

# Vías de inmovilización de biomoléculas sobre SU-8 y otras superficies poliméricas para su utilización en biosensado óptico sin marcaje

Tesis Doctoral:

Zeneida Díaz Betancor



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Directores:

María José Bañuls Polo

Ángel Maquieira Català

Valencia, Julio 2020





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento  
Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM)

# **Vías de inmovilización de biomoléculas sobre SU-8 y otras superficies poliméricas para su utilización en biosensado óptico sin marcaje**

**Tesis Doctoral**

*Zeneida Díaz Betancor*

Directores

*María José Bañuls Polo*

*Ángel Maquieira Català*

Valencia, Julio 2020



*“Be less curious about people  
and more curious about ideas”*

Mařia Sklodowska Curie





ÁNGEL MAQUIEIRA CATALÁ y MARÍA JOSÉ BAÑULS POLO, Doctores en Química y profesores en la Universitat Politècnica de València,

CERTIFICAN:

Que Zeneida Díaz Betancor desarrolló el trabajo "Vías de inmovilización de biomoléculas sobre SU-8 y otras superficies poliméricas para su utilización en biosensado óptico sin marcaje" bajo su supervisión en el Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico de la Universitat Politècnica de València, como un proyecto de tesis para obtener el título de doctor en Química en la Universitat Politècnica de València.

Valencia, 20 de mayo de 2020





## **Agradecimientos**

En primer lugar, quería agradecer a mis tutores María José y Ángel por darme la oportunidad y permitirme desarrollar mi tesis en su grupo. También, por guiarme durante estos años y enseñarme durante cada etapa de la tesis.

En este sentido también quería agradecer a Sergi quien me enseñó las primeras nociones del funcionamiento del laboratorio, a MJ quien fue una buena compañera durante mis primeros meses en el laboratorio. En general al ambiente ameno y dinámico que había cada día en el laboratorio, gracias a todos los compañeros tanto por sus bromas como por su paciencia. Pues, me ayudaron tanto aprender tanto de forma teórica o experimental como personal. Erik, Salva, Javi, Edurne, Pilar, Miquel, Dani, Gabi, Sara, Cynthia, Ana, Augusto, Vicki, Pedro, Rafa, Noelle, Maribel, Estrella, Luis, Miguel Ángel y Nuria.

También, quería agradecer la colaboración realizada con los compañeros del NTC, Jad, Jaime y Maribel. Y la colaboración realizada con la UPM con el grupo del profesor Holgado.

Agradecer a la financiación de esta investigación por Garantía Juvenil, FEDER y los proyectos del MINECO CTQ / 2016/75749-R y TEC / 2017/84846-R. Además, fue apoyado por el Programa Horizonte 2020 de la Unión Europea en el marco del proyecto H2020-PHC-634013 (PHOCNOSIS).

Por último, me gustaría agradecer a mis padres, familiares y amigos que, aunque no todos podían estar cada día a mi lado me apoyaban a pesar de la distancia.



## Resumen

La presente tesis “Vías de inmovilización de biomoléculas sobre SU-8 y otras superficies poliméricas para su utilización en biosensado óptico sin marcaje” tiene como objetivo el diseño, desarrollo y evaluación de diferentes métodos de anclaje de biorreceptores en distintos materiales, en formato de micromatriz, con aplicación en biosensado.

En la actualidad sigue siendo un área de creciente interés desarrollar nuevos sistemas de análisis para la detección de analitos, más sensibles y selectivos, con tiempos de análisis reducidos, miniaturizables y automatizables. Estos desarrollos pueden aplicarse en dispositivos biosensores que encuentran su aplicación en campos tan diversos como diagnóstico clínico, medicina forense y medio ambiente.

Con el objetivo de desarrollar biosensores con prestaciones mejoradas se estudiaron estrategias de inmovilización de sondas sobre el soporte de ensayo basadas en el empleo de hidrogeles.

En una primera fase, los desarrollos se realizaron usando tecnología de micromatrices de fluorescencia, que permite utilizar una menor cantidad de muestra y analizar múltiples analitos y muestras a la vez, reduciendo el tiempo de análisis y el coste.

Posteriormente, los desarrollos ya optimizados se emplearon para la puesta a punto de un biosensor óptico sin marcaje de tipo BICELL (*Biophotonic Sensing Cells*) en colaboración con la UPM (Universidad Politécnica de Madrid), que se aplicaron a sistemas modelo y a problemas reales. Asimismo, y en colaboración con el Centro de Tecnología Nanofotónica de la UPV, se implementó la estrategia de inmovilización a través del uso de hidrogeles, en biosensores ópticos sin marcaje constituidos por guías de ondas corrugadas. En este caso, además de la inmovilización a través de hidrogeles, se estudió un método de inmovilización covalente de fragmentos de anticuerpos que permitió su fijación orientada y muy próxima a la superficie del sensor.

La tesis se estructura en seis capítulos. En el Capítulo 1 se da una visión general del concepto de biosensado, atendiendo a las distintas clasificaciones y los diferentes aspectos que hay que considerar en su diseño.

En el Capítulo 2 se plantean los objetivos generales y particulares de la tesis.

El Capítulo 3 plantea la aplicación de dos hidrogeles fotoinducidos derivados de fosforilcolina y dextrano para mejorar la inmovilización de biomoléculas en formato micromatriz, sobre superficies planas y usando el formato de micromatriz de fluorescencia para realizar ensayos de detección con proteínas y oligonucleótidos. La polimerización del gel y el anclaje de las sondas se lleva a cabo simultáneamente mediante la utilización de reacciones fotoinducidas empleando la química *click* de acoplamiento tiol-eno.

En el Capítulo 4 se implementa el método desarrollado en micromatriz con uno de los hidrogeles en dos tipos de biosensores interferométricos sin marcaje fabricados en SU-8. Con ambos sensores se detecta CRP en suero con muy buena sensibilidad (LOD de 21 pg/mL). Por otro lado, esta estrategia se ensaya también en sensores nanofotónicos basados en guías de ondas corrugadas con resultados prometedores. En este capítulo también se pone a punto y se evalúa en tiempo real la inmovilización de fragmentos de anticuerpo sobre la superficie del sensor nanofotónico, mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno inducida por luz UV. La monitorización en tiempo real permite demostrar el papel indispensable de la luz en el proceso de inmovilización. Utilizando esta aproximación se ensaya la detección sin marcaje de tres biomarcadores cardíacos de interés (CRP, cTnI/T y Mioglobina).

El quinto capítulo se dedica a la descripción detallada de todos los procedimientos experimentales que se llevan a cabo en los Capítulos 3 y 4.

Finalmente, el Capítulo 6 recoge las conclusiones alcanzadas a partir de los resultados obtenidos en el desarrollo de la tesis doctoral.

**Abstract**

This thesis "Biomolecule immobilization approaches on SU-8 and other polymer surfaces for label-free optical biosensing" aims to design, develop and evaluate different methods for anchoring bioreceptors in different materials, in a microarray format, with application in biosensing.

Currently, it is still an area of growing interest to develop new analysis systems for the detection of biomolecules, being more sensitive and selective, with reduced analysis time, miniaturizable and automatable. These developments can be applied in biosensing devices that find utility in fields as diverse as clinical diagnosis, forensic medicine and environmental monitoring.

To develop biosensors with improved performance, here strategies for immobilization of probes on the test support based on the use of hydrogels were studied.

In a first phase, the developments were carried out using microarray technology, which uses lower amount of sample and can analyze multiple targets and samples at the same time, reducing tests time and cost.

Subsequently, the optimized developments were used to develop, in collaboration with UPM (Polytechnic University of Madrid), a label-free optical biosensor based on BICELLS (Biophotonic Sensing Cells), which were applied to model systems and real samples. Likewise, and in collaboration with the Nanophotonic Technology Center at UPV, the hydrogel-based immobilization strategy was implemented in other label-free nanophotonic biosensors consisting of corrugated waveguides. In this case, in addition to immobilization through hydrogels, we studied a method of covalent immobilization of antibody fragments that allowed them to be oriented and very close to the sensor surface.

Thus the thesis is organized into six chapters. Chapter 1 gives an overview of the concept of biosensing, and takes into account the different classifications and different items that must be considered in its design.

Chapter 2 sets out the general and particular objectives of the thesis.

Chapter 3 discusses the application of two photoinduced hydrogels, derived from phosphoricoline and dextran, respectively, to improve the immobilization of biomolecules in microarray format, on planar surfaces and using the fluorescence

microarray format to perform detection assays with proteins and oligonucleotides. The polymerization of the gel and the anchoring of the probes are carried out using photoinduced reactions using the thiol-ene coupling click chemistry, and derivatives, performing both steps simultaneously.

In Chapter 4 the method developed with one of the hydrogels in microarray format is transferred to two types of SU-8 based interferometric label-free biosensors. Both biosensors detected CRP in blood serum with very good sensitivity (LOD de 21 pg/mL). Besides, this strategy is also tested on nanophotonic sensors based on corrugated waveguides with promising results. In this chapter, immobilization of antibody fragments on the surface of the nanophotonic sensor is also performed and assessed in real time by the UV light-induced thiol-ene coupling reaction. Real-time monitoring shows the essential role of light in the immobilization process. Using this approach, the label-free detection of three cardiac biomarkers of interest (CRP, cTnl / T and Myoglobin) is tested.

The fifth chapter is devoted to the detailed description of all the experimental procedures that are carried out in chapters 3 and 4.

Finally, Chapter 6 collects the conclusions reached from the results obtained in the development of the doctoral thesis.

**Resum**

La present tesi "Vies d'immobilització de biomolècules sobre SU-8 i altres superfícies polimèriques per a la seva utilització en biosensado òptic sense marcatge" té com a objectiu el disseny, desenvolupament i avaluació de diferents mètodes d'ancoratge de bioreceptors en diferents materials, en format de micromatriu, amb aplicació en biosensat.

En l'actualitat segueix sent una àrea de creixent interès desenvolupar nous sistemes d'anàlisi per a la detecció de biomolècules, que siguin més sensibles i selectius, amb temps d'anàlisi reduïts, miniaturitzables i automatitzables. Aquests desenvolupaments poden aplicar-se en dispositius biosensors que troben la seva utilitat en camps tan diversos com diagnòstic clínic, medicina forense i medi ambient.

Amb l'objectiu de desenvolupar biosensors amb prestacions millorades es van estudiar estratègies d'immobilització de sondes sobre el suport d'assaig basades en l'ús de hidrogels.

En una primera fase, els desenvolupaments es van realitzar usant tecnologia de micromatrius, que permet utilitzar una menor quantitat de mostra i analitzar múltiples dianes i mostres alhora, reduint el temps d'anàlisi i el cost.

Posteriorment, els desenvolupaments ja optimitzats es van emprar per a la posada a punt d'un biosensor òptic sense marcatge de tipus BICELL (*Biophotonic Sensing Cells*) en col·laboració amb la UPM (Universitat Politècnica de Madrid), que es van aplicar a sistemes model i als problemes reals. Així mateix, i en col·laboració amb el Centre de Tecnologia Nanofotònica de la UPV, es va implementar l'estratègia d'immobilització a través de l'ús de hidrogels, en biosensors òptics sense marcatge constituïts per guies d'ones corrugades. En aquest cas, a més de la immobilització mitjançant hidrogels es va estudiar un mètode d'immobilització covalent de fragments d'anticossos que va permetre la seva unió orientada i molt propera a la superfície del sensor.

Així donç, la tesi s'estructura en sis capítols. En el capítol 1 es dóna una visió general del concepte de biosensat, atenent les diferents classificacions i els diferents aspectes que cal considerar en el seu disseny.

En el capítol 2 es plantegen els objectius generals i particulars de la tesi.

El Capítol 3 planteja l'aplicació de dos hidrogels fotoinduïts derivats de fosforilcolina i dextrà respectivament per millorar la immobilització de biomolècules en format micromatriu, sobre superfícies planes i usant el format de micromatriu de fluorescència per a realitzar assajos de detecció amb proteïnes i oligonucleòtids. La polimerització del gel i l'ancoratge de les sondes es porta a terme simultàniament mitjançant la utilització de reaccions fotoinducides emprant la química *click* d'acoblament tiol-eno, i derivades.

En el capítol 4 s'implementa el mètode desenvolupat en micromatriu amb un dels hidrogels en dos tipus de biosensors interferomètrics sense marcatge basats en SU-8. Amb tots dos sensors es detecta CRP en sèrum sanguini amb molt bona sensibilitat (LOD de 21 pg/mL). D'altra banda, aquesta estratègia s'assaja també en sensors nanofotònics basats en guies d'ones corrugades amb resultats prometedors. En aquest capítol també es posa a punt i s'avalua en temps real la immobilització de fragments d'anticòs sobre la superfície del sensor nanofotònic, mitjançant la reacció d'acoblament tiol-eno induïda per llum UV. El monitoratge en temps real permet demostrar el paper indispensable de la llum en el procés d'immobilització. Utilitzant aquesta aproximació s'assaja la detecció sense marcatge de tres biomarcadors cardíacs d'interès (CRP, cTnI / T i Mioglobina).

El cinquè capítol es dedica a la descripció detallada de tots els procediments experimentals que es duen a terme en els capítols 3 i 4.

Finalment, el Capítol 6 recull les conclusions assolides a partir dels resultats obtinguts en el desenvolupament de la tesi doctoral.



### **Difusión de los Resultados**

Los estudios incluidos en esta tesis han conducido a los documentos científicos enumerados a continuación, publicados en revistas científicas o presentados en congresos.

1. Z. Díaz Betancor, M.J. Bañuls Polo, Á. Maquieira. “Development new light induced methods for functionalization surfaces with application in Biosensors”.  
*III Encuentro de doctorandos de la UPV*, Valencia (Spain), **2017**. ISBN 978-84-697-5069-8
2. Z. Díaz Betancor, M.J. Bañuls Polo, Á. Maquieira, R. Puchades. “Hydrogel based on 2-methacryloxyethyl phosphorylcholine (MPC) for high density based on blu-ray disk surface”.  
*XI International Workshop on Sensors and and Molecular Recognition*, Burjassot (Spain), **2017**. ISBN 978-84-697-5069-8
3. Z. Díaz Betancor, M.J. Bañuls Polo, Á. Maquieira, R. Puchades. “Photopolymerization of phosphorylcholine methacryl hydrogel (MPC) on SU-8 or Blu-ray disks (BD) for microarray and biosensing applications”  
*II Congreso Nacional de Jóvenes Investigadores en Biomedicina*, Valencia (Spain), **2017**.
4. Z. Díaz Betancor, MJ Bañuls Polo, Á. Maquieira. “Dextran hydrogel to immobilize biomolecules on microarray format”  
*XII International Workshop on Sensors and and Molecular Recognition*, Valencia (Spain), **2018**.
5. J. Sabek J, L. Torrijos-Morán, Z. Díaz Betancor, MJ Bañuls Polo, Á. Maquieira, J. García-Rupérez. “In situ functionalization and label free protein detection using a nanophotonic biosensor”  
*XII International Workshop on Sensors and and Molecular Recognition*, Valencia (Spain), **2018**.
6. J. Sabek J, L. Torrijos-Morán, A. Griol, Z. Díaz Betancor, M.J. Bañuls Polo, Á. Maquieira, J. García-Rupérez. “Real time monitoring of a UV light-assisted biofunctionalization protocol using a nanophotonic biosensor”  
*Biosensor* 9, 6 (**2019**).
7. J. Sabek J, L. Torrijos-Morán, A. Griol, Z. Díaz Betancor, M.J. Bañuls Polo, Á. Maquieira, J. García-Rupérez. “Live tracking biofunctionalization and label-free protein detection performed by a nanophotonic biosensor”

*Proceedings 4, 15 (2019)*

8. J. Sabek, F.J. Díaz-Fernández, L. Torrijos-Morán, Z. Díaz-Betancor, Á. Maquieira, M.J. Bañuls, E. Pinilla-Cienfuegos and Jaime García-Rupérez. “Experimental study of an evanescent-field biosensor based on 1D photonic bandgap structures”. *Beilstein J. Nanotechnol.* 10, 967–974 (2019)
9. Z. Díaz-Betancor, M.J. Bañuls, F. J. Sanza, R. Casquel, M. Fe Laguna, M. Holgado, R. Puchades, A. Maquieira. “Phosphorylcholine-based hydrogel for immobilization of biomolecules. Application to fluorometric microarrays for use in hybridization assays and immunoassays, and nanophotonic biosensing”. *Microchim. Acta* 6, (2019).
10. Z. Díaz-Betancor, M. Bañuls, A. Maquieira. Photoclick chemistry to create dextran-based nucleic acid microarrays. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 6745–6754 (2019).

## Abreviaturas

<b>A</b>	Adenina
<b>Ab</b>	Anticuerpo
<b>a-BSA</b>	Anticuerpo contra albúmina de suero bovino
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>AN</b>	Ácido nucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>Asp</b>	Ácido aspártico
<b>BD</b>	<i>Blu-ray disc</i>
<b>BICELLS</b>	Celdas de sensado biofotónico o <i>Bio photonic sensing cells</i>
<b>BSA</b>	Albumina de suero bovino
<b>C</b>	Citosina
<b>CCD</b>	<i>Charge-coupled device camera</i>
<b>TC</b>	Tampón carbonato
<b>CRP</b>	Proteína C reactiva
<b>CRP*</b>	Proteína C reactiva marcada con Alexa 647
<b>cTn</b>	Troponina
<b>Cy</b>	Cianina
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>DMAP</b>	4-dimetilamonioipridina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPI</b>	Interferometría de doble polarización
<b>Dx</b>	Dextrano
<b>ECV</b>	Enfermedades cardiovasculares
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EIA</b>	Enzimoimmunoanálisis
<b>ELISA</b>	Enzimoimmunoanálisis de adsorción
<b>Fab</b>	Fragmento de unión al antígeno o parátopo
<b>Fc</b>	Fracción constante o fragmento cristalizable
<b>FPIA</b>	Inmunoensayo de polarización de fluorescencia
<b>G</b>	Guanina
<b>Glu</b>	Glutamina
<b>GAR</b>	Anticuerpo contra IgG de conejo producido en cabra
<b>Lys</b>	Lisina
<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI), time of flight (TOF)</i>
<b>mAb</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>Mb</b>	Mioglobina
<b>MPC</b>	Metacriloil fosforilcolina

<b>MZI</b>	Mach-Zehner
<b>NHS</b>	N-Hidroxisuccinimida
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>pAb</b>	Anticuerpo policlonal
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PBS-T</b>	Tampón fosfato salino con <i>tween 20</i>
<b>PC</b>	Fosforilcolina
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PHEMA</b>	Polihidroxiethylmetacrilato
<b>PNAs</b>	Ácidos peptidonucleicos
<b>PoC</b>	<i>Point-of-care</i>
<b>QCM</b>	Microbalanza de cristal de cuarzo
<b>IR</b>	Índice de refracción
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>haBSA</b>	Medio anticuerpo de anti albúmina de suero bovino
<b>hIgG</b>	Medio anticuerpo IgG o <i>half-IgG</i>
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>S/R</b>	Relación señal ruido
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrida o <i>Scanning electron microscopy</i>
<b>Ser</b>	Serina
<b>SPR</b>	Resonancia de plasmón Superficial
<b>SOI</b>	silicio sobre aislante o <i>Silicon-on-insulator</i>
<b>SSC</b>	Tampón citrato sodio salino
<b>T</b>	Timina
<b>T.a.</b>	Temperatura ambiente
<b>TCEP</b>	Tris (2-carboxietil)fosfina
<b>TEC</b>	Acoplamiento tiol-eno o <i>thiol-eno coupling</i>
<b>Tir</b>	Tirosina
<b>TSA</b>	Amplificación de la señal de tiramida
<b>TEVS</b>	Trietoxivinilsilano
<b>U</b>	Uracilo
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WCA</b>	Ángulo de contacto del agua o <i>Water contact angle</i>
<b>XPS</b>	Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X

## Contenido

1. Introducción .....	1
1.1 Concepto de Biosensor .....	1
1.2 Clasificación de los Biosensores .....	5
1.3 Elementos de detección-reconocimiento biológico .....	7
1.3.1 Características de los anticuerpos como biorreceptores .....	7
1.3.2 Características de los ácidos nucleicos como biorreceptores .....	14
1.4 Biosensores basados en detección con y sin marcaje .....	17
1.5 Materiales usados en biosensado .....	25
1.6 Métodos de inmovilización .....	31
1.7 Hidrogeles, su utilización y aplicaciones .....	37
1.8 Marcadores Cardiovasculares: CRP, Mioglobina, Troponina I y T .....	42
1.9 Referencias .....	47
2. Objetivos .....	58
3. Desarrollo de hidrogeles para inmovilización de biomoléculas .....	60
3.1 Inmovilización de biomoléculas basada en el uso de hidrogeles de fosforilcolina en BD y SU-8. ....	61
3.1.1. Formación del hidrogel y detección de CRP en formato micromatriz de fluorescencia .....	65
3.1.2 Inmovilización de anticuerpos en el hidrogel y detección fluorescencia específica de proteínas en formato de micromatriz. ....	73
3.1.3 Inmovilización en formato de micromatriz de ácidos nucleicos en hidrogel de MPC .....	79
3.2 Inmovilización de biomoléculas basada en el uso de hidrogeles de dextrano sobre BD y SU-8. ....	86
3.2.1 Estudios de inmovilización de anticuerpos y ensayos de inmunorreconocimiento .....	110
3.3 Comparación de las prestaciones de diferentes hidrogeles .....	112
3.4 Conclusiones .....	114

3.5 Referencias .....	116
4. Aplicación de los desarrollos para biosensores sin marcaje .....	122
4.1 Transferencia del hidrogel de fosforilcolina a estructuras interferométricas de SU-8 .....	123
4.2 Biosensado sin marcaje de biomarcadores cardiovasculares en estructuras nanofotónicas basadas en óptica integrada.....	128
4.2.1 Silanización de la superficie de óxido de silicio y ensayos de inmovilización de medios anticuerpos en formato micromatriz .....	133
4.2.2 Inmovilización asistida por luz ultravioleta de medios anticuerpos .....	136
4.3 Conclusión .....	146
4.4 Referencias .....	148
5. Experimental.....	150
5.1 Inmovilización de biomoléculas basada en el uso de hidrogeles de fosforilcolina en BD y SU-8. ....	150
5.1.1 Materiales y Métodos .....	150
5.1.3 Procedimiento experimental.....	152
5.2 Inmovilización de biomoléculas basada en el uso de hidrogeles de dextrano en BD y SU-8. ....	154
5.2.1 Materiales y Métodos .....	154
5.2.3 Procedimientos experimentales.....	156
5.3 Aplicación de los desarrollos para biosensado sin marcaje .....	159
5.3.1 Materiales y Métodos .....	159
5.3.2 Procedimiento experimental.....	160
5.4 Referencias .....	164
6. Conclusiones.....	180

# Introducción





## 1. Introducción

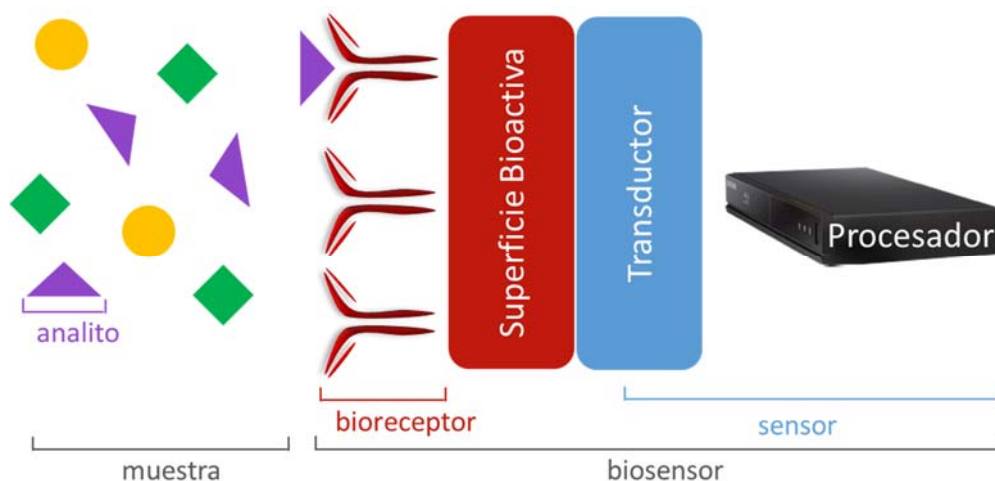
### 1.1 Concepto de Biosensor

Actualmente existe un gran interés en desarrollar herramientas que permitan realizar medidas rápidas y específicas de componentes químicos o biológicos para distintas aplicaciones, en este contexto surgen los biosensores. En 1962 Clark y Lyons desarrollaron el primer dispositivo biosensor para medir los niveles de glucosa en sangre. Este primer dispositivo era un sistema amperométrico con un electrodo sensible al cambio de concentración de oxígeno producido en la reacción entre la enzima glucosa oxidasa y el sustrato glucosa y oxígeno<sup>1</sup>. Así, esto cambió la forma de analizar glucosa en humanos. Desde entonces los biosensores se han convertido en una herramienta analítica potente y eficaz para analizar cualitativa y cuantitativamente sustancias químicas y bioquímicas en distintos sectores. Algunas de estas incluyen su aplicación en sanidad para diagnóstico clínico y prevención sanitaria, mediante la detección (utilizando anticuerpos, secuencias de ADN, virus, etc.) de moléculas relacionadas con el estado de salud o asociadas a enfermedades<sup>2</sup>. Otros tienen aplicación industrial, militar o medio ambiental, por ejemplo para la detección de residuos de plaguicidas y otras sustancias nocivas para la salud, control de calidad de alimentos, detección de explosivos, etc<sup>3</sup>.

La IUPAC<sup>4</sup> define biosensor como *un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células completas para detectar compuestos químicos normalmente mediante señales eléctricas, térmicas u ópticas*. Así, un biosensor es un dispositivo compacto que está formado por dos componentes, un receptor de tipo biológico (anticuerpo, ácido nucleico, enzima, tejido, etc.) que actúa como elemento molecular por el cual se reconoce específicamente al analito y un transductor que actúa de detector físico-químico (figura 1.1). El elemento transductor obtiene la información por la interacción entre el componente biológico o de reconocimiento y el analito<sup>5,6</sup>, generando una señal medible y cuantificable. Cuando tiene lugar la interacción bioespecífica se produce un cambio físico-químico, por ejemplo un cambio de masa, de potencial, de intensidad luminosa, de frecuencia de resonancia, de absorción o un cambio en el índice de refracción. Así, a partir de ese cambio, el transductor produce la señal discreta o continua que está relacionada con la concentración del

analito<sup>7</sup>. Por tanto, estos dispositivos permiten medir, cuantificar y analizar a tiempo real un proceso de interacción entre el analito y el biorreceptor.

Los biosensores se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios como el tipo de analito o reacción monitorizada, el sistema de transducción, el modo de detección o el tipo de biorreceptor.



**Figura 1.1.** Esquema general que muestra los componentes principales de un biosensor. Superficie bioactiva donde tienen lugar las biointeracciones, transductor y el procesador.

En el desarrollo de un biosensor se ponen en juego muchos conceptos químicos, bioquímicos, físicos de, ciencia de materiales, etc. Las características ideales buscadas para el diseño de un biosensor se centran en la sensibilidad, selectividad, versatilidad, formato de ensayo, robustez, intervalo y tiempo de respuesta. Así, es importante que presente una buena sensibilidad para detectar la mínima concentración requerida, y una alta selectividad para detectar exclusivamente al analito de interés. Esas propiedades se logran mediante la incorporación de elementos específicos de reconocimiento biológico. También, se requiere operar en un intervalo de concentraciones de analito óptimo y a ser posible en tiempo real. El desarrollo de sistemas robustos que permitan efectuar el ensayo a partir de muestras no tratadas es muy interesante ya que simplifica el análisis y reduce su

duración. Además, el dispositivo debe ser fácil de usar y no requerir personal especializado para su manejo. Entre las características deseables de un biosensor también está la versatilidad, es decir, que pueda aplicarse para la detección de distintos analitos o muestras. La capacidad del transductor para su miniaturización permitirá su integración en plataformas reducidas y desarrollar sistemas portátiles, así como de trabajar con volúmenes de muestra reducidos. Otro requisito para llevar a cabo la producción en masa de biosensores es que su fabricación sea de bajo costo. Además de estas propiedades, la automatización de los sistemas de análisis podría permitir la incorporación de biosensores a procesos en línea. La capacidad de multiplexado es también una característica buscada para detectar de forma simultánea diferentes analitos en la misma muestra.

En el desarrollo de un biosensor se puede hacer uso de un formato altamente interesante, como el formato de micromatriz<sup>8</sup>. Una micromatriz se define como una colección de puntos ordenados de una sonda (biorreceptor) inmovilizados en un soporte sólido. Este tipo de ensayo permite analizar una gran cantidad de analitos utilizando diferentes sondas que incluyen desde oligonucleótidos, aptámeros o mi-ARNs, hasta proteínas, tejidos u otras sustancias. Estos sistemas presentan una serie de ventajas como es su aplicación en multiplexado y su alta capacidad de trabajo.

La tecnología de micromatriz se basa en realizar multitud de ensayos en un pequeño espacio<sup>8</sup>. Una micromatriz contiene un gran número de sondas ancladas de forma ordenada a una superficie sólida<sup>9</sup>. Este formato de trabajo aplicado inicialmente a inmunoensayo fue descrito por primera vez por Roger Ekins en 1989<sup>10</sup>, quien estableció que un pequeño punto constituido por un anticuerpo inmovilizado en un microespacio del orden de micrómetros de diámetro, es capaz de alcanzar una mayor sensibilidad que los inmunoensayos macroscópicos convencionales<sup>11</sup>.

Desde la aparición de la tecnología de micromatriz esta se ha aplicado a solventar multitud de problemas debido a las ventajas que presenta. Así, numerosos investigadores las han plasmado en medicina, agricultura, alimentación y medio ambiente, entre otros<sup>12, 13, 14</sup>.

La tecnología de micromatriz ha ido evolucionado desde su establecimiento, siendo una técnica útil y poderosa, que sigue despertando gran interés como lo demuestra el número de publicaciones en el tema, del orden de 1000 por año.

El desarrollo de un sistema analítico con formato de micromatriz no es una tarea fácil, debe superar numerosos obstáculos y retos, requiriendo un diseño previo del proceso. Durante los últimos años se ha avanzado mucho en el desarrollo de las micromatrices, sin embargo, quedan desafíos que superar, como mejorar la sensibilidad, la selectividad, y la reproducibilidad. También, existe dificultad en encontrar las sondas adecuadas con alta afinidad capaces de proporcionar una señal suficiente o reducir la absorción inespecífica.

Los biosensores que trabajan en formato heterogéneo, y las micromatrices presentan en común la necesidad de desarrollar métodos efectivos de inmovilización de biorreceptores sobre los soportes de ensayo, por lo que en esta tesis las estrategias de inmovilización se desarrollan en primer lugar sobre soportes planos, utilizando la tecnología de micromatriz con detección fluorescente, para después ser transferidas a soportes nanoestructurados, que constituyen los sustratos de los biosensores ópticos tratados también en esta tesis.

Por otro lado, dentro del campo de los biosensores hay una gran demanda de sistemas *Point-of-Care* (PoC). El término *Point-of-Care* o punto de atención, se refiere a pruebas de ensayos principalmente para diagnóstico médico que se realizan en el momento y lugar de la atención al paciente<sup>15</sup>. Este tipo de dispositivos es muy útil en la gestión sanitaria reduciendo el coste de los tratamientos e incrementado la tasa de supervivencia de los pacientes. Como se está manifestando en la crisis del COVID19 con los famosos “ensayos rápidos”. Esto supone un gran avance en análisis clínico, pues las pruebas convencionales están limitadas total o parcialmente al laboratorio, lo que supone una gran inversión de horas o días hasta tener los resultados donde, a veces, el tiempo de análisis es crucial<sup>16</sup>.

Los biosensores desarrollados para aplicación *Point-of-Care*, deben reunir una serie de características como ser fáciles de usar, de bajo coste, simples y portátiles, para poder realizar el análisis y tener los resultados *in situ* a tiempo real<sup>17</sup>. Así, la Organización Mundial de la Salud estableció el criterio “ASSURED” que define que estos dispositivos deben ser asequibles, sensibles, específicos, fáciles de usar, rápidos y robustos, no requerir otro equipamiento y ser portátiles, y utilizados por los usuarios finales<sup>18</sup>. Las ventajas de estos dispositivos son reducción del tiempo de

análisis, no se necesita personal cualificado para su manejo, menor volumen de muestra, fabricación sencilla y simple<sup>15</sup>. Un ejemplo muy conocido es el glucómetro utilizado por pacientes con diabetes, que les permite llevar un control a tiempo real de sus niveles de azúcar en sangre. En este sentido, existe un sensor Freestyle Libre®, medidor de glucosa capilar que actualiza los niveles de glucosa en sangre cada minuto y almacena la información durante 8 h comercializado por la compañía Abbot, está compuesto por un catéter que se inserta subcutáneamente<sup>19</sup>, lo que permite su funcionamiento autónomo *in situ*. Actualmente se está investigando en dispositivos con características similares para otras enfermedades, sin embargo, no se ha conseguido llevar al mercado de manera tan exitosa otro sistema de PoC.

Para el desarrollo de este tipo de dispositivos la nanotecnología puede ser un gran aliado debido a las múltiples ventajas que presenta. Algunas de estas son sensibilidad, alto nivel de integración, menor tiempo de obtención de resultados, detección sin marcaje, y reducción de volúmenes de muestra y reactivos. Además, permite la fabricación en masa para su producción usando técnicas de la industria microelectrónica, lo cual se refleja en un bajo costo final del producto de interés. La nanotecnología trabaja con distintos tipos de materiales, pero los más usados en biosensores fotónicos están basados en silicio, como por ejemplo los cristales fotónicos<sup>20</sup>.

### 1.2 Clasificación de los Biosensores

Como se ha comentado anteriormente, la clasificación de los biosensores puede realizarse atendiendo a diferentes criterios, existiendo tres categorías generales: según el transductor empleado, el elemento de reconocimiento y el método de detección.

En el primer caso, dependiendo del transductor empleado en el biosensor se habla de sensores eléctricos, mecánicos, ópticos o magnéticos. Este elemento está implicado en la sensibilidad, el tamaño del sensor, los componentes totales y el coste final del biosensor.

Los biosensores electroquímicos generalmente se basan en medir los cambios de una reacción química en la interfaz de un conductor eléctrico, las ventajas de este sistema es que puede ser monitorizado *in vivo* y se pueden desarrollar dispositivos

simples y de bajo coste. Un ejemplo de este biosensor es el basado en un electrodo enzimático amperométrico para peróxido de hidrógeno<sup>21</sup>. Por otro lado, los biosensores conductimétricos se basan en provocar un cambio en la concentración iónica o conductividad eléctrica, el ejemplo más conocido es el sensor de urea<sup>22</sup>.

Los biosensores mecánicos detectan cambios debidos a una magnitud física, como los acústicos, los que detectan variaciones en el espesor, o los que detectan la unión formada en la superficie por un cambio en la frecuencia resonante o en el relieve de la misma<sup>20</sup>.

Los biosensores ópticos se basan en la interacción entre la luz y la materia. Cuando ocurre el biorreconocimiento hay un cambio en el índice de refracción que se traduce en un cambio en alguna propiedad óptica, que a su vez se relaciona con la concentración del analito<sup>23</sup>. Este tipo de sensores tiene gran interés, siendo los más estudiados y desarrollados.

Los biosensores magnéticos miden las variaciones del campo magnético creado por nanopartículas que se unen a moléculas específicas como marcadores, permitiendo que tenga lugar el biorreconocimiento en poco tiempo y mejorando la sensibilidad. Además, tienden a imitar tecnologías desarrolladas con anterioridad<sup>24</sup>.

La clasificación de los biosensores también se puede hacer atendiendo al elemento de reconocimiento biológico utilizado para detectar el analito. Los elementos biológicos pueden ser simples (enzimas, anticuerpos, oligonucleótidos, etc.) o más integrados y complejos como células, tejidos u organismos. Un ejemplo de un biosensor enzimático<sup>25</sup> es el de glucosa comentado con anterioridad. En esta tesis el tipo de biosensores que se han estudiado utilizan como elementos de reconocimiento anticuerpos y ácidos nucleicos.

Por último, existe otra clasificación basada en la detección con o sin marcaje del analito. La primera se basa en utilizar el analito o un elemento de detección marcado con moléculas o partículas radioactivas, fluorescentes o magnéticas<sup>25</sup>. Por tanto, dicho marcador es lo que se detecta y se relaciona con la concentración de analito. En la segunda no existe este marcaje, lo cual simplifica el proceso. Se denominan biosensores sin marcaje o *label-free*<sup>26</sup> cuando se mide directamente la señal bioquímica sobre el transductor. Actualmente hay tendencia a su desarrollo por las ventajas que ofrece. Los métodos directos son más idóneos porque suponen una

reducción de etapas de ensayo y del número de reactivos empleados. Sin embargo, los métodos indirectos son más fáciles y amplifican la señal, por lo que están más extendidos.

### 1.3 Elementos de detección-reconocimiento biológico

El principal fenómeno presente en un biosensor es el biorreconocimiento, donde se reconoce selectivamente un analito particular. Aunque, existen sensores basados en bioafinidad usando aptámeros, receptores de células o enzimas, esta tesis se centra en los biosensores basados en inmunoensayo e hibridación de ácidos nucleicos. Los primeros utilizan la interacción anticuerpo-antígeno para la detección de analitos, los segundos la unión entre sondas complementarias de ácidos nucleicos. Estos ensayos se utilizan rutinariamente en muchos ámbitos como en hospitales para la detección de infecciones patógenas, biomarcadores, etc.

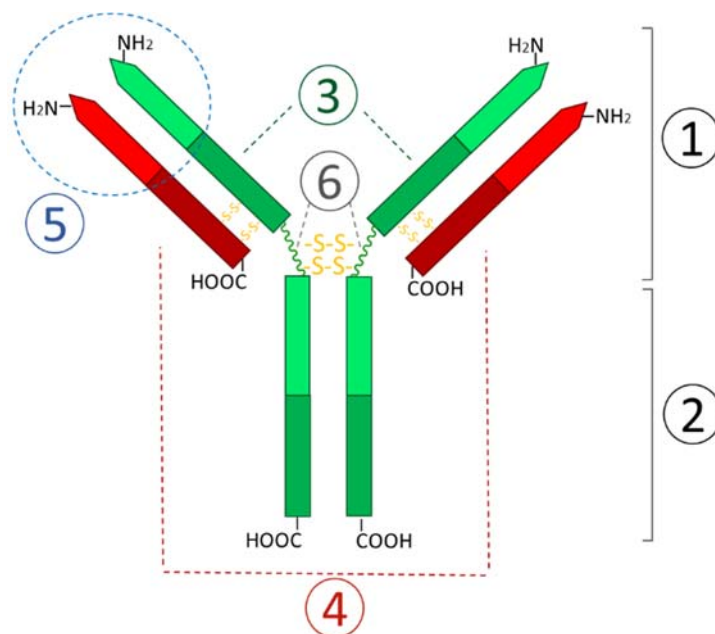
En 1959, Rosalyn Yalow y Salomon Berson describieron por primera vez la tecnología de inmunoensayo con marcaje enzimático conocido como ELISA, para la determinación de insulina<sup>27</sup>. Desde entonces esta técnica de ensayo se ha hecho muy común, aplicándose a la detección de multitud de sustancias.

A continuación, se describirán brevemente las características y potencial de los anticuerpos, puesto que en esta tesis son los principales elementos de detección-reconocimiento con los que se trabaja.

#### 1.3.1 Características de los anticuerpos como biorreceptores

Los anticuerpos o inmunoglobulinas G (IgG) son glicoproteínas utilizadas en inmunoensayo, siendo una de las cinco clases de anticuerpos humorales del organismo (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE) presentes en la sangre. La inmunoglobulina G es el anticuerpo más abundante presente en el torrente sanguíneo (~ 12 mg/mL en suero). Aunque la IgG depende mucho de la especie originaria, si se considera en forma de monómero, su masa molecular es aproximadamente de 150 kDa, su tamaño es de 12 x 6 nm y tiene forma de Y. Está constituida por dos fracciones idénticas unidas por enlaces disulfuro cuyo número depende de la especie<sup>28</sup> o la subclase<sup>29</sup>. Las IgGs están formadas por 4 subunidades, dos cadenas pesadas (H) con una masa de 50 kDa y dos cadenas ligeras (L) de 22 kDa (figura 1.2). Cada fracción idéntica está compuesta por una fracción constante (Fc) que forma la base de la

molécula, que corresponde al extremo del ácido carboxílico, y una región variable que consiste en el fragmento de unión al antígeno (Fab) o paratopo, que corresponde al extremo del grupo amina. Las cadenas tienen una región bisagra, muy flexible, para un mejor acoplamiento a los antígenos. Los grupos Fab varían de un anticuerpo a otro en relación con el antígeno específico que se reconoce. Fc representa el área principal de la cadena pesada, es específica de cada especie y es la región de unión del anticuerpo a otras proteínas y receptores celulares<sup>30</sup>.



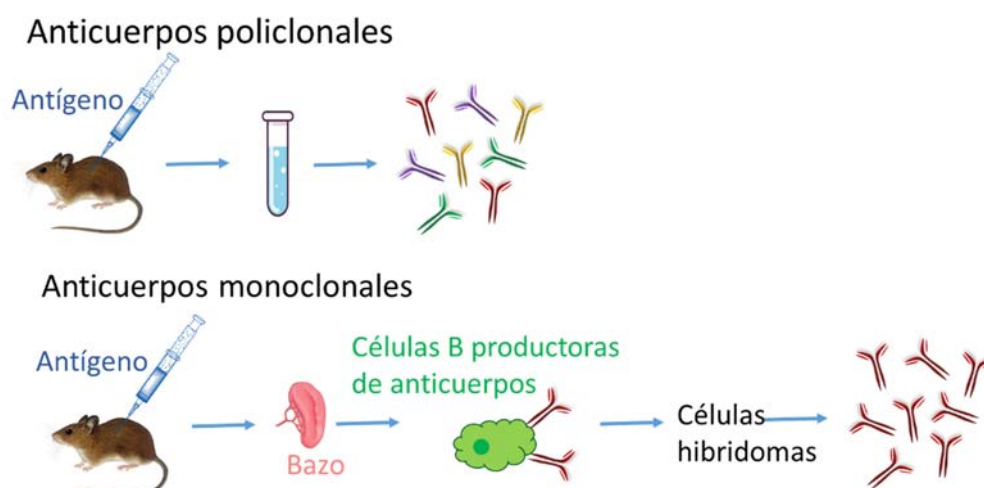
**Figura 1.2.** 1: Región Fab. 2: Región Fc. 3: Cadena pesada (H) con un dominio variable seguido por un dominio constante, una región bisagra, y dos más constantes, los dominios. 4: Cadena ligera (L) con un dominio variable y uno constante. 5: Lugar de unión al antígeno (paratopo). 6: Región bisagra.

Durante la reacción de reconocimiento anticuerpo-antígeno (Ab-Ag) intervienen distintos factores como: temperatura, pH, fuerza iónica del medio, concentración de reactivos, tiempo de incubación o parámetros fluídicos. Los anticuerpos utilizados en inmunoensayo son producidos específicamente de acuerdo con el antígeno a detectar y están clasificados como policlonales o monoclonales, recombinantes, etc., dependiendo de su origen y técnica de obtención<sup>31</sup>.



Los anticuerpos policlonales (pAb) se producen en un animal estimulado con un inmunógeno (antígeno) y, como respuesta, el animal produce inmunoglobulinas G contra los diferentes componentes del antígeno utilizado como inmunógeno. Por ello, los anticuerpos policlonales pueden reaccionar con diferentes epítomos del antígeno. Su costo de producción es bajo, rápido (alrededor de tres meses), y la reproducibilidad de un lote a otro es menor que la de los anticuerpos monoclonales. Son muy sensibles y tolerantes a los cambios en las configuraciones de proteínas.

En la producción de anticuerpos monoclonales, todas las inmunoglobulinas son exactamente iguales y se pueden reproducir fácilmente; siendo sensibles, más específicos<sup>31</sup> y reproducibles entre lotes, que los policlonales por lo que son los preferidos para kits comerciales. Los anticuerpos monoclonales (mAb) a diferencia de los anticuerpos policlonales, generalmente solo reconocen a un único epítomo del antígeno. Su producción lleva largos períodos de tiempo (12 meses). La figura 1.3 muestra las etapas de obtención de los anticuerpos policlonales y monoclonales.

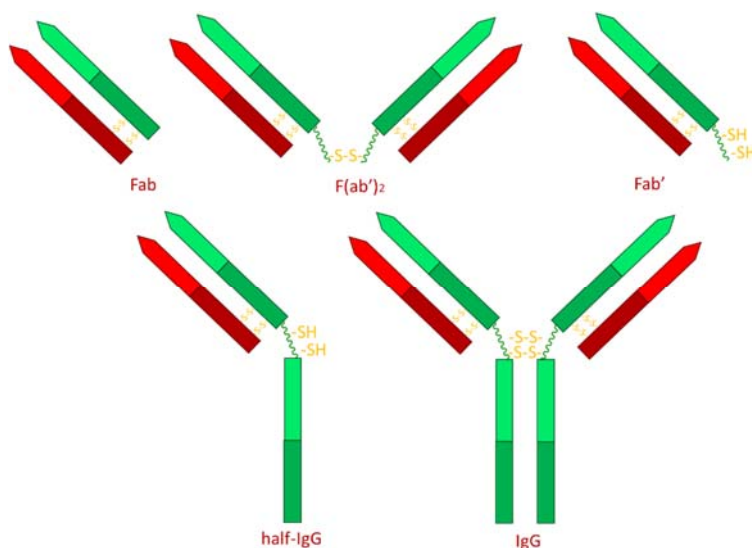


**Figura 1.3.** Esquema de producción de anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos policlonales se obtienen al inmunizar un mamífero (en este caso un ratón), produciendo los anticuerpos que se unirán a diferentes epítomos del antígeno. En la parte inferior, se muestran las etapas para la producción de los anticuerpos monoclonales; un antígeno es inyectado al ratón, las células B se

extraen del bazo, a continuación, se fusionan con células tumorales para tener un cultivo celular produciendo anticuerpos monoclonales

Además de los anticuerpos enteros, existen distintas técnicas para generar fragmentos; como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> o *half*-IgG, los cuales pueden emplearse con éxito como sondas para inmunosensores (figura 1.4). Estos fragmentos tienen un gran interés debido a su menor tamaño y obtención sencilla con alto rendimiento, lo que supone una ventaja en la disponibilidad de inmunorreactivos y en su precio final. Por ello, en los últimos años se ha desarrollado la producción exclusivamente de los fragmentos de unión al antígeno, de acuerdo con las aplicaciones finales. Por ejemplo, ahora es posible obtener solo el fragmento Fab, asegurando la disponibilidad de los sitios de unión al antígeno, para el reconocimiento de analitos, y por lo tanto mejorando el rendimiento de los biosensores.

Para llevar a cabo la fragmentación de IgGs se usan agentes reductores y proteasas que digieren o cortan ciertas porciones de la estructura proteica de los anticuerpos. Hoy en día, esto se ha logrado con dos tipos de inmunoglobulinas, las IgG y las IgM.



**Figura 1.4.** En la imagen se muestran los distintos fragmentos de una IgG: Fab (*Fragment antigen-binding*), F(ab')<sub>2</sub>, Fab', *half*-IgG; obtenidos por la ruptura de los puentes disulfuro. Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener por digestión con papaína para obtener Fab, o con pepsina para obtener F(ab')<sub>2</sub><sup>32</sup>.

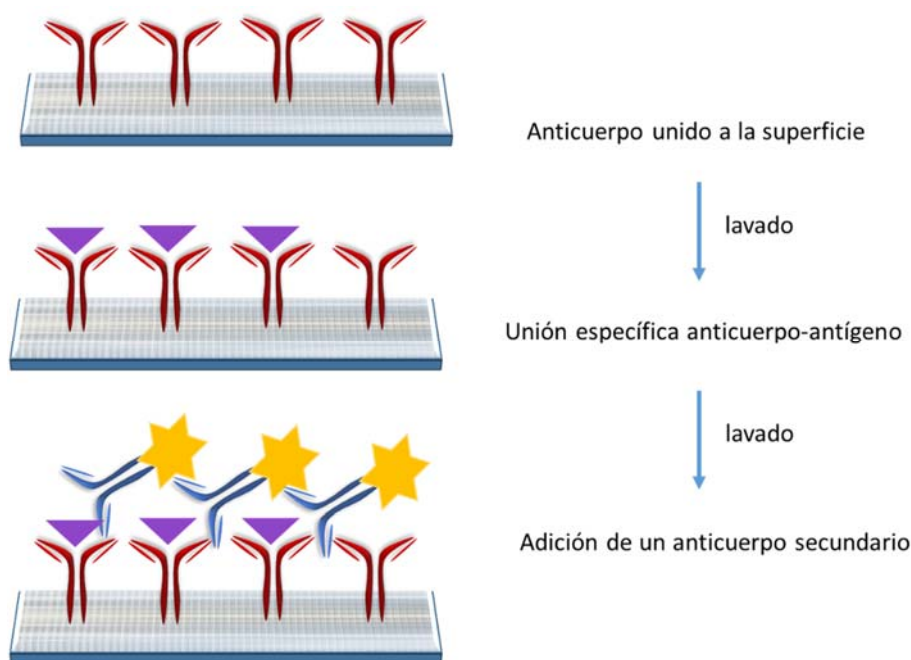
Los fragmentos obtenidos de la digestión enzimática son Fab, que reconoce específicamente al antígeno, y Fc, que no se une al antígeno. Los fragmentos Fab contienen la región variable de la cadena pesada y ligera, las cuales están unidas mediante enlaces disulfuro por lo que se conserva el sitio de unión al antígeno. Los otros fragmentos Fc están formados por la región constante de la cadena pesada y se encargan de las funciones celulares efectoras.

Las ventajas de usar fragmentos frente al anticuerpo entero en técnicas inmunoquímicas son: reducción de las interacciones inespecíficas por la unión de la Fc, sistemas de producción más simple (se pueden generar en sistemas microbianos como *Escherichia coli* o levaduras) y cuando se trabaja en biosensado óptico basado en onda evanescente, la interacción ocurre más cerca de la superficie y aumenta su efecto sobre el campo óptico de sensado, aumentando la sensibilidad del ensayo.

### *1.3.1.1 Clasificación de los inmunoensayos*

Los inmunoensayos pueden ser clasificados bajo diferentes criterios, en función del medio donde ocurre la interacción antígeno-anticuerpo (homogéneo o heterogéneo), por la técnica de medición del reconocimiento, por el formato de ensayo competitivo o no competitivo, o por el marcador usado para la detección del proceso, entre otros.

Así, se denomina inmunoensayo homogéneo a los ensayos en disolución, es decir la unión antígeno-anticuerpo ocurre en el mismo medio donde se forma el complejo inmune generando una señal y suele necesitar menos tiempo de análisis. Los ensayos heterogéneos se caracterizan por inmovilizar en un soporte uno de los inmunorreactivos ocurriendo la biointeracción en el mismo. Este formato requiere varias etapas intermedias de adición de reactivos y de lavado para eliminar interacciones inespecíficas (figura 1.5), representan el 90% de los ensayos y necesitan un tiempo mayor de análisis.

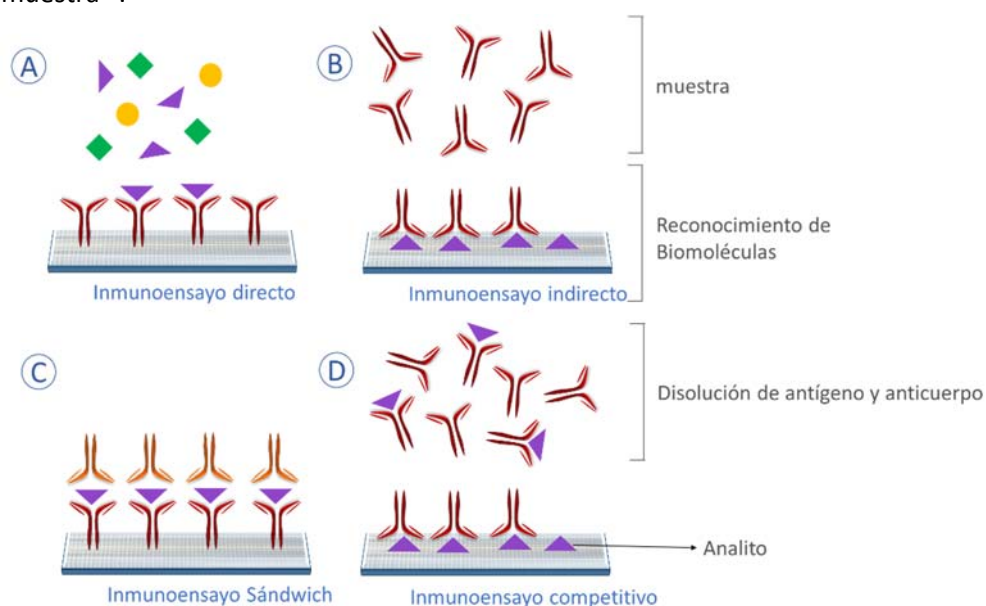


**Figura 1.5.** Esquema general de las etapas durante un inmunoensayo. A veces es necesaria una cuarta etapa de revelado.

Existen tres tipos de inmunoensayos heterogéneos basados en estas dos etapas. Así, se habla de inmunoensayo directo cuando el anticuerpo se inmoviliza en la superficie de un sustrato. Tras la inmovilización, se lleva a cabo el reconocimiento del antígeno. También, existe un tipo de inmunoensayo directo llamado "inmunoensayo sándwich" en el que al complejo anticuerpo-antígeno se agrega un anticuerpo secundario para la detección del antígeno. Así, el antígeno queda atrapado entre ambos anticuerpos. En ensayos con marcaje, el anticuerpo secundario se puede marcar, lo que proporciona distinta intensidad de señal en función de la cantidad de antígeno presente.

En otros casos se habla de formato indirecto, donde la detección se usa para controlar la presencia de anticuerpos en muestras de suero. En este ensayo, el antígeno se inmoviliza sobre la superficie del transductor. Por lo tanto, el biosensor puede detectar anticuerpos específicos.

Otra clasificación de los formatos de ensayo atiende a nombrarlos como competitivos y no competitivos (figura 1.6). En el formato competitivo directo se inmoviliza una molécula que se denomina anticuerpo o receptor, a continuación se pone en contacto con la muestra que tiene el analito y otras moléculas. Por ello, a menor señal implica que hay más analito presente en la muestra, es decir la concentración de analito es inversamente proporcional a la señal detectada. El formato no competitivo (a como se definió anteriormente tipo sándwich) suelen tener niveles altos de sensibilidad y selectividad con resultados del orden de ng/mL o pg/mL. En los ensayos no competitivos la medición del analito marcado (puede ser un anticuerpo) es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra<sup>33</sup>.



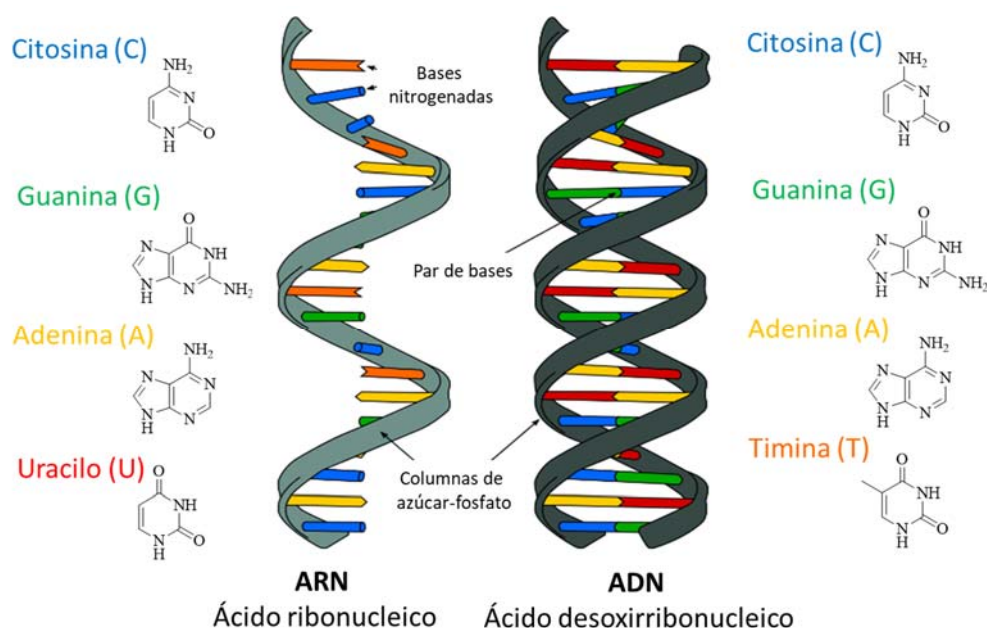
**Figura 1.6.** Esquema de los tipos de inmunoensayos A) Inmunoensayo directo, B) Inmunoensayo indirecto, C) Inmunoensayo directo tipo sándwich y D) Inmunoensayo competitivo.

El inmunoensayo indirecto competitivo se basa en inmovilizar una molécula (competidor o hapteno) similar al antígeno a la superficie. La muestra que se emplea contiene los anticuerpos y los antígenos y se pone en contacto con la superficie. Durante la incubación, el competidor y el antígeno compiten por unirse al

anticuerpo. El antígeno se une al anticuerpo, dificultando el reconocimiento del hapteno inmovilizado en la superficie. En este tipo de inmunoensayos una menor señal detectada implica menos anticuerpo unido y, por lo tanto, más antígeno en la muestra analizada. Por último, la clasificación de inmunoensayos también se puede hacer atendiendo al tipo de marcador que se utiliza. Los radioinmunoensayos (RIA)<sup>20</sup> donde se emplea un marcador que es un isótopo radioactivo. El enzimoimmunoanálisis (EIA)<sup>34</sup> se basa en usar un marcador enzimático, como por ejemplo la técnica conocida como ELISA<sup>34</sup>. El fluoroinmunoanálisis se basa en emplear un marcador que es una molécula fluorescente, como por ejemplo el ensayo en fase homogénea FPIA<sup>35</sup>. Y el ensayo luminiscente que puede emplear reactivos quimioluminiscentes y bioluminiscentes<sup>33</sup>. Esta última técnica es sensible como los radioinmunoensayos, pero sin presentar los riesgos de manipular trazadores radioactivos.

### 1.3.2 Características de los ácidos nucleicos como biorreceptores

Los ácidos nucleicos son polímeros formados por las bases nitrogenadas citosina, guanina, adenina, timina y uracilo, unidos por enlaces fosfodiéster y que en forma libre o combinada, constituyen una gran familia de compuestos. En esta tesis nos hemos centrado en las moléculas básicas. Hay dos tipos de ácidos nucleicos naturales, ARN (ácido ribonucleico) y ADN (ácido desoxirribonucleico) (figura 1.7). El ADN se diferencia en la base nitrogenada timina mientras que el ARN se diferencia en el uracilo. Además, el ARN está formado por una única cadena y el ADN por dos cadenas unidas mediante puentes de hidrógeno formando una doble hélice<sup>36</sup>.



**Figura 1.7.** Estructuras químicas del ARN y del ADN<sup>36</sup>.

Los biosensores de ácidos nucleicos usan oligonucleótidos como receptores, ofrecen una metodología de análisis con alta sensibilidad, capacidad de detección a tiempo real y posibilidad de miniaturización. Estos biosensores permiten trabajar con formatos de ensayos sencillos basados de hibridación de secuencias complementarias. Sin embargo, la detección del producto de la hibridación es de baja sensibilidad. Por ello, generalmente se recurre a amplificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la secuencia problema<sup>37</sup> o el marcaje de secuencias<sup>38</sup> o ambas, alcanzando altas sensibilidades.

El uso de los ácidos nucleicos en biosensado se debe a que se pueden identificar secuencias propias de las especies presentes en una muestra. Ello abre un campo enorme de aplicaciones tanto cualitativas como cuantitativas. Estos sensores se aplican en salud, alimentación, medio ambiente y agricultura. Habiéndose desarrollado metodologías en ámbito tan dispares como pruebas de paternidad<sup>38</sup>, medicina forense<sup>39</sup>, cáncer, detección de alérgenos transgénicos microorganismos. Otras aplicaciones importantes en el campo de la medicina están relacionadas con el cáncer, permitiendo su análisis y detección precoz.

Además de usar ácidos nucleicos y oligonucleótidos en ensayos de hibridación, se han empleado otras moléculas denominadas aptámeros, los cuales poseen una estructura con propiedades similares a los anticuerpos. Los aptámeros son ácidos nucleicos obtenidos de forma sintética mediante el método SELEX (*Systematic Evolution of Ligand by Exponential enrichment*)<sup>40</sup> y de cadena sencilla, que se pliega tridimensionalmente de modo que se obtienen estructuras que tienen una capacidad de reconocimiento importante, lo que les dota de elevada selectividad y sensibilidad. Los aptámeros, como elementos de biorreconocimiento, se comportan de modo similar a los anticuerpos, habiéndose aplicados para biosensado desde iones a células<sup>40</sup>. Presentan la ventaja de ser más estables que los anticuerpos y se obtienen en un tiempo reducido muy competitivos.

### 1.3.2.1. Ensayos de hibridación

Una de las principales aplicaciones de los ácidos nucleicos, especialmente ADN, es su uso en el desarrollo de biosensores, para identificación de especies en múltiples campos. Así, estos sensores de ADN se basan en la complementariedad entre secuencias de ácidos nucleicos. Para ello, se lleva a cabo la inmovilización de sondas monocatenarias de ADN en una superficie para reconocer su secuencia diana de ADN complementaria mediante hibridación (figura 1.8). En el caso de los biosensores de ADN, la inmovilización de una sonda se realiza directamente sobre la superficie de un soporte. Las secuencias de ADN permiten la detección y el análisis múltiple en paralelo de los patrones de expresión de miles de genes en un solo experimento<sup>41</sup>. Y han sido muy utilizados en sistemas de biorreconocimiento por sus características, ya que pueden soportar altas temperaturas, bajo pH y alto nivel de disolvente orgánico, mientras que los anticuerpos, salvo excepciones, pueden desnaturalizarse y perder su actividad biológica de reconocimiento siendo menos estables. Así, el ADN no sufre tantos cambios conformacionales que puedan afectar a la posible respuesta de detección. También, presentan otras ventajas como su fácil inmovilización en distintas superficies (vidrio, plástico o silicona), así como su pequeño tamaño, que facilita la miniaturización de los dispositivos de ensayo<sup>42, 43, 44</sup>.





**Figure 1.8.** Esquema de un ensayo de hibridación con sondas de oligonucleótidos. La sonda de captura (azul) hibrida con la sonda de detección (amarilla) marcada con Cy5.

Además, como se ha comentado, el ADN es termodinámicamente estable y se pueden usar con distintos marcadores y detectores, siendo sondas de análisis excepcionales con una excelente sensibilidad, selectividad y capacidad de detección a tiempo real<sup>45, 46, 41</sup>.

#### 1.4 Biosensores basados en detección con y sin marcaje

Como ya se ha comentado, los biosensores pueden ser clasificados de distintas formas. Una de ellas lo hace en función de si trabajan con o sin marcaje. En el primer caso, se genera una señal debida a la biointeracción. En el segundo, es necesaria una molécula (marcador) para que se pueda detectar la biointeracción, como puede ser un fluoróforo. En la tabla 1.1 se recogen distintas aproximaciones de detección con marcaje con sus características. A su vez los biosensores con marcaje pueden ser clasificados como directos, es decir cuando la molécula marcada es el analito de interés o indirectos cuando la molécula marcada reconoce al analito.

**Tabla 1.1.** Diferentes técnicas de marcaje<sup>47</sup>.

	<b>Agentes empleados</b>	<b>Método</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Marcaje directo</b>	Fluoróforo-NHS éster	Unión directa del marcador al analito	No se requieren pasos adicionales de incubación	Difícil con proteínas, el marcaje puede alterar la estructura de la proteína y hay que eliminar el marcador sin unir.
<b>Marcaje indirecto</b>	Conjugados fluoróforo-anticuerpo secundario, Conjugados molécula específica-anticuerpos	La incubación con trazadores genéricos marcados es a menudo específica	Los trazadores genéricos marcados se pueden obtener comercialmente, no es necesario un paso de marcaje.	Requiere un paso adicional de incubación, todos los analitos necesitan una etiqueta al cual el trazador genérico puede unirse y se requieren lavados exhaustivos.
<b>Marcaje enzimático</b>	Conjugado anticuerpo- cebador, ADN circular, polimerasa, sondas de oligonucleótidos fluorescentes.	Extensión del <i>primer e</i> hibridación de las sondas de oligonucleótidos marcadas	Las enzimas se pueden unir directa o indirectamente al analito	Se pueden dar grandes variaciones en función de los tiempos de incubación

NHS: N-hidroxisuccinimida.

La detección con marcaje fluorescente ha sido usada ampliamente en dispositivos ópticos, microscopía de imagen, biología, investigación médica y diagnóstico. Los métodos de detección basados en marcadores fluorescentes en formato de micromatriz están entre los más utilizados. Estos marcadores se caracterizan por sus altos rendimientos cuánticos y su estabilidad frente al pH, con una franja de emisión y excitación estrecha, que permite su aplicación para la detección simultánea utilizando varios colorantes. Este tipo de detección múltiple permite la comparación

directa de diferentes muestras sin variación entre chips<sup>48</sup>. Por todo ello, es la técnica de marcaje predominante en biosensado.

Durante el desarrollo de esta tesis se han usado dos fluoróforos principalmente Alexa Flúor 647 y Cy5, siendo análogos en prestaciones. Existen distintos instrumentos para llevar a cabo la detección y la lectura del ensayo mediante imágenes bidimensionales, como cámaras CCD o los escáneres de fluorescencia. Las imágenes que se obtienen presentan matrices de puntos y la intensidad está directamente relacionada con la cantidad de moléculas reconocidas por agentes de captura (proteínas, oligonucleótidos, etc.) inmovilizados en la superficie.

Aunque el etiquetado puede aumentar la selectividad y mejorar la sensibilidad, también puede presentar algunos problemas, como un aumento de la complejidad del proceso y el precio. Además, los marcadores pueden interferir con un ensayo al perturbar la interacción nativa de la bioespecie por impedimento estérico o por oclusión de los sitios de unión.

Como se mencionó anteriormente el otro tipo de detección en biosensado es la que no utiliza marcaje para la monitorización del resultado de los ensayos, siendo capaz de simplificarlos, debido a que no es necesario añadir una etiqueta a las moléculas (analito o biorreceptor) involucradas en la interacción. En los métodos sin marcaje o *label-free* el analito se detecta sin la necesidad de modificaciones adicionales, a partir de las propiedades del conjugado analito-receptor o de los cambios inducidos por su formación, como cambio de índice de refracción, masa, etc.

Los biosensores ópticos *label-free* han experimentado un desarrollo exponencial y están atrayendo el interés de muchos sectores. Funcionan a una escala física inalcanzable hasta las últimas décadas en las que las nuevas tecnologías de detección han desbloqueado el uso de este tipo de biosensores.

Es evidente que las técnicas de detección sin marcaje representan un ahorro en tiempo y coste del análisis, en comparación con las técnicas con marcaje. Además de eso, el proceso sin etiqueta permite la detección a tiempo real del proceso. De esta manera, puede mejorar la precisión y la información obtenida de las mediciones al permitir la determinación de la cinética, constantes de afinidad, velocidades de difusión, tamaños moleculares, etc.

La capacidad del sistema de detección para operar en un proceso sin marcaje (*label-free*) está íntimamente ligada a la transducción de señal físico-química empleada. Por eso, los transductores capaces de operar de esta manera atraen el interés de la comunidad científica.

Existen distintos tipos de transductores *label-free* como los magnéticos, piezoeléctricos, mecánicos, electroquímicos, entalpimétricos y ópticos; siendo estos últimos los empleados en esta tesis.

Los biosensores ópticos se basan en que el biorreconocimiento produce cambios en las propiedades ópticas de la luz como longitud de onda, intensidad (debido a los cambios en la absorción o dispersión de la luz), polarización o velocidad de la fase (cambios en el índice de refracción)<sup>49</sup>. En comparación con los transductores electroquímicos, los sensores ópticos permiten alcanzar mayor sensibilidad en un proceso sin marcaje, y tienen un rango dinámico más amplio, facilitan su fabricación a gran escala, y permiten la incorporación de un gran número de sensores en un área muy pequeña facilitando el multiplexado en un solo chip. Además, tienen más estabilidad mecánica y están libres de interferencias electromagnéticas y químicas. Por otro lado, los avances realizados en las tecnologías de micro y nanofabricación, permite la utilización de componentes propios de la tecnología de comunicación óptica (láseres, fotodetectores, guías de onda, etc.) y su integración y miniaturización.

Algunas de las técnicas más importantes dentro de la detección sin etiquetado son la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)<sup>50</sup>, los nanosensores de óptica integrada<sup>51</sup>, la Interferometría de Polarización Dual (DPI)<sup>52</sup> y la Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM)<sup>53</sup>, siendo los tres primeros de tipo óptico.

En esta tesis, se han estudiado sensores fotónicos basados en óptica integrada y en interferometría, ambos están constituidas por usar las propiedades de la luz y su interacción con la materia. Los transductores ópticos basados en la detección de ondas evanescentes consisten en estructuras en las que se pueden confinar las ondas electromagnéticas. En este tipo de sensores, la detección se debe a la interacción del campo electromagnético que se extiende en el medio externo con el elemento de reconocimiento molecular. Dependiendo de la forma en que el campo evanescente modifique la luz propagada, los biosensores de onda evanescente

pueden clasificarse como lineales o no lineales. En sensores lineales se modifica, la polarización, la amplitud o la fase de la luz. En los sensores no lineales, los modos guiados se generan con una longitud de onda diferente a la luz incidente (por ejemplo, el efecto Raman).

La tecnología fotónica se ha usado en superficies planas presentando una serie de ventajas como alta sensibilidad, materiales compactos, tiempos cortos de análisis, uso de pequeños volúmenes de muestras, compatibilidad con materiales de óxidos metálicos semiconductores, etc<sup>54,16</sup>. Durante el desarrollo de esta tesis se han utilizado estructuras fotónicas interferométricas de tipo guía de ondas corrugadas que son un tipo de cristal fotónico. Los materiales fotónicos con *band-gap* o cristales fotónicos son materiales con un perfil dieléctrico periódico, los cuales pueden evitar que la luz de ciertas frecuencias o longitudes de onda se propague<sup>55</sup>, el primero en definirlo fue Yablonovitch en 1987<sup>56</sup>. Es decir, la estructura dieléctrica permite definir rangos frecuenciales y direcciones del espacio, denominando *bandgaps* a las bandas frecuenciales cuya propagación de ondas electromagnéticas está prohibida. Las guías corrugadas de la estructura fotónica, actúan como filtro, debido a su periodicidad, la luz es confinada en la guía de onda y se genera un *band-gap* fotónico (PBG), es decir, a partir de una longitud de onda no se transmite la luz (figura 1.8).

En las guías corrugadas la transducción principal se basa en la dependencia de su respuesta a los cambios del índice de refracción<sup>57,54</sup>. El índice de refracción (RI, *refractive index*) de un medio es el cociente de las velocidades de la luz en el vacío y en el medio. Como consecuencia del biorreconocimiento de las dianas se produce una variación en el índice de refracción y, por tanto, en la posición del *bandgap*, y esto se traduce en un cambio en el intervalo del espectro donde no es posible la propagación de la luz. Esta variación se suele utilizar como la respuesta del sensor y puede ser monitorizado, tanto el desplazamiento espectral como la variación de la intensidad óptica de un haz a una determinada longitud de onda (figura 1.9).

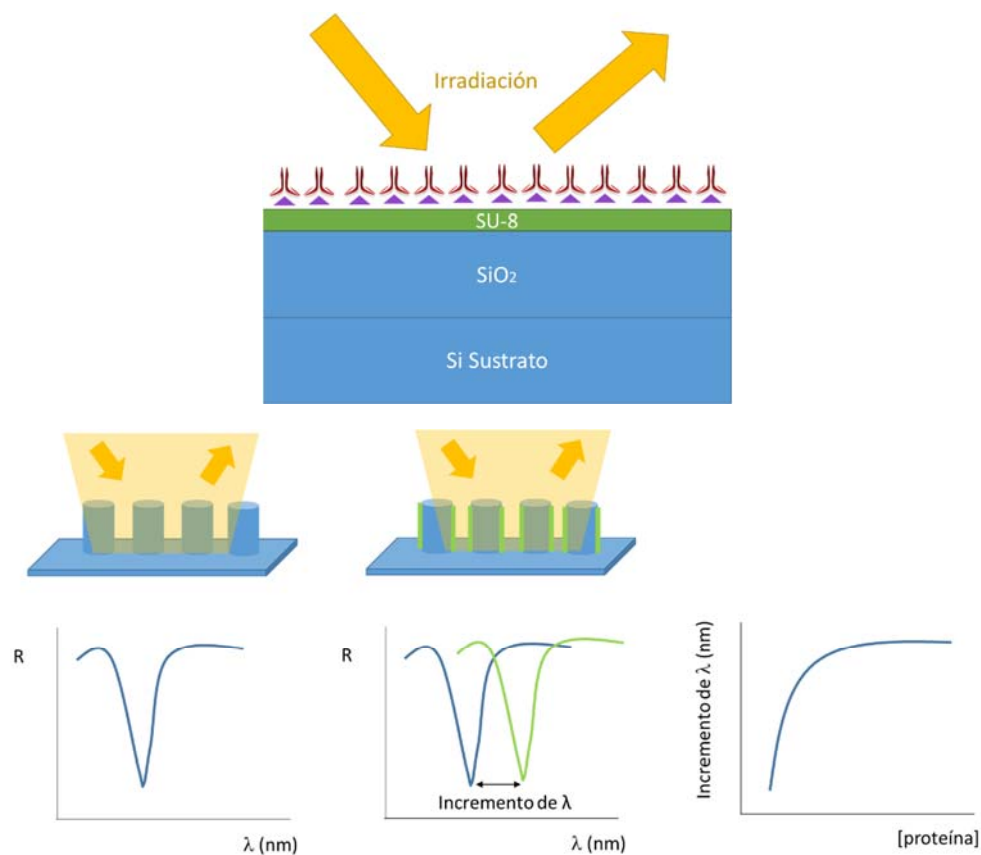


**Figura 1.9.** Representación esquemática de las medidas en estructuras de PBG. La onda evanescente interactúa con la materia de la superficie, lo cual modifica la luz que viaja dentro de la guía de onda, provocando un desplazamiento del PBG a longitudes de onda mayores.

Además de los cristales fotónicos existen otras configuraciones que se usan para nanobioensado, siendo las más destacadas los anillos resonantes (RR)<sup>20</sup> y los interferómetros Mach-Zehnder (MZI)<sup>58</sup>, que además permiten desarrollar dispositivos ópticos pasivos como filtros, acopladores o compensadores de dispersión.

Otro tipo de nanosensores fotónicos son los basados en interferómetros multicapa o nanoestructuras interferométricas, como los BICELLS (*Bio Photonic Sensing Cells*). Estos son interferómetros IR basados en matrices de nanopilares distribuidos a lo largo del sustrato. Este tipo de sensores elimina la necesidad de acoplamiento de luz que tiene lugar en los biosensores de guías de onda. Además, los BICELLS permiten la infiltración directa de líquidos y la captura de analitos<sup>59</sup>. Para la interrogación vertical de las nanoestructuras se utiliza un microscopio con una fuente de luz infrarroja conectada a un espectrómetro. Luego, un *software* de gestión de datos específico muestra la respuesta óptica al representar la intensidad de la señal de la matriz nanoestructurada en función de la longitud de onda, de acuerdo al rango espectral del espectrómetro y la fuente de luz. Las nanoestructuras pueden fabricarse con diferentes materiales y geometrías, que determinan en parte las prestaciones finales de transductor. Para sensar en estas estructuras en primer lugar, se irradia la superficie y se registra la longitud de onda basal (señal del blanco),

cuando el analito se ha anclado a la superficie se registra de nuevo la longitud de onda, debido a la masa acumulada se produce un incremento en la longitud de onda donde se produce la interferencia. Este incremento se relaciona con la concentración de analito. El dispositivo (figura 1.10) consiste en una red periódica de nanopilares de SU-8 sobre silicio y una capa interferométrica de SiO<sub>2</sub>. La luz se enfoca en la muestra con un ángulo determinado registrándola previamente a la biofuncionalización (en azul). Después se vuelve a medir observando un cambio en la longitud de onda (en verde). El incremento de la longitud de onda debido a la cantidad de proteína anclada a la superficie, permite obtener una relación entre el incremento en la longitud de onda y la concentración de la proteína, permitiendo su cuantificación.



**Figura 1.10.** Representación esquemática de las medidas en nanoestructuras periódicas de SU-8 tipo BICELLS. Nuestro grupo de investigación, en colaboración con el grupo liderado por el profesor Holgado de la UPM, demostró por primera vez la capacidad de biosensado de los BICELLS basados en nanopilares fabricados con el polímero SU-8. En estos trabajos se empleó el sistema modelo BSA/aBSA, alcanzando límites de detección en el orden de  $\text{ng/mL}^{60, 61}$ . Estas estructuras biosensibles permiten la detección simultánea de múltiples analitos. Cada nanopilar actúa como un solo nanosensor y el conjunto de ellos proporciona la señal óptima. Además, estas estructuras pueden ser integradas en un dispositivo PoC<sup>62</sup>.



Entre las ventajas que presentan, destacan la reducción del tiempo de medida y su simplificación, al no tener que acoplar la luz a una guía de ondas, la robustez de las medidas, o la producción en masa para la fabricación (disminuyendo los costes por análisis), por lo que tienen gran potencial para métodos de *screening*, sensibles y selectivos.

Los descubrimientos de nuevos materiales, nanotecnologías y el aumento exponencial del conocimiento transferido han sido elementos indiscutibles para el desarrollo de biosensores tipo *label-free*. Han demostrado un alto rendimiento, proporcionando buenas prestaciones analíticas en condiciones de laboratorio. Aun así, la mayoría de desarrollos todavía tienen que mejorar para convertirse en un producto comercial tipo *point of care*<sup>63</sup>. En primer lugar, necesitan operatividad y simplicidad donde no haya muchos pasos involucrados, y no se necesite personal especializado para su manejo. También deben ser portátiles y atractivos para dispositivos *lab-on-a-chip*<sup>64</sup> y *point-of-care*<sup>17</sup>. Por último, para el éxito comercial es esencial que sean productos fabricados en masa, hechos de materiales baratos, fáciles de encontrar en el mercado, de manera que los biosensores o al menos los transductores, puedan ser desechables<sup>17</sup>.

Por ello, la selección de los materiales para la construcción de un biosensor es un aspecto importante, que se discute a continuación.

### 1.5 Materiales usados en biosensado

Una parte fundamental a tener en cuenta en el desarrollo de un biosensor es la naturaleza del material que constituya el sustrato y las características de su superficie. Los materiales que se utilizan van desde el vidrio, el silicio y derivados, hasta los metales, los polímeros sintéticos, el carbono, principalmente. Además, la presentación es muy diversa, encontrando desde materiales rígidos planos (2D) a estructuras y multicapas (3D) o geles con textura blanda. Por otro lado, hay que considerar las propiedades la superficie utilizada para la inmovilización de los biorreceptores, ya que estos han de presentar alta capacidad de unión al analito. Así, la inmovilización de biomoléculas en una superficie constituye un reto, sobre todo cuando se trata de proteínas, ya que es necesario preservar su actividad biológica una vez inmovilizadas. Las proteínas tienden a desnaturalizarse en la interfaz con el

agua y el soporte sólido, además algunas proteínas al inmovilizarse presentan ciertas orientaciones que pueden enmascarar su sitio activo y, por otro lado existe el riesgo de agregación a las altas concentraciones empleadas en los procesos de inmovilización, aunque esto último es independiente del material.

Por lo tanto, las superficies que se empleen como sustrato, idealmente deben reunir una serie de características comunes como son: estabilidad química, buena relación señal/ruido, bajas uniones inespecíficas, y versatilidad para aplicarse con diferentes sistemas de detección.

Dentro de los materiales semiconductores están los basados en silicio destacando los de óxido de silicio. Este material es interesante porque permite cambiar la estructura, doparlo, etc. Además, se pueden generar nanoestructuras utilizando técnicas estándar de la industria microelectrónica. Los materiales conocidos como SOI (*silicon-on-insulator*) son empleados para fabricar transductores ópticos con potencial en nanosensado. Nuestro grupo tiene experiencia previa utilizando la modificación de este tipo de materiales para inmovilizar distintas biomoléculas, incluyendo tanto ácidos nucleicos como proteínas<sup>65</sup>. Este material ha sido uno de los usados durante el desarrollo de esta tesis como soporte de inmovilización.

Por otro lado, los polímeros sintéticos también pueden ser empleados como soporte porque son materiales hidrofóbicos, lo cual es una gran ventaja para anclar biomoléculas, pues pueden adsorberse a la superficie. Además, tienen un bajo coste de producción y facilidad de fabricación en masa, son moldeables y se pueden hacer canales u otras estructuras. Para poder ser usados en biosensado óptico, los polímeros deben ser transparentes a la radiación, y posee baja fluorescencia de fondo en el caso de estar trabajando con marcadores fluorescentes<sup>62</sup>.

Dentro de los materiales poliméricos existe una gran colección que permiten llevar a cabo el anclaje covalente de las biomoléculas ya que la superficie suele presentar algún grupo funcional disponible y adecuado para unir covalentemente a la sonda deseada<sup>62</sup>.

Alguna de las alternativas para mejorar las prestaciones de ciertas superficies es el uso de geles u otros recubrimientos como pueden ser agarosa, poliácridamida o nitrocelulosa<sup>66</sup>. En este las proteínas se unen por adsorción física conservando su

conformación nativa, pero presentan variaciones en la intensidad de la señal. En general, estos materiales son interesantes por su biocompatibilidad<sup>67</sup>.

Entre los polímeros orgánicos sintéticos, comúnmente denominados plásticos, que pueden ser empleados como soportes se encuentran el poliestireno (PS), policarbonato (PC), metacrilato (PMMA)<sup>66</sup>, polidimetilsiloxano (PDMS), poliamidas (Nylon), etc. También existen polímeros naturales que pueden ser usados como soporte como el látex, proteínas, almidones, celulosas y semisintéticos, etc. Algunos de estos materiales tienen grupos funcionales que permiten el anclaje covalente de las sondas, otros como el PC o PMMA permiten su modificación con los grupos funcionales deseados como amino o tiol. Estos materiales suelen ser hidrofóbicos, propiedad interesante para inmovilizar directamente biomoléculas, y suelen ser ópticamente activos con un índice de refracción que cambia cuando las moléculas están en la superficie. Además, suelen ser transparentes a la radiación UV/V, por ejemplo, y no presentan fluorescencia<sup>66</sup> intrínseca en un amplio rango de longitudes de onda.

Existen productos comerciales de uso diario, que incorporan este tipo de plásticos con elementos mecánicos o electrónicos de interés, además suelen ser económicamente accesibles como por ejemplo los discos CD, DVD o BD. Estos han sido empleados en nuestro grupo como soporte para la inmovilización de biomoléculas y llevar a cabo los ensayos de reconocimiento, ya que son plataformas de gran calidad, económicas y que permiten el uso del propio lector de discos como detector<sup>68</sup>.

En ese ámbito, nuestro grupo ha puesto a punto ensayos en formato micromatriz sobre discos compactos de diferentes maneras, y con distintas aplicaciones<sup>69</sup>. El uso de esta tecnología permite realizar ensayos sensibles, rápidos y para múltiples analitos utilizando un detector comercial<sup>70</sup>. También, los discos compactos pueden incorporar microrreactores mediante fluídica para la determinación de ADN a tiempo real, por ejemplo para la detección de bacterias *Salmonella*<sup>71</sup>. También, CDs y DVDs se han usado en inmunoensayos para la detección de marcadores de cáncer (alfa-fetoproteína) y herbicidas<sup>69</sup>. Además, los CDs se pueden recubrir con diferentes materiales reflectantes como oro, carbono o aluminio, manteniendo las propiedades ópticas<sup>68</sup>.

En esta tesis se han escogido como plataforma de ensayo los discos compactos tipo *Blu-ray* debido a sus propiedades ópticas, reducida señal de fondo, hidrofobicidad, durabilidad, antiadhesión y resistencia a los arañazos<sup>72, 70</sup>. Los discos *Blu-ray* (BD) presentan una capa de policarbonato donde está la pista de registro de la información, además, los BD, en su cara inferior están protegidos por un compuesto patentado por TDK conocido como Durabis que es químicamente inerte y altamente hidrofóbico<sup>73</sup>. La última característica permite imprimir puntos más pequeños y regulares para obtener micromatrices, por lo que se puede utilizar el BD en biosensado para diagnóstico molecular y la digitalización de imágenes derivadas del ensayo con un lector de BD<sup>74,75</sup>, en principio con mejores prestaciones.

**Tabla 1.2.** Características de la tecnología de grabación de disco óptico BD.

<b><i>Blu-ray</i> (BD)</b>	
	Etiqueta
	Policarbonato (1,1 mm)
Estructura en capas <sup>a</sup>	Capa reflectante
	Tinte de grabación
	( <i>Track</i> o pista)
	Capa de Durabis (0,1 mm)
Periodo <sup>b</sup>	320 nm
Anchura <sup>b</sup>	130 nm
Longitud <sup>b</sup>	150 nm
$\varnothing_{track}$ <sup>b</sup>	480 nm
$\varnothing_{bottom}$ <sup>c</sup>	131 nm
Altura del agujero <sup>b</sup>	65 nm
Altura del track <sup>b</sup>	20 nm
Láser $\lambda\Phi$	405 nm
Intensidad <sup>d</sup>	0,5/5-8 mW
Capacidad de datos	25 GB
Precio <sup>e</sup>	0,56/75 €

<sup>a</sup> Estructura de disco por capas (incidencia del láser desde la parte inferior).

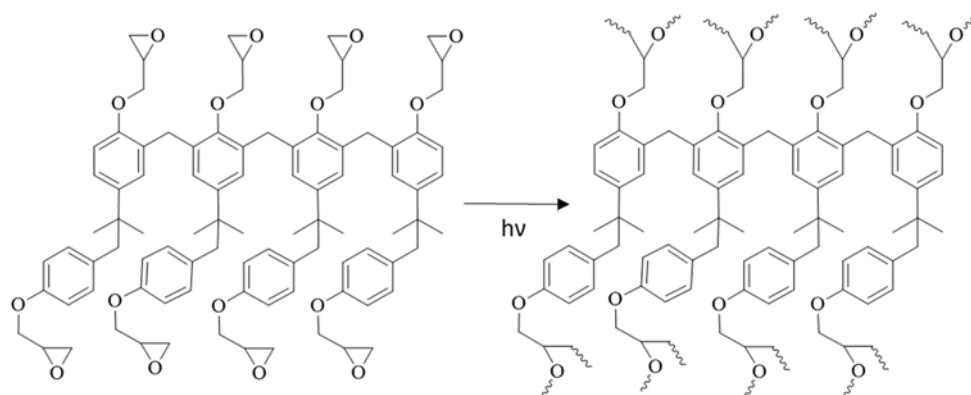
<sup>b</sup> Altura de agujero estimada por  $\lambda$  (1,55 x 4). La altura del *track* experimentalmente medida por microscopio de fuerza atómica.

<sup>c</sup> Diámetro del punto láser en la superficie interior del disco

<sup>d</sup> Intensidad de luz para la lectura/grabación

<sup>e</sup> Precios aproximadas, disco (-R)/unidad (lector - grabador)

De la misma manera que en los materiales de naturaleza inorgánica se utiliza ampliamente el vidrio como superficie plana para formato micromatriz, y los materiales en base SOI (*silicon-on-insulator*) para construir nanoestructuras que actúen como transductores ópticos; en el caso de los polímeros ocurre algo similar. Así, el PMMA, PC, etc. se han utilizado en formato plano para implementar micromatrices, pero también existen polímeros con capacidad de micro/nanoestructuración que se usan para fabricar transductores ópticos. De estos últimos destaca el SU-8<sup>59</sup>. Glicidil éter de bisfenol A (EEUU Patente 4882245) es una fotoresina con grupos epóxidos, en la cual la reacción fotoquímica cambia las propiedades de la zona irradiada. El SU-8 tiene 8 grupos epóxidos por monómero (figura 1.11). Esta resina se usa en la fabricación de microcomponentes y en microelectrónica, y presenta transmisión óptica para longitudes de onda entre los 350 y 400 nm.

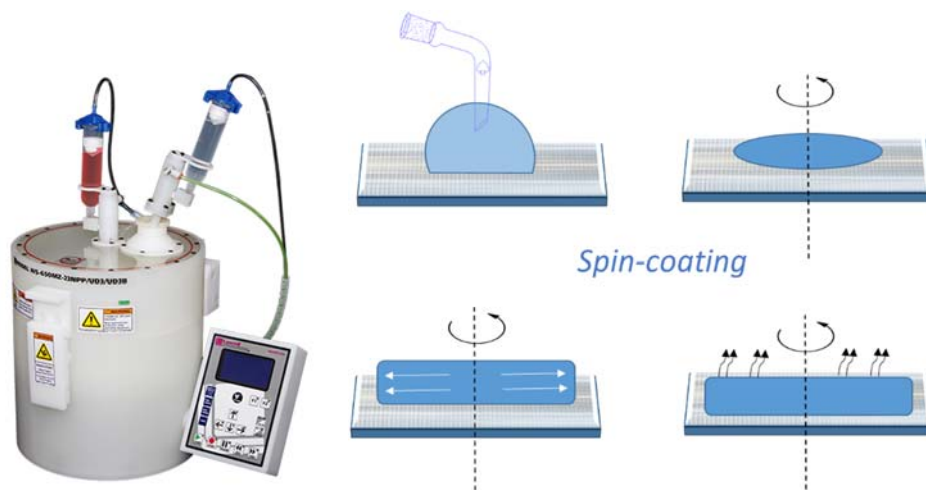


**Figura 1.11.** Estructura molecular del SU-8 [Genolet 2001] y apertura fotoquímica de los epóxidos.

El polímero debe depositarse sobre un sustrato cumpliendo varias condiciones: homogeneidad sobre la superficie, reproducibilidad y procesamiento de bajo costo. Aunque se han desarrollado varias técnicas para la deposición de la fotoresina, las principales son: recubrimiento por centrifugación (*spin-coating*), recubrimiento por pulverización y recubrimiento de menisco. Se hace especial hincapié en la primera técnica, ya que fue la utilizada en este trabajo.

La técnica de *spin-coating* empleada para depositar la resina de SU-8, permite la deposición de una película delgada sobre los sustratos mediante centrifugación

(figura 1.12). La fuerza centrífuga hace que este líquido se esparza por toda la superficie, con homogeneidad y reproducibilidad relativamente buena. El espesor resultante depende de la velocidad de rotación, la viscosidad de la disolución y también de la adhesión a la superficie. La homogeneidad de la película resultante se ve influenciada principalmente por la velocidad de rotación, la limpieza de la superficie y otros parámetros relacionados con el equipo utilizado para el *spin-coating*<sup>76,77</sup>.



**Figura 1.12.** Esquema del proceso de *spin-coating* o recubrimiento por centrifugación. Se deposita en la superficie del soporte de ensayo el sustrato disuelto convenientemente, luego se gira a alta velocidad, de modo que el flujo de aire seca el disolvente y se queda una película homogénea sobre la superficie.

Tras realizar el depósito de la resina, se debe efectuar un análisis visual, para buscar posibles defectos debidos a partículas, burbujas, mala adherencia e inhomogeneidad del recubrimiento.

Para la fabricación de nanopilares la superficie se irradia con un haz de electrones, o utilizando una fotomáscara y se vuelve a curar finalizando la reacción de reticulación. Tras una etapa de revelado se obtiene una estructura periódica de nanopilares aumentando la superficie efectiva de SU-8<sup>60</sup>.

En general, los beneficios que se buscan a la hora de elegir un soporte para biosensado son los derivados de sus propiedades físicas y químicas, suele ser su

simplicidad de manejo, robustez, bajo coste y fácil producción. La elección del soporte o superficie suele ser el primer paso para llevar a cabo el diseño de un biosensor, pues condicionará las siguientes etapas de desarrollo.

Centrándonos en el formato de micromatriz, el material más utilizado ha sido el vidrio. Por su bajo coste, su facilidad para modificarlo químicamente con distintos grupos funcionales y su baja señal de fondo. Este material es muy versátil en cuanto a presentación, es resistente a muchos disolventes y además es económico. Estas superficies unen las biomoléculas mediante interacciones electrostáticas o mediante la formación de enlaces covalentes, siendo esta última la vía más utilizada, aunque requiere la modificación o funcionalización de la superficie del vidrio. En 2004 Sobek *et al.*<sup>78</sup> realizaron ensayos pioneros en superficies de vidrio modificadas químicamente con grupos aldehídos, epóxidos o ácidos carboxílicos.

Así, una vez seleccionado el material a utilizar, el siguiente paso en la construcción de biosensor es diseñar la mejor estrategia de inmovilización de elemento de reconocimiento.

### 1.6 Métodos de inmovilización

En los biosensores, normalmente que por definición operan en formato heterogéneo, el componente biológico está inmovilizado sobre un soporte sólido, que puede ser inerte o actuar como transductor de la señal. Las biomoléculas pueden ser inmovilizadas empleando diferentes técnicas, dependiendo del tipo de interacción entre la biomolécula y el soporte o del tipo de soporte.

La inmovilización es definida como la unión de las biomoléculas (proteínas, ANs otras) a una superficie perdiendo la movilidad. Este paso es clave para de un biosensor y dicha inmovilización debe realizarse sin que las biomoléculas pierdan su capacidad de reconocimiento, debido a una orientación aleatoria o una modificación conformacional. La forma empleada para la inmovilización determinará las propiedades del biosensor. Dentro de las técnicas en uso existen las técnicas reversibles, que se caracterizan porque la ruptura del complejo biomolécula-analito manteniéndose la actividad de la biomolécula, y técnicas irreversibles, donde la ruptura supone la pérdida de su actividad y/o la modificación del soporte.

En general, la elección de una estrategia de inmovilización está determinada por las propiedades fisicoquímicas tanto de la superficie del transductor como de la biomolécula biorreceptora. Se pueden utilizar varias rutas para biofuncionalizar la superficie del sensor: adsorción física por depósito directo de la biomolécula; monocapas autoensambladas; unión covalente de la biomolécula a la superficie; interacciones no covalentes con una capa activa previamente depositada, ya sea por interacciones electrostáticas no específicas o por afinidad intermediado por biotina-avidina, sistemas His-Tag, proteína A/G para anticuerpos, o atrapamiento físico en una capa de polímero o en un gel.

La adsorción física es la estrategia más simple, en ella las biomoléculas se adsorben en las superficies a través de fuerzas intermoleculares; interacciones electrostáticas, hidrófobas o polares. Las fuerzas intermoleculares dependen de la naturaleza de la biomolécula y de la superficie, la capa resultante suele ser heterogénea y orientada aleatoriamente para minimizar las repulsiones del sustrato adsorbido. La geometría de la molécula inmovilizada limita la capacidad de adsorción a la superficie. Y una alta densidad de biorreceptores podría conducir al bloqueo estérico de los sitios activos de las proteínas interfiriendo con sus propiedades funcionales<sup>79</sup>. Además, esta estrategia presenta una serie de inconvenientes cuando se trata de aplicarla en biosensores; puede llevar a la desorción de los receptores activos durante el ensayo y también cuando se emplean disoluciones de pH alto o bajo, o fuerza iónica elevada, o disolventes orgánicos. Otro inconveniente es debido a la proximidad de las biomoléculas con la superficie lo cual puede causar un plegamiento no deseado de ellas, y la consiguiente pérdida de su afinidad por el antígeno. Aun así, este método es uno de los más empleados para la inmovilización de proteínas debido a su simplicidad, especialmente sobre sustratos poliméricos.

La superficie del transductor también puede ser funcionalizada mediante monocapas autoensambladas empleando moléculas anfifílicas que se autoorganizan para formar una estructura bidimensional<sup>80</sup>. El grupo hidrófilo tiene una afinidad especial por la superficie, mientras que la cola hidrófoba tiene un grupo funcional que puede unirse al biorreceptor. Las monocapas de este tipo pueden formarse a partir de polímeros heterobifuncionales, tales como subunidades de polietilenglicol (PEG)<sup>81</sup> con diferentes terminaciones, así como alquiltioles terminados en dendrímero<sup>82</sup>.



Entre las técnicas de inmovilización más utilizadas se encuentran las basadas en la unión covalente que permiten la unión irreversible de las biomoléculas a una superficie de forma generalmente orientada. Para ello, muchas veces es necesario llevar a cabo una modificación que genere grupos funcionales adecuados en la superficie. Refiriéndose a proteínas, los enlaces covalentes se forman, la mayoría de veces, entre grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas con las superficies modificadas, resultando una unión irreversible. Los grupos funcionales más reactivos en proteínas son los amino de los residuos de la lisina, los grupos carboxilo del ácido aspártico y glutámico y los grupos tiol de la cisteína<sup>83</sup>. Estos grupos funcionales se utilizan como puntos de anclaje mediante reactivos, como los ésteres de succinimida o carbodiimidas, que pueden unirse a las superficies previamente modificadas con grupos carboxilo, amino o tiol (tabla 1.3).

Para inmovilizar ácidos nucleicos, es posible usar interacciones electrostáticas directas cuando se trabaja con sustratos de vidrio o bien para anclaje covalente, aprovechar la versatilidad de la síntesis de ADN que permite la incorporación directa de grupos reactivos muy diversos al final de la secuencia<sup>84, 65</sup>.

**Tabla 1.3.** Grupos funcionales disponibles en proteínas y las funcionalizaciones más frecuentes de las superficies de los sustratos.

Cadenas laterales	Aminoácidos	Superficies
-NH <sub>2</sub>	Lys, Hidroxil-Lys	Ácidos carboxílicos Ésteres activos (NHS) Epóxidos Aldehídos
-SH	Cys	Maleimidias Piridil disulfuros Vinil sulfonas
-COOH	Asp, Glu	Aminas
-OH	Ser, Thr	Epóxidos

La formación del enlace covalente mediante las cadenas laterales de los aminoácidos puede ser aleatoria, pudiendo producir la unión simultánea de varios residuos, aumentando la heterogeneidad de la disposición las proteínas ancladas.

Por otro lado, estas uniones químicas se pueden realizar de manera ordenada para conseguir un anclaje orientado con respuesta más selectiva. En este tipo de anclaje

se buscan procedimientos que proporcionen una inmovilización reproducible y orientada. La inmovilización específica se lleva a cabo mediante la funcionalización de las moléculas a unir y/o de la superficie<sup>79</sup>. En definitiva, la inmovilización covalente se aplica porque presenta una serie de ventajas como la elevada disponibilidad de reactivos químicos con propiedades adecuadas como solubilidad, reactividad y estabilidad, posibilidad de incluir espaciadores entre la biomolécula y el soporte y robustez del anclaje. Sin embargo, también presenta algunas desventajas como la pérdida de actividad biológica si no se controlan los grupos de la biomolécula que reaccionan con el soporte, la necesidad de etapas previas de activación del soporte y el uso de reactivos tóxicos en algunos casos.

Dentro de las estrategias de inmovilización covalente, las reacciones fotoinducidas presentan propiedades altamente interesantes. Las reacciones fotoquímicas para inmovilización se llevan a cabo mediante radicales generados por la irradiación a una longitud de onda dada en presencia de reactivos fotosensibles. Se pueden usar en todos los materiales orgánicos, son rápidas, eficientes, se realizan en un solo paso y no es necesaria la funcionalización de la molécula de interés. Además, su principal ventaja es la biocompatibilidad, porque se emplea con benzofenonas o diazirinas que se activan por irradiación a longitudes de onda superiores a 350 nm y en donde la mayoría de las biomoléculas son transparentes<sup>79</sup>. Por eso, las proteínas y ANS fotoinmovilizadas conservan su actividad biológica una vez han sido ancladas, de modo que la irradiación no supone una destrucción significativa de la estructura 3D de las moléculas, y por ello, este tipo de reacción se aplica para la fabricación de micromatrices de proteínas<sup>85</sup>.

Sin embargo, aún hay aspectos a mejorar como la selectividad de los grupos funcionales de modo que no generen radicales inespecíficos, o la necesidad de un grupo fotorreactivo, o que el grupo funcional protegido necesario para la fotoactivación pueda reaccionar con la proteína.

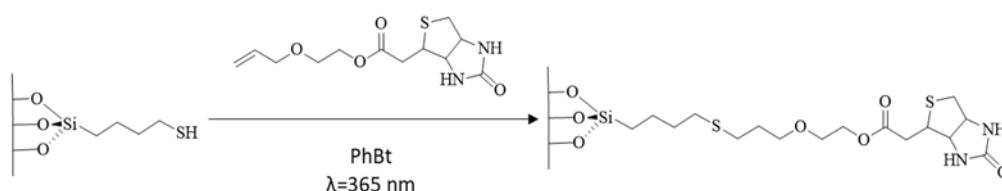
Otro grupo de reacciones interesantes para la inmovilización de reactivos son las que se conocen como química *click*. Esta metodología agrupa un conjunto de reacciones que permiten obtener sustancias de forma rápida y eficiente. En concepto fue introducido en 2001 por Sharpless<sup>86</sup>, quien inspirado por las reacciones que se dan en la naturaleza, agrupó bajo este término un conjunto de reacciones conocidas que tenían en común una serie de propiedades muy interesantes. Para ser consideradas

como química *click* las reacciones tienen que ser estereoespecíficas, modulares, fáciles de realizar, de amplio alcance, transcurrir con altos rendimientos, no generar subproductos, y utilizar disolventes no agresivos o no necesitar disolvente.

Esta química es rápida y fiable, es aplicable tanto con moléculas de pequeño tamaño, como fármacos, como macromoléculas, como proteínas y ha sido muy utilizada en el campo de los polímeros.

Un tipo de reacción, que no fue incluida en el trabajo de Sharpless, pero que, por sus características también cumple con los requisitos de la química *click*, y por tanto es aceptada como tal, es la reacción de acoplamiento tiol-alqueno (TEC). Esta reacción se basa en el uso de luz UV como iniciador radicalario de la reacción, presentando ventajas como tiempos cortos de trabajo, reducción de pasos de reacción, simplificación de los procesos, etc<sup>87</sup>. Ejemplos de la aplicación de esta metodología para el anclaje de biomoléculas, son los trabajos realizados por Waldman y colaboradores que emplean superficies funcionalizadas con grupos tiol para inmovilizar las biomoléculas, las cuales se han modificado con un doble enlace (grupo farsenil)<sup>88</sup>.

Durante años, nuestro grupo ha estado estudiando este tipo de reacciones para el anclaje de biomoléculas<sup>89</sup>, porque es una estrategia rápida, sencilla y biocompatible (figura 1.13). Algunos de estos estudios se basan en el anclaje directo de sondas a superficies, como vidrio y SOI, previamente funcionalizadas, obteniendo buenos rendimientos de inmovilización de sonda e hibridación de oligonucleótidos de cadenas complementarias<sup>90, 87</sup>.



**Figura 1.13.** Esquema de la reacción *click* basada en tiol-eno<sup>89</sup>.

Para emplear la reacción TEC en el anclaje de oligonucleótidos estos tienen que modificarse previamente adicionándoles grupos tiol o alqueno. Así, esta reacción se ha aplicado en la detección de productos de PCR, discriminación de SNP, e

inmovilización de balizas moleculares para la detección de microRNAs mediante técnicas de biosensado nanofotónico<sup>65,91</sup>. También, se han realizado estudios con anticuerpos, en concreto con medios anticuerpos, para el anclaje covalente a una superficie previamente modificada mediante el grupo vinilo. Por otro lado, en nuestro grupo se ha estudiado la modulación de la hidrofobia e hidrofilia en las superficies de biosensado para mejorar sus prestaciones, empleando organosilanos con grupos vinilo y distinta longitud del silano, para finalmente anclar las sondas tioladas mediante la reacción fotoquímica tiol-eno<sup>92</sup>. Además de la reacción de acoplamiento tiol-eno, en el grupo se han estudiado otro tipo de reacciones características de química *click*, que han dado también buenos resultados. Por ejemplo, las reacciones de acoplamiento tiol-epoxi<sup>75, 93</sup>, tiol-ino<sup>94, 95</sup>, o tiol-carbono-flúor<sup>96</sup>. Todas ellas usan luz UV como catalizador del acoplamiento y han sido empleadas para inmovilizar ácidos nucleicos o anticuerpos<sup>97</sup>. En todos estos casos siempre se ha trabajado en superficies 2D. Sin embargo, existe otra vía de inmovilización que también resulta muy interesante y ampliamente utilizada y que, hasta el momento, en nuestro grupo no ha sido trabajada, como es la inmovilización en redes tridimensionales.

El atrapamiento físico de los biorreceptores en una matriz polimérica permite la incorporación de moléculas huésped dentro de la matriz en un solo paso. Es decir, permite tener una metodología rápida, simple y con ahorro de reactivos. Este procedimiento evita la necesidad de una unión covalente de biomoléculas y la inclusión de grupos específicos en su superficie o en la del polímero requerida para la adsorción física<sup>98</sup>. Los polímeros más comunes como matrices para atrapar biomoléculas son la polianilina, el politiofeno, el polipirrol y sus derivados. Una de las principales ventajas de usar una matriz polimérica 3D es que permite almacenar gran cantidad de sonda. En algunos casos, esta metodología requiere el tratamiento de la superficie y se ha observado un bajo índice de hibridación. Sin embargo, el atrapamiento físico permite llevar a cabo la inmovilización de un gran número de receptores, aunque algunos podrían liberarse de la red polimérica, por eso la inmovilización covalente en redes 3D, combina las ventajas de la inmovilización covalente y el atrapamiento, impidiendo la liberación de los receptores<sup>99</sup>.

### 1.7 Hidrogeles, su utilización y aplicaciones

En los últimos años la popularidad de los hidrogeles se ha incrementado debido a sus propiedades únicas, tanto en los hidrogeles obtenidos a partir de polímeros naturales como en los sintéticos. Los hidrogeles son redes tridimensionales entrecruzadas de polímeros hidrofílicos formados mediante uniones químicas o físicas de moléculas. Estos hidrogeles tienen diferentes propiedades como biocompatibilidad, una estructura porosa y estabilidad. Además, absorben agua siendo permeables a los analitos, lo cual convierte a los hidrogeles en un medio favorable e idóneo para albergar biointeracciones específicas. Su parecido con el tejido vivo abre muchas oportunidades para aplicaciones en áreas biomédicas. Actualmente, se continúa estudiando el potencial de los hidrogeles que encontramos en muchos productos cotidianos. Estos hidrogeles se utilizan para fabricar lentes de contacto, productos de higiene, tejidos, sistemas de administración de fármacos, productos alimentarios, implantes, prótesis y vendajes para heridas<sup>100</sup>.

Como se ha mencionado, una de las características principales del hidrogel es su capacidad de almacenamiento de agua. Por ello, los hidrogeles son entornos ideales para incluir biomoléculas como las proteínas, y para que tengan lugar las reacciones de biorreconocimiento. Así, los hidrogeles son candidatos idóneos para aplicarlos en biosensado, pues permiten la inmovilización del biorreceptor en su interior (proteínas, enzimas, péptidos u oligonucleótidos), dando lugar a una gran superficie activa. Por ello, se han utilizado para imitar el entorno fisiológico y para aumentar la capacidad de carga. Otra cualidad interesante del uso de hidrogeles es su potencial para proporcionar relaciones de señal/fondo extremadamente altas, con bajo grado de unión inespecífica<sup>101, 102</sup>.

Los geles son usados muchas veces para el atrapamiento o encapsulamiento de biomoléculas receptoras en el interior de la matriz del gel, mientras que las moléculas pequeñas, como pueden ser las dianas moleculares, pueden fácilmente difundir dentro del gel para ser reconocidas. Sin embargo, una unión covalente del biorreceptor siempre resulta interesante, especialmente cuando son de pequeño tamaño, como polipéptidos o cuando los receptores y las dianas son de tamaño similar, por ejemplo, en el caso de los ácidos nucleicos utilizados en los ensayos de hibridación.

El uso de los hidrogeles en formato de micromatrices se ha centrado en el estudio de la adhesión y la proliferación celular o el cribado de fármacos. También, destacan el uso de hidrogeles derivados de polisacáridos, usando poliacrilamida o hidrogeles a base de poliacrilato, un ejemplo son los hidrogeles de lectina para la captura de bacterias<sup>103</sup>. Los hidrogeles basados en poliacrilamidas fueron descritos por Gushchin y colaboradores para microchips de oligonucleótidos o proteínas mediante detección fluorimétrica<sup>104</sup>; y desarrollados posteriormente por Arenkov y colaboradores para llevar a cabo la inmovilización de proteínas y reacciones enzimáticas en el gel, estos geles son estables, termorresistentes y porosos. Arenkov y colaboradores usaron el gel para realizar inmunoensayos tipo sándwich para detectar hepatitis (300 kDa) e incluso con enzimas como GUS ( $\beta$ -D-glucuronidasa) (290 kDa)<sup>105</sup>. Cuando el hidrogel se usa en inmunoensayo, el tamaño de los poros debe permitir que un anticuerpo (aprox. 150 kDa) penetre en el gel por difusión pasiva<sup>106</sup>.

Otras de las propiedades por las cuales se han utilizado los hidrogeles en formato de micromatriz se basa en el incremento de la superficie de análisis. Tal y como se había mencionado, los geles suelen presentar una estructura tridimensional. La mayoría de las micromatrices empleadas se basan en *spots* planos (2D), sin embargo, emplear estos materiales podría aumentar las señales. En los últimos años la aplicación de hidrogeles en micromatriz se ha generalizado llegando a diferentes ámbitos<sup>106, 107</sup>. También, se han desarrollado microchips basados en hidrogeles tridimensionales con ADN o proteínas para la detección de marcadores tumorales vale, buena sensibilidad<sup>108</sup>. La porosidad del gel permite la penetración de ADN de 500 nucleótidos, que hibrida con las sondas inmovilizadas en interior. Estos hidrogeles, derivados de poliacrilamida, son estables, presentan baja señal de fondo, bajas absorciones inespecíficas y alta capacidad de inmovilización. La inmovilización de ADN se llevó a cabo mediante dos metodologías, en la primera mediante la fabricación de un gel copolimerizando gel-ADN. La segunda se llevó a cabo con ADN aminado<sup>109</sup>. Estas metodologías resultan interesantes, pero tienen largos tiempos de polimerización y son costosas.

Continuando con su aplicación en micromatrices, es interesante usar la propiedad que permite que este material sea copolimerizado junto a la biomolécula que se quiere inmovilizar en el hidrogel. Esto supone una gran ventaja porque se reduce el

tiempo de fabricación y permite realizar los inmunoensayos en un tiempo menor. Así, Mirzabekov y colaboradores han desarrollado microchips de hidrogeles tridimensionales para inmovilizar ADN o proteínas<sup>106,109,110</sup> debido a la red de entrecruzamiento de un hidrogel con grupos acrilatos que atrapa a las moléculas, que también pueden estar modificadas con grupos acrilato, por tanto la polimerización se lleva a cabo entre los dobles enlaces. En 2001, en este grupo de investigación desarrollaron una nueva generación de biochips basados en el uso de un hidrogel de poliacrilamida; que incluían la inmovilización de proteínas modificadas con distintos grupos funcionales como acrilato y, mejorando la porosidad de los geles<sup>110,111</sup>, dando buenos resultados en inmunoensayo de enterotoxinas<sup>112</sup>. Esto ha sido posible gracias a la tecnología de copolimerización de los geles en los microchips que se ha usado en la preparación de ambos tipos de microchips de ADN y proteínas, inmovilizados de forma covalente<sup>106,109,110</sup>.

Los microchips de gel con anticuerpos inmovilizados también han sido utilizados en ensayos cuantitativos con resultados positivos en la detección de marcadores tumorales ( $\alpha$ -fetoproteína, antígeno prostático específico, antígeno carcinoembrionario, otros antígenos de cáncer CA 125, CA 19-9, CA 15-3) con buena sensibilidad (LOD 0,2 ng/mL) para el antígeno prostático específico<sup>106,109,110,113</sup>.

La inmovilización de las biomoléculas puede ser llevada a cabo por una reacción de acoplamiento tiol-eno inducida por luz, durante esta reacción el monómero del gel formado participa en una polimerización radicalaria con los grupos insaturados. Como resultado de la copolimerización, la molécula se ancla covalentemente al hidrogel a través de la red del polímero<sup>99</sup>. Sin embargo, para llevar a cabo la reacción de fotopolimerización se necesita la modificación previa de la proteína para incorporar grupos insaturados. Ello requiere modificar primero la proteína que puede conllevar la pérdida de la actividad biológica de la proteína que a su vez puede afectar en las etapas de reconocimiento.

En definitiva, uno de los retos a estudiar en el desarrollo biosensores con formato de micromatriz es la inmovilización de las moléculas de forma rápida y sencilla, sobre todo si tenemos en cuenta que hay que preservar su actividad biológica para que haya biorreconocimiento. Por ello, los estudios basados en tecnología de geles son interesantes, pues permiten la inmovilización en un medio hidrofílico y tridimensional con gran cantidad de agua, siendo condiciones similares al entorno

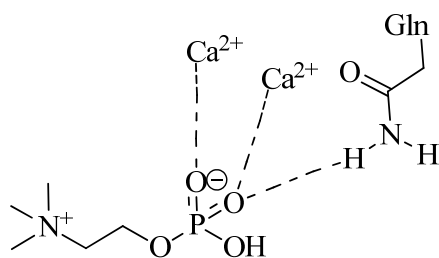
biológico. Además, estos geles, como se ha mencionado con anterioridad, pueden ser aplicados a estudios con ácidos nucleicos lo que aumenta su versatilidad.

Salvo los comentados, existen pocos ejemplos en la literatura basados en la unión covalente del biorreceptor al gel. Hermann *et al.* han estudiado recientemente un novedoso hidrogel unido *in situ* a la superficie, basado en la reacción de cicloadición azida-alquino para la inmovilización tanto por encapsulamiento de proteínas como mediante enlace covalente de oligonucleótidos<sup>114</sup>. La metodología propuesta en esta tesis se basa en la reacción de acomplamiento tiol-eno catalizada por luz UV, esto permite realizar de forma simultánea la formación de gel y la inmovilización de las sondas, dando lugar a una metodología rápida y reduciendo el proceso del ensayo.

En esta tesis se ha trabajado con dos tipos de hidrogeles basados en unidades de fosforilcolina y de dextrano, respectivamente. A continuación, se hará un breve comentario del estado del arte de estos dos tipos de hidrogeles concretos. Los geles en base fosforilcolina han sido usados para producir polímeros con aplicaciones en lentes de contacto, como recubrimientos para dispositivos médicos (como por ejemplo un *stent* coronario) y como aditivos en cosmética. También, los polímeros derivados de fosforilcolina se han usado para desarrollar otros materiales no trombogénicos, presentando buena compatibilidad con la sangre<sup>115</sup>. Por ejemplo, este polímero se ha usado en biosensores de glucosa, en este caso como polímero de membrana para recubrir la aguja del sensor electroquímico y monitorizar la concentración de glucosa durante aproximadamente dos semanas<sup>116</sup>. Además, estos polímeros se han estudiado como estructuras artificiales de membranas celulares, y se han aplicado en trasplantes de órganos artificiales.

Por otro lado, la unión de la proteína C-reactiva (CRP) a la fosforilcolina está bastante estudiada a nivel fisiológico, ya que desempeña un papel importante en la defensa del huésped. La CRP se une a la fosforilcolina (la parte polar de los fosfolípidos) en células dañadas o patógenas de las membranas, induciendo una respuesta en el sistema inmune. Esta unión es más fuerte en presencia de  $\text{Ca}^+$  y EDTA, cada subunidad de la CRP se une a una fosforilcolina en presencia de dos iones calcio<sup>117</sup> (figura 1.14).



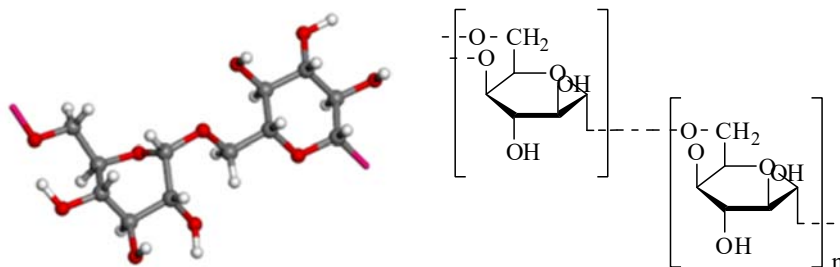


**Figura 1.14.** CRP unida a la fosforilcolina coordinada por iones Ca.

Así, la fosforilcolina es una sustancia que se encuentra en la membrana celular como fosfolípido, también se conoce que tiene un alto efecto repelente de muchas sustancias reduciendo la adsorción inespecífica e impidiendo el crecimiento no deseado de bacterias u otros microorganismos. Además, otra propiedad que presenta es su biocompatibilidad en medios biológicos como la sangre, plasma de proteínas, etc<sup>118</sup>. Así pues, planteamos como objetivo generar/emplear un hidrogel basado en fosforilcolina que aunaría las propiedades de reconocimiento específico de CRP, hidrofilia y repelencia a adsorciones inespecíficas con el hecho de inmovilizar mediante redes 3D, que potencialmente mejorarán las prestaciones en comparación con la inmovilización 2D.

Con respecto al otro tipo de hidrogeles, el dextrano es un polisacárido de D-glucopiranososa producido por bacterias *Leuconostoc mesenteroides*<sup>119</sup> (figura 1.15), se utiliza como antiplaquante, aunque también tiene aplicaciones farmacéuticas y agrícolas. Este polímero está disponible en una gran gama de masas moleculares. Entre las diversas propiedades de este polisacárido destacan: la alta solubilidad en agua, biocompatibilidad, biodegradabilidad y estabilidad<sup>120</sup>. El dextrano también es conocido porque se utiliza en la separación de moléculas mediante cromatografía, siendo su nombre comercial Sephadex. También, se han realizado estudios basados en hidrogeles derivados de dextrano debido a la reactividad de los grupos hidroxilo. Por ejemplo, estos derivados han sido estudiados para aplicaciones en ingeniería de tejidos blandos, por su resistencia a la adsorción de proteínas y a la adhesión celular, así se estudió un derivado carboximetilado de dextrano para evitar la colonización del tejido epitelial de la cornea<sup>119</sup>. También, el dextrano ha sido estudiado como recubrimiento unido a poliestireno por su capacidad de rechazo de fibrinógeno y el efecto sobre la movilidad electroforética<sup>121</sup>. El hidrogel dextrano también se incorpora en sensores de resonancia de plasmón superficial (SPR) para la detección

sin marcaje. El hidrogel se usa como recubrimiento de la película de oro del sensor, mejorando su capacidad de inmovilización de la película de oro del sensor<sup>3</sup>. En formato micromatriz el dextrano también se emplea se ha usado en la bibliografía para mejorar las condiciones de hibridación de sondas de ADN<sup>121</sup>.



**Figura 1.15.** Estructura química del dextrano.

Las propiedades mencionadas lo hacen un candidato muy interesante para su utilización en la inmovilización 3D de biomoléculas y para aplicarlo tanto en micromatrices como en otros formatos de biosensado, por ello se seleccionó para estudiarlo en esta tesis.

### 1.8 Marcadores Cardiovasculares: CRP, Mioglobina, Troponina I y T

Parte de la investigación realizada en la tesis se enmarca dentro de las tareas a desarrollar en un proyecto europeo financiado por el programa Horizon2020, de título “*Advanced nanophotonic point-of-care analysis device for fast and early diagnosis of cardiovascular diseases (PHOCNOSIS)*”<sup>122</sup>. El principal objetivo es el desarrollo de un dispositivo biosensor de análisis, *point-of-care* (PoC), basado en conceptos nanotecnológicos y micro/nanofluídicos para el diagnóstico precoz de enfermedades cardiovasculares. Además, el diagnóstico se basa en la detección rápida (<10 minutos), ultra-sensible (<1 ng/L), y sin marcaje (*label-free*) de diversos biomarcadores cardiacos de relevancia (CRP, mioglobina y troponina) En muestras de sangre. Este dispositivo pretende mejorar la gestión sanitaria, reducir costes, analizar mayor cantidad de muestras, todo ello con el objetivo de las tasas de supervivencia de los pacientes. Para ello se plantea el uso, como transductor, de una guía corrugada de óxido de silicio que es un sistema de óptica integrada basado en

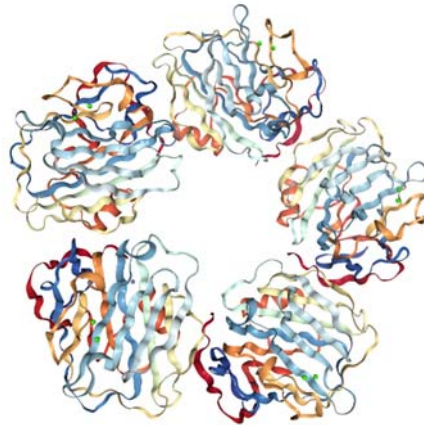
guías de ondas. Los biomarcadores selectivos para su determinación en sangre mediante inmunoensayo fueron las proteínas, troponina, CRP y mioglobina.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de defunción en todo el mundo. Causaron alrededor de 17,5 millones de muertes en 2012 según la Organización Mundial de la Salud (OMS), y se espera que para 2030 las muertes lleguen a casi 23,6 millones. Además, el 80% de los infartos de miocardio y de los accidentes cerebrovasculares prematuros son prevenibles y el 75% de las muertes por ECV se producen en países de ingresos bajos y medios.

Los marcadores o biomarcadores cardíacos son sustancias que se liberan cuando se produce algún daño en el corazón. La concentración de estos marcadores es medida para diagnosticar las enfermedades cardiovasculares. Por ello, las investigaciones se centran en buscar marcadores biológicos de ECV presentes en sangre, orina o saliva. Estos marcadores de las ECVs suelen aparecer durante ciertos procesos inflamatorios, pues es un mecanismo de la aterogénesis y la progresión de enfermedad arterial coronaria, la inflamación se relaciona con lesiones tisulares. Algunos de esos biomarcadores presentes en la sangre son la proteína amiloide sérica (AAS), creatina quinasa, interleucina-6, mioglobina, troponina I y T, fibrinógeno y la proteína C reactiva (CRP)<sup>123</sup>. A efectos de diagnóstico, se deben estudiar varios marcadores para poder conocer el estado de un paciente.

### **CRP**

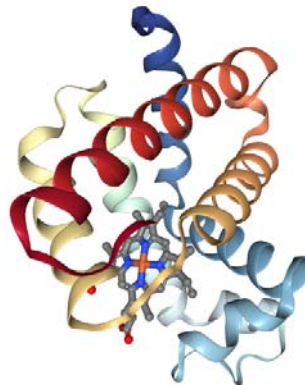
La CRP es uno de los biomarcadores cardiovasculares más estudiados y bien establecidos. Es una proteína de fase aguda que se produce en el hígado y está presente en sangre a elevadas concentraciones en los procesos inflamatorios. Pertenece a la familia de las pentraxinas, pues está compuesta por 5 protómeros o subunidades idénticas unidas por interacciones no covalentes (figura 1.16). La CRP es una molécula interesante debido a su distribución equitativa en el sistema vascular sin presentar retención significativa en los sitios de inflamación. Los niveles de CRP relacionados con la probabilidad de sufrir una ECV se clasifican en: riesgo mínimo a una concentración de CRP menor a 1 mg/L, riesgo medio cuando la concentración de CRP está en el intervalo de 1-3 mg/L y riesgo alto cuando la concentración de CRP es mayor a 3 mg/L<sup>124</sup>.



**Figura 1.16.** Estructura química de la proteína C reactiva (Imagen de PDB).

### **Mioglobina**

En 1958, John Kendrew determinó por primera vez la estructura de una proteína, en concreto la estructura de la Mioglobina (Mb) mediante cristalografía de rayos X. La mioglobina es una proteína monomérica de 153 amino ácidos, con una estructura globular, de bajo peso molecular (18 kDa), y contiene un grupo hemo que se une al oxígeno (figura 1.17).



**Figura 1.17.** Estructura química de la mioglobina con el grupo hemo en el interior (imagen de PDB).

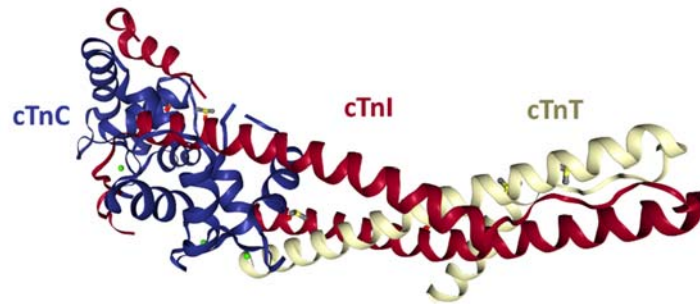
La mioglobina se encuentra entre los biomarcadores evaluados en el diagnóstico del infarto de miocardio<sup>123</sup>. También, es un marcador de necrosis precoz, cuando se expresa encontrándose en músculos cardíaco y esquelético. La liberación precoz de la mioglobina permite su detección a partir de la primera o segunda hora de su aparición en sangre. Además, su nivel más alto se alcanza entre las 6-12 h y desaparece del plasma a las 12-24 h. La sensibilidad clínica requerida para la mioglobina es de 80 ng/mL, particularmente en un rango entre 70 y 80 ng/mL<sup>125</sup>. Se han utilizado diferentes métodos para la detección de mioglobina tanto en suero como en orina<sup>126</sup>, existiendo dos grandes grupos de métodos fisicoquímicos, e inmunológicos. Los métodos inmunológicos son utilizados por su especificidad y eficacia en la detección. En la actualidad se emplean inmunoensayos con anticuerpos monoclonales que permiten su detección en cuestión de minutos. Sin embargo, esta metodología aún tiene limitaciones como que no permite diferenciar entre la estructura de la molécula expresada en el músculo miocárdico y en el esquelético, también es una proteína que se encuentra en niveles altos en pacientes con insuficiencia renal.

### **Troponina (cTn)**

Entre los marcadores de daño miocárdico destacan de manera especial las troponinas cardíacas (cTnT y cTnI) por su cardioespecificidad. La troponina es una proteína globular presente en los músculos esqueléticos y cardíacos. Existen tres tipos de troponina: la T que se une a la actina, la troponina C que se une al calcio y la troponina I que inhibe la interacción con la miosina en ausencia de iones calcio (figura 1.18). Desde el punto de vista clínico sólo tienen interés las troponinas I y T pues son cardioespecíficas<sup>125</sup>.

Los valores normales de troponina en sangre suelen ser menores a 0,25 ng/mL para la troponina I y 0,2 ng/mL para la troponina T. Durante el proceso de necrosis miocárdica, la troponina se detecta a partir de 4-6 h, siendo el máximo a las 12-48 h y se mantiene en sangre durante 4-12 días<sup>125,127</sup>. La troponina I (cTnI) se denomina así porque inhibe la actividad de la miosina ATPasa, además existen 3 tipos de troponina I localizados en los músculos. La troponina T (cTnT) no es activa por sí sola, sino que se activa por la troponina C.

Actualmente, existe un test de la troponina que se ha convertido en uno de los métodos más importantes para el diagnóstico precoz de pequeños infartos de miocardio y, que puede detectar posibles lesiones de corazón o de miocardio<sup>128</sup>. El test TROPT® es una herramienta de detección rápida (1-15 min de análisis) y fiable para la detección de las células afectadas, siendo un procedimiento menos costoso y más rápido que usando ELISA (2 h). Sin embargo, esta prueba sólo indica el daño cuando se realiza antes de 24 h, pues al realizarla después se obtenían falsos positivos. Además, este test sólo analiza la troponina T<sup>128</sup>.



**Figura 1.18.** Estructura química del complejo de la troponina (troponina T en blanco, I en rojo y C en azul).

En el proyecto PHOCNOSIS nuestra función fue desarrollar los métodos de inmovilización para biorreceptores que detecten las proteínas arriba indicadas. Para ello, se ha trabajado en inmunoensayos, inicialmente, en formato de micromatriz sobre soporte plano para transferirlo después a las guías corrugadas.

## 1.9 Referencias

1. Clark, L. C. & Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. New York Acad. Sci.* **102**, 29–45 (1962).
2. Luchansky, M. S. & Bailey, R. C. High-Q optical sensors for chemical and biological analysis. *Anal. Chem.* **84**, 793–821 (2012).
3. Li, S. *et al.* Dextran hydrogel coated surface plasmon resonance imaging (SPRi) sensor for sensitive and label-free detection of small molecule drugs. *Appl. Surf. Sci.* **355**, 570–576 (2015).
4. R., D., Thevenot, Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* **71**, 2333–2348 (1999).
5. Kim, E. *et al.* Phosphocholine-modified magnetic nanoparticles for isolation of C-reactive protein from human serum. *Sep. Sci. Technol.* **48**, 2600–2607 (2013).
6. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 121–131 (2001).
7. Hulanicki, A., Glab, S. & Ingman, F. Chemical sensors definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* **63**, 1247–1250 (1991).
8. Barbulovic-nad, I. *et al.* Bio-microarray fabrication techniques — a review. **26**, 237–259 (2008).
9. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science (80- )*. **270**, 467–470 (1995).
10. Ekins, R. P. Multi-analyte immunoassay. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**, 155–168 (1989).
11. Hu, S., Xie, Z., Qian, J., Blackshaw, S. & Heng, Z. Functional protein microarray technology. *Rev. Syst. Biol. Med.* **3**, 255–268 (2011).
12. Ventimiglia, G. & Petralia, S. Recent advances in DNA microarray technology: an overview on production strategies and detection methods. *Bionanoscience* 428–450 (2013).
13. Kostrzynska, M. & Bachand, A. Application of DNA microarray technology

- for detection, identification, and characterization of food-borne pathogens. *Can. J. Microbiol.* **8**, 1–8 (2006).
14. Heller, M. J. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **4**, 129–153 (2002).
  15. Dutta, S. Point of care sensing and biosensing using ambient light sensor of smartphone: Critical review. *Trends Anal. Chem.* **110**, 393–400 (2019).
  16. Estevez, M. C., Alvarez, M. & Lechuga, L. M. Integrated optical devices for lab-on-a-chip biosensing applications. *Laser Photonics Rev.* **6**, 463–487 (2012).
  17. Petryayeva, E. & Algar, W. R. Toward point-of-care diagnostics with consumer electronic devices: the expanding role of nanoparticles. *RSC Adv.* **5**, 22256–22282 (2015).
  18. Kosack, C. S., Page, A. & Klatser, P. R. A guide to aid the selection of diagnostic tests. *Bull World Heal. Organ* **95**, 639–645 (2017).
  19. Mcgarraugh, G., Brazg, R. & Weinstein, R. FreeStyle navigator continuous glucose monitoring system with TRUstart algorithm, a 1-hour warm-up time. *J. Diabetes Sci. Technol.* **5**, 99–106 (2011).
  20. Martínez, A. *et al.* Ultrafast all-optical switching in a silicon-nanocrystal-based silicon slot waveguide at telecom wavelengths. *Nano Lett.* **10**, 1506–1511 (2010).
  21. Lia, J., Tana, S. N. & Geb, H. Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for hydrogen peroxide. *Anal. Chim. Acta* **335**, 137–145 (1996).
  22. Velychko, T. P. *et al.* A novel conductometric urea biosensor with improved analytical characteristic based on recombinant urease adsorbed on nanoparticle of silicalite. *Nanoscale Res. Lett.* **11**, 106 (2016).
  23. Avella-Oliver, M., Carrascosa, J., Puchades, R. & Maquieira, A. Diffractive protein gratings as optically active transducers for high-throughput label-free immunosensing. *Anal. Chem.* **89**, 9002–9008 (2017).
  24. Llandro, J., Palfreyman, J. J., Ionescu, A. & Barnes, C. H. W. Magnetic biosensor technologies for medical applications: a review. *Med Biol Eng Comput* **48**, 977–998 (2010).
  25. Kawamura, A. & Miyata, T. Biosensors. in *Biomaterials Nanoarchitectonics*



- 157–176 (2016).
26. Borisov, S. M. & Wolfbeis, O. S. Optical biosensors. *Chem. Rev.* **108**, 423–461 (2008).
  27. Yalow, R. S. & Berson, S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *Obes. Res.* **4**, 583–600 (1996).
  28. Crivianu-Gaita, V., Romaschin, A. & Thompson, M. High efficiency reduction capability for the formation of Fab' antibody fragments from F(ab)2 units. *Biochem. Biophys. Reports* **2**, 23–28 (2015).
  29. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* **5**, 1–17 (2014).
  30. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. New York: Garland Science **91**, (2001).
  31. Killard, A. J., Deasy, B., O'Kennedy, R. & Smyth, M. R. Antibodies: production, functions and applications in biosensors. *Trends Anal. Chem.* **14**, 257–266 (1995).
  32. Lopez de Silanes, J., Mancilla Nava, R. & Paniagua Solis, J. Pharmaceutical composition of F(Ab)2 fragments of antibodies and method for preparation. (2002).
  33. Hage, D. S. Immunoassays. **65**, 420–424 (1993).
  34. Chen, G. *et al.* A review of enhancers for chemiluminescence enzyme immunoassay. *Food Agric. Immunol.* **28**, 315–327 (2017).
  35. Salm, P. *et al.* Evaluation of a fluorescent polarization immunoassay for whole blood everolimus determination using samples from renal transplant recipients. *Clin. Biochem.* **39**, 732–738 (2006).
  36. Ateto, A. A. The structures of DNA and RNA. in *Molecular Biology of the GeneEdition: Fifth Edition* 1–33 (2002).
  37. Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H. & Vogt, P. H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* **23**, 504–511 (1997).
  38. Board, E. A. Recent advances in DNA biosensor. *Sensors Transducers J.* **92**, 122–133 (2008).

39. Cristofolini, L. *et al.* The structure of DNA-containing complexes suggests the idea for a new adaptive sensor. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **321**, 158–162 (2008).
40. Sampson, T. Aptamers and SELEX: the technology. *World Pat. Inf.* **25**, 123–129 (2003).
41. Sassolas, A., Leca-Bouvier, B. D. & Blum, L. J. DNA biosensors and microarrays. *Chem. Rev.* **108**, 109–139 (2008).
42. Bagni, G., Osella, D., Sturchio, E. & Mascini, M. Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies. *Anal. Chim. Acta* **573–574**, 81–89 (2006).
43. Wang, J. *et al.* DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review. *Anal. Chim. Acta* **347**, 1–8 (1997).
44. Sassolas, A., Hayat, A. & Marty, J.-L. Electrochemical biosensors for the detection of microcystins: recent advances and perspectives. *Biosens. Recent Adv. Math. challenges* **4**, 97–109 (2014).
45. Huertas, C. S., Fariña, D. & Lechuga, L. M. Direct and label-free quantification of micro-RNA-181a at attomolar level in complex media using a nanophotonic biosensor. *ACS Sensors* **1**, 748–756 (2016).
46. Zhang, G. J., Chua, J. H., Chee, R. E., Agarwal, A. & Wong, S. M. Label-free direct detection of MiRNAs with silicon nanowire biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 2504–2508 (2009).
47. Francis, T. S. Y. & Shizhuo, Y. Fiber optic sensors. in (ed. Yin, F. T. S. Y. S.) 1–509 (2002).
48. Angenendt, P. Progress in protein and antibody microarray technology. *Drug Discov. today targets* **10**, 1–9 (2005).
49. Patel, P. N., Mishra, V. & Mandloi, A. S. Optical biosensors: fundamentals & trends. *J. Eng. Res. Stud.* **1**, 15–34 (2010).
50. Mannelli, I. *et al.* DNA immobilisation procedures for surface plasmon resonance imaging (SPRI) based microarray systems. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 803–809 (2007).
51. Ruiz-Tórtola, A. *et al.* Experimental study of the evanescent-wave photonic sensors response in presence of molecular beacon conformational changes.

- J. Biophotonics* **11**, e201800030 (2018).
52. Escorihuela, J. *et al.* Dual-polarization interferometry: a novel technique to light up the nanomolecular world. **115**, 265–294 (2015).
  53. Juste-dolz, A. *et al.* New structural insights into the role of TROVE2 complexes in the on-set and pathogenesis of systemic lupus erythematosus determined by a combination of QCM-D and DPI. *Anal. Bioanal. Chem.* **411**, 4709–4720 (2018).
  54. Conteduca, D., Dell’Olio, F., Ciminelli, C. & Armenise, M. N. New miniaturized exhaled nitric oxide sensor based on a high Q/V mid-infrared 1D photonic crystal cavity. *Appl. Opt.* **54**, 2208–2217 (2015).
  55. Tao, X. Wearable photonics based on integrative polymeric photonic fibres. in *Wearable Electronics and Photonics* 136–154 (Woodhead Publishing Limited, 2005).
  56. Yablonovitch, E. Inhibited spontaneous emission in solid-state physics and electronics. *Phys. Rev. Lett.* **58**, 13–20 (1987).
  57. Goyal, A. K. & Pal, S. Design and simulation of high sensitive photonic crystal waveguide sensor. *Optik (Stuttg.)* **126**, 240–243 (2015).
  58. Liu, Q. *et al.* Biosensors and bioelectronics Mach–Zehnder interferometer (MZI) point-of-care system for rapid multiplexed detection of microRNAs in human urine specimens. *Biosens. Bioelectron.* **71**, 365–372 (2015).
  59. Sanza, F. J. *et al.* Bio-photonic sensing cells over transparent substrates for anti-gestrinone antibodies biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4842–4847 (2011).
  60. Holgado, M. *et al.* Label-free biosensing by means of periodic lattices of high aspect ratio SU-8 nano-pillars. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 2553–2558 (2010).
  61. Lavín, Á., Casquel, R., Sanza, F. J., Laguna, M. F. & Holgado, M. Efficient design and optimization of bio-photonic sensing cells (BICELLS) for label free biosensing. *Sensors Actuators, B Chem.* **176**, 753–760 (2013).
  62. Holgado, M. *et al.* Biophotonic sensing cells (BICELLS) for label-free biosensing. *Symp. A1.III. Mater. devices sensing.* **26**, 4847 (2011).
  63. Zanchetta, G., Lanfranco, R., Giavazzi, F., Bellini, T. & Buscaglia, M. Emerging applications of label-free optical biosensors. *Nanophotonics* **6**, 627–645

- (2017).
64. Chin, C. D., Linder, V. & Sia, S. K. Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities. *Lab Chip* **7**, 41–57 (2007).
  65. González-Lucas, D., Bañuls, M. J. & García-rupérez, J. Covalent attachment of biotinylated molecular beacons via thiol-ene coupling. A study on conformational changes upon hybridization and streptavidin binding. *Microchim. Acta* **184**, 3231–3238 (2017).
  66. Irawati, N. *et al.* Relative humidity sensing using a PMMA doped agarose gel microfiber. *J. Light. Technol.* **35**, 3940–3944 (2017).
  67. Jerónimo, P., Araújo, A., Conceicao, M. & Montenegro, B. S. M. Optical sensors and biosensors based on sol – gel films. *Talanta* **72**, 13–27 (2007).
  68. Brun, E. M., Puchades, R. & Maquieira, A. Gold, carbon, and aluminum low-reflectivity compact discs as microassaying platforms. *Anal. Chem.* **85**, 4178–4186 (2013).
  69. Morais, S. & Tamarit-lópez, J. Analytical prospect of compact disk technology in immunosensing. *Anal Bioanal Chem* 2837–2844 (2008).
  70. Morais, S., Tortajada-Genaro, L. & Maquieira, A. Array-on-a-disk? How Blu-ray technology can be applied to molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **14**, 773–775 (2014).
  71. Santiago-Felipe, S., Tortajada-Genaro, L. A., Carrascosa, J., Puchades, R. & Maquieira, Á. Real-time loop-mediated isothermal DNA amplification in compact disc micro-reactors. *Biosens. Bioelectron.* **79**, 300–306 (2016).
  72. Morais, S., Puchades, R. & Maquieira, A. Disc-based microarrays: principles and analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 4523–4534 (2016).
  73. Enomoto, M., Tsubo, R., Kikuchi, M. & Mori, K. US Patent US2005/0233103A1. US Pat. (2005).
  74. Arnandis-Chover, T., Morais, S., González-Martínez, M. Á., Puchades, R. & Maquieira, Á. Biosensors and Bioelectronics High density MicroArrays on Blu-ray discs for massive screening. *Biosens. Bioelectron.* **51**, 109–114 (2014).
  75. Peris, E., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Photoattachment of thiolated DNA probes on SU-8 spin-coated Blu-ray disk surfaces for

- biosensing. *J. Mater. Chem. B* **1**, 6245–6253 (2013).
76. Tyona, M. D. A theoretical study on spin coating technique. *Adv. Mater. Res.* **2**, 195–208 (2013).
  77. Meyerhofer. Key stages in spin coating process. *Adv. Mater. Res.* **2**, 181–193 (1978).
  78. Sobek, J. & Schlappbach, R. Substrate architecture and functionality defining the properties and performance of DNA, peptide, protein and carbohydrate microarrays. *Pharmagenomics* **7**, 32–44 (2004).
  79. Rusmini, F., Zhong, Z. & Feijen, J. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* **8**, 1775–1789 (2007).
  80. Pallavicini, P., Dacarro, G. & Taglietti, A. Self-assembled monolayers of silver nanoparticles: from intrinsic to switchable inorganic antibacterial surfaces. *Antibact. Surfaces* **2018**, 4846–4855 (2018).
  81. Pfeifer, M. E. ADIBO-based “click” chemistry for diagnostic peptide microarray fabrication: physicochemical and assay characteristics. *Molecules* **18**, 9833–9849 (2013).
  82. Haghshenas Kashani, S. *et al.* Nano–silica functionalized with thiol–based dendrimer as a host for gold nanoparticles: An efficient and reusable catalyst for chemoselective oxidation of alcohols. *Appl. Organomet. Chem.* **32**, 1–13 (2018).
  83. Nelson, E. E. & Guyer, A. E. Regioselective covalent immobilization of recombinant antibody binding proteins A, G, and protein L for construction of antibody arrays. *J. Am Chem Soc.* **135**, 8973–8980 (2013).
  84. Escorihuela, J. *et al.* Direct covalent attachment of DNA microarrays by rapid thiol-ene ‘click’ chemistry. *Bioconjug. Chem.* **25**, 618–627 (2014).
  85. Ito, Y. Combinatorial bioengineering: review. *Biotechnol Prog.* **22**, 924–932 (2006).
  86. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int.* **40**, 2004–2021 (2001).
  87. Escorihuela, J. *et al.* Direct covalent attachment of DNA microarrays by rapid thiol-ene “click” chemistry. *Bioconjug. Chem.* **25**, 6618–627 (2014).

88. Weinrich, D. *et al.* Preparation of biomolecule microstructures and microarrays by thiol-ene photoimmobilization. *ChemBioChem* **11**, 235–247 (2010).
89. Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Chemical surface modifications for the development of silicon-based label-free integrated optical (IO) biosensors: A review. *Anal. Chim. Acta* **777**, 1–16 (2013).
90. Alonso, R., Jiménez-Meneses, P., García-Rupérez, J., Bañuls, M. J. & Maquieira, A. Thiol-ene click chemistry towards easy microarraying of half-antibodies. *Chem. Commun.* **54**, 6144–6147 (2018).
91. Ruiz-Tórtola, A. *et al.* High sensitivity and label-free oligonucleotides detection using photonic bandgap sensing structures biofunctionalized with molecular beacon probes. *Biomed. Opt. Express* **9**, 1717–1727 (2018).
92. Aragón, P., Noguera, P., Bañuls, M. José, Puchades, R. & Maquieira, A. Modulating receptor-ligand binding in biorecognition by setting surface wettability. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**, 5723–5730 (2018).
93. Escorihuela, J., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Development of oligonucleotide microarrays onto Si-based surfaces via thioether linkage mediated by UV irradiation. *Bioconjug. Chem.* **23**, 2121–2128 (2012).
94. Bañuls, M. J. *et al.* Improved performance of DNA microarray multiplex hybridization using probes anchored at several points by thiol-ene or thiol-yne coupling chemistry. *Bioconjug. Chem.* **28**, 496–506 (2017).
95. Escorihuela, J. & Puchades, R. Site-specific immobilization of DNA on silicon surfaces by using the thiol-yne reaction. *J. Mater. Chem. B* **2**, 8510–8517 (2014).
96. Jiménez-Meneses, P., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Fluor-thiol photocoupling reaction for developing high performance nucleic acid (NA) microarrays. *Anal. Chem.* **90**, 11224–11231 (2018).
97. Bañuls, M. J., González-Martínez, M. Á., Sabek, J., García-Rupérez, J. & Maquieira, A. Thiol-click photochemistry for surface functionalization applied to optical biosensing. *Anal. Chim. Acta* **1060**, 103–113 (2019).
98. Wichterlew, O. & Lim, D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature* **185**, 117–118 (1960).
99. Rubina, A. Y., Kolchinsky, A., Makarov, A. A. & Zasedatelev, A. S. Why 3-D?

- Gel-based microarrays in proteomics. *Proteomics* **8**, 817–831 (2008).
100. Caló, E. & Khutoryanskiy, V. V. Biomedical applications of hydrogels: a review of patents and commercial products. *Eur. Polym. J.* **65**, 252–267 (2015).
  101. Moschallski, M., Evers, A., Brandstetter, T. & Rühle, J. Sensitivity of microarray based immunoassays using surface-attached hydrogels. *Anal. Chim. Acta* **781**, 72–79 (2013).
  102. Beyer, A., Pollok, S., Berg, A., Weber, K. & Popp, J. Easy daylight fabricated hydrogel array for colorimetric DNA analysis. *Macromol. Biosci.* **14**, 889–898 (2014).
  103. Liu, X., Lei, Z., Liu, F., Liu, D. & Wang, Z. Fabricating three-dimensional carbohydrate hydrogel microarray for lectin-mediated bacterium capturing. *Biosens. Bioelectron.* **58**, 92–100 (2014).
  104. Guschin, D. *et al.* Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips. *Anal. Biochem.* **250**, 203–211 (1997).
  105. Arenkov, P. *et al.* Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal. Biochem.* **278**, 123–131 (2000).
  106. Rubina, A. Y. *et al.* Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications. *Biotechniques* **34**, 1008–1022 (2003).
  107. Rubina, A. Y., Dyukova, V. I., Dementieva, E. I. & Stomakhin, A. A. Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips. *Anal. Biochem.* **340**, 317–329 (2005).
  108. Hosseinkhani, H. *et al.* DNA nanoparticles encapsulated in 3D tissue-engineered scaffolds enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 47–60 (2007).
  109. Rubina, A. Y. *et al.* Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. *Anal. Biochem.* **325**, 92–106 (2004).
  110. Mirzabekov, A. D., Rubina, A. J. & Panvok, V. S. Composition for polymerizing immobilization of biological molecules and method for producing said composition. (2010).
  111. Mirzabekov, A. & Kolchinsky, A. Emerging array-based technologies in

- proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 70–75 (2002).
112. Charles, P. T. *et al.* Fabrication and characterization of 3D hydrogel microarrays to measure antigenicity and antibody functionality for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 753–764 (2004).
  113. E.I., D. *et al.* Protein microchips in quantitative assays for tumor markers. *Dokl. Biochem. Biophys.* **395**, 88–92 (2004).
  114. Herrmann, A., Kaufmann, L., Dey, P., Haag, R. & Schedler, U. Bioorthogonal in situ hydrogels based on polyether polyols for new biosensor materials with high sensitivity. *Appl. Mater. Interfaces* **10**, 11382–11390 (2018).
  115. Nakabayashi, N. & Williams, D. F. Preparation of non-thrombogenic materials using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. *Biomaterials Nanoarchitectonics* **24**, 2431–2435 (2003).
  116. K, N. *et al.* Development of a ferrocene-mediated needle-type glucose sensor covered with newly designed biocompatible membrane, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate. *Med Prog Technol* **21**, 91–103 (1995).
  117. Dalton, J. A., Higgins, M. K., Miller, A. H., Keefe, F. J. & Khuri, F. R. Purification of recombinant C-reactive protein mutants. *J Biol Chem.* **35**, 25353–25358 (1992).
  118. Iwasaki, Y. & Ishihara, K. Cell membrane-inspired phospholipid polymers for developing medical devices with excellent biointerfaces. *Sci. Technol. od Adv. Mater.* **13**, 064101 (2012).
  119. Mclean, K. M. *et al.* Method of immobilization of carboxymethyl-dextran affects resistance to tissue and cell colonization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **18**, 221–234 (2000).
  120. Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C. & Alhaique, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J. Control. Release* **119**, 5–24 (2007).
  121. Chao, J. *et al.* Hybridization chain reaction amplification for highly sensitive fluorescence detection of DNA with dextran coated microarrays. *Biosens. Bioelectron.* **81**, 92–96 (2016).
  122. García-Rupérez, J. Advanced nanophotonic point-of-care analysis device for fast and early diagnosis of cardiovascular diseases. <https://phocnosis.eu/>



123. Bhayana, V. & Henderson, R. Biochemical markers of myocardial damage. *Clin. Biochem.* **28**, 1–29 (1995).
124. Algarra, M., Gomes, D. & Esteves da Silva, J. C. G. Current analytical strategies for C-reactive protein quantification in blood. *Clin. Chim. Acta* **415**, 1–9 (2013).
125. Störk, T. V. *et al.* Diagnostic and prognostic role of myoglobin in patients with suspected acute coronary syndrome. *Am. J. Cardiol.* **86**, 1371–1374 (2000).
126. Kagen, L. J. Myoglobin: methods and diagnostic uses. *Critial Rev. Clin. Lab. Sci.* **9**, 273–302 (1978).
127. Ioannidis, J. P. A., Salem, D., Chew, P. W. & Lau, J. Accuracy of imaging technologies in the diagnosis of acute cardiac ischemia in the emergency department: a meta-analysis. *Ann. Emerg. Med.* **37**, 471–477 (2001).
128. Bertsch, T., Bleuel, H., Deschl, U. & Rebel, W. A new sensitive cardiac troponin T rapid test (TROPT<sup>®</sup>) for the detection of experimental acute myocardial damage in rats. *Exp. Toxic Pathol.* **51**, 565–569 (1999).
129. Vermonden, T., Censi, R. & Hennink, W. E. Hydrogels for protein delivery. *Chem. Rev.* **112**, 2853–2888 (2012).
130. Liu, X., Lei, Z., Liu, D. & Wang, Z. Development of a sandwiched microarray platform for studying the interactions of antibiotics with *Staphylococcus aureus*. *Anal. Chim. Acta* **917**, 93–100 (2016).
131. Sampaio, C. *et al.* Development of peptide-functionalized synthetic hydrogel microarrays for stem cell and tissue engineering applications. *Acta Biomater.* **45**, 110–120 (2016).
132. Liu, X., Li, T., Liu, D. & Wang, Z. Fabricating three-dimensional hydrogel oligonucleotide microarrays to detect single nucleotide polymorphisms. *Anal. Methods* **5**, 285–290 (2013).
133. Li, S. *et al.* Dextran hydrogel coated surface plasmon resonance imaging (SPRi) sensor for sensitive and label-free detection of small molecule drugs. *Appl. Surf. Sci.* **355**, 570–576 (2015).
134. Moschallski, M., Baader, J., Prucker, O. & Rühle, J. Printed protein microarrays on unmodified plastic substrates. *Anal. Chim. Acta* **671**, 92–98 (2010).

135. Kivlehan, F., Paolucci, M., Brennan, D., Ragoussis, I. & Galvin, P. Three-dimensional hydrogel structures as optical sensor arrays, for the detection of specific DNA sequences. *Anal. Biochem.* **421**, 1–8 (2012).
136. Thompson, D., Pepys, M. B. & Wood, S. P. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* **7**, 169–177 (1999).
137. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* **107**, 363–369 (2003).
138. Deegan, O., Walshe, K., Kavanagh, K. & Doyle, S. Quantitative detection of C-reactive protein using phosphocholine-labelled enzyme or microspheres. *Anal. Biochem.* **312**, 175–181 (2003).
139. Lee, S. G. *et al.* Phosphocholine-modified magnetic nanoparticles for isolation of C-reactive protein from human serum. *Sep. Sci. Technol.* **48**, 2600–2607 (2013).
140. Kim, E. K. *et al.* Protein-directed immobilization of phosphocholine ligands on a gold surface for multivalent C-reactive protein binding. *Bentham Sci. Publ.* **13**, 519 (2013).
141. Kitayama, Y. & Takeuchi, T. Localized surface plasmon resonance nanosensing of C-reactive protein with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-grafted gold nanoparticles prepared by surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Anal. Chem.* **86**, 5587–5594 (2014).
142. Kamon, Y. *et al.* Synthesis of grafted phosphorylcholine polymer layers as specific recognition ligands for C-reactive protein focused on grafting density and thickness to achieve highly sensitive detection. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 9951–9958 (2015).
143. Yoshimoto, J. *et al.* Optical properties of 2-ethacryloyloxyethyl phosphorylcholine-protected Au<sub>4</sub> nanoclusters and their fluorescence sensing of C-reactive protein. *J. Phys. Chem. C* **119**, 14319–14325 (2015).
144. Matsuura, R., Tawa, K., Kitayama, Y. & Takeuchi, T. A plasmonic chip-based bio/chemical hybrid sensing system for the highly sensitive detection of C-reactive protein. *Chem. Commun.* **52**, 3883–3886 (2016).
145. Morais, S., Tortajada-Genaro, L. & Maquieira, A. Array-on-a-disk? How Blu-ray technology can be applied to molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol.*

- Diagn.* **14**, 773–775 (2014).
146. Morais, S., Tortajada-Genaro, L. A., Arnandis-Chover, T., Puchades, R. & Maquieira, A. Multiplexed microimmunoassays on a digital versatile disk. *Anal. Chem.* **81**, 5646 (2009).
  147. Mira, D. *et al.* High-throughput screening of surface-enhanced fluorescence on industrial standard digital recording media. *Opt. Based Biol. Chem. Sens. Def.* **5617**, 364–373 (2004).
  148. Chen, H., Huang, J., Lee, J., Hwang, S. & Koh, K. Surface plasmon resonance spectroscopic characterization of antibody orientation and activity on the calixarene monolayer. *Sensors Actuators, B Chem.* **147**, 548–553 (2010).
  149. Escorihuela, J. *et al.* Direct covalent attachment of DNA microarrays by rapid thiol – ene “click” chemistry. *Bioconjug. Chem.* **25**, 6618–627 (2014).
  150. González-Lucas, D., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Versatile and easy fabrication of advanced surfaces for high performance DNA microarrays. *Adv. Mater. Interfaces* **3**, 1500850 (2016).
  151. Zhou, Y., Fang, Y. & Ramasamy, R. P. Non-covalent functionalization of carbon nanotubes for electrochemical biosensor development. *Sensors (Switzerland)* **19**, (2019).
  152. Qu, Z., Xu, H. & Gu, H. Synthesis and biomedical applications of poly((meth)acrylic acid) brushes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 14537–14551 (2015).
  153. Oh, S. J., Hong, B. J., Choi, K. Y. & Park, J. W. Surface modification for DNA and protein microarrays. *Omi. A J. Integr. Biol.* **10**, 327–343 (2006).
  154. Stanciu, M. C. & Nichifor, M. Influence of dextran hydrogel characteristics on adsorption capacity for anionic dyes. *Carbohydr. Polym.* **199**, 75–83 (2018).
  155. Zhou, Y., Andersson, O., Lindberg, P. & Liedberg, B. Protein microarrays on carboxymethylated dextran hydrogels: immobilization, characterization and application. **30**, 21–30 (2004).
  156. Nikpour, P., Salimi-kenari, H., Fahimipour, F. & Mahmood, S. Dextran hydrogels incorporated with bioactive glass-ceramic: Nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* **190**, 281–294 (2018).

157. Wang, X. *et al.* Injectable dextran hydrogels fabricated by metal-free click chemistry for cartilage tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **73**, 21–30 (2017).
158. Hoque, J. & Haldar, J. Direct synthesis of dextran-based antibacterial hydrogels for extended release of biocides and eradication of topical biofilms. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 15975–15985 (2017).
159. Ma, Y., Yi, J.-Z. & Zhang, L.-M. A Facile approach to incorporate silver nanoparticles into dextran-based hydrogels for antibacterial and catalytical application. *J. Macromol. Sci.* **46**, 643–648 (2009).
160. Varshosaz, J. Dextran conjugates in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **9**, 509–523 (2012).
161. Herranz, S. *et al.* Multiplex environmental pollutant analysis using an array biosensor coated with chimeric hapten-dextran-lipase constructs. *Sensors Actuators B. Chem.* **257**, 256–262 (2018).
162. Chao, J. *et al.* Hybridization chain reaction amplification for highly sensitive fluorescence detection of DNA with dextran coated microarrays. *Biosens. Bioelectron.* **81**, 92–96 (2016).
163. Blum, L. J. & Marquette, C. A. High-throughput multiplexed competitive immunoassay for pollutants sensing in water. *Anal. Chem.* **84**, 10267–10276 (2012).
164. Angeloni, S., Ridet, J. L., Kusy, N. & Gao, H. Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. **15**, 31–41 (2005).
165. Escorihuela, J. & Puchades, R. Site-specific immobilization of DNA on silicon surfaces by using the thiol–yne reaction. *J. Mater. Chem. B* **2**, 8510–8517 (2014).
166. Escorihuela, J., Puchades, R. & Maquieira, A. Development of oligonucleotide microarrays onto Si-based surfaces via thioether linkage mediated by UV irradiation. *Bioconjug. Chem.* **23**, 2121–2128 (2012).
167. Dondoni, A. The Emergence of thiol–ene coupling as a click process for materials and bioorganic Chemistry \*\*. *Angew. Chem.* **47**, 8995–8997 (2008).
168. van Dijk-Wotthuis, W. N. E. *et al.* Synthesis, characterization, and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran.

- Macromolecules* **28**, 6317–6322 (1995).
169. Pirrung, M. C. How to make a DNA chip. *Angew. Chem. Int* **41**, 1276–1289 (2002).
  170. Wang, C. *et al.* DNA microarray fabricated on poly (acrylic acid) brushes-coated porous silicon by in situ rolling circle amplification. *Analyst* **137**, 4539–4545 (2012).
  171. Casanova-Salas *et al.* Identification of miR-187 and miR-182 as biomarkers of early diagnosis and prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J. Urol.* **192**, 252–259 (2014).
  172. Wu, J. *et al.* Lab-on-a-chip platforms for detection of cardiovascular disease and cancer biomarkers. *Sensors (Switzerland)* **17**, 2934 (2017).
  173. Jonkheijm, P., Weinrich, D., Schröder, H., Niemeyer, C. M. & Waldmann, H. Chemical strategies for generating protein biochips. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 9618–9647 (2008).
  174. Phaner-Goutorbe, M., Dugas, V., Chevolut, Y. & Souteyrand, E. Silanization of silica and glass slides for DNA microarrays by impregnation and gas phase protocols: a comparative study. *Mater. Sci. Eng. C* **31**, 384–390 (2011).
  175. Sanza, F. J. *et al.* Bio-Photonic sensing cells over transparent substrates for anti-gestrinone antibodies biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4842–4847 (2011).
  176. Casquel, R. *et al.* Optimization of a label-free biosensor vertically characterized based on a periodic lattice of high aspect ratio SU-8 nanopillars with a simplified 2D theoretical model. *Phys. Status Solidi Curr. Top. Solid State Phys.* **8**, 1087–1092 (2011).
  177. Mira, D. *et al.* High-throughput screening of surface-enhanced fluorescence on industrial standard digital recording media. *Opt. Based Biol. Chem. Sens. Def.* **5617**, 364 (2004).
  178. Lee, J. H. *et al.* Label free novel electrical detection using micromachined PZT monolithic thin film cantilever for the detection of C-reactive protein. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 269–275 (2004).
  179. Roberts, W. L. *et al.* Evaluation of nine automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. Part 2. *Clin. Chem.* **47**, 418–25 (2001).

180. Hu, W. P. *et al.* Immunodetection of pentamer and modified C-reactive protein using surface plasmon resonance biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1631–1637 (2006).
181. Kim, H. C., Lee, S. K., Sohn, Y. S., Ryu, H. K. & Jeong, S. W. Preparation of a sensing membrane for C-reactive protein. *Macromol. Symp.* **249–250**, 71–75 (2007).
182. Yuk, J. S., Jung, J. W., Hyun, J., Kim, Y. M. & Ha, K. S. Development of a scanning surface plasmon microscope based on white light for analysis of a wide range of protein arrays. *Sensors Actuators, B Chem.* **131**, 241–246 (2008).
183. Vashist, S. K., Schneider, E. M. & Luong, J. H. T. Surface plasmon resonance-based immunoassay for human C-reactive protein. *Analyst* **140**, 4445–4452 (2015).
184. Luan, E., Shoman, H., Ratner, D. M., Cheung, K. C. & Chrostowski, L. Erratum: Luan, E.X.; Shoman, H.; Ratner, D.M.; Cheung, K.C.; Chrostowski, L. Silicon Photonic biosensors using label-free detection. *Sensors* 2018, 18, 3519. *Sensors (Basel)*. **19**, 19051161 (2019).
185. Iqbal, M. *et al.* Label-free biosensor arrays based on silicon scanning instrumentation. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **16**, 654–661 (2010).
186. Franssen, O., Talsma, H., Steenbergen, M. J. Van, Bosch, J. J. K. Den & Hennink, W. E. Synthesis, characterization, and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran. *Macromolecules* **28**, 6317–6322 (1995).
187. Povinelli, M. L., Johnson, S. G. & Joannopoulos, J. D. Slow-light, band-edge waveguides for tunable time delays. *Opt. Express* **13**, 7145–7159 (2006).
188. Arya, S., Khan, S., Akhil Vaid, H. K. & Lehana, P. Microfluidic mechanics and applications: a review. *J. Nano- Electron. Phys.* **5**, 1–12 (2013).

# Objetivos





## 2. Objetivos

El objetivo general de esta tesis es el diseño, fabricación y evaluación de diferentes métodos de anclaje de biorreceptores, de interés clínico, a distintos materiales para su aplicación en biosensado, con especial interés en el estudio de aproximaciones 3D basadas en hidrogeles. El objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos particulares:

- Fabricación y caracterización de hidrogeles de fosforilcolina y de dextrano sobre superficies planas para su utilización en ensayos de bio-reconocimiento. Estudio de formato de micromatriz y detección fluorescente, aplicados a proteínas y oligonucleótidos.
- Utilización de reacciones fotoquímicas para llevar a cabo la polimerización de geles y el anclaje de sondas mediante la química de acoplamiento tiol-eno. Caracterización de los hidrogeles optimizados.
- Comparación del manejo y prestaciones de los hidrogeles obtenidos con métodos de anclaje convencionales y los nuevos aquí desarrollados.
- Aplicación de hidrogeles para biosensado sin marcaje (*label-free*) basado en estructuras interferométricas y en guías de onda corrugadas.



# Capítulo 3.

## Desarrollo de hidrogeles para inmovilización de biomoléculas



### 3. Desarrollo de hidrogeles para inmovilización de biomoléculas

En este capítulo de la tesis se aborda la inmovilización de biomoléculas basada en el uso de distintos hidrogeles derivados de metacrilato. Los hidrogeles son materiales poliméricos que almacenan gran cantidad de agua en su interior, lo que los convierte en medios ideales para albergar biomoléculas. Se propone usar reacciones fotoquímicas para realizar de forma simultánea la polimerización del gel y el anclaje de la sonda por la reacción de acoplamiento tiol-acrilato. En primer lugar, se estudió un hidrogel derivado de fosforilcolina con grupos acrilato tanto como receptor específico de la CRP, como para la inmovilización de proteínas o ácidos nucleicos. Continuamos estudiando otro gel basado en dextrano con la misma finalidad. Finalmente, se realizó una comparación de los hidrogeles. Durante el desarrollo de estos estudios se han utilizado distintas superficies, siendo las más empleadas la de disco *Blu-ray* (BD) y la resina polimérica SU-8 depositada sobre vidrio.

### 3.1 Inmovilización de biomoléculas basada en el uso de hidrogeles de fosforilcolina en BD y SU-8.

A continuación, se exponen los resultados obtenidos en el desarrollo de una estrategia de inmovilización covalente de biomoléculas en un hidrogel derivado del acrilato de fosforilcolina. La inmovilización de la sonda y la formación del hidrogel ocurren de forma simultánea por una reacción de acoplamiento tiol-acrilato inducida por luz UV (254 nm). Para ello, se han empleado dos sustratos poliméricos diferentes: *Blu-Ray* y resina SU-8, donde anclar el hidrogel y se aplica a biosensado de proteínas y oligonucleótidos en formato de micromatriz y detección fluorescente. La biodisponibilidad de las sondas inmovilizadas se demuestra en ensayos con analitos marcados con Cy5 o Alexa 647 ( $\lambda_{em}$  635 nm); para el caso de oligonucleótidos mediante la discriminación de polimorfismos de un solo nucleótido y, para el caso de anticuerpos, por inmunorreconocimiento de albumina de suero bovino (BSA). El hidrogel en bruto se emplea para detectar proteína C reactiva humana.

La inmovilización de sondas, tanto proteínas como ácidos nucleicos, es un proceso clave que debe ser rediseñado para la superficie de cada soporte. Los problemas asociados a este paso son la degradación de la sonda durante el proceso de anclaje, su agregación en disolución o su desnaturalización en la interfaz entre la disolución y la superficie sólida. Además, la clave para alcanzar el rendimiento deseado es reducir el impedimento estérico y tener una densidad superficial adecuada de sonda biodisponible.

Para soslayar estas limitaciones en esta tesis se propone usar hidrogeles como soporte para la inmovilización de sondas<sup>106</sup>. Los hidrogeles son redes entrecruzadas de polímeros que retienen una gran cantidad de líquido en su estado hinchado manteniendo su estructura 3D. Así, combinan un medio biocompatible y una estructura porosa que los hace ideales para inmovilizar proteínas, enzimas o péptidos<sup>129</sup>. Por ello, se han utilizado para imitar el entorno fisiológico y para aumentar la capacidad de carga<sup>105</sup>. Los hidrogeles tienen el potencial de proporcionar alta relación señal/ruido, buena capacidad de carga de la sonda y baja unión inespecífica<sup>101,102</sup>.

Las micromatrices de hidrogel normalmente utilizan poliacrilamidas o poliacrilatos modificados con polisacáridos<sup>103,130</sup>, o péptidos<sup>131</sup>. El atrapamiento o

encapsulamiento en el gel es el método que se suele utilizar a menudo para inmovilizar las diferentes biomoléculas. Sin embargo, el anclaje covalente como método de inmovilización es siempre interesante, especialmente cuando se trabaja con biorreceptores de pequeño tamaño, como péptidos, o cuando el receptor y la diana son similares en tamaño. El enlace de la sonda se puede realizar después de que se forme el hidrogel<sup>132,133</sup>, o modificando los monómeros con la biomolécula previamente a la reticulación del hidrogel<sup>131,134</sup>.

Llevar a cabo la formación del hidrogel y la unión covalente del biorreceptor mediante un procedimiento simultáneo permite reducir las etapas del proceso, así como su duración, lo cual supone una gran ventaja. Este tipo de procedimientos están siendo estudiados y existen muy pocos ejemplos en la literatura<sup>135</sup>, como se ha expuesto en la introducción de esta memoria.

En definitiva, el desarrollo de métodos donde las biomoléculas se unen covalentemente al hidrogel mientras éste se forma sigue siendo de interés científico. Aquí, proponemos el uso de la química de acoplamiento tiol-acrilato para promover el enlace covalente de sondas tioladas, empleando un monómero basado en acrilato donde sincronizadamente a la formación del hidrogel se une la sonda tiolada de manera fácil, limpia y rápida, siendo el agua el único disolvente utilizado.

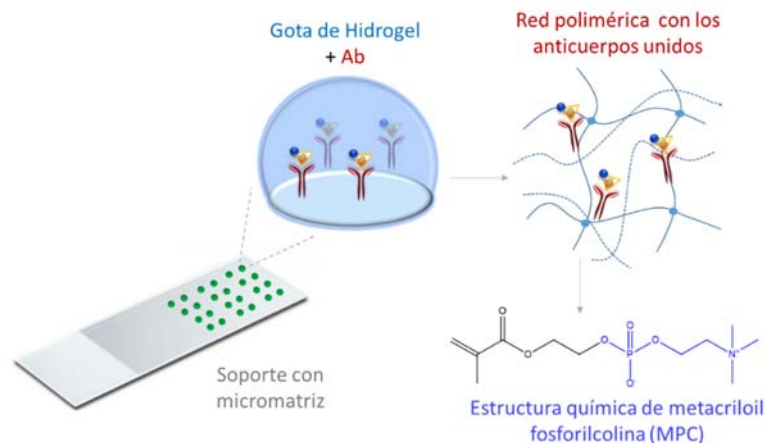
El hidrogel que se propone usar tiene grupos fosforilcolina que evitan las adsorciones inespecíficas, lo cual suele ser un aspecto importante a evitar porque mejora considerablemente las prestaciones del soporte. La fosforilcolina es un grupo polar hidrófilo y un tipo de fosfolípido que se encuentra en la membrana plasmática de la célula. Además, la fosforilcolina es el receptor natural de la proteína C reactiva, utilizada como marcador en los procesos inflamatorios asociados a enfermedades cardiovasculares (ECV)<sup>136,137</sup>.

La detección de CRP ha sido ampliamente estudiada por lo que existen diferentes métodos para su detección, la mayoría de ellos basados en turbidimetría o inmunoensayo<sup>124</sup>, sin embargo los métodos en los cuales se usa la fosforilcolina como biorreceptor son pocos. Algunos de estos estudios se basan en la conjugación con otras moléculas, como el estudio realizado por Deegan y colaboradores donde lo conjugaron con BSA y a microesferas carboxiladas para realizar una detección basada en ELISA y turbidimétrica, respectivamente<sup>138</sup>. También, Kim *et al.* realizaron

una conjugación a nanopartículas magnéticas para aislar la proteína<sup>139</sup>. Sin embargo, la mayoría de los ejemplos utilizan diferentes derivados de fosforilcolina para modificar las superficies de oro y para realizar una detección basada en resonancia de plasmón superficial que alcanza buenas sensibilidades<sup>140,141,142,143,144</sup>. Por lo que sabemos, el uso del hidrogel de fosforilcolina para la detección basada en micromatrices todavía no se ha descrito.

Durante el desarrollo de este capítulo de la tesis demostramos los diferentes usos del hidrogel. En primer lugar, lo aplicamos para fabricar micromatrices para la detección de CRP mediante marcaje fluorescente, debido a que el hidrogel es un medio adecuado para la CRP y aumenta el número de receptores por punto de la micromatriz. Además, al usarse un derivado de fosforilcolina se bloqueará la adsorción inespecífica de otras proteínas presentes en las muestras (suero sanguíneo) debido a sus propiedades repelentes. Posteriormente, el hidrogel lo empleamos para crear micromatrices de anticuerpos u oligonucleótidos donde la biointeracción tiene lugar dentro del hidrogel (Figura 3.1). Esto es debido a que se usa un derivado de acrilato de fosforilcolina que forma el hidrogel en disolución acuosa simplemente bajo irradiación con luz UV, y al mismo tiempo puede unirse covalentemente a las sondas tioladas (anticuerpos y ácidos nucleicos) mediante acoplamiento tiol-acrilato.





**Figura 3.1.** Ejemplo de inmunoensayo en formato micromatriz usando el hidrogel derivado de fosforilcolina para inmovilizar anticuerpos y reconocerlos con la proteína marcada.

Por otro lado, es clave la elección de los materiales de soporte de la micromatriz. Así, los materiales usados como soporte son de naturaleza polimérica e incluyen discos *Blu-ray* y SU-8. En estos materiales, la irradiación también promueve la unión del hidrogel al soporte sólido. Los discos *Blu-ray* se seleccionaron como soportes de micromatrices por sus atractivas propiedades, como estabilidad, baja adsorción inespecífica, baja señal de fondo, compatibilidad con sistemas de detección baratos, bajo costo, disponibilidad a gran escala y buena resistencia al calor y al impacto<sup>145,72</sup>. Otra propiedad interesante de los discos BD es que poseen una capa protectora de un material (Durabis) que tiene grupos vinilo o epoxi, lo que permite la unión covalente de las unidades de monómero de acrilato a la superficie, de modo robusto. Además, el grupo de investigación tiene experiencia en el uso de tecnología de disco compacto para realizar ensayos en formato de micromatriz, utilizando usando el propio lector como detector<sup>72, 146</sup>.

Como soporte también se estudió la resina de SU-8 inicialmente se optimiza en formato de micromatriz plana, como paso previo para su aplicación en biosensado utilizando un transductor óptico basado en nanopilares de SU-8 (idea que se desarrolla en el capítulo 4). El material SU-8 fue seleccionado porque es una resina

basada en epoxi, por lo que los hidrogeles también pueden unirse covalentemente a su superficie, y es un material común para fabricar transductores interferométricos mediante fotolitografía. Además, su ángulo de contacto (WCA) es 80°, similar al del BD, por lo que las propiedades de hidrofobicidad son similares. Esta resina se deposita por *spin-coating* en la superficie de portaobjetos de vidrio, previamente irradiados con luz ultravioleta, luego el chip se cura en estufa a 120°C y se irradia para fijar la resina.

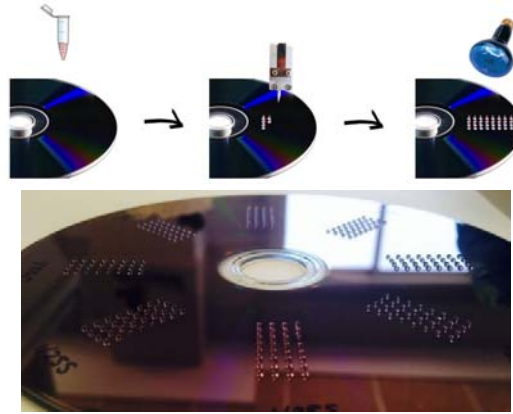
#### 3.1.1. Formación del hidrogel y detección de CRP en formato micromatriz de fluorescencia

En este trabajo se usa un derivado de fosforilcolina, receptor específico de la CRP, sin tener reactividad cruzada con la albumina o el citocromo C, y se combina con el uso de un hidrogel, provocando un incremento significativo del número de receptores disponibles, obteniendo un sistema de detección mejorado en términos de sensibilidad y facilidad de uso.

Durante el proceso de lectura uno de los retos más importante es obtener altas intensidades en la señal de fluorescencia en las áreas donde la proteína se captura, con baja señal de fondo con respecto a todas las demás ubicaciones. Además, la adsorción inespecífica de otras moléculas fluorescentes debe ser reducida al mínimo. Por tanto, la señal del fondo debe tener baja adsorción inespecífica de proteínas unidas a la superficie del chip. En nuestro caso, ambos materiales el BD y el SU-8 muestran muy bajas señales de fondo en fluorescencia y baja adsorción inespecífica.

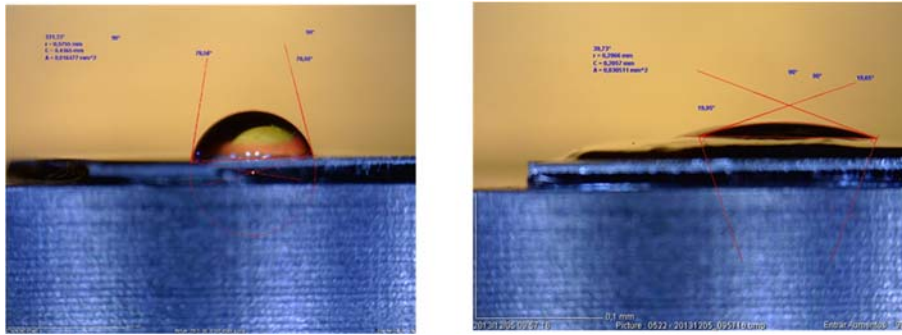
Para optimizar la preparación de las micromatrices, se disolvió 2-metacrililoetilfosforilcolina (MPC) en agua, etanol, tetrahidrofurano y tolueno a una concentración de 1 M. Las disoluciones fueron depositadas en la superficie del chip (BD o SU-8) e irradiadas a 254 nm a diferentes tiempos comprendidos entre 1 y 60 minutos. A esta longitud de onda, la polimerización radicalaria de los dobles enlaces tiene lugar rápidamente, y los radicales formados promueven el enlace del hidrogel polimérico a los sustratos. Las matrices se lavaron exhaustivamente con agua y la consistencia de los puntos se inspeccionó a simple vista. El hidrogel formado fotoquímicamente en agua durante 7 min de irradiación presentaba mayor

resistencia y reproducibilidad, por lo que se seleccionó para optimizar las condiciones del ensayo (Figura 3.2). Además, se realizaron controles negativos, comprobando que la irradiación UV es indispensable para formar el gel, pues al no irradiarlo no permanecían en la superficie tras su lavado.



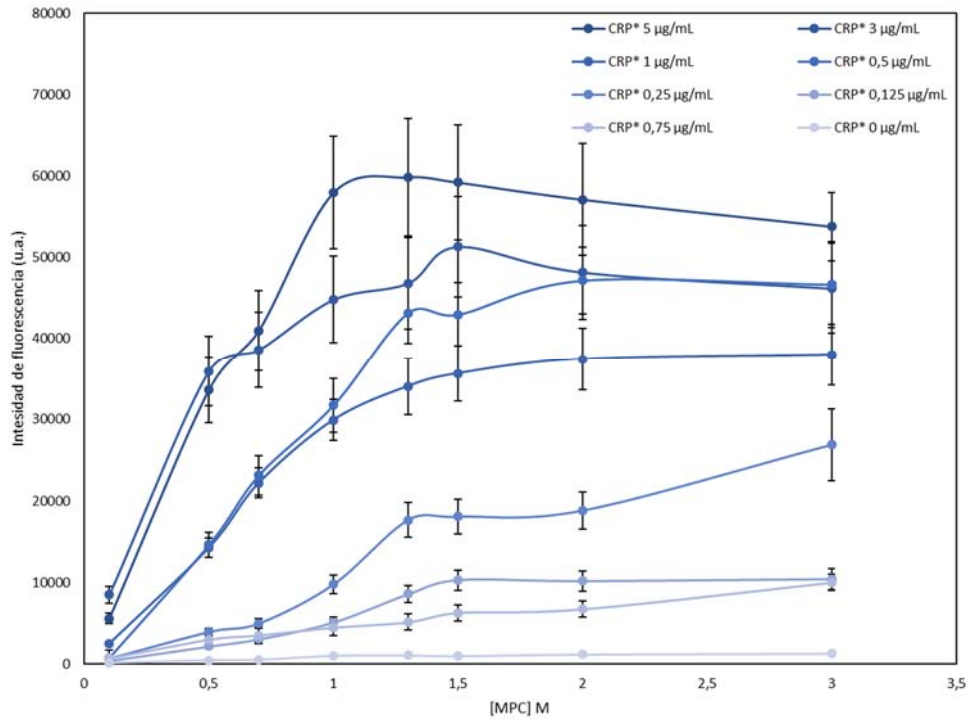
**Figura 3.2.** Esquema del procedimiento para crear las micromatrices en BD y foto de las micromatrices impresas sobre BD.

El gel de fosforilcolina proporciona un ambiente altamente hidrófilo (WCA aprox.  $20^\circ$ ), en contraste con las superficies de BD (WCA  $80^\circ$ ) y SU-8 (WCA  $79^\circ$ , Figura 3.3). Las propiedades repelentes o antiincrustamiento de la fosforilcolina impiden la retención inespecífica de otras proteínas en el seno del hidrogel, mientras que la alta hidrofilia presentada por la formación del hidrogel favorece el contacto de las disoluciones acuosas que se emplean durante los distintos ensayos, y solo la CRP de la muestra se unirá a través de la interacción específica con la fosforilcolina.



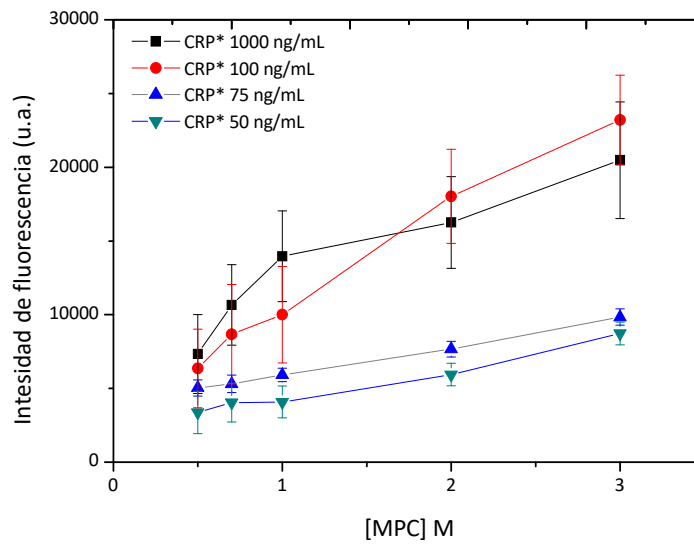
**Figura 3.3.** Fotografía del aspecto y ángulo de contacto de la superficie de SU-8 (izquierda) y de la superficie de SU-8 cubierta con el hidrogel de MPC (derecha).

Se ensayaron diferentes concentraciones de MPC acuoso, desde 0,1 a 3 M. Para crear las micromatrices en BD. Para caracterizar el reconocimiento de CRP, esta se marcó con el fluoróforo Alexa647 (CRP\*). Los primeros ensayos se realizaron utilizando PBS-T como tampón para diluir la CRP. Se aplicaron diluciones de sonda en el intervalo de 0,075  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sobre la micromatriz y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para después lavar y registrar la fluorescencia<sup>147</sup>. Tras tratar los datos, se detectó una señal distinguible del fondo para todas las concentraciones de CRP\* (Figura 3.4). Como el reconocimiento de la CRP puede ser dependiente del calcio, se realizaron nuevos ensayos agregando cloruro de calcio 10 mM al tampón de unión, PBS-T, sin encontrar una mejora relevante. De todas las concentraciones de MPC ensayadas (0,1-3 M), se seleccionó 1 M como la óptima para los ensayos posteriores.



**Figura 3.4.** Evolución de la intensidad de la fluorescencia de la micromatriz en BD para concentraciones crecientes de MPC y de CRP\* (0,75 a 5 µg/mL).

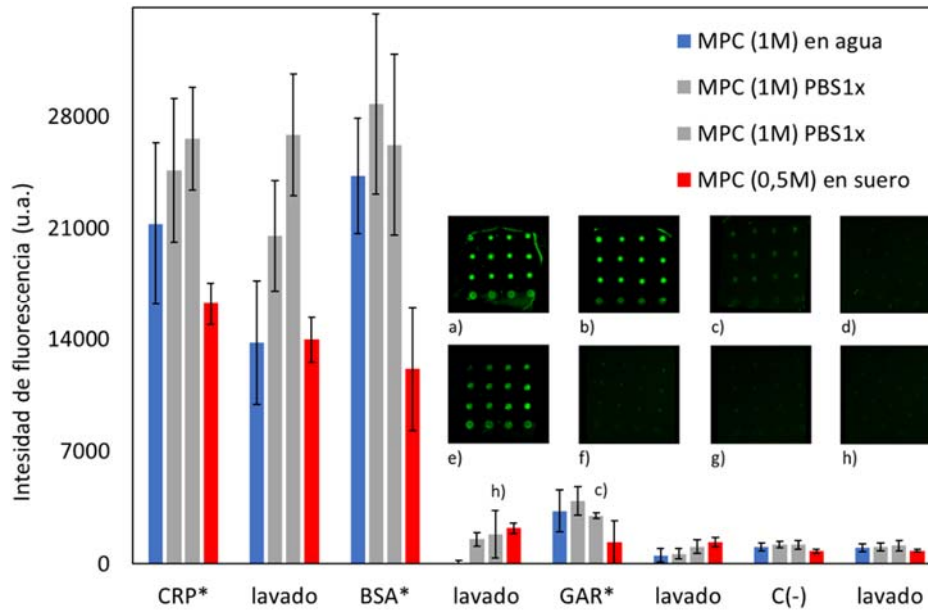
También, se llevaron a cabo experimentos análogos en las superficies SU-8, al igual que en los ensayos anteriores se seleccionó MPC 1 M como la mejor concentración (Figura 3.5), ya que el punto de hidrogel es más compacto y homogéneo.



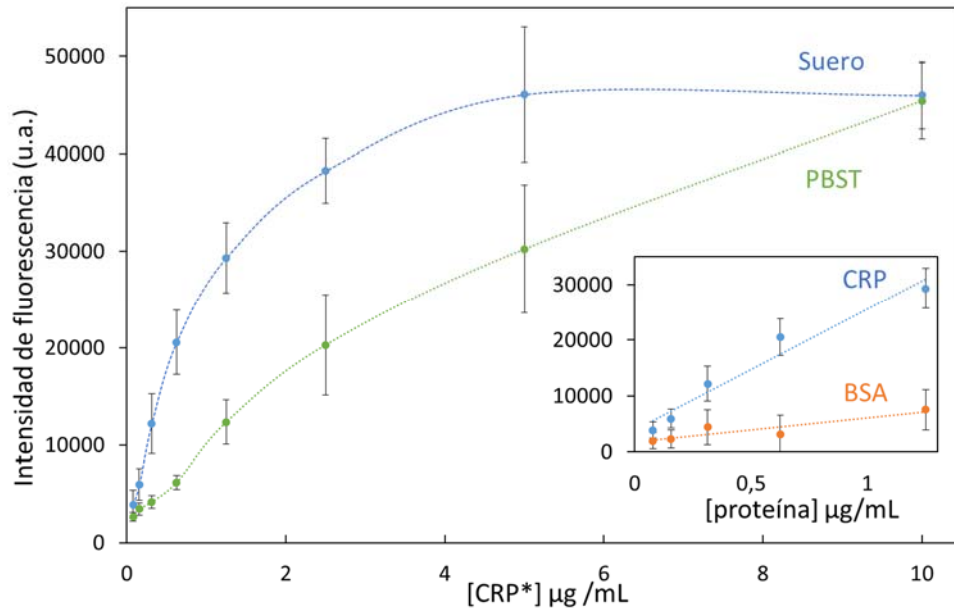
**Figura 3.5.** Intensidad de fluorescencia obtenida para concentraciones de CRP\* de 50, 75, 100 y 1000 ng/mL frente a la concentración de MPC empleada para formar la micromatriz de hidrogel sobre vidrio SU-8.

Puesto que el objetivo final es la determinación de CRP en suero sanguíneo, se hicieron ensayos con suero de conejo dopado con CRP\* entre 0,08 y 10  $\mu\text{g/mL}$ , para comprobar las prestaciones del hidrogel. El tiempo de incubación sobre en nuevas micromatrices fue de 30 minutos a temperatura ambiente. Para el BD y para SU-8 todas las concentraciones dieron señal superior a la del blanco. El límite de detección, calculado como la concentración que proporciona la señal del blanco más tres veces su desviación estándar, resultó 0,03  $\mu\text{g/mL}$  y 0,025  $\mu\text{g/mL}$  para BD y SU-8, respectivamente. Para demostrar la selectividad del reconocimiento, se realizó el mismo experimento, utilizando proteínas no específicas; concretamente albúmina de suero bovino (BSA) y un anticuerpo anticonejo producido en cabra (GAR), ambos marcados con el fluoróforo Alexa647 (BSA\* y GAR\*). Para la BSA\* el marcaje se realizó en el laboratorio y en el caso del anticuerpo se adquirió ya marcado (Figura 3.6). En ningún caso se detectó señal de fluorescencia en la micromatriz. Además, se observó una buena relación lineal entre la señal de fluorescencia y la concentración de CRP\* como se muestra en la figura 3.7. La sensibilidad de este ensayo está

limitada por la propia sensibilidad del lector de fluorescencia de superficies empleado. Teniendo en cuenta las limitaciones del dispositivo de lectura, las plataformas revelaron una gran idoneidad para el reconocimiento específico de niveles muy bajos de CRP y, se prevé que el cambio a otro dispositivo de detección más sensible o el uso de detección colorimétrica o enzimática, podría mejorar los límites de detección en al menos dos órdenes de magnitud, como ya observamos en otros sistemas<sup>90</sup>.



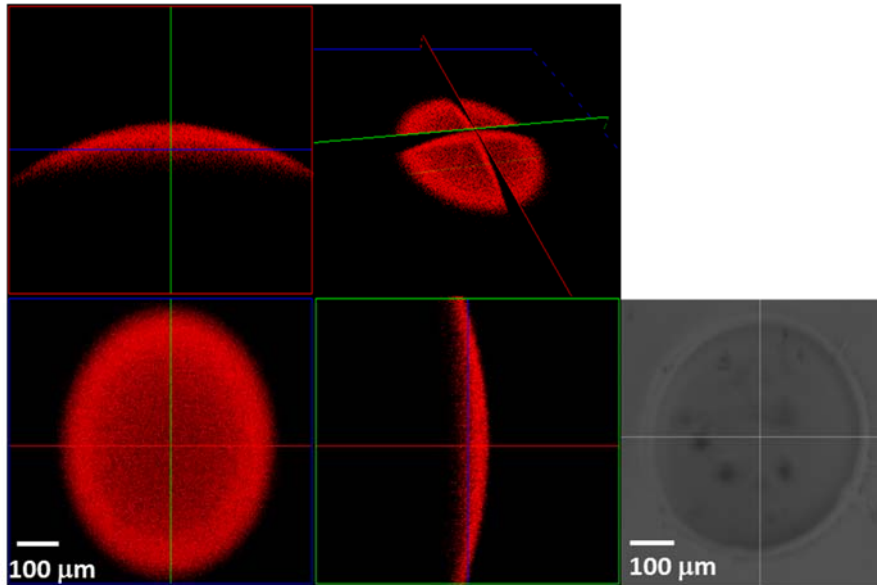
**Figure 3.6.** Ejemplos de micromatrices de MPC inmovilizada y ensayos de reconocimiento con proteínas marcadas. a) CRP\*, b) BSA\*, c) GAR\* y d) SSC 5x. Los resultados muestran que sólo las micromatrices de MPC dan señal para CRP\* y BSA\*, al lavar se comprueba que sólo hay señal con CRP\* (e) CRP\*, f) BSA\*, g) GAR\* y h) SSC 5x).



**Figura 3.7.** Comparación de las curvas de unión de CRP\* en PBS-T y en suero para micromatrices de MPC (1M) creadas en superficies BD. Rango lineal para CRP y BSA en suero.

Puesto que el hidrogel forma gotas en la superficie, teniendo una estructura 3D, se planteó un estudio de penetrabilidad de la proteína para determinar si el reconocimiento de la CRP se producía únicamente en la zona más externa del gel o si por el contrario tenía lugar también en el interior. Para ello, se usó la técnica de microscopía confocal de fluorescencia y se analizaron puntos de una micromatriz de MPC sobre BD que había sido incubada con CRP\* y lavada posteriormente, de acuerdo al protocolo optimizado. Como puede verse en la figura 3.8, las proteínas logran penetrar dentro del hidrogel por difusión, como muestra la pues hay señal de fluorescencia en el interior de la gota y no sólo en la capa externa del gel.





**Figura 3.8.** Imagen de una gota de hidrogel registrada mediante microscopía de fluorescencia confocal para diferentes planos z y ángulos para evaluar la presencia de fluorescencia dentro del gel. La CRP marcada con Alexa647 penetra dentro del *spot*. A la derecha, imagen del *spot* para luz transmitida.

Una vez que se demostraron las capacidades de las micromatrices propuestas sobre las superficies BD y SU-8, se estudió la posibilidad de anclar diferentes sondas dentro del hidrogel. El hecho de poder incorporar diferentes sondas a la matriz de MPC la dotaría de una mayor versatilidad, pudiendo ajustarla a la diana seleccionada, a la vez que mantiene sus propiedades de alta densidad de sitios de reconocimiento y de repeler las adsorciones no específicas de proteínas.

Para ello, se planteó se llevó a cabo el fotoacoplamiento tiol-acrilato de sondas biorreceptoras tioladas que se incorporarían a la micromatriz simultáneamente a la formación de la misma. El estudio se planteó tanto para sondas de proteínas (anticuerpos), como para sondas de ácidos nucleicos.

3.1.2 Inmovilización de anticuerpos en el hidrogel y detección fluorescencia específica de proteínas en formato de micromatriz.

En primer lugar, se estudió la capacidad de inmovilizar anticuerpos en el hidrogel a análisis, así como su biodisponibilidad. Para ello, se usó el sistema modelo albumina de suero bovino/anticuerpo contra albúmina de suero bovino (BSA/aBSA), pues se usa ampliamente y en la literatura existen bastantes datos para su comparación.

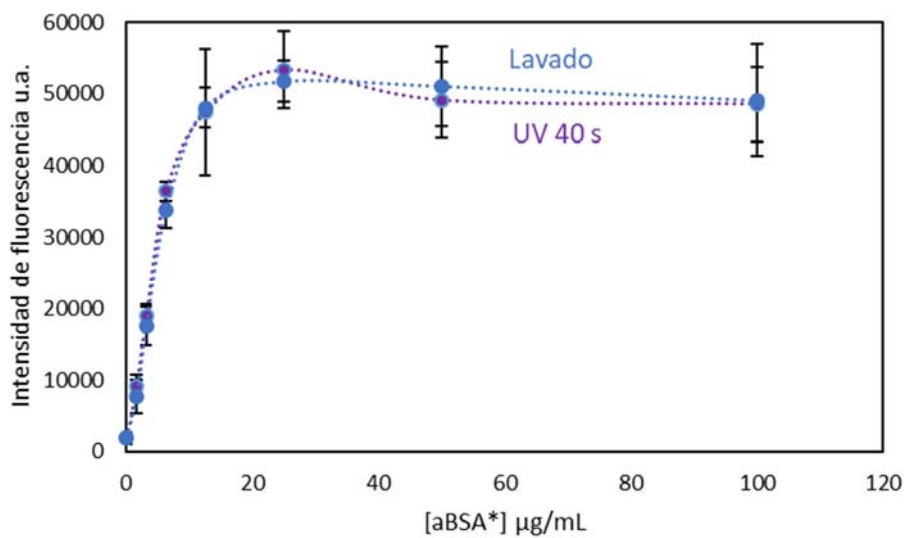
Primeramente, se estudió la fotoinmovilización del anticuerpo mientras se formaba el hidrogel. Nuestra hipótesis se basaba en que la misma irradiación que induce la polimerización del acrilato podría catalizar la reacción de acoplamiento tiol-acrilato entre las unidades de MPC y los tioles del anticuerpo. Para ello, se purificó el aBSA del suero de conejo mediante una columna de afinidad de proteína A y posteriormente fue marcado con Alexa647 (aBSA\*).

Se optimizaron diferentes parámetros, incluyendo: tampón, concentración de MPC, condiciones de lavado y concentración de aBSA. Así, se estudió la inmovilización en tres tampones diferentes: agua, tampón fosfato salino (PBS 1x) y tampón carbonato (TC). También, se estudiaron diferentes concentraciones de aBSA\* (de 1,56 µg/mL a 100 µg/mL) que contenía MPC 1 M sobre BD, se irradiaron a 254 nm y finalmente se lavaron durante 14 minutos con PBS 1x, registrando la fluorescencia en cada etapa del proceso.

Durante la etapa de inmovilización, al usar diferentes tampones no se encontraron diferencias significativas, y se seleccionó PBS 1x para los siguientes experimentos. Además, este tampón se eligió porque en los ensayos de reconocimiento se observó que las señales de fluorescencia mejoraban al usarlo en la inmovilización. Otro de los parámetros optimizados en los ensayos fue el tiempo de irradiación necesario para formar la micromatriz de sonda, que se variaron entre 10 s y 10 min. Largos tiempos de irradiación dieron lugar a peores señales en la inmovilización de la aBSA, y se eligió como óptimo un tiempo de 40 s. A tiempos menores de 40 s la homogeneidad de los puntos era peor y no siempre se formaba el hidrogel, pues con un simple lavado desaparecían los puntos, probablemente debido a que el tiempo de exposición a la luz UV no era suficiente para alcanzar un grado de reticulación aceptable.

Las señales de fluorescencia observadas tras irradiar el gel 40 s y su lavado posterior, eran similares. Esto indicó que los anticuerpos aBSA\* permanecían inmovilizados en el hidrogel (Figura 3.9).

Para estudiar la reproducibilidad de los ensayos en micromatriz, se realizaron réplicas, y calculando la desviación estándar de la relación señal/ruido (S/R) tanto entre los *spots* de una misma matriz (desviación intrachip) como entre diferentes matrices (desviación interchip), resultando valores de 2-17% para la desviación intrachip, y 6-15% para la interchip. Ambos resultados están dentro de la reproducibilidad habituales del formato de micromatriz.

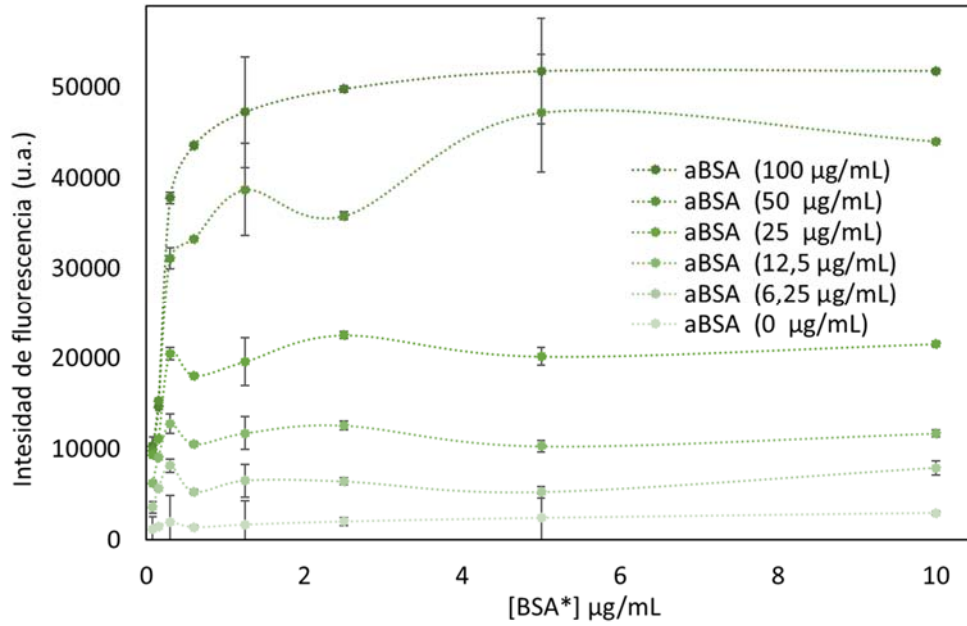


**Figura 3.9.** Intensidad de fluorescencia frente a la concentración de aBSA\* localizada para un hidrogel formado en BD después de la irradiación (40 s a 254 nm) y de eliminar la sonda no unida. La fluorescencia permanece inalterada, lo que indica que los anticuerpos impresos estaban inmovilizados. Los puntos corresponden al promedio de dos réplicas de chips con 4 puntos/concentración para cada chip.

La densidad de inmovilización fue estimada a partir del rendimiento de inmovilización. Para ello, se imprimieron diferentes concentraciones de aBSA\* formando micromatrices. Tras irradiar, el chip la fluorescencia y se estableció la

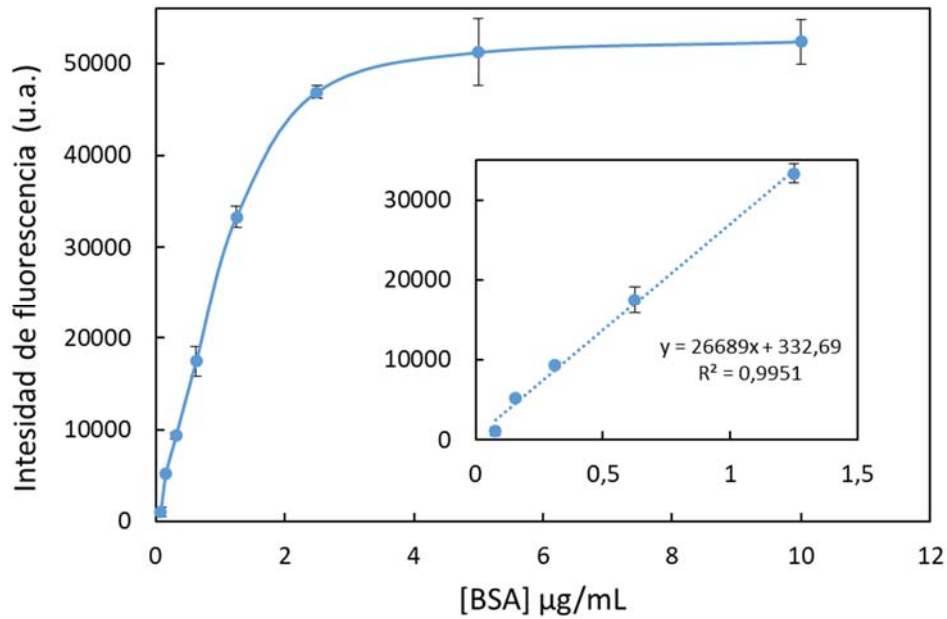
relación entre el valor de la densidad de inmovilización y la intensidad de fluorescencia observada. La densidad superficial se calculó a partir del área del punto de la micromatriz, el diámetro del punto, el volumen dispensado y la concentración. Tras establecer esta relación, los chips son lavados y se registró la fluorescencia nuevamente. Este valor indica la sonda inmovilizada y permite determinar su densidad por interpolación en la recta de calibrado. Los valores obtenidos se mueven entre 0,37 y 27,85 picomol/cm<sup>2</sup>, para las concentraciones impresas más bajas y más altas, respectivamente, pues es un valor que depende de la concentración de aBSA. Los valores obtenidos son buenos ya que mejoran las densidades de inmovilización obtenidas en otro tipo de micromatrices. En las condiciones de saturación, alcanzadas cuando se usan concentraciones superiores a 25 µg/mL, la densidad de inmovilización resulta aproximadamente 10 veces la densidad de inmovilización esperada para una monocapa de anticuerpo inmovilizado en una superficie 2D (2,47 – 2,93 picomol/cm<sup>2</sup>)<sup>148</sup>.

Para evaluar la biodisponibilidad del anticuerpo inmovilizado dentro del hidrogel, se crearon nuevas micromatrices utilizando aBSA sin fluoróforo. Las micromatrices se sometieron a incubación con concentraciones crecientes de BSA marcada con Alexa647 (BSA\*) en PBS-T (0 a 10 µg/mL). Al igual que antes, el marcaje de la BSA se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor. La incubación se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavó y se registró la fluorescencia. La figura 3.10 muestra las curvas obtenidas.

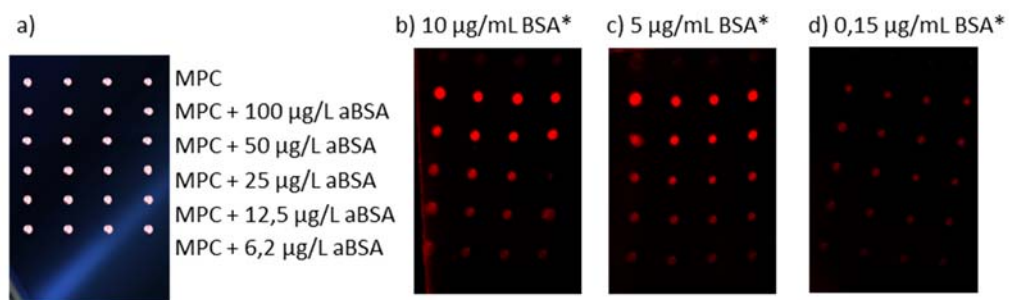


**Figura 3.10.** Variación de la intensidad de la fluorescencia para concentraciones crecientes de aBSA (0, 6, 12, 25, 50 y 100 µg/mL) inmovilizada dentro del hidrogel MPC (1M) frente a cantidad de BSA\*.

Utilizando la curva de calibración correspondiente (Figura 3.11) fue posible determinar la cantidad de BSA reconocida y relacionarla con el anticuerpo inmovilizado. Las densidades de BSA biorreconocidas variaron de 0,20 a 5,27 picomol/cm<sup>2</sup>, lo que corresponde a rendimientos de biorreconocimiento de 54% a 20%. En la micromatriz, se incorporó una fila del hidrogel MPC sin aBSA como control negativo para verificar que la BSA se mantiene dentro del hidrogel debido al reconocimiento específico del anticuerpo, la figura 3.12 muestra que existe señal en todos los casos excepto para el blanco.



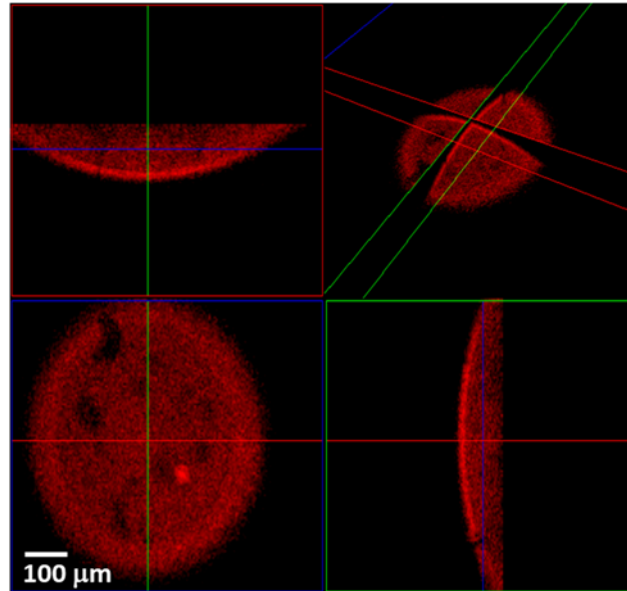
**Figura 3.11.** Curva de calibración de la BSA. Inserción, rango lineal y valores de ajuste.



**Figura 3.12.** Imágenes de las micromatrices de hidrogel para sistema modelo aBSA/BSA\*. a) Diseño de la micromatrices, b) c) y d) distintas concentraciones incubadas de la micromatriz y las señales de fluorescencia obtenidas.

Durante el desarrollo de la micromatriz de hidrogel, se planteó la duda de dónde ocurría el reconocimiento de las biomoléculas, en la superficie de las gotas o en su interior. Para ello, se inmovilizó aBSA en el hidrogel y se reconoció con BSA\* analizando el resultado mediante microscopía confocal de fluorescencia. En la figura

3.13 se observa que dicho reconocimiento específico no ocurría sólo en la superficie o capa más externa del gel, sino que también ocurre en su interior, por lo cual la superficie efectiva de estas micromatrices es mayor que la obtenida usando inmovilizaciones 2D convencionales.



**Figura 3.13.** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia para un punto de una micromatriz de hidrogel MPC (1M) con aBSA coinmovilizado y luego incubado con BSA marcada (BSA\*).

Además, se estudió la estabilidad de las micromatrices de hidrogel con el tiempo, mediante la preparación de varios chips y la ejecución del ensayo de inmediato y transcurridos 4, 7, 15 y 30 días, almacenando los chips en nevera a 4°C. La señal de fluorescencia se analizó sin observar pérdidas importantes, considerando que los chips se almacenan sin más precauciones que controlar la temperatura (tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Porcentaje de variación en la fluorescencia obtenida para el ensayo de reconocimiento de BSA usando 10 µg/mL de BSA\* después de 4, 7, 15 y 30 días de almacenamiento. Los porcentajes se refieren a la fluorescencia obtenida cuando el ensayo se lleva a cabo inmediatamente después de crear la matriz.

	Día 4	Día 7	Día 15	Día 30
aBSA 50 µg/mL	110%	90%	91%	81%
aBSA 25 µg/mL	120%	92%	87%	84%

### 3.1.3 Inmovilización en formato de micromatriz de ácidos nucleicos en hidrogel de MPC

A continuación, se planteó demostrar la idoneidad del hidrogel de MPC para inmovilizar sondas de ácidos nucleicos y realizar hibridaciones en el mismo. Para ello, oligonucleótidos modificados con el grupo tiol terminal, se entrecruzaron con el polímero mediante de acoplamiento tiol-acrilato, como en el caso de los anticuerpos.

**Tabla 3.2.** Denominación y secuencia de los oligonucleótidos empleados.

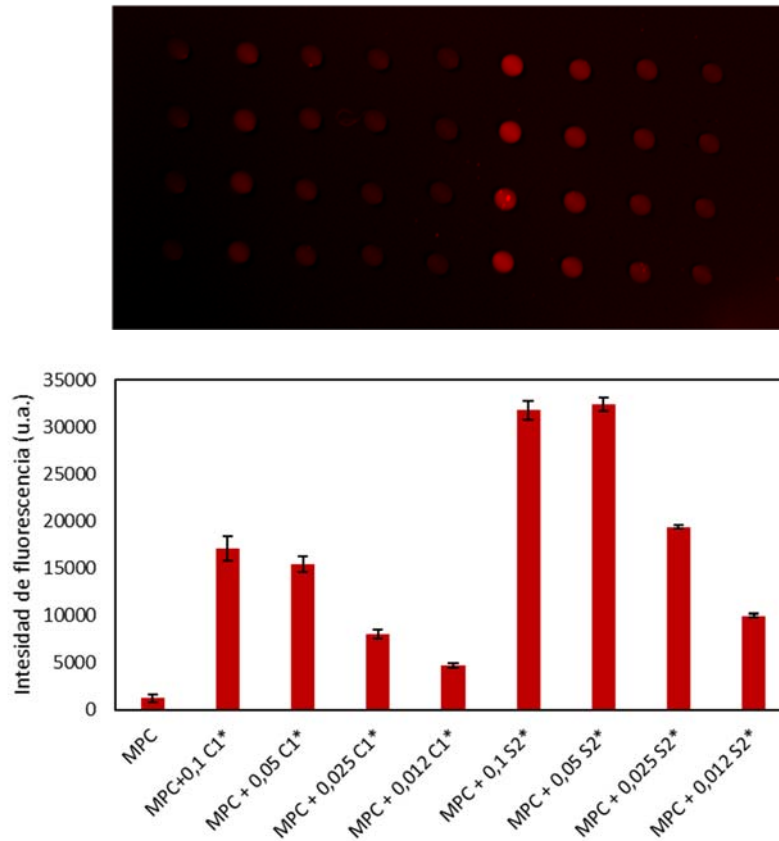
Oligonucleótido <sup>a</sup>	Secuencia (5'-3')
C1	BTN-(T) <sub>15</sub> -CCCGATTGACCAGCTAGCATT
C1*	BTN-TTACGATCGA-Cy5
C2	H <sub>2</sub> N-(T) <sub>15</sub> CCCGATTGATTAGCTAGCATT
C2*	Cy5-TTACGATCGATTAGTTAGCCC(T) <sub>15</sub> -NH <sub>2</sub>
S1	SH-(T) <sub>15</sub> -CCCGATTGACCAGCTAGCATT
S1.1m	SH-(T) <sub>15</sub> -CCCGATTGACC <u>I</u> GCTAGCATT
S1.2m	SH-(T) <sub>15</sub> -CCCGATTGAT <u>I</u> TAGCTAGCATT
S1.3m	SH-(T) <sub>15</sub> -CCAT <u>A</u> TTGACCAGCTAT <u>C</u> CATT
S2*	Cy5-CCCGATTGACCAGCTAGCATT-(T) <sub>15</sub> -SH
S3	SH-ATCGACACCCCTATCACGATTAGCATTAA
D1*	Cy5-AATGCTAGCTGGTCAATCGGG

<sup>a</sup> C significa control, S sonda y D oligonucleótido diana. \* indica que la secuencia está marcada con un fluoróforo (Cy5). BTN significa biotina.

Las disoluciones de MPC 1M contiendo diferentes concentraciones de oligonucleótidos marcados (Sonda 2\* terminado en tiol, Control 2\* terminado en amina y Control 1\* terminado en biotina) se imprimieron en el BD y se irradiaron durante 7 min a 254 nm. Después de un lavado extenso se midió la fluorescencia. Solo la Sonda 2\* permaneció significativamente dentro del hidrogel, lo que de nuevo



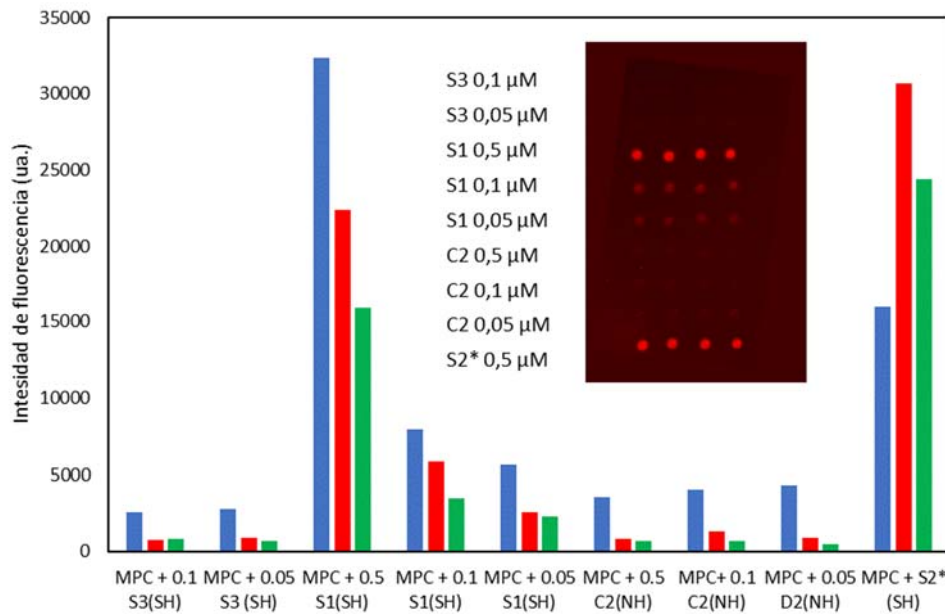
demuestra que el grupo tiol para lograr la unión covalente mediante el acoplamiento de tiol-acrilato (Figura 3.14).



**Figura 3.14.** Intensidad de fluorescencia obtenida para una micromatriz de hidrogel de MPC creada en presencia de la Sonda 2\* (marcada con Cy5, oligonucleótido que contiene tiol) y la sonda Control 1\* (oligonucleótido marcada con Cy5 sin un grupo tiol). Parte superior: imagen de la micromatriz, parte inferior: diagrama de los datos tratados obtenidos de la imagen.

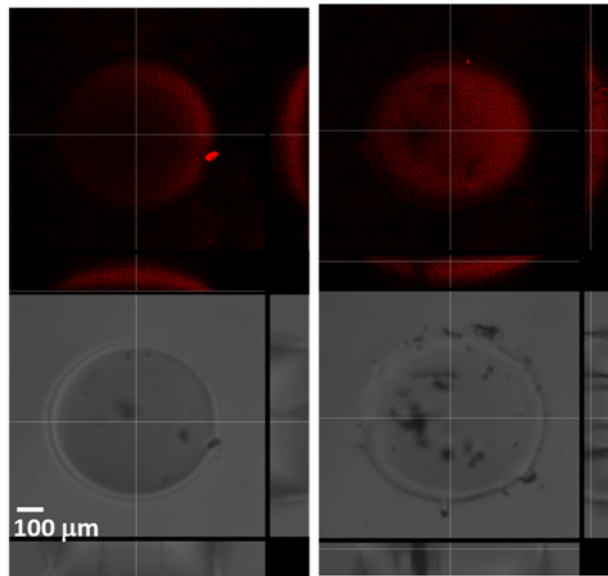
Para probar la eficacia de la hibridación en las micromatrices, se prepararon hidrogeles con la Sonda 3 (extremo tiol), la Sonda 1 (extremo tiol), el Control 2 (extremo amino) y la Sonda 2\* (extremo tiol). La Sonda 1 y el Control 2 tenían la secuencia complementaria de la Diana 1\*, se incluyó la Sonda 3 para probar la especificidad de la hibridación y la Sonda 2\* como control de inmovilización de la

sonda. Después de la irradiación y el lavado, los chips se hibridaron con la Diana 1\* en SSC 1x durante 1 hora a 37 °C. Luego, se lavaron con SSC 1x se midió la fluorescencia y se trataron los datos de manera similar a los anteriores apartados. Como era de esperar, solo las filas de la micromatriz correspondientes a la Sonda 1 y la Sonda 2\* proporcionaron señales de fluorescencia significativas (Figura 3.15).



**Figura 3.15.** Señales de fluorescencia obtenidas para una micromatriz en 3 chips (azul chip1, rojo chip 2 y verde chip 3), diseñada como se muestra en la figura, después de la hibridación con la Diana 1\* en SSC 1x durante 1 h a 37 °C. La Diana 1\* es complementaria de la Sonda 1, el Control 2 y la Sonda 2\*. La Sonda 2\* se incluyó como control de inmovilización positivo.

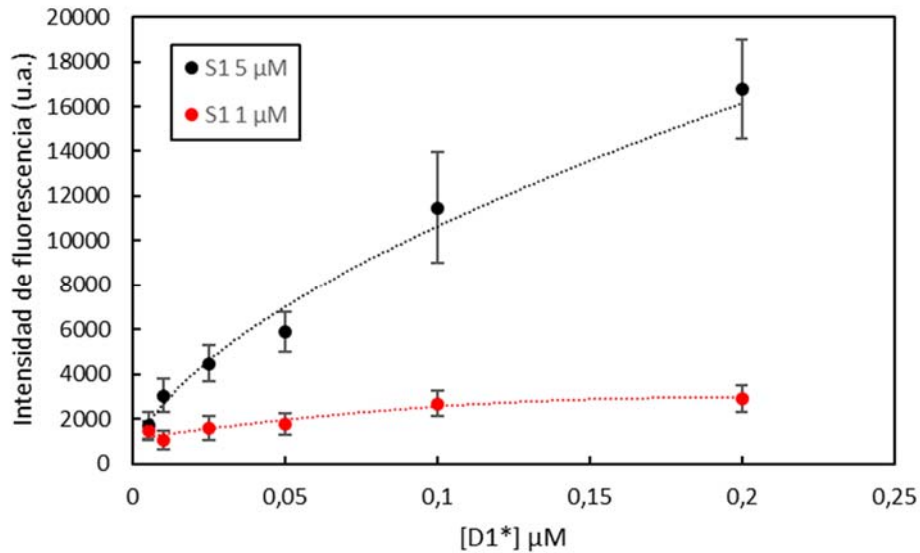
Además, para comprobar que la hibridación tenía lugar en el interior del hidrogel se realizaron medidas mediante microscopía confocal de fluorescencia (Figura 3.16). En las imágenes se pudo ver que la sonda marcada entra en el hidrogel. Las imágenes obtenidas son similares a las que se obtuvieron anteriormente cuando se analizaron micromatrices con anticuerpos.



**Figura 3.16.** a) Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia para puntos de una micromatriz de hidrogel MPC (1M) con oligonucleótidos (la Sonda 1, la Diana 1\* y la Sonda 2\*) a la derecha el control de inmovilización la Sonda 2\* y a la izquierda el ensayo de hibridación entre la Sonda 1 0,4 μM y la Diana 1\* a 0,1 μM, además los cortes transversales del hidrogel permitan observar fluorescencia en su interior.

Una vez demostrada la inmovilización efectiva de los oligonucleótidos y su capacidad de hibridación específica, se realizaron estudios de sensibilidad. Para ello, se desarrolló el ensayo con concentraciones decrecientes (de 0,5 μM a 0,003 μM) de la diana marcada (Diana 1\*). Se pudo detectar hasta 0,003 μM, que se compara bien con los datos reportados previamente (Figura 3.17). El LOD resultó 6 nM, que se correlaciona bien con la concentración más baja detectada en otras micromatrices medidas bajo las mismas condiciones. La saturación de la hibridación se obtiene para la Sonda 1 a 1 μM y concentraciones de la Diana 1\* sobre 0,05 μM, mientras que si se emplea 5 μM de la Sonda 1 la saturación se alcanza por encima de 0,2 μM (Figura 3.17). La hibridación también se realizó en SSC 5x sin mejorar los resultados obtenidos para SSC 1x. Las intensidades de fluorescencia son similares a las reportadas por nuestro grupo en micromatrices creadas utilizando la química de acoplamiento de tiol-foto-*click* pero sin la ayuda de un hidrogel<sup>94, 96</sup>. Sin embargo, en esos casos la concentración de sonda necesaria era entre 5 y 10 μM, mientras que

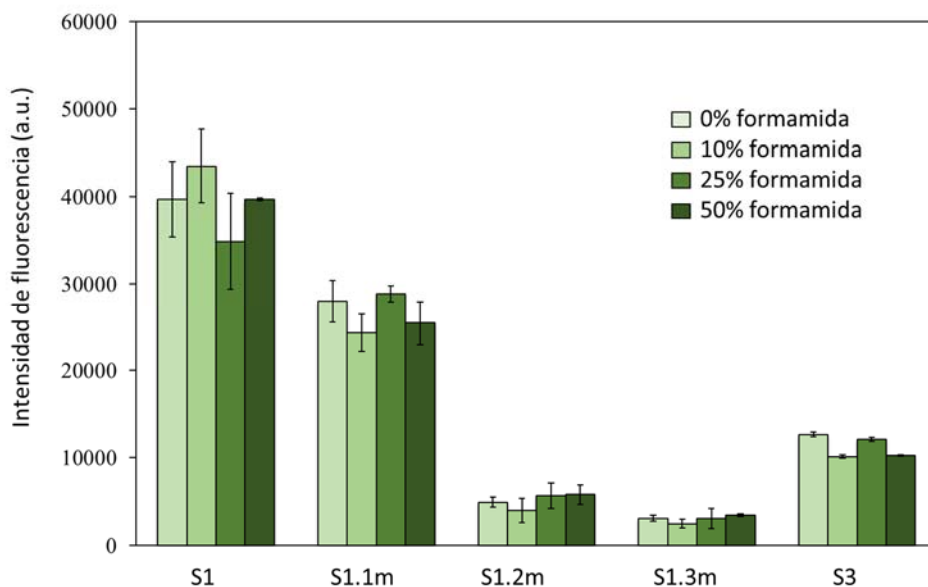
aquí la misma sensibilidad se alcanza con concentraciones de sonda de 0,1 y 0,5  $\mu\text{M}$ . Como se dijo anteriormente, la sensibilidad está limitada por el rendimiento del lector de superficies y se podría mejorar con un mejor dispositivo.



**Figura 3.17.** Curva de hibridación de la Diana 1 \* para micromatrices creadas con el hidrogel de MPC para 1  $\mu\text{M}$  (rojo) y 5  $\mu\text{M}$  (negro) de la Sonda 1, respectivamente.

Finalmente, se analizó la aplicabilidad del método a la detección de polimorfismos de una sola base. Los polimorfismos de una sola base suelen ser la mutación genética más común en el genoma humano. Por ello, se intentó la discriminación del polimorfismo de un solo nucleótido con las micromatrices desarrolladas. Para llevar a cabo la discriminación es necesario emplear un medio que debilite la formación de los puentes de hidrógeno, evitando el reconocimiento entre bases complementarias y así favorecer sólo el reconocimiento con la cadena que es totalmente complementaria. Con dicha finalidad suele usarse formamida o concentraciones muy elevadas de sales. Así, se prepararon micromatrices que incluyen diferentes sondas S1, S1.1m, S1.2m, S1.3m y S3, que son sondas que se diferencian de S1 entre una, dos, tres bases o en toda la secuencia, y por tanto no son totalmente complementaria a la Diana 1 \*. Estas sondas se inmovilizaron a 5  $\mu\text{M}$  y la hibridación

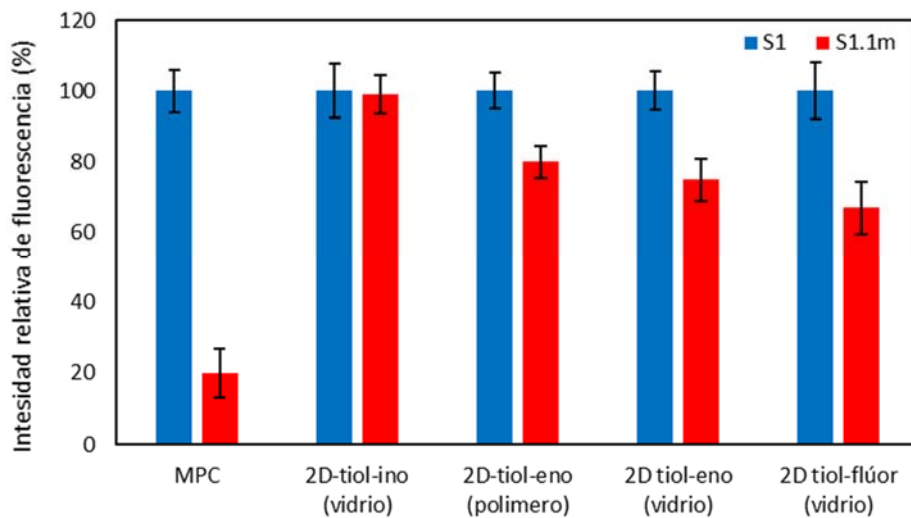
se realizó con la Diana 1 \* a 0,25  $\mu\text{M}$  durante 2 horas a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Se probaron diferentes concentraciones iónicas (SSC 1x a SSC 10x) y diferentes porcentajes de formamida (0% a 50%) (Figura 3.18). Se observó que al disminuir la complementariedad disminuye la intensidad de fluorescencia. Para todas las condiciones se alcanzó una discriminación exitosa (Figura 3.18). Por otro lado, se observaron pocas diferencias con los distintos porcentajes de formamida, pues el propio hidrogel se encarga de realizar una buena discriminación.



**Figura 3.18.** Ensayos de discriminación de polimorfismos de una sola base con diferente porcentaje de formamida.

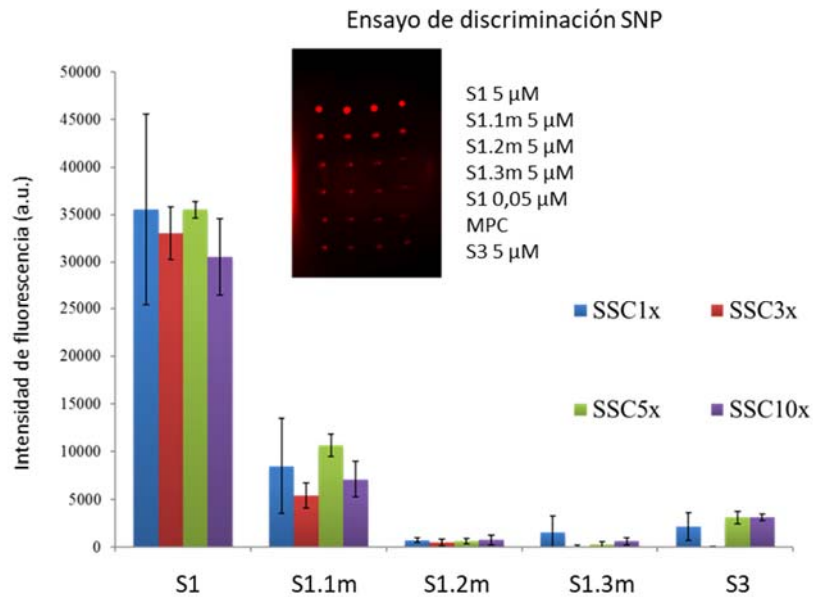
Además, se realizaron ensayos para la discriminación de un solo polimorfismo y se comparó con respecto a las técnicas de inmovilización covalente convencionales 2D (Figura 3.19). En el ensayo se usó la Sonda 1 (totalmente complementaria) y S1.1m (un solo polimorfismo) en MPC, y usando técnicas 2D de fotoinmovilización a través de acoplamiento tiol-ino, tiol-eno y tiol-flúor, para después hibridar con la Diana 1\*. El mejor resultado se daba cuando se usaba el hidrogel de MPC, mientras que para

las otras aproximaciones 2D las señales obtenidas resultaron de menos intensidad y con pocas diferencias entre ellas.



**Figura 3.19.** Resultados de los ensayos de discriminación de una sola base comparando el hidrogel de MPC (3D) con técnicas 2D basadas en el acoplamiento tiol-ino<sup>95</sup>, tiol-eno<sup>149,150</sup> y tiol-fluor<sup>96</sup>. En el ensayo se usan sondas totalmente complementarias (Sonda 1) y no complementarias con un solo polimorfismo (S1.1m) que hibridan con la Diana 1\* (0,25  $\mu$ M) en SSC 1x durante 1 hora a 37 °C. La micromatriz basada en hidrogel proporciona una mejor discriminación de SNP sin usar diferentes condiciones de hibridación.

También, se estudió el efecto de aumentar la concentración de sales (Figura 3.20) en el tampón de hibridación para analizar la capacidad de discriminación. Se emplearon cuatro disoluciones con diferente concentración de SSC 1x, 3x, 5x y 10x sin formamida. En todos estos ensayos se comprobó que el propio hidrogel mejora la capacidad de discriminación sin necesidad de modificar el tampón de hibridación, cambiando la concentración de las sales o usando formamida.



**Figura 3.20.** Resultados obtenidos en los ensayos de discriminación de polimorfismos. Se emplearon diferentes sondas que tienen la secuencia complementaria a la Diana 1\* (Sonda 1), y sondas con 1, 2 y 3 desapareamientos (S1.1m, S1.2m, S1.3m) o no son complementarias en absoluto (Sonda 3). La hibridación realizada durante 1 hora a 37 °C, con la Diana 1\* a 0,25 μM en SSC 1x, 3x, 5x y 10x.

Con este trabajo se demuestra que el hidrogel de fosforilcolina puede usarse en ensayos de micromatrices y con detección de fluorescencia, siendo de aplicación en superficies tanto BD como otras con grupos alqueno. La principal ventaja del hidrogel es su capacidad de inmovilizar covalentemente un gran número de biorreceptores como ácidos nucleicos tiolados o anticuerpos con buena biodisponibilidad.

### 3.2 Inmovilización de biomoléculas basada en el uso de hidrogeles de dextrano sobre BD y vidrio-acrilato.

Dados los buenos resultados obtenidos con el hidrogel de fosforilcolina para anticuerpos y ácidos nucleicos se planteó ampliar el estudio a nuevos hidrogeles. En la literatura se describen diferentes hidrogeles para crear plataformas genéricas con

aplicación en micromatrices de proteínas y ácidos nucleicos, aunque en general implican procesos largos y con muchos pasos. Aquí se desarrolló una estrategia novedosa para obtener micromatrices de altas prestaciones, utilizando un hidrogel derivado de dextrano para inmovilizar covalentemente oligonucleótidos y proteínas. Este método emplea disoluciones acuosas de dextrano derivatizado con un grupo acrilato (Dx-Ma), que es un monómero biocompatible y fotopolimerizable. Esta aproximación promueve, mediante luz, la unión covalente de las sondas de captura dentro del hidrogel, gracias a la reacción de acoplamiento tiol-acrilato, mientras se forma el polímero de dextrano. Las nuevas micromatrices de hidrogel se prepararon en diferentes superficies como discos *Blu-ray*, policarbonato o portaobjetos de vidrio funcionalizados con grupos alqueno, mostrando altas densidades de inmovilización de la sonda y buenos rendimientos de biorreconocimiento. Esta metodología presenta ciertas ventajas como menor coste, tiempos de análisis cortos, buena sensibilidad y capacidad de multiplexación, entre otras. La novedad de esta metodología radica en cambiar el uso de micromatrices 2D por micromatrices de hidrogeles tridimensionales. El análisis mediante microscopía confocal de fluorescencia demostró que la inmovilización del receptor y el evento de biorreconocimiento tienen lugar dentro del hidrogel y no solo en la superficie.

A pesar de su alto grado de desarrollo, hay aspectos de la tecnología de micromatrices que pueden mejorarse para que alcance las prestaciones óptimas, como puede ser mejorar la densidad de sonda inmovilizada, que cómo se ha mencionado anteriormente depende de la naturaleza de la sonda, la superficie empleada, la reacción química elegida para realizar dicha inmovilización, etc.

Por ello, se ha trabajado mucho en la inmovilización covalente de biomoléculas para biosensado<sup>151</sup>, incluyendo el uso de polímeros tipo peine<sup>152</sup>, la optimización de las uniones y los espaciadores horizontales<sup>153</sup>.

Sin embargo, las dificultades que presentan otras metodologías para el anclaje pueden ser solventadas mediante el uso de hidrogeles para llevar a cabo la inmovilización<sup>106</sup>. Los hidrogeles presentan la ventaja de sustituir gotas 2D por 3D para inmovilizar las sondas, aumentando la capacidad de carga de receptor en la superficie. Además, el hidrogel proporciona un entorno hidrófilo que imita el entorno biológico y reduce la adsorción no específica de proteínas. Por lo tanto, los hidrogeles aplicados a micromatrices proporcionan una alta densidad de



inmovilización de sonda y baja unión inespecífica<sup>101,102</sup>. Actualmente, existen biochips basados en hidrogeles disponibles comercialmente, aunque es interesante simplificar su fabricación y ampliar la gama de sondas potencialmente inmovilizables.

Se sabe que los hidrogeles de dextrano entrecruzados (HDx) reticulados proporcionan condiciones similares a la matriz extracelular con alto contenido de agua y biocompatibilidad, y han sido estudiados en diferentes bioaplicaciones como biosensado con SPR<sup>154, 155</sup>, soportes para ingeniería tisular<sup>156, 157</sup>, películas antibacterianas<sup>158, 159</sup>, o sistemas de administración controlada<sup>160</sup>.

Con respecto al uso de HDx como matriz para la inmovilización covalente de sondas en la tecnología de micromatrices, la mayoría de los enfoques realizan la inmovilización de la sonda después de crear la capa de HDx en el soporte<sup>161, 162, 50</sup>, o bien previamente a la formación de la capa de dextrano<sup>163</sup>. En ambos casos se emplean reacciones clásicas de acoplamiento para el anclaje de la sonda. Por lo tanto, muy pocos enfoques utilizan métodos alternativos como los basados en la química *click*<sup>81, 164</sup> para inmovilizar las sondas, y en cualquier caso lo hacen después de la deposición de la capa de HDx.

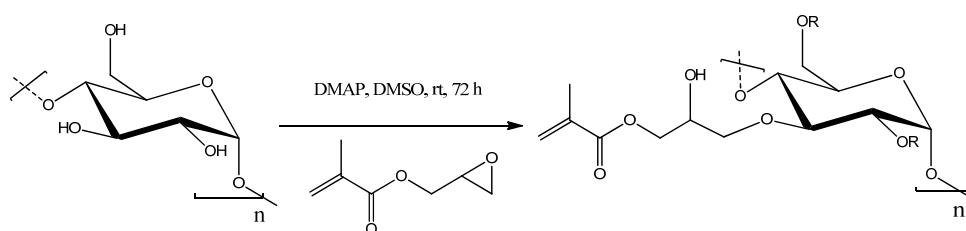
Como ya se ha venido comentando a lo largo de la tesis nuestro grupo ha estado trabajando activamente en un conjunto de reacciones de química *click* que emplean luz UV para activar las sondas que contienen el grupo tiol y para promover el enlace covalente a los grupos alqueno, alquino o epoxi presentes en la superficie<sup>90, 149, 165, 166</sup>. Todas esas reacciones presentan las ventajas asociadas a la química *click*, como funcionar en presencia de oxígeno, ser reacciones regioselectivas, tolerar muchos grupos funcionales, utilizarse sin disolventes o disolventes no agresivos como el agua y proporcionar rendimientos cuantitativos o casi cuantitativos<sup>167</sup>. Además, las micromatrices desarrolladas con estos enfoques demostraron mejorar las prestaciones de los métodos de acoplamiento clásicos, proporcionando una mejor sensibilidad y haciendo el proceso más rápido y limpio.

En la búsqueda de nuevas mejoras, aquí proponemos un método por el cual el Dx-Ma se forma por foto-reticulación de dextrano derivatizado con grupos acrilatos, y la unión covalente de las sondas que llevan el tiol tiene lugar simultáneamente a la formación de la capa de Dx-Ma. Durante el proceso de polimerización, Dx-Ma

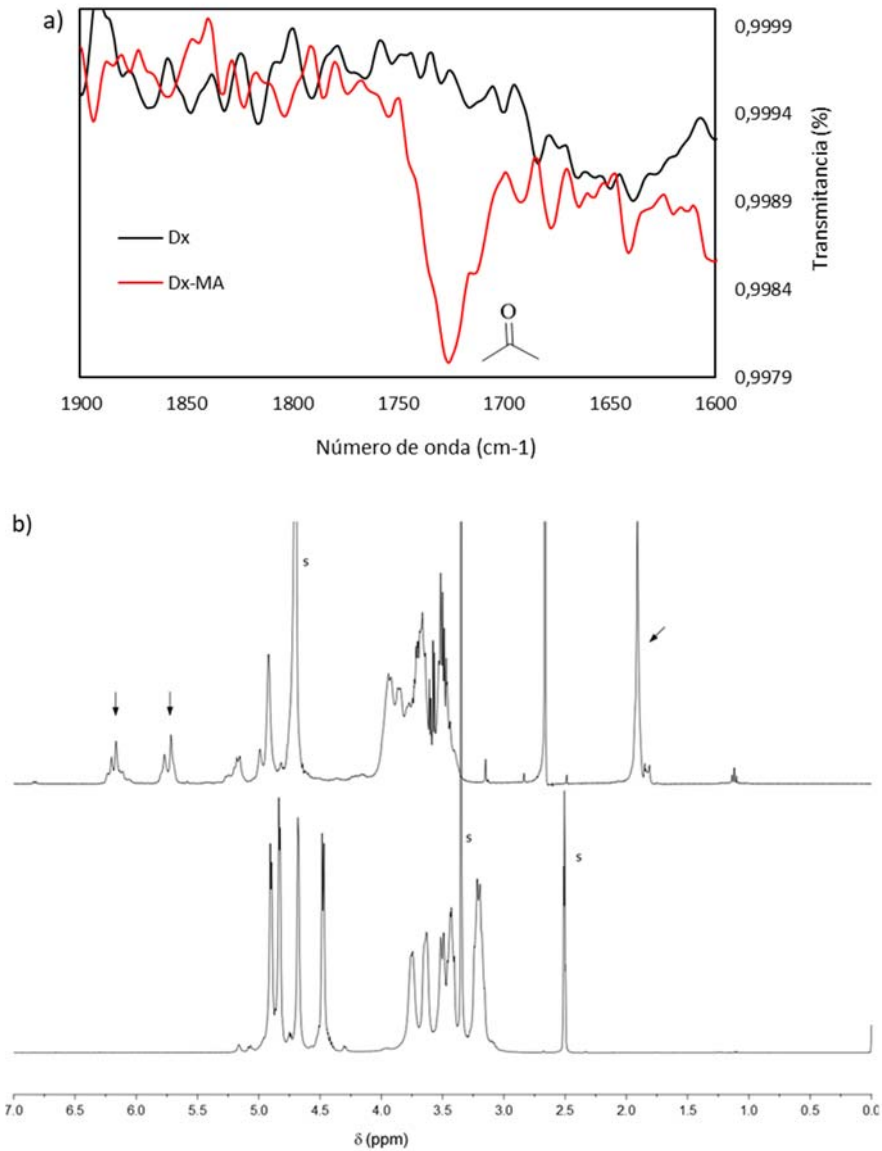
también se une covalentemente a las superficies que tienen grupos epoxi, alqueno, acrilato o alquino. En este trabajo las micromatrices de Dx-Ma se crean sobre vidrio funcionalizado con acrilato y sobre discos *Blu-ray* que tienen una capa protectora basada en epoxi o vinilo (Durabis).

Las micromatrices se pueden preparar en muy poco tiempo, siguiendo un procedimiento limpio y rápido que emplea solo agua como disolvente. La luz tiene una doble función, ya que cataliza tanto la polimerización de monómeros de acrilato-dextrano como la unión covalente de la sonda mediante un acoplamiento tior-acrilato.

Por ello, en primer lugar, el polímero de dextrano se modificó con grupos metacrilato para tener un fotopolímero (Dx-Ma) como se indica en la figura 3.21. Con este propósito, se utilizó una modificación de un protocolo descrito por van Dijk-Wolthuis *et al.*<sup>168</sup>; la incorporación del acrilato al dextrano se confirmó por RMN-<sup>1</sup>H, con la presencia de señales a 6,15 y 5,7 ppm, correspondientes al vinilo, y en 1,91 ppm, correspondientes al grupo metilo (Figura 3.22b). Además, el espectro de ATR-FTIR mostró la banda a 1728 cm<sup>-1</sup> correspondiente al estiramiento del grupo metacrilato (Figura 3.22a).



**Figura 3.21.** Síntesis del Dx-Ma a partir del polisacárido de dextrano con glicidil metacrilato (DMAP 4-dimetilamoniopiridina) en DMSO.



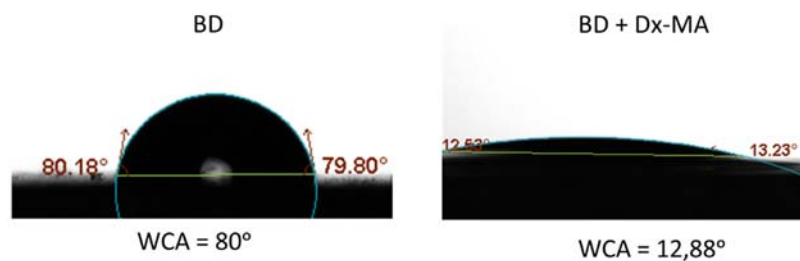
**Figura 3.22.** a) Comparación de los espectros de ATR-FTIR para el Dx y el Dx-Ma, la presencia de la banda  $1728\text{ cm}^{-1}$  revela el éxito de la reacción para incorporar el grupo metacrilato al polisacárido de dextrano. b) Comparación de los espectros de RMN- $^1\text{H}$  entre dextrano (abajo) y dextrano modificado con acrilato (arriba). La

presencia de grupos acrilato se verifica mediante las señales atribuidas (flechas negras) a los hidrógenos de tipo vinilo (6,15 y 5,7 ppm) y metilo (1,91 ppm).

Para la optimización de micromatrices de hidrogel sobre discos *Blu-ray* se tuvo en cuenta que la capa polimérica protectora externa de los discos BD está basada en resinas en base vinilo o epoxi (la composición varía según el fabricante). Por lo tanto, los grupos vinilo/epoxi restantes en la superficie permiten el anclaje a la superficie del hidrogel durante su reticulación. Además, como es una capa protectora anti-polvo y anti-arañazos, se observa baja señal de fondo cuando las proteínas u oligonucleótidos marcados con fluoróforo se incuban en la superficie. Esto indica que se produce una baja adsorción no específica en la superficie.

Tras su modificación, el Dx-Ma se disolvió en agua a diferentes relaciones peso/volumen (de 1:10 a 1:10<sup>8</sup>), y se imprimieron micromatrices en la superficie del BD, irradiando durante 40 s a 254 nm. Después de los lavados, se evaluó a simple vista la calidad de los puntos se inspeccionó a simple vista observando la homogeneidad y si se formaba el gel, pues en algunos casos al lavar las gotas desaparecen. Solo las micromatrices creadas con una relación de 1:10 eran visibles y con una uniformidad aceptable, por lo que se seleccionó esta relación para los experimentos siguientes. También se analizaron otros tampones acuosos en lugar de agua, como SSC 1× o PBS 1×, proporcionando resultados similares a los obtenidos con agua.

El ángulo de contacto en agua cambió de 80° para el BD sin modificar a aproximadamente 13° después de depositar el Dx-Ma (Figura 3.23).



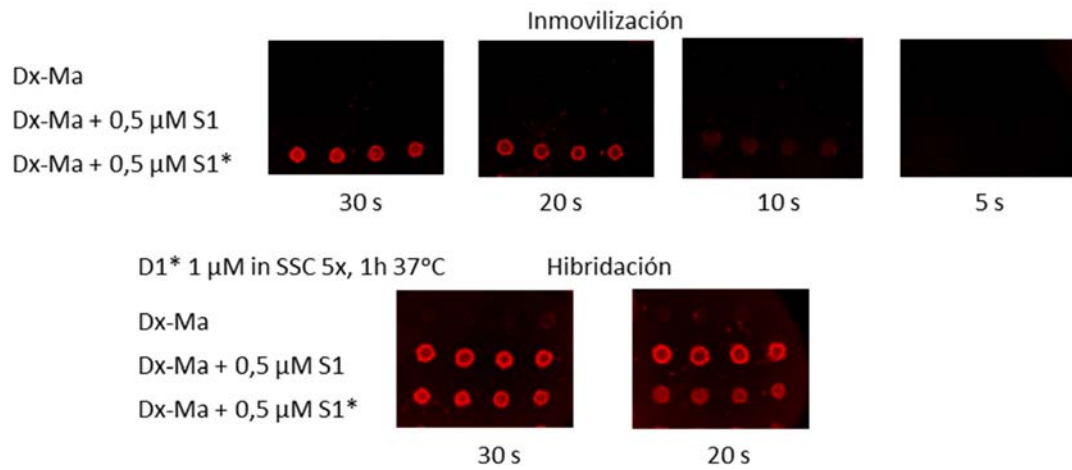
**Figura 3.23.** Comparación de la hidrofobicidad (WCA) de la superficie de BD original y modificada con Dx-Ma.

Una vez comprobadas las características del gel así como la hidrofilia de las superficies, se procedió a optimizar el tiempo de irradiación para la inmovilización de las sondas y a estudiar su capacidad de hibridación. Las sondas de ácidos nucleicos usadas son las que se detallan en la tabla 3.3. Para ello, diferentes micromatrices de Dx-Ma con la Sonda 1, la Sonda 1\* y la Diana 1\* fueron impresas sobre BD e irradiadas a tiempos entre 5 y 30 segundos, comprobando que a menor tiempo de irradiación la inmovilización presentaba peores resultados (Figura 3.24). En estos ensayos se ve como disminuye la señal de fluorescencia a medida que disminuye el tiempo de irradiación, así como aumenta la heterogeneidad de los puntos depositados en la superficie. Por otro lado, los ensayos de hibridación se realizaron inmovilizando la Sonda 1 e hibridando con la Diana 1\* y mostraron que a tiempo inferior a 20 s no se observaba señal, obteniéndose el mejor resultado a 30 s.

**Tabla 3.3.** Denominación y secuencia de los diferentes oligonucleótidos usados.

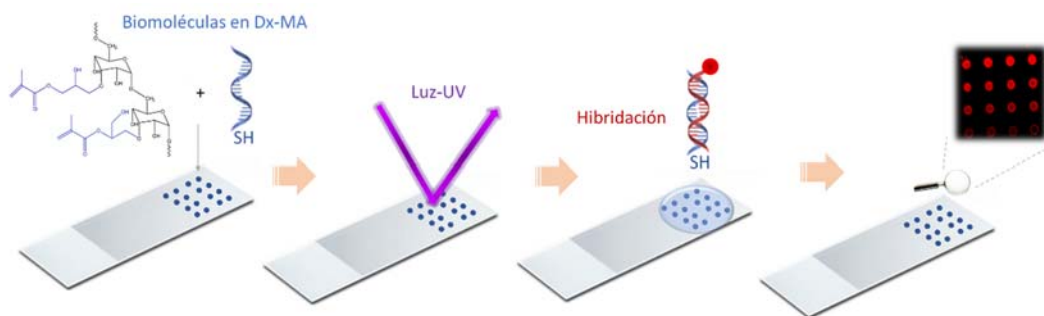
Denominación	Secuencia (5'- 3')
S1	SH-(T) <sub>15</sub> -CCCGATTGACCAGCTAGCATT
S1*	SH-(T) <sub>15</sub> -CCCGATTGACCAGCTAGCATT-Cy5
S2 <sup>b</sup>	H <sub>2</sub> N-C <sub>7</sub> -(T) <sub>15</sub> CCCGATTGATTAGCTAGCATT
S2 * <sup>b</sup>	Cy5- TTACGATCGATTAGTTAGCCC(T) <sub>15</sub> -C <sub>7</sub> - NH <sub>2</sub>
S3	SH-ATTCACCTCAACATCAGTCTGGTAAGCTAGTGAAT
S4	SH-ATCGACAAGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAAAGTCGAT
D1*	Cy5-AATGCTAGCTGGTCAATCGGG
miRNA-182*	Cy5-UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU

<sup>a</sup>S significa sonda y D para oligonucleótidos diana. \* indica que la secuencia está marcada con un fluoróforo (Cy5). BTN significa biotina. <sup>b</sup> Para comparar en los portaobjetos comerciales 2D-Epoxy, la Sonda 2 tenía un grupo amino en lugar de un grupo tiol, al que nos referimos como una "Sonda 2 aminada".



**Figura 3.24.** Resultado de los ensayos de optimización del tiempo de irradiación ( $\lambda=254\text{nm}$ ) sobre BD, inmovilizando la Sonda 1\*, y luego hibridando con la Diana 1\* para comprobar que la Sonda 1 sin marcar estaba inmovilizada.

En la figura 3.25 se ilustra el proceso descrito anteriormente para la inmovilización de la matriz y posterior hibridación. Las diferentes etapas consisten en: deposición de la disolución del Dx-Ma con los oligonucleótidos sobre la superficie deseada; fotopolimerización del gel y lavado. Las etapas finales son la incubación con la disolución de hibridación, lavado, y el registro de la señal de fluorescencia.

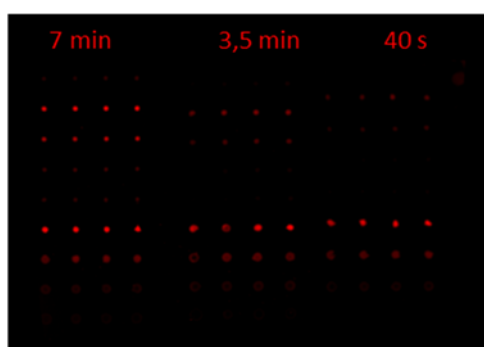


**Figura 3.25.** Esquema general de un ensayo de hibridación en el gel de dextrano.

Después de asegurar la formación correcta y reproducible del hidrogel Dx-Ma, se estudió con más detalle la coinmovilización de los ácidos nucleicos mientras se formaba el hidrogel. Se planteó la hipótesis de que las sondas de oligonucleótidos

que contienen el grupo tiol resultarían unidas covalentemente al hidrogel por medio de una adición de Michael entre el tiol de la sonda y el doble enlace del grupo acrilato. Para demostrarlo, se preparó una micromatriz sobre BD y se irradiaron Sondas 1\* a concentraciones crecientes (de 0,1 a 0,0125  $\mu\text{M}$ ) marcada en el extremo 5' con tiol y en el extremo 3' con Cy5, en Dx-Ma 1:10 a diferentes tiempos (40 s, 1 min, 3,5 min y 7 min). Paralelamente, se prepararon varias micromatrices con la Diana 1\* (no tiolada) en las mismas concentraciones que la Sonda 1\*. Después de lavar abundantemente con agua, se registró y cuantificó la fluorescencia. Para 40 s de irradiación, la fluorescencia solo se detectó en el caso de la Sonda 1\*, lo que demuestra el papel clave del grupo tiol en la inmovilización de la sonda. Para tiempos de irradiación más largos, la Diana 1\* también quedó atrapada dentro del hidrogel, probablemente debido a un alto grado de reticulación del polímero que impide la salida del oligonucleótido (Figura 3.26).

1. Dx-Ma
2. Dx-Ma + Diana 1\* 0,1 $\mu\text{M}$
3. Dx-Ma + Diana 1\* 0,05 $\mu\text{M}$
4. Dx-Ma + Diana 1\* 0,025 $\mu\text{M}$
5. Dx-Ma + Diana 1\* 0,012 $\mu\text{M}$
6. Dx-Ma + Sonda 1\* 0,1 $\mu\text{M}$
7. Dx-Ma + Sonda 1\* 0,05 $\mu\text{M}$
8. Dx-Ma + Sonda 1\* 0,025 $\mu\text{M}$
9. Dx-Ma + Sonda 1\* 0,012 $\mu\text{M}$



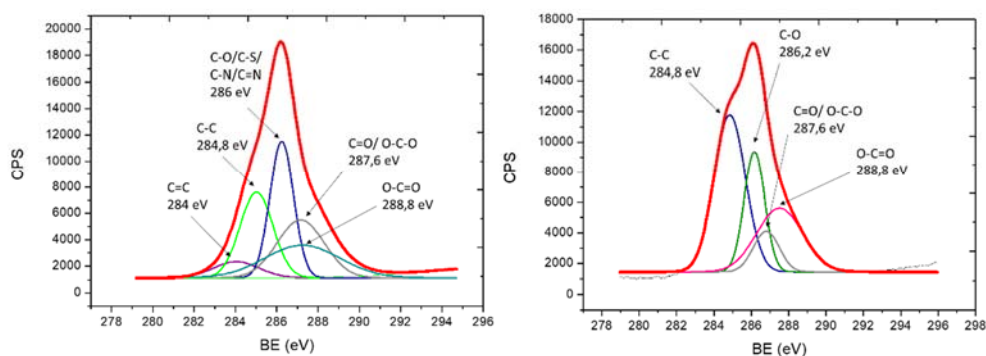
**Figura 3.26.** Imágenes de fluorescencia de micromatrices de Dx-Ma irradiadas a distintos tiempos 7 min, 3,5 min y 40 s en presencia de Diana 1\* o Sonda 1\*, a diferentes concentraciones. Para la irradiación de 40 s, solamente la Sonda 1\*, que lleva el grupo tiol, resulta inmovilizada en la micromatriz.

Por otro lado, se ensayaron diferentes tampones para la inmovilización como tampón carbonato (TC) y PBS 1x, además de agua. Sin embargo, no se produjo ninguna mejora significativa, así que el agua se estableció como el disolvente para la preparación de micromatrices de Dx-Ma. Además, se analizaron tiempos de irradiación entre 5 s y 30 s. Como se observa en la figura 3.24 el hidrogel permaneció unido a la superficie a partir de 20 s de irradiación, aunque la señal óptima se obtenía a 30 s a tiempos largos.

El análisis mediante espectroscopia fotoelectrónica de Rayos X (XPS) demostró la inmovilización exitosa de la Sonda 1\*. Por un lado, el porcentaje de cada elemento en la superficie que tiene Dx-Ma con sonda mostró la presencia de átomos de S y N, que no aparecieron cuando la muestra era solo de Dx-Ma (Tabla 3.4). Por otra parte, la deconvolución del pico del 1s de C indicó la presencia de enlaces C = C, y los enlaces C-N y C-S a 284 y 284,6 eV, respectivamente, atribuibles a la estructura del oligonucleótido (Figura 3.27).

**Tabla 3.4.** Porcentaje atómico proporcionado por XPS de muestras depositadas en BD para Dx-Ma y para Dx-Ma + Sonda 1\* (nd no detectado).

Cuantificación (Atómica %)	O 1s	C 1s	Si 2p	N 1s	S 2p
Dx-Ma	35,6	63,7	0,7	nd	nd
Dx-Ma + Sonda 1*	38,6	60,5	nd	0,6	0,3



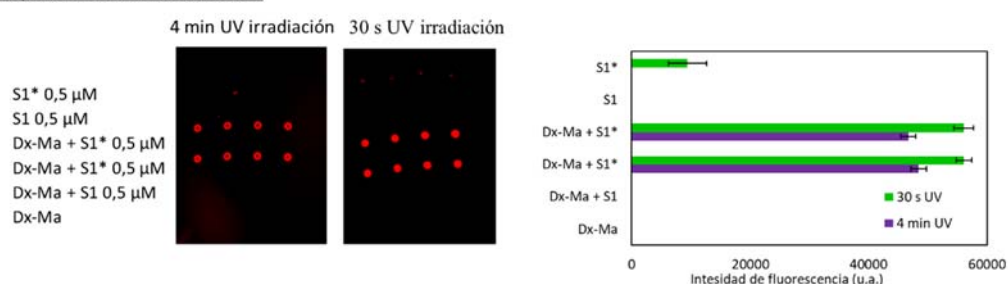
**Figura 3.27.** Deconvolución del pico de C 1s para los espectros XPS de muestras depositadas en BD para Dx-Ma (izquierda) y para Dx-Ma + Sonda 1\* (derecha). La contribución de los enlaces C-S, C-N y C = N se atribuye a la presencia de oligonucleótido.

Teniendo en cuenta que la capa protectora en la parte superior de BD tiene grupos vinilo o epoxi, las sondas tioladas pueden ser directamente inmovilizadas en 2D mediante reacciones de acoplamiento de tiol-eno y tiol-epoxi<sup>149, 166</sup>. Por lo tanto, se realizó una comparación entre la unión directa y la inmovilización a través del

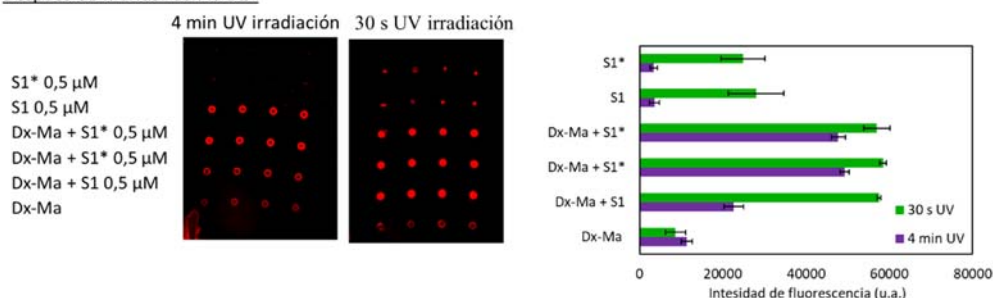


hidrogel de Dx-Ma (Figura 3.28). Para ello, se preparó una micromatriz con la Sonda 1\* y la Sonda 1 a 0,5  $\mu\text{M}$  tanto en Dx-Ma 1:10 como directamente sobre la superficie de BD. Las sondas impresas se irradiaron durante 30 segundos y, después del lavado con agua y se hibridaron con la Diana 1\* (1  $\mu\text{M}$  en SSC 5x). El mismo experimento también se realizó irradiando durante 4 minutos para facilitar la unión de la sonda directamente sobre la superficie sin Dx-Ma. Como se puede ver en la figura 3.28, el hidrogel Dx-Ma aumentó la cantidad de sonda inmovilizada y, también, la hibridación. En los ensayos de optimización del tiempo de irradiación se observó que al aumentar el tiempo los puntos de hidrogel presentaban peor calidad, debido al efecto “gota de café”, que puede apreciarse en las imágenes de las micromatrices de la figura 3.28. Además, se produjo el fotoblanqueo de la Sonda 1\* cuando se imprimió sin Dx-Ma.

Después de inmovilizar las sondas



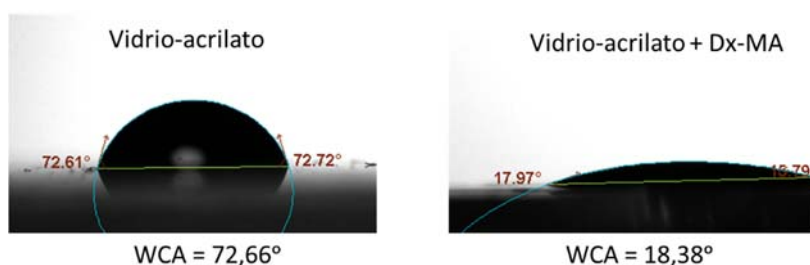
Después de hidridar con la D1\*



**Figura 3.28.** Comparación de los ensayos de la hibridación con la Diana 1\* por la Sonda 1 inmovilizada a través de Dx-Ma o directamente sobre la superficie de BD. Tanto la inmovilización de la Sonda 1 como la hibridación con la Diana 1\* proporcionan una intensidad de fluorescencia mucho mayor para la inmovilización a través de Dx-Ma.

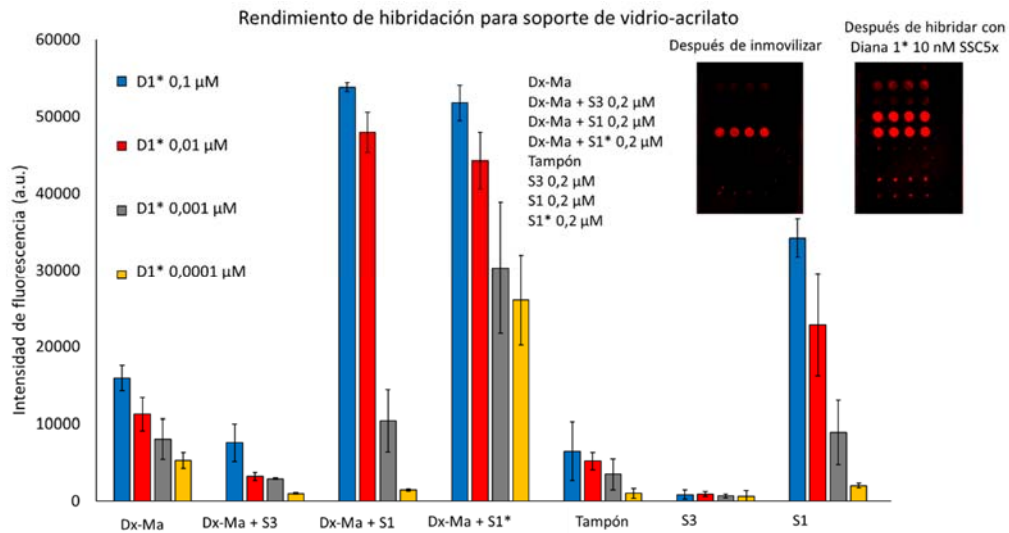
Al analizar y comprar las señales de fluorescencia obtenidas al usar el hidrogel, se observó que la señal de hibridación fue 3 veces mayor para la Sonda 1 inmovilizada a través de Dx-Ma en comparación con la inmovilización directa. También, este ensayo dio lugar a señales ligeramente más altas para el caso de irradiaciones de 30 s que durante 4 min (Figura 3.28). Con el objetivo de ampliar la comparativa, también se trabajó en otra superficie de vidrio-acrilato, para ello el vidrio sin tratar se funcionalizó con acrilato. Primero, la superficie se activa con luz UV y a continuación se sumerge en una disolución al 10% del organosilano (3-trimetoxisilil propilmetacrilato), luego se cura durante 30 min a 120 °C. Ensayos similares a estos se realizaron en la superficie de BD.

También, se empleó vidrio funcionalizado con grupos acrilato para llevar a cabo ensayos con Dx-Ma. Para el vidrio-acrilato (v-A) el ángulo de contacto cambió de 73° a 18° aproximadamente cuando la superficie tenía Dx-Ma (Figura 3.29).



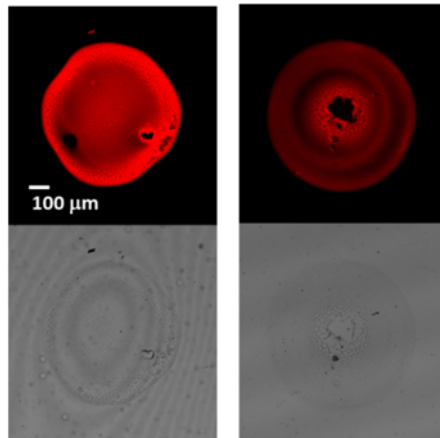
**Figura 3.29.** Variación de ángulo de contacto (WCA) para el vidrio-acrilato y tras la deposición de Dx-Ma.

A continuación, se llevaron a cabo ensayos de hibridación usando el gel de Dx-Ma comparando con la inmovilización directa en superficies de vidrio-acrilato (Figura 3.30). En estos ensayos se inmovilizó la Sonda 3 (no complementaria a D1\*), la Sonda 1 y la Sonda 1\* (0,2  $\mu\text{M}$ ) tanto usando el hidrogel (3D) como de forma directa (2D). Se observa que la Sonda 1\* en el hidrogel se ha inmovilizado mejor que sin usar el gel. Después, se llevó a cabo la hibridación con la Diana 1\* (0,1 – 0,0001  $\mu\text{M}$ ) observando que esta metodología mejora la hibridación.



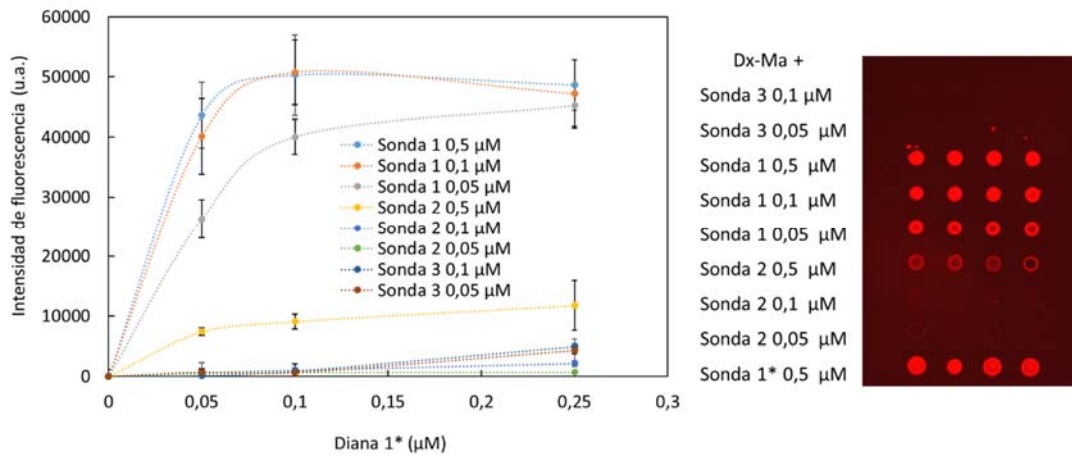
**Figura 3.30.** Rendimiento de hibridación sobre superficie de vidrio funcionalizada con grupos acrilato, comparación de la inmovilización de la sonda en el gel y directamente en la superficie y su capacidad para hibridar específicamente.

Como en los apartados anteriores, el hidrogel de dextrano se analizó mediante microscopía confocal de fluorescencia comparando el hidrogel en las dos superficies, BD y vidrio funcionalizado con acrilato, tras la hibridación con la Diana 1\*. En ambas superficies la señal de fluorescencia es buena, así como la homogeneidad del punto, pero al polimerizar el Dx-Ma en superficie de BD la señal es más intensa y presenta menos defectos (Figura 3.31).



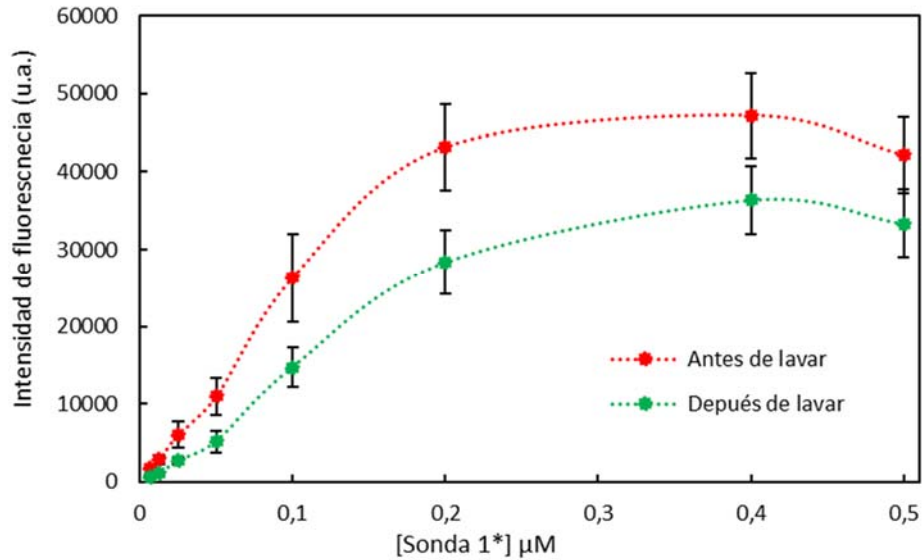
**Figura 3.31.** Comparación de resultados de ensayos de hibridación, inmovilizando la Sonda 1 a  $0,4 \mu\text{M}$  e hibridando con la Diana  $1^*$  a  $0,1 \mu\text{M}$  sobre BD (izquierda) y vidrio funcionalizado con acrilato (derecha).

Para demostrar la especificidad y sensibilidad resultantes de la etapa de anclaje covalente y posterior hibridación, se preparó una micromatriz sobre BD en la que se inmovilizaron la Sonda 1 y la Sonda 2, a varias concentraciones ( $0,5$ ,  $0,1$  y  $0,05 \mu\text{M}$ ). Ambas sondas tienen la secuencia complementaria de la Diana  $1^*$ , pero la Sonda 2 contiene un grupo amina en el extremo 5' en lugar de un grupo tiol. También se incluyó en la matriz una sonda tiolada en 5' con una secuencia no complementaria a la Diana  $1^*$ , la Sonda 3, y el control de inmovilización positivo, la Sonda  $1^*$  (ver tabla 3.3). Después de la inmovilización, se realizó la hibridación con la Diana  $1^*$  en SSC 5x a concentraciones decrecientes ( $0,25$ ,  $0,1$  y  $0,05 \mu\text{M}$ ), registrándose las señales obtenidas. Como puede verse en la figura 3.32, solo las filas que contienen la Sonda 1 proporcionaron una fluorescencia significativa, que se correlacionó con la concentración de la Diana  $1^*$ . Por lo tanto, este experimento demostró, que la inmovilización de la sonda requiere del tiol y, por otra parte, la especificidad de la hibridación.



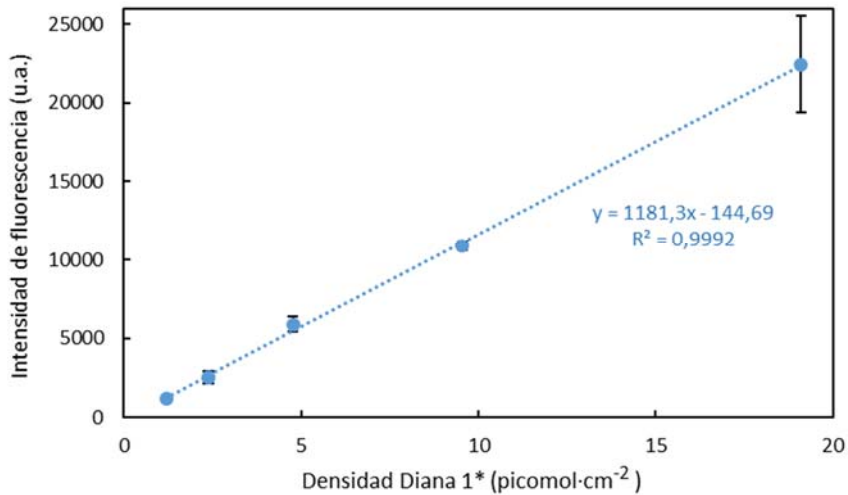
**Figura 3.32.** Comparación de la intensidad de fluorescencia obtenida para concentraciones crecientes de la Diana 1\* en micromatrices a través de Dx-Ma. Las sondas inmovilizadas son: una hebra complementaria tiolada (Sonda 1), una hebra complementaria aminada (Sonda 2) y una hebra no complementaria tiolada (Sonda 3).

La cantidad de sonda inmovilizada se determinó midiendo la fluorescencia de una micromatriz irradiada de Sonda 1\* antes y después del lavado. Al considerar el volumen depositado, 30 nL, y el diámetro del punto, 180 µm, las densidades de inmovilización variaron desde 0,28 picomol/cm<sup>2</sup>, a 46 picomol/cm<sup>2</sup>, para concentración de Sonda 1\* 6,25 nM y 0,5 µM respectivamente. Estos resultados mejoran sensiblemente los obtenidos en un trabajo anterior en que la misma sonda tiolada se inmovilizaba en superficies 2D ya que, aunque las sensibilidades de inmovilización son similares, la incorporación del dextrano aumenta la hidrofilia lo que incrementa claramente los rendimientos de hibridación sonda-diana (Figura 3.33). En la figura 3.33 se muestran las intensidades para distintas concentraciones antes y después de lavar, frente a la concentración de Sonda 1\*.



**Figura 3.33.** Intensidad de la fluorescencia antes y después de los lavados en una micromatriz Dx-Ma de Sonda 1\*.

Para calcular la densidad de hibridación se realizó una curva de calibrado de Diana 1\*. Para ello se depositaron distintas concentraciones de la Diana 1\* en MPC, y se tuvo en cuenta el diámetro de la gota depositada. Así, se estableció una relación entre la intensidad de fluorescencia y la densidad de la Diana 1\* (Figura 3.34). A continuación, en los estudios de hibridación se empleó la Sonda 1 sin marcar y tras hibridar con diferentes concentraciones de la Diana 1\*, se pudo calcular su densidad. La eficiencia de hibridación se calculó al referir la densidad de la diana a la densidad de la sonda inmovilizada, determinada antes para 0,2 µM de la Sonda 1\*. El rendimiento de hibridación osciló entre el 9%, para 50 nM de la Diana 1\*, y el 98%, para 0,5 µM de la Diana 1\*. Una vez más, este resultado se comparó favorablemente con el obtenido con las superficies 2D, donde el rendimiento de hibridación máximo fue del 70%, y sólo cuando se inmovilizaron 5 µM de sonda. En la Tabla 3.5, se muestran los rendimientos de hibridación para cada concentración de la Diana 1\*.

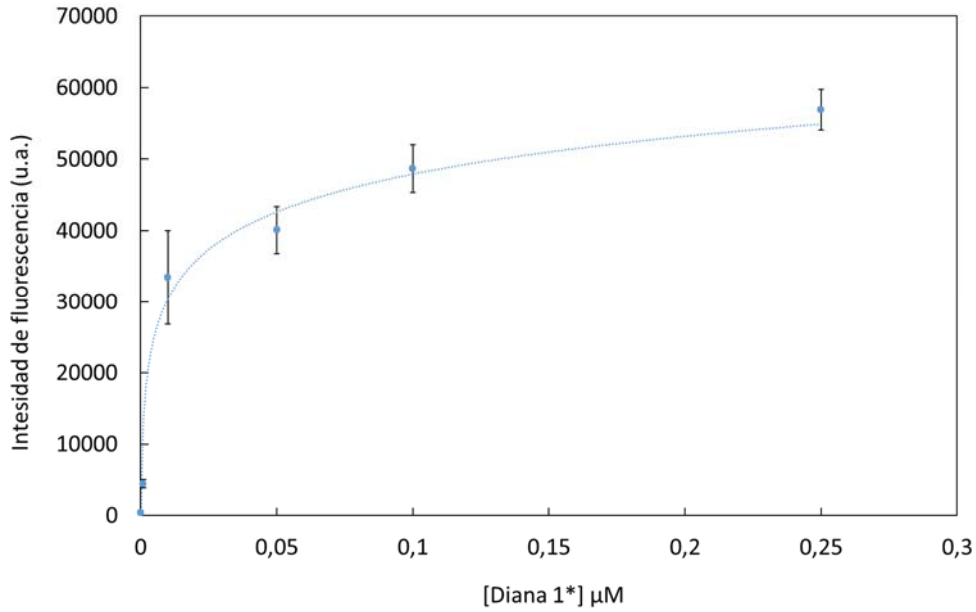


**Figura 3.34.** Gráfico de calibración para la Diana 1 \* empleado para determinar la cantidad de Diana hibridada en las micromatrices de la Sonda 1.

**Tabla 3.5.** Rendimientos de hibridación obtenidos para micromatrices de Sonda 1 0,2  $\mu\text{M}$  e hibridado a distintas concentraciones de Diana 1 \*.

[Diana 1*]-( $\mu\text{M}$ )	Interpolación la gráfica de calibrado (picomol/cm <sup>2</sup> )	Densidad de la Sonda 1 (0,2 $\mu\text{M}$ impresa) (picomol/cm <sup>2</sup> )	Rendimiento de hibridación (%)	S/R (F-B/ $\sigma_B$ )
0,5	20,06	20,57	98	494,2
0,1	10,4	20,57	50	67,4
0,05	1,93	20,57	9	20,9

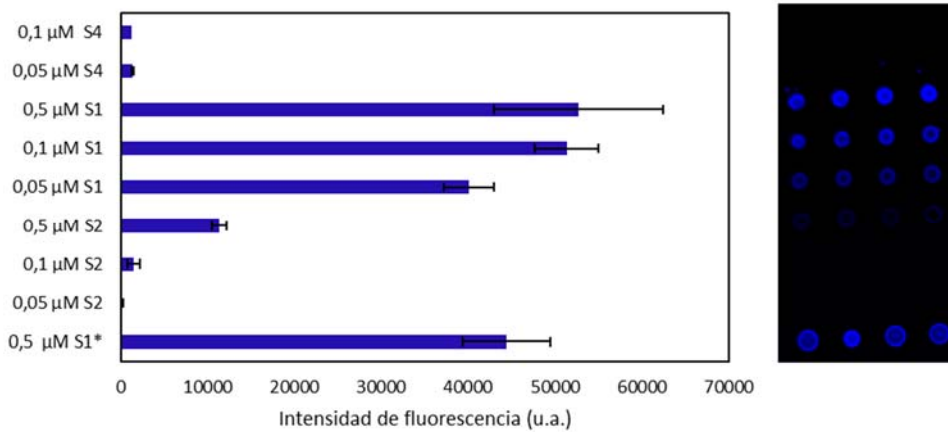
Para determinar la sensibilidad alcanzada por el hidrogel desarrollado, se crearon nuevas micromatrices sobre BD donde se inmovilizó la Sonda 1 a diferentes concentraciones (0,1, 0,2 y 0,4  $\mu\text{M}$ ) y se llevó a cabo la hibridación con la Diana 1 \*, de 0,0001 a 0,1  $\mu\text{M}$  en SSC 5x, como se describe anteriormente (Figura 3.35).



**Figura 3.35.** Curva de hibridación de Diana 1\* para micromatrices con la Sonda 1 a 0,1  $\mu\text{M}$ .

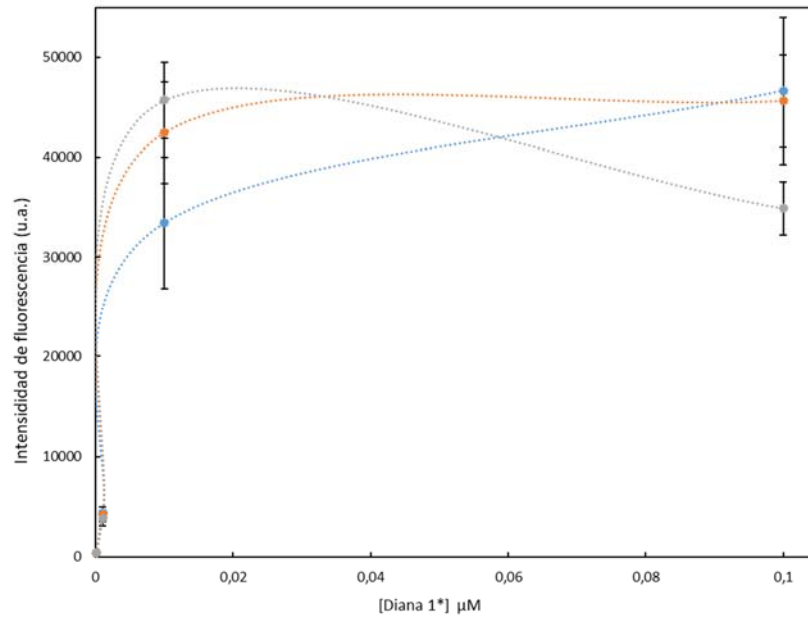
También se llevaron a cabo ensayos inmovilizando sondas con distintos grupos funcionales ( $\text{NH}_2$  y  $\text{SH}$ ). Estos ensayos de hibridación fueron llevados a cabo con las sondas 1, 2 y 4 (Tabla 3.3), las cuales se coinmovilizaron durante la formación del hidrogel y se incubaron con la Diana 1\*. Las condiciones fueron optimizadas durante los ensayos de inmovilización, dichas condiciones fueron 40 s de irradiación UV y diferentes etapas de lavado para eliminar las sondas no unidas covalentemente al hidrogel. La hibridación se llevó a cabo durante 1 hora a 37 °C en ambiente húmedo saturado, después de todas las etapas de lavado, se registró y cuantificó la fluorescencia. Se analizaron concentraciones de Sonda 1 de 0,5 a 0,003  $\mu\text{M}$ . El hidrogel pudo llevar a cabo hibridación con la cantidad de Sonda 1 más baja inmovilizada a 0,003  $\mu\text{M}$ , que se compara bien con los datos reportados previamente. Tras probar que solo se inmovilizó el oligonucleótido con el grupo tiol (Figura 3.36), las señales de hibridación obtenidas tenían valores cercanos a la saturación con la Sonda 1\* coinmovilizada.





**Figura 3.36.** Resultados de un ensayo de hibridación sobre micromatriz de Dx-Ma en BD comparando las sondas tioladas (0,1-0,05  $\mu\text{M}$  de Sonda 1 y Sonda 4 no complementaria y 0,5-0,05  $\mu\text{M}$  Sonda 2 aminada) con las sondas aminadas.

Las intensidades de fluorescencia obtenidas fueron similares para las diferentes concentraciones de la Sonda 1, mostrando un rendimiento muy bueno incluso para la concentración más baja de sonda. El rango lineal estuvo comprendido entre 0,01  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , que es un intervalo amplio, logrado incluso para las concentraciones más altas de la Sonda 1. Una comparación entre la intensidad de fluorescencia obtenida para las diferentes concentraciones de la Sonda 1 se puede ver en las figuras 3.36 y 3.37. El límite de detección se calculó como la concentración que proporciona la señal del blanco más tres veces su desviación estándar, siendo 85  $\mu\text{M}$ , que se compara muy bien con las sensibilidades previamente informadas mediante el uso de sondas análogas y diferentes formas de anclaje<sup>149, 165, 166, 169, 170</sup>. El valor alcanzado está limitado por la sensibilidad del dispositivo de lectura; sin embargo, se podría alcanzar un LOD inferior utilizando un detector de fluorescencia más sensible.



**Figura 3.37.** Curvas de hibridación para diferentes concentraciones de la Sonda 1 y su intervalo lineal.

La reproducibilidad de los ensayos en micromatrices se evaluó mediante la hibridación de 10 portaobjetos con 4x4 puntos de la Sonda 1 (0,1  $\mu\text{M}$ ) con la Diana 1\* (0,25  $\mu\text{M}$ ). El coeficiente de variación de las medias intrachip fue 10% mientras que interchips fue del 14%.

El enfoque propuesto anteriormente puede emplearse sobre otras superficies que contengan grupos acrilato, alqueno o tiol que puedan reaccionar con el Dx-Ma para formar el hidrogel en la superficie, como se demostró en la discusión previa.

El límite de detección calculado para esta superficie fue de 92 pM, muy similar al observado para las superficies BD. Una comparación entre los resultados de hibridación obtenidos en las superficies de vidrio modificado con acrilato inmovilizando las sondas en Dx-Ma y directamente a la superficie, muestra que usar el gel es una estrategia mejor para la inmovilización de las sondas.

Por todo ello, se demuestra la versatilidad del enfoque desarrollado, que sirve para inmovilizar de forma efectiva cualquier sonda tiolada en superficies modificadas mediante alquenos, tioles o acrilatos.

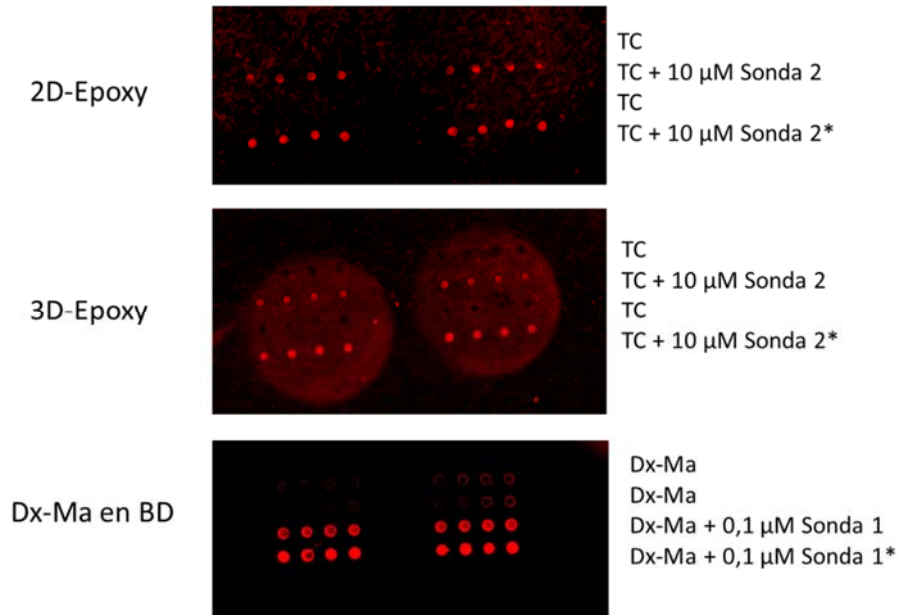
El rendimiento de inmovilización de la sonda y la capacidad de hibridación se compararon con otras superficies de referencia empleadas para realizar ensayos con micromatrices. Para ello, se estudiaron superficies de vidrio 2D-Epoxy y 3D-Epoxy de un proveedor comercial (PolyAn GmbH). Estos soportes se comercializan para inmovilizar sondas a través de sus grupos amino. Así, las micromatrices de la Sonda 2 aminada se crearon siguiendo los protocolos del proveedor. Luego, las micromatrices se hibridaron con Diana 1\* y se compararon con nuestra micromatriz Dx-Ma sobre BD mediante la verificación de varios parámetros, como el tiempo de inmovilización, la señal de inmovilización e hibridación, el tiempo total de análisis y la duración de la etapa de bloqueo. La comparación de resultados se recoge en la Tabla 3.6.

**Tabla 3.6.** Comparación de resultados de hibridación obtenidos con soporte 2D y 3D vidrio-epoxi y BD Dx-Ma.

Superficie	$\mu\text{M}$ [Sonda]	Tiempo de inmovilización	Bloqueo	Señal de inmovilización (S1*)	Señal de hibridación (D 1* 0,25 $\mu\text{M}$ )	S/R	Tiempo total del ensayo
2D-Epoxy	10 (S2)	Toda la noche	50 mM etanolamina 60 min	10939 $\pm$ 680	8582 $\pm$ 1387	30,5	26 h
3D-Epoxy	10 (S2)	Toda la noche	50 mM etanolamina 60 min	19687,0 $\pm$ 1789,3	10875 $\pm$ 965	52	26 h
BD Dx-Ma	0,5 (S1)	40 s	no	25518 $\pm$ 3810	19009 $\pm$ 3040	397	3 h
BD Dx-Ma	0,1 (S1)	40 s	no	10925,7 $\pm$ 400	17215 $\pm$ 1658	180	3 h

De la comparativa concluimos que nuestro enfoque ofrece una mayor señal de inmovilización e hibridación que los soportes comerciales estudiados, y el tiempo para preparar y ejecutar el ensayo es significativamente más corto. Además, no se

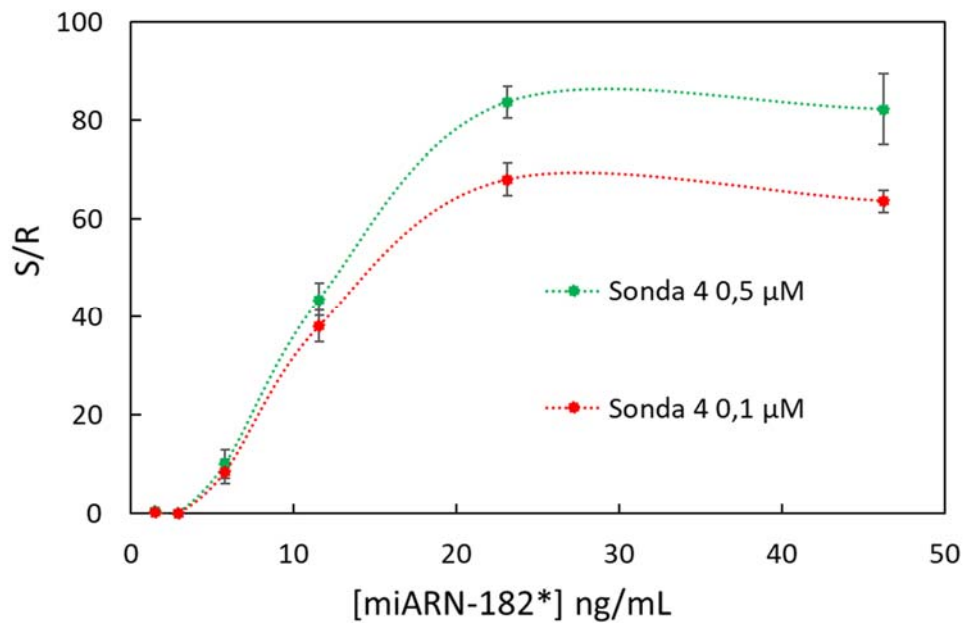
necesita bloqueo y la cantidad de sonda necesaria es 100 veces menor para lograr señales de fluorescencia similares. Por el contrario, la desviación estándar (reproducibilidad) en los datos es peor que en los soportes comerciales, lo que podría ser un aspecto a mejorar en futuros desarrollos. No obstante, la desviación obtenida en los valores de fluorescencia para Dx-Ma es aceptable si se considera la sensibilidad alcanzada y el equipo de media utilizado. En la figura 3.38 se compara la imagen de fluorescencia de las tres superficies tras irradiar la micromatriz.



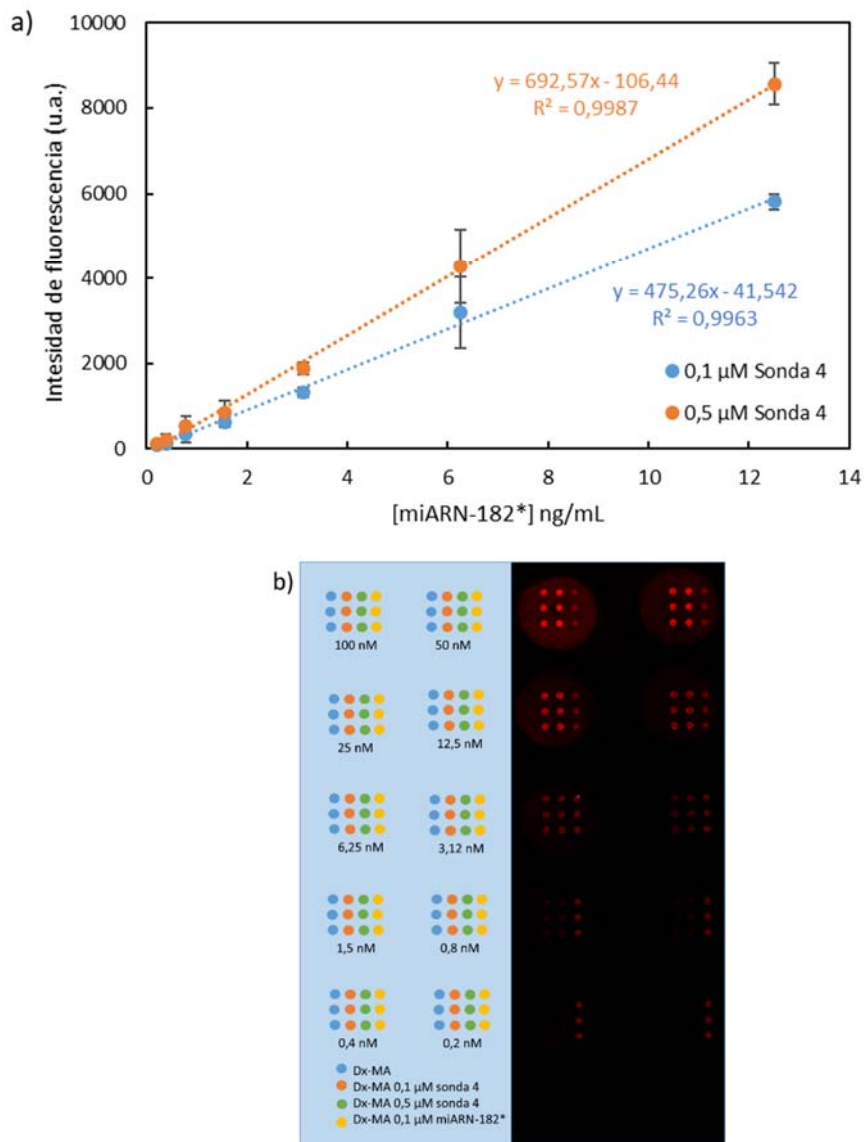
**Figura 3.38.** Imagen de micromatriz de fluorescencia para las superficies epoxy 2D y 3D comerciales y nuestro soporte BD Dx-Ma.

Como demostración del potencial de nuestra aproximación, el hidrogel de Dx-Ma se utilizó para detectar miARN-182, el cual se sobreexpresa en pacientes con cáncer de próstata y puede proporcionar información para el pronóstico<sup>171</sup>. Para ello, se prepararon chips de vidrio-acrilato y micromatriz de Dx-Ma con la sonda específica para miARN-182 tiolada (Sonda 4) a 0,1  $\mu$ M y 0,5  $\mu$ M. La hibridación se realizó con concentraciones decrecientes de miARN-182\* marcado con Cy5. En el caso de demostrador se usó para la lectura de la fluorescencia un escáner confocal de fluorescencia para micromatrices (*Axon 4400A Microarray Scanner de Molecular Devices*). Como se observa en la figura 3.39 hay buena correlación entre la intensidad

de señal proporcionada por la micromatriz y la cantidad de diana. El límite de detección fue 2,92 ng/mL siendo menor que los ensayos realizados por López-Guerrero *et al.* en donde fue del orden de  $\mu\text{g/mL}$ <sup>171</sup> (Figura 3.40).



**Figura 3.39.** Gráfico de hibridación, relación S/R obtenida tras la hibridación de micromatrices de Dx-Ma creados en un portaobjeto de vidrio-acrilato con la Sonda 4 (0,1 y 0,5  $\mu\text{M}$ ), específica para miARN-182 y posterior hibridación con miARN-182\* en SSC 5x.

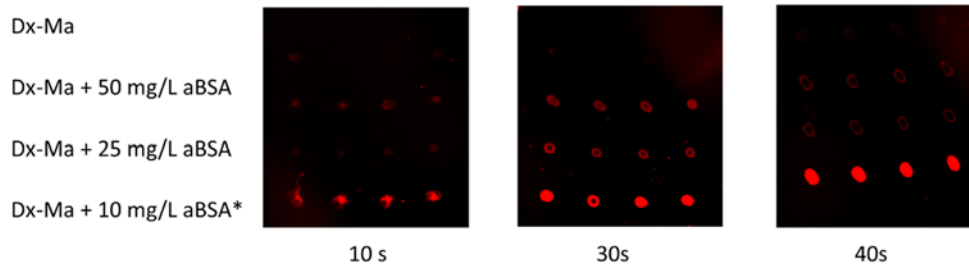


**Figura 3.40.** a) Representación del rango lineal para las gráficas de hibridación con concentraciones 0,1 y 0,5 μM de Sonda 4. b) Imágenes de las señales de fluorescencia obtenidas con diferentes concentraciones (100-0,2 nM) de miARN-182\*.

### 3.2.1 Estudios de inmovilización de anticuerpos y ensayos de inmunorreconocimiento

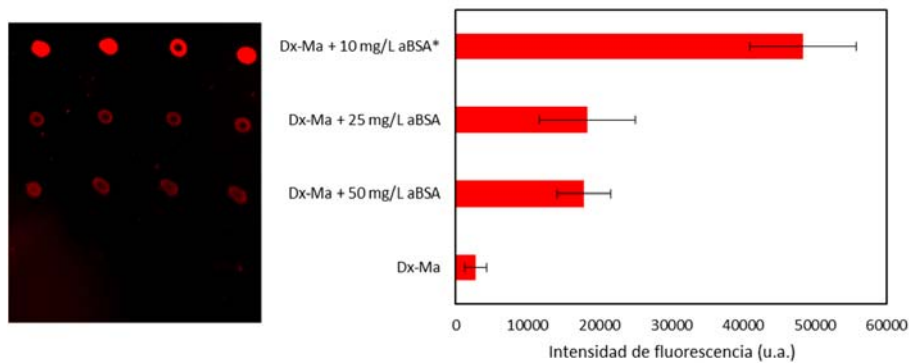
Como los ensayos de hibridación anteriores presentaban buenas prestaciones se pensó en aplicar el hidrogel con otro tipo de biomoléculas, concretamente anticuerpos. En este caso, cuando el hidrogel se forma a partir del monómero de acrilato, la disolución del monómero se prepara conteniendo la sonda del anticuerpo para provocar su unión covalente a algunos de los monómeros, a través de la reacción de tiol-acrilato, simultáneamente a la formación de hidrogel. Primero, se probó y optimizó la inmovilización, de modo que el hidrogel se preparó con diferentes concentraciones de anticuerpo marcado con el fluoróforo Alexa647, como en casos anteriores se trabajó con el par BSA/antiBSA policlonal de conejo. Así, para el estudio del sistema modelo BSA/aBSA, primeramente, se optimizó la inmovilización de aBSA marcado (aBSA\*) e incluso BSA\*. Para optimizar el inmunoensayo, se estudió la influencia de varios parámetros (tiempo de inmovilización o pH) para evitar la desnaturalización de los paratopos o zonas de reconocimiento de los anticuerpos en la inmovilización del hidrogel. El Dx-Ma se disolvió en PBS 1x, H<sub>2</sub>O y en tampón carbonato (TC); así, las señales de fluorescencia más altas se obtuvieron en PBS 1x. Además, se probaron diferentes tiempos de irradiación (3-420 s), y se observó que reduciendo el tiempo de irradiación se obtenía un mejor resultado. El tiempo de irradiación mínimo necesario para alcanzar una calidad óptima fue de 30 s. Tiempos inferiores a 10 s provocan que los puntos sean irregulares o no que se formara el gel, debido a que la polimerización no tiene lugar.

Una vez se optimizó la etapa de inmovilización se pusieron a punto procedió a realizar los inmunoensayos. Se inmovilizaron diferentes concentraciones de aBSA no marcado (0-50 mg/L) en las micromatrices creadas con Dx-Ma y se incubaron con BSA\* (0-10 mg/L) en PBST durante 30 min a t.a. Como se mencionó anteriormente, en este ensayo se optimizó el tiempo de irradiación, observando que la mejor señal de reconocimiento tenía lugar cuando el hidrogel era irradiado durante 30 s (Figura 3.41). Esto es debido a que la radiación UV destruye los sitios de reconocimiento y por eso las señales de fluorescencia son menores. También, se observa que los puntos no son homogéneos a tiempos de irradiación bajos.



**Figura 3.41.** Micromatrices de Dx-Ma con aBSA inmovilizada (0-50 mg/L) y reconocimiento con BSA\* a 10 mg/mL a distintos tiempos de irradiación UV (10, 30 y 40 s) en BD.

Los inmunoensayos permitieron establecer la cantidad mínima detectada que fue de 0,08 mg/L de BSA\*, estos resultados mejoraron significativamente los obtenidos usando la metodología convencional de inmovilización 2D. Además, pudimos observar que el hidrogel preparado es estable almacenado en nevera durante 15 días e incluso durante 1 mes, aunque en este caso la señal obtenida disminuyó ligeramente. La viabilidad de la micromatriz se comprobó tanto en superficies de BD como de vidrio, funcionalizadas con grupos acrilato, de manera análoga a la descrita anteriormente. Las señales de fluorescencia tienen homogeneidad en la superficie de BD, pero son más irregulares en el caso de vidrio-acrilato (anillo de café).



**Figura 3.42.** Micromatriz de Dx-Ma con aBSA inmovilizada y reconocimiento con BSA\* a 10 mg/mL en BD.



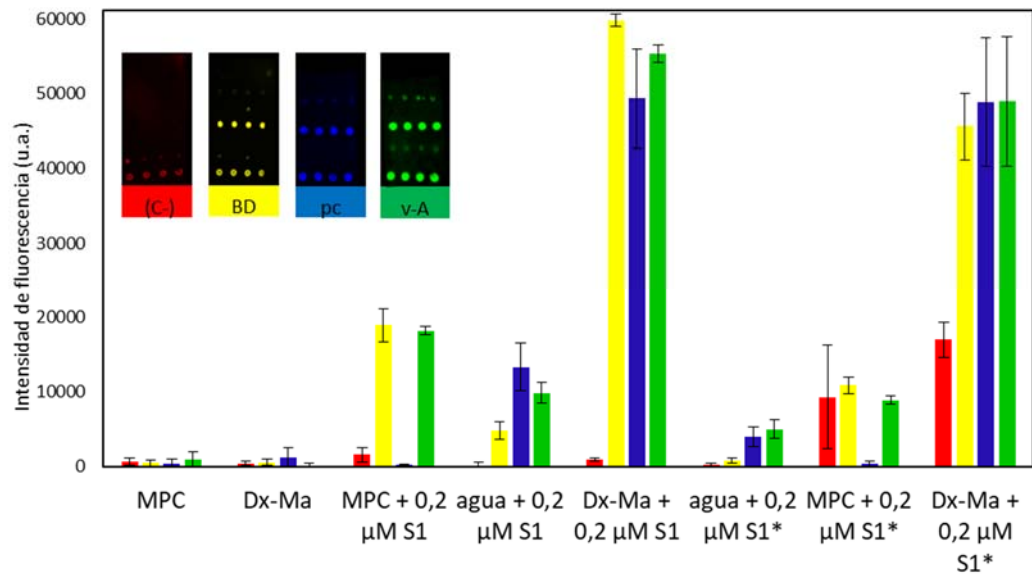
En comparación con el ensayo de inmunoreconocimiento basado en adsorción convencional, el uso de un hidrogel, como se esperaba, proporcionó una intensidad de fluorescencia 10 veces superior.

Por todo ello, queda demostrado que este hidrogel puede ser aplicado en inmunoensayos con potencial para usarse con proteínas diferentes a las ensayadas en este apartado.

### 3.3 Comparación de las prestaciones de diferentes hidrogeles

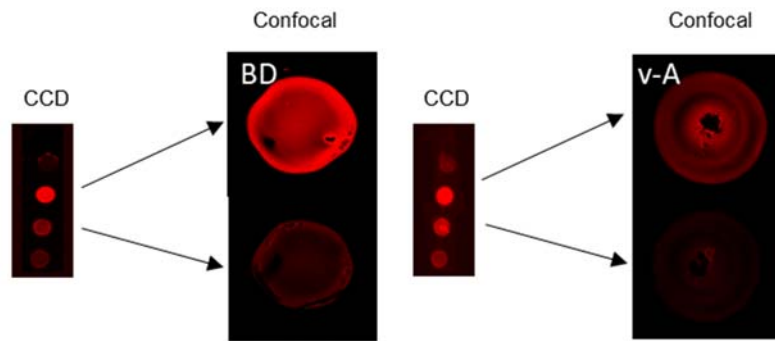
Para llevar a cabo la comparación de las prestaciones de los hidrogeles estudiados (fosforilcolina y Dx) se desarrollaron una serie de ensayos de inmovilización e hibridación con ácidos nucleicos, estudiando la homogeneidad de los puntos, la densidad de las sondas inmovilizadas, intensidad de la señal de fluorescencia, etc. Así, se observó que los *spots* de MPC tienen casi la mitad de diámetro que los de Dx-Ma.

El nuevo hidrogel de dextrano se comparó con el hidrogel de MPC descrito durante la primera parte de este capítulo en diferentes superficies; el primer paso fue la inmovilización de la sonda marcada tiolada (Sonda 1\*). Las diferentes superficies utilizadas fueron BD, policarbonato (pc), vidrio acrilato (v-A), vidrio alquenilado y vidrio sin tratar (Figura 3.43). Los resultados fueron similares entre las diferentes superficies, solo en el vidrio sin tratar los puntos presentaron menos señal. En el caso de usar vidrio funcionalizado con grupos acrilatos o alquenos, observamos un resultado similar y decidimos usar la superficie modificada con acrilato. Comparando los geles pudimos observar algunas diferencias, como que la intensidad de fluorescencia es mayor usando Dx-Ma en lugar de MPC (Figura 3.43), llegando a valores de saturación. Otra de las ventajas de usar el hidrogel de Dx-Ma es su versatilidad porque puede usarse en diferentes superficies. Además, se realizaron ensayos de hibridación observando que Dx-Ma tiene una señal de fluorescencia 4 veces superior en comparación con MPC, y presenta 12 veces más señal de fluorescencia en hibridación que la metodología covalente convencional sin hidrogel (Figura 3.43).



**Figura 3.43.** Gráfica comparativa para tres superficies con los geles (MPC y Dx-Ma) y sin gel (inmovilización por adsorción) para un ensayo de hibridación con controles de inmovilización. El ensayo se realizó en tres superficies BD, pc (policarbonato), vidrio de acrilato y se incluyó un control negativo BD (C-) sin hibridación. Se observa que sólo hay señales para los geles, siendo más intensa para el gel de Dx-Ma.

Además, como se muestra en las figuras 3.44 se estudiaron y compararon las señales obtenidas para el gel de Dx-Ma con el gel de MPC, se analizó tanto la intensidad de fluorescencia como la forma de la gota tras la polimerización. El análisis de microscopía confocal de fluorescencia demostró que el MPC tiene una estructura tridimensional, mientras que el Dx-Ma tiene una estructura más plana (Figura 3.44). En general, el nuevo hidrogel obtenido a partir de dextrano mejora la señal de fluorescencia y presenta una estructura más plana que las gotas semiesféricas de MPC.



**Figura 3.44.** Comparación de las imágenes obtenidas en diferentes superficies: BD y vidrio acrilato. También, comparación de las imágenes obtenidas mediante cámara CCD (SFR) y mediante microscopía confocal.

### 3.4 Conclusiones

En este capítulo, se describe la utilización de hidrogeles de fosforilcolina y dextrano que permiten desarrollar una metodología simple y rápida, para formar hidrogeles que combinan la fotopolimerización iniciada por los grupos acrilatos y el anclaje de sondas de forma simultánea. En el caso de usar un hidrogel derivado de fosforilcolina, actúa como agente antiincrustante, así como receptor específico para la CRP. Este nuevo sistema usando hidrogeles presenta las ventajas de ser fácil de fabricar y aplicable al formato de micromatriz.

Se demuestra el potencial del hidrogel (MPC) para la aplicación en micromatrices sobre superficies planas de BD mediante la fotoinmovilización covalente de sondas tioladas, al tiempo que se está formando el hidrogel. El procedimiento es una metodología adecuada para biofuncionalizar superficies con grupos alqueno y epoxi.

Además, es una metodología adecuada para generar micromatrices de hidrogel biofuncionalizado con fosforilcolina, con excelentes prestaciones en inmunoensayo y ensayos de hibridación de ácidos nucleicos. Este método de inmovilización es rápido, limpio y biocompatible. Además, alcanza buenas densidades de inmovilización y aumenta la superficie efectiva (3D). La nueva metodología es más sensible en comparación con los ensayos convencionales, las densidades de inmovilización son muy altas porque la micromatriz 3D aumenta el número de

receptores disponibles. El hidrogel también proporciona un entorno adecuado para el reconocimiento sonda-diana, reduciendo las adsorciones inespecíficas gracias a los grupos de fosforilcolina.

Por otro lado, se ha llevado a cabo la modificación de un polímero de dextrano con unidades de acrilato para posteriormente emplearlo como medio de anclaje de ácidos nucleicos o proteínas mediante un hidrogel. Se comprobó mediante diferentes técnicas como XPS, IR y RMN que el hidrogel tenía grupos metacrilato. Las sondas de oligonucleótidos se unen covalentemente al polímero de dextrano mediante la química de acoplamiento tiol-acrilato. La formación del hidrogel de dextrano, su fijación a la superficie de soporte y la unión covalente de la sonda, se llevan a cabo en un solo paso, en tan solo unos segundos. Este proceso es activado por luz UV y se realiza en medio acuoso.

Debido a su simplicidad, rapidez y condiciones suaves, esta metodología es muy interesante para desarrollar micromatrices con sondas tioladas que son unidas covalentemente. La cantidad de sonda inmovilizada es alta y la hibridación con la cadena complementaria es específica.

Ambos métodos significan un avance importante en el uso de la química *click* de tioleno para aplicaciones de micromatrices y aúnan la rapidez y la ortogonalidad de las reacciones de química de *click* con la alta capacidad de carga y la mayor sensibilidad de las micromatrices 3D.

La metodología de síntesis de micromatrices se ha demostrado en soportes BD y vidrio modificado con acrilato, pero puede ser potencialmente aplicable a cualquier superficie con grupos acrilato, alqueno o epoxi, por lo que constituye una forma sencilla de preparar micromatrices de altas prestaciones. La versatilidad del uso de gel se basa en que puede aplicarse en diferentes superficies, y proporcionando una unión rápida y covalente en muy diversos tipos de ensayo de biorreconocimiento, con posibilidad de emplear también distintas técnicas de detección.

### 3.5 Referencias

1. Clark, L. C. & Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. New York Acad. Sci.* **102**, 29–45 (1962).
2. Luchansky, M. S. & Bailey, R. C. High-Q optical sensors for chemical and biological analysis. *Anal. Chem.* **84**, 793–821 (2012).
3. Li, S. *et al.* Dextran hydrogel coated surface plasmon resonance imaging (SPRi) sensor for sensitive and label-free detection of small molecule drugs. *Appl. Surf. Sci.* **355**, 570–576 (2015).
4. R., D., Thevenot, Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* **71**, 2333–2348 (1999).
5. Kim, E. *et al.* Phosphocholine-modified magnetic nanoparticles for isolation of C-reactive protein from human serum. *Sep. Sci. Technol.* **48**, 2600–2607 (2013).
6. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 121–131 (2001).
7. Hulanicki, A., Glab, S. & Ingman, F. Chemical sensors definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* **63**, 1247–1250 (1991).
8. Barbulovic-nad, I. *et al.* Bio-microarray fabrication techniques — a review. **26**, 237–259 (2008).
9. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science (80- )*. **270**, 467–470 (1995).
10. Ekins, R. P. Multi-analyte immunoassay. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**, 155–168 (1989).
11. Hu, S., Xie, Z., Qian, J., Blackshaw, S. & Heng, Z. Functional protein microarray technology. *Rev. Syst. Biol. Med.* **3**, 255–268 (2011).
12. Ventimiglia, G. & Petralia, S. Recent advances in DNA microarray technology: an overview on production strategies and detection methods. *Bionanoscience* 428–450 (2013).
13. Kostrzynska, M. & Bachand, A. Application of DNA microarray technology

- for detection, identification, and characterization of food-borne pathogens. *Can. J. Microbiol.* **8**, 1–8 (2006).
14. Heller, M. J. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **4**, 129–153 (2002).
  15. Dutta, S. Point of care sensing and biosensing using ambient light sensor of smartphone: Critical review. *Trends Anal. Chem.* **110**, 393–400 (2019).
  16. Estevez, M. C., Alvarez, M. & Lechuga, L. M. Integrated optical devices for lab-on-a-chip biosensing applications. *Laser Photonics Rev.* **6**, 463–487 (2012).
  17. Petryayeva, E. & Algar, W. R. Toward point-of-care diagnostics with consumer electronic devices: the expanding role of nanoparticles. *RSC Adv.* **5**, 22256–22282 (2015).
  18. Kosack, C. S., Page, A. & Klatser, P. R. A guide to aid the selection of diagnostic tests. *Bull World Heal. Organ* **95**, 639–645 (2017).
  19. Mcgarraugh, G., Brazg, R. & Weinstein, R. FreeStyle navigator continuous glucose monitoring system with TRUstart algorithm, a 1-hour warm-up time. *J. Diabetes Sci. Technol.* **5**, 99–106 (2011).
  20. Martínez, A. *et al.* Ultrafast all-optical switching in a silicon-nanocrystal-based silicon slot waveguide at telecom wavelengths. *Nano Lett.* **10**, 1506–1511 (2010).
  21. Lia, J., Tana, S. N. & Geb, H. Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for hydrogen peroxide. *Anal. Chim. Acta* **335**, 137–145 (1996).
  22. Velychko, T. P. *et al.* A novel conductometric urea biosensor with improved analytical characteristic based on recombinant urease adsorbed on nanoparticle of silicalite. *Nanoscale Res. Lett.* **11**, 106 (2016).
  23. Avella-Oliver, M., Carrascosa, J., Puchades, R. & Maquieira, A. Diffractive protein gratings as optically active transducers for high-throughput label-free immunosensing. *Anal. Chem.* **89**, 9002–9008 (2017).
  24. Llandro, J., Palfreyman, J. J., Ionescu, A. & Barnes, C. H. W. Magnetic biosensor technologies for medical applications: a review. *Med Biol Eng Comput* **48**, 977–998 (2010).
  25. Kawamura, A. & Miyata, T. Biosensors. in *Biomaterials Nanoarchitectonics*

- 157–176 (2016).
26. Borisov, S. M. & Wolfbeis, O. S. Optical biosensors. *Chem. Rev.* **108**, 423–461 (2008).
  27. Yalow, R. S. & Berson, S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *Obes. Res.* **4**, 583–600 (1996).
  28. Crivianu-Gaita, V., Romaschin, A. & Thompson, M. High efficiency reduction capability for the formation of Fab' antibody fragments from F(ab)2 units. *Biochem. Biophys. Reports* **2**, 23–28 (2015).
  29. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* **5**, 1–17 (2014).
  30. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. New York: Garland Science **91**, (2001).
  31. Killard, A. J., Deasy, B., O'Kennedy, R. & Smyth, M. R. Antibodies: production, functions and applications in biosensors. *Trends Anal. Chem.* **14**, 257–266 (1995).
  32. Lopez de Silanes, J., Mancilla Nava, R. & Paniagua Solis, J. Pharmaceutical composition of F(Ab)2 fragments of antibodies and method for preparation. (2002).
  33. Hage, D. S. Immunoassays. **65**, 420–424 (1993).
  34. Chen, G. *et al.* A review of enhancers for chemiluminescence enzyme immunoassay. *Food Agric. Immunol.* **28**, 315–327 (2017).
  35. Salm, P. *et al.* Evaluation of a fluorescent polarization immunoassay for whole blood everolimus determination using samples from renal transplant recipients. *Clin. Biochem.* **39**, 732–738 (2006).
  36. Ateto, A. A. The structures of DNA and RNA. in *Molecular Biology of the Gene Edition: Fifth Edition* 1–33 (2002).
  37. Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H. & Vogt, P. H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* **23**, 504–511 (1997).
  38. Board, E. A. Recent advances in DNA biosensor. *Sensors Transducers J.* **92**, 122–133 (2008).

39. Cristofolini, L. *et al.* The structure of DNA-containing complexes suggests the idea for a new adaptive sensor. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **321**, 158–162 (2008).
40. Sampson, T. Aptamers and SELEX: the technology. *World Pat. Inf.* **25**, 123–129 (2003).
41. Sassolas, A., Leca-Bouvier, B. D. & Blum, L. J. DNA biosensors and microarrays. *Chem. Rev.* **108**, 109–139 (2008).
42. Bagni, G., Osella, D., Sturchio, E. & Mascini, M. Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies. *Anal. Chim. Acta* **573–574**, 81–89 (2006).
43. Wang, J. *et al.* DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review. *Anal. Chim. Acta* **347**, 1–8 (1997).
44. Sassolas, A., Hayat, A. & Marty, J.-L. Electrochemical biosensors for the detection of microcystins: recent advances and perspectives. *Biosens. Recent Adv. Math. challenges* **4**, 97–109 (2014).
45. Huertas, C. S., Fariña, D. & Lechuga, L. M. Direct and label-free quantification of micro-RNA-181a at attomolar level in complex media using a nanophotonic biosensor. *ACS Sensors* **1**, 748–756 (2016).
46. Zhang, G. J., Chua, J. H., Chee, R. E., Agarwal, A. & Wong, S. M. Label-free direct detection of MiRNAs with silicon nanowire biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 2504–2508 (2009).
47. Francis, T. S. Y. & Shizhuo, Y. Fiber optic sensors. in (ed. Yin, F. T. S. Y. S.) 1–509 (2002).
48. Angenendt, P. Progress in protein and antibody microarray technology. *Drug Discov. today targets* **10**, 1–9 (2005).
49. Patel, P. N., Mishra, V. & Mandloi, A. S. Optical biosensors: fundamentals & trends. *J. Eng. Res. Stud.* **1**, 15–34 (2010).
50. Mannelli, I. *et al.* DNA immobilisation procedures for surface plasmon resonance imaging (SPRI) based microarray systems. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 803–809 (2007).
51. Ruiz-Tórtola, A. *et al.* Experimental study of the evanescent-wave photonic sensors response in presence of molecular beacon conformational changes.



*J. Biophotonics* **11**, e201800030 (2018).

52. Escorihuela, J. *et al.* Dual-polarization interferometry: a novel technique to light up the nanomolecular world. **115**, 265–294 (2015).
53. Juste-dolz, A. *et al.* New structural insights into the role of TROVE2 complexes in the on-set and pathogenesis of systemic lupus erythematosus determined by a combination of QCM-D and DPI. *Anal. Bioanal. Chem.* **411**, 4709–4720 (2018).
54. Conteduca, D., Dell’Olio, F., Ciminelli, C. & Armenise, M. N. New miniaturized exhaled nitric oxide sensor based on a high Q/V mid-infrared 1D photonic crystal cavity. *Appl. Opt.* **54**, 2208–2217 (2015).
55. Tao, X. Wearable photonics based on integrative polymeric photonic fibres. in *Wearable Electronics and Photonics* 136–154 (Woodhead Publishing Limited, 2005).
56. Yablonovitch, E. Inhibited spontaneous emission in solid-state physics and electronics. *Phys. Rev. Lett.* **58**, 13–20 (1987).
57. Goyal, A. K. & Pal, S. Design and simulation of high sensitive photonic crystal waveguide sensor. *Optik (Stuttg.)* **126**, 240–243 (2015).
58. Liu, Q. *et al.* Biosensors and bioelectronics Mach–Zehnder interferometer (MZI) point-of-care system for rapid multiplexed detection of microRNAs in human urine specimens. *Biosens. Bioelectron.* **71**, 365–372 (2015).
59. Sanza, F. J. *et al.* Bio-photonic sensing cells over transparent substrates for anti-gestrinone antibodies biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4842–4847 (2011).
60. Holgado, M. *et al.* Label-free biosensing by means of periodic lattices of high aspect ratio SU-8 nano-pillars. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 2553–2558 (2010).
61. Lavín, Á., Casquel, R., Sanza, F. J., Laguna, M. F. & Holgado, M. Efficient design and optimization of bio-photonic sensing cells (BICELLS) for label free biosensing. *Sensors Actuators, B Chem.* **176**, 753–760 (2013).
62. Holgado, M. *et al.* Biophotonic sensing cells (BICELLS) for label-free biosensing. *Symp. A1.III. Mater. devices sensing.* **26**, 4847 (2011).
63. Zanchetta, G., Lanfranco, R., Giavazzi, F., Bellini, T. & Buscaglia, M. Emerging applications of label-free optical biosensors. *Nanophotonics* **6**, 627–645

- (2017).
64. Chin, C. D., Linder, V. & Sia, S. K. Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities. *Lab Chip* **7**, 41–57 (2007).
  65. González-Lucas, D., Bañuls, M. J. & García-rupérez, J. Covalent attachment of biotinylated molecular beacons via thiol-ene coupling. A study on conformational changes upon hybridization and streptavidin binding. *Microchim. Acta* **184**, 3231–3238 (2017).
  66. Irawati, N. *et al.* Relative humidity sensing using a PMMA doped agarose gel microfiber. *J. Light. Technol.* **35**, 3940–3944 (2017).
  67. Jerónimo, P., Araújo, A., Conceicao, M. & Montenegro, B. S. M. Optical sensors and biosensors based on sol – gel films. *Talanta* **72**, 13–27 (2007).
  68. Brun, E. M., Puchades, R. & Maquieira, A. Gold, carbon, and aluminum low-reflectivity compact discs as microassaying platforms. *Anal. Chem.* **85**, 4178–4186 (2013).
  69. Morais, S. & Tamarit-lópez, J. Analytical prospect of compact disk technology in immunosensing. *Anal Bioanal Chem* 2837–2844 (2008).
  70. Morais, S., Tortajada-Genaro, L. & Maquieira, A. Array-on-a-disk? How Blu-ray technology can be applied to molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **14**, 773–775 (2014).
  71. Santiago-Felipe, S., Tortajada-Genaro, L. A., Carrascosa, J., Puchades, R. & Maquieira, Á. Real-time loop-mediated isothermal DNA amplification in compact disc micro-reactors. *Biosens. Bioelectron.* **79**, 300–306 (2016).
  72. Morais, S., Puchades, R. & Maquieira, A. Disc-based microarrays: principles and analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 4523–4534 (2016).
  73. Enomoto, M., Tsubo, R., Kikuchi, M. & Mori, K. US Patent US2005/0233103A1. US Pat. (2005).
  74. Arnandis-Chover, T., Morais, S., González-Martínez, M. Á., Puchades, R. & Maquieira, Á. Biosensors and Bioelectronics High density MicroArrays on Blu-ray discs for massive screening. *Biosens. Bioelectron.* **51**, 109–114 (2014).
  75. Peris, E., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Photoattachment of thiolated DNA probes on SU-8 spin-coated Blu-ray disk surfaces for

- biosensing. *J. Mater. Chem. B* **1**, 6245–6253 (2013).
76. Tyona, M. D. A theoretical study on spin coating technique. *Adv. Mater. Res.* **2**, 195–208 (2013).
77. Meyerhofer. Key stages in spin coating process. *Adv. Mater. Res.* **2**, 181–193 (1978).
78. Sobek, J. & Schlappbach, R. Substrate architecture and functionality defining the properties and performance of DNA, peptide, protein and carbohydrate microarrays. *Pharmagenomics* **7**, 32–44 (2004).
79. Rusmini, F., Zhong, Z. & Feijen, J. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* **8**, 1775–1789 (2007).
80. Pallavicini, P., Dacarro, G. & Taglietti, A. Self-assembled monolayers of silver nanoparticles: from intrinsic to switchable inorganic antibacterial surfaces. *Antibact. Surfaces* **2018**, 4846–4855 (2018).
81. Pfeifer, M. E. ADIBO-based “click” chemistry for diagnostic peptide microarray fabrication: physicochemical and assay characteristics. *Molecules* **18**, 9833–9849 (2013).
82. Haghshenas Kashani, S. *et al.* Nano-silica functionalized with thiol-based dendrimer as a host for gold nanoparticles: An efficient and reusable catalyst for chemoselective oxidation of alcohols. *Appl. Organomet. Chem.* **32**, 1–13 (2018).
83. Nelson, E. E. & Guyer, A. E. Regioselective covalent immobilization of recombinant antibody binding proteins A, G, and protein L for construction of antibody arrays. *J. Am Chem Soc.* **135**, 8973–8980 (2013).
84. Escorihuela, J. *et al.* Direct covalent attachment of DNA microarrays by rapid thiol-ene ‘click’ chemistry. *Bioconjug. Chem.* **25**, 618–627 (2014).
85. Ito, Y. Combinatorial bioengineering: review. *Biotechnol Prog.* **22**, 924–932 (2006).
86. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int.* **40**, 2004–2021 (2001).
87. Escorihuela, J. *et al.* Direct covalent attachment of DNA microarrays by rapid thiol-ene “click” chemistry. *Bioconjug. Chem.* **25**, 6618–627 (2014).

88. Weinrich, D. *et al.* Preparation of biomolecule microstructures and microarrays by thiol-ene photoimmobilization. *ChemBioChem* **11**, 235–247 (2010).
89. Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Chemical surface modifications for the development of silicon-based label-free integrated optical (IO) biosensors: A review. *Anal. Chim. Acta* **777**, 1–16 (2013).
90. Alonso, R., Jiménez-Meneses, P., García-Rupérez, J., Bañuls, M. J. & Maquieira, A. Thiol-ene click chemistry towards easy microarraying of half-antibodies. *Chem. Commun.* **54**, 6144–6147 (2018).
91. Ruiz-Tórtola, A. *et al.* High sensitivity and label-free oligonucleotides detection using photonic bandgap sensing structures biofunctionalized with molecular beacon probes. *Biomed. Opt. Express* **9**, 1717–1727 (2018).
92. Aragón, P., Noguera, P., Bañuls, M. José, Puchades, R. & Maquieira, A. Modulating receptor-ligand binding in biorecognition by setting surface wettability. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**, 5723–5730 (2018).
93. Escorihuela, J., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Development of oligonucleotide microarrays onto Si-based surfaces via thioether linkage mediated by UV irradiation. *Bioconjug. Chem.* **23**, 2121–2128 (2012).
94. Bañuls, M. J. *et al.* Improved performance of DNA microarray multiplex hybridization using probes anchored at several points by thiol-ene or thiol-yne coupling chemistry. *Bioconjug. Chem.* **28**, 496–506 (2017).
95. Escorihuela, J. & Puchades, R. Site-specific immobilization of DNA on silicon surfaces by using the thiol-yne reaction. *J. Mater. Chem. B* **2**, 8510–8517 (2014).
96. Jiménez-Meneses, P., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Fluor-thiol photocoupling reaction for developing high performance nucleic acid (NA) microarrays. *Anal. Chem.* **90**, 11224–11231 (2018).
97. Bañuls, M. J., González-Martínez, M. Á., Sabek, J., García-Rupérez, J. & Maquieira, A. Thiol-click photochemistry for surface functionalization applied to optical biosensing. *Anal. Chim. Acta* **1060**, 103–113 (2019).
98. Wichterlew, O. & Lim, D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature* **185**, 117–118 (1960).
99. Rubina, A. Y., Kolchinsky, A., Makarov, A. A. & Zasedatelev, A. S. Why 3-D?

- Gel-based microarrays in proteomics. *Proteomics* **8**, 817–831 (2008).
100. Caló, E. & Khutoryanskiy, V. V. Biomedical applications of hydrogels: a review of patents and commercial products. *Eur. Polym. J.* **65**, 252–267 (2015).
  101. Moschallski, M., Evers, A., Brandstetter, T. & Rühle, J. Sensitivity of microarray based immunoassays using surface-attached hydrogels. *Anal. Chim. Acta* **781**, 72–79 (2013).
  102. Beyer, A., Pollok, S., Berg, A., Weber, K. & Popp, J. Easy daylight fabricated hydrogel array for colorimetric DNA analysis. *Macromol. Biosci.* **14**, 889–898 (2014).
  103. Liu, X., Lei, Z., Liu, F., Liu, D. & Wang, Z. Fabricating three-dimensional carbohydrate hydrogel microarray for lectin-mediated bacterium capturing. *Biosens. Bioelectron.* **58**, 92–100 (2014).
  104. Guschin, D. *et al.* Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips. *Anal. Biochem.* **250**, 203–211 (1997).
  105. Arenkov, P. *et al.* Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal. Biochem.* **278**, 123–131 (2000).
  106. Rubina, A. Y. *et al.* Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications. *Biotechniques* **34**, 1008–1022 (2003).
  107. Rubina, A. Y., Dyukova, V. I., Dementieva, E. I. & Stomakhin, A. A. Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips. *Anal. Biochem.* **340**, 317–329 (2005).
  108. Hosseinkhani, H. *et al.* DNA nanoparticles encapsulated in 3D tissue-engineered scaffolds enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 47–60 (2007).
  109. Rubina, A. Y. *et al.* Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. *Anal. Biochem.* **325**, 92–106 (2004).
  110. Mirzabekov, A. D., Rubina, A. J. & Panvok, V. S. Composition for polymerizing immobilization of biological molecules and method for producing said composition. (2010).
  111. Mirzabekov, A. & Kolchinsky, A. Emerging array-based technologies in

- proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 70–75 (2002).
112. Charles, P. T. *et al.* Fabrication and characterization of 3D hydrogel microarrays to measure antigenicity and antibody functionality for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 753–764 (2004).
  113. E.I., D. *et al.* Protein microchips in quantitative assays for tumor markers. *Dokl. Biochem. Biophys.* **395**, 88–92 (2004).
  114. Herrmann, A., Kaufmann, L., Dey, P., Haag, R. & Schedler, U. Bioorthogonal in situ hydrogels based on polyether polyols for new biosensor materials with high sensitivity. *Appl. Mater. Interfaces* **10**, 11382–11390 (2018).
  115. Nakabayashi, N. & Williams, D. F. Preparation of non-thrombogenic materials using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. *Biomaterials Nanoarchitectonics* **24**, 2431–2435 (2003).
  116. K, N. *et al.* Development of a ferrocene-mediated needle-type glucose sensor covered with newly designed biocompatible membrane, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate. *Med Prog Technol* **21**, 91–103 (1995).
  117. Dalton, J. A., Higgins, M. K., Miller, A. H., Keefe, F. J. & Khuri, F. R. Purification of recombinant C-reactive protein mutants. *J Biol Chem.* **35**, 25353–25358 (1992).
  118. Iwasaki, Y. & Ishihara, K. Cell membrane-inspired phospholipid polymers for developing medical devices with excellent biointerfaces. *Sci. Technol. od Adv. Mater.* **13**, 064101 (2012).
  119. Mclean, K. M. *et al.* Method of immobilization of carboxymethyl-dextran affects resistance to tissue and cell colonization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **18**, 221–234 (2000).
  120. Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C. & Alhaique, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J. Control. Release* **119**, 5–24 (2007).
  121. Chao, J. *et al.* Hybridization chain reaction amplification for highly sensitive fluorescence detection of DNA with dextran coated microarrays. *Biosens. Bioelectron.* **81**, 92–96 (2016).
  122. García-Rupérez, J. Advanced nanophotonic point-of-care analysis device for fast and early diagnosis of cardiovascular diseases. <https://phocnosis.eu/>

123. Bhayana, V. & Henderson, R. Biochemical markers of myocardial damage. *Clin. Biochem.* **28**, 1–29 (1995).
124. Algarra, M., Gomes, D. & Esteves da Silva, J. C. G. Current analytical strategies for C-reactive protein quantification in blood. *Clin. Chim. Acta* **415**, 1–9 (2013).
125. Störk, T. V. *et al.* Diagnostic and prognostic role of myoglobin in patients with suspected acute coronary syndrome. *Am. J. Cardiol.* **86**, 1371–1374 (2000).
126. Kagen, L. J. Myoglobin: methods and diagnostic uses. *Critial Rev. Clin. Lab. Sci.* **9**, 273–302 (1978).
127. Ioannidis, J. P. A., Salem, D., Chew, P. W. & Lau, J. Accuracy of imaging technologies in the diagnosis of acute cardiac ischemia in the emergency department: a meta-analysis. *Ann. Emerg. Med.* **37**, 471–477 (2001).
128. Bertsch, T., Bleuel, H., Deschl, U. & Rebel, W. A new sensitive cardiac troponin T rapid test (TROPT<sup>®</sup>) for the detection of experimental acute myocardial damage in rats. *Exp. Toxic Pathol.* **51**, 565–569 (1999).
129. Vermonden, T., Censi, R. & Hennink, W. E. Hydrogels for protein delivery. *Chem. Rev.* **112**, 2853–2888 (2012).
130. Liu, X., Lei, Z., Liu, D. & Wang, Z. Development of a sandwiched microarray platform for studying the interactions of antibiotics with *Staphylococcus aureus*. *Anal. Chim. Acta* **917**, 93–100 (2016).
131. Sampaio, C. *et al.* Development of peptide-functionalized synthetic hydrogel microarrays for stem cell and tissue engineering applications. *Acta Biomater.* **45**, 110–120 (2016).
132. Liu, X., Li, T., Liu, D. & Wang, Z. Fabricating three-dimensional hydrogel oligonucleotide microarrays to detect single nucleotide polymorphisms. *Anal. Methods* **5**, 285–290 (2013).
133. Li, S. *et al.* Dextran hydrogel coated surface plasmon resonance imaging (SPRi) sensor for sensitive and label-free detection of small molecule drugs. *Appl. Surf. Sci.* **355**, 570–576 (2015).
134. Moschallski, M., Baader, J., Prucker, O. & Rühle, J. Printed protein microarrays on unmodified plastic substrates. *Anal. Chim. Acta* **671**, 92–98 (2010).

135. Kivlehan, F., Paolucci, M., Brennan, D., Ragoussis, I. & Galvin, P. Three-dimensional hydrogel structures as optical sensor arrays, for the detection of specific DNA sequences. *Anal. Biochem.* **421**, 1–8 (2012).
136. Thompson, D., Pepys, M. B. & Wood, S. P. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* **7**, 169–177 (1999).
137. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* **107**, 363–369 (2003).
138. Deegan, O., Walshe, K., Kavanagh, K. & Doyle, S. Quantitative detection of C-reactive protein using phosphocholine-labelled enzyme or microspheres. *Anal. Biochem.* **312**, 175–181 (2003).
139. Lee, S. G. *et al.* Phosphocholine-modified magnetic nanoparticles for isolation of C-reactive protein from human serum. *Sep. Sci. Technol.* **48**, 2600–2607 (2013).
140. Kim, E. K. *et al.* Protein-directed immobilization of phosphocholine ligands on a gold surface for multivalent C-reactive protein binding. *Bentham Sci. Publ.* **13**, 519 (2013).
141. Kitayama, Y. & Takeuchi, T. Localized surface plasmon resonance nanosensing of C-reactive protein with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-grafted gold nanoparticles prepared by surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Anal. Chem.* **86**, 5587–5594 (2014).
142. Kamon, Y. *et al.* Synthesis of grafted phosphorylcholine polymer layers as specific recognition ligands for C-reactive protein focused on grafting density and thickness to achieve highly sensitive detection. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 9951–9958 (2015).
143. Yoshimoto, J. *et al.* Optical properties of 2-ethacryloyloxyethyl phosphorylcholine-protected Au<sub>4</sub> nanoclusters and their fluorescence sensing of C-reactive protein. *J. Phys. Chem. C* **119**, 14319–14325 (2015).
144. Matsuura, R., Tawa, K., Kitayama, Y. & Takeuchi, T. A plasmonic chip-based bio/chemical hybrid sensing system for the highly sensitive detection of C-reactive protein. *Chem. Commun.* **52**, 3883–3886 (2016).
145. Morais, S., Tortajada-Genaro, L. & Maquieira, A. Array-on-a-disk? How Blu-ray technology can be applied to molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol.*



*Diagn.* **14**, 773–775 (2014).

146. Morais, S., Tortajada-Genaro, L. A., Arnandis-Chover, T., Puchades, R. & Maquieira, A. Multiplexed microimmunoassays on a digital versatile disk. *Anal. Chem.* **81**, 5646 (2009).
147. Mira, D. *et al.* High-throughput screening of surface-enhanced fluorescence on industrial standard digital recording media. *Opt. Based Biol. Chem. Sens. Def.* **5617**, 364–373 (2004).
148. Chen, H., Huang, J., Lee, J., Hwang, S. & Koh, K. Surface plasmon resonance spectroscopic characterization of antibody orientation and activity on the calixarene monolayer. *Sensors Actuators, B Chem.* **147**, 548–553 (2010).
149. Escorihuela, J. *et al.* Direct covalent attachment of DNA microarrays by rapid thiol – ene “click” chemistry. *Bioconjug. Chem.* **25**, 6618–627 (2014).
150. González-Lucas, D., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Versatile and easy fabrication of advanced surfaces for high performance DNA microarrays. *Adv. Mater. Interfaces* **3**, 1500850 (2016).
151. Zhou, Y., Fang, Y. & Ramasamy, R. P. Non-covalent functionalization of carbon nanotubes for electrochemical biosensor development. *Sensors (Switzerland)* **19**, (2019).
152. Qu, Z., Xu, H. & Gu, H. Synthesis and biomedical applications of poly((meth)acrylic acid) brushes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 14537–14551 (2015).
153. Oh, S. J., Hong, B. J., Choi, K. Y. & Park, J. W. Surface modification for DNA and protein microarrays. *Omi. A J. Integr. Biol.* **10**, 327–343 (2006).
154. Stanciu, M. C. & Nichifor, M. Influence of dextran hydrogel characteristics on adsorption capacity for anionic dyes. *Carbohydr. Polym.* **199**, 75–83 (2018).
155. Zhou, Y., Andersson, O., Lindberg, P. & Liedberg, B. Protein microarrays on carboxymethylated dextran hydrogels: immobilization, characterization and application. **30**, 21–30 (2004).
156. Nikpour, P., Salimi-kenari, H., Fahimipour, F. & Mahmood, S. Dextran hydrogels incorporated with bioactive glass-ceramic: Nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* **190**, 281–294 (2018).

157. Wang, X. *et al.* Injectable dextran hydrogels fabricated by metal-free click chemistry for cartilage tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **73**, 21–30 (2017).
158. Hoque, J. & Haldar, J. Direct synthesis of dextran-based antibacterial hydrogels for extended release of biocides and eradication of topical biofilms. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 15975–15985 (2017).
159. Ma, Y., Yi, J.-Z. & Zhang, L.-M. A Facile approach to incorporate silver nanoparticles into dextran-based hydrogels for antibacterial and catalytical application. *J. Macromol. Sci.* **46**, 643–648 (2009).
160. Varshosaz, J. Dextran conjugates in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **9**, 509–523 (2012).
161. Herranz, S. *et al.* Multiplex environmental pollutant analysis using an array biosensor coated with chimeric hapten-dextran-lipase constructs. *Sensors Actuators B. Chem.* **257**, 256–262 (2018).
162. Chao, J. *et al.* Hybridization chain reaction amplification for highly sensitive fluorescence detection of DNA with dextran coated microarrays. *Biosens. Bioelectron.* **81**, 92–96 (2016).
163. Blum, L. J. & Marquette, C. A. High-throughput multiplexed competitive immunoassay for pollutants sensing in water. *Anal. Chem.* **84**, 10267–10276 (2012).
164. Angeloni, S., Ridet, J. L., Kusy, N. & Gao, H. Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. **15**, 31–41 (2005).
165. Escorihuela, J. & Puchades, R. Site-specific immobilization of DNA on silicon surfaces by using the thiol–yne reaction. *J. Mater. Chem. B* **2**, 8510–8517 (2014).
166. Escorihuela, J., Puchades, R. & Maquieira, A. Development of oligonucleotide microarrays onto Si-based surfaces via thioether linkage mediated by UV irradiation. *Bioconjug. Chem.* **23**, 2121–2128 (2012).
167. Dondoni, A. The Emergence of thiol–ene coupling as a click process for materials and bioorganic Chemistry \*\*. *Angew. Chem.* **47**, 8995–8997 (2008).
168. van Dijk-Wotthuis, W. N. E. *et al.* Synthesis, characterization, and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran.

*Macromolecules* **28**, 6317–6322 (1995).

169. Pirrung, M. C. How to make a DNA chip. *Angew. Chem. Int* **41**, 1276–1289 (2002).
170. Wang, C. *et al.* DNA microarray fabricated on poly (acrylic acid) brushes-coated porous silicon by in situ rolling circle amplification. *Analyst* **137**, 4539–4545 (2012).
171. Casanova-Salas *et al.* Identification of miR-187 and miR-182 as biomarkers of early diagnosis and prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J. Urol.* **192**, 252–259 (2014).
172. Wu, J. *et al.* Lab-on-a-chip platforms for detection of cardiovascular disease and cancer biomarkers. *Sensors (Switzerland)* **17**, 2934 (2017).
173. Jonkheijm, P., Weinrich, D., Schröder, H., Niemeyer, C. M. & Waldmann, H. Chemical strategies for generating protein biochips. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 9618–9647 (2008).
174. Phaner-Goutorbe, M., Dugas, V., Chevolut, Y. & Souteyrand, E. Silanization of silica and glass slides for DNA microarrays by impregnation and gas phase protocols: a comparative study. *Mater. Sci. Eng. C* **31**, 384–390 (2011).
175. Sanza, F. J. *et al.* Bio-Photonic sensing cells over transparent substrates for anti-gestrinone antibodies biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4842–4847 (2011).
176. Casquel, R. *et al.* Optimization of a label-free biosensor vertically characterized based on a periodic lattice of high aspect ratio SU-8 nanopillars with a simplified 2D theoretical model. *Phys. Status Solidi Curr. Top. Solid State Phys.* **8**, 1087–1092 (2011).
177. Mira, D. *et al.* High-throughput screening of surface-enhanced fluorescence on industrial standard digital recording media. *Opt. Based Biol. Chem. Sens. Def.* **5617**, 364 (2004).
178. Lee, J. H. *et al.* Label free novel electrical detection using micromachined PZT monolithic thin film cantilever for the detection of C-reactive protein. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 269–275 (2004).
179. Roberts, W. L. *et al.* Evaluation of nine automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. Part 2. *Clin. Chem.* **47**, 418–25 (2001).

180. Hu, W. P. *et al.* Immunodetection of pentamer and modified C-reactive protein using surface plasmon resonance biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1631–1637 (2006).
181. Kim, H. C., Lee, S. K., Sohn, Y. S., Ryu, H. K. & Jeong, S. W. Preparation of a sensing membrane for C-reactive protein. *Macromol. Symp.* **249–250**, 71–75 (2007).
182. Yuk, J. S., Jung, J. W., Hyun, J., Kim, Y. M. & Ha, K. S. Development of a scanning surface plasmon microscope based on white light for analysis of a wide range of protein arrays. *Sensors Actuators, B Chem.* **131**, 241–246 (2008).
183. Vashist, S. K., Schneider, E. M. & Luong, J. H. T. Surface plasmon resonance-based immunoassay for human C-reactive protein. *Analyst* **140**, 4445–4452 (2015).
184. Luan, E., Shoman, H., Ratner, D. M., Cheung, K. C. & Chrostowski, L. Erratum: Luan, E.X.; Shoman, H.; Ratner, D.M.; Cheung, K.C.; Chrostowski, L. Silicon Photonic biosensors using label-free detection. *Sensors* 2018, 18, 3519. *Sensors (Basel)*. **19**, 19051161 (2019).
185. Iqbal, M. *et al.* Label-free biosensor arrays based on silicon scanning instrumentation. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **16**, 654–661 (2010).
186. Franssen, O., Talsma, H., Steenbergen, M. J. Van, Bosch, J. J. K. Den & Hennink, W. E. Synthesis, characterization, and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran. *Macromolecules* **28**, 6317–6322 (1995).
187. Povinelli, M. L., Johnson, S. G. & Joannopoulos, J. D. Slow-light, band-edge waveguides for tunable time delays. *Opt. Express* **13**, 7145–7159 (2006).
188. Arya, S., Khan, S., Akhil Vaid, H. K. & Lehana, P. Microfluidic mechanics and applications: a review. *J. Nano- Electron. Phys.* **5**, 1–12 (2013).

Capítulo 4.  
Aplicación de los  
desarrollos para  
biosensores sin marcaje



#### 4. Aplicación de los desarrollos para biosensores sin marcaje

En el tercer capítulo, se abordaron estrategias dirigidas a la preparación de hidrogeles sumada a inmovilización fotoquímica de biomoléculas. En este capítulo se aplican estos desarrollos, sobre una superficie de SU-8 tipo BICELLS o Fabry-Perot interferométricos, con el objetivo de poner a punto biosensores que operen en formato *label-free*.

Además, los hidrogeles desarrollados en el capítulo 3 se proyectó aplican también en otro tipo de transductores *label-free*, concretamente guías corrugadas producidas en SOI (*silicon-on-insulator*). Estos transductores son fabricados por el Centro de Tecnología Nanofotónica de la UPV en el marco del proyecto europeo PHOCNOSIS. El objetivo de este proyecto era poner a punto un dispositivo de diagnóstico temprano de riesgo cardiovascular mediante detección de biomarcadores específicos (CRP, Troponina cardíaca, y mioglobina), a través de inmunorreconocimiento, sobre la superficie de dichas estructuras. Para ello, previamente, se puso a punto el biosensor con sistema modelo BSA/aBSA y después se extendió a los diferentes biomarcadores. Inicialmente se trabajó en formato plano (2D), optimizando los métodos de inmovilización covalente y biorreconocimiento sobre SOI no nanoestructurado para después transferirlo a las estructuras fotónicas. En la última etapa de la investigación se efectuaron las medidas fotónicas de los biomarcadores en formato 3D de hidrogel de fosforilcolina.

#### 4.1 Transferencia del hidrogel de fosforilcolina a estructuras interferométricas de SU-8

En la actualidad ha crecido el interés por desarrollar dispositivos fotónicos integrados como los biosensores *lab-on-a-chip* para mejorar y sustituir a las técnicas de medida y formato de ensayo convencionales, por otras más económicas, rápidas y operativas en campo<sup>64,172</sup>. También, resulta interesante la combinación de elementos nanoestructurados y elementos fluídicos<sup>172</sup>, los cuales pueden favorecer el multiplexado, reducir los tiempos de análisis y los volúmenes de muestra, facilitar la miniaturización, mejorar la sensibilidad, y permitir medidas a tiempo real. El problema es que a veces estos elementos nanoestructurados de transducción no una respuesta satisfactoria, por lo que es necesaria la adecuada inmovilización de receptores específicos<sup>173</sup>. Existen diferentes vías para mejorar las prestaciones de sistemas fotónicos. Entre otras, la inmovilización covalente de las biomoléculas, para nuestro objetivo presenta muchas ventajas como robustez de la unión superficie-receptor, y orientación de la capa de reconocimiento<sup>174</sup>. Otra metodología de inmovilización que es muy pertinente en este caso es mediante atrapamiento en un gel o incluso, un hidrogel que incorpora un biorreceptor unido covalentemente. En este sentido los geles derivados de fosforilcolina (MPC), desarrollados en el tercer capítulo presentan ventajas interesantes. Por lo que sabemos, el uso de hidrogeles de fosforilcolina para detección interferométrica sin marcaje, todavía no se ha descrito.

En este capítulo de la tesis estudiamos sobre el uso de un hidrogel derivado de acrilato de fosforilcolina, desarrollado como soporte de inmovilización de altas prestaciones, para la construcción de un biosensor óptico sin marcaje basado en estructuras interferométricas de SU-8.

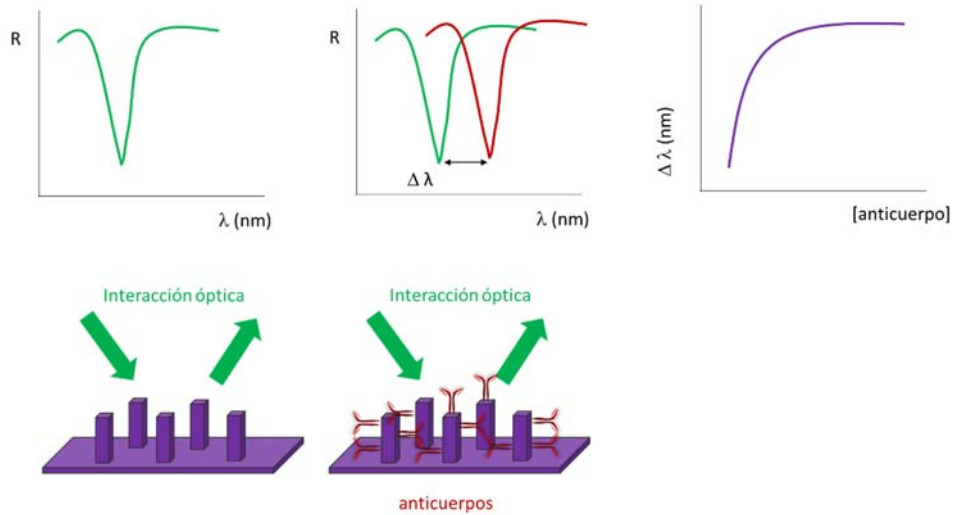
Por ello, se trabajó con dos tipos de estructuras interferométricas, la primera era un interferómetro de tipo Fabry-Perot basado en una capa uniforme de SU-8 de 200 nm de espesor sobre un material semiconductor de Si. Por otro lado, se ha utilizado estructuras interferométricas denominadas BICELLS<sup>60,175,176,61</sup> basadas en estructuras periódicas de nanopilares que presentan altos límites de detección, acoplamiento vertical de luz y la capacidad de multiplexado. Además, este transductor tiene el pico interferométrico en el rango del IR (9000 a 16000  $\text{cm}^{-1}$ ) disminuyendo el número de



onda, es decir aumenta la longitud de onda cuando aumenta la concentración de biomoléculas en su superficie.

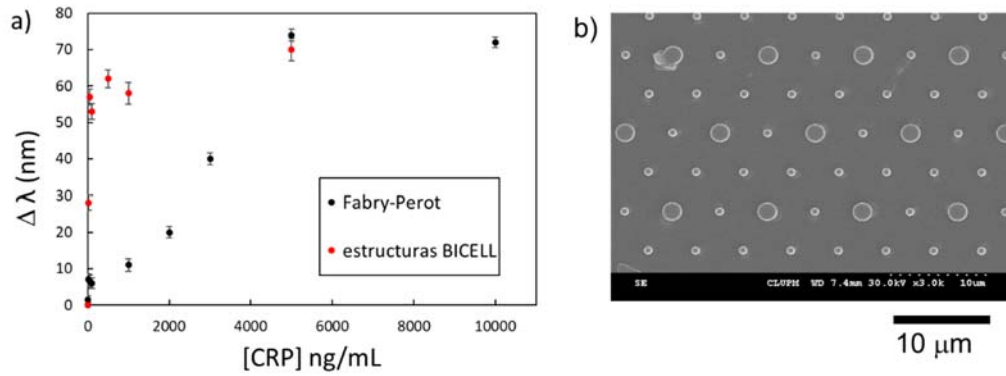
Ambos transductores se han desarrollado en la UPM (Universidad Politécnica de Madrid) en el grupo Optics, Photonics and Biophotonics Lab, liderado por el Dr. Holgado<sup>60</sup>, y se basan en la caracterización de la respuesta óptica vertical de las estructuras fotónicas<sup>175</sup>, utilizando métodos de micro- y nanofabricación sobre chips de silicio, vidrio o superficies poliméricas. Estas estructuras han demostrado ser lo suficientemente sensibles para biosensado. Una de las ventajas del uso de nanopilares es el aumento del área de detección con respecto a los interferómetros planos de Fabry-Perot. Otro beneficio del uso de matrices periódicas de nanopilares es su capacidad de confinamiento de la luz, lo que mejora la sensibilidad del biosensor. El efecto es similar al que se produce en las guías de onda, pero en este caso la señal óptica se debe a diferencias de índice de refracción entre el nanopilar y el material circundante, que en este caso puede ser la biomolécula unida a la superficie de los nanopilares. Aunque hay trabajos de biosensado con BICELLS que se basan en la inmovilización de los biorreceptores por adsorción o mediante reacciones clásicas de inmovilización covalente, en esta tesis se plantea la hipótesis de que utilizar un hidrogel como vía de inmovilización puede aumentar el número de receptores y mejorar la sensibilidad, como ocurría en los ensayos realizados en formato de micromatriz. Así, se desarrollará en BICELLS esta nueva estrategia de biosensado para la detección de CRP.

Las medidas en estas estructuras se basan en el desplazamiento en la longitud de onda debido a una acumulación de masa en la superficie que cambia el índice de refracción de la misma. Para ello, la luz transmitida o reflejada se mide inicialmente cuando la superficie está limpia. A continuación, cuando las moléculas se han unido a la superficie de SU-8 se vuelve a medir, debido a la acumulación de masa de las biomoléculas se produce un cambio en el índice de refracción, es decir, un desplazamiento en la longitud de onda, que se relaciona con la concentración de proteína.



**Figura 4.1.** Esquema general de las medidas en estructuras interferométricas, tipo BICELLS. Obteniendo una relación entre el incremento de la longitud de onda y la concentración de anticuerpo.

En un inicio, el interferómetro de Fabry-Perot se funcionalizó con MPC utilizando una modificación del protocolo empleado para el ensayo en micromatrices (capítulo 3). Dado que el elemento de detección se debe colocar cerca de la superficie, el volumen de MPC 0,5 M se redujo a 10  $\mu\text{L}$  y se irradió en las condiciones ya optimizadas. La respuesta óptica del interferómetro desnudo con la MPC se registró mediante un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR-VIS) unido a un microscopio en modo de reflexión con un objetivo de 15X en el rango espectral visible-infrarrojo cercano. Posteriormente, se prepararon disoluciones de CRP en PBS-T desde 250 ng/mL hasta 3  $\mu\text{g/mL}$ , y se incubaron en serie sobre la estructura Fabry-Perot. La respuesta óptica del interferómetro se midió después de cada etapa de incubación y lavado. Los cambios en la longitud del mínimo frente a la concentración de CRP se representaron para obtener la curva dosis respuesta (Figura 4.2a).



**Figura 4.2.** a) Curvas de calibrado obtenidas por medio de técnicas interferométricas sin marcaje. Cambio de longitud de onda (nm) frente a la concentración de CRP (ng/mL en PBS-T) para estructuras Fabry-Perot y BICELLS. b) Imagen SEM de la estructura interferométrica basada en una matriz periódica de nanopilares BICELLS con 2 diámetros distintos.

Al analizar las respuestas entre 0 y 25 ng/mL, la sensibilidad calculada  $m_s$  resultó ser  $0,28 \text{ nm/ngmL}^{-1}$ , lo que proporcionó un LOD ( $U_w/m_s$ ) de 21  $\mu\text{g/mL}$ . Aquí, la incertidumbre expandida para la longitud de onda utilizada para las medidas es  $U_w = 3 u_w$  y la evaluación de la incertidumbre del número de onda ( $u_w$ ) durante el proceso de interrogación óptica es  $u_w^2 = (w_{res})^2 / 12$  siendo  $w_{res}$  la resolución del número de onda.

Finalmente, se incubó en un nuevo interferómetro Fabry-Perot, funcionalizado con MPC y caracterizado ópticamente como antes, una muestra de suero sanguíneo humano dopado con 2  $\mu\text{g/mL}$  de CRP en las mismas condiciones empleadas para el ensayo de calibración. Después del lavado, la respuesta óptica mostró un cambio de longitud de onda de 14 nm. Este cambio de longitud de onda fue interpolado en la curva de calibrado ajustada, obteniéndose una concentración de CRP de 1560 ng/mL, que corresponde a una recuperación del 78%. Es de destacar que la medida se realizó en suero y la concentración de CRP detectada se encuentra dentro del intervalo de valores clínicos significativos para riesgo de infarto (entre 1 y 5  $\mu\text{g/mL}$ ), por lo que el método sería de aplicación directa sobre el suero del paciente sin necesidad de más tratamiento de muestra.

Los BICELLS utilizados consistieron en estructuras periódicas basadas en nanopilares con dimensiones de  $d_1 = 760 \text{ nm}$  y  $d_2 = 2 \text{ }\mu\text{m}$  (Figura 4.2b), funcionalizados con MPC. Estas estructuras pueden mejorar la sensibilidad con respecto a un sensor Fabry-Perot típico sin recubrimiento de hidrogel debido a la mayor superficie efectiva. El principio detallado de detección de BICELLS se puede encontrar en publicaciones previas<sup>175,61,177</sup>.

En este caso, la concentración de MPC empleada fue incluso menor que para el Fabry-Perot, las estructuras se recubrieron por centrifugación con 0,1 M de MPC y se irradiaron como antes para crear el hidrogel. Las incubaciones en serie con concentraciones crecientes de CRP en PBS-T se llevaron a cabo como antes, y la respuesta óptica se midió después de cada etapa de incubación y lavado. Las concentraciones de CRP variaron de 0 a 5000 ng/mL. Para obtener la curva de calibrado, el cambio de longitud de onda se representó en función de la relación dosis-respuesta. En la figura 4.2a se puede ver la respuesta óptica para las estructuras BICELLS y Fabry-Perot en el mismo rango de concentraciones de CRP. La sensibilidad obtenida para BICELLS fue de  $2,88 \text{ nm/ngmL}^{-1}$  que corresponde a un límite de detección (LOD) de 2 pg/mL. Ello significa que la estructura BICELLS mejora 10 veces la sensibilidad del sensor Fabry-Perot.

Para establecer el porcentaje de recuperación de analito, se dopó la muestra de suero sanguíneo con CRP a 50 ng/mL y se incubó en una BICELLS, funcionalizada con MPC, siguiendo el mismo procedimiento que antes. Después de lavar y caracterizar su respuesta óptica, se midió un cambio de longitud de onda de 45 nm; correspondiente a una concentración de aproximadamente 40 ng/mL. En este caso, la recuperación calculada resultó ser del 80%. En el caso de las BICELLS el interferómetro también podría emplearse para detectar CRP en muestras reales, donde la dilución del suero (1/100) sería el único tratamiento de muestra requerido. Esto es una ventaja, puesto que se reduce el posible efecto matriz y la cantidad de muestra necesaria.

Así, la CRP podría cuantificarse *label-free* con estos sensores interferométricos en un amplio rango de concentraciones sin necesidad de ninguna modificación o etiquetado la aproximación estudiada. Alcanza un límite de detección inferior al de otros ensayos sin marcaje descritos, basados la mayoría de ellos en medidas de SPR. En definitiva, los LOD de 21 pg/mL y 2 pg/mL alcanzados con las estructuras de Fabry-

Perot y BICELLS funcionalizadas con hidrogel, mejoran los LOD reportados para otras aproximaciones sin marcaje como se muestra en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Tabla comparativa de la sensibilidad (LOD) alcanzado para varias técnicas de determinación sin marcaje de CRP.

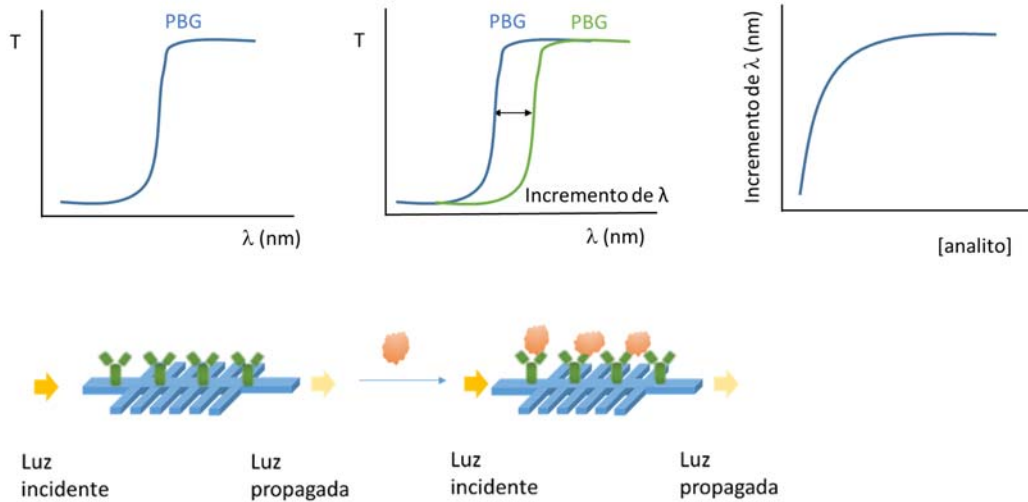
Técnica de detección	LOD	Ref.
Biosensor basado en la capacidad de los aptámeros de ARN sin etiqueta mediante una capa de PZT	0,1 mg/mL	178
Nueva detección eléctrica sin marcaje. Comparación de los métodos de <i>Dade Behring, Daiichi, Denka Seiken, Diagnostic Products Corporation, Iatron, Kamiya, Olympus, Roche, and Wako</i>	1 ng/mL	179
Biosensor espectral SPR para serodiagnóstico	0,1 ng/mL	180
Microscopio SP de barrido basado en luz blanca	1000 ng/mL	181
Aplicación de imágenes espectrales SPR	10 <sup>5</sup> ng/mL	182
Chip plasmónico con polímero mediante detección de fluorescencia	1,25 ng/mL	144
Resonancia de plasmón en superficie	1,2 ng/mL	183
Interferómetro Fabry-Perot combinado con hidrogel de PC	0,021 ng/mL	
BICELLS combinado con hidrogel de PC	0,002 ng/mL	

#### 4.2 Biosensado sin marcaje de biomarcadores cardiovasculares en estructuras nanofotónicas basadas en óptica integrada

Dentro de la detección de biomarcadores cardiovasculares también se ha estudiado la detección *label-free* en estructuras nanofotónicas basadas en guía de onda corrugadas, fabricadas en SOI.

En este tipo de transductores la zona de sensado consiste en una estructura periódica transversal a la guía, que impide que ciertas longitudes de onda se puedan propagar. Esto es denominado *bandgap* fotónico (PBG). La medida en estas estructuras se basa en el cambio de índice de refracción en la superficie debido a la

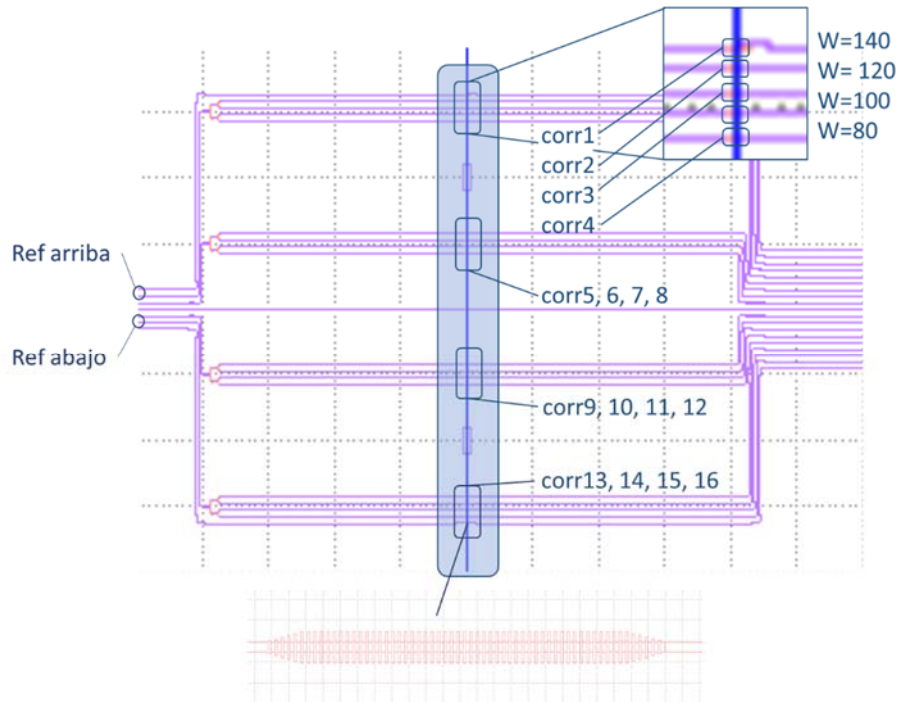
acumulación de masa sobre las mismas, y que es detectado por el campo evanescente de la guía. Para ello, se mide antes y después de que el analito esté unido a la superficie. Cuando el analito es reconocido por la sonda de captura inmovilizada en la superficie de la estructura óptica de sensado, el PBG se desplaza hacia longitudes de onda mayores como consecuencia del aumento en el índice de refracción superficial. Así, se establece una relación entre el incremento en la longitud de onda del PBG y la concentración de analito (Figura 4.3). En general, las estructuras fotónicas utilizadas en la detección de biomoléculas presentan un gran potencial en los dispositivos de análisis con detección sin marcaje. Ello es debido a las buenas prestaciones que presentan como alta sensibilidad, miniaturización, capacidad de multiplexado, respuesta rápida, reducción de los volúmenes de muestras o reactivos empleados<sup>184</sup>. Muchos de estos sensores se basan en el uso de configuraciones resonantes o interferométricas, algunos ejemplos son los interferómetros de Mach-Zehnder y los anillos resonadores. Este tipo de estructuras se han empleado con resultados muy positivos para la detección de distintos analitos, permitiendo la detección de proteínas en el rango de ng/mL<sup>45</sup> y de oligonucleótidos en el rango fM<sup>185</sup>.



**Figura 4.3.** Principio de medida de las guías corrugadas. Cuando el analito es reconocido por los receptores de la superficie de la guía, el aumento en el índice de refracción superficial provoca un desplazamiento del PBG a longitudes de onda mayores, que se puede relacionar con la cantidad de analito reconocido.

Este tipo de sensores tiene una zona de sensado muy pequeña y permite trabajar con elevadas densidades de sensores en un mismo chip, con gran potencial para la detección simultánea de múltiple de analitos.

En nuestro caso, se ha trabajado con chips que tienen cuatro grupos de sensores ópticos. En cada grupo hay cuatro guías corrugadas, con distintas periodicidades en el elemento transversal (Figura 4.4). Así, los dos grupos de sensores centrales generalmente son funcionalizados con el receptor específico del analito a detectar, mientras que los externos se bloquean. Durante el ensayo se obtiene una curva de unión al analito, donde se muestra el desplazamiento espectral de los PBGs cuando se fluye la muestra y se une la diana al sensor. Además, como la diana está marcada con un fluoróforo, se puede realizar una medida adicional de fluorescencia para verificar que ha tenido lugar la unión bioespecífica en la zona de sensado.

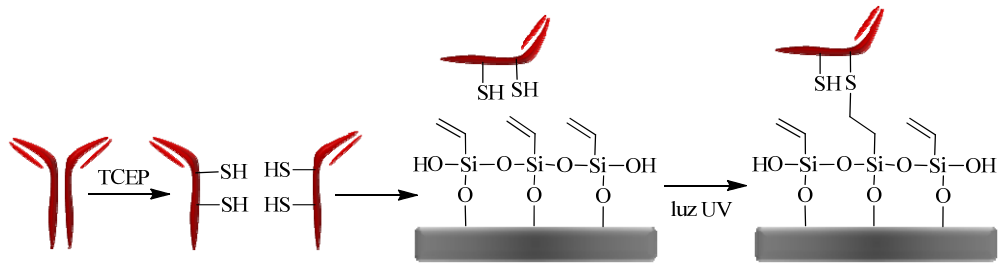


**Figura 4.4.** Diseño del chip utilizado y ampliación de la zona sensora de una guía corrugada.

Para el caso de las guías corrugadas se planteó primeramente emplear estrategias de inmovilización covalente 2D, porque se tenía experiencia previa en este sentido y porque el trabajo se realizó en el marco de un proyecto europeo donde las decisiones se tomaron teniendo en cuenta también las indicaciones del resto de socios del proyecto. Así, se planteó optimizar primeramente una técnica de inmovilización convencional en 2D, para después, comparar los resultados con los obtenidos inmovilizando mediante el uso de los hidrogeles desarrollados en el capítulo 3 (inmovilización 3D).

Para ello, se estudió la inmovilización covalente de fragmentos de medios anticuerpos (hlgGs). Así, en primer lugar, se derivatizó el SOI con vinilo mediante foto-acoplamiento tiol-eno (Figura 4.5). A continuación, se unió covalentemente el biorreceptor a la superficie modificada de SOI.





**Figura 4.5.** Esquema del proceso de inmovilización covalente asistida por luz UV, mediante la reacción *click* tiol-eno entre los hlgGs y la superficie silanizada de los sensores SOI.

Este tipo de ensayos fueron llevados a cabo para un sistema modelo BSA/aBSA y después ampliado a biomarcadores cardiovasculares, como CRP, troponina cardíaca y mioglobina.

Así, dentro del proyecto PHOCNOSIS, se llevó a cabo la optimización de la inmovilización de medios anticuerpos, de forma rápida, efectiva y en condiciones biocompatibles, mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno catalizada por luz<sup>90</sup>. Con pocos segundos de irradiación se consiguieron inmovilizaciones efectivas. Los ensayos se llevaron a cabo en formato micromatriz de fluorescencia en superficies planas de SOI funcionalizadas con vinilo. Además, la irradiación se puede hacer de forma espacialmente selectiva usando una fotomáscara para fotoactivar únicamente las zonas en que actúa la luz. Sin embargo, nosotros comparamos chips en los que se irradió y chips sin irradiación, para simplificar el proceso experimental.

El uso de hlgGs se debe a dos motivos. El primero es emplear un fragmento que da lugar a una capa de reconocimiento de espesor reducido que se traduce en una mayor interacción con el campo evanescente, incrementando así la sensibilidad del dispositivo, y además los medios anticuerpos permiten tener una orientación adecuada de los sitios de unión al acrilato. El segundo motivo es que los fragmentos de anticuerpo disponen de grupos tiol libres o puentes disulfuro más accesibles, para poder llevar a cabo el anclaje a la superficie por acoplamiento tiol-eno.

La ventaja de este tipo de inmovilización es que permite controlar la localización de los receptores en el área sensora del transductor, irradiando selectivamente en las zonas donde se quiere llevar a cabo el anclaje. De esta manera se podría aumentar

la sensibilidad, pues el analito es retenido únicamente en la zona donde es medido y donde se encuentran los receptores anclados, sin perderse analito en las zonas donde la interacción no puede ser medida.

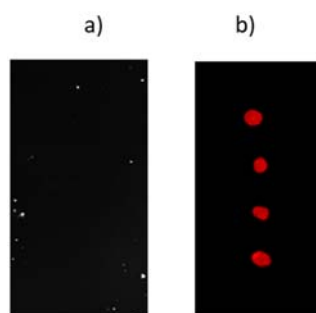
#### 4.2.1 Silanización de la superficie de óxido de silicio y ensayos de inmovilización de medios anticuerpos en formato micromatriz

La funcionalización de la superficie de SOI plana se realiza con grupos vinil para poder llevar a cabo la reacción de acoplamiento tiol-eno con los medios anticuerpos. Para ello los chips de SOI se limpian e irradian durante 7 min con luz UV a 254 nm para activar la superficie aumentando el número de grupos hidroxilo, después se silanizan por inmersión durante 2 h en una disolución al 2% de trietoxivinilsilano (TEVS) en tolueno y posteriormente son curados 20 min a 90 °C. La caracterización de la silanización se llevó a cabo antes y después del proceso de funcionalización mediante medida del ángulo de contacto en agua (WCA), el cual aumenta debido a la hidrofobicidad de los grupos alqueno (WCA inicial aprox. 30°, WCA final aprox. 80°). También se caracterizó su grosor por elipsometría resultando ser 4,5 nm.

En paralelo se optimizó el proceso de corte e inmovilización de los anticuerpos mediante reducción selectiva de la región bisagra. Los medios anticuerpos se generaron mediante tratamiento con TCEP (tris 2-carboxietilfosfina) del anticuerpo entero. También se probaron otros reductores como 2-mercaptoetilamina (MEA), pero se obtuvo una reducción en exceso, desnaturalizando al anticuerpo y no mostrando reconocimiento del analito. Así, usando TCEP se probaron diferentes temperaturas, tiempos y concentraciones de ensayo. Las condiciones elegidas se basaron en la mejor capacidad de reconocimiento del medio anticuerpo. Además, este anticuerpo generado por la reducción con TCEP con el sistema modelo aBSA (policlonal de ratón) fue caracterizado mediante electroforesis SDS-PAGE. El número de tioles disponibles se determinó mediante el ensayo de Ellmans. Este experimento mostró que el haBSA preparado por reducción de TCEP tiene aproximadamente 4 grupos tiol libres, mientras que cuando se reducían anticuerpos monoclonales de ratón, por ejemplo, para detectar Troponina cardíaca I (haCTnI) se obtenían 3 grupos. En ambos casos los valores están de acuerdo con el número de puentes disulfuro de la región bisagra. Además, indica que la zona de reconocimiento está intacta. Para el caso del haBSA, usado como sistema modelo, previamente a la reducción selectiva,

se purificó mediante columna de proteína A, y luego una parte se marcó con Alexa647 para llevar a cabo los estudios de inmovilización en micromatriz de fluorescencia.

Una vez comprobada la silanización de las superficies de los chips de SOI, y obtenidos los hIgGs, se realizaron pruebas para poner a punto el protocolo de inmovilización TEC mediante luz UV. Para ello, se marcó haBSA con Alexa647 (haBSA\*) en PBS, y se depositó en la superficie de diferentes chips silanizados. Para inducir la reacción entre los grupos vinilo de la superficie y los tioles del haBSA\* se irradió el chip con luz UV durante 5 s (254 nm) con una potencia de 6 mW/cm<sup>2</sup>. Como control, para comprobar el papel de la luz UV se depositó hBSA\* en otro chip silanizado, pero no se irradió. Posteriormente, los chips se lavaron con PBS-T y agua, se secaron y se midió la fluorescencia. En la figura 4.6 se muestran los resultados, donde podemos ver claramente que sólo se observa respuesta cuando el chip es irradiado con luz UV, lo que confirma la naturaleza del proceso de fotobiofuncionalización.



**Figura 4.6.** Medidas de fluorescencia para dos superficies de SOI silanizadas con TEVS en las que se deposita haBSA\*. a) Chip no irradiado con luz UV, b) Chip irradiado con luz UV, la señal observada confirma que la inmovilización mediante reacción TEC ha sido exitosa.

La densidad de inmovilización de los medios anticuerpos se determinó inmovilizando distintas concentraciones de haBSA\* (0-20 µg/mL), siguiendo el protocolo descrito para el formato de micromatrices, resultando ser 2,4 pmolcm<sup>-2</sup>, con una desviación estándar de 8%, lo que indica una buena reproducibilidad de inmovilización<sup>90</sup>.

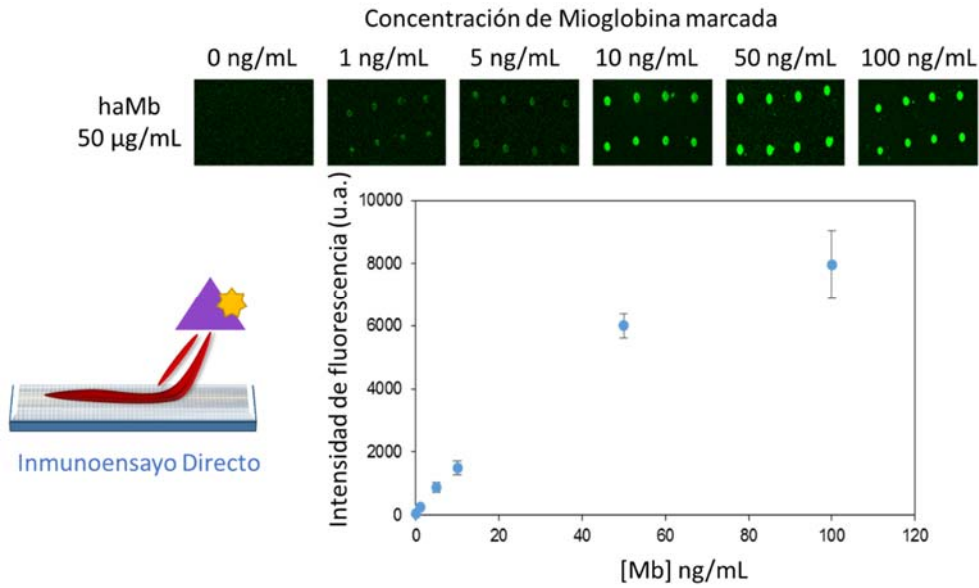
Para los ensayos de biorreconocimiento, fueron impresas en la superficie funcionalizada con grupos vinil, diferentes concentraciones de haBSA (25 a 500

$\mu\text{g/mL}$ ), ahora sin marcar, luego se irradiaron con luz UV para inducir la reacción TEC. Además, el anticuerpo entero también se inmovilizó en una línea de la micromatriz para compararlo con el medio anticuerpo. Después de lavar, los chips eran incubados durante 30 min en oscuridad con diferentes concentraciones de BSA\*. La fluorescencia se midió empleando el lector de fluorescencia de superficies con los chips limpios y secos. En todos los casos, los medios anticuerpos proporcionaban los mejores resultados, obteniendo hasta 7 veces más intensidad de señal que al inmovilizar el anticuerpo entero.

Una vez optimizada la metodología para el sistema modelo, esta se aplicó a los analitos de interés clínico (CRP, cTn y Mb). Así, se realizaron ensayos de biorreconocimiento similares a los descritos anteriormente con los medios anticuerpos específicos de las proteínas de interés. En estos casos la fluorescencia se midió con un scanner confocal de fluorescencia para micromatrices. La concentración mínima detectada de CRP\* fue de 2 ng/mL.

Para los ensayos con troponina se realizaron inmunoensayos tipo sándwich, ya que la troponina no soporta las condiciones de marcado. La sensibilidad alcanzada (LOD) fue de 10 ng/mL, donde la troponina se utilizaba en PBS-T con 10% de suero.

En el caso de la mioglobina se pudo trabajar tanto en formato directo, con la mioglobina marcada, como en formato sándwich, siendo capaces de detectar hasta 1 ng/mL en el formato directo y 50 ng/mL en el formato sándwich (Figura 4.7). Este resultado mejora la sensibilidad reportada por los autores<sup>126</sup>, en torno a 200-300 ng/mL.



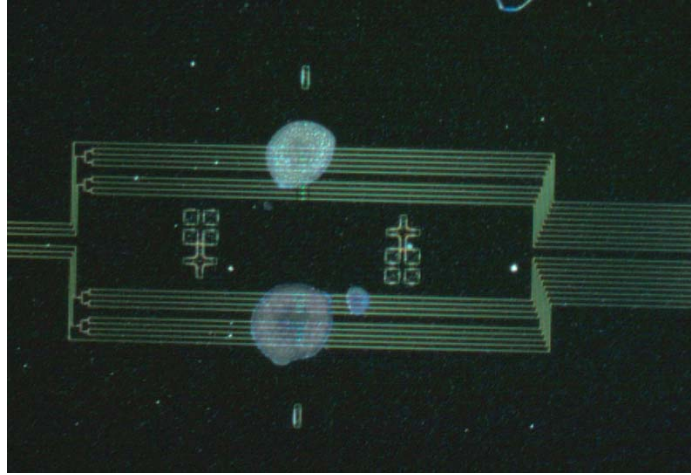
**Figura 4.7.** Curva de reconocimiento de mioglobina marcada en una micromatriz con haMb inmovilizado vía TEC. El tampón utilizado fue PBS-T con 10% de suero. La concentración mínima detectada fue de 1 ng/mL.

En definitiva, se pudo comprobar que el protocolo de biofuncionalización era efectivo sobre el material constituyente de las guías corrugadas. Así, los IgG se inmovilizaban de manera biodisponible y con mejores prestaciones que el anticuerpo completo. Por ello, se procedió a transferir los protocolos a las guías corrugadas para realizar el biosensado nanofotónico.

#### 4.2.2 Inmovilización asistida por luz ultravioleta de medios anticuerpos

Una vez fueron optimizados los ensayos en formato de micromatriz, se estudió su transferencia a las estructuras fotónicas basadas en guías corrugadas.

Para ello, como se mencionó anteriormente, se funcionalizó la superficie de las guías con grupos vinilo mediante inmersión en TEVS durante 2h al 2% en tolueno seco anhidro. Al igual que en los ensayos de micromatrices se imprimieron *spots* de una disolución de haBSA (400 µg/mL) en las zonas de sensado (Figura 4.8) y se irradiaron 5 s a 254 nm para inmovilizar la sonda.

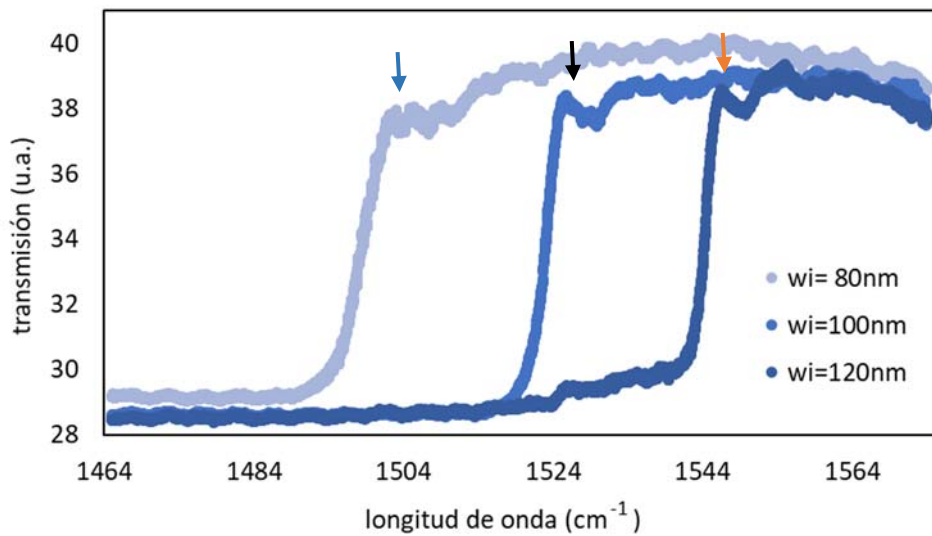


**Figura 4.8.** Fotografía de los sensores biofuncionalizados. Las manchas corresponden a la disolución de haBSA depositada en la superficie de sensado de las estructuras nanofotónicas.

Una vez que los biorreceptores de haBSA se inmovilizan en la superficie se fluye BSA con el objetivo de ser detectado por las guías corrugadas. Luego, se fluye un anticuerpo secundario a-BSA marcado con Alexa 647 operando en formato sándwich. Para ello, se realizaron ensayos en los que se inmovilizaba el medio anticuerpo y se fluían distintas disoluciones de BSA (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\text{ng}/\text{mL}$ , 10  $\text{ng}/\text{mL}$ , 1  $\text{ng}/\text{mL}$ ) en tampón PBS 0,5x. A continuación, se incubaba con aBSA\* (50  $\text{ng}/\text{mL}$ ) durante 30 min, se lavaba, se secaba y se registraba la fluorescencia. En las medidas fotónicas de diferentes ensayos no se pudo concluir la detección de la proteína. No obstante, cuando las estructuras eran examinadas en el lector de fluorescencia de superficies sí que se observó señal de fluorescencia que evidenciaba que se había producido biorreconocimiento específico.

En vista de estos resultados se decidió estudiar el proceso de biofuncionalización de los hIgGs asistido por luz UV a tiempo real mediante la inmovilización *in situ* en las guías corrugadas. Para ello, se fluyen disoluciones de dicha sonda sobre el chip que contiene estructuras tipo PBG. En primer lugar, se fluía PBS para tener la señal correspondiente al tampón, luego se fluía la disolución con la sonda sin irradiar para comprobar que, en ausencia de irradiación, no se producía la inmovilización, y a continuación se encendía la lámpara de 254 nm durante 20 minutos. Finalmente se

fluía tampón PBS. Durante todo el experimento el flujo se mantenía constante a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . En general, las gráficas obtenidas muestran desplazamientos de los PBG en las guías corrugadas, como prueba de una inmovilización exitosa. En la figura 4.9 se muestran los espectros iniciales en disolución salina tamponada con fosfato (PBS 1x) en las estructuras fotónicas de un grupo de sensores que tiene las guías corrugadas dentro del rango de medida (excluyen por tanto  $w_i = 140 \text{ nm}$ ). El aumento del ancho de los elementos transversales,  $w_i$ , produce un desplazamiento del lóbulo del PBG hacia longitudes de onda más largas. La detección se realiza con un seguimiento de la posición del lóbulo que aparece en el PBG para monitorizar el cambio espectral cuando la biofuncionalización tiene lugar en la superficie de los sensores.

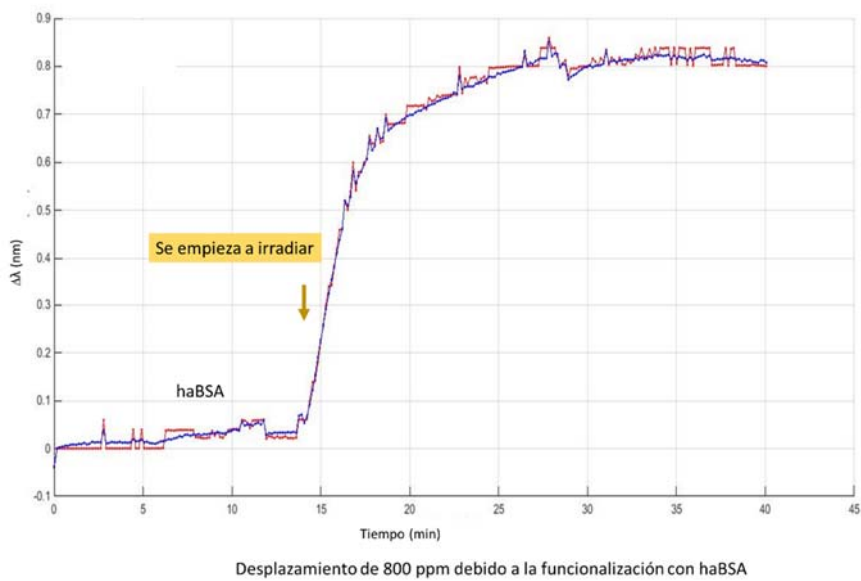


**Figura 4.9.** Espectro inicial en PBS 1x para las estructuras de detección de PBG dentro de un grupo de sensores (las unidades de transmisión vienen dadas por los valores ADC proporcionados por la cámara IR). Los lóbulos marcados con flecha son los que se utilizan en cada guía para monitorizar su desplazamiento durante el proceso de biofuncionalización.

En la figura 4.10 se muestra la evolución en la longitud de la onda donde aparece el PBG en uno de los sensores, en función del momento del experimento de

inmovilización. Se puede apreciar claramente que el desplazamiento del PBG, y por tanto la inmovilización del haBSA ocurre únicamente cuando se produce la irradiación.

Por tanto, se puede calificar como exitosa la inmovilización del medio anticuerpo usando luz UV mediante la reacción tiol-eno. Sin embargo, al continuar con el ensayo realizar el ensayo en formato sándwich fluyendo la proteína BSA y posteriormente aBSA\*, no se obtuvieron cambios en las señales fotónicas en ningún caso. Cuando una vez finalizado el experimento examinaba la fluorescencia en la superficie sí que se obtenía señal, indicando que el biorreconocimiento había tenido lugar a pesar de no ser detectado en el transductor fotónico.

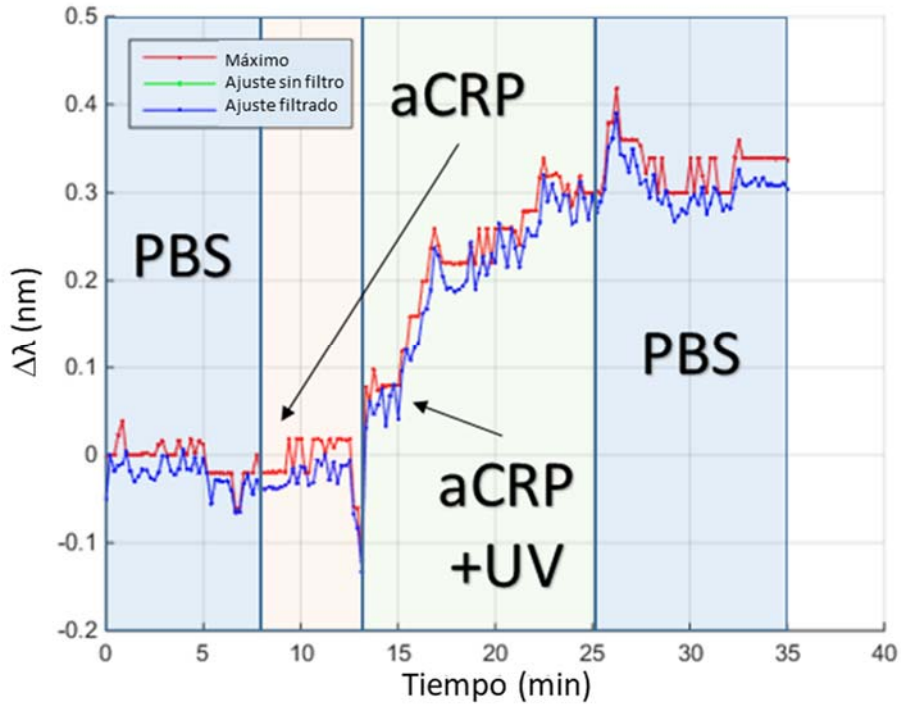


**Figura 4.10.** Evolución de la longitud de onda donde aparece el PBG, para uno de los sensores, cuando se fluye haBSA sin y con irradiación.



#### 4.2.2.1 *Ensayo de CRP*

Para la puesta a punto de un inmunoensayo para la determinación de CRP utilizando el sensor con guía corrugadas, se procede según se ha descrito para el sistema BSA. Primero se optimizó el ensayo en formato de micromatriz y luego en las estructuras fotónicas. En primer lugar, se analizó la reacción tiol-eno mediante luz UV en la cual la sonda elegida es medio anticuerpo contra CRP. Como antes, se utilizó un sistema fluídico de PDMS sobre el cual se situó la lámpara de 254 nm. Primero, se fluyó el tampón, luego una disolución del medio anticuerpo a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sin irradiar y finalmente irradiando. Cuando el medio anticuerpo fluye sin irradiar no se observan cambios en el índice de refracción, por lo que no se aprecia desplazamiento de la señal. Pero al irradiar, sí se observa el aumento en la longitud de onda debido a que la sonda se está anclando a la superficie fotónica. En la figura 4.11 se observa cómo la inmovilización del medio anticuerpo se produce sobre el minuto 13, que es cuando comienza la irradiación con luz UV y se activa la reacción TEC. Por ello, se produce una buena respuesta de sensado cuando la sonda se une a la superficie. Sin embargo, las señales obtenidas resultaron peores a las del sistema BSA.

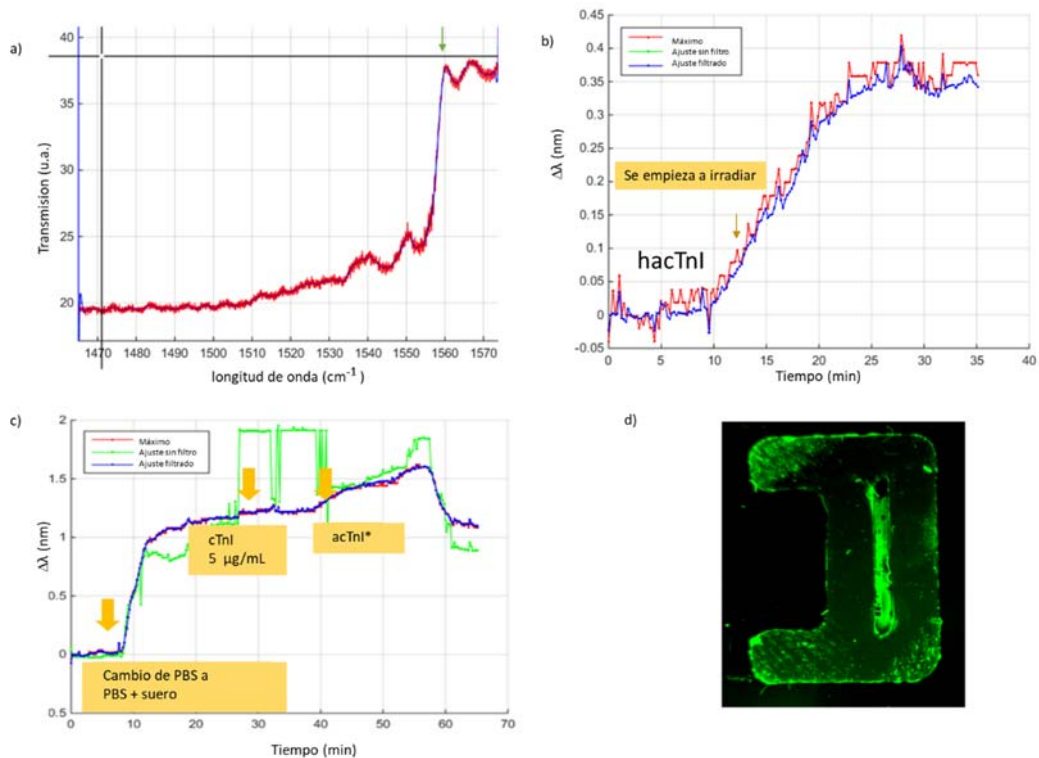


**Figura 4.11.** Representación gráfica de cambio de índice de refracción del sistema CRP. Se observa un cambio en la señal debido a la reacción tiol-eno. Dicho cambio se produce cuando se irradia con luz UV.

Una vez inmovilizado el medio anticuerpo se probó a detectar CRP mediante un ensayo tipo directo. Para ello, se fluyeron distintas concentraciones de CRP 0,1-1 mg/mL en PBST y luego aCRP\* a 10  $\mu\text{g/mL}$ . En este caso, sólo se observaron cambios en la señal al usar una concentración baja de proteína. Cuando se ensayaron concentraciones superiores no se observaban cambios significativos en la señal. Cuando a continuación se fluyó aCRP\*, se observan cambios en las señales para algunas de las estructuras, pero los resultados no fueron concluyentes. Sin embargo, como en el caso anterior observándose una intensidad de fluorescencia observada era del orden de 4000 u.a. que indicaba que, aunque se había producido el reconocimiento pero que no fue detectado por el sensor nanofotónico.

#### 4.2.2.1 Ensayo de troponina

Otro de los sistemas estudiados fue el de las troponinas cardíacas I y T. Al igual que en los ensayos anteriores se estudió en primer lugar la inmovilización del medio anticuerpo en la superficie nanofotónica. Para ello, se procedió de manera similar a los casos descritos anteriormente. Así, se puede observar como la fotoinmovilización se produce en algunas de las estructuras de sensado y en otras no. Cuando se fluía la proteína cTnI se observó la unión de dicha proteína en algunas de las estructuras para concentraciones de proteína mayores de 1000 ng/mL. En el último paso, se usó el anticuerpo acTnI\* para comprobar si había tenido lugar el biorreconocimiento (Figura 4.12).



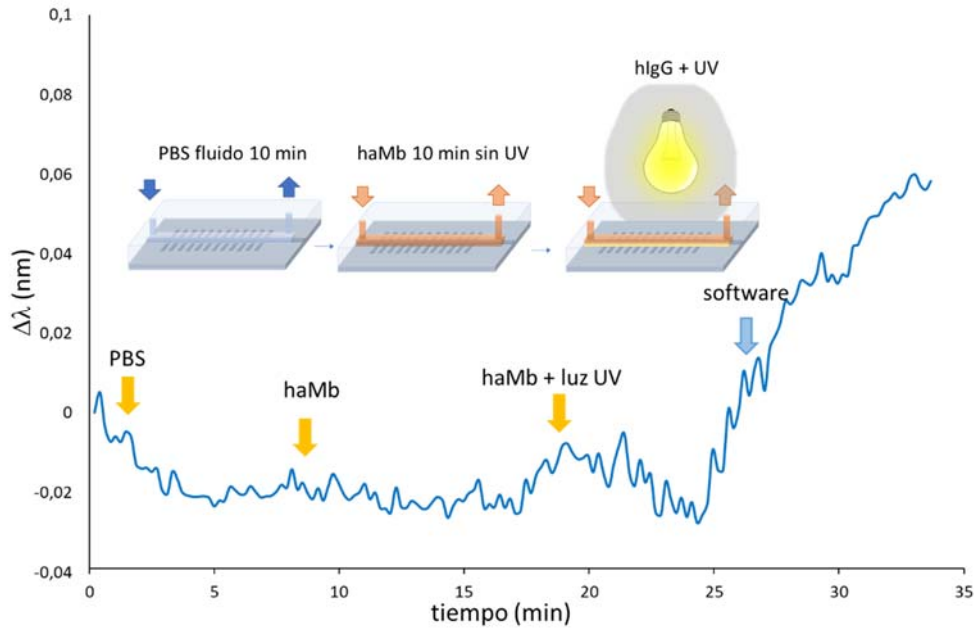
**Figura 4.12.** Espectro de transmisión de una de las guías corrugadas (a) y evolución de la longitud de onda donde aparece un pico cuando se fluye hacTnI sin y con irradiación (b) ensayo de reconocimiento de cTnI en formato sándwich (c) e imagen de la fluorescencia registrada tras el ensayo con el lector de fluorescencia (d).

Al igual que en los ensayos anteriores se consiguió el anclaje del medio anticuerpo mediante la reacción TEC, aunque la detección de la troponina no fue concluyente porque las señales obtenidas con el nanosensor no fueron buenas el no poderse relacionar variación de concentración y señal.

#### *4.2.2.1 Ensayo de mioglobina*

Finalmente se realizó el ensayo con el sistema de la mioglobina (Mb). Para ello, se funcionalizó un chip de SOI con estructuras nanofotónicas mediante grupos vinilo. El chip se introdujo en el sistema fluídico de medida fotónica y se monitorizó la señal mientras se fluía la disolución del medio anticuerpo de mioglobina con y sin activación con luz UV.

El protocolo de ensayo seguido consistió en fluir la disolución de anticuerpo haMb diluido en PBS1x (10 mg/mL) con la lámpara apagada durante 10 min, evitando la unión de los hIgGs que simplemente fluirán a través del sistema sin que se produzca más variación en el índice de refracción que el debido al cambio del tampón. Sin embargo, cuando se encendía la lámpara UV (254nm) e incide en los hIgGs, se produjo la reacción de acoplamiento del anticuerpo a la superficie del chip, observándose una bajada en la potencia y un aumento en el índice de refracción que desplaza la longitud de onda del pico monitorizado a valores mayores, como se observa en la Figura 4.13.



**Figura 4.13.** Gráfica de la evolución temporal en el índice de refracción para el ensayo de Mb. En el minuto 20 aumenta el índice de refracción, debido a que al irradiar con luz UV se activa la reacción de acoplamiento tiol-eno. Las señales están desplazadas por un problema del software.

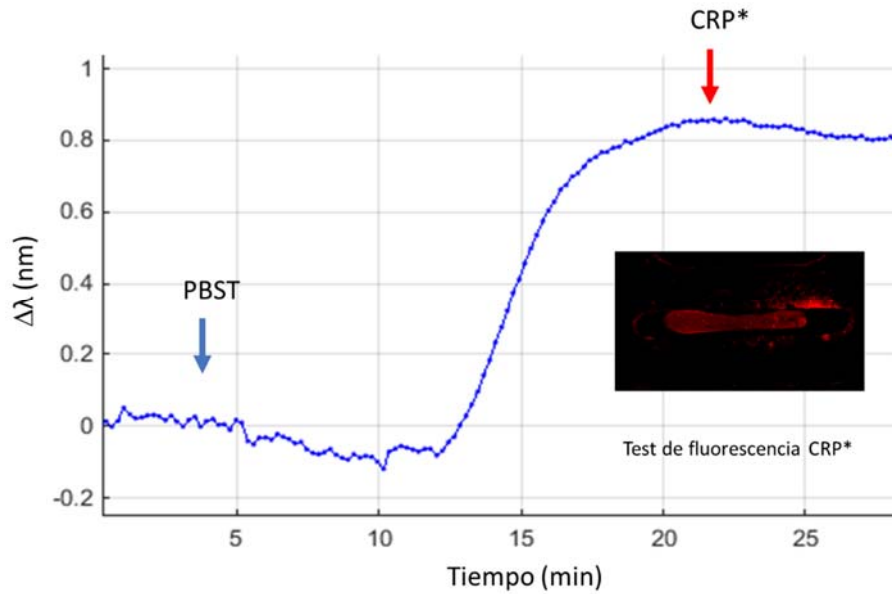
En un segundo ensayo con el sistema de Mb, se analizó la interacción de la Mb\* con los hlgGs unidos a la superficie del chip. Inicialmente se fluyó Mb\* a 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y a continuación el tampón PBST y finalmente Mb\* a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sin embargo, en este caso no se observaron cambios en la señal. Esto puede deberse a que la mioglobina tiene un tamaño y una masa pequeños, por lo que el cambio en el índice de refracción es despreciable y no distinguible de la señal observada. Como en los casos anteriores, la fluorescencia evidenció que el biorreconocimiento se había producido pese a que la guía corrugada no fue capaz de detectarlo.

En conclusión, se demostró que al fluir la disolución con el medio anticuerpo e irradiar con luz UV tiene lugar el anclaje de dicha sonda, siendo necesaria la irradiación UV en todos los casos (CRP, cTnI y Mb). Sin embargo, el chip fotónico que opera en formato *label-free* no fue capaz de detectar las proteínas. Solo cuando se usaron reactivos marcados con Alexa, se obtuvieron imágenes de fluorescencia que

evidenciaron el biorreconocimiento. Este resultado también demuestra que la irradiación mantiene la actividad de la proteína (halgG) siendo capaz de reconocer específicamente a los diferentes biomarcadores estudiados.

#### *4.2.2.4 Ensayo con hidrogeles*

En este apartado se exponen los resultados obtenidos al funcionalizar con hidrogeles las nanoestructuras propuestas en este capítulo con el fin de determinar CRP de forma similar al capítulo 3. Para ello, se depositó en la zona nanoestructurada una gota (30 nL) del precursor del gel de fosforilcolina y se irradió 7 min a 254 nm. A continuación, el chip se introdujo en el sistema fotónico y se fluyeron distintas concentraciones de CRP\* (0.25-3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en PBST con calcio. Al igual que en los ensayos anteriores se fluyó sólo tampón para establecer la línea base. A continuación, se fluyeron las disoluciones con la CRP\*, observando un cambio en el índice de refracción siendo dicho cambio más notable cuando se fluía CRP\* a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sin embargo, la detección no se produjo en todas las guías corrugadas del chip.



**Gráfica 4.14.** Evolución temporal de la señal de detección de CRP (3 µg/mL) usando el chip funcionalizado con el hidrogel de fosforilcolina y test de fluorescencia de CRP\*.

También, se realizó el test de fluorescencia una vez finalizó el ensayo fotónico observándose señal en todo el canal donde estaba el hidrogel, con una intensidad de 5000 u.a., comparable a las señales observadas en el capítulo 3. Pese a la falta de reproducibilidad detectada, los resultados son prometedores y apuntan a que este tipo de aproximación podría constituir una mejora considerable de la sensibilidad, dejando el camino abierto a posteriores investigaciones.

### 4.3 Conclusión

De entre los diferentes materiales nanoestructurados estudiados para la detección sin marcaje, como los BICELLS que aumentaron la sensibilidad del sensor 10 veces con respecto a las estructuras Fabry-Perot. Además, integración de estas estructuras, basadas en el principio de medición BICELLS, e hidrogeles, demostrando ser una herramienta poderosa para determinar analitos minoritarios y traza, siendo

una aproximación especialmente interesante en matrices complejas donde la adsorción no específica puede ser un problema limitante para la detección.

El hidrogel empleado en estos desarrollos se forma por fotopolimerización de los grupos acrilato, y presenta unidades de fosforilcolina, receptor específico de CRP, además de tener propiedades *antifouling*. Por tanto, la combinación de nanoestructuras e hidrogeles permite la obtención de resultados en poco tiempo, reduciendo el número de etapas y simplificando el proceso.

Por otro lado, se ha implementado un protocolo de biofuncionalización asistida por luz UV para la inmovilización de biorreceptores con grupos tiol disponibles, en chips de silicio funcionalizados con vinilo. El hecho de que se requiera luz UV para inducir la inmovilización permite que solo las posiciones específicas donde se colocan las estructuras de detección sean biofuncionalizadas, lo que es interesante para desarrollar biosensores con diferentes biorreceptores y realizar multiplexado a gran escala. También, hemos podido monitorizar esta inmovilización foto-catalítica, a tiempo real, usando un chip nanofotónico integrado, que muestra que los grupos vinilo en la superficie y los grupos tiol de los biorreceptores no reaccionan hasta que la luz UV está presente. Este resultado demuestra la posibilidad de utilizar sensores nanofotónicos para estudiar, a tiempo real, los mecanismos de las reacciones fotoinducidas.

Además, esta es la primera vez que las estructuras fotónicas con guía corrugadas se biofuncionalizan con medios anticuerpos, lo que sin duda introduce una ventaja en términos de mayor densidad de cobertura de la superficie, menor grosor de la capa de reconocimiento y orientación adecuada de los sitios de unión de los anticuerpos, mejorando significativamente las prestaciones del biosensor.



#### 4.4 Referencias

1. Clark, L. C. & Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. New York Acad. Sci.* **102**, 29–45 (1962).
2. Luchansky, M. S. & Bailey, R. C. High-Q optical sensors for chemical and biological analysis. *Anal. Chem.* **84**, 793–821 (2012).
3. Li, S. *et al.* Dextran hydrogel coated surface plasmon resonance imaging (SPRI) sensor for sensitive and label-free detection of small molecule drugs. *Appl. Surf. Sci.* **355**, 570–576 (2015).
4. R., D., Thevenot, Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* **71**, 2333–2348 (1999).
5. Kim, E. *et al.* Phosphocholine-modified magnetic nanoparticles for isolation of C-reactive protein from human serum. *Sep. Sci. Technol.* **48**, 2600–2607 (2013).
6. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 121–131 (2001).
7. Hulanicki, A., Glab, S. & Ingman, F. Chemical sensors definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* **63**, 1247–1250 (1991).
8. Barbulovic-nad, I. *et al.* Bio-microarray fabrication techniques — a review. **26**, 237–259 (2008).
9. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brownt, P. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science (80- )*. **270**, 467–470 (1995).
10. Ekins, R. P. Multi-analyte immunoassay. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**, 155–168 (1989).
11. Hu, S., Xie, Z., Qian, J., Blackshaw, S. & Heng, Z. Functional protein microarray technology. *Rev. Syst. Biol. Med.* **3**, 255–268 (2011).
12. Ventimiglia, G. & Petralia, S. Recent advances in DNA microarray technology: an overview on production strategies and detection methods. *Bionanoscience* 428–450 (2013).
13. Kostrzynska, M. & Bachand, A. Application of DNA microarray technology

- for detection, identification, and characterization of food-borne pathogens. *Can. J. Microbiol.* **8**, 1–8 (2006).
14. Heller, M. J. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **4**, 129–153 (2002).
  15. Dutta, S. Point of care sensing and biosensing using ambient light sensor of smartphone: Critical review. *Trends Anal. Chem.* **110**, 393–400 (2019).
  16. Estevez, M. C., Alvarez, M. & Lechuga, L. M. Integrated optical devices for lab-on-a-chip biosensing applications. *Laser Photonics Rev.* **6**, 463–487 (2012).
  17. Petryayeva, E. & Algar, W. R. Toward point-of-care diagnostics with consumer electronic devices: the expanding role of nanoparticles. *RSC Adv.* **5**, 22256–22282 (2015).
  18. Kosack, C. S., Page, A. & Klatser, P. R. A guide to aid the selection of diagnostic tests. *Bull World Heal. Organ* **95**, 639–645 (2017).
  19. Mcgarraugh, G., Brazg, R. & Weinstein, R. FreeStyle navigator continuous glucose monitoring system with TRUstart algorithm, a 1-hour warm-up time. *J. Diabetes Sci. Technol.* **5**, 99–106 (2011).
  20. Martínez, A. *et al.* Ultrafast all-optical switching in a silicon-nanocrystal-based silicon slot waveguide at telecom wavelengths. *Nano Lett.* **10**, 1506–1511 (2010).
  21. Lia, J., Tana, S. N. & Geb, H. Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for hydrogen peroxide. *Anal. Chim. Acta* **335**, 137–145 (1996).
  22. Velychko, T. P. *et al.* A novel conductometric urea biosensor with improved analytical characteristic based on recombinant urease adsorbed on nanoparticle of silicalite. *Nanoscale Res. Lett.* **11**, 106 (2016).
  23. Avella-Oliver, M., Carrascosa, J., Puchades, R. & Maquieira, A. Diffractive protein gratings as optically active transducers for high-throughput label-free immunosensing. *Anal. Chem.* **89**, 9002–9008 (2017).
  24. Llandro, J., Palfreyman, J. J., Ionescu, A. & Barnes, C. H. W. Magnetic biosensor technologies for medical applications: a review. *Med Biol Eng Comput* **48**, 977–998 (2010).
  25. Kawamura, A. & Miyata, T. Biosensors. in *Biomaterials Nanoarchitectonics*

- 157–176 (2016).
26. Borisov, S. M. & Wolfbeis, O. S. Optical biosensors. *Chem. Rev.* **108**, 423–461 (2008).
  27. Yalow, R. S. & Berson, S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *Obes. Res.* **4**, 583–600 (1996).
  28. Crivianu-Gaita, V., Romaschin, A. & Thompson, M. High efficiency reduction capability for the formation of Fab' antibody fragments from F(ab)2 units. *Biochem. Biophys. Reports* **2**, 23–28 (2015).
  29. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* **5**, 1–17 (2014).
  30. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. New York: Garland Science **91**, (2001).
  31. Killard, A. J., Deasy, B., O'Kennedy, R. & Smyth, M. R. Antibodies: production, functions and applications in biosensors. *Trends Anal. Chem.* **14**, 257–266 (1995).
  32. Lopez de Silanes, J., Mancilla Nava, R. & Paniagua Solis, J. Pharmaceutical composition of F(Ab)2 fragments of antibodies and method for preparation. (2002).
  33. Hage, D. S. Immunoassays. **65**, 420–424 (1993).
  34. Chen, G. *et al.* A review of enhancers for chemiluminescence enzyme immunoassay. *Food Agric. Immunol.* **28**, 315–327 (2017).
  35. Salm, P. *et al.* Evaluation of a fluorescent polarization immunoassay for whole blood everolimus determination using samples from renal transplant recipients. *Clin. Biochem.* **39**, 732–738 (2006).
  36. Ateto, A. A. The structures of DNA and RNA. in *Molecular Biology of the Gene Edition: Fifth Edition* 1–33 (2002).
  37. Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H. & Vogt, P. H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* **23**, 504–511 (1997).
  38. Board, E. A. Recent advances in DNA biosensor. *Sensors Transducers J.* **92**, 122–133 (2008).

39. Cristofolini, L. *et al.* The structure of DNA-containing complexes suggests the idea for a new adaptive sensor. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **321**, 158–162 (2008).
40. Sampson, T. Aptamers and SELEX: the technology. *World Pat. Inf.* **25**, 123–129 (2003).
41. Sassolas, A., Leca-Bouvier, B. D. & Blum, L. J. DNA biosensors and microarrays. *Chem. Rev.* **108**, 109–139 (2008).
42. Bagni, G., Osella, D., Sturchio, E. & Mascini, M. Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies. *Anal. Chim. Acta* **573–574**, 81–89 (2006).
43. Wang, J. *et al.* DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review. *Anal. Chim. Acta* **347**, 1–8 (1997).
44. Sassolas, A., Hayat, A. & Marty, J.-L. Electrochemical biosensors for the detection of microcystins: recent advances and perspectives. *Biosens. Recent Adv. Math. challenges* **4**, 97–109 (2014).
45. Huertas, C. S., Fariña, D. & Lechuga, L. M. Direct and label-free quantification of micro-RNA-181a at attomolar level in complex media using a nanophotonic biosensor. *ACS Sensors* **1**, 748–756 (2016).
46. Zhang, G. J., Chua, J. H., Chee, R. E., Agarwal, A. & Wong, S. M. Label-free direct detection of MiRNAs with silicon nanowire biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 2504–2508 (2009).
47. Francis, T. S. Y. & Shizhuo, Y. Fiber optic sensors. in (ed. Yin, F. T. S. Y. S.) 1–509 (2002).
48. Angenendt, P. Progress in protein and antibody microarray technology. *Drug Discov. today targets* **10**, 1–9 (2005).
49. Patel, P. N., Mishra, V. & Mandloi, A. S. Optical biosensors: fundamentals & trends. *J. Eng. Res. Stud.* **1**, 15–34 (2010).
50. Mannelli, I. *et al.* DNA immobilisation procedures for surface plasmon resonance imaging (SPRI) based microarray systems. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 803–809 (2007).
51. Ruiz-Tórtola, A. *et al.* Experimental study of the evanescent-wave photonic sensors response in presence of molecular beacon conformational changes.

*J. Biophotonics* **11**, e201800030 (2018).

52. Escorihuela, J. *et al.* Dual-polarization interferometry: a novel technique to light up the nanomolecular world. *115*, 265–294 (2015).
53. Juste-dolz, A. *et al.* New structural insights into the role of TROVE2 complexes in the on-set and pathogenesis of systemic lupus erythematosus determined by a combination of QCM-D and DPI. *Anal. Bioanal. Chem.* **411**, 4709–4720 (2018).
54. Conteduca, D., Dell’Olio, F., Ciminelli, C. & Armenise, M. N. New miniaturized exhaled nitric oxide sensor based on a high Q/V mid-infrared 1D photonic crystal cavity. *Appl. Opt.* **54**, 2208–2217 (2015).
55. Tao, X. Wearable photonics based on integrative polymeric photonic fibres. in *Wearable Electronics and Photonics* 136–154 (Woodhead Publishing Limited, 2005).
56. Yablonovitch, E. Inhibited spontaneous emission in solid-state physics and electronics. *Phys. Rev. Lett.* **58**, 13–20 (1987).
57. Goyal, A. K. & Pal, S. Design and simulation of high sensitive photonic crystal waveguide sensor. *Optik (Stuttg.)* **126**, 240–243 (2015).
58. Liu, Q. *et al.* Biosensors and bioelectronics Mach–Zehnder interferometer (MZI) point-of-care system for rapid multiplexed detection of microRNAs in human urine specimens. *Biosens. Bioelectron.* **71**, 365–372 (2015).
59. Sanza, F. J. *et al.* Bio-photonic sensing cells over transparent substrates for anti-gestrinone antibodies biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4842–4847 (2011).
60. Holgado, M. *et al.* Label-free biosensing by means of periodic lattices of high aspect ratio SU-8 nano-pillars. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 2553–2558 (2010).
61. Lavín, Á., Casquel, R., Sanza, F. J., Laguna, M. F. & Holgado, M. Efficient design and optimization of bio-photonic sensing cells (BICELLS) for label free biosensing. *Sensors Actuators, B Chem.* **176**, 753–760 (2013).
62. Holgado, M. *et al.* Biophotonic sensing cells (BICELLS) for label-free biosensing. *Symp. A1.III. Mater. devices sensing.* **26**, 4847 (2011).
63. Zanchetta, G., Lanfranco, R., Giavazzi, F., Bellini, T. & Buscaglia, M. Emerging applications of label-free optical biosensors. *Nanophotonics* **6**, 627–645

- (2017).
64. Chin, C. D., Linder, V. & Sia, S. K. Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities. *Lab Chip* **7**, 41–57 (2007).
  65. González-Lucas, D., Bañuls, M. J. & García-rupérez, J. Covalent attachment of biotinylated molecular beacons via thiol-ene coupling. A study on conformational changes upon hybridization and streptavidin binding. *Microchim. Acta* **184**, 3231–3238 (2017).
  66. Irawati, N. *et al.* Relative humidity sensing using a PMMA doped agarose gel microfiber. *J. Light. Technol.* **35**, 3940–3944 (2017).
  67. Jerónimo, P., Araújo, A., Conceicao, M. & Montenegro, B. S. M. Optical sensors and biosensors based on sol – gel films. *Talanta* **72**, 13–27 (2007).
  68. Brun, E. M., Puchades, R. & Maquieira, A. Gold, carbon, and aluminum low-reflectivity compact discs as microassaying platforms. *Anal. Chem.* **85**, 4178–4186 (2013).
  69. Morais, S. & Tamarit-lópez, J. Analytical prospect of compact disk technology in immunosensing. *Anal Bioanal Chem* 2837–2844 (2008).
  70. Morais, S., Tortajada-Genaro, L. & Maquieira, A. Array-on-a-disk? How Blu-ray technology can be applied to molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **14**, 773–775 (2014).
  71. Santiago-Felipe, S., Tortajada-Genaro, L. A., Carrascosa, J., Puchades, R. & Maquieira, Á. Real-time loop-mediated isothermal DNA amplification in compact disc micro-reactors. *Biosens. Bioelectron.* **79**, 300–306 (2016).
  72. Morais, S., Puchades, R. & Maquieira, A. Disc-based microarrays: principles and analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 4523–4534 (2016).
  73. Enomoto, M., Tsubo, R., Kikuchi, M. & Mori, K. US Patent US2005/0233103A1. US Pat. (2005).
  74. Arnandis-Chover, T., Morais, S., González-Martínez, M. Á., Puchades, R. & Maquieira, Á. Biosensors and Bioelectronics High density MicroArrays on Blu-ray discs for massive screening. *Biosens. Bioelectron.* **51**, 109–114 (2014).
  75. Peris, E., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Photoattachment of thiolated DNA probes on SU-8 spin-coated Blu-ray disk surfaces for

- biosensing. *J. Mater. Chem. B* **1**, 6245–6253 (2013).
76. Tyona, M. D. A theoretical study on spin coating technique. *Adv. Mater. Res.* **2**, 195–208 (2013).
  77. Meyerhofer. Key stages in spin coating process. *Adv. Mater. Res.* **2**, 181–193 (1978).
  78. Sobek, J. & Schlappbach, R. Substrate architecture and functionality defining the properties and performance of DNA, peptide, protein and carbohydrate microarrays. *Pharmagenomics* **7**, 32–44 (2004).
  79. Rusmini, F., Zhong, Z. & Feijen, J. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* **8**, 1775–1789 (2007).
  80. Pallavicini, P., Dacarro, G. & Taglietti, A. Self-assembled monolayers of silver nanoparticles: from intrinsic to switchable inorganic antibacterial surfaces. *Antibact. Surfaces* **2018**, 4846–4855 (2018).
  81. Pfeifer, M. E. ADIBO-based “click” chemistry for diagnostic peptide microarray fabrication: physicochemical and assay characteristics. *Molecules* **18**, 9833–9849 (2013).
  82. Haghshenas Kashani, S. *et al.* Nano-silica functionalized with thiol-based dendrimer as a host for gold nanoparticles: An efficient and reusable catalyst for chemoselective oxidation of alcohols. *Appl. Organomet. Chem.* **32**, 1–13 (2018).
  83. Nelson, E. E. & Guyer, A. E. Regioselective covalent immobilization of recombinant antibody binding proteins A, G, and protein L for construction of antibody arrays. *J. Am Chem Soc.* **135**, 8973–8980 (2013).
  84. Escorihuela, J. *et al.* Direct covalent attachment of DNA microarrays by rapid thiol-ene ‘click’ chemistry. *Bioconjug. Chem.* **25**, 618–627 (2014).
  85. Ito, Y. Combinatorial bioengineering: review. *Biotechnol Prog.* **22**, 924–932 (2006).
  86. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int.* **40**, 2004–2021 (2001).
  87. Escorihuela, J. *et al.* Direct covalent attachment of DNA microarrays by rapid thiol-ene “click” chemistry. *Bioconjug. Chem.* **25**, 6618–627 (2014).

88. Weinrich, D. *et al.* Preparation of biomolecule microstructures and microarrays by thiol-ene photoimmobilization. *ChemBioChem* **11**, 235–247 (2010).
89. Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Chemical surface modifications for the development of silicon-based label-free integrated optical (IO) biosensors: A review. *Anal. Chim. Acta* **777**, 1–16 (2013).
90. Alonso, R., Jiménez-Meneses, P., García-Rupérez, J., Bañuls, M. J. & Maquieira, A. Thiol-ene click chemistry towards easy microarraying of half-antibodies. *Chem. Commun.* **54**, 6144–6147 (2018).
91. Ruiz-Tórtola, A. *et al.* High sensitivity and label-free oligonucleotides detection using photonic bandgap sensing structures biofunctionalized with molecular beacon probes. *Biomed. Opt. Express* **9**, 1717–1727 (2018).
92. Aragón, P., Noguera, P., Bañuls, M. José, Puchades, R. & Maquieira, A. Modulating receptor-ligand binding in biorecognition by setting surface wettability. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**, 5723–5730 (2018).
93. Escorihuela, J., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Development of oligonucleotide microarrays onto Si-based surfaces via thioether linkage mediated by UV irradiation. *Bioconjug. Chem.* **23**, 2121–2128 (2012).
94. Bañuls, M. J. *et al.* Improved performance of DNA microarray multiplex hybridization using probes anchored at several points by thiol-ene or thiol-yne coupling chemistry. *Bioconjug. Chem.* **28**, 496–506 (2017).
95. Escorihuela, J. & Puchades, R. Site-specific immobilization of DNA on silicon surfaces by using the thiol-yne reaction. *J. Mater. Chem. B* **2**, 8510–8517 (2014).
96. Jiménez-Meneses, P., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Fluor-thiol photocoupling reaction for developing high performance nucleic acid (NA) microarrays. *Anal. Chem.* **90**, 11224–11231 (2018).
97. Bañuls, M. J., González-Martínez, M. Á., Sabek, J., García-Rupérez, J. & Maquieira, A. Thiol-click photochemistry for surface functionalization applied to optical biosensing. *Anal. Chim. Acta* **1060**, 103–113 (2019).
98. Wichterlew, O. & Lim, D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature* **185**, 117–118 (1960).
99. Rubina, A. Y., Kolchinsky, A., Makarov, A. A. & Zasedatelev, A. S. Why 3-D?



- Gel-based microarrays in proteomics. *Proteomics* **8**, 817–831 (2008).
100. Caló, E. & Khutoryanskiy, V. V. Biomedical applications of hydrogels: a review of patents and commercial products. *Eur. Polym. J.* **65**, 252–267 (2015).
  101. Moschallski, M., Evers, A., Brandstetter, T. & Rühle, J. Sensitivity of microarray based immunoassays using surface-attached hydrogels. *Anal. Chim. Acta* **781**, 72–79 (2013).
  102. Beyer, A., Pollok, S., Berg, A., Weber, K. & Popp, J. Easy daylight fabricated hydrogel array for colorimetric DNA analysis. *Macromol. Biosci.* **14**, 889–898 (2014).
  103. Liu, X., Lei, Z., Liu, F., Liu, D. & Wang, Z. Fabricating three-dimensional carbohydrate hydrogel microarray for lectin-mediated bacterium capturing. *Biosens. Bioelectron.* **58**, 92–100 (2014).
  104. Guschin, D. *et al.* Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips. *Anal. Biochem.* **250**, 203–211 (1997).
  105. Arenkov, P. *et al.* Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal. Biochem.* **278**, 123–131 (2000).
  106. Rubina, A. Y. *et al.* Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications. *Biotechniques* **34**, 1008–1022 (2003).
  107. Rubina, A. Y., Dyukova, V. I., Dementieva, E. I. & Stomakhin, A. A. Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips. *Anal. Biochem.* **340**, 317–329 (2005).
  108. Hosseinkhani, H. *et al.* DNA nanoparticles encapsulated in 3D tissue-engineered scaffolds enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 47–60 (2007).
  109. Rubina, A. Y. *et al.* Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. *Anal. Biochem.* **325**, 92–106 (2004).
  110. Mirzabekov, A. D., Rubina, A. J. & Panvok, V. S. Composition for polymerizing immobilization of biological molecules and method for producing said composition. (2010).
  111. Mirzabekov, A. & Kolchinsky, A. Emerging array-based technologies in

- proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 70–75 (2002).
112. Charles, P. T. *et al.* Fabrication and characterization of 3D hydrogel microarrays to measure antigenicity and antibody functionality for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 753–764 (2004).
  113. E.I., D. *et al.* Protein microchips in quantitative assays for tumor markers. *Dokl. Biochem. Biophys.* **395**, 88–92 (2004).
  114. Herrmann, A., Kaufmann, L., Dey, P., Haag, R. & Schedler, U. Bioorthogonal in situ hydrogels based on polyether polyols for new biosensor materials with high sensitivity. *Appl. Mater. Interfaces* **10**, 11382–11390 (2018).
  115. Nakabayashi, N. & Williams, D. F. Preparation of non-thrombogenic materials using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. *Biomaterials Nanoarchitectonics* **24**, 2431–2435 (2003).
  116. K, N. *et al.* Development of a ferrocene-mediated needle-type glucose sensor covered with newly designed biocompatible membrane, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate. *Med Prog Technol* **21**, 91–103 (1995).
  117. Dalton, J. A., Higgins, M. K., Miller, A. H., Keefe, F. J. & Khuri, F. R. Purification of recombinant C-reactive protein mutants. *J Biol Chem.* **35**, 25353–25358 (1992).
  118. Iwasaki, Y. & Ishihara, K. Cell membrane-inspired phospholipid polymers for developing medical devices with excellent biointerfaces. *Sci. Technol. od Adv. Mater.* **13**, 064101 (2012).
  119. Mclean, K. M. *et al.* Method of immobilization of carboxymethyl-dextran affects resistance to tissue and cell colonization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **18**, 221–234 (2000).
  120. Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C. & Alhaique, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J. Control. Release* **119**, 5–24 (2007).
  121. Chao, J. *et al.* Hybridization chain reaction amplification for highly sensitive fluorescence detection of DNA with dextran coated microarrays. *Biosens. Bioelectron.* **81**, 92–96 (2016).
  122. García-Rupérez, J. Advanced nanophotonic point-of-care analysis device for fast and early diagnosis of cardiovascular diseases. <https://phocnosis.eu/>

123. Bhayana, V. & Henderson, R. Biochemical markers of myocardial damage. *Clin. Biochem.* **28**, 1–29 (1995).
124. Algarra, M., Gomes, D. & Esteves da Silva, J. C. G. Current analytical strategies for C-reactive protein quantification in blood. *Clin. Chim. Acta* **415**, 1–9 (2013).
125. Störk, T. V. *et al.* Diagnostic and prognostic role of myoglobin in patients with suspected acute coronary syndrome. *Am. J. Cardiol.* **86**, 1371–1374 (2000).
126. Kagen, L. J. Myoglobin: methods and diagnostic uses. *Critial Rev. Clin. Lab. Sci.* **9**, 273–302 (1978).
127. Ioannidis, J. P. A., Salem, D., Chew, P. W. & Lau, J. Accuracy of imaging technologies in the diagnosis of acute cardiac ischemia in the emergency department: a meta-analysis. *Ann. Emerg. Med.* **37**, 471–477 (2001).
128. Bertsch, T., Bleuel, H., Deschl, U. & Rebel, W. A new sensitive cardiac troponin T rapid test (TROPT<sup>®</sup>) for the detection of experimental acute myocardial damage in rats. *Exp. Toxic Pathol.* **51**, 565–569 (1999).
129. Vermonden, T., Censi, R. & Hennink, W. E. Hydrogels for protein delivery. *Chem. Rev.* **112**, 2853–2888 (2012).
130. Liu, X., Lei, Z., Liu, D. & Wang, Z. Development of a sandwiched microarray platform for studying the interactions of antibiotics with *Staphylococcus aureus*. *Anal. Chim. Acta* **917**, 93–100 (2016).
131. Sampaio, C. *et al.* Development of peptide-functionalized synthetic hydrogel microarrays for stem cell and tissue engineering applications. *Acta Biomater.* **45**, 110–120 (2016).
132. Liu, X., Li, T., Liu, D. & Wang, Z. Fabricating three-dimensional hydrogel oligonucleotide microarrays to detect single nucleotide polymorphisms. *Anal. Methods* **5**, 285–290 (2013).
133. Li, S. *et al.* Dextran hydrogel coated surface plasmon resonance imaging (SPRi) sensor for sensitive and label-free detection of small molecule drugs. *Appl. Surf. Sci.* **355**, 570–576 (2015).
134. Moschallski, M., Baader, J., Prucker, O. & Rühle, J. Printed protein microarrays on unmodified plastic substrates. *Anal. Chim. Acta* **671**, 92–98 (2010).

135. Kivlehan, F., Paolucci, M., Brennan, D., Ragoussis, I. & Galvin, P. Three-dimensional hydrogel structures as optical sensor arrays, for the detection of specific DNA sequences. *Anal. Biochem.* **421**, 1–8 (2012).
136. Thompson, D., Pepys, M. B. & Wood, S. P. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* **7**, 169–177 (1999).
137. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* **107**, 363–369 (2003).
138. Deegan, O., Walshe, K., Kavanagh, K. & Doyle, S. Quantitative detection of C-reactive protein using phosphocholine-labelled enzyme or microspheres. *Anal. Biochem.* **312**, 175–181 (2003).
139. Lee, S. G. *et al.* Phosphocholine-modified magnetic nanoparticles for isolation of C-reactive protein from human serum. *Sep. Sci. Technol.* **48**, 2600–2607 (2013).
140. Kim, E. K. *et al.* Protein-directed immobilization of phosphocholine ligands on a gold surface for multivalent C-reactive protein binding. *Bentham Sci. Publ.* **13**, 519 (2013).
141. Kitayama, Y. & Takeuchi, T. Localized surface plasmon resonance nanosensing of C-reactive protein with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-grafted gold nanoparticles prepared by surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Anal. Chem.* **86**, 5587–5594 (2014).
142. Kamon, Y. *et al.* Synthesis of grafted phosphorylcholine polymer layers as specific recognition ligands for C-reactive protein focused on grafting density and thickness to achieve highly sensitive detection. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 9951–9958 (2015).
143. Yoshimoto, J. *et al.* Optical properties of 2-ethacryloyloxyethyl phosphorylcholine-protected Au<sub>4</sub> nanoclusters and their fluorescence sensing of C-reactive protein. *J. Phys. Chem. C* **119**, 14319–14325 (2015).
144. Matsuura, R., Tawa, K., Kitayama, Y. & Takeuchi, T. A plasmonic chip-based bio/chemical hybrid sensing system for the highly sensitive detection of C-reactive protein. *Chem. Commun.* **52**, 3883–3886 (2016).
145. Morais, S., Tortajada-Genaro, L. & Maquieira, A. Array-on-a-disk? How Blu-ray technology can be applied to molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol.*

*Diagn.* **14**, 773–775 (2014).

146. Morais, S., Tortajada-Genaro, L. A., Arnandis-Chover, T., Puchades, R. & Maquieira, A. Multiplexed microimmunoassays on a digital versatile disk. *Anal. Chem.* **81**, 5646 (2009).
147. Mira, D. *et al.* High-throughput screening of surface-enhanced fluorescence on industrial standard digital recording media. *Opt. Based Biol. Chem. Sens. Def.* **5617**, 364–373 (2004).
148. Chen, H., Huang, J., Lee, J., Hwang, S. & Koh, K. Surface plasmon resonance spectroscopic characterization of antibody orientation and activity on the calixarene monolayer. *Sensors Actuators, B Chem.* **147**, 548–553 (2010).
149. Escorihuela, J. *et al.* Direct covalent attachment of DNA microarrays by rapid thiol – ene “click” chemistry. *Bioconjug. Chem.* **25**, 6618–627 (2014).
150. González-Lucas, D., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Versatile and easy fabrication of advanced surfaces for high performance DNA microarrays. *Adv. Mater. Interfaces* **3**, 1500850 (2016).
151. Zhou, Y., Fang, Y. & Ramasamy, R. P. Non-covalent functionalization of carbon nanotubes for electrochemical biosensor development. *Sensors (Switzerland)* **19**, (2019).
152. Qu, Z., Xu, H. & Gu, H. Synthesis and biomedical applications of poly((meth)acrylic acid) brushes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 14537–14551 (2015).
153. Oh, S. J., Hong, B. J., Choi, K. Y. & Park, J. W. Surface modification for DNA and protein microarrays. *Omi. A J. Integr. Biol.* **10**, 327–343 (2006).
154. Stanciu, M. C. & Nichifor, M. Influence of dextran hydrogel characteristics on adsorption capacity for anionic dyes. *Carbohydr. Polym.* **199**, 75–83 (2018).
155. Zhou, Y., Andersson, O., Lindberg, P. & Liedberg, B. Protein microarrays on carboxymethylated dextran hydrogels: immobilization, characterization and application. **30**, 21–30 (2004).
156. Nikpour, P., Salimi-kenari, H., Fahimipour, F. & Mahmood, S. Dextran hydrogels incorporated with bioactive glass-ceramic: Nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* **190**, 281–294 (2018).

157. Wang, X. *et al.* Injectable dextran hydrogels fabricated by metal-free click chemistry for cartilage tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **73**, 21–30 (2017).
158. Hoque, J. & Haldar, J. Direct synthesis of dextran-based antibacterial hydrogels for extended release of biocides and eradication of topical biofilms. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 15975–15985 (2017).
159. Ma, Y., Yi, J.-Z. & Zhang, L.-M. A Facile approach to incorporate silver nanoparticles into dextran-based hydrogels for antibacterial and catalytical application. *J. Macromol. Sci.* **46**, 643–648 (2009).
160. Varshosaz, J. Dextran conjugates in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **9**, 509–523 (2012).
161. Herranz, S. *et al.* Multiplex environmental pollutant analysis using an array biosensor coated with chimeric hapten-dextran-lipase constructs. *Sensors Actuators B. Chem.* **257**, 256–262 (2018).
162. Chao, J. *et al.* Hybridization chain reaction amplification for highly sensitive fluorescence detection of DNA with dextran coated microarrays. *Biosens. Bioelectron.* **81**, 92–96 (2016).
163. Blum, L. J. & Marquette, C. A. High-throughput multiplexed competitive immunoassay for pollutants sensing in water. *Anal. Chem.* **84**, 10267–10276 (2012).
164. Angeloni, S., Ridet, J. L., Kusy, N. & Gao, H. Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. **15**, 31–41 (2005).
165. Escorihuela, J. & Puchades, R. Site-specific immobilization of DNA on silicon surfaces by using the thiol–yne reaction. *J. Mater. Chem. B* **2**, 8510–8517 (2014).
166. Escorihuela, J., Puchades, R. & Maquieira, A. Development of oligonucleotide microarrays onto Si-based surfaces via thioether linkage mediated by UV irradiation. *Bioconjug. Chem.* **23**, 2121–2128 (2012).
167. Dondoni, A. The Emergence of thiol–ene coupling as a click process for materials and bioorganic Chemistry \*\*. *Angew. Chem.* **47**, 8995–8997 (2008).
168. van Dijk-Wotthuis, W. N. E. *et al.* Synthesis, characterization, and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran.

- Macromolecules* **28**, 6317–6322 (1995).
169. Pirrung, M. C. How to make a DNA chip. *Angew. Chem. Int* **41**, 1276–1289 (2002).
  170. Wang, C. *et al.* DNA microarray fabricated on poly (acrylic acid) brushes-coated porous silicon by in situ rolling circle amplification. *Analyst* **137**, 4539–4545 (2012).
  171. Casanova-Salas *et al.* Identification of miR-187 and miR-182 as biomarkers of early diagnosis and prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J. Urol.* **192**, 252–259 (2014).
  172. Wu, J. *et al.* Lab-on-a-chip platforms for detection of cardiovascular disease and cancer biomarkers. *Sensors (Switzerland)* **17**, 2934 (2017).
  173. Jonkheijm, P., Weinrich, D., Schröder, H., Niemeyer, C. M. & Waldmann, H. Chemical strategies for generating protein biochips. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 9618–9647 (2008).
  174. Phaner-Goutorbe, M., Dugas, V., Chevolut, Y. & Souteyrand, E. Silanization of silica and glass slides for DNA microarrays by impregnation and gas phase protocols: a comparative study. *Mater. Sci. Eng. C* **31**, 384–390 (2011).
  175. Sanza, F. J. *et al.* Bio-Photonic sensing cells over transparent substrates for anti-gestrinone antibodies biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4842–4847 (2011).
  176. Casquel, R. *et al.* Optimization of a label-free biosensor vertically characterized based on a periodic lattice of high aspect ratio SU-8 nanopillars with a simplified 2D theoretical model. *Phys. Status Solidi Curr. Top. Solid State Phys.* **8**, 1087–1092 (2011).
  177. Mira, D. *et al.* High-throughput screening of surface-enhanced fluorescence on industrial standard digital recording media. *Opt. Based Biol. Chem. Sens. Def.* **5617**, 364 (2004).
  178. Lee, J. H. *et al.* Label free novel electrical detection using micromachined PZT monolithic thin film cantilever for the detection of C-reactive protein. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 269–275 (2004).
  179. Roberts, W. L. *et al.* Evaluation of nine automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. Part 2. *Clin. Chem.* **47**, 418–25 (2001).

180. Hu, W. P. *et al.* Immunodetection of pentamer and modified C-reactive protein using surface plasmon resonance biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1631–1637 (2006).
181. Kim, H. C., Lee, S. K., Sohn, Y. S., Ryu, H. K. & Jeong, S. W. Preparation of a sensing membrane for C-reactive protein. *Macromol. Symp.* **249–250**, 71–75 (2007).
182. Yuk, J. S., Jung, J. W., Hyun, J., Kim, Y. M. & Ha, K. S. Development of a scanning surface plasmon microscope based on white light for analysis of a wide range of protein arrays. *Sensors Actuators, B Chem.* **131**, 241–246 (2008).
183. Vashist, S. K., Schneider, E. M. & Luong, J. H. T. Surface plasmon resonance-based immunoassay for human C-reactive protein. *Analyst* **140**, 4445–4452 (2015).
184. Luan, E., Shoman, H., Ratner, D. M., Cheung, K. C. & Chrostowski, L. Erratum: Luan, E.X.; Shoman, H.; Ratner, D.M.; Cheung, K.C.; Chrostowski, L. Silicon Photonic biosensors using label-free detection. *Sensors* 2018, 18, 3519. *Sensors (Basel)*. **19**, 19051161 (2019).
185. Iqbal, M. *et al.* Label-free biosensor arrays based on silicon scanning instrumentation. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **16**, 654–661 (2010).
186. Franssen, O., Talsma, H., Steenbergen, M. J. Van, Bosch, J. J. K. Den & Hennink, W. E. Synthesis, characterization, and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran. *Macromolecules* **28**, 6317–6322 (1995).
187. Povinelli, M. L., Johnson, S. G. & Joannopoulos, J. D. Slow-light, band-edge waveguides for tunable time delays. *Opt. Express* **13**, 7145–7159 (2006).
188. Arya, S., Khan, S., Akhil Vaid, H. K. & Lehana, P. Microfluidic mechanics and applications: a review. *J. Nano- Electron. Phys.* **5**, 1–12 (2013).



# Capítulo 5. Experimental



## 5. Experimental

### 5.1 Inmovilización de biomoléculas basada en el uso de hidrogeles de fosforilcolina en BD y SU-8.

#### 5.1.1 Materiales y Métodos

##### *5.1.1.1 Reactivos*

Albúmina de suero bovino  $\geq 98\%$  liofilizada (BSA), anticuerpo contra albúmina de suero bovino producido en conejo (aBSA), proteína C reactiva de plasma humano en disolución (en Tris 0,02 M, cloruro de sodio 0,28 M, cloruro de calcio 0,005 M, pH 7,8-8,2, y azida sódica al 0,1%), Trizma base y 2-metacrilóiloxietilfosforilcolina, todos estos reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich Química (España). Los oligonucleótidos utilizados en los diferentes experimentos se enumeran en la tabla 5.1 y fueron proporcionados por Sigma-Genosis (Reino Unido). Alexa Fluor 647 NHS Ester (éster succinimidil), anticuerpo anticonejo producido en cabra (GAR-Alexa 647) fueron suministrado por ThermoFisher (España). Los tampones empleados: disolución salina tamponada con fosfato (PBS 1x, fosfato disódico 0,008 M, fosfato monosódico 0,002 M, cloruro sódico 0,137 M, cloruro potásico 2,7 M, pH 7,5), PBS-T (PBS 1x que contiene Tween 20 al 0,05%), tampón carbonato (TC, carbonato sódico 0,015 M, bicarbonato sódico 0,035 M, pH 9,6), SSC 10x (cloruro sódico 1,5 M y citrato sódico 0,15 M, pH 7) tampón Tris (1 M, pH 4), todos los reactivos para preparar los tampones fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química (España). Los tampones y disoluciones de lavado se filtraron antes de su uso a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro de GE Whatman (Alemania). La purificación de aBSA se realizó con una columna de alta afinidad de proteína A de GE Healthcare (España), BSA, aBSA y CRP se marcaron con Alexa647 en el laboratorio siguiendo las instrucciones del proveedor.

**Tabla 5.1.** Denominación y secuencia de los oligonucleótidos empleados.

Oligonucleótido <sup>a</sup>	Secuencia (5'-3')
C1	BTN-(T) <sub>15</sub> -CCCGATTGACCAGCTAGCATT
C1*	BTN-TTACGATCGA-Cy5
C2	H <sub>2</sub> N-(T) <sub>15</sub> CCCGATTGATTAGCTAGCATT
C2*	Cy5-TTACGATCGATTAGTTAGCCC(T) <sub>15</sub> -NH <sub>2</sub>
S1	SH-(T) <sub>15</sub> -CCCGATTGACCAGCTAGCATT
S1.1m	SH-(T) <sub>15</sub> -CCCGATTGACCTGCTAGCATT
S1.2m	SH-(T) <sub>15</sub> -CCCGATTGATTAGCTAGCATT
S1.3m	SH-(T) <sub>15</sub> -CCATATTGACCAGCTATCATT
S2*	Cy5-CCCGATTGACCAGCTAGCATT-(T) <sub>15</sub> -SH
S3	SH-ATCGACACCCCTATCACGATTAGCATTAA
D1*	Cy5-AATGCTAGCTGGTCAATCGGG
D3*	Cy5-AUCGACUUAUUGCUAAUCGUGAUAGGGGUGUCGAU

<sup>a</sup> C significa control, S para sonda y D para oligonucleótidos diana. \* indica que la secuencia está marcada con un fluoróforo (Cy5). BTN significa biotina.

#### 5.1.1.2 Técnicas instrumentales

La impresión de micromatrices se realizó con un sistema de dispensación robótica sin contacto de bajo volumen Biodot AD1500 (EE. UU.). Las medidas de ángulo de contacto con agua MiliQ (18 mΩ) se realizaron con un equipo Attension Theta Lite y las imágenes se trataron con el programa OneAttension (versión 3.1), ambas de Biolin (España). Las medidas se realizaron por triplicado a temperatura ambiente dispensando 5 μL.

El equipo de limpieza con ozono UV El UVOH150 LAB de FHR (Alemania), equipado con una lámpara UV (254 nm, 50 mW/cm<sup>2</sup>) fue empleado para la activación de la superficie, para la formación de hidrogeles y la unión de la sonda. Las disoluciones de proteínas se concentraron y se purificaron en una centrifuga 5412D de Eppendorf (España) con un kit Pierce Protein Concentrator PES (10 K, 30 K y 100 K MWCO) de ThermoFisher (España). Los *Blu-ray* Disk MediaRange, fueron proporcionados por CD Rohling-up house GmbH (Alemania). Las concentraciones de proteínas se determinaron midiendo la densidad óptica a 280 nm con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific (España). La señal de fluorescencia se detectó utilizando un lector de fluorescencia de superficie (SFR) casero equipado con una cámara CCD de alta sensibilidad<sup>177</sup>. Las medidas se realizaron por acumulación de luz

emitida (633 nm) por las muestras durante 8 s con una ganancia del dispositivo de 3. Para el análisis de imágenes de las micromatrices estándares, se empleó el software GenePix Pro 4.0 de Molecular Devices, Inc. (EE. UU.). Las medidas de microscopía confocal de fluorescencia se realizaron en el centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia) con un microscopio Leica TCS-SP2-AOBS a 633 nm de excitación y con líneas de láser de emisión de 670 nm, dotado de un detector de diodo para el contraste interferencial, una platina motorizada y una cámara de incubación para regular la temperatura y el CO<sub>2</sub> en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia). Las medidas de espectroscopia fotoelectrónica de rayos X se realizaron con un equipo SEGE 150 de SPECS GMBH-Surface Analysis (Alemania) en el Instituto de Tecnología cerámica de Castellón.

### 5.1.3 Procedimiento experimental

#### *5.1.3.1 Preparación del soporte sólido*

Dos soportes sólidos diferentes fueron usados durante este trabajo para desarrollar micromatrices de hidrogel. La superficie de discos *Blu-Ray* y SU-8. Depositado sobre portaobjetos de vidrio por *spin-coating*.

Los discos *Blu-Ray* usados se lavaron con previamente isopropanol y agua desionizada y posteriormente se secaron con aire y se cortaron en trozos de 5 x 2,5 cm.

Para el soporte de SU-8, se utilizaron como sustrato portaobjetos de vidrio (Labbox, Barcelona, España) que fueron lavados con agua y etanol, y secados con aire, luego fueron irradiados con luz ultravioleta durante 10 min. Después, fueron precalentados a 80 °C durante 1 min y a continuación se depositó en el centro de la superficie 1 mL de SU-8 por cada 5 cm<sup>2</sup> de vidrio, seguido de *spin-coating* en dos pasos: primero a 300 rpm durante 15 s y luego a 2500 rpm durante 3 min. A continuación, cada superficie fue curada a 120 °C durante 15 min e irradiada con luz UV (350 nm) durante 1 h. Después, se lavaron con acetona y curaron a 80 °C durante 15 min. Finalmente, los portaobjetos fueron cortados en trozos de 1x3 cm usando un punzón de tungsteno.

### 5.1.3.2 Formación de hidrogeles y detección de CRP

Se pesaron 14,75 g de 2-metracrilóiloxietil fosforilcolina (MPC) y se disolvieron en 10 mL de agua desionizada para obtener una disolución 5 M. Se prepararon disoluciones de 0,5 a 3 M para realizar matrices de 5x4 (30 nL/gota) que fueron depositadas en el soporte sólido usando un robot de impresión de no-contacto (Biodot, Irvine, CA, USA). Los chips fueron irradiados durante 7 min a 254 nm, incubados en oscuridad durante 10 min, lavados y secados.

La proteína C reactiva se marcó con el fluoróforo de Alexa647 siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Para ello, se mezclaron 200 µL de CRP a 166 µg/mL en PBS con 10 mg/mL de Alexa obteniéndose con una relación de marcaje (Alexa/CRP) de 2. Después, se prepararon alícuotas de CRP en PBS-T o en suero sanguíneo de conejo (de 0 a 10 µg/mL). Los chips fueron incubados durante 30 min a temperatura ambiente con humedad a saturación. Finalmente, las micromatrices se lavaron por inmersión durante 15 min en PBS-T seguido de 5 min en agua y secado al aire.

La fluorescencia fue medida con el lector SFR. Estos resultados se procesaron a mediante el *software GenePix*.

### 5.1.3.3 Inmovilización de anticuerpo en el hidrogel de MPC y detección de la proteína

Diferentes disoluciones de aBSA fueron preparadas a concentraciones de 0 a 100 µg/mL en MPC 1 M, diluida en PBS 1x. Las disoluciones fueron depositadas sobre los chips de BD (4 puntos/fila, 30 nL/punto) e irradiados a 254 nm durante 40 s. Después, la superficie fue lavada con agua y secada con aire.

La BSA fue marcada con Alexa647 como se describe anteriormente, siendo la relación de marcaje de 2/1 (Alexa/BSA). Después, se prepararon diferentes disoluciones de BSA marcada en un rango de 0 a 10 µg/mL, cada una fue incubada sobre las micromatrices durante 30 min a temperatura ambiente. Los chips fueron lavados con PBS-T durante 14 min, después con agua y finalmente secados. La fluorescencia fue medida y cuantificada como se describe anteriormente.

### *5.1.3.4 Inmovilización de oligonucleótidos en el hidrogel de MPC y ensayos de hibridación*

Diferentes disoluciones de Sonda 1 fueron preparadas en MPC 1M (desde 0,1 a 5  $\mu$ M). Las disoluciones fueron depositadas sobre los chips de BD (4 puntos/fila, 30 nL/punto) e irradiados a 254 nm durante 7 min. Después los chips fueron lavados durante 15 min en PBST y a continuación durante 10 min en agua. Las micromatrices fueron incubadas con concentraciones decrecientes de Diana 1\* en SSC 5x (de 0,005 a 0,03  $\mu$ M) durante 1h a 37 °C. Después, los chips fueron lavados durante 15 min en SSC 1x y secados.

Durante los ensayos de polimorfismos las condiciones de inmovilización fueron las mismas y la hibridación fue llevada a cabo en SSC 1x con porcentajes de formamida de 0 a 50%.

## **5.2 Inmovilización de biomoléculas basada en el uso de hidrogeles de dextrano en BD y SU-8.**

### 5.2.1 Materiales y Métodos

#### *5.2.1.1 Reactivos*

Como sustratos sólidos se usaron portaobjetos de vidrio de Labbox (Barcelona, España) y BD de 25 Gbyte de MediaRange GmbH (Bad Soden, Alemania). Los portaobjetos de vidrio, 2D-Epoxy y 3D-Epoxy, se adquirieron de PolyAn GmbH (Berlín, Alemania). Albúmina (98 %) de suero bovino en polvo liofilizado (BSA), anticuerpo contra albúmina de suero bovino producido en conejo, Dextrano de Leuconostoc spp. (Sr. 450,000-650,000), glicidil metacrilato (GMA), 4-dimetilaminopiridina (DMAP), dimetilsulfóxido (DMSO), D<sub>2</sub>O y etanolamina fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Química (Madrid, España). El 3- (mercaptopropil) trimetoxisilano y el 3- (trimetoxisilil) propilmetacrilato fueron de Acros (España). Los oligonucleótidos utilizados fueron adquiridos a Sigma-Genosis (UK), las secuencias utilizadas se muestran en la tabla 5.2. Alexa Flúor (Alx) 647 NHS Ester se adquirió a ThermoFisher (España). Los biorreactivos se marcaron en el laboratorio siguiendo las instrucciones del proveedor.

**Tabla 5.2.** Denominación y secuencia de los diferentes oligonucleótidos usados.

Denominación	Secuencia (5'- 3')
S1	SH-(T) <sub>15</sub> -CCCGATTGACCAGCTAGCATT
S1*	SH-(T) <sub>15</sub> -CCCGATTGACCAGCTAGCATT-Cy5
S2 <sup>b</sup>	H <sub>2</sub> N-C <sub>7</sub> -(T) <sub>15</sub> CCCGATTGATTAGCTAGCATT
S2 * <sup>b</sup>	Cy5- TTACGATCGATTAGTTAGCCC(T) <sub>15</sub> -C <sub>7</sub> - NH <sub>2</sub>
S3	SH-ATTCACCTCAACATCAGTCTGGTAAGCTAGTGAAT
S4	SH-ATCGACAAGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAAAGTCGAT
D1*	Cy5-AATGCTAGCTGGTCAATCGGG
miRNA-182*	Cy5-UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU

<sup>a</sup>S significa sonda y D oligonucleótidos diana. \* indica que la secuencia está marcada con un fluoróforo (Cy5). BTN significa biotina. <sup>b</sup> Para comparar en los portaobjetos comerciales 2D-Epoxy, la Sonda 2 tenía un grupo amino en lugar de un grupo tiol, al que nos referimos como una "Sonda 2 aminada".

### 5.2.1.2 Técnicas instrumentales

Al igual que en el apartado 5.1.1.2 se usaron las siguientes técnicas y metodologías. La impresión de las micromatrices se realizó con un sistema de dispensación sin contacto de bajo volumen Biodot AD1500 (Irvine, CA, EE. UU.). Las medidas del ángulo de contacto se realizaron con un equipo Attension Theta Lite y las imágenes con OneAttension, ambas de Biolin Sci (España). La irradiación se llevó a cabo con un sistema de limpieza con ozono UV FHR (Ottendorf, Okrilla, Alemania). La medición de la absorción se realizó con un equipo NanoDrop 2000 de Thermo Scientific (España). Las mediciones de fluorescencia de las micromatrices se llevaron a cabo con un lector de fluorescencia de superficie (SFR) equipado con una cámara CCD, como se describe<sup>177</sup> y con GenePix™ 4000 B Array Scanner de Molecular Devices. El tratamiento de datos de las imágenes de fluorescencia se realizó con el software GenePix Pro 4.0 (Axon, CA, USA). Las lecturas de microscopía confocal de fluorescencia se realizaron con un microscopio Leica TCS-SP2-AOBS a 633 nm de excitación y 670 nm de emisión. Los espectros XPS se adquirieron con un equipo SEGE 150 de SPECA GMBH-Surface Analysis (Alemania).



### 5.2.3 Procedimientos experimentales

#### 5.2.3.1 Síntesis de acrilato-dextrano (Dx-Ma)

Los grupos metacrilato se incorporaron al Dextrano mediante una modificación del procedimiento descrito por van Dijk-Wolthuis<sup>186</sup>. En resumen, se disolvió el Dextrano (Sr. 450,000 - 650,000, 1,7 g) en DMSO (15 mL). Una vez disuelto el polímero, se agregaron DMAP (0,34 g) y GMA (1 mL). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, en oscuridad, con agitación durante 72 h. El producto se precipitó en EtOH frío (200 mL) y se lavó varias veces con EtOH. Después de secar el producto, la modificación del polímero se evaluó mediante RMN (en D<sub>2</sub>O) y ATR-FTIR.

#### 5.2.3.2 Funcionalización de superficies

Para preparar las micromatrices en sustrato de discos *Blu-Ray*, estos se usaron sin más tratamiento que un lavado con isopropanol, agua desionizada y secado. Cuando fue necesario se cortaron en chips de 1 × 2,5 cm.

Para las superficies modificadas con acrilato, los portaobjetos de vidrio se lavaron con isopropanol, agua y se secaron. Luego, la superficie se activó en el equipo limpiador de superficies durante 10 minutos antes de ser sumergidas en una disolución en tolueno al 10% (v/v) del organosilano correspondiente. Después de 1 h de agitación a temperatura ambiente, los sustratos se limpiaron con tolueno, isopropanol y se curaron a 120 °C durante 30 min. La funcionalización se evaluó mediante la medición del ángulo de contacto en las superficies, antes y después de la silanización.

#### 5.2.3.3 Inmovilización de oligonucleótidos y ensayos de hibridación en Dx-Ma

Se preparó una disolución acuosa de Dx-Ma disolviendo 1 g de dextrano modificado en 10 mL de agua desionizada. Esta mezcla se empleó como disolvente para preparar varias disoluciones (0,5; 0,1 y 0,05 M) de Sonda 1, Sonda 2, Sonda 3 y Sonda 4, las cuales se imprimieron en el soporte sólido creando matrices de 4 puntos por 4 filas (30 nL/punto). También, se incluyó como control positivo de inmovilización una fila adicional con la Sonda 1\* a 0,5 μM. Las micromatrices se irradiaron durante 40 s a 254 nm (50 mW/cm<sup>2</sup>), se lavaron con agua y se secaron. Después, se llevó a cabo la hibridación con la Sonda 1\* en SSC 5x, de 0,25 a 0,0001 M, durante 1 hora a 37 °C. Luego los chips se lavaron con SSC 1x y se secaron. La fluorescencia se registró con el lector SFR y se cuantificó mediante el software GenePix 4.0.

### 5.2.3.4 Ensayos de inmovilización e hibridación de oligonucleótidos en portaobjetos 2D-Epoxy y 3D-epoxy

Las micromatrices fueron creados siguiendo las instrucciones del proveedor. Para ello, se disolvió la Sonda 2 aminada en tampón carbonato (pH 11) a 1  $\mu$ M. Las micromatrices 4x4 fueron impresas (30 nL/punto) a 24 °C y 70% de humedad relativa. Una de las filas contenía la sonda aminada (S2) marcada con un fluoróforo, mientras que las otras eran de la sonda aminada (S2\*) no marcada. Luego, los portaobjetos fueron incubados durante toda la noche en una cámara con humedad a saturación, llena con 50 mL de SSC 1x. Posteriormente, los portaobjetos se secaron a 80 °C y se bloquearon con etanolamina 50 mM en tampón Tris 0,1 M (pH 9) durante 60 minutos. La superficie se lavó secuencialmente con SSC 4x, SSC 2x + 0,1% (p/v) SDS, SSC 1x, SSC 0,2x y SSC 0,1x, y finalmente con agua desionizada.

Las micromatrices se hibridaron con Diana 1\* a 0,5, 0,25, 0,12 y 0,06  $\mu$ M en SSC 5x durante 60 minutos a 37 °C como antes. La fluorescencia se leyó con el equipo SFR y se cuantificó como antes.

### 5.2.3.5 Inmunoensayo aBSA/BSA\* en Dx-Ma

Para inmovilizar el aBSA (50 - 0 mg/L) se utilizó una disolución de Dx-Ma (1: 10) en agua, estas disoluciones se imprimieron en chips de BD 1 x 3 cm, creando matrices de 4 x 4 (30 nL/spot). Además, se imprimió aBSA (50 - 0 mg/L) en carbonato, el mismo tampón que el control negativo. La coinmovilización se realizó irradiando con luz UV durante 10-40 s (254 nm), luego los *chips* se lavaron y se secaron. Después, se llevó a cabo la incubación con diferentes concentraciones de BSA\* (10 mg/L), disuelta en PBS-T, durante 40 minutos, a temperatura ambiente, en oscuridad. A continuación, se lavaron los chips en PBS-T durante 15 min y se secaron. La fluorescencia se registró con el equipo SFR y los resultados se procesaron con el software GenePix.

### 5.2.3.6 Comparación de hidrogeles (MPC y Dx-Ma)

Los resultados obtenidos con el hidrogel de Dx-Ma se compararon con el MPC, ambos descritos en el tercer capítulo, y con la metodología convencional. Es decir, los dos geles acrilatados se compararon para establecer sus prestaciones respecto a la inmovilización de biomoléculas. El ensayo de inmovilización e hibridación se realizó en condiciones similares a los descritos anteriormente. Los oligonucleótidos se disolvieron en MPC y Dx-Ma o agua para comparar las señales de fluorescencia. Para los ensayos de inmovilización se prepararon disoluciones de oligonucleótidos

(S1, S2, S1\* y D1\*; 0,2-0,12  $\mu\text{M}$ ) en Dx-Ma, y agua. Estas disoluciones se depositaron (30  $\mu\text{L}$  por punto, con una humedad establecida al 95%) en las diferentes superficies (vidrio funcionalizado, PC, BD) creando micromatrices en los que cada fila contenía 4 réplicas; se aumentó el número de filas para tener una fila por oligonucleótido y concentración. Luego, las micromatrices se irradiaron con luz UV a 254 nm, durante 40-420 s para inducir la fotopolimerización de Dx-Ma y la inmovilización de los oligonucleótidos. Se realizaron diferentes pasos de lavado: enjuague corto con agua, enjuague largo con agua, lavado durante 15 minutos en PBS 1x y durante 10 minutos en agua para eliminar los oligonucleótidos no anclados covalentemente. Las medidas de fluorescencia se hicieron mediante SFR para poder cuantificar el rendimiento de inmovilización. Las medidas se realizaron mediante la acumulación de luz emitida por las muestras durante 8 s, con una ganancia del dispositivo de 3. En los ensayos de hibridación como se indicó anteriormente, las disoluciones de S1 y S1\* a 0,2  $\mu\text{M}$  se prepararon en Dx-Ma (1:10). Cada concentración de oligonucleótido era una fila de una micromatriz y se imprimió en diferentes superficies (4 puntos por fila, 30 nL por punto, ocho filas y humedad relativa del 95%). La inmovilización de oligonucleótidos en gel se realizó con luz UV irradiando los portaobjetos como anteriormente. Luego, se realizaron diferentes etapas de lavado: enjuague con agua, lavado durante 15 min en PBS 1x y secado al aire. Después, se dispensaron 80  $\mu\text{L}$  de la diana 1\* (0,5  $\mu\text{M}$  - 0,1 nM en SSC 1x). Después de la incubación durante 1 hora a 37 ° C y humedad constante, el chip se lavó con SSC 1x y se secó. Finalmente, los chips se lavaron con SSC 1x durante 15 min. La intensidad de fluorescencia de los puntos se registró con el SFR como se describe anteriormente. Luego, se prepararon las disoluciones de cada gel en agua según se ha descrito anteriormente.

### 5.3 Aplicación de los desarrollos para biosensado sin marcaje

#### 5.3.1 Materiales y Métodos

##### *5.3.1.1 Reactivos*

Albúmina de suero bovino  $\geq 98\%$  en polvo liofilizado (BSA), anticuerpo de albúmina bovina producido en conejo (aBSA), proteína C reactiva de plasma humano (en Tris 0,02 M, cloruro sódico 0,28 M, cloruro de calcio 0,005 M, pH 7,8 – 8,2, que contiene azida de sodio al 0,1%), anticuerpo aCRP (C7) producido en conejo, Trizma base, 2-metacrililoiloxietilfosforilcolina y trietoxivinil silano (TEVS), todos ellos de Sigma-Aldrich Química (España). Anticuerpo contra troponina cardíaca I [4C2] ab10231, proteína natural humana de mioglobina ab96036, troponina cardíaca T ab9937, troponina I ab207624, anticuerpo contra mioglobina ab19601 fueron proporcionados por Abcam. Anticuerpo contra troponina cardíaca T MAb2F3 y anticuerpo contra troponina cardíaca I MAb16A11 (anticuerpo secundario) fueron adquiridos a Hytest. Anticuerpo contra troponina cardíaca T (2F3) [Alexa Fluor647] NB120-10216AF647 de Novus. Alexa Fluor 647 NHS Ester (Succinimidyl Ester) fue suministrado por ThermoFisher (España). Tampones empleados: disolución salina tamponada con fosfato (PBS 1x, fosfato disódico 0,008 M, fosfato monosódico 0,002 M, cloruro sódico 0,137 M, cloruro potásico 2,7 M, pH 7,5), PBS-T (PBS 1x que contiene Tween 20 al 0,05%), tampón carbonato (TC, carbonato sódico 0,015 M, bicarbonato sódico 0,035 M, pH 9,6), SSC 10x (cloruro sódico 1,5 M y citrato sódico 0,15 M, pH 7) Tris Buffer (1 M, pH 4). Todos los tampones y disoluciones de lavado se filtraron a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, Whatman GmbH (Alemania). La purificación de aBSA se realizó con una columna de afinidad-A HP de GE Healthcare (España). BSA, aBSA y CRP se marcaron con Alexa647 en el laboratorio, siguiendo las instrucciones del proveedor. Los sustratos de óxido de silicio (SOI) fueron cedidos por el NTC y la UPM.

##### *5.3.1.2 Técnicas instrumentales*

Las técnicas instrumentales empleadas en el desarrollo de este apartado (5.3) son las que se recogen en el apartado 5.1.1.2.

### 5.3.2 Procedimiento experimental

#### 5.3.2.1 Fabricación de BICELL

Los BICELLS se produjeron mediante litografía de contacto a nivel de oblea utilizando un alineador de máscara MA6 de *Süssensuring*. Se utilizaron obleas de Si de 6 pulgadas como sustrato. La litografía se aplicó en un solo paso para producir las estructuras fotónicas.

Primero, el sustrato se limpió sucesivamente en baño de ultrasonidos en acetona y agua, durante 2 min. Después de enjuagar y secar, se realizó un tratamiento durante 30 s con ácido fluorhídrico diluido con agua (HF: H<sub>2</sub>O, 1:10 v/v), seguido de ultrasonicación en agua durante 2 min. Después de enjuagar y secar la oblea de Si, esta se sumergió en disolución piraña (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2: 1 v/v) durante 20 min. Finalmente, se enjuagó, se secó y se calentó a 120 °C durante 1 h.

Luego, se depositó el SU-8 sobre la superficie utilizando una disolución de SU-8 2010 en ciclopentanona (CP). Controlando la velocidad de centrifugado y la dilución de resina, se obtuvieron chips con espesores de SU-8 de: 200 nm y de entre 0,9 y 1,2 μm de diámetro.

Más tarde, los chips se curaron a un curado durante 30 s a 70 °C, y después se irradiaron durante 10 s con luz UV (densidad de potencia ~ 40 mW/cm<sup>2</sup>). Para efectuar litografía se usaron fotomáscaras de cuarzo. A continuación, se realizó otra etapa de post-curado durante 60 s a 70 °C lavado con isopropanol (IPA) y secado con aire. Finalmente, se realizó un curado durante 10 minutos a 70 °C para endurecer el polímero.

Se produjeron dos tipos de estructuras interferométricas: interferómetros de Fabry-Perot (preparadas por la UPM), basados en una sola película delgada, y BICELLS basados en microestructuras periódicas. Estas estructuras estaban formadas por microdominios de 200 x 200 μM de tamaño.

### *5.3.2.2 Formación del hidrogel y reconocimiento de CRP en el Interferómetro Fabry-Perot*

Para llevar a cabo estos ensayos se depositaron 10  $\mu\text{L}$  de MPC 0,5 M sobre la superficie del interferómetro y se irradiaron a 254 nm durante 60 s, el hidrogel se usó a 0,1 M. Después de lavar con agua y secar con aire, se midió la respuesta óptica.

Para construir la curva de calibrado, los chips se incubaron con concentraciones crecientes de CRP en PBS-T (de 10 a 10000 ng/mL, 10  $\mu\text{L}$ ) durante 30 minutos a 37 °C en medio húmedo a saturación. Después de cada etapa de incubación, el chip se lavó repetidamente con PBS-T y agua, y se secó. La respuesta óptica se midió mediante un espectrómetro (FTIR-VIS) unido a un microscopio para la medición del microdominio en BICELLS de 200 x 200  $\mu\text{m}$ .

Para las medidas de muestras reales, se usó suero sanguíneo que se dopó con 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CRP, se incubó y se midió como se indica anteriormente.

### *5.3.2.3 Formación del hidrogel y respuesta de CRP en BICELLS*

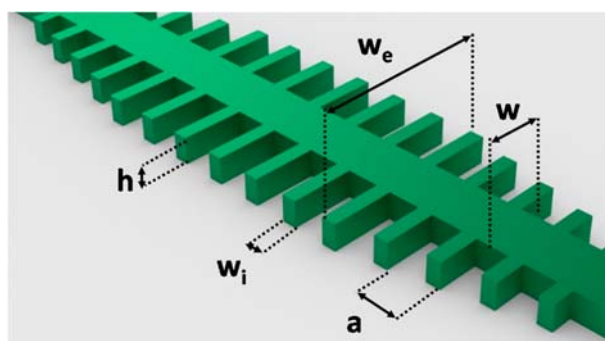
Se depositaron 10  $\mu\text{L}$  de MPC 0,1 M sobre los BICELLS y se irradiaron a 254 nm. Después de lavar con agua y secar, la respuesta óptica se caracterizó según lo descrito para los interferómetros de Fabry-Perot.

Para obtener la curva de calibrado los chips se incubaron con concentraciones crecientes de CRP en PBS-T. Para el ensayo con muestras reales, se dispuso de muestras de suero sanguíneo de voluntarios sanos con valores basales de CRP. Los sueros sanguíneos se doparon a 50 ng/mL de CRP para determinar el porcentaje de recuperación.

### *5.3.2.4 Fabricación de los chips fotónicos (SOI)*

A continuación, se explica el proceso de fabricación de los chips fotónicos donde se lleva a cabo la detección a tiempo real en las zonas nanoestructuradas (PBG). En estas estructuras, la introducción de una modulación periódica en el índice de refracción da lugar a la aparición de una banda espectral, la llamada PBG<sup>187</sup>, cuya posición dependerá del índice de refracción del medio. Los chips son fabricados en óxido de silicio (SOI) en una sala blanca, se usa litografía de haz de electrones con un voltaje de 100 keV y un grabado por plasma de la capa superior de silicio, finalmente se realiza el diseño en la capa superior de silicio del SOI. Los chips fotónicos tienen 4 grupos de 4 PBG, los cuales tienen los siguientes parámetros estructurales: altura h

= 220 nm, ancho de guía de onda  $w = 450$  nm, periodo  $a = 380$  nm, longitud de elementos transversales  $w_e = 1500$  nm y ancho de los elementos transversales entre  $w_i = 80$  nm y  $w_i = 140$  nm. Estos parámetros proporcionan un rango de longitud de onda entre 1500 nm y 1600 nm, donde opera el equipo de caracterización experimental. Se accede al chip a través de acopladores de rejilla 1D de 70 nm de profundidad. Finalmente, el chip se cubre con un revestimiento superior de 400 nm de  $\text{SiO}_2$  y se abre un canal de 400 nm de ancho utilizando litografía UV para tener acceso a las estructuras PBG.



**Figura 5.1.** Representación esquemática de la estructura PBG y sus dimensiones.

#### 5.3.2.5 Silanización de la superficie de óxido de silicio

Las superficies que contienen las nanoestructuras son previamente lavadas con disolución piraña ( $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4$  1:3 v/v), se enjuagan con agua y etanol, y se secan con aire. Luego, la superficie se activó en atmósfera de ozono durante 10 minutos. A continuación, se sumergieron en una disolución al 10% (p/v) de trietoxivinil silano (TEVS) en tolueno. Después de 2 h de agitación a temperatura ambiente, los sustratos se lavaron, y se curaron a 120 °C durante 30 min. La funcionalización se evaluó mediante medidas de WCA en las superficies antes y después de la silanización.

#### 5.3.2.6 Inmovilización asistida por luz ultravioleta de medios anticuerpos (hlgGs)

Los hlgG específicos para el sistema modelo aBSA/BSA o para biomarcadores cardiovasculares (troponinas I y T, mioglobina y CRP) son receptores que tienen grupos tiol. Los hlgG se obtuvieron a partir de anticuerpo entero por un proceso de reducción con tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) durante 90 min a 37 °C en tampón acetato (acetato sódico 0,15 M, EDTA 0,01 M, cloruro sódico 0,1 M, pH = 4,5) a una

concentración de 4 mg/mL en presencia de TCEP 25 mM. Los hlgGs se purificaron mediante centrifugación con un filtro de 50 kDa y la concentración se determinó usando el equipo NanoDrop. La inmovilización de los hlgG se realizó mediante luz UV, depositando una disolución del medio anticuerpo a concentración de 200 µg/mL o 40 µg/mL. Tras ello, se incubó 1h a 37 °C y se irradia 5 s a 254 nm. La señal de fluorescencia fue cuantificada con el lector SFR. Los resultados se procesaron mediante el software GenePix.

### *5.3.2.7 Preparación de los biorreactivos para ensayos en chips nanofotónicos*

Diferentes disoluciones de hlgG se prepararon para inmovilizarse en la superficie fotónica como se describe anteriormente. Luego, se prepararon diferentes disoluciones del antígeno correspondiente a concentraciones de 0 a 1000 ng/mL en PBST o PBST-suero (1% o 10% suero, BSA 0,1% y EDTA 5 mM para la troponina I o T). También se preparó la disolución del anticuerpo marcado con Alexa 657 a 10 µg/mL o 20 µg/mL en PBST o PBST-suero. Algunos anticuerpos secundarios o hBSA\* (hlgG de BSA) fueron marcados con Alexa647 siguiendo las instrucciones del proveedor, siendo la relación de marcaje entre 2-3 (Alexa/proteína). La fluorescencia fue medida y cuantificada como se describe anteriormente.

### *5.3.2.8 Plataforma experimental*

El chip fotónico SOI previamente silanizado con una monocapa de grupos vinilo, se ensambla a una celda de flujo de polidimetilsiloxano (PDMS) que tiene un canal tamaño 400 µm × 50 µm × 6 mm (ancho × alto × longitud) a la que se accede a través de 2 tubos de politetrafluoroetileno (PTFE). El chip fotónico y el montaje para fluir las disoluciones se coloca en el soporte de la muestra y se fija con una tapa de polimetacrilato de metilo (PMMA). Se han utilizado PDMS y PMMA para la fabricación de la celda de flujo y la tapa, respectivamente, ya que son transparentes a la luz UV y permiten irradiar el chip fotónico durante el proceso de biofuncionalización fotocatalizado. Para caracterizar el chip fotónico, se acopla la luz de un láser de barrido continuo a los acopladores de rejilla de entrada mediante un colimador de fibra. La luz que sale de los acopladores de rejilla de salida es medida usando una cámara infrarroja (IR) sincronizada con el láser para obtener los espectros simultáneamente de todas las estructuras de detección de PBG dentro del chip<sup>91</sup>. Las disoluciones se hacen fluir utilizando una bomba de jeringa que se ajusta a un caudal constante de 10 µL/min<sup>188</sup>.



## 5.4 Referencias

1. Clark, L. C. & Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. New York Acad. Sci.* **102**, 29–45 (1962).
2. Luchansky, M. S. & Bailey, R. C. High-Q optical sensors for chemical and biological analysis. *Anal. Chem.* **84**, 793–821 (2012).
3. Li, S. *et al.* Dextran hydrogel coated surface plasmon resonance imaging (SPRi) sensor for sensitive and label-free detection of small molecule drugs. *Appl. Surf. Sci.* **355**, 570–576 (2015).
4. R., D., Thevenot, Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* **71**, 2333–2348 (1999).
5. Kim, E. *et al.* Phosphocholine-modified magnetic nanoparticles for isolation of C-reactive protein from human serum. *Sep. Sci. Technol.* **48**, 2600–2607 (2013).
6. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 121–131 (2001).
7. Hulanicki, A., Glab, S. & Ingman, F. Chemical sensors definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* **63**, 1247–1250 (1991).
8. Barbulovic-nad, I. *et al.* Bio-microarray fabrication techniques — a review. **26**, 237–259 (2008).
9. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science (80- )*. **270**, 467–470 (1995).
10. Ekins, R. P. Multi-analyte immunoassay. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**, 155–168 (1989).
11. Hu, S., Xie, Z., Qian, J., Blackshaw, S. & Heng, Z. Functional protein microarray technology. *Rev. Syst. Biol. Med.* **3**, 255–268 (2011).
12. Ventimiglia, G. & Petralia, S. Recent advances in DNA microarray technology: an overview on production strategies and detection methods. *Bionanoscience* 428–450 (2013).
13. Kostrzynska, M. & Bachand, A. Application of DNA microarray technology

- for detection, identification, and characterization of food-borne pathogens. *Can. J. Microbiol.* **8**, 1–8 (2006).
14. Heller, M. J. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **4**, 129–153 (2002).
  15. Dutta, S. Point of care sensing and biosensing using ambient light sensor of smartphone: Critical review. *Trends Anal. Chem.* **110**, 393–400 (2019).
  16. Estevez, M. C., Alvarez, M. & Lechuga, L. M. Integrated optical devices for lab-on-a-chip biosensing applications. *Laser Photonics Rev.* **6**, 463–487 (2012).
  17. Petryayeva, E. & Algar, W. R. Toward point-of-care diagnostics with consumer electronic devices: the expanding role of nanoparticles. *RSC Adv.* **5**, 22256–22282 (2015).
  18. Kosack, C. S., Page, A. & Klatser, P. R. A guide to aid the selection of diagnostic tests. *Bull World Heal. Organ* **95**, 639–645 (2017).
  19. Mcgarraugh, G., Brazg, R. & Weinstein, R. FreeStyle navigator continuous glucose monitoring system with TRUstart algorithm, a 1-hour warm-up time. *J. Diabetes Sci. Technol.* **5**, 99–106 (2011).
  20. Martínez, A. *et al.* Ultrafast all-optical switching in a silicon-nanocrystal-based silicon slot waveguide at telecom wavelengths. *Nano Lett.* **10**, 1506–1511 (2010).
  21. Lia, J., Tana, S. N. & Geb, H. Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for hydrogen peroxide. *Anal. Chim. Acta* **335**, 137–145 (1996).
  22. Velychko, T. P. *et al.* A novel conductometric urea biosensor with improved analytical characteristic based on recombinant urease adsorbed on nanoparticle of silicalite. *Nanoscale Res. Lett.* **11**, 106 (2016).
  23. Avella-Oliver, M., Carrascosa, J., Puchades, R. & Maquieira, A. Diffractive protein gratings as optically active transducers for high-throughput label-free immunosensing. *Anal. Chem.* **89**, 9002–9008 (2017).
  24. Llandro, J., Palfreyman, J. J., Ionescu, A. & Barnes, C. H. W. Magnetic biosensor technologies for medical applications: a review. *Med Biol Eng Comput* **48**, 977–998 (2010).
  25. Kawamura, A. & Miyata, T. Biosensors. in *Biomaterials Nanoarchitectonics*

- 157–176 (2016).
26. Borisov, S. M. & Wolfbeis, O. S. Optical biosensors. *Chem. Rev.* **108**, 423–461 (2008).
  27. Yalow, R. S. & Berson, S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *Obes. Res.* **4**, 583–600 (1996).
  28. Crivianu-Gaita, V., Romaschin, A. & Thompson, M. High efficiency reduction capability for the formation of Fab' antibody fragments from F(ab)2 units. *Biochem. Biophys. Reports* **2**, 23–28 (2015).
  29. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* **5**, 1–17 (2014).
  30. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. New York: Garland Science **91**, (2001).
  31. Killard, A. J., Deasy, B., O'Kennedy, R. & Smyth, M. R. Antibodies: production, functions and applications in biosensors. *Trends Anal. Chem.* **14**, 257–266 (1995).
  32. Lopez de Silanes, J., Mancilla Nava, R. & Paniagua Solis, J. Pharmaceutical composition of F(Ab)2 fragments of antibodies and method for preparation. (2002).
  33. Hage, D. S. Immunoassays. **65**, 420–424 (1993).
  34. Chen, G. *et al.* A review of enhancers for chemiluminescence enzyme immunoassay. *Food Agric. Immunol.* **28**, 315–327 (2017).
  35. Salm, P. *et al.* Evaluation of a fluorescent polarization immunoassay for whole blood everolimus determination using samples from renal transplant recipients. *Clin. Biochem.* **39**, 732–738 (2006).
  36. Ateto, A. A. The structures of DNA and RNA. in *Molecular Biology of the GeneEdition: Fifth Edition* 1–33 (2002).
  37. Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H. & Vogt, P. H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* **23**, 504–511 (1997).
  38. Board, E. A. Recent advances in DNA biosensor. *Sensors Transducers J.* **92**, 122–133 (2008).

39. Cristofolini, L. *et al.* The structure of DNA-containing complexes suggests the idea for a new adaptive sensor. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **321**, 158–162 (2008).
40. Sampson, T. Aptamers and SELEX: the technology. *World Pat. Inf.* **25**, 123–129 (2003).
41. Sassolas, A., Leca-Bouvier, B. D. & Blum, L. J. DNA biosensors and microarrays. *Chem. Rev.* **108**, 109–139 (2008).
42. Bagni, G., Osella, D., Sturchio, E. & Mascini, M. Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies. *Anal. Chim. Acta* **573–574**, 81–89 (2006).
43. Wang, J. *et al.* DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review. *Anal. Chim. Acta* **347**, 1–8 (1997).
44. Sassolas, A., Hayat, A. & Marty, J.-L. Electrochemical biosensors for the detection of microcystins: recent advances and perspectives. *Biosens. Recent Adv. Math. challenges* **4**, 97–109 (2014).
45. Huertas, C. S., Fariña, D. & Lechuga, L. M. Direct and label-free quantification of micro-RNA-181a at attomolar level in complex media using a nanophotonic biosensor. *ACS Sensors* **1**, 748–756 (2016).
46. Zhang, G. J., Chua, J. H., Chee, R. E., Agarwal, A. & Wong, S. M. Label-free direct detection of MiRNAs with silicon nanowire biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 2504–2508 (2009).
47. Francis, T. S. Y. & Shizhuo, Y. Fiber optic sensors. in (ed. Yin, F. T. S. Y. S.) 1–509 (2002).
48. Angenendt, P. Progress in protein and antibody microarray technology. *Drug Discov. today targets* **10**, 1–9 (2005).
49. Patel, P. N., Mishra, V. & Mandloi, A. S. Optical biosensors: fundamentals & trends. *J. Eng. Res. Stud.* **1**, 15–34 (2010).
50. Mannelli, I. *et al.* DNA immobilisation procedures for surface plasmon resonance imaging (SPRI) based microarray systems. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 803–809 (2007).
51. Ruiz-Tórtola, A. *et al.* Experimental study of the evanescent-wave photonic sensors response in presence of molecular beacon conformational changes.

- J. Biophotonics* **11**, e201800030 (2018).
52. Escorihuela, J. *et al.* Dual-polarization interferometry: a novel technique to light up the nanomolecular world. **115**, 265–294 (2015).
  53. Juste-dolz, A. *et al.* New structural insights into the role of TROVE2 complexes in the on-set and pathogenesis of systemic lupus erythematosus determined by a combination of QCM-D and DPI. *Anal. Bioanal. Chem.* **411**, 4709–4720 (2018).
  54. Conteduca, D., Dell’Olio, F., Ciminelli, C. & Armenise, M. N. New miniaturized exhaled nitric oxide sensor based on a high Q/V mid-infrared 1D photonic crystal cavity. *Appl. Opt.* **54**, 2208–2217 (2015).
  55. Tao, X. Wearable photonics based on integrative polymeric photonic fibres. in *Wearable Electronics and Photonics* 136–154 (Woodhead Publishing Limited, 2005).
  56. Yablonovitch, E. Inhibited spontaneous emission in solid-state physics and electronics. *Phys. Rev. Lett.* **58**, 13–20 (1987).
  57. Goyal, A. K. & Pal, S. Design and simulation of high sensitive photonic crystal waveguide sensor. *Optik (Stuttg.)* **126**, 240–243 (2015).
  58. Liu, Q. *et al.* Biosensors and bioelectronics Mach–Zehnder interferometer (MZI) point-of-care system for rapid multiplexed detection of microRNAs in human urine specimens. *Biosens. Bioelectron.* **71**, 365–372 (2015).
  59. Sanza, F. J. *et al.* Bio-photonic sensing cells over transparent substrates for anti-gestrinone antibodies biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4842–4847 (2011).
  60. Holgado, M. *et al.* Label-free biosensing by means of periodic lattices of high aspect ratio SU-8 nano-pillars. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 2553–2558 (2010).
  61. Lavín, Á., Casquel, R., Sanza, F. J., Laguna, M. F. & Holgado, M. Efficient design and optimization of bio-photonic sensing cells (BICELLS) for label free biosensing. *Sensors Actuators, B Chem.* **176**, 753–760 (2013).
  62. Holgado, M. *et al.* Biophotonic sensing cells (BICELLS) for label-free biosensing. *Symp. A1.III. Mater. devices sensing.* **26**, 4847 (2011).
  63. Zanchetta, G., Lanfranco, R., Giavazzi, F., Bellini, T. & Buscaglia, M. Emerging applications of label-free optical biosensors. *Nanophotonics* **6**, 627–645

- (2017).
64. Chin, C. D., Linder, V. & Sia, S. K. Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities. *Lab Chip* **7**, 41–57 (2007).
  65. González-Lucas, D., Bañuls, M. J. & García-rupérez, J. Covalent attachment of biotinylated molecular beacons via thiol-ene coupling. A study on conformational changes upon hybridization and streptavidin binding. *Microchim. Acta* **184**, 3231–3238 (2017).
  66. Irawati, N. *et al.* Relative humidity sensing using a PMMA doped agarose gel microfiber. *J. Light. Technol.* **35**, 3940–3944 (2017).
  67. Jerónimo, P., Araújo, A., Conceicao, M. & Montenegro, B. S. M. Optical sensors and biosensors based on sol – gel films. *Talanta* **72**, 13–27 (2007).
  68. Brun, E. M., Puchades, R. & Maquieira, A. Gold, carbon, and aluminum low-reflectivity compact discs as microassaying platforms. *Anal. Chem.* **85**, 4178–4186 (2013).
  69. Morais, S. & Tamarit-lópez, J. Analytical prospect of compact disk technology in immunosensing. *Anal Bioanal Chem* 2837–2844 (2008).
  70. Morais, S., Tortajada-Genaro, L. & Maquieira, A. Array-on-a-disk? How Blu-ray technology can be applied to molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **14**, 773–775 (2014).
  71. Santiago-Felipe, S., Tortajada-Genaro, L. A., Carrascosa, J., Puchades, R. & Maquieira, Á. Real-time loop-mediated isothermal DNA amplification in compact disc micro-reactors. *Biosens. Bioelectron.* **79**, 300–306 (2016).
  72. Morais, S., Puchades, R. & Maquieira, A. Disc-based microarrays: principles and analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 4523–4534 (2016).
  73. Enomoto, M., Tsubo, R., Kikuchi, M. & Mori, K. US Patent US2005/0233103A1. US Pat. (2005).
  74. Arnandis-Chover, T., Morais, S., González-Martínez, M. Á., Puchades, R. & Maquieira, Á. Biosensors and Bioelectronics High density MicroArrays on Blu-ray discs for massive screening. *Biosens. Bioelectron.* **51**, 109–114 (2014).
  75. Peris, E., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Photoattachment of thiolated DNA probes on SU-8 spin-coated Blu-ray disk surfaces for

- biosensing. *J. Mater. Chem. B* **1**, 6245–6253 (2013).
76. Tyona, M. D. A theoretical study on spin coating technique. *Adv. Mater. Res.* **2**, 195–208 (2013).
  77. Meyerhofer. Key stages in spin coating process. *Adv. Mater. Res.* **2**, 181–193 (1978).
  78. Sobek, J. & Schlappbach, R. Substrate architecture and functionality defining the properties and performance of DNA, peptide, protein and carbohydrate microarrays. *Pharmagenomics* **7**, 32–44 (2004).
  79. Rusmini, F., Zhong, Z. & Feijen, J. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* **8**, 1775–1789 (2007).
  80. Pallavicini, P., Dacarro, G. & Taglietti, A. Self-assembled monolayers of silver nanoparticles: from intrinsic to switchable inorganic antibacterial surfaces. *Antibact. Surfaces* **2018**, 4846–4855 (2018).
  81. Pfeifer, M. E. ADIBO-based “click” chemistry for diagnostic peptide microarray fabrication: physicochemical and assay characteristics. *Molecules* **18**, 9833–9849 (2013).
  82. Haghshenas Kashani, S. *et al.* Nano-silica functionalized with thiol-based dendrimer as a host for gold nanoparticles: An efficient and reusable catalyst for chemoselective oxidation of alcohols. *Appl. Organomet. Chem.* **32**, 1–13 (2018).
  83. Nelson, E. E. & Guyer, A. E. Regioselective covalent immobilization of recombinant antibody binding proteins A, G, and protein L for construction of antibody arrays. *J. Am Chem Soc.* **135**, 8973–8980 (2013).
  84. Escorihuela, J. *et al.* Direct covalent attachment of DNA microarrays by rapid thiol-ene ‘click’ chemistry. *Bioconjug. Chem.* **25**, 618–627 (2014).
  85. Ito, Y. Combinatorial bioengineering: review. *Biotechnol Prog.* **22**, 924–932 (2006).
  86. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int.* **40**, 2004–2021 (2001).
  87. Escorihuela, J. *et al.* Direct covalent attachment of DNA microarrays by rapid thiol-ene “click” chemistry. *Bioconjug. Chem.* **25**, 6618–627 (2014).

88. Weinrich, D. *et al.* Preparation of biomolecule microstructures and microarrays by thiol-ene photoimmobilization. *ChemBioChem* **11**, 235–247 (2010).
89. Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Chemical surface modifications for the development of silicon-based label-free integrated optical (IO) biosensors: A review. *Anal. Chim. Acta* **777**, 1–16 (2013).
90. Alonso, R., Jiménez-Meneses, P., García-Rupérez, J., Bañuls, M. J. & Maquieira, A. Thiol-ene click chemistry towards easy microarraying of half-antibodies. *Chem. Commun.* **54**, 6144–6147 (2018).
91. Ruiz-Tórtola, A. *et al.* High sensitivity and label-free oligonucleotides detection using photonic bandgap sensing structures biofunctionalized with molecular beacon probes. *Biomed. Opt. Express* **9**, 1717–1727 (2018).
92. Aragón, P., Noguera, P., Bañuls, M. José, Puchades, R. & Maquieira, A. Modulating receptor-ligand binding in biorecognition by setting surface wettability. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**, 5723–5730 (2018).
93. Escorihuela, J., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Development of oligonucleotide microarrays onto Si-based surfaces via thioether linkage mediated by UV irradiation. *Bioconjug. Chem.* **23**, 2121–2128 (2012).
94. Bañuls, M. J. *et al.* Improved performance of DNA microarray multiplex hybridization using probes anchored at several points by thiol-ene or thiol-yne coupling chemistry. *Bioconjug. Chem.* **28**, 496–506 (2017).
95. Escorihuela, J. & Puchades, R. Site-specific immobilization of DNA on silicon surfaces by using the thiol-yne reaction. *J. Mater. Chem. B* **2**, 8510–8517 (2014).
96. Jiménez-Meneses, P., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Fluor-thiol photocoupling reaction for developing high performance nucleic acid (NA) microarrays. *Anal. Chem.* **90**, 11224–11231 (2018).
97. Bañuls, M. J., González-Martínez, M. Á., Sabek, J., García-Rupérez, J. & Maquieira, A. Thiol-click photochemistry for surface functionalization applied to optical biosensing. *Anal. Chim. Acta* **1060**, 103–113 (2019).
98. Wichterlew, O. & Lim, D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature* **185**, 117–118 (1960).
99. Rubina, A. Y., Kolchinsky, A., Makarov, A. A. & Zasedatelev, A. S. Why 3-D?



- Gel-based microarrays in proteomics. *Proteomics* **8**, 817–831 (2008).
100. Caló, E. & Khutoryanskiy, V. V. Biomedical applications of hydrogels: a review of patents and commercial products. *Eur. Polym. J.* **65**, 252–267 (2015).
  101. Moschallski, M., Evers, A., Brandstetter, T. & Rühle, J. Sensitivity of microarray based immunoassays using surface-attached hydrogels. *Anal. Chim. Acta* **781**, 72–79 (2013).
  102. Beyer, A., Pollok, S., Berg, A., Weber, K. & Popp, J. Easy daylight fabricated hydrogel array for colorimetric DNA analysis. *Macromol. Biosci.* **14**, 889–898 (2014).
  103. Liu, X., Lei, Z., Liu, F., Liu, D. & Wang, Z. Fabricating three-dimensional carbohydrate hydrogel microarray for lectin-mediated bacterium capturing. *Biosens. Bioelectron.* **58**, 92–100 (2014).
  104. Guschin, D. *et al.* Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips. *Anal. Biochem.* **250**, 203–211 (1997).
  105. Arenkov, P. *et al.* Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal. Biochem.* **278**, 123–131 (2000).
  106. Rubina, A. Y. *et al.* Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications. *Biotechniques* **34**, 1008–1022 (2003).
  107. Rubina, A. Y., Dyukova, V. I., Dementieva, E. I. & Stomakhin, A. A. Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips. *Anal. Biochem.* **340**, 317–329 (2005).
  108. Hosseinkhani, H. *et al.* DNA nanoparticles encapsulated in 3D tissue-engineered scaffolds enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 47–60 (2007).
  109. Rubina, A. Y. *et al.* Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. *Anal. Biochem.* **325**, 92–106 (2004).
  110. Mirzabekov, A. D., Rubina, A. J. & Panvok, V. S. Composition for polymerizing immobilization of biological molecules and method for producing said composition. (2010).
  111. Mirzabekov, A. & Kolchinsky, A. Emerging array-based technologies in

- proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 70–75 (2002).
112. Charles, P. T. *et al.* Fabrication and characterization of 3D hydrogel microarrays to measure antigenicity and antibody functionality for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 753–764 (2004).
  113. E.I., D. *et al.* Protein microchips in quantitative assays for tumor markers. *Dokl. Biochem. Biophys.* **395**, 88–92 (2004).
  114. Herrmann, A., Kaufmann, L., Dey, P., Haag, R. & Schedler, U. Bioorthogonal in situ hydrogels based on polyether polyols for new biosensor materials with high sensitivity. *Appl. Mater. Interfaces* **10**, 11382–11390 (2018).
  115. Nakabayashi, N. & Williams, D. F. Preparation of non-thrombogenic materials using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. *Biomaterials Nanoarchitectonics* **24**, 2431–2435 (2003).
  116. K, N. *et al.* Development of a ferrocene-mediated needle-type glucose sensor covered with newly designed biocompatible membrane, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate. *Med Prog Technol* **21**, 91–103 (1995).
  117. Dalton, J. A., Higgins, M. K., Miller, A. H., Keefe, F. J. & Khuri, F. R. Purification of recombinant C-reactive protein mutants. *J Biol Chem.* **35**, 25353–25358 (1992).
  118. Iwasaki, Y. & Ishihara, K. Cell membrane-inspired phospholipid polymers for developing medical devices with excellent biointerfaces. *Sci. Technol. od Adv. Mater.* **13**, 064101 (2012).
  119. Mclean, K. M. *et al.* Method of immobilization of carboxymethyl-dextran affects resistance to tissue and cell colonization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **18**, 221–234 (2000).
  120. Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C. & Alhaique, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J. Control. Release* **119**, 5–24 (2007).
  121. Chao, J. *et al.* Hybridization chain reaction amplification for highly sensitive fluorescence detection of DNA with dextran coated microarrays. *Biosens. Bioelectron.* **81**, 92–96 (2016).
  122. García-Rupérez, J. Advanced nanophotonic point-of-care analysis device for fast and early diagnosis of cardiovascular diseases. <https://phocnosis.eu/>

123. Bhayana, V. & Henderson, R. Biochemical markers of myocardial damage. *Clin. Biochem.* **28**, 1–29 (1995).
124. Algarra, M., Gomes, D. & Esteves da Silva, J. C. G. Current analytical strategies for C-reactive protein quantification in blood. *Clin. Chim. Acta* **415**, 1–9 (2013).
125. Störk, T. V. *et al.* Diagnostic and prognostic role of myoglobin in patients with suspected acute coronary syndrome. *Am. J. Cardiol.* **86**, 1371–1374 (2000).
126. Kagen, L. J. Myoglobin: methods and diagnostic uses. *Critial Rev. Clin. Lab. Sci.* **9**, 273–302 (1978).
127. Ioannidis, J. P. A., Salem, D., Chew, P. W. & Lau, J. Accuracy of imaging technologies in the diagnosis of acute cardiac ischemia in the emergency department: a meta-analysis. *Ann. Emerg. Med.* **37**, 471–477 (2001).
128. Bertsch, T., Bleuel, H., Deschl, U. & Rebel, W. A new sensitive cardiac troponin T rapid test (TROPT<sup>®</sup>) for the detection of experimental acute myocardial damage in rats. *Exp. Toxic Pathol.* **51**, 565–569 (1999).
129. Vermonden, T., Censi, R. & Hennink, W. E. Hydrogels for protein delivery. *Chem. Rev.* **112**, 2853–2888 (2012).
130. Liu, X., Lei, Z., Liu, D. & Wang, Z. Development of a sandwiched microarray platform for studying the interactions of antibiotics with *Staphylococcus aureus*. *Anal. Chim. Acta* **917**, 93–100 (2016).
131. Sampaio, C. *et al.* Development of peptide-functionalized synthetic hydrogel microarrays for stem cell and tissue engineering applications. *Acta Biomater.* **45**, 110–120 (2016).
132. Liu, X., Li, T., Liu, D. & Wang, Z. Fabricating three-dimensional hydrogel oligonucleotide microarrays to detect single nucleotide polymorphisms. *Anal. Methods* **5**, 285–290 (2013).
133. Li, S. *et al.* Dextran hydrogel coated surface plasmon resonance imaging (SPRi) sensor for sensitive and label-free detection of small molecule drugs. *Appl. Surf. Sci.* **355**, 570–576 (2015).
134. Moschallski, M., Baader, J., Prucker, O. & Rühle, J. Printed protein microarrays on unmodified plastic substrates. *Anal. Chim. Acta* **671**, 92–98 (2010).

135. Kivlehan, F., Paolucci, M., Brennan, D., Ragoussis, I. & Galvin, P. Three-dimensional hydrogel structures as optical sensor arrays, for the detection of specific DNA sequences. *Anal. Biochem.* **421**, 1–8 (2012).
136. Thompson, D., Pepys, M. B. & Wood, S. P. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* **7**, 169–177 (1999).
137. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* **107**, 363–369 (2003).
138. Deegan, O., Walshe, K., Kavanagh, K. & Doyle, S. Quantitative detection of C-reactive protein using phosphocholine-labelled enzyme or microspheres. *Anal. Biochem.* **312**, 175–181 (2003).
139. Lee, S. G. *et al.* Phosphocholine-modified magnetic nanoparticles for isolation of C-reactive protein from human serum. *Sep. Sci. Technol.* **48**, 2600–2607 (2013).
140. Kim, E. K. *et al.* Protein-directed immobilization of phosphocholine ligands on a gold surface for multivalent C-reactive protein binding. *Bentham Sci. Publ.* **13**, 519 (2013).
141. Kitayama, Y. & Takeuchi, T. Localized surface plasmon resonance nanosensing of C-reactive protein with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-grafted gold nanoparticles prepared by surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Anal. Chem.* **86**, 5587–5594 (2014).
142. Kamon, Y. *et al.* Synthesis of grafted phosphorylcholine polymer layers as specific recognition ligands for C-reactive protein focused on grafting density and thickness to achieve highly sensitive detection. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 9951–9958 (2015).
143. Yoshimoto, J. *et al.* Optical properties of 2-ethacryloyloxyethyl phosphorylcholine-protected Au<sub>4</sub> nanoclusters and their fluorescence sensing of C-reactive protein. *J. Phys. Chem. C* **119**, 14319–14325 (2015).
144. Matsuura, R., Tawa, K., Kitayama, Y. & Takeuchi, T. A plasmonic chip-based bio/chemical hybrid sensing system for the highly sensitive detection of C-reactive protein. *Chem. Commun.* **52**, 3883–3886 (2016).
145. Morais, S., Tortajada-Genaro, L. & Maquieira, A. Array-on-a-disk? How Blu-ray technology can be applied to molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol.*

- Diagn.* **14**, 773–775 (2014).
146. Morais, S., Tortajada-Genaro, L. A., Arnandis-Chover, T., Puchades, R. & Maquieira, A. Multiplexed microimmunoassays on a digital versatile disk. *Anal. Chem.* **81**, 5646 (2009).
  147. Mira, D. *et al.* High-throughput screening of surface-enhanced fluorescence on industrial standard digital recording media. *Opt. Based Biol. Chem. Sens. Def.* **5617**, 364–373 (2004).
  148. Chen, H., Huang, J., Lee, J., Hwang, S. & Koh, K. Surface plasmon resonance spectroscopic characterization of antibody orientation and activity on the calixarene monolayer. *Sensors Actuators, B Chem.* **147**, 548–553 (2010).
  149. Escorihuela, J. *et al.* Direct covalent attachment of DNA microarrays by rapid thiol – ene “click” chemistry. *Bioconjug. Chem.* **25**, 6618–627 (2014).
  150. González-Lucas, D., Bañuls, M. J., Puchades, R. & Maquieira, A. Versatile and easy fabrication of advanced surfaces for high performance DNA microarrays. *Adv. Mater. Interfaces* **3**, 1500850 (2016).
  151. Zhou, Y., Fang, Y. & Ramasamy, R. P. Non-covalent functionalization of carbon nanotubes for electrochemical biosensor development. *Sensors (Switzerland)* **19**, (2019).
  152. Qu, Z., Xu, H. & Gu, H. Synthesis and biomedical applications of poly((meth)acrylic acid) brushes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 14537–14551 (2015).
  153. Oh, S. J., Hong, B. J., Choi, K. Y. & Park, J. W. Surface modification for DNA and protein microarrays. *Omi. A J. Integr. Biol.* **10**, 327–343 (2006).
  154. Stanciu, M. C. & Nichifor, M. Influence of dextran hydrogel characteristics on adsorption capacity for anionic dyes. *Carbohydr. Polym.* **199**, 75–83 (2018).
  155. Zhou, Y., Andersson, O., Lindberg, P. & Liedberg, B. Protein microarrays on carboxymethylated dextran hydrogels: immobilization, characterization and application. **30**, 21–30 (2004).
  156. Nikpour, P., Salimi-kenari, H., Fahimipour, F. & Mahmood, S. Dextran hydrogels incorporated with bioactive glass-ceramic: Nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* **190**, 281–294 (2018).

157. Wang, X. *et al.* Injectable dextran hydrogels fabricated by metal-free click chemistry for cartilage tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **73**, 21–30 (2017).
158. Hoque, J. & Haldar, J. Direct synthesis of dextran-based antibacterial hydrogels for extended release of biocides and eradication of topical biofilms. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 15975–15985 (2017).
159. Ma, Y., Yi, J.-Z. & Zhang, L.-M. A Facile approach to incorporate silver nanoparticles into dextran-based hydrogels for antibacterial and catalytical application. *J. Macromol. Sci.* **46**, 643–648 (2009).
160. Varshosaz, J. Dextran conjugates in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **9**, 509–523 (2012).
161. Herranz, S. *et al.* Multiplex environmental pollutant analysis using an array biosensor coated with chimeric hapten-dextran-lipase constructs. *Sensors Actuators B. Chem.* **257**, 256–262 (2018).
162. Chao, J. *et al.* Hybridization chain reaction amplification for highly sensitive fluorescence detection of DNA with dextran coated microarrays. *Biosens. Bioelectron.* **81**, 92–96 (2016).
163. Blum, L. J. & Marquette, C. A. High-throughput multiplexed competitive immunoassay for pollutants sensing in water. *Anal. Chem.* **84**, 10267–10276 (2012).
164. Angeloni, S., Ridet, J. L., Kusy, N. & Gao, H. Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. **15**, 31–41 (2005).
165. Escorihuela, J. & Puchades, R. Site-specific immobilization of DNA on silicon surfaces by using the thiol–yne reaction. *J. Mater. Chem. B* **2**, 8510–8517 (2014).
166. Escorihuela, J., Puchades, R. & Maquieira, A. Development of oligonucleotide microarrays onto Si-based surfaces via thioether linkage mediated by UV irradiation. *Bioconjug. Chem.* **23**, 2121–2128 (2012).
167. Dondoni, A. The Emergence of thiol–ene coupling as a click process for materials and bioorganic Chemistry \*\*. *Angew. Chem.* **47**, 8995–8997 (2008).
168. van Dijk-Wotthuis, W. N. E. *et al.* Synthesis, characterization, and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran.

- Macromolecules* **28**, 6317–6322 (1995).
169. Pirrung, M. C. How to make a DNA chip. *Angew. Chem. Int* **41**, 1276–1289 (2002).
  170. Wang, C. *et al.* DNA microarray fabricated on poly (acrylic acid) brushes-coated porous silicon by in situ rolling circle amplification. *Analyst* **137**, 4539–4545 (2012).
  171. Casanova-Salas *et al.* Identification of miR-187 and miR-182 as biomarkers of early diagnosis and prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J. Urol.* **192**, 252–259 (2014).
  172. Wu, J. *et al.* Lab-on-a-chip platforms for detection of cardiovascular disease and cancer biomarkers. *Sensors (Switzerland)* **17**, 2934 (2017).
  173. Jonkheijm, P., Weinrich, D., Schröder, H., Niemeyer, C. M. & Waldmann, H. Chemical strategies for generating protein biochips. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 9618–9647 (2008).
  174. Phaner-Goutorbe, M., Dugas, V., Chevolut, Y. & Souteyrand, E. Silanization of silica and glass slides for DNA microarrays by impregnation and gas phase protocols: a comparative study. *Mater. Sci. Eng. C* **31**, 384–390 (2011).
  175. Sanza, F. J. *et al.* Bio-Photonic sensing cells over transparent substrates for anti-gestrinone antibodies biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4842–4847 (2011).
  176. Casquel, R. *et al.* Optimization of a label-free biosensor vertically characterized based on a periodic lattice of high aspect ratio SU-8 nanopillars with a simplified 2D theoretical model. *Phys. Status Solidi Curr. Top. Solid State Phys.* **8**, 1087–1092 (2011).
  177. Mira, D. *et al.* High-throughput screening of surface-enhanced fluorescence on industrial standard digital recording media. *Opt. Based Biol. Chem. Sens. Def.* **5617**, 364 (2004).
  178. Lee, J. H. *et al.* Label free novel electrical detection using micromachined PZT monolithic thin film cantilever for the detection of C-reactive protein. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 269–275 (2004).
  179. Roberts, W. L. *et al.* Evaluation of nine automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. Part 2. *Clin. Chem.* **47**, 418–25 (2001).

180. Hu, W. P. *et al.* Immunodetection of pentamer and modified C-reactive protein using surface plasmon resonance biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1631–1637 (2006).
181. Kim, H. C., Lee, S. K., Sohn, Y. S., Ryu, H. K. & Jeong, S. W. Preparation of a sensing membrane for C-reactive protein. *Macromol. Symp.* **249–250**, 71–75 (2007).
182. Yuk, J. S., Jung, J. W., Hyun, J., Kim, Y. M. & Ha, K. S. Development of a scanning surface plasmon microscope based on white light for analysis of a wide range of protein arrays. *Sensors Actuators, B Chem.* **131**, 241–246 (2008).
183. Vashist, S. K., Schneider, E. M. & Luong, J. H. T. Surface plasmon resonance-based immunoassay for human C-reactive protein. *Analyt* **140**, 4445–4452 (2015).
184. Luan, E., Shoman, H., Ratner, D. M., Cheung, K. C. & Chrostowski, L. Erratum: Luan, E.X.; Shoman, H.; Ratner, D.M.; Cheung, K.C.; Chrostowski, L. Silicon Photonic biosensors using label-free detection. *Sensors* 2018, 18, 3519. *Sensors (Basel)*. **19**, 19051161 (2019).
185. Iqbal, M. *et al.* Label-free biosensor arrays based on silicon scanning instrumentation. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **16**, 654–661 (2010).
186. Franssen, O., Talsma, H., Steenbergen, M. J. Van, Bosch, J. J. K. Den & Hennink, W. E. Synthesis, characterization, and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran. *Macromolecules* **28**, 6317–6322 (1995).
187. Povinelli, M. L., Johnson, S. G. & Joannopoulos, J. D. Slow-light, band-edge waveguides for tunable time delays. *Opt. Express* **13**, 7145–7159 (2006).
188. Arya, S., Khan, S., Akhil Vaid, H. K. & Lehana, P. Microfluidic mechanics and applications: a review. *J. Nano- Electron. Phys.* **5**, 1–12 (2013).



# Capítulo 6. Conclusiones



## 6. Conclusiones

En esta tesis nos hemos centrado en el uso y desarrollo de hidrogeles para fabricación de micromatrices de receptores o sondas moleculares para biosensado sin marcaje en superficies fotónicas.

En primer lugar, se han desarrollado dos hidrogeles de fosforilcolina y dextrano con grupos acrilato, para llevar a cabo ensayos en formato de micromatriz mediante una metodología simple y rápida de fotopolimerización.

El hidrogel de fosforilcolina (MPC) se ha aplicado en micromatrices sobre *Blu-ray*. La inmovilización de las sondas se lleva a cabo mediante reacción de acoplamiento tiol-acrilato entre sondas tioladas y los grupos acrilato del hidrogel. Esta metodología se puede aplicar en superficies con grupos alqueno o epoxi. Se ha demostrado que los hidrogeles pueden usarse en micromatrices para inmunoensayo y para ensayos de hibridación de ácidos nucleicos. Este método de inmovilización es rápido, limpio y biocompatible, habiéndose obtenido altas densidades de inmovilización y aumento de la superficie efectiva (3D). Esto hace que los ensayos sean más sensibles que los convencionales, presentando bajos límites de detección (6 nM), debido a que al trabajar con puntos tridimensionales de alta densidad aumenta el número de receptores.

También, se estudió un hidrogel de dextrano modificado con unidades de acrilato como medio de anclaje de proteínas o ácidos nucleicos (LOD 85 pM), como el miARN (LOD 2,92 pg/ $\mu$ L). Este hidrogel permite llevar a cabo la reacción fotoinducida de acoplamiento tiol-acrilato, permitiendo el anclaje de las sondas y la formación del hidrogel en un solo paso. Este hidrogel se ha usado para crear micromatrices en *Blu-ray* y vidrio modificado con acrilato. Igualmente, el hidrogel se puede usar en cualquier superficie con grupos acrilato, alqueno o epoxi, siendo una forma sencilla y robusta de preparar micromatrices de altas prestaciones para diferentes aplicaciones.

Por otro lado, se estudió la detección sin marcaje utilizando diferentes materiales nanoestructurados como BICELLS, aumentaron la sensibilidad del sensor un orden de magnitud con respecto a la obtenida en materiales con estructuras de Fabry-Perot, también estudiadas.

La combinación de estas estructuras, basadas en el principio de medición BICELL, con las propiedades de los hidrogeles ha demostrado ser una herramienta poderosa para

biosensado de analitos de baja abundancia, especialmente interesante en muestras con matrices complejas donde la adsorción no específica puede ser un problema para la detección. El hidrogel fue obtenido mediante reacción fotoquímica a partir del derivado de fosforilcolina, que mantiene su capacidad de reconocimiento de la CRP. Así, la combinación de la superficie nanoestructurada y el hidrogel permite simplificar el proceso, mejorando a su vez las prestaciones.

Además, se ha desarrollado un protocolo de biofuncionalización mediante la reacción tiol-eno entre los grupos tiol de los anticuerpos y los grupos vinilo de la superficie, catalizada por luz UV. La fotorreacción permite que las biomoléculas se inmovilicen solo en las posiciones específicas de detección, lo que abre la posibilidad al multiplexado. En formato micromatriz de fluorescencia, esta misma aproximación se ha aplicado a la determinación simultánea de 3 biomarcadores de riesgo cardiovascular CRP, cTnI y Mb, alcanzando prestaciones analíticas satisfactorias para su uso clínico.

Este método de anclaje también se ha ensayado en sensores fotónicos basados en guías corrugadas, monitorizándose el proceso de fotoinmovilización en tiempo real. Este resultado muestra la posibilidad de utilizar sensores nanofotónicos como herramienta para estudiar los mecanismos de las reacciones fotoinducidas a tiempo real. El biorreconocimiento de los biomarcadores por los anticuerpos inmovilizados se comprobó mediante la medida de fluorescencia, aunque las guías no produjeron señal detectable. En este sentido, cabe indicar que será necesario optimizar la respuesta fotónica de estos transductores para alcanzar la sensibilidad requerida en las aplicaciones estudiadas en esta tesis.

Los estudios preliminares de reconocimiento de CRP usando el hidrogel de fosforilcolina con transductores nanoestructurados (BICELLS o guías corrugadas) también han resultado prometedores, aunque queda mucho trabajo de optimización pendiente para que realmente constituya una alternativa competitiva en este campo.

Se ha demostrado por primera vez la fotoinmovilización de fragmentos de anticuerpos (hIgG) en superficies nanoestructuradas, manteniendo su capacidad de biorreconocimiento y aumentando significativamente la sensibilidad de los inmunoensayos respecto a la alcanzada con los anticuerpos originales.

