 3 el GLUT no se ha depositado, mientras que en la superficie 4, las capas de APTES y GLUT no han sido depositadas. Esta última superficie, la 4, se corresponde con una superficie de nitruro de silicio sin funcionalizar, es decir, ausencia de capas orgánicas y por tanto apta para el control de inmovilización por adsorción física de la sonda de captura. En cada uno de estos controles, se quiere verificar que al realizar la fase de biodetección, el analito no podrá ser detectado, dando un resultado negativo para la señal de fluorescencia.

En la fase de biodetección, el reconocimiento de la trombina se ha producido en una disolución tampón de PBS a T^a amb durante su incubación. Seguidamente, se ha empleado el mAb-THR como anticuerpo de detección y por último el pAb^{2*}-GAM marcado con Alexa Fluor 647 como cierre del inmunoensayo. El cuadro resumen completo del experimento y de los respectivos controles se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Esquema de los chips empleados para la detección de trombina: protocolo B.

Superficie 1	Superficie 2	Superficie 3	Superficie 4
Fase de Biofuncionalización: controles			
1-PIRAÑA 1h	1-PIRAÑA 1h	1-PIRAÑA 1h	1-PIRAÑA 1h
2-APTES 5%/iPrOH 2h	2- -----	2-APTES 5%/iPrOH 2h	2- -----
3-GLUT 2.5%/PBS 2h	3-GLUT 2.5%/PBS 2h	3- -----	3- -----
4-Inmovilización 2h	4-Inmovilización 2h	4-Inmovilización 2h	4-Inmovilización 2h
(F1) ApTHR/PBS + NaBH_3CN	(F1) ApTHR/PBS + NaBH_3CN	(F1) ApTHR/PBS + NaBH_3CN	(F1) ApTHR/PBS + NaBH_3CN
(F2) pAb ^{2*} -GAM/PBS + NaBH_3CN	(F2) pAb ^{2*} -GAM/PBS + NaBH_3CN	(F2) pAb ^{2*} -GAM/PBS + NaBH_3CN	(F2) pAb ^{2*} -GAM/PBS + NaBH_3CN
(F3) pAb-THR/PBS + NaBH_3CN	(F3) pAb-THR/PBS + NaBH_3CN	(F3) pAb-THR/PBS + NaBH_3CN	(F3) pAb-THR/PBS + NaBH_3CN
5-Block MEA 0.1M/CB 1h	5-Block MEA 0.1M/CB 1h	5-Block MEA 0.1M/CB 1h	5-Block MEA 0.1M/CB 1h
Fase de Biodetección			
6-THR/PBS 1h	6-THR/PBS 1h	6-THR/PBS 1h	6-THR/PBS 1h
7-mAb-THR/PBS 1h	7-mAb-THR/PBS 1h	7-mAb-THR/PBS 1h	7-mAb-THR/PBS 1h
8-pAb ^{2*} -GAM/PBS 1h	8-pAb ^{2*} -GAM/PBS 1h	8-pAb ^{2*} -GAM/PBS 1h	8-pAb ^{2*} -GAM/PBS 1h
Inmunoensayo completo	Control sin APTES	Control sin GLUT	Control sin APTES ni GLUT

Tras la fase de biodetección, se ha podido comprobar la validez de la sonda de captura ApTHR para el reconocimiento del analito THR correspondiente a la fila 1 de la superficie 1 (ensayo completo) donde la señal de fluorescencia es positiva como se muestra en la **Figura 69**.

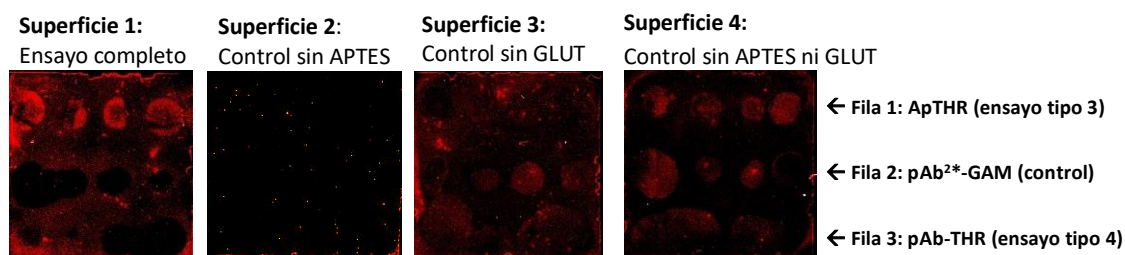


Figura 69. Imagen de las superficies planas de nitruro de silicio, escaneadas tras la fase de biodetección.

En el caso de la superficie 1, el ApTHR se ha inmovilizado de forma covalente mientras que en las superficies 2 y 3 la sonda no se ha inmovilizado ya que estas superficies se corresponden con el control de la superficie 1 y no deberían dar ninguna señal para la fila 1 del ensayo tipo 3. Una vía alternativa de inmovilización de la sonda se ha producido en el caso de la superficie 4, donde el ApTHR se ha pegado de forma inespecífica sobre la superficie. Esto se debe a la ausencia de las capas orgánicas, de APTES y GLUT. Por otra parte, para la fila 3 (ensayo tipo 4) correspondiente a la inmovilización del pAb-THR, no se ha obtenido una señal de fluorescencia al igual que para el ensayo tipo 2 del protocolo A. Con el protocolo químico aplicado, podemos asumir que la inmovilización de la sonda tan solo se favorece en el caso del aptámero, pero no en el caso de los anticuerpos mAb-THR (ensayo 2) pAb-THR (ensayo 4) porque no es posible inmovilizarlos correctamente sobre la superficie. Se está trabajando en implementar los protocolos de funcionalización química, ya aplicados en la inmovilización de los anticuerpos específicos de alérgenos y patógenos, para la correcta inmovilización de los anticuerpos de THR. Sin embargo, el control de la fila 2 del pAb^{2*}-GAM para las superficies 3 y 4, si que ha dado una señal, al igual que para las superficies 1 y 2 del protocolo A. El análisis de los resultados obtenidos a partir de la señal de fluorescencia (F-B), se muestran en la gráfica de la **Figura 70**.

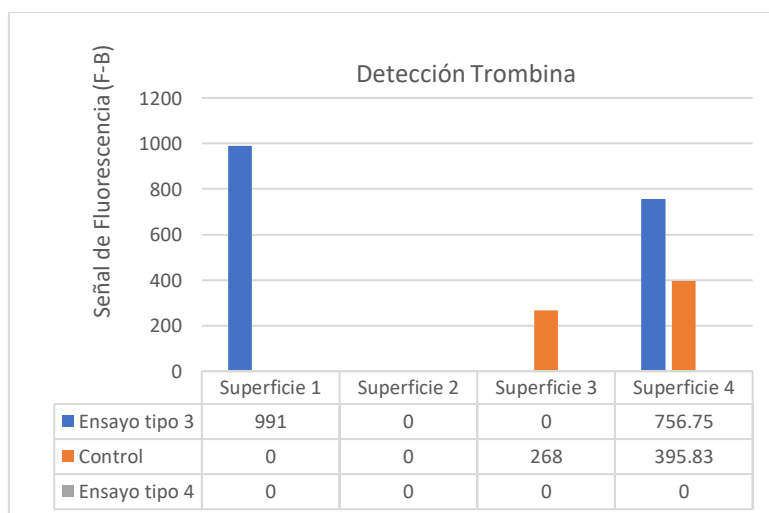


Figura 70. Gráfica de F-B de las superficies 1, 2, 3 y 4 del ensayo para la detección de trombina.

El valor de F-B obtenido para el ensayo tipo 3, correspondiente a la fila 1 donde se ha inmovilizado el ApTHR, es de 991 para la superficie 1 (enlace covalente), mientras que para la superficie 4 (adsorción física) el valor de la señal de fluorescencia es de 756,75. Por tanto, la contribución por unión covalente tiene un valor mayor que por adsorción física, reafirmando la importancia de la unión covalente para los ensayo inmunológicos empleados, ya que son enlaces mucho más fuertes y de mayor energía por lo que el biosensor preparado debe ser más estable.

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

El hecho de implementar un formato de inmunoensayo diferente, utilizando como sonda de captura el pAb-THR en vez del mAb-THR, de sustituir la THR-biot por una la THR, la Spt-Cy5 por el mAb-THR y el pAb^{2*}-GAM marcado con Alexa 647, no ha permitido obtener los resultados deseados. La activación química de la superficie ha favorecido la inmovilización del aptámero ApTHR como sonda de captura en vez del anticuerpo pAb-THR. Es por ello, que se ha decidido modificar las condiciones del protocolo B, utilizando tan solo como sonda a inmovilizar el aptámero específico de la trombina (ApTHR). La optimización del protocolo B, dio lugar a la implementación del protocolo C.

4.1.1.1.3 Detección de trombina: protocolo C

Por último, el protocolo C se ha utilizado como ensayo para mejorar la capacidad de captura del aptámero anti-trombina (ApTHR), no sin antes modificar algunos de los pasos de la fase de biofuncionalización. En primer lugar, el disolvente utilizado en la silanización se ha cambiado del iPrOH a una mezcla de EtOH/DIW en la proporción 95%/5% v/v. El porcentaje de APTES se ha reducido del 5% al 1% y el cambio del agente de bloqueo de MEA 0.1M a BSA 1%.

El ensayo tipo 3 optimizado del protocolo C, consta del ApTHR como sonda de captura para el reconocimiento de la THR seguido del mAb-THR como anticuerpo de detección y por último el pAb^{2*}-GAM como se muestra en la **Figura 43**. Asimismo, se han realizado una serie de controles en la fase de biodetección, que consisten en excluir uno o dos pasos del inmunoensayo, como el del analito THR o el del anticuerpo de detección mAb-THR. Por ejemplo, sobre la superficie 2 el analito THR no se ha añadido, en la superficie 3 el mAb-THR no se ha depositado, mientras que en la superficie 4, ni el THR ni el mAb-THR han sido depositados.

Con estos controles, se quiere realizar un estudio en la fase de biodetección para verificar que no hay pegado inespecífico con la ausencia de alguno de los reactivos y sobre todo la validez de la sonda de captura empleada. El cuadro resumen del inmunoensayo completo y de los respectivos controles de la fase de biodetección se muestra a continuación en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Esquema de las superficies empleados para la detección de trombina: protocolo C.

Superficie 1	Superficie 2	Superficie 3	Superficie 4
Fase de Biofuncionalización			
1-PIRAÑA 1h	1-PIRAÑA 1h	1-PIRAÑA 1h	1-PIRAÑA 1h
2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h	2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h	2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h	2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h
3-GLUT 2.5%/PBS 2h	3-GLUT 2.5%/PBS 2h	3-GLUT 2.5%/PBS 2h	3-GLUT 2.5%/PBS 2h
4-Inmovilización	4-Inmovilización	4-Inmovilización	4-Inmovilización
(F1, F2, F3 y F4) ApTHR/PBS + NaBH ₃ CN	(F1, F2, F3 y F4) ApTHR/PBS + NaBH ₃ CN	(F1, F2, F3 y F4) ApTHR/PBS + NaBH ₃ CN	(F1, F2, F3 y F4) ApTHR/PBS + NaBH ₃ CN
5-Block BSA 1%/PBS 1h	5-Block BSA 1%/PBS 1h	5-Block BSA 1%/PBS 1h5	5-Block BSA 1%/PBS 1h
Fase de Biodetección: controles			
6-THR/PBS 1h	6- -----	6-THR/PBS 1h	6- -----
7-mAb-THR/PBS 1h	7-mAb-THR/PBS 1h	7- -----	7- -----
8-pAb ^{2*} -GAM/PBS 1h	8-pAb ^{2*} -GAM/PBS 1h	8-pAb ^{2*} -GAM/PBS 1h	8-pAb ^{2*} -GAM/PBS 1h
Inmunoensayo completo	Control sin THR	Control sin mAb-THR	Control sin THR ni mAb-THR

Después de la fase de biodetección, se han escaneado las superficies de Si₃N₄ plano y se ha comprobado la validez de la sonda de captura ApTHR. La señal de fluorescencia en la superficie 1 (ensayo completo), es bastante intensa, esto quiere decir, que el aptámero se ha inmovilizado correctamente sobre la superficie, ha reconocido a la THR, el mAb-THR ha detectado al analito THR y el pAb^{2*}-GAM ha reconocido al anticuerpo de detección primario, dando un resultado positivo de fluorescencia tras el escaneo de la superficie (**Figura 71**).

Sin embargo, en las superficies 2, 3 y 4 correspondientes a los controles de la fase de biodetección, la señal es totalmente nula. Esto sucede, porque el anticuerpo secundario encargado de cerrar el inmunoensayo (pAb^{2*}-GAM), no ha podido reconocer al mAb-THR en ninguno de los tres controles. En la superficie 2, porque al excluir el analito en la fase de biodetección el ensayo está incompleto. En el caso de las superficies 3 y 4, sin el mAb-THR, el pAb^{2*}-GAM no puede reconocerlo y al lavar la superficie tras la incubación, el anticuerpo secundario se elimina y por eso no hay señal. Los resultados obtenidos a partir de los controles aplicados, han determinado la ausencia de falsos positivos.

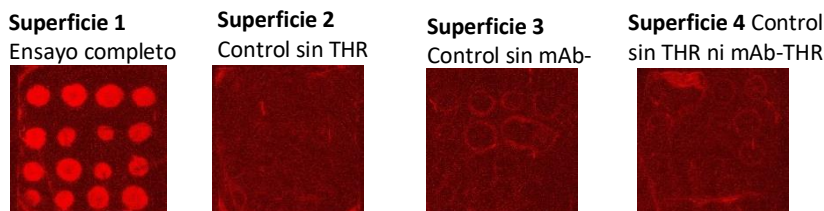


Figura 71. Imagen de las cuatro superficies del protocolo C tras la fase de biodetección.

El resultado obtenido del análisis de la señal de fluorescencia de la superficie 1, F-B, es de 476,25. Este valor es la media de la señal de fluorescencia de los 16 puntos ($F = 720,50$), menos el valor medio del fondo ($B = 244,25$). Por otra parte, el valor de S/R (113,74) se corresponde al cociente de la señal neta $S = F - B$ (476,25) entre la desviación estándar del valor medio del fondo ($R = 4.187$). El resultado nos indica que para la superficie 1, el reconocimiento de la THR se ha llevado a cabo por el aptámero específico ApTHR, dando un resultado positivo. La mejora de este protocolo C, ha permitido realizar un estudio para la optimización de la sonda de captura.

4.1.1.2 Optimización del protocolo C: variación de la concentración de sonda inmovilizada

En este apartado se pretende optimizar la concentración de la sonda de captura empleada en el protocolo C, correspondiente al aptámero de la trombina (ApTHR). El estudio realizado a diferentes concentraciones de sonda ha dado como resultado las siguientes imágenes de fluorescencia, que se muestran en la **Figura 72**.

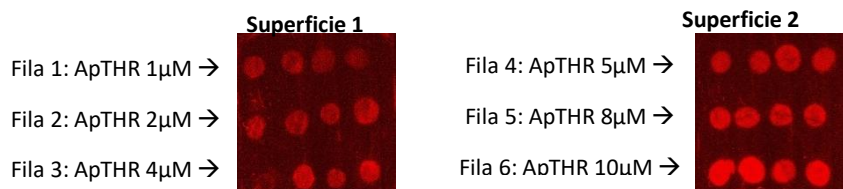


Figura 72. Señal de fluorescencia para diferentes concentraciones de sonda inmovilizada.

Las superficies 1 y 2 de nitruro de silicio plano, presentan una micromatriz de 3x4 puntos sobre ellas. Para cada una de las filas de la 1 a la 6, se tiene una concentración diferente de la sonda inmovilizada (ApTHR) correspondiente a las concentraciones de 1, 2, 4, 5, 8 y 10 μM respectivamente. El tratamiento de los datos de fluorescencia a diferentes concentraciones de sonda ha permitido la obtención de la gráfica que se muestran en la **Figura 73**, donde se representa la señal de fluorescencia frente a la concentración de la sonda inmovilizada.

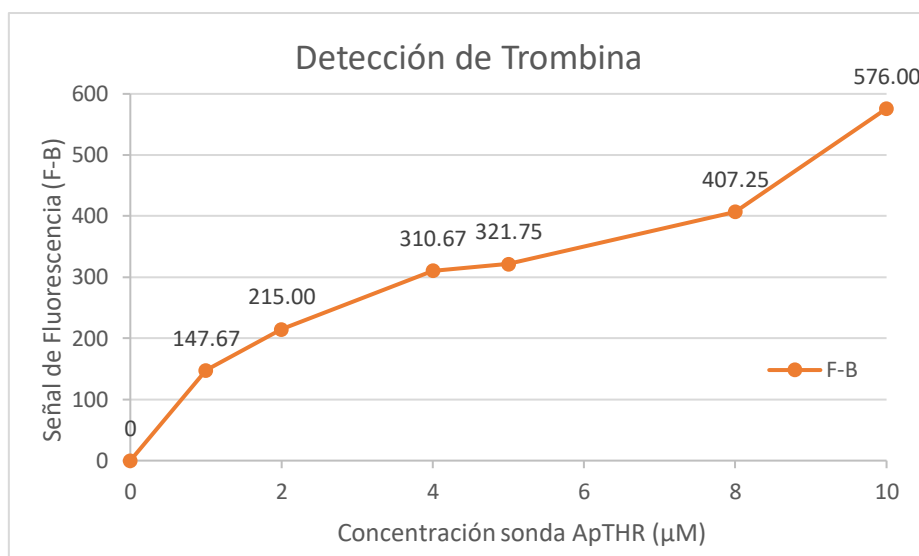


Figura 73. Representación gráfica de F-B frente diferentes concentraciones de sonda inmovilizada.

En este ensayo, se ha demostrado que, a una mayor concentración de sonda inmovilizada sobre la superficie del sensor mayor es la señal que se obtiene. Esto tiene sentido, ya que a una concentración mayor de sonda inmovilizada mayor es la capacidad de captura. Los resultados derivados de la optimización del protocolo C, han determinado que ha una concentración del ApTHR a 10μM, el sistema es capaz de detectar al analito THR a una concentración de 10ppm. No sabemos a que concentración de sonda inmovilizada el sistema satura y deja de crecer más.

4.1.1.3 Efecto matriz sobre la detección de trombina en muestras clínicas

Se ha realizado un estudio para la detección del analito trombina (THR) donde lo que se ha evaluado es el efecto que tiene la matriz en la valoración de éste en el seno de las siguientes matrices biológicas:

- Sangre completa (WB), que es la sangre humana empleada en las donaciones para realizar las transfusiones.

- Plasma sanguíneo (BP), que se obtiene por centrifugación de la WB donde se han eliminado los glóbulos rojos y blancos.

- Suero sanguíneo (BS), es el plasma de donde se han eliminado los factores de coagulación.

Para cada una de estas matrices (WB, BP y BS), se han preparado tres diluciones diferentes:

Dilución 1 → 0% Matriz / 100% PBS

Dilución 2 → 50% Matriz / 50% PBS

Dilución 3 → 100% Matriz / 0% PBS

El 0% de cada matriz corresponde al 100% de la disolución tampón PBS, el 50% es la mitad de matriz y la otra mitad PBS, mientras que en el caso del 100% la matriz no está diluida en PBS. Además, para cada una de las tres diluciones de los tres tipos de matrices, se realiza un dopado a tres concentraciones diferentes de THR: 0ppm (blanco), 5,5ppm y 11ppm. En la **Tabla 7**, se describen las nueve superficies para el experimento de la matriz de sangre completa (WB).

Tabla 7. Esquema de las superficies para la detección de THR en el seno de la matriz WB.

	Matriz Sangre Completa (WB)		
	0% WB/100% PBS	50% WB/50%PBS	100% WB/0%PBS
[THR] = 0ppm	Superficie 1	Superficie 4	Superficie 7
[THR] = 5,5ppm	Superficie 2	Superficie 5	Superficie 8
[THR] = 11ppm	Superficie 3	Superficie 6	Superficie 9

En la **Tabla 8**, se describen las nueve superficies utilizadas en el ensayo donde se ha empleado una matriz de plasma sanguíneo (BP).

Tabla 8. Esquema de las superficies para la detección de THR en el seno de la matriz BP.

	Matriz Plasma Sanguíneo (BP)		
	0% BP /100% PBS	50% BP /50%PBS	100% BP /0%PBS
[THR] = 0ppm	Superficie 10	Superficie 13	Superficie 16
[THR] = 5,5ppm	Superficie 11	Superficie 14	Superficie 17
[THR] = 11ppm	Superficie 12	Superficie 15	Superficie 18

Por último, en la **Tabla 9** se muestran las nueve superficies correspondientes al experimento donde se ha empleado una matriz de suero sanguíneo (BS).

Tabla 9. Esquema de las superficies para la detección de THR en el seno de la matriz BS.

	Matriz Suero Sanguíneo (BS)		
	0% BS/100% PBS	50% BS/50%PBS	100% BS/0%PBS
[THR] = 0ppm	Superficie 19	Superficie22	Superficie 25
[THR] = 5,5ppm	Superficie 20	Superficie 23	Superficie 26
[THR] = 11ppm	Superficie 21	Superficie 24	Superficie 27

Sobre cada una de las 27 superficies, se ha impreso una micromatriz de 4x4 puntos del aptámero ApTHR a 10µM. Después, se ha incubado la trombina en el seno de la matriz correspondiente y a un factor de dilución aplicado. Por último, se ha empleado el anticuerpo monoclonal de detección mAb-THR y el policlonal secundario pAb^{2*}-GAM para cerrar el inmunoensayo. El escaneo de cada una de las superficies se ha llevado a cabo por el equipo de fluorescencia GenePix y como resultado de esta prueba, se han obtenido las siguientes imágenes clasificadas en tres bloques diferentes según la matriz empleada.

En primer lugar, en las imágenes de la **Figura 74** se muestran los resultados de las superficies correspondientes a la matriz de sangre completa (WB).

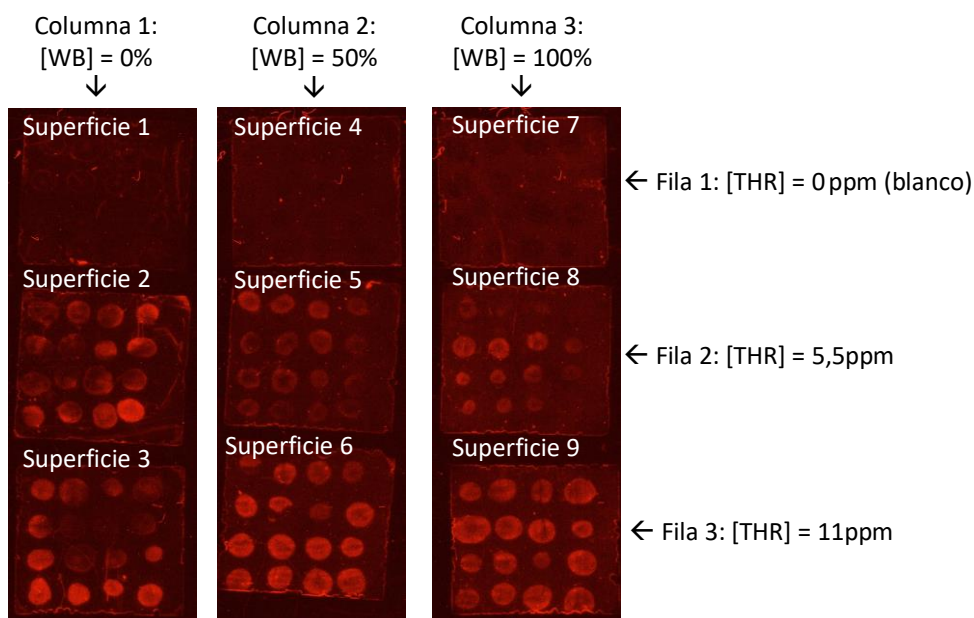


Figura 74. Señal fluorescencia para diferentes concentraciones de THR y porcentajes de matriz (WB).

En segundo lugar, las imágenes de la **Figura 75** muestran los resultados obtenidos de las superficies correspondientes a la matriz de plasma sanguíneo (BP).

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

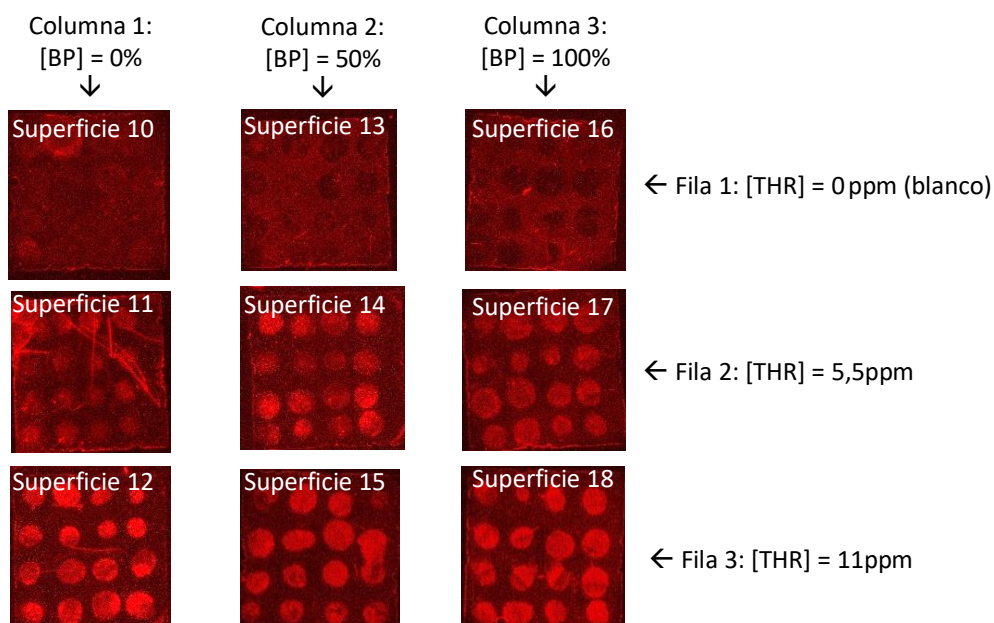


Figura 75. Señal de fluorescencia para diferentes concentraciones de THR y porcentajes de matriz (BP).

Finalmente, las imágenes de la **Figura 76**, representan los resultados conseguidos tras el escaneo de las superficies correspondientes a la matriz de suero sanguíneo (BS).

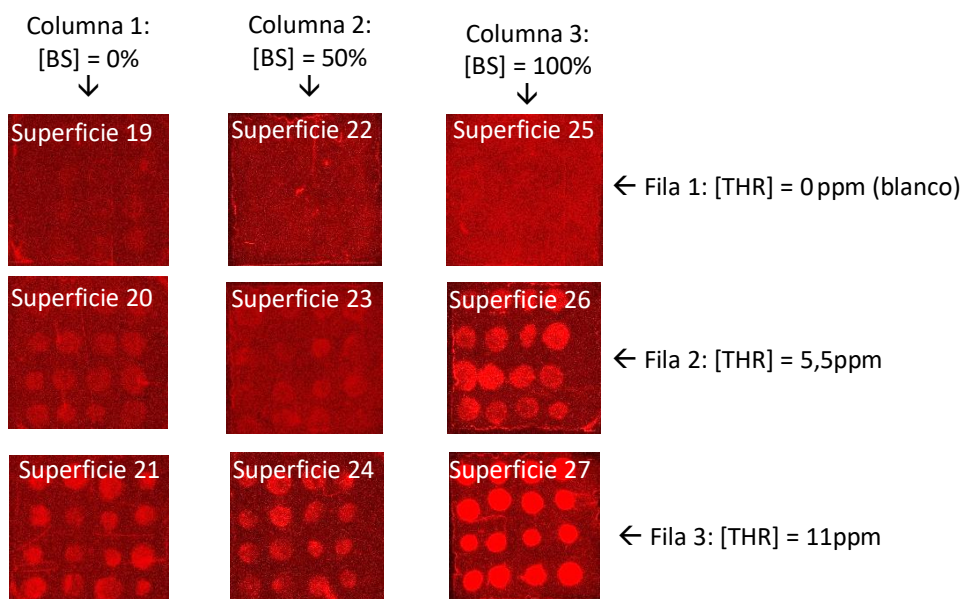
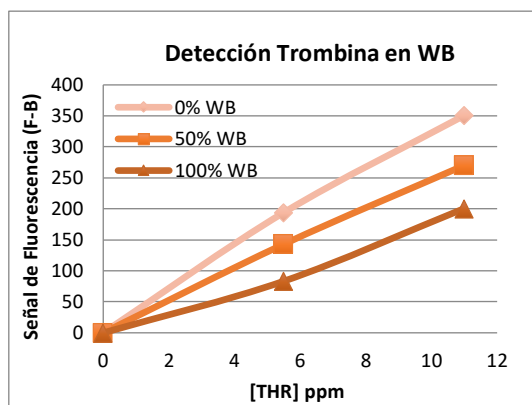


Figura 76. Señal de fluorescencia para diferentes concentraciones de THR y porcentajes de matriz (BS).

De los resultados obtenidos tras el escaneo, se puede observar que la señal de fluorescencia es más intensa al aumentar la concentración del analito trombina, para una concentración fija de $10\mu\text{M}$ de la sonda de captura inmovilizada sobre la superficie. Esta tendencia, se corresponde al incremento de la concentración del analito aplicado sobre la superficie, desde los 0 ppm (blanco) de la fila 1 donde la señal de fluorescencia es nula debido a la ausencia del analito, pasando por los 5,5 ppm de la fila 2 y hasta los 11 ppm de la fila 3, donde al duplicar la concentración de analito de 5,5 a 11, incrementa la intensidad de la señal de fluorescencia.

Tras el análisis de la señal de fluorescencia de las superficies escaneadas, se han determinado los valores de la señal neta (F-B), que se muestran en la gráfica de la **Figura 77**, donde se representan frente a las diferentes concentraciones de trombina empleada (0, 5,5 y 11 ppm) y los diferentes factores de dilución de la matriz WB (0, 50 y 100%).

Matriz Sangre Completa (WB)



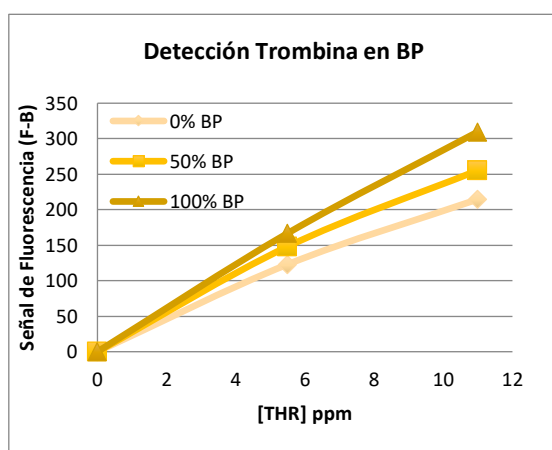
[THR] ppm	0ppm	5,5ppm	11ppm
0% WB	0,00	194,08	350,67
50% WB	0,00	143,00	270,21
100% WB	0,00	83,33	200,67

Figura 77. Representación gráfica de (F-B) frente a las diferentes concentraciones de THR aplicadas, adicionadas en una matriz de sangre completa (WB) y valores de la señal de fluorescencia (F-B).

El comportamiento que se observa es el que ya se había deducido al ver las imágenes escaneadas de la **Figura 74**. Un aumento de la señal neta (F-B) al aumentar la concentración de trombina, para las tres diluciones empleadas. Este comportamiento se debe a la capacidad de captura de la sonda inmovilizada, ya que para una mayor concentración de analito, más moléculas de trombina se capturan y por tanto más intensa es la señal obtenida en el inmunoensayo. Pero cuando se aumenta la proporción de la matriz del 0 al 100%, disminuyendo así el factor de dilución de la misma del 100% al 0% con PBS, la intensidad de la señal de fluorescencia disminuye para una misma concentración de trombina. Esto nos da a entender que de alguna forma la matriz de sangre completa en la que se encuentra el analito trombina afecta a la hora del reconocimiento entre la sonda de captura y el analito, deduciendo que existe un efecto matriz para la muestra de sangre completa.

En la **Figura 78** se representan los valores de (F-B) para las diferentes concentraciones de trombina y los diferentes factores de dilución de la matriz de plasma sanguíneo (BP).

Matriz Plasma Sanguíneo (BP)



[THR] ppm	0ppm	5,5ppm	11ppm
0% BP	0,00	123,00	214,67
50% BP	0,00	148,17	255,50
100% BP	0,00	166,87	309,71

Figura 78. Representación gráfica de (F-B) frente a las diferentes concentraciones de THR aplicadas, adicionadas en una matriz de plasma sanguíneo (BP) y valores de la señal de fluorescencia (F-B).

En este caso, cuando aumenta la concentración de trombina aumenta la intensidad de la señal de fluorescencia, al igual que para la matriz de WB. Sin embargo, el valor de la señal que se obtiene a una concentración de trombina fija de 5,5 ó 11ppm para los tres factores de dilución aplicados, aumenta al incrementar el porcentaje de la matriz. Este valor, es mucho más parecido entre ellos, a diferencia de los valores obtenidos para la matriz WB que están más distanciados.

Con este resultado se afirma que, en el seno de una matriz de BP el efecto que tiene ésta sobre el reconocimiento del analito trombina es menos acusado que para el caso anterior de la WB.

Finalmente, se realiza un experimento bajo las mismas condiciones que con la WB y el BP, pero haciendo uso esta vez de una matriz de suero sanguíneo (BS). En la **Figura 79** se representan los valores de (F-B) para las diferentes concentraciones de trombina empleada y los diferentes factores de dilución aplicados a la matriz BS.

Matriz Suero Sanguíneo (BS)

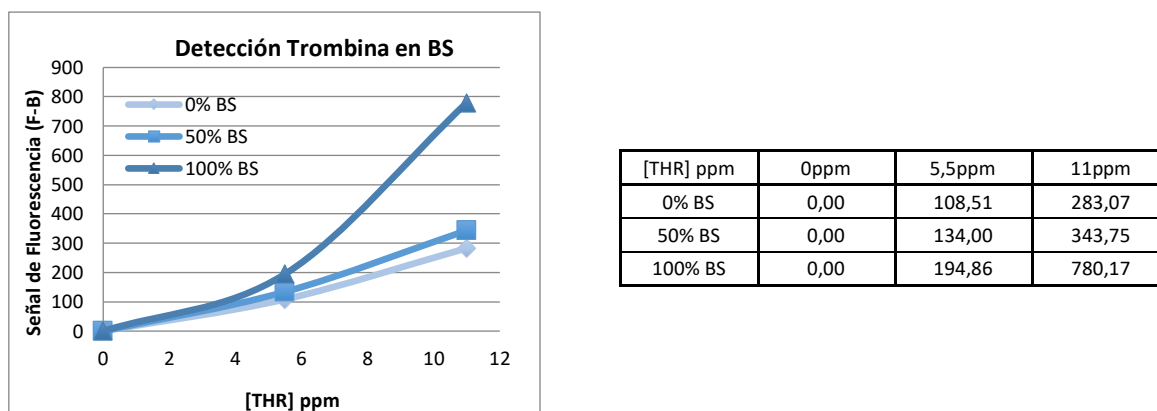


Figura 79. Representación gráfica de (F-B) frente a las diferentes concentraciones de THR aplicadas, adicionadas en una matriz de suero sanguíneo (BS) y valores de la señal de fluorescencia (F-B).

La tendencia general se repite, se produce un aumento de la señal de fluorescencia al incrementar la concentración del analito trombina al igual que para las dos matrices anteriores. Además, los valores de intensidad de la señal de fluorescencia a una concentración de trombina fija de 5.5 y 11ppm para cada uno de los tres factores de dilución aplicados, son diferentes entre sí. Este comportamiento nos indica que, efectivamente existe un efecto matriz y que se va observando cuando se realiza el calibrado al mismo tiempo que cuando se va añadiendo paulatinamente un porcentaje de la matriz sobre la disolución tampón.

Por lo general, en el caso de la matriz BP parece que se observa un menor efecto matriz para los tres puntos, en comparación con las otras dos matrices, la WB y la BS. En resumen, tras los resultados obtenidos del análisis para la determinación del analito trombina en el seno de diferentes matrices biológicas, se ha determinado que existe efecto matriz en todos los casos. Esto se corresponde a la complejidad que presenta la matriz empleada respecto al tampón PBS. Por otro lado, que para una mayor concentración del analito trombina, mayor es la señal de fluorescencia obtenida, teniendo una tendencia progresiva de la señal.

4.1.2 Detección de trombina sobre chip fotónico

Los resultados obtenidos en cuanto a la activación química e inmovilización de las sondas biológicas sobre superficies de nitruro de silicio plano se han transferido a chips fotónicos basados en estructuras de anillos resonantes (RR). La distribución de los ocho anillos del chip fotónico se agrupan en dos columnas de cuatro anillos por columna, los RR impares se encuentran en la columna de la izquierda, correspondiente al canal fluídico 1 (RR 1, 3, 5 y 7), mientras que los RR pares se disponen en la columna de la derecha donde se encuentra superpuesto el canal fluídico 2 (RR 2, 4, 6 y 8) como se muestra en la **Figura 80**.

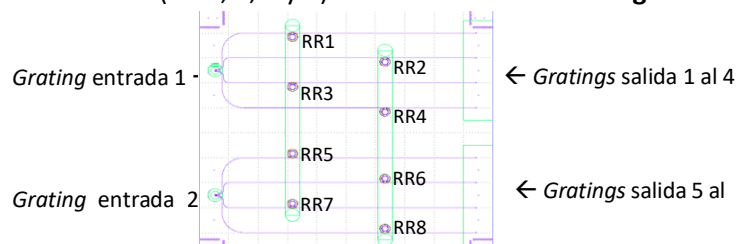


Figura 80. Distribución de los RRfunc. y los RRref. sobre el chip fotónico basado en estructuras RR.

Las medidas fotónicas descritas en este trabajo se han realizado a nivel de laboratorio (*set-up* optoelectrónico), dando lugar a los siguientes resultados para la detección de trombina. Sobre la superficie del chip fotónico se tienen dos tipos de funcionalidad para los anillos resonantes (RR). Por una parte, los RR funcionalizados (RRfunc.) sobre los que se ha inmovilizado la sonda de captura (ApTHR) de forma covalente y por otra parte los RR de referencia (RRref.) en los que no se ha depositado nada sobre ellos, quedando estos para la evaluación de la adsorción inespecífica. En la monitorización previa a la realización del ensayo de detección, se ha observado una respuesta fotónica que no era la adecuada para algunos anillos de referencia. (línea verde y fucsia), como se muestra en la figura **Figura 81**.

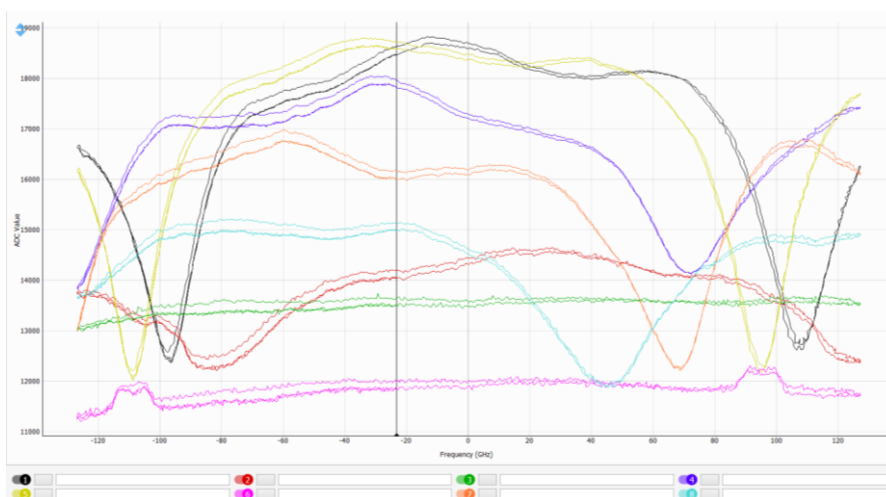


Figura 81. Representación gráfica de las frecuencias para todos los RR del chip fotónico.

Estos anillos son los RRref.3 y RRref.6, que como no resuenan, no hay señal que seguir y se ha decidido descartarlos. Por tanto, la distribución de las sondas sobre los anillos del chip fotónico que de la siguiente manera (**Figura 82**).

Chip fotónico: RRfunc. (ApTHR) y RRref. (PBS)	
Canal 1: THR	Canal 2: THR
RR1: ApTHR (10 μ M)	RR2: ApTHR (10 μ M)
RR3: Referencia	RR4: Referencia
RR5: ApTHR (10 μ M)	RR6: Referencia
RR7: Referencia	RR8: ApTHR (10 μ M)

Figura 82. Esquema de inmovilización del chip fotónico con la distribución de los RRfunc. y los RRref.

Por una parte, el sistema microfluídico del *set-up* de laboratorio que se dispone sobre la superficie del chip fotónico, se acopla de tal forma que cada uno de los canales fluídicos, coincide con un grupo de cuatro RR por donde se fluyen las disoluciones durante la medida fotónica. El flujo que transporta las diferentes disoluciones que sobre los anillos pasa se mantiene constante a 30 μ L/min. y está controlado por una bomba peristáltica.

Por otra parte, los colimadores que se encuentran en los extremos de la fibra proveniente de la fuente láser focalizan la luz del mismo, para que ésta entre de forma correcta a través de los *gratings couplers* de entrada. Este haz de luz recorre uniformemente las guías del chip, llega a los anillos donde se produce la resonancia entre la guía y el anillo hasta que la luz sale por los ocho *gratings couplers* de salida (uno por cada anillo). Los fotodetectores que se encuentran en el *set-up*, recogen la luz proveniente de los *gratings* de salida y la transforman en corriente eléctrica.

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

Los pasos a seguir para realizar la medida fotónica a nivel de laboratorio son: partiendo del chip fotónico funcionalizado con la sonda inmovilizada, se pasa a pegar la lámina fluídica que se utilizará sobre él. Después se coloca este conjunto (chip+fluídica) sobre un *holder* que permite la interconexión de los canales fluídicos de la fluídica de laboratorio con una serie de tubos que conducen la muestra líquida desde el reservorio que la contiene, pasando por la zona de sensado del chip, hasta el área donde se encuentra el reservorio de desecho. La disolución de la muestra discurre a través de estas canalizaciones mediante impulsos provocados por una bomba peristáltica. Asimismo, en la zona electrónica se encuentra la PCB, esta placa permite el control del láser y la adquisición de la señal que proviene de los fotodetectores (**Figura 83**).

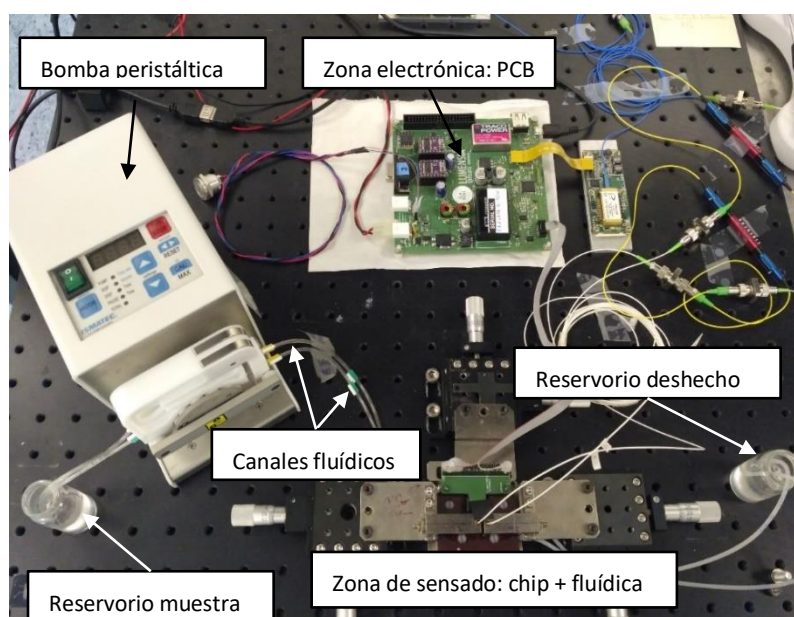


Figura 83. Imagen de los componentes que forman el set-up de laboratorio.

En la medida de la **Figura 84**, durante los 12 primeros minutos (intervalo 0-12min.), se establece la línea base del ensayo fluyendo la disolución tampón PBS hasta que la señal se estabiliza y se mantiene constante. A continuación, se fluye la muestra de THR a 1ppm en PBS durante 10 minutos más (intervalo 12-22min.), en el momento que la disolución pasa por encima de los anillos resonantes, la señal aumenta poco a poco para los RRfunc. ya que estos anillos detectan un cambio del índice de refracción (RI) que se corresponde con la unión que se está formando entre la sonda y el analito. Sin embargo, para los RRref. la señal aumenta, pero menos que la de los RRfunc. debido a la adsorción inespecífica del analito sobre la superficie del anillo. El comportamiento idóneo, sería que cuando la disolución con el analito pasa por los RRref. la señal se mantuviese constante sin producirse ningún cambio de RI. Después se vuelve a fluir el tampón PBS 13 minutos más (int. 22-35min.) para lavar las interacciones inespecíficas, tanto de los RRfunc. como de los RRref. La señal neta resultante se obtiene de la resta entre la señal media de los RRfunc. (componente específica + inespecífica) y la señal media de los RRref. (componente inespecífica), dando como resultado la componente específica de la interacción analito/sonda. Los datos obtenidos a tiempo real se representan en la gráfica de la **Figura 84**, donde se puede observar el desplazamiento de la variación de las resonancias de cada uno de los RR medido en picómetros (pm) frente al tiempo de duración del ensayo en segundos (seg.).

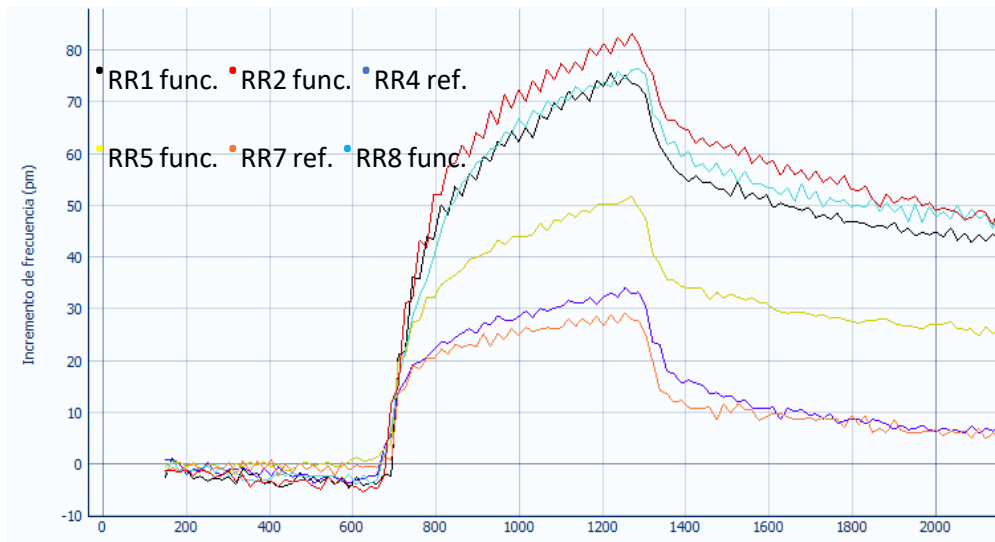


Figura 84. Representación gráfica del desplazamiento óptico en pm frente al tiempo en minutos.

Los valores de desplazamiento de la resonancia para cada uno de los anillos medidos en picómetros (pm) se recogen en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Valores del desplazamiento de la resonancia para la detección de trombina a 1ppm.

Señal	Desplazamiento de la resonancia
RR1 funcionalizado	50pm
RR2 funcionalizado	57pm
RR4 referencia	12pm
RR5 funcionalizado	32pm
RR7 referencia	12pm
RR8 funcionalizado	54pm

El tratamiento de los datos obtenidos ha permitido calcular el valor de la señal neta que se corresponde a la componente específica de la interacción analito/sonda medido en pm, como se muestra en la **Figura 85**.

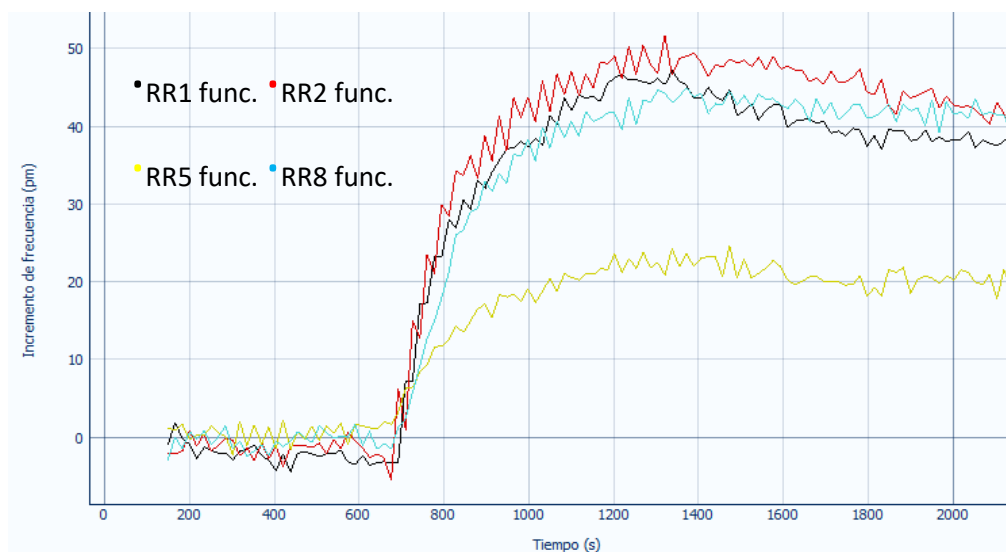


Figura 85. Representación gráfica de la señal neta en pm frente al tiempo en minutos.

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

En la **Tabla 11** se muestran los valores netos del desplazamiento de la resonancia en pm, para cada una de las parejas de RRfunc., menos los RRref. correspondientes a los de su propio canal.

Tabla 11. Valores del desplazamiento óptico neto para la detección de trombina a 1ppm

Señal	Desplazamiento de la resonancia
Canal 1: RR1-RR7	38pm
Canal 1: RR5-RR7	20pm
Canal 2: RR2-RR4	45pm
Canal 2: RR8-RR4	42pm

Los resultados para la detección de trombina (THR) sobre chip fotónico, han determinado que el sistema es capaz de detectar el analito THR a una concentración de 1ppm utilizando el aptámero de trombina (ApTHR) como sonda de captura a una concentración de 10 μ M.

Una línea de trabajo queda abierta ante la continuación de este tipo de ensayos, para la detección de trombina en muestra real. Cabe destacar, que la trombina generada durante el proceso de coagulación debe formar un complejo con la antitrombina, impidiendo reconocer el analito de forma libre. Por ello, se ha decidido hacer un estudio previo para controlar la activación del proceso de coagulación en una muestra de sangre completa.

4.1.3 Estudio de la activación del proceso de coagulación de la sangre completa

La sangre completa empleada para el estudio de la activación del proceso de coagulación puede servir para transfusiones tanto en su forma original como en sus componentes específicos: plasma, glóbulos blancos, plaquetas y glóbulos rojos (**Figura 86**).

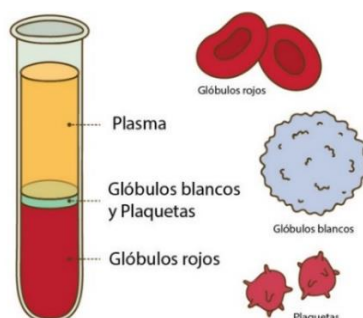


Figura 86. Esquema de la composición de una muestra de sangre completa centrifugada.

Fuente (www.referenciabancodesangre.net/componentes-la-sangre).

Las diferentes vías por las cuales se puede iniciar la cascada de coagulación son:

- la vía extrínseca, donde interviene el factor tisular
- la vía intrínseca, donde interviene la calicreína
- la vía común, en la que interviene la trombina.

De las tres vías posibles mencionadas para activar la coagulación, en este trabajo tan solo se ha investigado la extrínseca.

Sin embargo, en la literatura⁴⁵ se describe otro agente de activación del proceso de coagulación, que consiste en una mezcla de tres fosfolípidos (PV): la fosfatidilserina (PS), la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE). Esta mezcla, solamente se utiliza en el caso de trabajar con plasma pobre en plaquetas (PPP). En el caso de plasma rico en plaquetas (PRP) y sangre completa (WB), tan solo se requiere la utilización del factor tisular (TF) y el cloruro de calcio (CaCl₂), dado que la adición de fosfolípidos en estos casos presenta una baja influencia sobre la generación de trombina. Como se describe en el siguiente apartado, esta forma es la que se ha aplicado para abordar el estudio de la vía extrínseca para una muestra de WB.

4.1.3.1 Activación de sangre completa: vía extrínseca

El estudio realizado en muestras reales de sangre completa (WB) anticoaguladas con citrato trisódico, ha permitido realizar el control de la activación de la coagulación. La sal de citrato con la que se mezcla la muestra de sangre sirve como preservante para evitar que ésta coagule. Para una muestra a la que se le han añadido los activadores TF y CaCl_2 , se quiere observar para qué factor de dilución y durante cuánto tiempo es capaz de seguir fluyendo durante el experimento. Las concentraciones empleadas de los activadores son para todas las muestras 1.5pM de TF y 50mM de CaCl_2 para iniciar la activación de la muestra. Las diluciones empleadas son:

Muestra 1 sangre al 25% diluida en PBS; fluye suavemente durante 40min.

Muestra 2 sangre al 50% diluida en PBS; fluye suavemente durante 38min.

Muestra 3 sangre al 75% diluida en PBS; fluye suavemente durante 38min.

Muestra 4 sangre al 85.8% diluida en PBS; a los 11min 48 seg, el tubo se obstruye

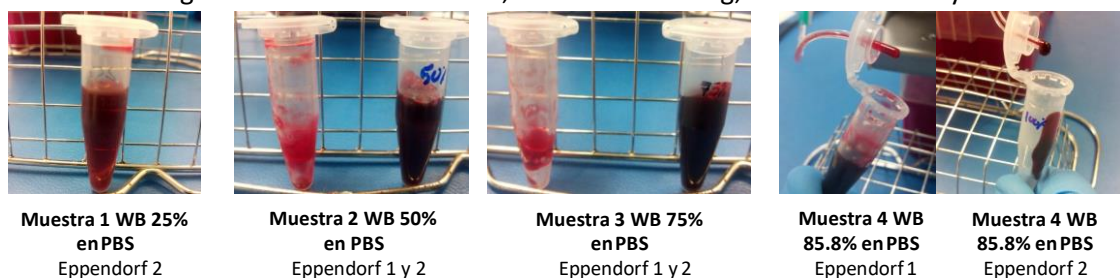


Figura 87. Imágenes de las muestras activadas de sangre completa anticoagulada a diferentes diluciones

Los resultados nos permiten fluir sin problemas hasta una muestra de WB al 75% durante cuarenta minutos. Donde la adición de los factores TF y CaCl_2 en el seno de esta muestra ha permitido contrarrestar con éxito el efecto anticoagulante consiguiendo que la muestra coagule.

Por tanto, los experimentos realizados en muestras de sangre completa han servido para ver el efecto que tiene la viscosidad y movilidad de la sangre una vez iniciado el proceso de coagulación. De esta forma, se asegura que la muestra siga fluyendo durante todo el ensayo. La finalidad de estos experimentos es conocer de antemano el tiempo que una muestra de sangre activada es capaz de fluir sin llegar a obstruir el conducto fluido para poder transferir los experimentos de detección de trombina a chips fotónicos, y así realizar medidas con el *set-up* optoelectrónico que está acoplado a un sistema microfluídico en entorno de laboratorio.

4.2 Alérgenos

Los alérgenos son compuestos que pueden llegar a inducir una reacción alérgica, intolerancias o hasta la anafilaxis en individuos hipersensibles que hayan estado en contacto directo con este tipo de sustancias. Por ello, en 2005 se aprobó el Real Decreto 2220/2004 (BOE)⁴⁶ donde se obliga a etiquetar todos los alimentos que contengan alguno de los siguientes alérgenos, 12 de ellos en 2005 y otros 2 (altramuces y moluscos) en 2006 (**Figura 88**).



Figura 88. Listado de alérgenos obligados a aparecer etiquetados según el Real Decreto 2220/2004.

Fuente (alcatraz.es/alergenos).

4.2.1 Detección de alérgenos sobre superficies de nitruro de silicio plano

En este apartado se describen los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados con aptámeros como sondas de captura para la detección de alérgenos. La selección y desarrollo de las secuencias de estos aptámeros se llevaron a cabo por la empresa Aptus Biotech, obteniendo unas secuencias de oligonucleótidos capaces de reconocer de forma específica a los analitos frente a los que fueron seleccionados. Estos ensayos son de tipo *sándwich* y se han basado en el uso de estrategias ALISA (*Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay*). Esta estrategia se ha utilizado como herramienta para la detección del Ovomucoide (OVO) y de la Gliadina (GLN).

Ovomucoide: proteína de la clara del huevo (11% del contenido de proteína) causante de reacciones alérgicas en seres humanos. Es la proteína más importante como causa de reacción alérgica debido posiblemente a su mayor resistencia al calor y a la acción enzimática digestiva.

Gliadina: proteína que forma parte del gluten en el trigo. Es la causante de las reacciones de alergia e intolerancia al gluten. Está asociada a una de las más importantes patologías alimenticias, como la enfermedad celíaca.

En ambos casos, se ha conseguido detectar con éxito las proteínas OVO y GLN en disolución tampón sobre superficies de nitruro de silicio plano.

4.2.1.1 Detección de Ovomucoide (OVO): vía aptámero

Como estrategia de funcionalización química para determinar la capacidad de captura de la sonda inmovilizada se ha utilizado en este caso el protocolo D (**Figura 50**). En la fase de biofuncionalización, se han inmovilizado los aptámeros de captura ApOVO3.9A y ApOVO3.11A, que son específicos del alérgeno OVO. Estas sondas biológicas presentan una modificación de un grupo amino (NH₂) en el extremo 5' de su estructura. En la fase de biodetección, el reconocimiento del alérgeno OVO se ha llevado a cabo por la sonda de captura inmovilizada y se ha producido durante el tiempo de incubación del analito en PBS y a T^a amb. Este aptámero, empleado como sonda de captura, ha sido estructurado previamente a la T^a de selección (95°C), a esta T^a la conformación obtenida de su estructura muestra su mayor afinidad por el analito, seguidamente se enfría el aptámero para que mantenga su conformación óptima Finalmente, se ha aplicado el aptámero de detección ApOVO3.9B para el ensayo 1 (superficies 1 y 2) y el ApOVO3.11B para el ensayo 2 (superficies 3 y 4), ambos específicos del alérgeno OVO. Estos aptámeros de cierre, están conjugados con el fluoróforo Cy5 en el extremo 5' de su estructura. El cuadro resumen de este experimento se muestra en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Esquema de las superficies preparadas para la detección de OVO: protocolo D.

Ensayo 1: cierre ApOVO3.9B		Ensayo 2: cierre ApOVO3.11B	
Superficie 1: Blanco	Superficie 2: Muestra	Superficie 3: Blanco	Superficie 4: Muestra
Fase de Biofuncionalización			
1-PIRAÑA 1h 2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h 3-GLUT 2.5%/PBS 2h 4-Inmovilización (F1) PBS + NaBH ₃ CN (Control) (F2) ApOVO3.9A 1μM / MgCl ₂ 1mM en PBS + NaBH ₃ CN (F3) ApOVO3.11A 1μM / MgCl ₂ 1mM en PBS + NaBH ₃ CN 5-Block BSA 1%/PBS 1h	1-PIRAÑA 1h 2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h 3-GLUT 2.5%/PBS 2h 4-Inmovilización (F1) PBS + NaBH ₃ CN (Control) (F2) ApOVO3.9A 1μM / MgCl ₂ 1mM en PBS + NaBH ₃ CN (F3) ApOVO3.11A 1μM / MgCl ₂ 1mM en PBS + NaBH ₃ CN 5-Block BSA 1%/PBS 1h	1-PIRAÑA 1h 2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h 3-GLUT 2.5%/PBS 2h 4-Inmovilización (F1) PBS + NaBH ₃ CN (Control) (F2) ApOVO3.9A 1μM / MgCl ₂ 1mM en PBS + NaBH ₃ CN (F3) ApOVO3.11A 1μM / MgCl ₂ 1mM en PBS + NaBH ₃ CN 5-Block BSA 1%/PBS 1h	1-PIRAÑA 1h 2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h 3-GLUT 2.5%/PBS 2h 4-Inmovilización (F1) PBS + NaBH ₃ CN (Control) (F2) ApOVO3.9A 1μM / MgCl ₂ 1mM en PBS + NaBH ₃ CN (F3) ApOVO3.11A 1μM / MgCl ₂ 1mM en PBS + NaBH ₃ CN 5-Block BSA 1%/PBS 1h
Fase de Biodetección			
6-MgCl ₂ 1mM en PBS 1h 7-ApOVO3.9B 1μM / MgCl ₂ 1mM en PBS 1h	6-OVO 10ppm/MgCl ₂ 1mM en PBS 1h 7-ApOVO3.9B 1μM / MgCl ₂ 1mM en PBS 1h	6-MgCl ₂ 1mM en PBS 1h 7-ApOVO3.11B 1μM / MgCl ₂ 1mM en PBS 1h	6-OVO 10ppm/MgCl ₂ 1mM en PBS 1h 7-ApOVO3.11B 1μM / MgCl ₂ 1mM en PBS 1h

Después de la fase de biodetección, se han escaneado las superficies de Si₃N₄ plano y se ha evaluado la efectividad de las sondas de captura ApOVO3.9A y ApOVO3.11A inmovilizadas a 1μM para el reconocimiento del analito OVO incubado a 10ppm. Las imágenes obtenidas mediante escáner de fluorescencia se muestran en la **Figura 89**.



Figura 89. Imágenes del ensayo 1 para las superficies 1 y 2 y del ensayo 2 para las superficies 3 y 4.

De los resultados obtenidos respecto a la señal de fluorescencia, se observa en primer lugar un falso positivo ante la ausencia de OVO en las superficies 1 (F2 y F3) y 3 (F3), correspondientes al blanco. Esto se debe a las interacciones inespecíficas entre las sondas inmovilizadas y el aptámero de cierre empleado. Sin embargo, para las mismas filas de las superficies 2 y 4, la señal de fluorescencia se corresponde por un parte a la contribución específica de la interacción sonda/analito y por otra parte a las posibles interacciones inespecíficas. La señal total neta será por tanto la resta de la señal de la muestra menos la señal del blanco ($S_{neta} = S_{muestra} - S_{blanco}$).

En segundo lugar, en la superficie 3 no se observa ninguna señal de fluorescencia para la F2, pero sí en la F2 de la superficie 4 donde se ha incubado la muestra. Esto nos indica que no existe ninguna contribución de señal inespecífica en el blanco, ya que la señal de fluorescencia pertenece por completo a la contribución específica de la interacción entre el aptámero y el analito OVO. Por tanto, esta intensidad de señal nos indica que el ensayo ha funcionado correctamente para la pareja 2 de aptámeros (ApOVO3.9A/ApOVO3.11B), obteniendo un resultado óptimo. Sin embargo, para las otras tres combinaciones de ApOVO existe una pequeña contribución inespecífica en el blanco.

El resultado obtenido tras el análisis de la señal de fluorescencia de los ensayos 1 y 2, se muestra en la **Figura 90** correspondiente a la señal neta para la detección de Ovomucoide.

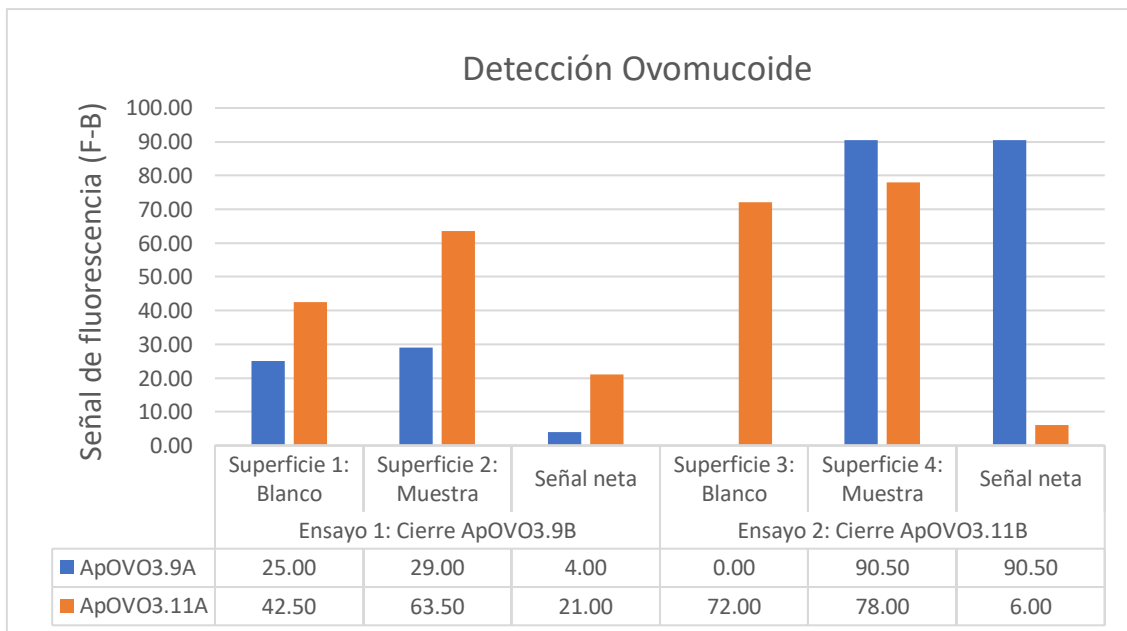


Figura 90. Representación gráfica de la señal de fluorescencia F-B de la detección del OVO sobre Si₃N₄ plano.

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

La señal neta en los dos ensayos ha dado un resultado positivo para ambas sondas de captura. En el caso del ensayo 1, la señal neta es mayor para la pareja ApOVO3.11A y ApOVO3.9B (21), mientras en el caso del ensayo 2 es mucho mayor para la pareja de aptámeros ApOVO3.9A y ApOVO3.11B (90.50). La diferencia entre los valores de ambos ensayos se corresponde a la ausencia de señal en el blanco de la superficie 3 para el ApOVO3.9A, siendo la señal neta igual a la señal de la muestra. Entonces, de los dos aptámeros de captura del alérgeno OVO empleados, el ApOVO3.9A ha demostrado ser más eficaz frente al ApOVO3.11A, dando un buen resultado para la detección del analito. En general, tras los ensayos realizados, se ha determinado a partir de los resultados obtenidos de la señal neta, que la combinación óptima de aptámeros para el reconocimiento del alérgeno OVO, es la del aptámero de captura ApOVO3.9A y del aptámero de detección ApOVO3.11B, correspondiente al cierre del ensayo 2. Con los datos obtenidos, se pretende introducir la transferencia de los resultados a un futuro ensayo sobre chip fotónico.

4.2.1.2 Detección de Gliadina (GLN): vía aptámero

El gluten representa una gran amenaza para las personas que padecen la enfermedad celíaca por su intolerancia y sensibilidad que muestran frente a este alérgeno presente en diferentes cereales como el trigo (GLN), la cebada (hordeína) y el centeno (secalina). En este apartado, se ha empleado el aptámero específico seleccionado frente la GLN como sonda de captura, pero no frente a la hordeína y secalina como en el caso del R5 empleado en los ensayos con anticuerpos como sonda de captura. Por tanto, la GLN es una gluco proteína presente en el trigo y forma parte de la estructura del gluten, junto a la glutenina (**Figura 91**).

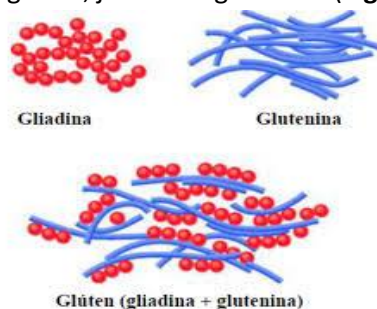


Figura 91. Componentes que constituyen la estructura del gluten de trigo: gliadina y glutenina.

Fuente (avancesenmedicina97.blogspot.com/2013/11/avance-en-el-diseno-de-un-biosensor/).

El protocolo D (**Figura 52**) se ha utilizado de nuevo como estrategia de funcionalización química para determinar la capacidad de captura de la sonda inmovilizada sobre superficies de Si₃N₄ plano para el reconocimiento del alérgeno GLN. En la fase de biofuncionalización, se han inmovilizado los aptámeros (ApGLN1F y ApGLN6F) que presentan una modificación en el extremo 5', un grupo amino (NH₂), y después se ha procedido a bloquear la superficie con una disolución de BSA al 1%. En la fase de biodetección, se ha llevado a cabo el reconocimiento del analito GLN en PBS y a T^{amb}. Por último, se ha aplicado el aptámero de detección específico del alérgeno GLN (ApGLN9F) marcado con el fluoróforo Cy5 en su extremo 5'. El cuadro resumen de este experimento se muestra en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Esquema de las superficies preparadas para la detección de GLN: protocolo D.

Ensayo 3	
Superficie 1: Blanco	Superficie 2: Muestra
Fase de Biofuncionalización	
1-PIRAÑA 1h	1-PIRAÑA 1h
2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h	2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h
3-GLUT 2.5%/PBS 2h	3-GLUT 2.5%/PBS 2h
4-Inmovilización 2h	4-Inmovilización 2h
(F1) ApGLN1F 0.9µM en MgCl ₂ 1mM/PBS	(F1) ApGLN1F 0.9µM en MgCl ₂ 1mM/PBS
(F2) MgCl ₂ 1mM/PBS (Control)	(F2) MgCl ₂ 1mM/PBS (Control)
(F3) ApGLN6F 0.9µM en MgCl ₂ 1mM/PBS	(F3) ApGLN6F 0.9µM en MgCl ₂ 1mM/PBS
5-Block BSA 1%/PBS 1h	5-Block BSA 1%/PBS 1h
Fase de Biodetección	
6-PBS 1h (Blanco) 1h y a T ^{amb} .	6-GLN 10ppm/PBS 1h y a T ^{amb} .
7-ApGLN9F 1µM / MgCl ₂ 1mM en PBS 1h	7-ApGLN9F 1µM / MgCl ₂ 1mM en PBS 1h

Para la disolución de la GLN (Sigma-Merck (G3375)), ha sido necesario preparar una mezcla de etanol al 60% en agua desionizada (EtOH 60%/DIW) como medio para poder disolverla. Tras finalizar la fase de biodetección, se han escaneado las superficies de Si₃N₄ plano con el equipo de fluorescencia y se ha evaluado la efectividad de las sondas de captura ApGLN1F y ApGLN6F inmovilizadas a 0.9µM para el reconocimiento del analito GLN a 10ppm. Las imágenes obtenidas del escáner de fluorescencia se muestran en la **Figura 92**.

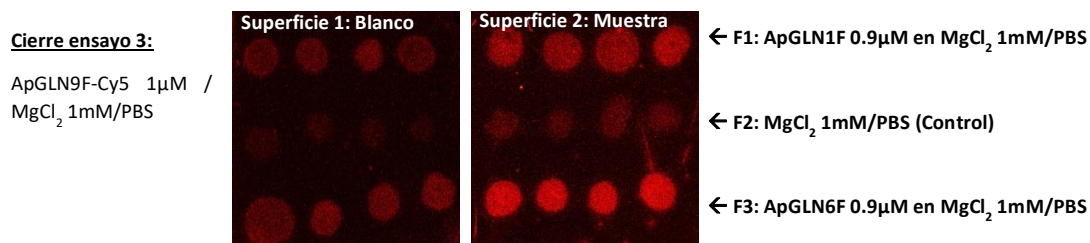


Figura 92. Imágenes del ensayo 3, para las superficies 1 (blanco) y 2 (muestra).

Las señales de fluorescencia de la superficie 2, donde se ha aplicado la muestra de GLN son más intensas que las de la superficie 1 correspondiente al blanco. Esta diferencia de intensidad se corresponde a la contribución específica por el reconocimiento de la GLN que ocurre sobre la muestra y que no sucede con el blanco. Sin embargo, se observa un falso positivo ante la ausencia de GLN en la superficie del blanco, debido a la adsorción inespecífica del aptámero de detección ApGLN9F sobre el punto donde se ha inmovilizado el aptámero de captura (ApGLN1F y ApGLN6F), dando una señal débil de fluorescencia en comparación con la muestra. Además, se observa también un falso positivo en la F2 de la superficie 2. El aptámero ApOVO3.9Cy5 se pega sobre el punto donde se ha depositado la disolución tampón de MgCl₂ 1mM/PBS.

El análisis de datos procedente de las señales de fluorescencia del ensayo 3, se ha realizado con el software acoplado al escáner GenePix. Los valores obtenidos, se muestran en la gráfica de la **Figura 93**, correspondientes a la señal neta de la detección de GLN.

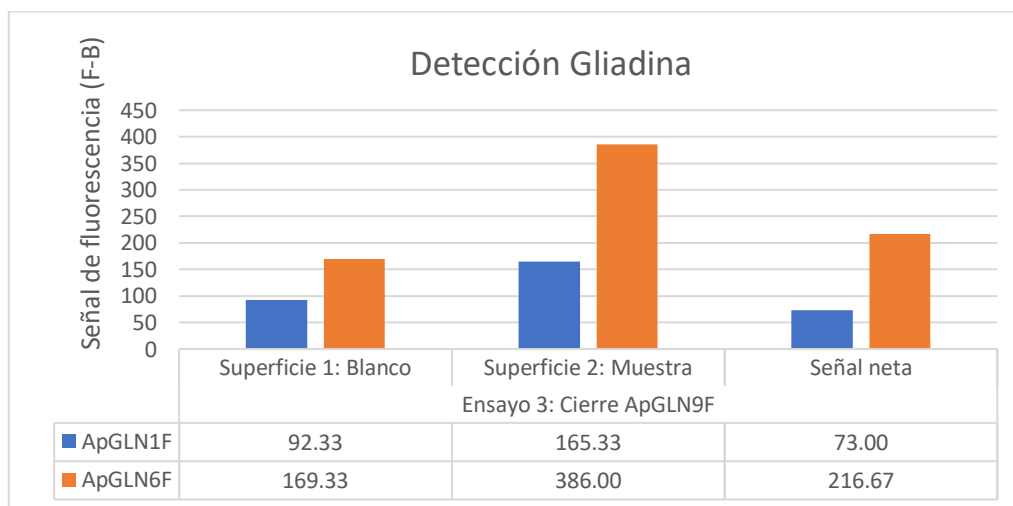


Figura 93. Representación gráfica de los resultados del inmunoensayo 3 sobre las superficies de Si₃N₄ plano.

De las dos combinaciones entre los aptámeros de captura (ApGLN1F y ApGLN6F) y el aptámero de detección (ApGLN9F), que han dado una señal neta positiva en ambos casos, es la combinación de la pareja ApGLN6F/ApGLN9F (216,67) la que ha alcanzado un valor tres veces mayor que el de la pareja ApGLN1F/ApGLN9F (73). Esta diferencia de señal entre ambos aptámeros, viene determinada por la secuencia y estructura 3D que adoptan para el reconocimiento del analito, siendo en este caso más favorable para la sonda ApGLN6F. Los resultados alcanzados con este modelo se quieren transferir a un sistema fotónico como trabajo futuro.

4.2.2 Control de inmovilización de los anticuerpos específicos contra alérgenos

En este apartado se describen los resultados obtenidos del control de inmovilización para los anticuerpos comerciales de INGENASA, como paso previo a las medidas fotónicas. El protocolo E (**Figura 54**) se ha utilizado como estrategia de funcionalización química, cuya estructura consiste en una fase previa de biofuncionalización y otra de verificación de la inmovilización. En la primera parte se funcionaliza la superficie de Si₃N₄ plano y después se inmovilizan los anticuerpos. Estos anticuerpos son monoclonales y se han desarrollado en ratón (mAb-GLN, mAb-OVA, mAb-CAS y mAb-BLG) siendo específicos de los alérgenos GLN, OVA, CAS y BLG respectivamente. Además, se ha inmovilizado un anticuerpo policlonal de trombina desarrollado en oveja (pAb-THR) como control inespecífico para todas las superficies. En la verificación del control de inmovilización para los diferentes anticuerpos, se ha empleado el anticuerpo secundario policlonal anti-ratón desarrollado en cabra conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 647 (pAb^{2*}-GAM). El cuadro resumen de este experimento se muestra en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Esquema de las superficies preparadas para el control de inmovilización de los mAb.

Superficie 1: mAb-GLN sin EDC/NHS	Superficie 2: mAb-GLN EDC/NHS	Superficie 3: mAb-OVA sin EDC/NHS	Superficie 4: mAb-OVA EDC/NHS	Superficie 5: mAb-CAS sin EDC/NHS	Superficie 6: mAb-CAS EDC/NHS	Superficie 7: mAb-BLG sin EDC/NHS	Superficie 8: mAb-BLG EDC/NHS
Fase de Biofuncionalización							
1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block BSA 1% / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-EDC/NHS MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block BSA 1% / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block BSA 1% / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-EDC/NHS MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block BSA 1% / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block BSA 1% / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-EDC/NHS MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block BSA 1% / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-EDC/NHS MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block BSA 1% / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-EDC/NHS MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block BSA 1% / PBS 1h
Control de Inmovilización							
7-pAb ^{2*} - GAM 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} - GAM 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} - GAM 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} - GAM 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} - GAM 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} - GAM 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} - GAM 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} - GAM 5ppm/PBS 1h

Las superficies de Si₃N₄ plano se han escaneado tras el control de inmovilización y se ha evaluado la inmovilización de los anticuerpos monoclonales sobre la superficie de nitruro de silicio plana aplicados a 50 y 100 ppm. Las imágenes obtenidas del escáner de fluorescencia se muestran en la **Figura 94**. Las cuatro imágenes de la línea superior se corresponden a las superficies que no han sido activadas con EDC/NHS (1, 3, 5 y 7), mientras que la segunda fila pertenece a las superficies activadas (2, 4, 6 y 8).

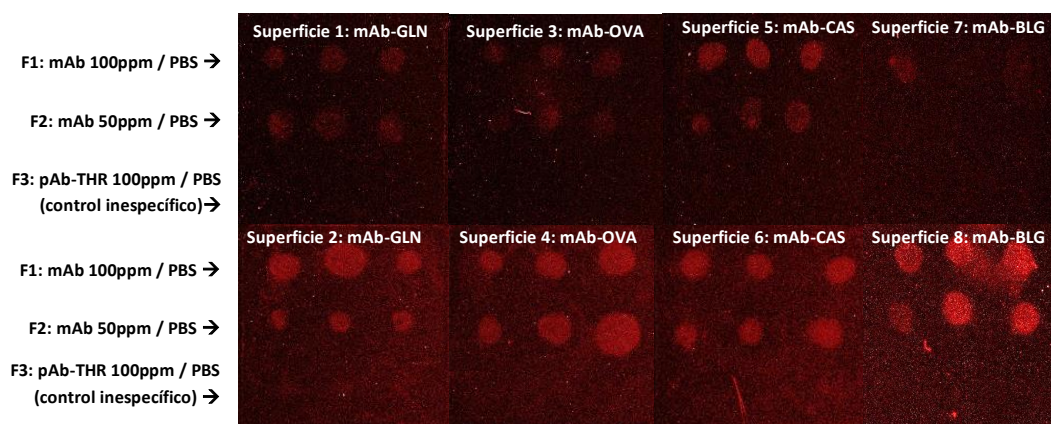


Figura 94. Imágenes del control de inmovilización para los mAb de GLN, OVA, CAS y BLG.

De los resultados obtenidos de la señal de fluorescencia, se observa en primer lugar que los anticuerpos monoclonales de las filas 1 y 2 de las ocho superficies se han inmovilizado, mientras que el control de la fila 3 correspondiente al anticuerpo pAb-THR no ha dado ningún tipo de señal. Esto sucede porque el anticuerpo empleado para la verificación del control de inmovilización es un anti-ratón (pAb^{2*}-GAM) por tanto, tan solo es capaz de reconocer a otro anticuerpo que haya sido desarrollado en ratón, como ocurre en el caso de los monoclonales inmovilizados sobre la superficie, pero no en el del policlonal que ha sido desarrollado en oveja.

En segundo lugar, la señal de fluorescencia en las superficies donde no hay EDC/NHS (1, 3, 5 Y 7) se corresponden a la señal por contribución inespecífica mientras que donde hay EDC/NHS (2, 4, 6 y 8) la señal es más fuerte porque se tiene contribución inespecífica más enlace covalente del anticuerpo sobre la superficie activada, de ahí la diferencia de intensidad entre ambos casos.

Por tanto, el uso de la pareja de reactivos EDC/NHS para activar la superficie es necesaria para favorecer la formación de enlaces covalentes entre mAb y superficie de Si₃N₄. Este enlace de tipo peptídico se forma a partir de la unión entre los grupos amino del anticuerpo a inmovilizar y los grupos ácidos de la capa orgánica depositada sobre la superficie (CTES). De esta forma, se puede evaluar la contribución de la componente covalente frente a la contribución inespecífica por adsorción pasiva del anticuerpo monoclonal en las superficies sin activar.

Efectivamente, el control de inmovilización nos sirve para validar la correcta inmovilización del anticuerpo y que más adelante se utilice como sonda de captura en los chips fotónicos para las medidas con el *set-up* de laboratorio. Entonces, la diferencia entre el resultado obtenido de la superficie activada y sin activar es que la inmovilización por unión covalente es irreversible.

El análisis de datos procedente de las señales de fluorescencia obtenidas se ha realizado con el software del equipo de fluorescencia. Los valores resultantes se corresponden a la señal neta debida a la contribución por enlace covalente del anticuerpo (Señal Cov.), que se corresponde a la diferencia entre la señal total de las superficies activadas (Señal Ads. + Cov.) y la señal por adsorción inespecífica del anticuerpo sobre las superficies sin activar (Señal Ads.). Los datos obtenidos se muestran en la gráfica de la **Figura 95**.

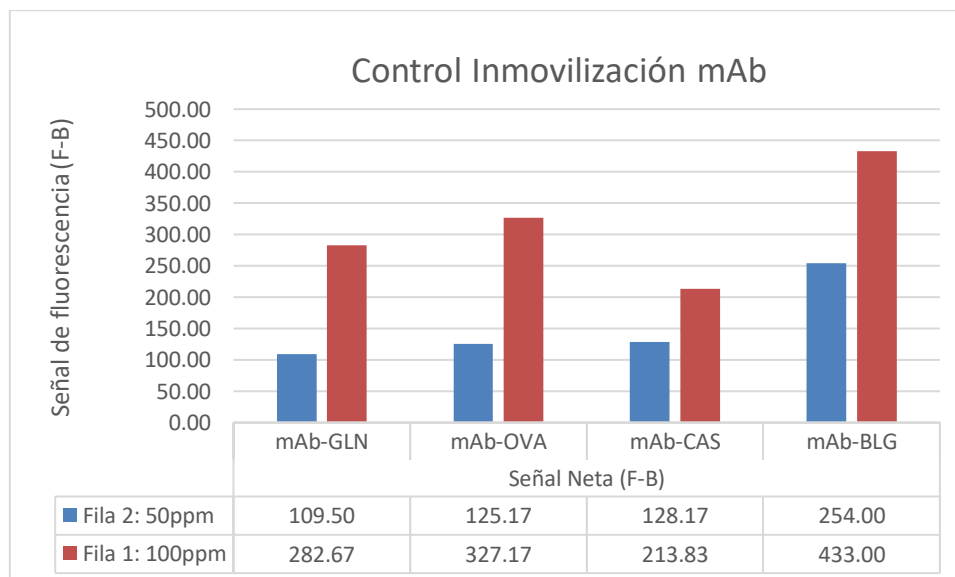


Figura 95. Representación gráfica de los resultados del control de inmovilización de los mAb.

Los valores de la señal de fluorescencia para las dos concentraciones de anticuerpo monoclonal inmovilizado (50 y 100ppm) nos indican que se ha conseguido realizar el control de inmovilización del anticuerpo monoclonal con éxito mediante unión covalente sobre las superficies activadas. Ya que el resultado de la señal neta es positivo para los cuatro anticuerpos. Además, los resultados para la concentración de 100ppm de sonda inmovilizada da una señal de

fluorescencia más intensa que la de 50ppm. Esto significa que, al inmovilizar más cantidad de anticuerpo sobre la superficie, mayor probabilidad tiene el secundario pAb^{2*}-GAM de reconocerlo y por tanto mayor es la intensidad de la señal de fluorescencia. Los porcentajes correspondiente a la contribución por enlace covalente de los anticuerpos inmovilizados se representan en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Porcentajes de contribución por enlace covalente del control de inmovilización de los mAb.

[Sonda Inmov.]	Contribución enlace covalente			
	mAb-GLN	mAb-OVA	mAb-CAS	mAb-BLG
50ppm	34%	44%	42%	90%
100ppm	56%	66%	49%	88%
Valor medio	45%	55%	45.5%	89%

La pretensión de este estudio ha sido inmovilizar covalentemente los anticuerpos sobre la superficie, el resultado obtenido ha sido óptimo para la inmovilización de los cuatro anticuerpos monoclonales con un valor medio de contribución por enlace covalente del 59% de forma global. Por tanto, a partir de los datos obtenidos podemos afirmar que las condiciones de inmovilización para estos anticuerpos son las más idóneas. De los cuatro mAb empleados inicialmente en el control, se han escogido el mAb-GLN y el mAb-CAS como sondas de captura para los experimentos sobre chips fotónicos. Esta decisión se ha tomado porque en el caso del mAb-GLN, la detección de la GLN está relacionada directamente con una de las patologías alimenticias más importantes como lo es la enfermedad celíaca y su intolerancia al gluten. Mientras que en el caso del mAb-CAS, la detección por la CAS en vez de la BLG se debe a la diferencia que hay entre ambas proteínas respecto al porcentaje total de proteína en una muestra de leche de vaca. Donde la CAS es del 84%, siendo la más abundante frente al 12% de la BLG.

4.2.3 Detección de alérgenos con anticuerpos sobre chip fotónico

Los resultados obtenidos a partir del estudio del control de inmovilización de los anticuerpos mAb-GLN y mAb-CAS sobre superficies de Si₃N₄ plano, se han transferido a chips fotónicos basados en estructuras de anillos resonantes (RR). Estos anticuerpos se han empleado en este apartado como sondas de captura para la detección de los alérgenos GLN y CAS como disolución patrón y en muestras reales. Las medidas fotónicas se han realizado a nivel de laboratorio (*set-up*), cuyos resultados se describen a continuación.

4.2.3.1 Detección de alérgenos como disolución patrón

En esta primera parte, se describen los resultados obtenidos para la detección de GLN y CAS como disolución patrón, empleando los anticuerpos monoclonales mAb-GLN y mAb-CAS como sonda de captura respectivamente. Este estudio se ha realizado con la finalidad de conseguir una recta de calibrado y obtener los valores del LOD y LOQ además del rango dinámico de trabajo para ambos analitos.

Las sondas de captura empleadas son por un lado el mAb-GLN, correspondiente al anticuerpo R5 que es capaz de reconocer específicamente una misma secuencia común en la estructura de las siguientes prolaminas: Gliadina (GLN) del trigo, Hordeína de la cebada y Secalina del centeno. Este grupo de proteínas de origen vegetal presentan un elevado contenido en prolina y forman parte del Gluten de los cereales. Por otro lado, el mAb-CAS que es específico de la proteína CAS que se encuentra en la leche y algunos derivados lácteos.

4.2.3.1.1 Detección del alérgeno Gliadina (GLN)

La detección de la GLN se ha llevado a cabo sobre chip fotónico, el diseño de este chip consta de una total de ocho anillos resonantes (RR) repartidos sobre la superficie del sensor en dos grupos de cuatro. Además, los canales 1 y 2 hacen referencia a los dos canales microfluídicos por donde fluyen las disoluciones y que discurren sobre los RR correspondientes. Esta distribución, se muestra en el chip de la **Figura 96**. La diferencia en el diseño de este chip

respecto al empleado para la detección de trombina, se debe a la evolución del diseño que ha realizado la empresa LUMENSIA para reducir tanto el tamaño del chip como y los costes de producción.

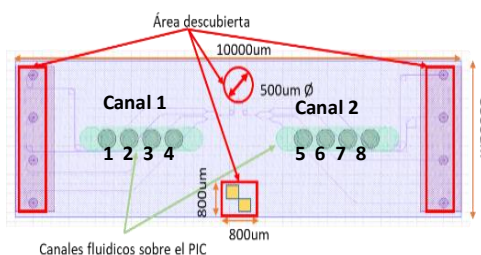


Figura 96. Esquema del chip fotónico con la distribución de los RR sobre la superficie.

En el caso del chip empleado para la detección de GLN, de los ocho RR que se encuentran en la superficie se han funcionalizado cuatro de ellos (RRfunc. 1, 2, 5 y 6) con el anticuerpo monoclonal mAb-GLN a una concentración de 200ppm y los otros cuatro se han utilizado de referencia (RRref. 3, 4, 7 y 8) como se muestra en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Distribución de los RR sobre la superficie del chip fotónico para la detección de CAS.

Chip fotónico: RRfunc. (mAb- GLN) y RRref.	
Canal 1: GLN PWG	Canal 2: GLN PWG
RR1: mAb-GLN (200ppm)	RR5: mAb-GLN (200ppm)
RR2: mAb-GLN (200ppm)	RR6: mAb-GLN (200ppm)
RR3: Referencia	RR7: Referencia
RR4: Referencia	RR8: Referencia

El analito que se ha empleado en las medidas fotónicas es el PWG, este preparado de GLN se utiliza como sustancia de referencia a 1mg/mL y viene disuelto al 60% en EtOH. El porcentaje de EtOH al que se han llevado a cabo los experimentos de detección ha sido del 7.5% debido a que el proveedor de anticuerpos recomienda este porcentaje como máximo debido a la tolerancia de su inmunoensayo. De esta forma, se consiguieron finalmente unos resultados óptimos en cuanto a la detección del analito GLN a diferentes concentraciones, permitiendo la obtención de una recta de calibrado. Los datos originados de las medidas fotónicas, se analizaron con el software de LUMENSIA dando lugar a los sensogramas de las **Figura 97**, **Figura 98** y **Figura 99**. Para el primer punto del calibrado de la GLN a 1.25ppm se obtuvo el siguiente sensograma (**Figura 97**).

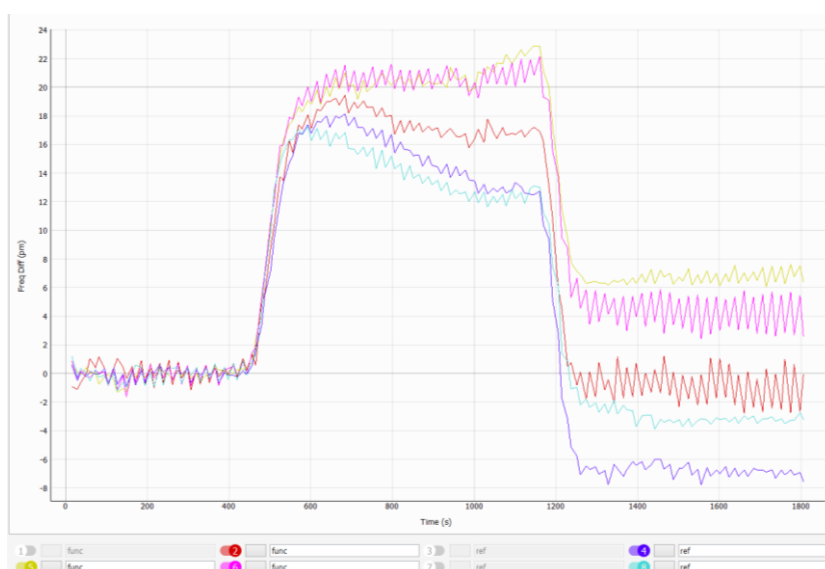


Figura 97. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para GLN 1.25ppm.

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

La línea base de la medida fotónica se establece de 0 a 470 segundos donde se ha fluido el tampón PBST al 7.5% de EtOH, de 470 a 1230 segundos se ha fluido la disolución de GLN PWG a 1.25ppm en PBST y finalmente la medida concluye con el lavado de la superficie del sensor fotónico empleando el tampón PBST de los 1230 hasta los 1800 segundos. La duración total de la medida es de 30 minutos.

Tras la realización de la medida, se analizaron los valores del desplazamiento de la longitud de onda de resonancia para cada uno de los RR en el tramo final, durante la etapa de lavado. El reconocimiento se produce en el momento que el analito comienza a interactuar con la sonda. Lo que se pretende con el lavado es eliminar del medio los analitos sin interactuar que permanecen en disolución además de eliminar en la medida de lo posible la componente de adsorción inespecífica sobre la superficie del sensor. En cuanto a la adsorción inespecífica que no se ha podido quitar con el lavado, se tienen los RRref que al restar su valor a los RRfunc., se obtiene la señal neta de la interacción analito/sonda. Esta unión es una interacción específica y lo que se forman son enlaces débiles del tipo puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas entre la sonda y el analito. Por eso, esta unión es reversible y se puede romper utilizando un medio a pH extremo empleando una disolución de NaOH o glicina.

Los datos obtenidos se corresponden al desplazamiento de la resonancia y se miden en picómetros (pm). En primer lugar, se toman los valores del desplazamiento de todos los anillos funcionalizados (RRfunc.) por canales y se calcula un promedio. En segundo lugar, se toman los valores del desplazamiento de todos los anillos de referencia (RRref.) por canales y se calcula un promedio. Finalmente, se calcula la diferencia entre ambos promedios y se toma este valor como desplazamiento efectivo debido al analito en cuestión. Estos cálculos se realizan mediante el software desarrollado por LUMENSIA, obteniendo los siguientes valores:

Canal 1: RRfunc. 2 y RRref. 4 → Valor medio neto del desplazamiento $\Delta\text{pm} = 8\text{pm}$

Canal 2: RRfunc. 5, 6 y RRref. 8 → Valor medio neto del desplazamiento $\Delta\text{pm} = 12\text{pm}$

El valor medio del desplazamiento de los dos canales es de 10pm a una [GLN] = 1.25ppm.

No todos los RR se han tenido en cuenta, porque para las resonancias de los RR con valores discordantes en la medida fotónica se han descartado. Finalmente, entre un punto del calibrado y el otro, se aplica sobre el chip fotónico una disolución de glicina 0.1M a un pH de 2.3, durante dos minutos. Con esto, se busca regenerar la superficie del biosensor mediante la utilización de una disolución a pH ácido, siendo después reacondicionada mediante PBST. La regeneración del chip se realiza en parte por practicidad y economía, ya que un chip es lo suficientemente fiable como para regenerarlo varias veces y seguir respondiendo bien. Este procedimiento tan solo ha sido aplicado para el calibrado, pero no se aplicaría en la determinación de muestras para evitar la contaminación cruzada entre muestras. Además, la reutilización del mismo para medir los diferentes puntos del calibrado evita la variabilidad entre chips. El segundo punto del calibrado de la GLN a 2.5ppm se muestra en el sensograma de la **Figura 98**.

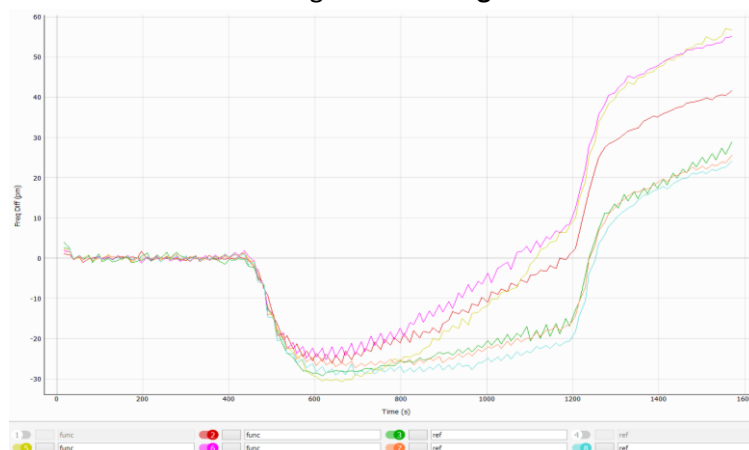


Figura 98. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para GLN 2.5ppm.

La línea base se establece esta vez de 0 a 440 segundos donde se ha fluido el tampón PBST al 7.5% de EtOH, de 440 a 1200 segundos se ha fluido la muestra de GLN a 2.5ppm en el tampón y por último se fluye de nuevo el tampón de los 1200 hasta los 1600 segundos aprox. (23min.). Después se analizan los datos de desplazamiento para cada uno de los dos canales, siguiendo el protocolo del punto anterior, obteniéndose los siguientes valores en el intervalo de 1400 a 1600 segundos:

Canal 1: RRfunc. 2 y RRref. 3 → Valor medio neto del desplazamiento 15pm

Canal 2: RRfunc. 5, 6 y RRref. 7,8 → Valor medio neto del desplazamiento 31m

El valor medio del desplazamiento de los dos canales es de 23pm a una [GLN] = 2.5ppm.

En esta segunda medida, el RRref. para el canal 1 es el RR3, mientras que en el punto anterior el RRref. es el 4. Esta diferencia asumimos que es debido a la regeneración y que para alguno de los RRref. se ha podido perder la resonancia y recuperarse para otros. Finalmente, se regenera el chip por segunda vez con la disolución de glicina 0.1M a pH 2.3. A continuación, se mide por tercera vez el chip para el correspondiente punto del calibrado de GLN a 5ppm. El sensograma obtenido se muestra en la **Figura 99**.

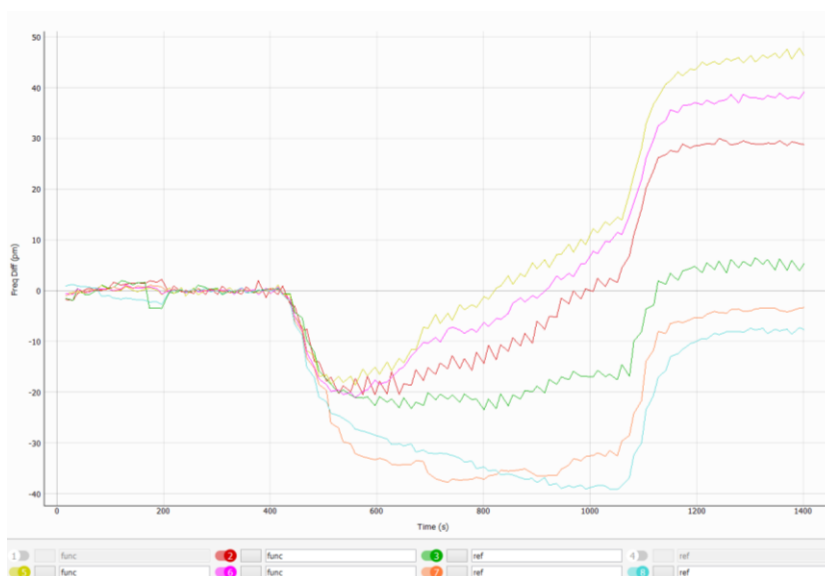


Figura 99. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para GLN 5ppm.

De 0 a 440 segundos se establece la línea base de la medida fotónica donde se ha fluido el tampón PBST con un 7.5% en EtOH. De 440 a 1200 segundos se ha fluido la disolución de GLN PWG a 5ppm en el mismo tampón y finalmente la medida concluye con el lavado de la superficie del sensor fotónico utilizando el tampón PBST, de 1200 a 1400 segundos. La duración total de la medida es de 23 minutos aproximadamente. Se analizan los datos de desplazamiento para cada uno de los dos canales, obteniendo los siguientes valores para el intervalo de tiempo de 1200 a 1400 segundos, correspondiente al lavado:

Canal 1: RRfunc. 2 y RRref. 3 → Valor medio neto del desplazamiento 27pm

Canal 2: RRfunc. 5, 6 y RRref. 7,8 → Valor medio neto del desplazamiento 53pm

El valor medio del desplazamiento de los dos canales es de 40pm a una [GLN] = 5ppm.

Los resultados derivados de la detección del alérgeno GLN como disolución patrón en chips fotónicos, han dado lugar a una serie de puntos que se han utilizado para establecer un calibrado del sistema para este analito. Cada uno de estos puntos se corresponde a un valor de desplazamiento de la resonancia de cada una de las medidas fotónicas. A partir de estos puntos se ha extraído una recta de la cual se pueden obtener los parámetros analíticos de detección y cuantificación para la GLN en este sistema (**Figura 100**).

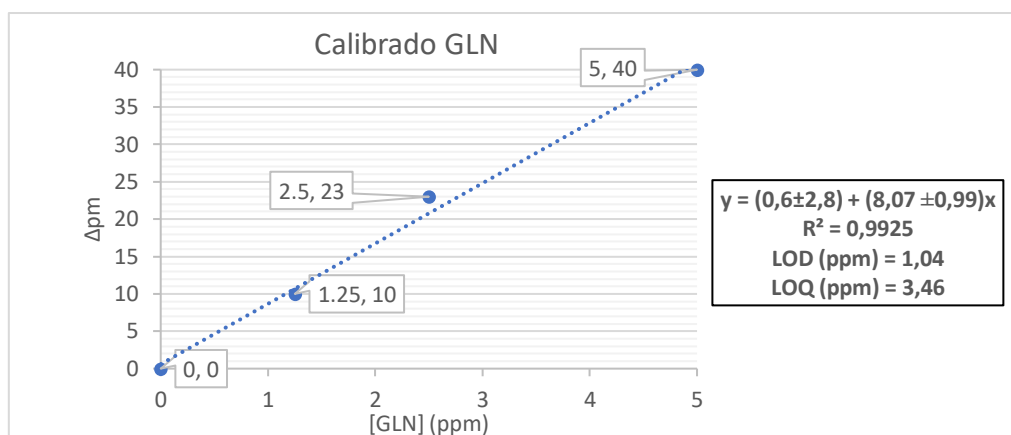


Figura 100. Representación de la recta de calibrado para la detección de GLN.

La ecuación de la recta es $\rightarrow y = (a \pm SDa) + (b \pm SDb)x = (0.6 \pm 2.8) + (8.07 \pm 0.99)x$

Y los valores del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) son:

$$\text{LOD (ppm)} = 3 \cdot SDa / b = 3 \cdot 2.8 / 8.07 = 1.04 \text{ ppm}$$

$$\text{LOQ (ppm)} = 10 \cdot SDa / b = 10 \cdot 2.8 / 8.07 = 3.46 \text{ ppm}$$

Estos parámetros analíticos, se definen como tres veces el valor medio de la desviación estándar de la ordenada en el origen (SDa) partido por la pendiente (b) para calcular el LOD y diez veces el valor medio de la SDa entre b para el LOQ. Por debajo del LOD la muestra no se puede detectar ya que el valor estaría junto al ruido de fondo. Si los valores están comprendidos entre el LOD y el LOQ, la muestra estaría dentro de los límites de los ensayos cualitativos, es decir, se puede obtener una respuesta de presencia o ausencia de analito. Si el valor se encuentra por encima del LOQ, decimos que la muestra se puede cuantificar y determinar su concentración.

4.2.3.1.2 Detección del alérgeno Caseína (CAS)

La CAS es una proteína que se encuentra mayoritariamente en la leche de vaca (84%) y es la causante de reacciones alérgicas en seres humanos. La detección de la CAS se ha llevado a cabo sobre el mismo diseño de chip fotónico (Figura 96) que el utilizado para la GLN. De los ocho anillos resonantes (RR) que se encuentran distribuidos sobre la superficie del chip fotónico, se han empleado cuatro de ellos como sondas de captura (RRfunc. 1, 2, 5 y 6) donde se ha inmovilizado el anticuerpo mAb-CAS a una concentración de 100ppm, esta concentración es diferente a la del mAb-GLN (200ppm), porque en este caso se ha optimizado para 100ppm. Asimismo, los otros cuatro de referencia (RRref. 3, 4, 7 y 8) como se representa en la Tabla 17.

Tabla 17. Distribución de los RR sobre la superficie del chip fotónico para la detección de CAS.

Chip fotónico: RRfunc. (mAb- CAS) y RRref.	
Canal 1: CAS	Canal 2: CAS
RR1: mAb-CAS (100ppm)	RR5: mAb-CAS (100ppm)
RR2: mAb-CAS (100ppm)	RR6: mAb-CAS (100ppm)
RR3: Referencia	RR7: Referencia
RR4: Referencia	RR8: Referencia

El alérgeno CAS empleado como patrón es comercial, en concreto la proteína alfa-caseína procedente de la leche bovina. Los resultados del ensayo para la detección de la CAS como disolución patrón sobre chips fotónicos se describen a continuación. Para la obtención de la recta de calibrado, se han realizado una serie de medidas fotónicas a diferentes concentraciones de analito. El primer punto del calibrado de la CAS se corresponde a una concentración de 1.25ppm, el resultado de la medida fotónica se muestra en la Figura 101.

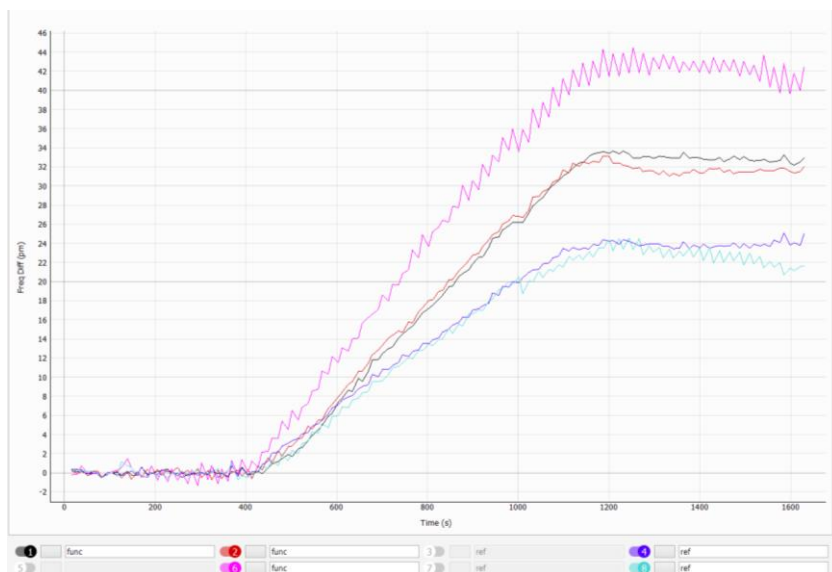


Figura 101. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para CAS 1.25ppm.

La línea base establecida va de 0 a 400 segundos donde se fluye el tampón PBST, de 400 a 1100 segundos se pasa la muestra de CAS a 1.25ppm en PBST y finalmente se vuelve a fluir el tampón inicial de los 1100 hasta los 1600 segundos (27min.). Los datos de desplazamiento se analizan para cada uno de los canales de la misma forma que para las medidas de la GLN, obteniendo los siguientes valores correspondientes al intervalo del lavado:

Canal 1: RRfunc. 1, 2 y RRref. 4 → Valor medio neto del desplazamiento 8pm

Canal 2: RRfunc. 5, 6 y RRref. 7, 8 → Valor medio neto del desplazamiento 20pm

El valor medio del desplazamiento de los dos canales es de 14pm a una [CAS] = 1.25ppm.

En este caso, la regeneración del biosensor entre medidas se realiza con una disolución de NaOH 20mM durante dos minutos. La respuesta del biosensor después de la regeneración con sosa es muy similar a su estado inicial. En cambio, utilizando glicina no es así. La respuesta del biosensor en este caso empeora, perdiéndose la respuesta de algunos de los RR. Por eso, este agente de regeneración es más útil y se consigue de nuevo una superficie funcional dispuesta para la siguiente medida. El segundo punto pertenece a una concentración de CAS de 2.5ppm y el sensograma obtenido se muestra en la **Figura 102**.

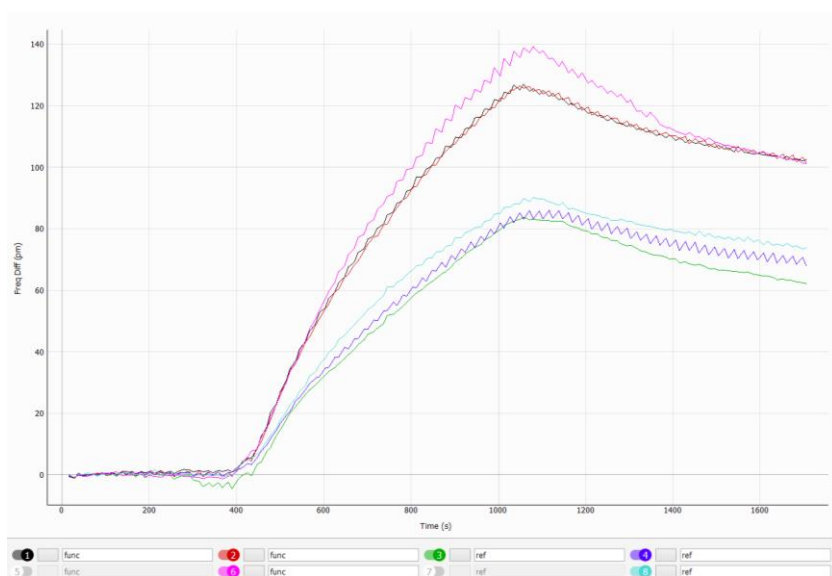


Figura 102. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para CAS 2.5ppm.

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

La línea base se establece de 0 a 400 segundos fluyendo PBST, de 400 a 1000 se pasa la disolución de CAS a 2.5ppm en PBST y por último se fluye de nuevo el tampón PBST para lavar de los 1000 hasta los 1700 segundos (28min.). Los datos se analizan para cada uno de los canales, obteniendo los siguientes valores para el intervalo de tiempo correspondiente al lavado:

Canal 1: RRfunc. 1, 2 y RRref. 3, 4 → Valor medio neto del desplazamiento 35pm

Canal 2: RRfunc. 6 y RRref. 8 → Valor medio neto del desplazamiento 31pm

El valor medio del desplazamiento de los dos canales es de 33pm a una [CAS] = 2.5ppm.

El chip se regenera por segunda vez con una disolución de NaOH 20mM durante 2 minutos, dejando de nuevo funcionales los anticuerpos de captura para la siguiente medida. El tercer y último punto se corresponde a una concentración de CAS de 5ppm, donde la gráfica de la medida se muestra en la **Figura 103**.

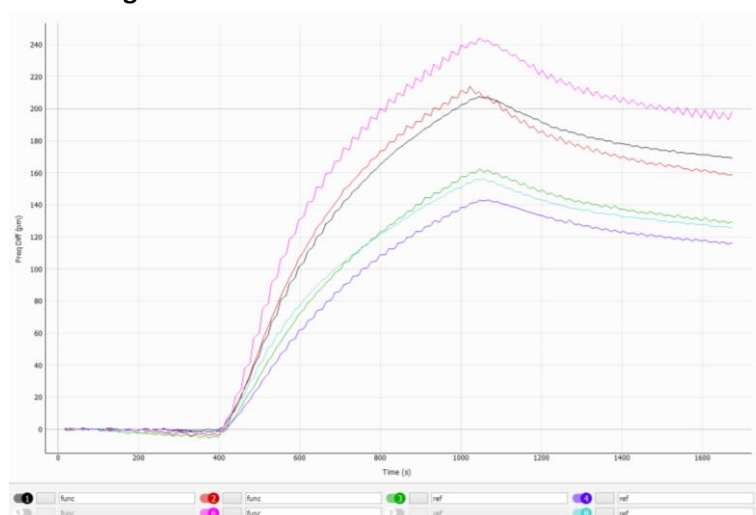


Figura 103. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para CAS 5ppm.

Línea base de 0 a 400 segundos con PBST, de 400 a 1000 se fluye CAS a 5ppm en PBST y para acabar se vuelve a fluir PBST de los 1000 hasta los 1700 segundos (28min.). Después se analizan los datos de desplazamiento para cada uno de los dos canales, obteniendo los valores correspondientes al intervalo de lavado de los 1200 a los 1600 segundos:

Canal 1: RRfunc. 1, 2 y RRref. 3, 4 → Valor medio neto del desplazamiento 46pm

Canal 2: RRfunc. 6 y RRref. 8 → Valor medio neto del desplazamiento 70pm

El valor medio del desplazamiento de los dos canales es de 58pm a una [CAS] = 5ppm.

Los puntos obtenidos se han empleado para realizar una recta de calibrado. Estos valores de desplazamiento se corresponden a cada una de las medidas fotónicas realizadas a diferentes concentraciones del analito, obteniendo un calibrado para el alérgeno CAS (**Figura 104**).

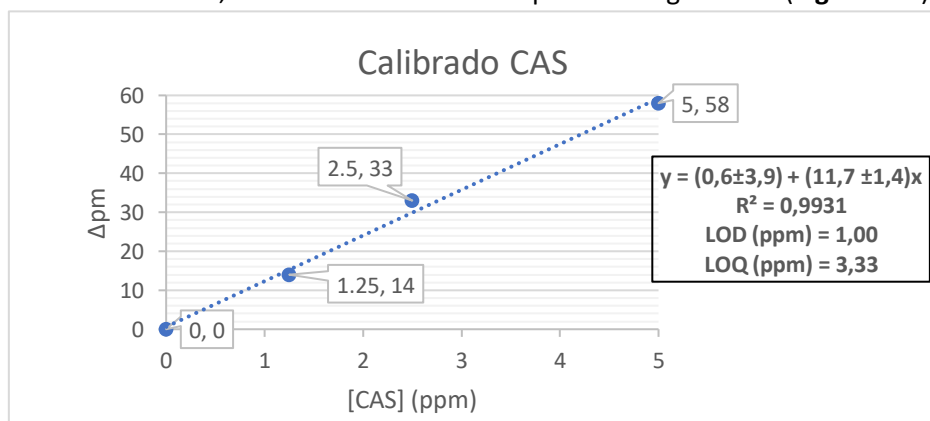


Figura 104. Representación de la recta de calibrado para la detección de CAS.

La ecuación de la recta es $\rightarrow y = (a \pm SDa) + (b \pm SDb)x = (0.6 \pm 3.9) + (11.7 \pm 1.4)x$

Y los valores del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) son:

$$\text{LOD (ppm)} = 3 \cdot SDa / b = 3 \cdot 3.9 / 11.7 = 1.00$$

$$\text{LOQ (ppm)} = 10 \cdot SDa / b = 10 \cdot 3.9 / 11.7 = 3.33$$

Las medidas fotónicas realizadas han permitido realizar un estudio sobre la detección específica de los alérgenos GLN y CAS como disolución patrón sobre la superficie del sensor de los chips fotónicos. Estas medidas han servido para la realización de un calibrado, que nos permitirá cuantificar la detección de estos alérgenos en muestras reales.

4.2.3.2 Detección del alérgeno GLN en muestra real: extracto cárnico

En esta segunda parte, se ha realizado la detección del alérgeno GLN a partir de una muestra real sobre chip fotónico. La recta de calibrado obtenida para GLN (**Figura 100**) nos ha permitido conocer la concentración del analito GLN, procedente del gluten de trigo del extracto cárnico. En este experimento, se ha empleado el anticuerpo monoclonal mAb-GLN a una concentración de 200ppm como sonda de captura, la cual se ha funcionalizado sobre la superficie del sensor en los RRfunc. 1, 2, 5 y 6, dejando los otros cuatro anillos de referencia (RRref. 3, 4, 7 y 8) como se muestra en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Distribución de los RR sobre la superficie del chip fotónico para la detección de GLN.

Chip fotónico: RRfunc. (mAb- GLN) y RRref.	
Canal 1: extracto GLN	Canal 2: extracto GLN
RR1: mAb-GLN (200ppm)	RR5: mAb-GLN (200ppm)
RR2: mAb-GLN (200ppm)	RR6: mAb-GLN (200ppm)
RR3: Referencia	RR7: Referencia
RR4: Referencia	RR8: Referencia

El tratamiento de la muestra como paso previo a la detección, se ha realizado mediante una extracción sólido /líquido. Esta muestra de procedencia cárnica está dopada con gluten de trigo a 30ppm y para su extracción ha sido necesario preparar una mezcla de EtOH al 60% en agua desionizada como medio para poder extraer el gluten, el cual contine GLN. A continuación, el extracto cárnico se pasa por los filtros de jeringa de 1 mL. Después, se diluye con PBST hasta una concentración de EtOH al 7.5% para poder realizar las medidas fotónicas. Una vez finalizada la fase de extracción y dilución, se realizaron las medidas para la detección de la GLN. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica de la **Figura 105**.

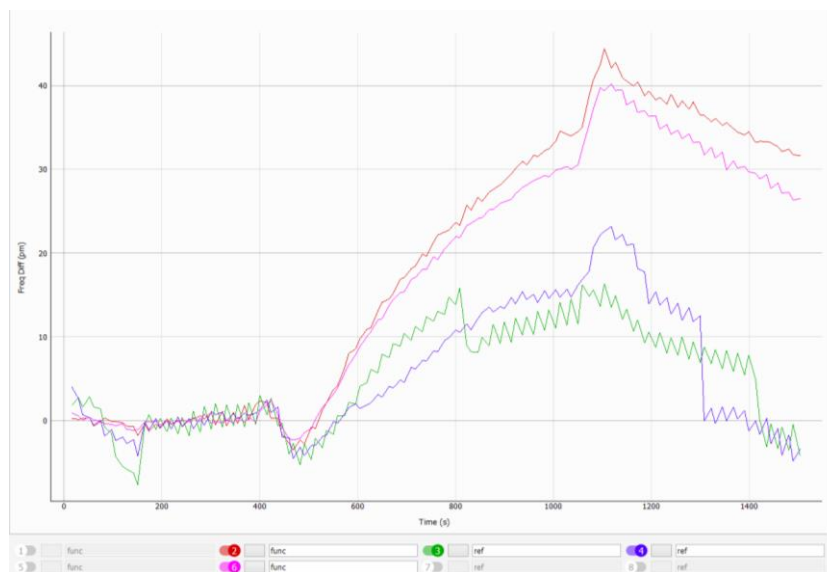


Figura 105. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para el extracto GLN.

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

La línea base de la medida fotónica se establece de 0 a 420 segundos donde se ha fluido el tampón PBST al 7.5% de EtOH, de 420 a 1000 segundos se ha fluido el extracto cárnico en PBST y por último la medida concluye con el lavado de la superficie del sensor fotónico empleando el tampón PBST de los 1000 hasta los 1500 segundos. La duración total de la medida es de 25 minutos.

Los valores del desplazamiento obtenido en el sensograma de la **Figura 105** para cada uno de los RR, se ha analizado con el programa desarrollado por LUMENSIA. Este análisis se realiza en el tramo final de la medida durante el lavado, en este intervalo de tiempo (1000-1500seg.), el valor del desplazamiento es de 29pm. El valor obtenido proviene de la resta entre valor medio de los RRfunc. (2 y 6) menos el valor medio de los RRref. (3 y 4). Si incluimos este valor en la recta de calibrado de la GLN (**Figura 100**), se obtiene un valor de 3.52ppm de GLN. Como este valor se encuentra por encima del valor del LOQ (3.46pm), podemos asumir que la concentración de GLN es cuantificable. Entonces, para calcular la concentración del gluten procedente del extracto cárnico es necesario deshacer las diluciones realizadas, en este caso una dilución 1/8, obteniendo por tanto un valor de 28ppm. Como la concentración del gluten inicial es de 30ppm en la muestra cárnica, esto nos indica que aproximadamente se ha podido extraer toda la GLN.

4.3 Pátógenos

Los agentes patogénicos son muy contagiosos y pueden inducir enfermedades infecciosas a plantas, animales e incluso seres humanos alterando su fisiología. El término patógenos, se utiliza para referirse a un grupo de microorganismos como pueden ser las bacterias, los virus, los hongos y los protozoos. De los cuatro patógenos mencionados, nos centraremos en las bacterias y los virus, ya que forman parte del estudio realizado en este trabajo, concretamente de la bacteria *Escherichia coli* (E.coli) y el Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2). Un ejemplo de las partes que constituyen la estructura de estos microorganismos se muestra en la **Figura 106**.

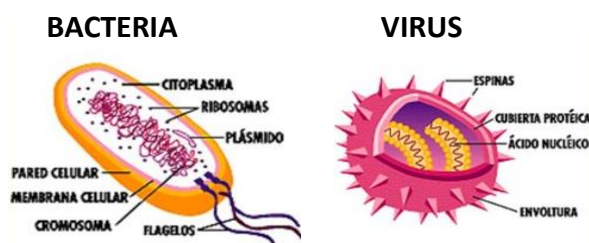


Figura 106. Representación esquemática de las partes de una bacteria y de un virus.

Fuente (slideplayer.es/slide/4640577).

Los estudios realizados para la detección de patógenos en este trabajo, ha dado lugar a unos resultados preliminares sobre superficies planas de Si_3N_4 para la detección de E.coli vía aptámeros como paso previo a las medidas fotónicas. Estas medidas se realizarán más adelante, por lo que no se han podido incluir en la tesis. Además, de un control del pAb-PCV2 sobre superficies de Si_3N_4 plano para verificar que el Ab se inmoviliza correctamente, como paso previo a las medidas fotónicas que se han realizado sobre chip fotónico basado en anillos resonantes para la detección del virus porcino PCV2. Los resultados obtenidos, se describen a continuación.

4.3.1 Detección de la bacteria E.coli sobre superficies de nitruro de silicio plano

La E.coli es una bacteria que se localiza principalmente en el intestino de los seres humanos y de los animales de sangre caliente (mamíferos y aves). El carácter patogénico de esta bacteria depende de la cepa de origen. Por lo general, este microorganismo es inócua y necesario para la digestión de los alimentos. Sin embargo, en el caso de la cepa de E.coli O157:H7, el consumo de alimentos crudos, como carne picada, hortalizas o líquidos contaminados puede causar una intoxicación alimentaria provocando diarrea y vómitos. Afortunadamente, este microorganismo

se destruye aplicando calor a todo el alimento partir de los 70°C, desde el exterior hasta el punto más interno para evitar cualquier tipo de riesgo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta cepa de E.coli (O157:H7) es el más alarmante debido al impacto que produce en la salud pública⁴⁷. De ahí, la importancia de este analito en el sector alimentación y el sector medio ambiente con el tratamiento de aguas, como indicador de la calidad del agua.

El ensayo realizado para la detección de la bacteria E.coli con aptámeros como sondas de captura, se basa en el uso de estrategias tipo ALISA. Estas estrategias consisten en un ensayo tipo “sándwich”, donde se inmoviliza sobre la superficie del sustrato un aptámero como sonda de captura específica del analito de interés y finalmente se ha empleado otro aptámero específico del mismo analito, como cierre de este ensayo. Los resultados obtenidos han dado lugar para el reconocimiento de dos cepas no patogénicas de la bacteria E.coli (Origami y XL1BLUE) como muestra patrón sobre superficies de Si₃N₄ plano. Estas cepas han sido facilitadas por Aptus Biotech, mientras que los aptámeros de captura han sido desarrollados por los autores que vienen descritos en la bibliografía^{41,42}. Para este experimento, se ha implementado el protocolo D (**Figura 59**) como estrategia de funcionalización química para determinar la capacidad de captura de la sonda inmovilizada. Este protocolo consta de dos partes, la fase de biofuncionalización que es donde se inmovilizan los aptámeros de captura específicos de la bacteria E.coli, ApE.coli 1 y ApE.coli 2, bloqueando la superficie con proteína BSA. Y la fase de biodetección, donde se incuban las cepas de E.coli (Origami y XL1BLUE) y finalizando con el aptámero de detección ApE.coli 3, que es específico de la bacteria y está marcado con el fluoróforo Cy5 para verificar así la captura del analito.

En este experimento, se presentan dos tipos de ensayo para la activación química de la superficie. En el ensayo 1 la funcionalización de la superficie con GLUT es durante 24h para las superficies 1, 2 y 3, mientras que en el ensayo 2, la funcionalización con GLUT es de 2h para las superficies 4, 5 y 6. El cuadro resumen del experimento se muestra en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Esquema de las superficies preparadas para la detección de E.coli: protocolo D.

Ensayo 1			Ensayo 2		
Superficie 1: Blanco	Superficie 2: E.Coli Origami	Superficie 3: E.Coli XL1BLUE	Superficie 4: Blanco	Superficie 5: E.Coli Origami	Superficie 6: E.Coli XL1BLUE
Fase de Biofuncionalización					
1-PIRAÑA 1h 2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h 3-GLUT 2.5%/PBS 24h 4-Inmov. 24h (F1) PBS + NaBH ₃ CN (control) (F2) ApE.coli1 9µM / PBS + NaBH ₃ CN (F3) ApE.coli2 9µM / PBS + NaBH ₃ CN 5-Block BSA 1%/PBS 1h	1-PIRAÑA 1h 2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h 3-GLUT 2.5%/PBS 24h 4-Inmov. 24h (F1) PBS + NaBH ₃ CN (control) (F2) ApE.coli1 9µM / PBS + NaBH ₃ CN (F3) ApE.coli2 9µM / PBS + NaBH ₃ CN 5-Block BSA 1%/PBS 1h	1-PIRAÑA 1h 2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h 3-GLUT 2.5%/PBS 24h 4-Inmov. 24h (F1) PBS + NaBH ₃ CN (control) (F2) ApE.coli1 9µM / PBS + NaBH ₃ CN (F3) ApE.coli2 9µM / PBS + NaBH ₃ CN 5-Block BSA 1%/PBS 1h	1-PIRAÑA 1h 2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h 3-GLUT 2.5%/PBS 2h 4-Inmov. 24h (F1) PBS + NaBH ₃ CN (control) (F2) ApE.coli1 9µM / PBS + NaBH ₃ CN (F3) ApE.coli2 9µM / PBS + NaBH ₃ CN 5-Block BSA 1%/PBS 1h	1-PIRAÑA 1h 2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h 3-GLUT 2.5%/PBS 2h 4-Inmov. 24h (F1) PBS + NaBH ₃ CN (control) (F2) ApE.coli1 9µM / PBS + NaBH ₃ CN (F3) ApE.coli2 9µM / PBS + NaBH ₃ CN 5-Block BSA 1%/PBS 1h	1-PIRAÑA 1h 2-APTES 1% / EtOH:DIW (95:5)% 2h 3-GLUT 2.5%/PBS 2h 4-Inmov. 24h (F1) PBS + NaBH ₃ CN (control) (F2) ApE.coli1 9µM / PBS + NaBH ₃ CN (F3) ApE.coli2 9µM / PBS + NaBH ₃ CN 5-Block BSA 1%/PBS 1h
Fase de Biodetección					
6-MgCl ₂ 1mM en PBS 1h 7-ApEColi3-Cy5 (88pb) 1µM / MgCl ₂ 1mM en PBS 1h	6-E.coli Origami (20ufc/µL)/MgCl ₂ 1mM en PBS 1h 7-ApEColi3-Cy5 (88pb) 1µM / MgCl ₂ 1mM en PBS 1h	6-E.coli XL1BLUE (20ufc/µL) / MgCl ₂ 1mM en PBS 1h 7-ApEColi3-Cy5 (88pb) 1µM / MgCl ₂ 1mM en PBS 1h	6-MgCl ₂ 1mM en PBS 1h 7-ApEColi3-Cy5 (88pb) 1µM / MgCl ₂ 1mM en PBS 1h	6-E.coli Origami (20ufc/µL)/MgCl ₂ 1mM en PBS 1h 7-ApEColi3-Cy5 (88pb) 1µM / MgCl ₂ 1mM en PBS 1h	6-E.coli XL1BLUE (20ufc/µL) / MgCl ₂ 1mM en PBS 1h 7-ApEColi3-Cy5 (88pb) 1µM / MgCl ₂ 1mM en PBS 1h

Después de la fase de biodetección, se escanean las superficies de Si₃N₄ plano y se comprueba la validez de las sondas de captura inmovilizadas a 9µM, para el reconocimiento de las cepas de E.Coli Origami y XL1BLUE a 20ufc/µL. Las imágenes obtenidas del escáner de fluorescencia se muestran en la **Figura 107**.

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

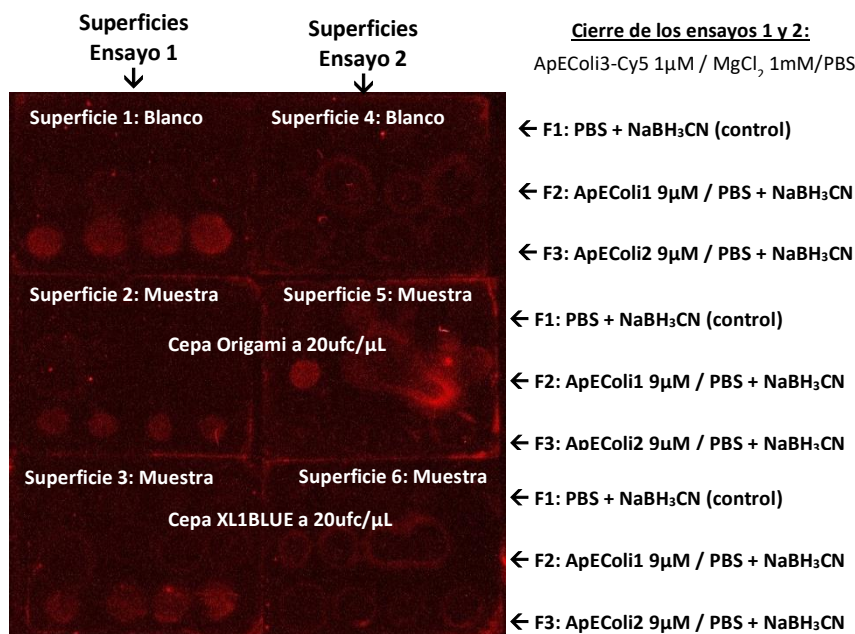


Figura 107. Imagen escaneada tras la fase de biofuncionalización para el reconocimiento de la E.coli.

De los resultados obtenidos podemos decir que de los dos aptámeros inmovilizados como sondas de captura (ApE.coli 1 y ApE.coli 2), tan solo el ApE.coli 2 ha dado una señal positiva para la fila 3 de las superficies 2 y 3 del ensayo 1. Mientras que en las superficies 4, 5 y 6 correspondientes al ensayo 2, la señal de fluorescencia es prácticamente nula, a excepción de un punto aislado de la superficie 5 que ha podido ser un pegado inespecífico del oligo de cierre (ApE.coli 3). La única diferencia que hay entre el ensayo 1 y el 2, es el tiempo de incubación del agente de entrecruzamiento glutaraldehído (GLUT). Como en las superficies del ensayo 1 el GLUT ha estado 24h en vez de las 2h del ensayo 2, éste ha tenido más tiempo de incubación y por tanto asumimos que ha formado una capa orgánica en las superficies 1, 2 y 3 mayor que las del ensayo 2, favoreciendo de esta forma la inmovilización del aptámero de captura. Esto quiere decir, que las condiciones del ensayo 1 son óptimas para el reconocimiento de la bacteria a una concentración de 20ufc/ μ L, para la combinación del aptámero de captura ApE.coli 2 y el de detección ApE.coli 3.

Sin embargo, se ha obtenido un falso positivo ante la ausencia de E.coli en la fila 3 de la superficie 1 (blanco), esto se debe a las interacciones inespecíficas del aptámero ApE.coli 3 sobre el ApE.coli 2, que se encuentra inmovilizado sobre la superficie. Por tanto, para calcular la señal neta del reconocimiento de E.coli, tendremos que restar a la señal total de las superficies 2 y 3 (reconocimiento específico del analito + pegado inespecífico del ApE.coli 3 sobre el ApE.coli 2), la señal del blanco (pegado inespecífico). El análisis de datos procedente de las señales de fluorescencia del ensayo 1, se ha realizado con el software correspondiente al escáner de fluorescencia. Los valores obtenidos, se muestran en la gráfica de la **Figura 108**, correspondientes a la señal neta de la detección de las cepa de E.coli Origami y XL1BLUE.

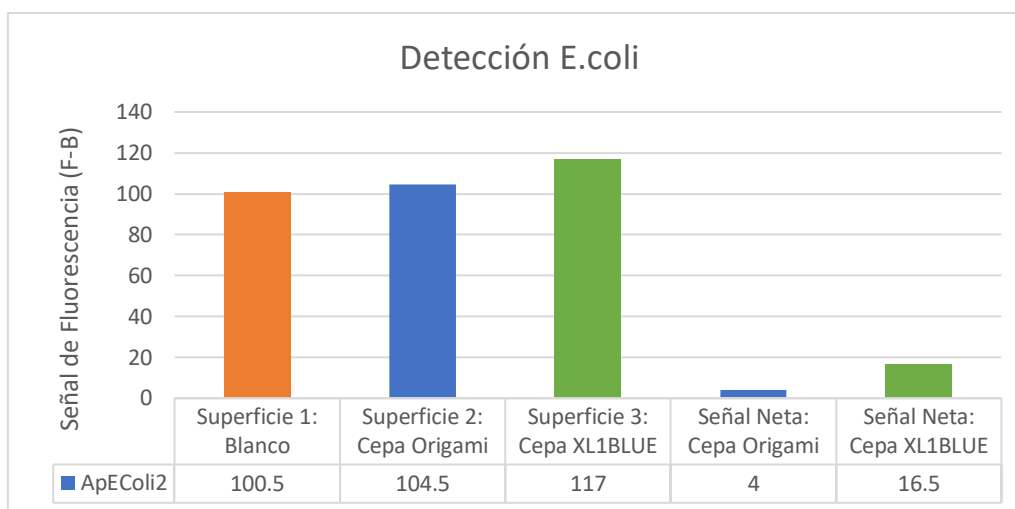


Figura 108. Representación gráfica de los resultados del ensayo 1 para la detección de la E.coli.

De las dos parejas de aptámeros propuestas para el reconocimiento de las cepas de E.coli en el ensayo 1 (**Figura 59**), ha sido la combinación de la pareja 2 (ApE.coli 2 / ApE.coli 3) la que ha dado un señal positiva. La señal neta (Smuestra - Sblanco) para la detección de las cepas de E.coli ha dado un valor de 4 para la Origami, mientras que la XL1BLUE ha dado un valor de 16,5, cuadruplicando así la señal neta. Podemos decir que estos aptámeros que han sido seleccionados previamente, han logrado una determinación positiva ante el reconocimiento de las cepas de E.coli Origami y XL1BLUE a niveles de 1000 unidades formadoras de colonias (ufc) por superficie ($20\text{ufc}/\mu\text{L} * 50\mu\text{L}/\text{superficie}$). Estos resultados son un paso previo al estudio fotónico como futuro trabajo.

4.3.2 Control de inmovilización del anticuerpo policlonal PCV2 (pAb-PCV2)

El Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) es un virus que se encuentra ampliamente extendido a nivel mundial. Este virus afecta al ganado porcino, causando una amplia variedad de infecciones, como la neumonía o problemas respiratorios. Es por ello, que el PCV2 se considera una epidemia verdaderamente importante con un gran impacto económico en el sector porcino. El problema de los virus porcinos en muchas ocasiones proviene por los jabalíes que infectan las granjas. La importancia sobre la detección rápida y sencilla de este virus es una de las tareas que se asumen en este trabajo. Además, para la detección de virus en cerdos hay que tener en cuenta el tema de los virus/bacterias zoonóticas. Una enfermedad zoonótica es una enfermedad que puede transmitirse entre animales y seres humanos y pueden ser provocadas por virus, bacterias, parásitos y hongos.

El control de inmovilización del anticuerpo policlonal específico contra el virus porcino PCV2 desarrollado en conejo (pAb-PCV2), se ha realizado siguiendo los pasos del protocolo F (**Figura 61**). Este protocolo se ha utilizado como estrategia de funcionalización química para verificar que el pAb-PCV2 está inmovilizado sobre la superficie. En la fase de biofuncionalización, se ha inmovilizado el pAb-PCV2 a diferentes concentraciones (50, 100 y 200ppm), además de un control inespecífico correspondiente al anticuerpo policlonal anti-trombina (pAb-THR). Asimismo, se han empleado una serie de bloqueos como la BSA, la OVA, gelatina de pescado (GF), tampón de bloqueo basado en caseína (BB) y etanolamina (MEA). Mientras que las superficies 11 y 12 no han sido bloqueadas. En el control de inmovilización se ha empleado el anticuerpo secundario policlonal anti-conejo desarrollado en cabra y conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 647 (pAb^{2*}-GAR), para la verificación del ensayo. El cuadro resumen de este experimento se muestra en la **Tabla 20** y en la **Tabla 21**.

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

Tabla 20. Esquema de las superficies preparadas para el control de inmovilización del pAb-PCV2 (block BSA, OVA, GF)

Superficie 1: pAb-PCV2 sin EDC/NHS	Superficie 2: pAb-PCV2 con EDC/NHS	Superficie 3: pAb-PCV2 sin EDC/NHS	Superficie 4: pAb-PCV2 con EDC/NHS	Superficie 5: pAb-PCV2 sin EDC/NHS	Superficie 6: pAb-PCV2 con EDC/NHS
Fase de Biofuncionalización					
1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block BSA 1% / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-EDC/NHS MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block BSA 1% / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block OVA 1% / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-EDC/NHS MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block OVA 1% / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block GF 1% / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-EDC/NHS MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block GF 1% / PBS 1h
Control de Inmovilización					
7-pAb ^{2*} -GAR 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} -GAR 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} -GAR 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} -GAR 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} -GAR 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} -GAR 5ppm/PBS 1h

Tabla 21. Esquema de las superficies preparadas para el control de inmovilización del pAb-PCV2 (Block BB, MEA y Sin bloqueo)

Superficie 7: pAb-PCV2 sin EDC/NHS	Superficie 8: pAb-PCV2 con EDC/NHS	Superficie 9: pAb-PCV2 sin EDC/NHS	Superficie 10: pAb-PCV2 con EDC/NHS	Superficie 11: pAb-PCV2 sin EDC/NHS	Superficie 12: pAb-PCV2 con EDC/NHS
Fase de Biofuncionalización					
1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block BB1x / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-EDC/NHS MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block BB1x / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block MEA 0.1M / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-EDC/NHS MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Block MEA 0.1M / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Sin Bloqueo / PBS 1h	1-PIRAÑA 30min. 2-CTES 1% / DIW pH 5 2h 3-EDC/NHS MES 0.1M 30min 4-Inmov. 2h 5-Sin Bloqueo / PBS 1h
Control de Inmovilización					
7-pAb ^{2*} -GAR 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} -GAR 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} -GAR 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} -GAR 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} -GAR 5ppm/PBS 1h	7-pAb ^{2*} -GAR 5ppm/PBS 1h

Después del control de inmovilización, se han escaneado las superficies de Si₃N₄ plano obteniendo las imágenes de fluorescencia que se muestran en la **Figura 109** y en la **Figura 110**.

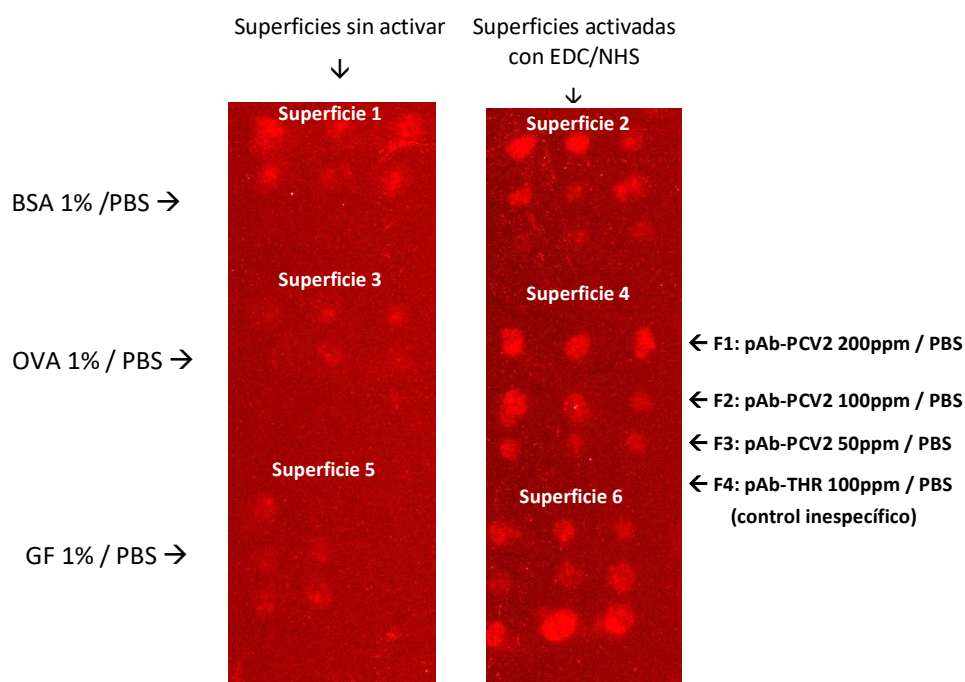


Figura 109. Imágenes del control de inmovilización del pAb-PCV2 con diferentes bloqueos.

De los resultados obtenidos, la señal de fluorescencia para las superficies activadas con EDC/NHS es mayor en comparación con la señal de las superficies que no están activadas. Esta señal, obtenida en las superficies activadas se compone de una parte covalente de la unión del Ab a la superficie y otra componente por unión inespecífica del Ab a la superficie. Si se le resta la parte inespecífica, el resultado es la contribución puramente covalente. El uso de los agentes reticulantes EDC y NHS para la activación de las superficies, ha permitido la formación de enlaces covalentes. Por tanto, la formación de estos enlaces entre un grupo ácido de la capa orgánica del silano CTES depositado sobre la superficie y un grupo amino del anticuerpo a inmovilizar, da lugar a un enlace peptídico, favoreciendo de esta forma la señal obtenida en el control de inmovilización.

Asimismo, el control de la fila 4 correspondiente al anticuerpo policlonal anti-trombina (pAb-THR) no ha dado ningún tipo de señal. Esto se debe porque el anticuerpo pAb^{2*}-GAR empleado para el cierre del ensayo tan solo es capaz de reconocer a otro anticuerpo que esté desarrollado en un conejo, como ocurre en el caso del pAb-PCV2, pero no en el del policlonal pAb-THR, que está desarrollado en oveja.

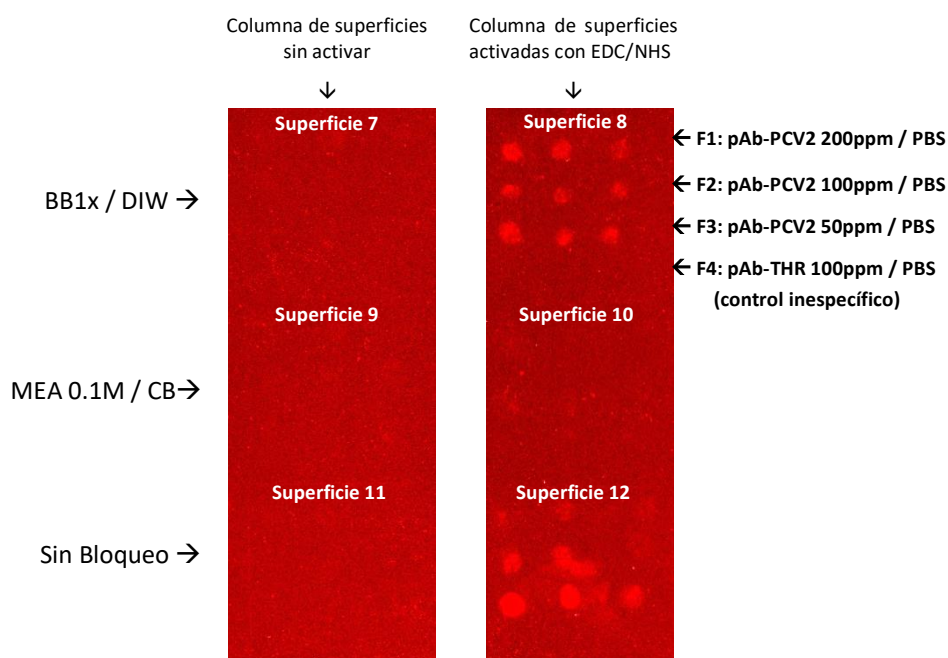


Figura 110. Imágenes del control de inmovilización del pAb-PCV2 con diferentes bloqueos.

Por último, el bloqueo con etanolamina (MEA) 0.1M a pH 9 en tampón carbonato (CB) de las superficies 9 y 10 no ha funcionado correctamente. Esto sucede porque el medio básico del CB no es el más adecuado para el pAb-PCV2 a diferencia de los demás bloqueos que están a un pH neutro (PBS o agua). Por tanto, bajo estas condiciones de pH no ha sido posible la verificación del anticuerpo de captura pAb-PCV2.

El valor de la señal neta por contribución covalente del anticuerpo pAb-PCV2, se corresponde a la diferencia entre la señal total de las superficies activadas y la señal por adsorción inespecífica del anticuerpo sobre las superficies sin activar. Los datos obtenidos se han analizado con el software del equipo de fluorescencia y los resultados se muestran en la gráfica de la **Figura 111**.

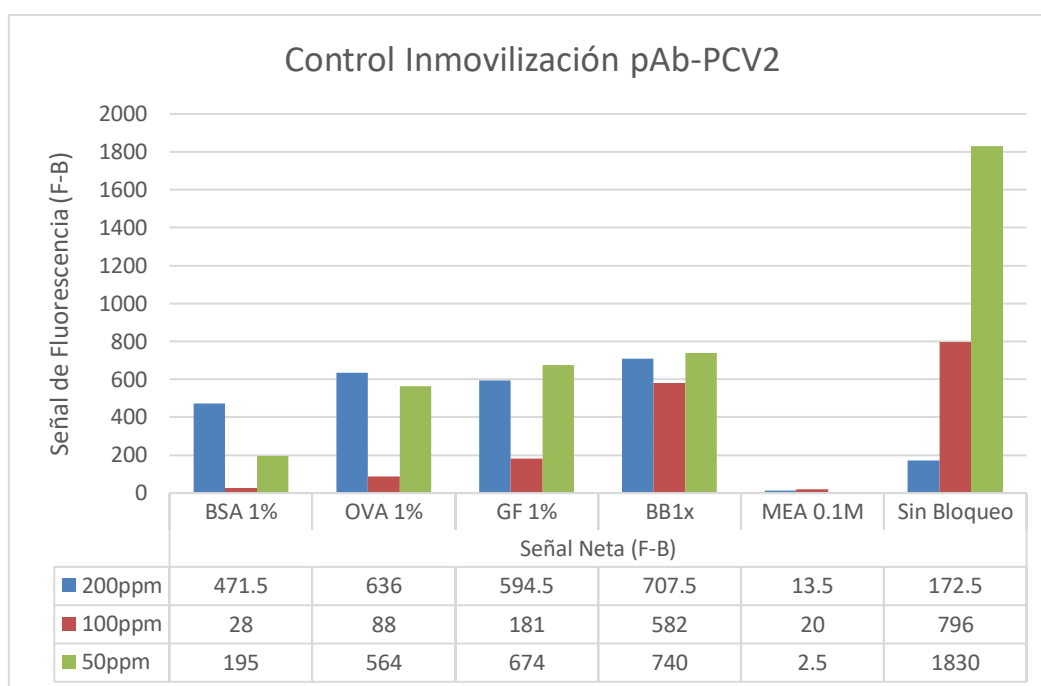


Figura 111. Representación gráfica de los resultados del control de inmovilización del pAb-PCV2

Si comparamos los valores de la señal de fluorescencia para las tres concentraciones de anticuerpo inmovilizado, se tiene un valor mayor para una concentración de 50ppm que para una de 100ppm o 200ppm. Esto significa que, si inmovilizamos por encima de los 50ppm de anticuerpo sobre la superficie, antes se acabará saturando la señal y por tanto se obtendrán resultados mayoritarios por pegado inespecífico del pAb-PCV2 inmovilizado sobre la superficie.

Los porcentajes correspondiente a la contribución por enlace covalente del anticuerpo inmovilizado y bloqueado con diferentes disoluciones se representan en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Porcentaje de contribución por enlace covalente del control de inmovilización del pAbPCV2

Contribución enlace covalente del pAb-PCV2 con diferentes bloqueos						
[Sonda Inmov.]	BSA 1%	OVA 1%	GF 1%	BB1x	MEA 0.1M	Sin Bloqueo
200ppm	36%	61%	94%	93%	30%	86%
100ppm	4%	16%	53%	90%	63%	100%
50ppm	77%	96%	72%	89%	5%	98%
Valor medio	39%	58%	73%	91%	32%	94%

La inmovilización del anticuerpo policlonal anti-PCV2 a tres concentraciones diferentes y con diferentes bloqueos, ha tenido un resultado óptimo para el bloqueo con BB1x con un valor medio del porcentaje de contribución por enlace covalente del 91%. Además, el porcentaje para las superficies sin bloquear es del 94%. De los datos obtenidos, podemos decir que las condiciones de inmovilización del pAb-PCV2 con un bloqueo de BB1x, son prácticamente igual que las superficies que no han sido bloqueadas. La diferencia es que con el bloqueo BB1x, se evitan las posibles interacciones inespecíficas sobre las zonas libres de la superficie que están sin bloquear. El bloqueo óptimo para el control de inmovilización no tiene por qué ser el mejor bloqueo para la detección del virus PCV2, ya que para el control se bloquea la superficie frente al pAb^{2*}-GAR y para la detección se bloquea frente virus PCV2. Esta prueba de control es un paso previo para pasar a las medidas fotónicas.

4.3.3 Detección del Circovirus Porcino PCV2 sobre chip fotónico

El estudio realizado del control de inmovilización del pAb-PCV2 sobre superficies de Si₃N₄ plano, se han transferido a chips fotónicos basados en estructuras de anillos resonantes (RR). Este anticuerpo se ha empleado en este apartado como sonda de captura para la detección del PCV2 como disolución patrón. Los resultados obtenidos de las medidas fotónicas realizadas a nivel de laboratorio (*set-up*), se clasifican en dos bloques. En el primero de ellos, se describen los resultados obtenidos para la optimización de la sonda pAb-PCV2 inmovilizada y del agente de bloqueo. En el segundo bloque, se describen los resultados de la dosis dependencia del PCV2 a diferentes factores de dilución.

4.3.3.1 Detección del PCV2: optimización de la sonda y bloqueo

La fase de biofuncionalización del protocolo F (**Figura 61**) empleado en este ensayo, se ha utilizado como estrategia de activación química para la detección del Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) sobre chips fotónicos. En la fase de biofuncionalización, se ha inmovilizado sobre la superficie del sensor el anticuerpo de captura (pAb-PCV2) a dos concentraciones diferentes (200 y 400ppm). Asimismo, se han empleado una serie de bloqueos como la BSA, la OVA y la gelatina de pescado (GF) para cada uno de los chips fotónicos. El cuadro resumen de este experimento se muestran en la **Tabla 23**

Tabla 23. Esquema de la fase de biofuncionalización de chips fotónicos para la detección del PCV2 (block BSA, OVA y GF)

Chip 1: Bloqueo BSA 1%	Chip 2: Bloqueo OVA 1%	Chip 3: Bloqueo GF 1%
Fase de Biofuncionalización		
1-PIRAÑA 30min.	1-PIRAÑA 30min.	1-PIRAÑA 30min.
2-CTES 1% / DIW pH 5 2h	2-CTES 1% / DIW pH 5 2h	2-CTES 1% / DIW pH 5 2h
3-EDC/NHS MES 0.1M 30min	3-EDC/NHS MES 0.1M 30min	3-EDC/NHS MES 0.1M 30min
4-Inmov. 2h	4-Inmov. 2h	4-Inmov. 2h
(RR _{ref}): Anillos de referencia sin disolución depositada.	(RR _{ref}): Anillos de referencia sin disolución depositada.	(RR _{ref}): Anillos de referencia sin disolución depositada.
(RR _{func1}): Anillos funcionalizados con pAb-PCV2 200ppm / PBS	(RR _{func1}): Anillos funcionalizados con pAb-PCV2 200ppm / PBS	(RR _{func1}): Anillos funcionalizados con pAb-PCV2 200ppm / PBS
(RR _{func2}): Anillos funcionalizados con pAb-PCV2 400ppm / PBS	(RR _{func2}): Anillos funcionalizados con pAb-PCV2 400ppm / PBS	(RR _{func2}): Anillos funcionalizados con pAb-PCV2 400ppm / PBS
5-Block BSA 1% / PBS 1h	5-Block OVA 1% / PBS 1h	5-Block GF 1% / PBS 1h

Sobre los RR de las superficies de los chips fotónicos 1, 2 y 3, se ha inmovilizado el pAb-PCV2 en los RRfunc. a dos concentraciones diferentes (200 y 400ppm) y en los RRref. no se ha depositado ninguna disolución. El esquema del chip fotónico y la distribución de los RR se muestran en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Distribución de los RR sobre la superficie del chip fotónico para la detección del PCV2.

Chip Fotónico: RRfunc. pAb-PCV2 y RRref. Aire	
Canal 1: PCV2	Canal 2: PCV2
RR1: pAb-PCV2 (200ppm)	RR2: pAb-PCV2 (200ppm)
RR3: Referencia	RR4: Referencia
RR5: pAb-PCV2 (400ppm)	RR6: pAb-PCV2 (400ppm)
RR7: Referencia	RR8: Referencia

La distribución de los ocho anillos del chip fotónico se agrupa en dos bloques de cuatro, los RR impares se encuentran en el canal fluido 1 (RR 1, 3, 5 y 7), mientras que los RR pares (RR 2, 4, 6 y 8) están situados en el canal 2. Después de la activación química de la superficie de los

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

chips fotónicos y bloqueo durante la fase de biofuncionalización, estos chips se han empaquetado con una lámina fluídica y se han colocado en el *set-up* optoelectrónico de laboratorio. La detección fotónica del PCV2 se ha realizado a una velocidad de flujo constante de 30 μ L/min por cada uno de los dos canales durante todo el experimento.

Los resultados obtenidos de la detección del PCV2 con diferentes bloqueos aplicados, Chip 1 BSA 1% (**Figura 112**), Chip 2 OVA 1% (**Figura 113**) y Chip 3 GF 1% (**Figura 114**) se ven reflejados en los siguientes sensogramas. Estos datos se analizaron con el software de LUMENSIA. De la medida del chip fotónico 1 con bloqueo de BSA 1%, se obtuvo el siguiente sensograma para la detección del PCV2 a una dilución de 1/100 (**Figura 112**).

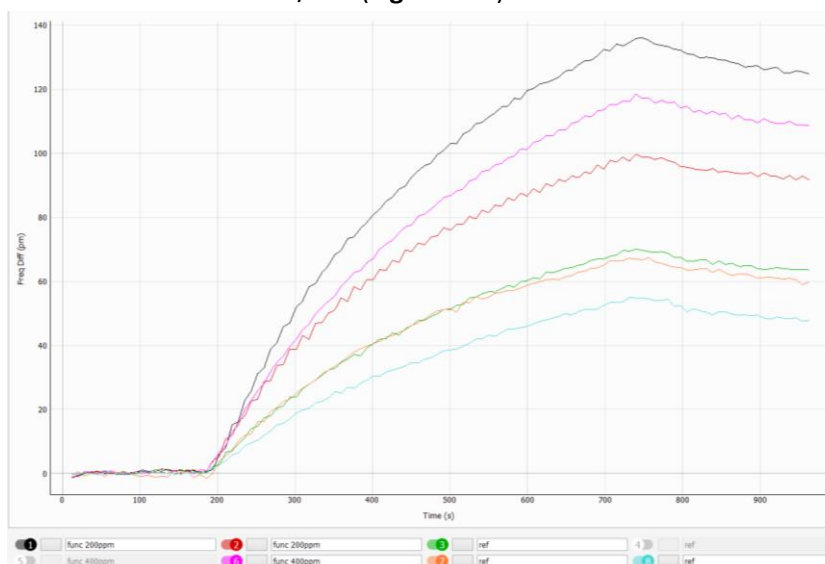


Figura 112. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/100, BSA.

En la **Figura 112**, durante los primeros 200 segundos se ha establecido la línea base de la medida fotónica fluyendo el tampón PBST, seguidamente se fluye la muestra del PCV2 diluido 1/100 en PBST en el intervalo de tiempo de 200 a 750 aprox. y para finalizar la medida se procede con el lavado de la superficie del sensor fotónico fluyendo de nuevo PBST de los 750 a los 1000 segundos. La duración de la medida ha sido de unos 17 minutos.

Los datos obtenidos del desplazamiento de la resonancia para esta medida son:

Canal 1: RRfunc. 1 (200ppm) y RRref. 3,7 \rightarrow Valor medio neto del desplazamiento

$$\Delta p_{m_{200}} = 63.87 \text{ pm}$$

Canal 2: RRfunc. 2 (200ppm), 6 (400ppm) y RRref. 8 \rightarrow Valor medio neto del desplazamiento

$$\Delta p_{m_{200}} = 45 \text{ pm} \text{ y } \Delta p_{m_{400}} = 105 \text{ pm}$$

El valor medio del desplazamiento neto para los RRfunc. 200ppm $\Delta p_{m_{200}} = 54.4 \text{ pm}$

El valor medio del desplazamiento neto para los RRfunc. 400ppm $\Delta p_{m_{400}} = 105 \text{ pm}$

Para la medida del chip fotónico 2 con bloqueo de OVA 1%, se obtuvo el siguiente sensograma para la detección del PCV2 a una dilución de 1/100 (**Figura 113**).



Figura 113. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/100, OVA.

En la **Figura 113**, los primeros 200 segundos se corresponden a la línea base de la medida fotónica que se ha obtenido al fluir el tampón PBST, después se fluye la muestra del PCV2 1/100 en PBST de los 200 a 800 aprox. y para concluir la medida se procede con el lavado fluyendo de nuevo PBST de los 800 a los 1000 segundos. La duración es de 17 minutos. Como solo hay un anillo de referencia, se utiliza el mismo valor para ambos canales.

Los datos obtenidos del desplazamiento de la resonancia para esta medida son:

Canal 1: RRfunc. 1 (200ppm), 5 (400ppm) → Valor medio neto del desplazamiento

$$\Delta pm_{200} = 23pm \text{ y } \Delta pm_{400} = 16pm$$

Canal 2: RRfunc. 2 (200ppm), 6 (400ppm) y RRref. 8 → Valor medio neto del desplazamiento

$$\Delta pm_{200} = 40pm \text{ y } \Delta pm_{400} = 33pm$$

El valor medio del desplazamiento neto para los RRfunc. 200ppm $\Delta pm_{200} = 31.5$

El valor medio del desplazamiento neto para los RRfunc. 400ppm $\Delta pm_{400} = 24.5$

La medida del chip fotónico 3 con bloqueo de GF 1%, dio lugar al siguiente sensograma para la detección del PCV2 a una dilución de 1/100 (**Figura 114**).

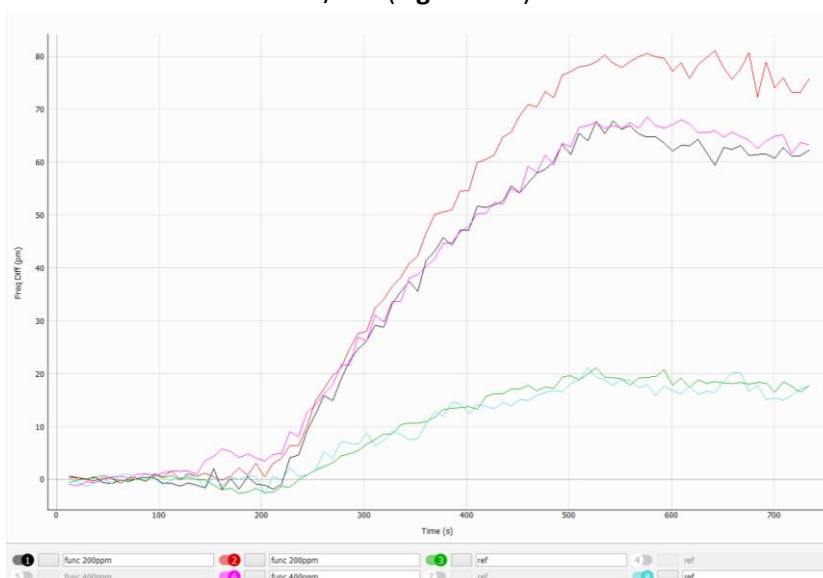


Figura 114. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/100, GF.

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

En la **Figura 114**, la descripción del sensograma se corresponde inicialmente a la línea base de la medida fotónica para los primeros 200 segundos de flujo PBST, después la muestra del PCV2 1/100 se fluye en PBST de los 200 a 500 aprox. y para finalizar la medida se procede a lavar los canales fluyendo de nuevo PBST de los 500 a los 750 segundos. La duración es de 13 minutos.

Los datos obtenidos del desplazamiento de la resonancia para esta medida son:

Canal 1: RRfunc. 1 (200ppm) y RRref. 3 → Valor medio neto del desplazamiento

$\Delta pm_{200} = 38.7pm$

Canal 2: RRfunc. 2 (200ppm), 6 (400ppm) y RRref. 8 → Valor medio neto del desplazamiento

$\Delta pm_{200} = 60.3pm$ y $\Delta pm_{400} = 47.3pm$

El valor medio del desplazamiento neto para los RRfunc. 200ppm $\Delta pm_{200} = 49.5pm$

El valor medio del desplazamiento neto para los RRfunc. 400ppm $\Delta pm_{400} = 47.3pm$

En la **Figura 115** se representa la señal de los RRfunc. a 200 y 400ppm y los RRref. frente al tipo de bloqueo aplicado en los chips fotónicos 1, 2 y 3. Además, se añade una línea correspondiente al valor de la relación señal ruido (S/R).

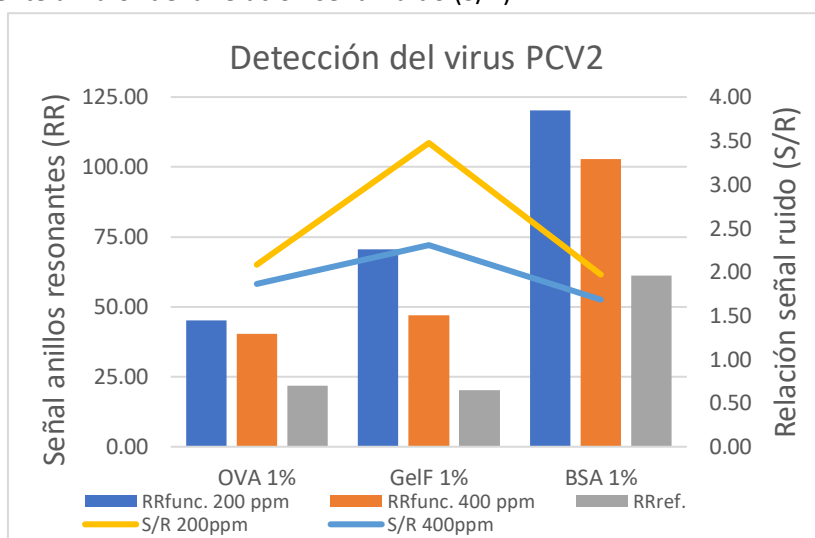


Figura 115. Representación gráfica del desplazamiento óptico en pm frente al bloqueo empleado.

De los resultados representados, la señal media obtenida de los anillos funcionalizados a 200ppm es mayor que la señal de los anillos a 400ppm para los tres chips fotónicos. Esto se corresponde a una saturación de los anillos para concentraciones de 400ppm, asumimos que a estas concentraciones la señal obtenida se debe a interacciones por pegado inespecífico entre los propios anticuerpos inmovilizados como sonda de captura formando un tapón en la ventana del anillo, por lo que se determina que la concentración máxima de sonda inmovilizada es de 200ppm. Por otra parte, el chip 1 (BSA 1%) que presenta los valores más altos para las señales de los RRfunc. en comparación con los chips 2 (OVA 1%) y 3 (GF 1%), tiene a su vez un valor de la señal de los RRref. tres veces mayor que los chips 2 y 3, dando como resultado la relación S/R más baja de los tres chips. Sin embargo, para el chip 3 que está bloqueado con GF 1%, tiene el valor más alto de la relación señal ruido para los anillos funcionalizados a 200ppm. La diferencia de señal entre los diferentes agentes de bloqueo es ocasionada por las interacciones entre la proteína utilizada y el virus cuando está fluyendo sobre la superficie del sensor.

Los resultados alcanzados en este apartado han sido en primer lugar, el reconocimiento específico del patógeno Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) a una dilución 1/100 sobre chips fotónicos a diferentes concentraciones de sonda inmovilizada (200 y 400 ppm) y bloqueos (OVA 1%, Gelatina 1% y BSA 1%), además de la verificación de la validez de la sonda pAb-PCV2 empleada. El resultado óptimo se corresponde para 200ppm de sonda inmovilizada y un bloqueo de GF 1%, esta combinación ha sido la resultante para aplicar en el siguiente apartado referente al estudio de la dosis dependencia del PCV2.

4.3.3.2 Detección del PCV2: relación dosis dependencia

El estudio realizado en este apartado consiste en el seguimiento de la respuesta de la dosis dependencia del virus PCV2 a diferentes diluciones sobre chips fotónicos. El procedimiento experimental consiste en la fase de biofuncionalización del protocolo F (Figura 61). Los RR sobre la superficie del chip fotónico se distribuyen de la siguiente manera (Figura 64), tomando como muestra los dos RRfunc. con pAb-PCV2 como sonda de captura a 200ppm y el RR3 de referencia, el RR4, 5 y 8 se descartan, ya que solo se van a medir los anillos a 200ppm (Tabla 25).

Tabla 25. Distribución de los RR sobre la superficie del chip fotónico para la detección del PCV2.

Chip Fotónico: RRfunc. pAb-PCV2 y RRref. Aire	
Canal 1: PCV2	Canal 2: PCV2
RR1: pAb-PCV2 (200ppm)	RR2: pAb-PCV2 (200ppm)
RR3: Referencia	RR4: Referencia

La detección fotónica del PCV2 se ha realizado a una velocidad de flujo constante de 30µL/min por cada uno de los dos canales durante todo el experimento. Los resultados obtenidos se ven reflejados en los siguientes sensogramas, cuyos datos han sido analizados con el software de LUMENSIA. Los valores del sensograma se corresponden al siguiente código de los RR empleados para todas las medidas fotónicas realiza.



La primera medida del chip fotónico bloqueado con GF 1%, se ha realizado a una dilución 1/5000 del PCV2 en PBST como disolución tampón (Figura 116).

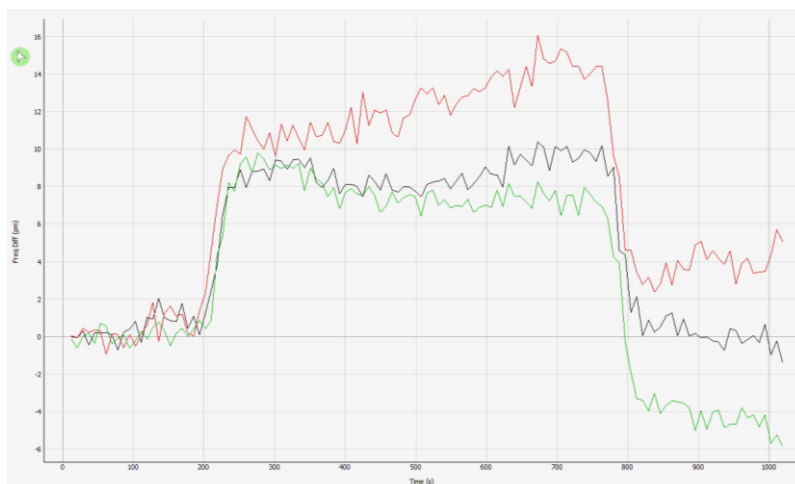


Figura 116. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/5000.

En el sensograma de la Figura 116, los primeros 200 segundos se corresponden a la línea base de la medida fotónica durante los cuales se ha fluido el tampón PBST. A continuación, se ha fluido la muestra del PCV2 diluido 1/5000 en PBST en el intervalo de tiempo de 200 a 800, finalmente se procede con el lavado de la superficie del sensor fotónico fluyendo de nuevo PBST de los 800 a los 1000 segundos. La duración de la medida ha sido de unos 17 minutos. El valor obtenido del desplazamiento de la resonancia para la medida 1 es: $\Delta pm_{200} = 6.1pm$.

La segunda medida se ha realizado a una dilución 1/2000 del PCV2 en PBST (**Figura 117**).



Figura 117. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/2000.

En el sensograma de la **Figura 117**, los primeros 200 segundos se corresponden a la línea base de la medida fotónica durante los cuales se ha fluido el tampón PBST. A continuación, se ha fluido la muestra del PCV2 diluido 1/2000 en PBST en el intervalo de tiempo de 200 a 800, finalmente se procede con el lavado de la superficie del sensor fotónico fluyendo de nuevo PBST de los 800 a los 1000 segundos. La duración de la medida ha sido de unos 17 minutos. El valor obtenido del desplazamiento de la resonancia para la medida 1 es: $\Delta p_{m200} = 12.3 \text{ pm}$.

La tercera medida se ha realizado a una dilución 1/1000 del PCV2 en PBST (**Figura 118**).

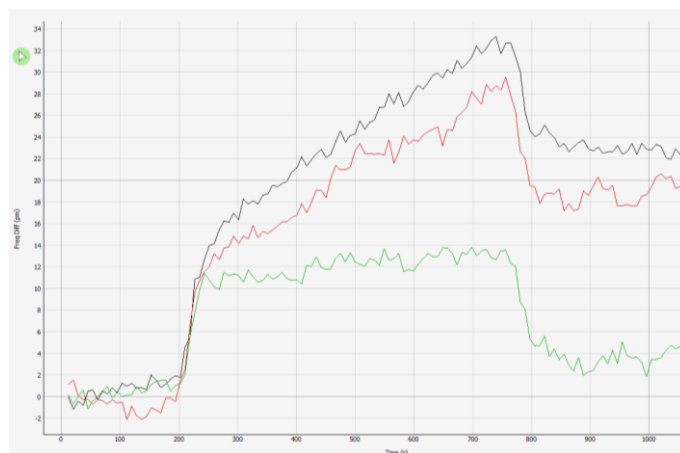


Figura 118. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/1000.

En el sensograma de la **Figura 118**, los primeros 200 segundos se corresponden a la línea base de la medida fotónica durante los cuales se ha fluido el tampón PBST. A continuación, se ha fluido la muestra del PCV2 diluido 1/1000 en PBST en el intervalo de tiempo de 200 a 800, finalmente se procede con el lavado de la superficie del sensor fotónico fluyendo de nuevo PBST de los 800 a los 1000 segundos. La duración de la medida ha sido de unos 17 minutos. El valor obtenido del desplazamiento de la resonancia para la medida 3 es: $\Delta p_{m200} = 17.3 \text{ pm}$.

La cuarta medida se ha realizado a una dilución 1/500 del PCV2 en PBST (**Figura 119**).

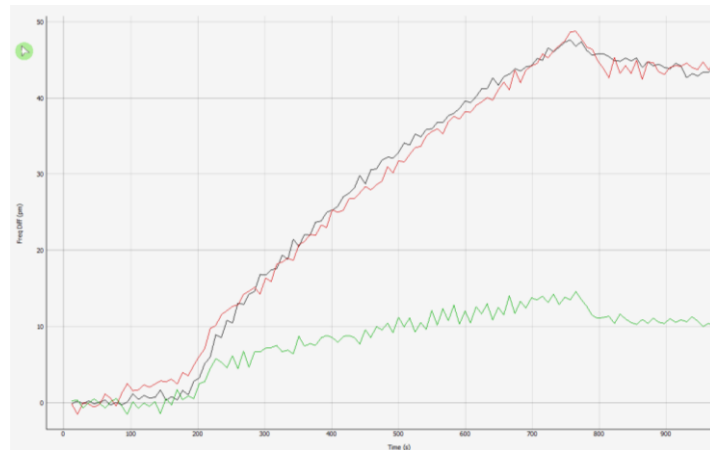


Figura 119. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/500.

En el sensograma de la **Figura 119**, los primeros 200 segundos se corresponden a la línea base de la medida fotónica durante los cuales se ha fluido el tampón PBST. A continuación, se ha fluido la muestra del PCV2 diluido 1/500 en PBST en el intervalo de tiempo de 200 a 750, finalmente se procede con el lavado de la superficie del sensor fotónico fluyendo de nuevo PBST de los 750 a los 1000 segundos. La duración de la medida ha sido de unos 17 minutos. El valor obtenido del desplazamiento de la resonancia para la medida 4 es: $\Delta p_{m200} = 33.4\text{pm}$.

La quinta medida se ha realizado a una dilución 1/100 del PCV2 en PBST (**Figura 120**).

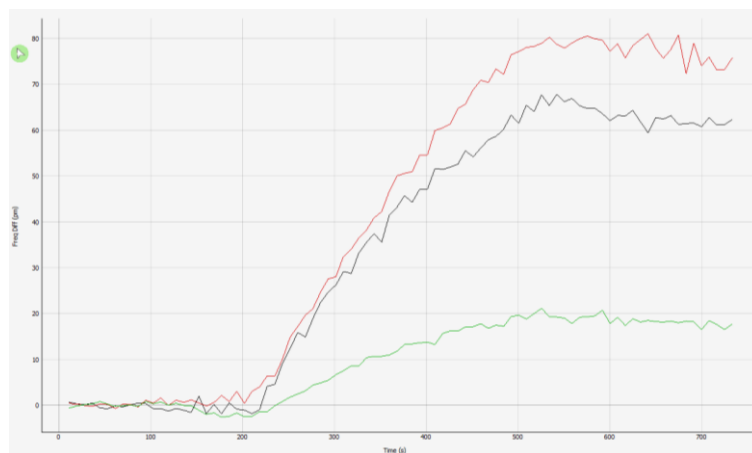


Figura 120. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/100.

En el sensograma de la **Figura 120**, los primeros 200 segundos se corresponden a la línea base de la medida fotónica durante los cuales se ha fluido el tampón PBST. A continuación, se ha fluido la muestra del PCV2 diluido 1/100 en PBST en el intervalo de tiempo de 200 a 500, finalmente se procede con el lavado de la superficie del sensor fotónico fluyendo de nuevo PBST de los 500 a los 700 segundos. La duración de la medida ha sido de unos 12 minutos. El valor obtenido del desplazamiento de la resonancia para la medida 5 es: $\Delta p_{m200} = 52.9\text{pm}$.

En la **Figura 121** se representa la relación dosis dependencia del PCV2 a las diferentes diluciones medidas con el *set-up* de laboratorio frente a la señal obtenida.

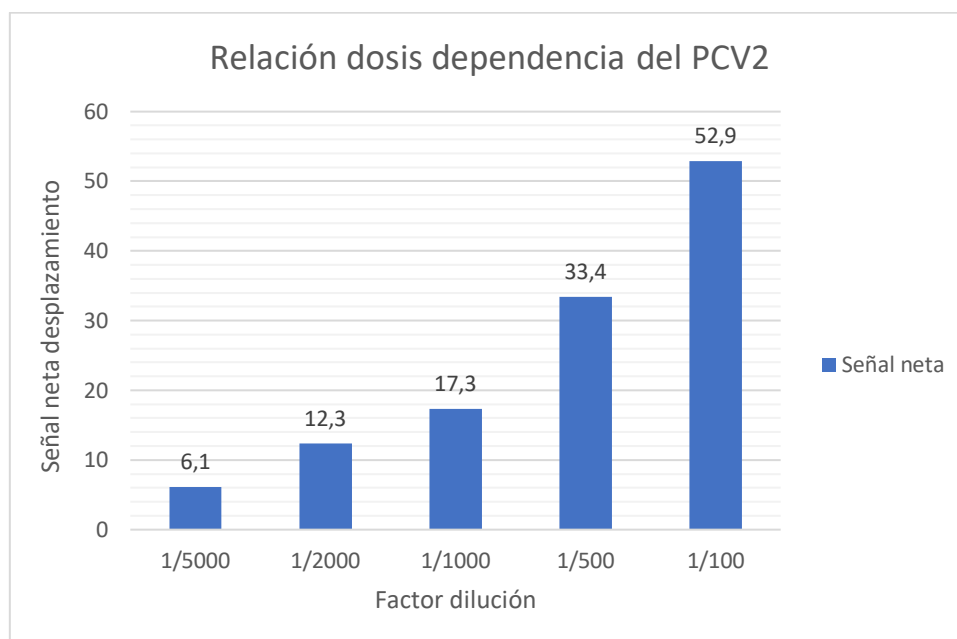


Figura 121. Representación gráfica de la dosis dependencia del PCV2 a diferentes diluciones.

Podemos concluir el ensayo con unos resultados globales positivos. La tendencia se observa claramente, si disminuye el factor de dilución, aumenta el porcentaje de la concentración del PCV2 y viceversa. Si aumenta el factor de dilución, disminuye la concentración del analito y por tanto la señal neta de la detección del PCV2. Este comportamiento es el esperado, ya que, mayor concentración de analito, mayor es la probabilidad que la sonda inmovilizada reconozca el PCV2 y por tanto mayor cambio en el índice de refracción y de la señal.

Chapter 5: CONCLUSIONS

5 CHAPTER 5: CONCLUSIONS

5.1 General conclusions

The general conclusions derived from the work done to detect thrombin, allergens and pathogens are described below:

1.-Of the tests corresponding to the detection of the thrombin analyte, the covalent immobilization of ApTHR on the sensor surface has been possible for the recognition of the standard thrombin. However, for the mAb-THR and pAb-THR probes they could not be correctly immobilized on the surface. Likewise, from the study conducted on the activation of a blood sample, the effect of its viscosity and mobility has been verified, once the coagulation process has begun. With this, we want to see how long the sample can flow without clogging the microfluidic channel, face to next measurements with the laboratory set-up. On the other hand, thrombin generated in the coagulation process must form a complex with antithrombin, preventing ApTHR from recognizing the free analyte. However, the standard thrombin in different biological samples is detected, so it is proposed to develop a specific capture probe for this complex, assuming that this probe will be different from the probe for free thrombin.

2.-Of the tests corresponding to the detection of allergens, it should be noted that from the parameters of the LOD (1.04ppm) and the LOQ (3.46ppm) obtained from the GLN calibration, a sensitivity of 8.07pm/ppm has been achieved. Therefore, this calibration has served us as a previous step to the realization of photonic measurements on chips, for the detection of GLN of a meat extract, from a sample of meat doped with 30ppm of gluten. After successive dilutions, a concentration of 3.52ppm corresponding to the GLN of wheat gluten has been detected, whose value is above the limits of quantification of the biosensor. In conclusion, we can affirm that our system is capable of measuring within the dynamic range of work, so it has been decided to continue on this line of work for the detection of other allergens from eggs, milk and gluten.

3.-Of the tests corresponding to the detection of pathogens, it has been possible to recognize two non-pathogenic strains of E.coli bacteria (Origami and XL1BLUE) at 1000cfu via aptamers (ApE.Coli 1, 2 and 3). As the results of these tests are not very conclusive, it has been decided to perform an immobilization control of the specific antibodies of the E.coli bacteria, to verify their validity and then be able to use them as capture probes in photonic measurements. From the tests for the detection of the PCV2 swine virus via antibodies, we can say that the validity of pAb-PCV2 as a capture probe at a 1/100 dilution of the virus has been verified. This result has served as a preliminary step to the study of the dose dependence of PCV2 at different dilution factors, from which we can conclude that our system is capable of detecting the virus up to a dilution of 1/5000.

5.2 Future expectation

The task performed in this Thesis, gives rise to a wide range of possibilities as future lines of work deposited in photonic biosensors. In addition, it should be noted that photonic technology is booming, due to the versatility and performance offered by this sensing technique. This confirms, therefore, that there is a high probability of bringing to market a product of these characteristics. For this reason, the following steps are proposed:

1.-First, the expansion of analytes in the food sector, to get to have controlled the 14 allergens of mandatory declaration and those of pathogens, such as *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Salmonella*. In addition to other sectors such as environment, health and chemical and biological warfare.

2.-Second, to develop a portable and low-cost device, as a platform for real-time sensing measurements and in a few minutes, for multi-analyte detection. In this case, LUMENSIA Sensors is already working on it, to bring it to market in 2020.

*ANEXO: Estancia del
Doctorado*

6 ANEXO: Estancia del Doctorado

La estancia del doctorado realizada en el *Istituto Italiano di Tecnologia* (IIT, www.iit.it) de Génova con una duración total de seis meses, ha sido posible gracias al contrato i-PFIS del Instituto de Salud Carlos III, concedido al INCLIVA y en colaboración con la empresa LUMENSIA Sensors SL. Durante ese tiempo, el trabajo se ha realizado en el departamento de Plasmon Nanotechnologies con Francesco De Angelis como investigador principal del grupo. Los resultados previos, han dado lugar a su presentación en el “5th International Workshop on Plasmonics (PLASMONICA 2017)” en la ciudad de Lecce (ITALIA), con el siguiente título: “Plasmonic silver-alkyne nanoclusters as putative intracellular SERS-active probes”. La continuación del trabajo presentado en el congreso del 2017 ha permitido la publicación de los resultados obtenidos en la revista *Scientific Reports* con el título “Live Intracellular Biorthogonal Imaging by Surface Enhanced Raman Spectroscopy using Alkyne-Silver Nanoparticles Clusters” y DOI: 10.1038/s41598-018-31165-3.

6.1 Actividades realizadas.

Las actividades llevadas a cabo durante la estancia se describen a continuación:

- Revisión del estado del arte para la síntesis de nanoclusters de metálicos como sondas SERS, permitiendo determinar cuáles son las principales vías de diseño más óptimas.
- Estrategia de síntesis para la obtención de nanoclusters metálicos (sondas SERS) formados a partir de la unión de nanopartículas de plata (AgNPs), del alquino 2-amino-3-mercapto-N-(prop-2-ynyl)propionamida (Alk) y del agente de entrecruzamiento Ditiotreitol (DTT) (**Figura 122**).

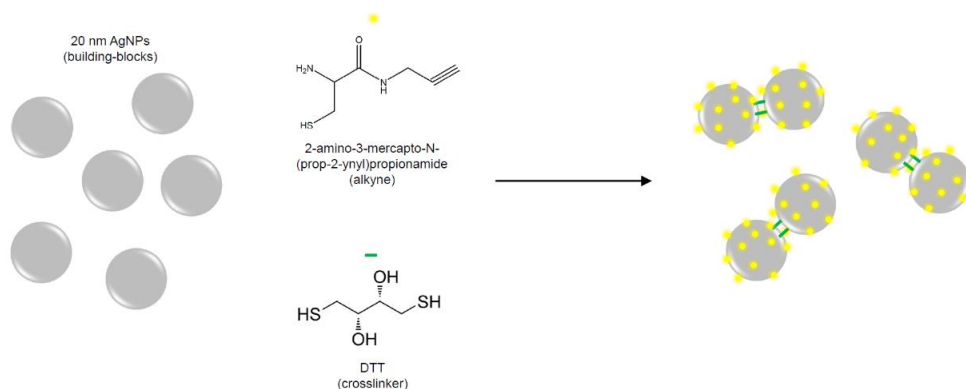


Figura 122. Estrategia de síntesis para una sonda Raman plasmónica basada en alquino.

- Evaluación de las muestras obtenidas mediante el uso del espectrómetro UV-Visible, las microscopías SEM / TEM, y técnica SERS.

6.2 Objetivos alcanzados

Las actividades descritas anteriormente se han completado con éxito y han logrado alcanzar el objetivo principal de este trabajo:

- Síntesis de nanoclusters y caracterización como sondas activas SERS intracelulares.

Además, se han alcanzado los siguientes objetivos específicos:

- Obtención de dos nanoclusters: el monómero AgNPs-Alk y el polímero AgNPs-Alk-DTT.
- Caracterización de los compuestos mediante espectroscopia UV-Visible permitiendo clasificar los nanoclusters según su pico de absorbancia.
- Resolución de los diferentes tamaños de los clusters obtenidos de la síntesis, medidos en los equipos de microscopía SEM y TEM.

- Control en la síntesis de sondas activas SERS con una señal detectable en la región silenciosa del espectro RAMAN y solubilidad a largo plazo en medio acuoso.
- Mejora de la señal SERS a 2030 cm^{-1} , correspondiente al alquino, debido a la formación de un *hot spot* en la región central del dímero metálico AgNPs-Alk-DTT, donde se concentra la potencia después de la radiación.

6.3 Experimental

El protocolo utilizado en la síntesis de los nanoclusters se desarrolla de la siguiente forma:

1) Preparación de las disoluciones correspondientes a los reactivos utilizados en la síntesis.

a) Preparar la dilución del alcohol de polivinilo (**PVA**) utilizado, para la estabilización de las nanopartículas en disolución.

· $[PVA]_{\text{stock}} = 13\% \rightarrow [PVA]_f = 0.5\%$, $V_{\text{total}} = 150\mu\text{L} \rightarrow V_{\text{aliqu.}} = 5.8\mu\text{L}$ por pocillo.

-Pipetear el volumen correspondiente tres veces para cantidades pequeñas, evitando que la punta de la micropipeta coja aire y se evite la formación de burbujas.

b) Preparar la disolución de nanopartículas de plata (**AgNPs**).

-Tomar una alícuota de la disolución comercial de AgNPs y ponerla en un eppendorf.

-Sonificar la suspensión durante 5 min. en baño a 20°C , una frecuencia de 59 y 100 de potencia.

-Repartir la disolución en dos eppendorf, centrifugar a 10000 rpm, durante 2 min. a 20°C .

-Retirar los eppendorf con sumo cuidado, pipetear el sobredrenante y desechar el precipitado (que contiene las NPs de mayor tamaño no deseadas).

· $[AgNPs]_{\text{stock}} = 3.8\text{nM} \rightarrow [AgNPs]_f = 1.5\text{nM}$, $V_{\text{total}} = 150\mu\text{L} \rightarrow V_{\text{aliqu.}} = 60\mu\text{L}$.

c) Preparar la dilución de alquino (**Alk**) con una ratio (1:2000).

· $[Alk]_{\text{stock}} = 23\% \rightarrow [Alk]_i = 11.5 \times 10^{-3}\%$, $V_{\text{total}} = 2000\mu\text{L} \rightarrow V_{\text{aliqu.}} = 1\mu\text{L}$.

· $[Alk]_i = 11.5 \times 10^{-3}\% \rightarrow [Alk]_f = 7.7 \times 10^{-5}\%$, $V_{\text{total}} = 150\mu\text{L} \rightarrow V_{\text{aliqu.}} = 1\mu\text{L}$ por pocillo.

d) Preparar las diluciones del Dithiothreitol (**DTT**), que actuará como agente *crosslinker*.

-Preparar una dilución con una concentración de $50\mu\text{M}$ de la disolución stock inicial.

· $[DTT]_{\text{stock}} = 35000\mu\text{M} \rightarrow [DTT]_i = 50\mu\text{M}$, $V_{\text{total}} = 1000\mu\text{L} \rightarrow V_{\text{aliqu.}} = 1.4\mu\text{L}$.

· $[DTT]_i = 50\mu\text{M} \rightarrow [DTT]_f = 1.6\mu\text{M}$, $V_{\text{total}} = 150\mu\text{L} \rightarrow V_{\text{aliqu.}} = 4.8\mu\text{L}$ por pocillo.

-Homogeneizar la disolución de DTT en vortex unos segundos.

2) Una vez preparadas todas las disoluciones, llenar los pocillos correspondientes en una gradilla de 96 pocillos con $150\mu\text{L}$ de agua Milli Q cada uno.

-Adicionar el PVA y homogeneizar rápidamente la disolución con otra pipeta 5 veces.

-Añadir el volumen de la disolución de AgNPs, sin que la punta de la micropipeta toque la disolución e incubar 10 minutos.

-Añadir a la disolución de PVA y AgNPs el Alk e incubar durante 30 min. en agitación constante, para estabilizar la disolución.

-Adicionar el volumen correspondiente de DTT a la anterior disolución, homogeneizar, e incubar 30min. en reposo.

Esquema de las disoluciones preparadas en los pocillos con un $V_{\text{total}} = 150\mu\text{L}$.

· Control (CAu): $V_t = 5.8\mu\text{L PVA (13\%)} + 60\mu\text{L AgNPs (3.8nM)} + 84.2\mu\text{L H}_2\text{O}$.

· CA: $V_t = 5.8\mu\text{L PVA (13\%)} + 60\mu\text{L AgNPs (3.8nM)} + 1\mu\text{L Alk (1:2000)} + 83.2\mu\text{L H}_2\text{O}$.

· DA: $V_t = 5.8\mu\text{L PVA (13\%)} + 60\mu\text{L AgNPs (3.8nM)} + 1\mu\text{L Alk (1:2000)} + 4.8\mu\text{L DTT (50}\mu\text{M)}$.

· Concent. finales: $[PVA]_f = 0.5\%$; $[AgNPs]_f = 1.5\text{nM}$; $[Alk]_f = 7.7 \times 10^{-5}\%$; $[DTT]_f = 1.6\mu\text{M}$.

6.4 Caracterización de las muestras

La caracterización de las muestras obtenidas durante la síntesis de nanoclusters, se han determinado mediante el uso de las siguientes técnicas: el espectro de UV-Visible, las microscopías SEM/TEM y la espectroscopia RAMAN.

6.4.1 Espectro UV-Visible

Espectro obtenido en el equipo de UV-Visible para las tres muestras, donde al añadir el Alk a las nanopartículas la disolución cambia de color de amarillo a anaranjado y su comportamiento es semejante, mientras que al añadir el DTT el pico de 400nm disminuye a la vez que aparece uno nuevo a 620nm cambiando también el color de la disolución a uno más oscuro (**Figura 123**).

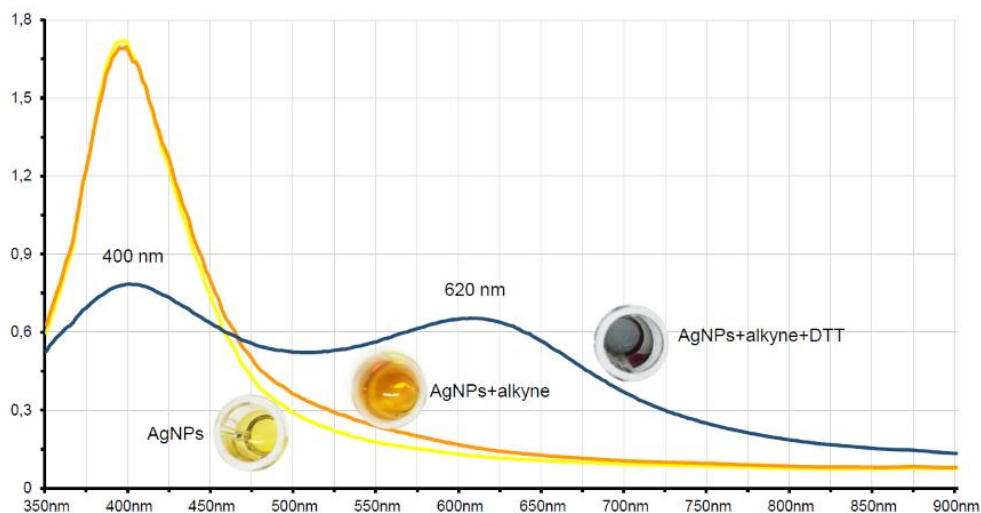


Figura 123. Propiedades ópticas: 1.5nM AgNPs, 7.7×10^{-5} % Alk, 1.6 μ M DTT, 0.5% PVA, agua milli Q, T^a amb. (20°C).

6.4.2 Microscopías SEM/TEM

SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

Preparación de la muestra:

-Añadir 1 μ L de las disoluciones CAu (AgNPs+PVA), CA (CAu +Alk) y DA (CA + DTT) sobre el disco dorado y secar a T^a amb. (**Figura 124**).

-Lavar con 1 μ L de agua Milli Q un par de veces y secar la gota previamente con papel.



Figura 124. Disco de SiO₂ recubierto por una fina capa de oro.

TEM (*Transmission Electron Microscopy*):

Preparación de la muestra:

-Depositar una gota de 2 μ L de la disolución DA y dejar secar sobre el lado recubierto de carbono en rejilla de la **Figura 125**.

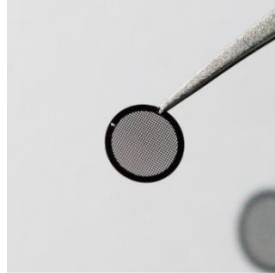


Figura 125. Rejilla de cobre recubierta por una fina capa de carbono.

En la **Figura 126** se muestran los resultados obtenidos de la caracterización de los nanoclusters sintetizados. Para el TEM se ha utilizado una rejilla de cobre recubierta con carbono como soporte, mientras para el SEM se ha epleado un disco de SiO₂ recubierto de oro.

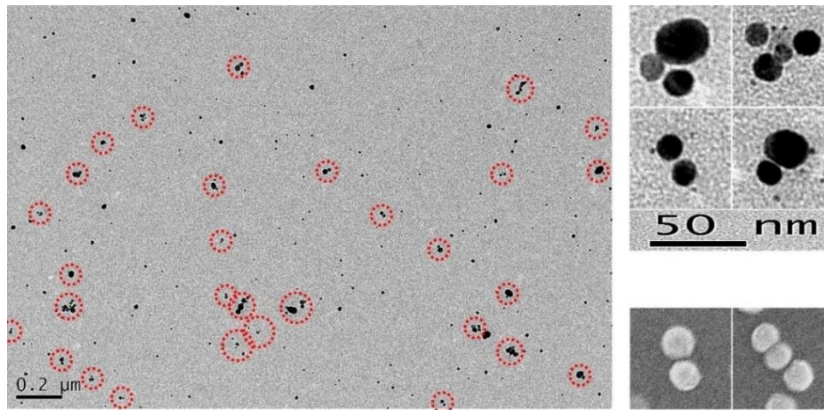


Figura 126. Imágenes TEM a 100keV de los nanoclusters en negro (izq y dcha arriba) y SEM a 5keV del dímero y trímero en blanco (dcha abajo).

6.4.3 Espectroscopia RAMAN

La espectroscopia Raman es una técnica utilizada para observar los modos: vibracional, rotacional y de baja frecuencia en un sistema. La espectroscopia Raman se usa comúnmente en análisis químico con el fin de proporcionar una estructura establecida mediante la cual se pueden identificar las moléculas (**Figura 127**).

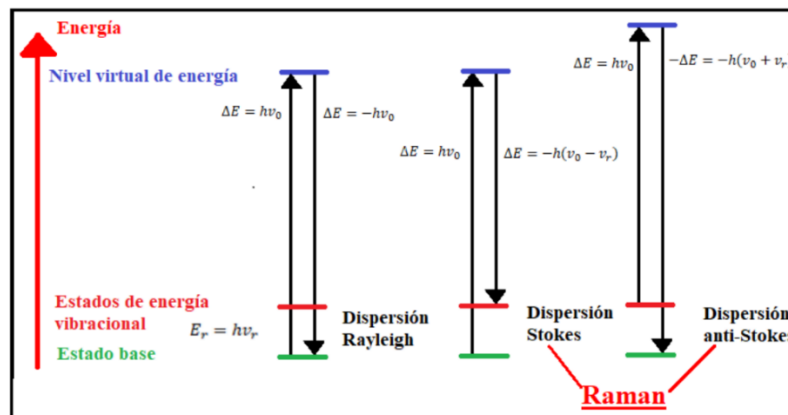


Figura 127. Diagrama de los niveles de energía de los estados implicados en la señal de Raman. Fuente (wikipedia.org/wiki/Efecto_Raman).

Cuando se incide un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 sobre una muestra, la luz del punto iluminado se recoge con una lente y se envía la información a un monocromador. Un ejemplo de ello, son las nanopartículas (NPs) metálicas y su capacidad para liberar calor local después de ser irradiadas⁴⁸.

La formación de dímeros mediante el uso del crosslinker DTT aumenta significativamente la señal SERS del espectro correspondiente al alquino (**Figura 128**). Durante la síntesis de estos dímeros, se forman enlaces fuertemente covalentes entre el azufre y la plata, lo que favorece un aumento considerable del comportamiento plasmónico del nanocluster.

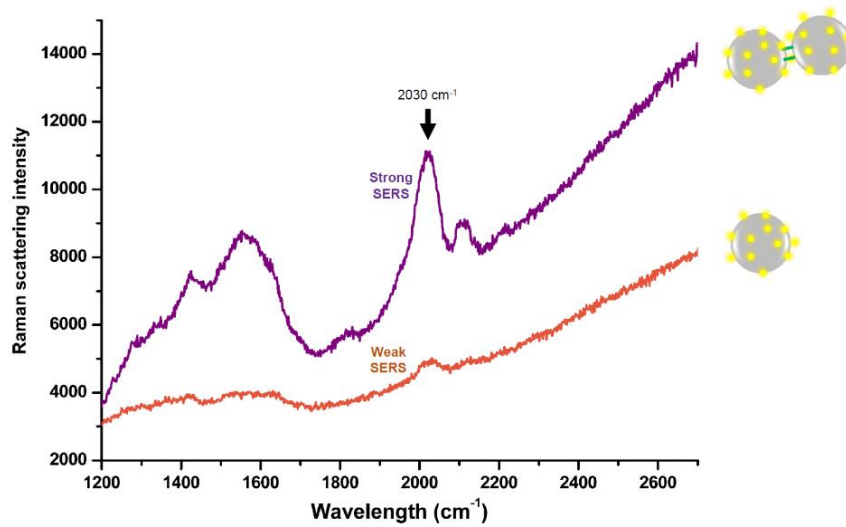


Figura 128. Espectroscopia Raman: tiempo de integración 10s, láser de 533 nm, sustrato de SiO₂, objetivo 20X.

APÉNDICE

7 APÉNDICE

7.1 Acrónimos

Ab	<i>Antibody</i>
Ap	<i>Aptamer</i>
ALISA	<i>Aptamer-Linked Immobilised Sorbent Assay</i>
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i>
APTES	<i>3-aminopropyl-triethoxysilane</i>
ASP	<i>Amnesic Shellfish Poisoning</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
BB	<i>Blocking Buffer</i>
BLG	<i>β-Lactoglobulin</i>
BP	<i>Blood Plasma</i>
BS	<i>Blood Serum</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAS	<i>Casein</i>
CB	<i>Coating Buffer</i>
CMOS	<i>Complementary Metal-Oxide-Semiconductor</i>
CTES	<i>Carboxyethylsilanetriol disodium salt</i>
CWA	<i>Chemical Warfare Agents</i>
DA	<i>Domoic Acid</i>
DIW	<i>Deionized Water</i>
EDC	<i>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride</i>
EtOH	<i>Ethanol</i>
GLN	<i>Gliadin</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
Ig	<i>Immunoglobulin</i>
iPrOH	<i>Isopropyl alcohol</i>
IR	<i>Infrared</i>
LOC	<i>Lab-on-a-chip</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LRSP	<i>Long-Range Surface Plasmon</i>
LSPR	<i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>
mAb	<i>Monoclonal Antibody</i>
pAb	<i>Polyclonal Antibody</i>

APÉNDICE

MEA	<i>Monoethanolamine</i>
MSD	<i>Mass Surface Density</i>
MZI	<i>Mach-Zehnder Interferometer</i>
NHS	<i>N-hydroxysuccinimide</i>
NIR	<i>Near-infrared</i>
OFG	<i>Optical fiber gratings</i>
OVA	<i>Ovalbumin</i>
OVO	<i>Ovomucoid</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCB	<i>Printed Circuit Board</i>
PIC	<i>Photonic integrated circuit</i>
PPP	<i>Platelet Poor Plasma</i>
PRP	<i>Platelet Rich Plasma</i>
PWG	<i>Prolamin Working Group</i>
QCM	<i>Quartz Crystal Microbalance</i>
RI	<i>Refractive Index</i>
RIU	<i>Refractive Index Units</i>
RT	<i>Room Temperature</i>
SAW	<i>Surface Acoustic Wave</i>
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
SERS	<i>Surface-enhanced Raman spectroscopy</i>
Si₃N₄	<i>Silicon Nitride</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
SPW	<i>Surface Plasmon Wave</i>
SRSP	<i>Short-Range Surface Plasmon</i>
TG	<i>Thrombin Generation</i>
TIR	<i>Total internal reflection</i>
TMS	<i>N-[3-Trimethoxysilyl]propyl] ethylenediamine triacetic acid trisodium salt</i>
UTI	<i>Urinary Tract Infection</i>
WB	<i>Whole Blood</i>
WGM	<i>Whispering-Gallery Modes</i>

7.2 Índice de figuras

Figura 1. Esquema de funcionamiento y principio en el que se basa un biosensor.	3
Figura 2. Esquema representativo de un enzima como elemento de reconocimiento. Fuente (biotecnologiauniversidad.blogspot.com).....	7
Figura 3. Representación gráfica de la estructura de un anticuerpo y sus isotipos. Fuente (www.3tres3.com/articulos/inmunidad-humoral-especifica-1-2-ig-tipos-y-estructura).	8
Figura 4. Representación del ApTHR en su forma de silla (a) e interacción entre la THR en gris con el ApTHR en rojo y azul (b). Fuente (www.researchgate.net/figure/Quadruplex-structure).	8
Figura 5. Clasificación de los biosensores según el sistema de transducción.....	9
Figura 6. Esquema representativo del funcionamiento de un transductor SPR. Fuente (www.bruker.com/de/products/surface-plasmon-resonance).....	9
Figura 7. Fenómeno de reflexión interna total. Fuente (wikipedia.org/wiki/TIR).	10
Figura 8. Desplazamiento de la señal al hibridar una secuencia de ARN sobre RR. Fuente (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20491114).....	10
Figura 9. Esquema del sensor del interferómetro Mach-Zehnder. Fuente (www.uv.es/materomo/resources/g5.pdf).	11
Figura 10. Esquema de la sección de una fibra óptica.	11
Figura 11. Esquema de un transductor de fibra óptica. Fuente (demulacion.blogspot.com/2019/05).	11
Figura 12. Ejemplo de un transductor electroquímico (pila eléctrica). Fuente (www.lifeder.com/anodo-y-catodo).....	12
Figura 13. Reacción de oxidación y reducción en una pila electroquímica. Fuente (fq.iespm.es/documentos/diego_navarrete/2_quimica/8.pdf).....	12
Figura 14. Gráfica representativa de un proceso catalítico. Fuente (apuntesbioquimicageneral.blogspot.com).	14
Figura 15. Esquema de un biosensor óptico libre de marcaje, detección cambios de RI. Fuente (www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/refraction-index).	15
Figura 16. Diseño del dispositivo para un microanillo resonador cubierto por un canal microfluídico. Fuente (www.osapublishing.org/boe/abstract.cfm?uri=boe-2-2-271).....	15
Figura 17. Gráfica del sensograma para la identificación de los parámetros de rendimiento de un RR. ..	17
Figura 18. Esquema RR con los parámetros Q-Factor, Leff, FSR y ER. Fuente (slideplayer.com/slide/10775470/).	17
Figura 19. Imagen del RR utilizado en la detección. Fuente (link.springer.com/article/10.1007/s00216-010-4237-z).....	18
Figura 20. Escáner de fluorescencia GenePix 4100A Microarray.	25
Figura 21. Equipo de microimpresión MicroGrid II (BioRobotics).	25
Figura 22. Equipo de microimpresión SCIENION S1.	26
Figura 23. Espectrofotómetro de microgota Nanodrop.....	26
Figura 24. Equilibrio ácido base para una disolución de HEPES.	27
Figura 25. Equilibrio ácido base para una disolución de MES.	27
Figura 26. Estructura del polisorbato 20.	28
Figura 27. Estructura del glutaraldehído.	28
Figura 28. Reacción de formación de enlace covalente mediante la pareja de reticulantes EDC/NHS. Fuente (www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning).....	28
Figura 29. Diseños fotónicos de los chips V1 y V2.	31
Figura 30. Imagen de una oblea de silicio con una dimensión de 6 pulgadas.....	31
Figura 31. (Izq) Oblea de 4" para chips fotónicos V1. (Dcha) Oblea de 6" para chips fotónicos V2.	31
Figura 32. Esquema de los tipos de resina fotosensible durante el proceso de fotolitografía. Fuente (docplayer.es/76668955).	32
Figura 33. Esquema de las etapas del proceso de fabricación de las capas de un chip fotónico.	32
Figura 34. Bomba peristáltica y conjunto chip fotónico/microfluídica del set-up de laboratorio.	33
Figura 35. Identificación de la resonancia de la respuesta del RR a la disolución tampón.	33
Figura 36. Desplazamiento a tiempo real de la resonancia del RR al producirse el cambio de RI.	34
Figura 37. Sensograma a tiempo real frente al desplazamiento de la longitud de onda (pm) de los RR. ...	34
Figura 38. Gráfica de sensado donde se relacionan la resonancia de los anillos junto al sensograma.	34
Figura 39. Ensayos tipo 1 y 2 para la detección de trombina sobre superficies de Si ₃ N ₄ plano.....	36
Figura 40. Esquema de la matriz depositada sobre Si ₃ N ₄ plano para la inmovilización de las sondas.	36

Figura 41. Ensayos tipo 3 y 4 para la detección de trombina sobre superficies de Si_3N_4 plano.....	37
Figura 42. Esquema de la matriz depositada sobre Si_3N_4 plano para la inmovilización de las sondas.	38
Figura 43. Esquema del protocolo C para la detección de trombina sobre superficies de Si_3N_4 plano.	39
Figura 44. Esquema de la matriz depositada sobre Si_3N_4 plano para la inmovilización del ApTHR.....	40
Figura 45. Esquema de la matriz depositada sobre Si_3N_4 plano para la inmovilización del ApTHR a diferentes concentraciones.	41
Figura 46. Esquema de la matriz depositada sobre Si_3N_4 plano para la inmovilización del ApTHR.....	42
Figura 47. Esquema del chip fotónico V1 con la distribución de los RR sobre la superficie.....	44
Figura 48. Esquema de la bomba peristáltica para experimento de una muestra de WB activada.	45
Figura 49. Esquema del ensayo empleado para la detección de alérgenos.	46
Figura 50. Esquema de los ensayos para la detección de OVO sobre superficies planas de Si_3N_4	46
Figura 51. Esquema de la matriz depositada sobre Si_3N_4 plano para la inmovilización de las sondas.	47
Figura 52. Esquema del ensayo realizado para la detección de GLN sobre superficies planas de Si_3N_4	48
Figura 53. Esquema de la matriz depositada sobre Si_3N_4 plano para la inmovilización de las sondas.	49
Figura 54. Esquema del ensayo para el control de inmovilización del anticuerpo monoclonal.	50
Figura 55. Esquema de la matriz depositada sobre Si_3N_4 plano para la inmovilización de los mAb.....	51
Figura 56. Esquema del chip fotónico V2 para la detección de GLN.....	52
Figura 57. Esquema del chip fotónico V2 para la detección de CAS.	53
Figura 58. Esquema del chip fotónico V2 para la detección de GLN.....	54
Figura 59. Esquema del ensayo para la detección de E.coli sobre superficies de Si_3N_4 plano.	55
Figura 60. Esquema de la matriz depositada sobre Si_3N_4 plano para la inmovilización de las sondas.	56
Figura 61. Esquema del ensayo para el control de inmovilización del anticuerpo policlonal pAb-PCV2....	57
Figura 62. Esquema de la matriz depositada sobre Si_3N_4 plano para la inmovilización de los pAb.....	58
Figura 63. Esquema del chip fotónico V1 con la distribución de los RR para la detección de PCV2.....	60
Figura 64. Esquema del chip fotónico V1 con la distribución de los RR para la detección de PCV2.....	61
Figura 65. Esquema de las tres vías para la activación de la coagulación: generación de la fibrina. Fuente (slideshare.net/AleRdzgarcia/coagulacion-sanguinea-40174483/4).	65
Figura 66. Imagen de las superficies planas de nitruro de silicio, escaneadas tras la fase de biofuncionalización.....	66
Figura 67. Imagen de las superficies planas de nitruro de silicio, escaneadas tras la fase de biodetección.	67
Figura 68. Gráfica del F-B y S/R de las superficies 1 y 2 del ensayo para la detección de trombina.....	67
Figura 69. Imagen de las superficies planas de nitruro de silicio, escaneadas tras la fase de biodetección.	69
Figura 70. Gráfica de F-B de las superficies 1, 2, 3 y 4 del ensayo para la detección de trombina.....	69
Figura 71. Imagen de las cuatro superficies del protocolo C tras la fase de biodetección.	71
Figura 72. Señal de fluorescencia para diferentes concentraciones de sonda inmovilizada.	71
Figura 73. Representación gráfica de F-B frente diferentes concentraciones de sonda inmovilizada.	72
Figura 74. Señal fluorescencia para diferentes concentraciones de THR y porcentajes de matriz (WB)....	73
Figura 75. Señal de fluorescencia para diferentes concentraciones de THR y porcentajes de matriz (BP).74	74
Figura 76. Señal de fluorescencia para diferentes concentraciones de THR y porcentajes de matriz (BS).74	74
Figura 77. Representación gráfica de (F-B) frente a las diferentes concentraciones de THR aplicadas, adicionadas en una matriz de sangre completa (WB) y valores de la señal de fluorescencia (F-B).....	75
Figura 78. Representación gráfica de (F-B) frente a las diferentes concentraciones de THR aplicadas, adicionadas en una matriz de plasma sanguíneo (BP) y valores de la señal de fluorescencia (F-B).	75
Figura 79. Representación gráfica de (F-B) frente a las diferentes concentraciones de THR aplicadas, adicionadas en una matriz de suero sanguíneo (BS) y valores de la señal de fluorescencia (F-B).	76
Figura 80. Distribución de los RRfunc. y los RRref. sobre el chip fotónico basado en estructuras RR.	76
Figura 81. Representación gráfica de las frecuencias para todos los RR del chip fotónico.	77
Figura 82. Esquema de inmovilización del chip fotónico con la distribución de los RRfunc. y los RRref. ...	77
Figura 83. Imagen de los componentes que forman el set-up de laboratorio.....	78
Figura 84. Representación gráfica del desplazamiento óptico en pm frente al tiempo en minutos.....	79
Figura 85. Representación gráfica de la señal neta en pm frente al tiempo en minutos.....	79
Figura 86. Esquema de la composición de una muestra de sangre completa centrifugada. Fuente (www.referenciabancodesangre.net/componentes-la-sangre).	80
Figura 87. Imágenes de las muestras activadas de sangre completa anticoagulada a diferentes diluciones	81

Figura 88. Listado de alérgenos obligados a aparecer etiquetados según el Real Decreto 2220/2004. Fuente (alcatraz.es/alergenos).....	81
Figura 89. Imágenes del ensayo 1 para las superficies 1 y 2 y del ensayo 2 para las superficies 3 y 4.	83
Figura 90. Representación gráfica de la señal de fluorescencia F-B de la detección del OVO sobre Si ₃ N ₄ plano.....	83
Figura 91. Componentes que constituyen la estructura del gluten de trigo: gliadina y glutenina. Fuente (avancesenmedicina97.blogspot.com/2013/11/avance-en-el-diseno-de-un-biosensor).....	84
Figura 92. Imágenes del ensayo 3, para las superficies 1 (blanco) y 2 (muestra).	85
Figura 93. Representación gráfica de los resultados del inmunoensayo 3 sobre las superficies de Si ₃ N ₄ plano.....	85
Figura 94. Imágenes del control de inmovilización para los mAb de GLN, OVA, CAS y BLG.....	86
Figura 95. Representación gráfica de los resultados del control de inmovilización de los mAb.....	87
Figura 96. Esquema del chip fotónico con la distribución de los RR sobre la superficie.....	89
Figura 97. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para GLN 1.25ppm.	89
Figura 98. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para GLN 2.5ppm.	90
Figura 99. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para GLN 5ppm.	91
Figura 100. Representación de la recta de calibrado para la detección de GLN.	92
Figura 101. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para CAS 1.25ppm.	93
Figura 102. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para CAS 2.5ppm.	93
Figura 103. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para CAS 5ppm.....	94
Figura 104. Representación de la recta de calibrado para la detección de CAS.....	94
Figura 105. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para el extracto GLN.	95
Figura 106. Representación esquemática de las partes de una bacteria y de un virus. Fuente (slideplayer.es/slide/4640577).	96
Figura 107. Imagen escaneada tras la fase de biofuncionalización para el reconocimiento de la E.coli. ...	98
Figura 108. Representación gráfica de los resultados del ensayo 1 para la detección de la E.coli.....	99
Figura 109. Imágenes del control de inmovilización del pAb-PCV2 con diferentes bloqueos.....	100
Figura 110. Imágenes del control de inmovilización del pAb-PCV2 con diferentes bloqueos.....	101
Figura 111. Representación gráfica de los resultados del control de inmovilización del pAb-PCV2.....	102
Figura 112. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/100, BSA.	104
Figura 113. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/100. OVA.	105
Figura 114. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/100, GF.	105
Figura 115. Representación gráfica del desplazamiento óptico en pm frente al bloqueo empleado.	106
Figura 116. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/5000.	107
Figura 117. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/2000.	108
Figura 118. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/1000.	108
Figura 119. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/500.	109
Figura 120. Representación gráfica del desplazamiento óptico frente al tiempo para PCV2 1/100.	109
Figura 121. Representación gráfica de la dosis dependencia del PCV2 a diferentes diluciones.....	110
Figura 122. Estrategia de síntesis para una sonda Raman plasmónica basada en alquino.....	117
Figura 123. Propiedades ópticas: 1.5nM AgNPs, 7.7e ⁻⁵ % Alk, 1.6μM DTT, 0.5% PVA, agua milli Q, T ^a amb. (20°C).....	119
Figura 124. Disco de SiO ₂ recubierto por una fina capa de oro.	119
Figura 125. Rejilla de cobre recubierta por una fina capa de carbono.	120
Figura 126. Imágenes TEM a 100keV de los nanoclusters en negro (izq y dcha arriba) y SEM a 5keV del dímero y trímero en blanco (dcha abajo).....	120
Figura 127. Diagrama de los niveles de energía de los estados implicados en la señal de Raman. Fuente (wikipedia.org/wiki/Efecto_Raman).....	120
Figura 128. Espectroscopia Raman: tiempo de integración 10s, láser de 533 nm, sustrato de SiO ₂ , objetivo 20X.	121

7.3 Índice de tablas

Tabla 1. Características de los biosensores vs. técnicas convencionales.	4
Tabla 2. Características de las sondas biológicas.....	4
Tabla 3. Esquema de las superficies empleadas en los experimentos de muestras reales biológicas.	43
Tabla 4. Esquema de las superficies preparadas para la detección de trombina: protocolo A.	66
Tabla 5. Esquema de los chips empleados para la detección de trombina: protocolo B.....	68
Tabla 6. Esquema de las superficies empleados para la detección de trombina: protocolo C.	70
Tabla 7. Esquema de las superficies para la detección de THR en el seno de la matriz WB.....	72
Tabla 8. Esquema de las superficies para la detección de THR en el seno de la matriz BP.	73
Tabla 9. Esquema de las superficies para la detección de THR en el seno de la matriz BS.	73
Tabla 10. Valores del desplazamiento de la resonancia para la detección de trombina a 1ppm.....	79
Tabla 11. Valores del desplazamiento óptico neto para la detección de trombina a 1ppm	80
Tabla 12. Esquema de las superficies preparadas para la detección de OVO: protocolo D.	82
Tabla 13. Esquema de las superficies preparadas para la detección de GLN: protocolo D.....	84
Tabla 14. Esquema de las superficies preparadas para el control de inmovilización de los mAb.....	86
Tabla 15. Porcentajes de contribución por enlace covalente del control de inmovilización de los mAb....	88
Tabla 16. Distribución de los RR sobre la superficie del chip fotónico para la detección de CAS.....	89
Tabla 17. Distribución de los RR sobre la superficie del chip fotónico para la detección de CAS.....	92
Tabla 18. Distribución de los RR sobre la superficie del chip fotónico para la detección de GLN.	95
Tabla 19. Esquema de las superficies preparadas para la detección de E.coli: protocolo D.	97
Tabla 20. Esquema de las superficies preparadas para el control de inmovilización del pAb-PCV2 (block BSA, OVA, GF).....	100
Tabla 21. Esquema de las superficies preparadas para el control de inmovilización del pAb-PCV2 (Block BB, MEA y Sin bloqueo).....	100
Tabla 22. Porcentaje de contribución por enlace covalente del control de inmovilización del pAbPCV2	102
Tabla 23. Esquema de la fase de biofuncionalización de chips fotónicos para la detección del PCV2 (block BSA, OVA y GF).....	103
Tabla 24. Distribución de los RR sobre la superficie del chip fotónico para la detección del PCV2.....	103
Tabla 25. Distribución de los RR sobre la superficie del chip fotónico para la detección del PCV2.....	107

7.4 Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Oxidación de la glucosa catalizada por la enzima glucosa oxidasa.	5
Ecuación 2. Hidrólisis del ATP: reacción exotérmica.....	13
Ecuación 3. Límite de detección (LOD).....	16
Ecuación 4. Rango espectral libre (FSR).....	16
Ecuación 5. Longitud de onda (λ)	16
Ecuación 6. Relación de extinción (ER)	16

BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Scognamiglio, V., Arduini, F., Palleschi, G., & Rea, G. *Biosensing technology for sustainable food safety. TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2014), 62, 1–10.
- 2.-Olaru, A., Bala, C., Jaffrezic-Renault, N., & Aboul-Enein, H. Y. *Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors in Pharmaceutical Analysis. Critical Reviews in Analytical Chemistry* (2015), 45(2), 97–105.
- 3.-Nigam, V. K., & Shukla, P. *Enzyme based biosensors for detection of environmental pollutants-A review. J Microbiol Biotechnol* (2015), 25(11), 1773–1781.
- 4.-Chae, M.-S., Kim, J., Jeong, D., Kim, Y., Roh, J. H., Lee, S. M., Heo, Y., Kang, J. Y., Lee, J. H., Yoon, D. S., Kim, T. G., Chang, S. T., & Hwang, K. S. *Enhancing surface functionality of reduced graphene oxide biosensors by oxygen plasma treatment for Alzheimer's disease diagnosis. Biosensors and Bioelectronics* (2017), 92, 610–617.
- 5.-Saito, M., Uchida, N., Furutani, S., Murahashi, M., Espulgar, W., Nagatani, N., Nagai, H., Inoue, Y., Ikeuchi, T., Kondo, S., Uzawa, H., Seto, Y., & Tamiya, E. *Field-deployable rapid multiple biosensing system for detection of chemical and biological warfare agents. Microsystems & Nanoengineering* (2018), 4, 17083.
- 6.-Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. *An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. Biotechnology Advances* (2010), 28(2), 232–254.
- 7.-Rocchitta, G., Spanu, A., Babudieri, S., Latte, G., Madeddu, G., Galleri, G., Nuvoli, S., Bagella, P., Demartis, M., Fiore, V., Manetti, R., & Serra, P. *Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. Sensors* (2016), 16(6), 780.
- 8.-Clark, L. C., & Lyons, C. *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Annals of the New York Academy of Sciences* (1962), 102(1), 29–45.
- 9.-Kermani, S. K. *Accuracy and Precision of Measured Blood Sugar Values by Three Glucometers Compared to the Standard Technique. Journal of clinical and diagnostic research* (2017).
- 10.-Mach, K. E., Wong, P. K., & Liao, J. C. *Biosensor diagnosis of urinary tract infections: a path to better treatment? Trends in Pharmacological Sciences* (2011), 32(6), 330–336.
- 11.-Li Wang, Sipe, D. M., Yong Xu, & Qiao Lin. *A MEMS Thermal Biosensor for Metabolic Monitoring Applications. Journal of Microelectromechanical Systems* (2008), 17(2), 318–327.
- 12.-Kapelko M, Lansink A.O, Stefanou S.E. *Effect of Food Regulation on the Spanish Food Processing Industry: A Dynamic Productivity Analysis. PLoS ONE* (2015), 10(6): e0128217.
- 13.-Farkas, E., Szekacs, A., Kovacs, B., Olah, M., Horvath, R., & Szekacs, I. *Label-free optical biosensor for real-time monitoring the cytotoxicity of xenobiotics: A proof of principle study on glyphosate. Journal of Hazardous Materials* (2018), 351, 80–89.
- 14.-Hiep, H. M., Endo, T., Kerman, K., Chikae, M., Kim, D.-K., Yamamura, S., Takamura, Y., Tamiya, E. *A localized surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of casein in milk. Science and Technology of Advanced Materials* (2007), 8(4), 331–338.
- 15.-Ercole, C., Del Gallo, M., Mosiello, L., Baccella, S., & Lepidi, A. *Escherichia coli detection in vegetable food by a potentiometric biosensor. Sensors and Actuators B: Chemical* (2003), 91(1-3), 163–168.
- 16.-Mohd Syaifudin, A. R., Jayasundera, K. P., & Mukhopadhyay, S. C. *A low cost novel sensing system for detection of dangerous marine biotoxins in seafood. Sensors and Actuators B: Chemical* (2009), 137(1), 67–75.
- 17.-Justino, C., Duarte, A., & Rocha-Santos, T. *Recent Progress in Biosensors for Environmental Monitoring: A Review. Sensors* (2017), 17(12), 2918.
- 18.-Mehrotra, P. *Biosensors and their applications – A review. Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* (2016), 6(2), 153–159.

- 19.-Yue, G., Su, S., Li, N., Shuai, M., Lai, X., Astruc, D., & Zhao, P. *Gold nanoparticles as sensors in the colorimetric and fluorescence detection of chemical warfare agents. Coordination Chemistry Reviews (2016), 311, 75–84.*
- 20.-Stoltenburg, R., Reinemann, C., & Strehlitz, B. *SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. Biomolecular Engineering (2007), 24(4), 381–403.*
- 21.-Ku, T.-H., Zhang, T., Luo, H., Yen, T., Chen, P.-W., Han, Y., & Lo, Y.-H. *Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing. Sensors (2015), 15(7), 16281–16313.*
- 22.-Qavi, A. J., & Bailey, R. C. *Multiplexed Detection and Label-Free Quantitation of MicroRNAs Using Arrays of Silicon Photonic Microring Resonators. Angewandte Chemie (2010), 122(27), 4712–4715.*
- 23.-Chiavaioli, F., Baldini, F., Tombelli, S., Trono, C., & Giannetti, A. *Biosensing with optical fiber gratings. Nanophotonics (2017), 6(4).*
- 24.-Yakovleva, M., Bhand, S., & Danielsson, B. *The enzyme thermistor—A realistic biosensor concept. A critical review. Analytica Chimica Acta (2013), 766, 1–12.*
- 25.-Ozalp, V. C., Bayramoglu, G., Erdem, Z., & Arica, M. Y. *Pathogen detection in complex samples by quartz crystal microbalance sensor coupled to aptamer functionalized core-shell type magnetic separation. Analytica Chimica Acta (2015), 853, 533–540.*
- 26.-Mishra, N., Kadam, Y., Malek, N. *Overview of enzyme based biosensors and their applications. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy (2018), 12 (1), 108-11.*
- 27.-Wu, S., Zhang, H., Shi, Z., Duan, N., Fang, C., Dai, S., & Wang, Z. *Aptamer-based fluorescence biosensor for chloramphenicol determination using upconversion nanoparticles. Food Control (2015), 50, 597–604.*
- 28.-Zhao, Y., Zheng, Y., Kong, R., Xia, L., & Qu, F. *Ultrasensitive electrochemical immunosensor based on horseradish peroxidase (HRP)-loaded silica-poly(acrylic acid) brushes for protein biomarker detection. Biosensors and Bioelectronics (2016), 75, 383–388.*
- 29.-Zhou, Y., Yang, Z., Li, X., Wang, Y., Yin, H., & Ai, S. *Electrochemical biosensor for detection of DNA hydroxymethylation based on glycosylation and alkaline phosphatase catalytic signal amplification. Electrochimica Acta (2015), 174, 647–652.*
- 30.-Li, M., Zhao, J., Chu, H., Mi, Y., Zhou, Z., Di, Z., Zhao, M., & Li, L. *Light-Activated Nanoprobes for Biosensing and Imaging. Advanced Materials (2018), 1804745.*
- 31.-Nitkowski, A., Baeumner, A., & Lipson, M. *On-chip spectrophotometry for bioanalysis using microring resonators. Biomedical Optics Express (2011), 2(2), 271.*
- 32.-Barrios, C. A., Gylfason, K. B., Sánchez, B., Griol, A., Sohlström, H., Holgado, M., & Casquel, R. *Slot-waveguide biochemical sensor. Optics Letters (2007), 32(21), 3080.*
- 33.-Liedberg, B., Nylander, C., & Lunström, I. *Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. Sensors and Actuators (1983), 4, 299–304.*
- 34.-Melnik, E., Muellner, P., Mutinati, G. C., Koppitsch, G., Schrank, F., Hainberger, R., & Laemmerhofer, M. *Local functionalization of CMOS-compatible Si₃N₄ Mach-Zehnder interferometers with printable functional polymers. Sensors and Actuators B: Chemical (2016), 236, 1061–1068.*
- 35.-Ymeti, A., Kanger, J. S., Greve, J., Lambeck, P. V., Wijn, R., & Heideman, R. G. *Realization of a multichannel integrated Young interferometer chemical sensor. Applied Optics (2003), 42(28), 5649.*
- 36.-Skivesen, N., Têtu, A., Kristensen, M., Kjems, J., Frandsen, L. H., & Borel, P. I. *Photonic-crystal waveguide biosensor. Optics Express (2007), 15(6), 3169.*
- 37.-Fan, X., White, I. M., Shopova, S. I., Zhu, H., Suter, J. D., & Sun, Y. *Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. Analytica Chimica Acta (2008), 620(1-2), 8–26.*
- 38.-Claes, T., Bogaerts, W., & Bienstman, P. *Experimental characterization of a silicon photonic biosensor consisting of two cascaded ring resonators based on the Vernier-effect and introduction of a curve fitting method for an improved detection limit. Optics Express (2010), 18(22), 22747.*

- 39.-Xu, D.-X., Vachon, M., Densmore, A., Ma, R., Janz, S., Delâge, A., Lapointe, J., Cheben, P., Schmid, J. H., Post, E., Messaoudène, S., & Fédéli, J.-M. *Real-time cancellation of temperature induced resonance shifts in SOI wire waveguide ring resonator label-free biosensor arrays*. *Optics Express* (2010), 18(22), 22867.
- 40.-Sosic, A., Meneghello, A., Cretaio, E., & Gatto, B. *Human Thrombin Detection Through a Sandwich Aptamer Microarray: Interaction Analysis in Solution and in Solid Phase*. *Sensors* (2011), 11(10), 9426–9441.
- 41.-Kim, Y. S., Song, M. Y., Jurng, J., & Kim, B. C. *Isolation and characterization of DNA aptamers against Escherichia coli using a bacterial cell–systematic evolution of ligands by exponential enrichment approach*. *Analytical Biochemistry* (2013), 436(1), 22–28.
- 42.-Marton, S., Cleto, F., Krieger, M. A., & Cardoso, J. *Isolation of an Aptamer that Binds Specifically to E. coli*. *PLOS ONE* (2016), 11(4), e0153637.
- 43.-Van Eckert, R., Berghofer, E., Ciclitira, P. J., Chirido, F., Denery-Papini, S., Ellis, H. J., Ferranti, P., Goodwin, P., Immer, U., Mamone, G., Méndez, E., Mothes, T., Novalin, S., Osman, A., Rumbo, M., Stern, M., Thorell, L., Whim, A., & Wieser, H. *Towards a new gliadin reference material–isolation and characterisation*. *Journal of Cereal Science* (2006), 43(3), 331–341.
- 44.-Park, M. K., Kee, J. S., Quah, J. Y., Netto, V., Song, J., Fang, Q., La Fosse, E. M., & Lo, G.-Q. *Label-free aptamer sensor based on silicon microring resonators*. *Sensors and Actuators B: Chemical* (2013), 176, 552–559.
- 45.-Ninivaggi, M., Apitz-Castro, R., Dargaud, Y., de Laat, B., Hemker, H. C., & Lindhout, T. *Whole-Blood Thrombin Generation Monitored with a Calibrated Automated Thrombogram-Based Assay*. *Clinical Chemistry* (2012), 58(8), 1252–1259.
- 46.-Real Decreto 2220/2004, de 26 de noviembre, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio (www.boe.es/eli/es/rd/2004/11/26/2220).
- 47.-Web Organización Mundial de la Salud (www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli).
- 48.-Govorov, A. O., & Richardson, H. H. *Generating heat with metal nanoparticles*. *Nano Today* (2007), 2(1), 30–38.

