



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Síntesis y caracterización de un hidrogel modificado con  
proteína y con polirotaxano para su empleo en la  
fabricación de un biosensor holográfico para detección  
óptica sin marcaje.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Huertas Soler, Pablo

Tutor/a: Bañuls Polo, María José

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

**DATOS DEL TFG:**

<b>Autor:</b> Pablo Huertas Soler
<b>Tutor/a:</b> María José Bañuls Polo
<b>Cotutor/a:</b> Aitor Cubells Gómez
<b>Titulación:</b> Biotecnología
<b>Título del trabajo:</b> Síntesis y caracterización de un hidrogel modificado con proteína y con polirotaxano para su empleo en la fabricación de un biosensor holográfico para detección óptica sin marcaje.
<b>Localidad y fecha:</b> Valencia, 13 de junio de 2022

# SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN HIDROGEL MODIFICADO CON PROTEÍNA Y CON POLIROTAXANO PARA SU EMPLEO EN LA FABRICACIÓN DE UN BIOSENSOR HOLOGRÁFICO PARA DETECCIÓN ÓPTICA SIN MARCAJE.

---

Un enfoque muy interesante dentro de la biodetección sin marcaje (*label-free*) es el desarrollo de biosensores ópticos basados en holografía, que brinda entre otras ventajas, simplicidad en la operación, flexibilidad y bajo costo de fabricación, lo que permite una capacidad de producción superior. Los sensores holográficos basados en *gratings* de hidrogel permiten una biodetección simple, con precedentes en la literatura para este tipo de metodología aplicada a la biodetección de IgG humana o trombina. Estos sistemas consisten en un hidrogel sensible que difracta la luz a diferentes longitudes de onda dependiendo de las dimensiones y los cambios del índice de refracción en el material que tiene grabado un patrón holográfico, produciendo así cambios en la señal de difracción en presencia del analito de interés, debido a la modificación estructural en el polímero inducida por el propio analito.

La composición de los hidrogeles se puede seleccionar para que respondan específicamente a diferentes estímulos y, por lo tanto, el patrón de difracción se puede correlacionar con la cantidad de analito. La reciente aparición de los materiales *slide-ring* (SR), polímeros dotados de una estructura reticulada basada en la estructura de los polirotaxanos, supone un gran avance en el desarrollo de materiales con extraordinarias propiedades en términos de elasticidad, elongación o resistencia a esfuerzos mecánicos. Por lo tanto, estos nuevos materiales podrían suponer la aparición de una nueva generación de hidrogeles adecuados para la elaboración de biosensores con un mayor rendimiento.

En este trabajo, se llevó a cabo un estudio de la síntesis y caracterización de un nuevo material de hidrogel basado en materiales SR capaz de detectar un analito específico, anti-BSA. Para conseguir la respuesta biológica del hidrogel, se incluyó albúmina de suero bovino (BSA) acrilada como monómero para que actuase como bioreceptor específico para el analito de interés. Con el fin de mejorar las propiedades mecánicas del hidrogel se incluyeron polirotaxanos acrilados en el proceso de síntesis, observando un aumento en la capacidad de hinchamiento. La viabilidad del hidrogel biosensible para generar redes de difracción superficiales (SRGs) mediante litografía blanda, también fue evaluada caracterizándose su eficiencia de difracción. Por su parte, la selectividad y sensibilidad del hidrogel funcionalizado hacia anti-BSA se analizó mediante ensayos de fluorescencia. Finalmente, se llevó a cabo la demostración del sistema desarrollado para la biodetección óptica sin marcaje de anti-BSA, alcanzándose un LOD de 0,183 mg L<sup>-1</sup>.

**Palabras clave:** hidrogel, biosensado óptico sin marcaje, holografía, BSA, polirotaxano, difracción, redes de difracción superficiales.

# SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A PROTEIN-MODIFIED HYDROGEL CONTAINING POLYROTAXANES FOR DEVELOPING A LABEL-FREE OPTICAL HOLOGRAPHIC BIOSENSOR.

---

A very interesting approach within *label-free* (LF) biosensing is the development of optical biosensors based on holography, which provides among other advantages, simplicity in operating, flexibility, and low manufacturing cost, allowing a superior production capacity. Holographic sensors based on hydrogel *grating* allow for simple biosensing, with precedents in the literature for this type of methodology applied to the biodetection of human IgG or thrombin. These systems consist of a responsive hydrogel that diffracts light at different wavelengths depending on the dimensions and refractive index changes in the material that has a holographic pattern engraved, thus producing changes in the diffraction signal in the presence of the analyte of interest, due to an analyte-induced polymer structural modification.

The composition of hydrogels can be selected to be specifically responsive to different stimuli, and thus the diffraction pattern can be correlated to the amount of analyte. The recent appearance of slide-ring (SR) materials, polymers with a cross-linked structure based on the structure of rotaxanes, represents a great advance in the development of materials with extraordinary properties in terms of elasticity, elongation, or resistance to mechanical stress. Thus, these new materials could lead to the appearance of a new generation of hydrogels suitable for better performing biosensors.

In this work, it was studied the synthesis and characterization of a new hydrogel material based on slide-ring materials capable of detect a specific analyte (anti-BSA). For the hydrogel to be bioresponsive, acrylated Bovine Serum Albumin (BSA) was included as a monomer to act as a specific bioreceptor for the analyte of interest. In order to improve hydrogels mechanical properties, acrylated polyrotaxanes were included in synthesis procedure, increasing their swelling capacity. The feasibility of the synthesized bioresponsive hydrogel to generate holographic surface relief gratings (SRGs) by soft lithography was also analyzed, characterizing its diffraction efficiency. On the other hand, it was studied the selectivity and sensibility of the functionalized hydrogel towards anti-BSA by fluorescence assays. Finally, the demonstration of the system developed for optical biodetection without anti-BSA labelling was carried out, reaching a LOD of 0,183 mg L<sup>-1</sup>.

**Keywords:** hydrogel, *label-free* optical biosensing, holography, BSA, polyrotaxane, diffraction, surface relief grating.

# AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar, agradecer a María José, mi tutora, la oportunidad que me dio de llevar a cabo este trabajo junto a ella, pues gracias a su apoyo, confianza, mucha paciencia y compromiso constante, he podido tener la oportunidad de tocar un área totalmente nueva y de interés para mí, aprendiendo mucho en el proceso.

Por supuesto, agradecer a Aitor toda la ayuda y apoyo brindado en el camino. A pesar de todos los problemas de origen conocido y desconocido que han ido surgiendo, hemos podido llevar a cabo este trabajo con éxito y entrega.

Por último, pero igual de importante, a mi familia y amigos, quienes me han acompañado a lo largo de esta etapa, en lo bueno y en lo malo, haciendo más amenos todos aquellos momentos donde parecía que todo se hacía cuesta arriba.

# ÍNDICE

---

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. IMPORTANCIA DE LOS BIOSENSORES Y MÉTODOS DIAGNÓSTICOS <i>IN VITRO</i> .....	1
1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSENSORES .....	3
1.3. BIOSENSORES CON Y SIN MARCAJE ( <i>LABEL-FREE</i> ) .....	4
1.4. BIOSENSORES BASADOS EN HOLOGRAFÍA.....	6
1.5. USO DE HIDROGELES PARA EL BIOSENSADO .....	9
1.6. ANTECEDENTES DE LOS SLIDE-RINGS.....	11
1.7. MOTIVACIÓN PARA ELABORAR EL ENSAYO .....	13
2. OBJETIVOS .....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. MATERIALES .....	15
3.2. MÉTODOS.....	15
3.2.1. PROTOCOLO MODIFICACIÓN DE BSA CON METACRILATO .....	15
3.2.2. SÍNTESIS DE HIDROGELES.....	16
3.2.3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE HINCHAMIENTO .....	17
3.2.4. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) .....	17
3.2.5. ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA.....	17
3.2.6. OBTENCIÓN DEL MOLDE DE PDMS MEDIANTE REPLICADO DEL <i>MASTER</i> .....	18
3.2.7. MEDIDAS ÓPTICAS DE LOS <i>GRATINGS</i> FABRICADOS.....	18
4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....	21
4.1. MODIFICACIÓN DE BSA CON METACRILATO.....	21
4.2. SÍNTESIS DE HIDROGELES .....	22
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES SINTETIZADOS .....	23
4.3.1. CAPACIDAD DE HINCHAMIENTO .....	23
4.3.2. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	24
4.4. CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO ESPECÍFICO DE ANTI-BSA MEDIANTE ENSAYOS DE FLUORESCENCIA.....	25
4.5. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DE LOS <i>GRATINGS</i> DE HIDROGEL.....	28
4.6. COMPARATIVA DE LOS PATRONES DE DIFRACCIÓN DE LOS <i>GRATING</i> DE HIDROGEL EN SECO E HIDRATADOS.....	29
4.6.1. COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE DIFRACCIÓN DE UN <i>GRATING</i> DE HIDROGEL SECO Y UNO HINCHADO EN MEDIO PBS-T .....	31

4.6.2. COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE DIFRACCIÓN DE UN <i>GRATING</i> DE HIDROGEL HINCHADO EN MEDIO PBS-T Y UNO INCUBADO CON ANTI-BSA .....	31
4.7. BIOSENSADO SIN MARCAJE DE ANTI-BSA MEDIANTE EL USO DE <i>GRATINGS</i> DE HIDROGEL, MEDIDAS DE DIFRACCIÓN .....	32
5. CONCLUSIONES .....	34
6. BIBLIOGRAFÍA.....	35

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

---

**Figura 1.** Representación esquemática de un biosensor.

**Figura 2.** *Gratings* formados por interferencia de rayos láser.

**Figura 3.** Esquema del mecanismo de detección de IgG humana en un *grating* de hidrogel. GAH-IgG: IgG antihumana de cabra, H-IgG: inmunoglobulina G humana.

**Figura 4.** Esquema de la estructura de un hidrogel convencional en estado relajado (izquierda) y bajo estrés mecánico (derecha).

**Figura 5.** Representación gráfica de entrecruzamiento reversible e irreversible.

**Figura 6.** Esquema de la estructura de un hidrogel basado en un polímero *slide-ring* en estado relajado (izquierda) y bajo estrés mecánico (derecha). Se puede observar como el efecto polea o *pulley effect* permite dispersar las tensiones producidas en el polímero al someter el hidrogel a estrés mecánico, concentrando dicho estrés en las cadenas cortas del gel.

**Figura 7.** Esquema de reacción por pasos para la obtención de hidrogeles basados en polirotaxanos.

**Figura 8.** Equipo utilizado para realizar las medidas de difracción. Donde: D=diafragma, L=lente móvil, P=fotodiodo y T=transductor.

**Figura 9.** Análisis de espectrometría de masas de BSA modificado con acrilato (6,5504 acrilato mol<sup>-1</sup>BSA).

**Figura 10.** Izquierda: estructura molecular del polirotaxano. Derecha: esquema de la estructura de un material *slide-ring* con entrecruzamientos que permiten el efecto polea.

**Figura 11.** Izquierda: hidrogel sintetizado en *bulk* (tras 48 horas sumergido en PBS-T) de apariencia transparente y uniforme en todos sus puntos y una morfología circular. Derecha: *grating* de hidrogel fabricado por réplica de molde holográfico (tras 48 horas sumergido en PBS-T).

**Figura 12.** Izquierda: comparación del porcentaje de hinchamiento de hidrogeles con y sin polirotaxanos en PBS-T a diferentes tiempos (h) (gráfico). Derecha: medidas del tamaño de un hidrogel en estado seco ( $\approx 2$  cm) (izquierda) e hinchado tras sumergirse en PBS-T durante 48 h ( $\approx 3$  cm) (derecha).

**Figura 13.** Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Universidad Politécnica de Valencia). Modelo Gemini SEM500 (Zeiss).

**Figura 14.** Fotografías tomadas mediante un equipo de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (Gemini SEM500). De izquierda a derecha: porosidades a 176X, porosidades a 315X, microporosidades a 1.28 K X.



**Figura 15.** Intensidad de fluorescencia de hidrogeles incubados en concentraciones crecientes de anti-BSA- Alexa<sub>647</sub> y anti-rabbit-Alexa<sub>647</sub> durante 30 minutos y lavado posterior en medio PBS-T durante 30 minutos.

**Figura 16.** Intensidad de fluorescencia de hidrogeles incubados con anti-BSA-Alexa<sub>647</sub> y anti-rabbit-Alexa<sub>647</sub> a diferentes concentraciones durante 30 minutos tras lavar con PBS-T a diferentes tiempos, 30 minutos y 14 horas.

**Figura 17.** Fotografías tomadas en un lector de fluorescencia casero basado en cámara CCD (20s, 0g). Intensidades de fluorescencia de hidrogeles incubados durante 30 minutos con anti-BSA-Alexa<sub>647</sub> (fila 1) y anti-rabbit-Alexa<sub>647</sub> (fila 2) y lavados posteriormente con medio PBS-T fresco (30 minutos). Anti-BSA- Alexa<sub>647</sub> y anti-rabbit- Alexa<sub>647</sub>: concentraciones crecientes en incubado (0, 1, 10, 25, 50, 100 mg L<sup>-1</sup>).

**Figura 18.** Izquierda: imagen obtenida mediante microscopia óptica del *grating* en el hidrogel hinchado. Derecha: medidas de difracción en 4 zonas (esquinas) de un *grating* de hidrogel. La replicación se llevó a cabo uniformemente en toda la red, permitiendo generar un patrón de difracción en cada uno de sus puntos, tal como se aprecia en la imagen.

**Figura 19.** Esquema del montaje óptico utilizado para la determinación de los ángulos de difracción y periodicidad del *grating*. Donde:  $s$ =distancia entre un orden determinado y el orden 0,  $D$ =distancia desde la cual se obtuvieron las imágenes y  $\theta$ =ángulo resultante de los rayos láser correspondientes a un orden determinado y el orden 0.

**Figura 20.** Comparativa de la capacidad de difracción de un *grating* de hidrogel sin hinchar (izquierda), uno hinchado tras ser sumergido en PBS-T durante 1 hora (centro) y uno tras una incubación de 1 hora con anti-BSA en PBS-T a una concentración de 25 mg L<sup>-1</sup> (derecha). Una mayor amplitud del período se correlaciona con una menor distancia entre los órdenes 0 y 1 (centro).

**Figura 21.** Eficiencia de difracción relativa (RDE) de *gratings* de hidrogel incubados en concentraciones crecientes de anti-BSA y anti-rabbit durante 4h y posterior lavado en medio PBS-T durante toda la noche.

**Tabla 1.** Técnicas de marcaje.

**Tabla 2.** Datos del patrón de difracción (orden 1) en *grating* de hidrogel seco.

**Tabla 3.** Datos del patrón de difracción (órdenes 1 y 2) en *grating* de hidrogel hinchado con PBS-T.

**Tabla 4.** Datos del patrón de difracción (orden 2) en *grating* de hidrogel incubado con anti-BSA a una concentración de 25 mg L<sup>-1</sup> en PBS-T.

# ABREVIATURAS

---

**AAm:** acrilamida

**AChE:** acetilcolinesterasa

**Anti-BSA:** antialbúmina de suero bovino

**Anti-BSA-Alexa<sub>647</sub>:** antialbúmina de suero bovino con fluoróforo Alexa Fluor 647

**Anti-rabbit:** anticuerpo de cabra anticonejo

**Anti-rabbit-Alexa<sub>647</sub>:** anticuerpo de cabra anticonejo con fluoróforo Alexa Fluor 647

**BSA:** albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)

**BSA-acrilato:** albúmina de suero bovino modificada con acrilato

**CCD:** dispositivo de carga acoplada

**CRP:** proteína C reactiva (*C-Reactive Protein*)

**CyD:** ciclodextrinas

**DE:** eficiencia de difracción

**DLIP:** patrones de interferencia láser directa (*Direct Laser Interference Patterning*)

**DMF:** N-dimetilformamida

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DPI:** interferometría de polarización dual

**GAH-IgG:** inmunoglobulina G de cabra antihumano

**H-IgG:** inmunoglobulina G humana

**IgG:** inmunoglobulina G

**IVD:** diagnóstico *in vitro*

**LF:** sin marcaje (*label-free*)

**LOD:** límite de detección

**LOQ:** límite de cuantificación

**M<sub>m</sub>:** masa molar

**NHS:** N-hidroxisuccimida

**PBA:** ácido fenilborónico

**PBL:** fenil-2,4,6-trimetil-benzoilfosfinato de litio

**PBS-T:** tampón de fosfato salino con Tween 20

**PDMS:** polimetilsiloxano

**PEG:** polietilenglicol

**PET-G:** copoliéster de polietilentereftalato glicol de extrusión

**POC:** punto de atención (*point-of-care*)

**PR:** polirotaxano

**RDE (%):** eficiencia de difracción relativa

**SEM:** microscopio electrónico de barrido

**SFR:** lector de fluorescencia de superficies

**SPR:** resonancia de plasmón superficial

**SR:** *slide-ring*

**SRG:** redes de relieve de superficie (*Surface Relief Grating*)

**UV:** ultravioleta

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**$\beta$ -CDAAmMe:** polirotaxano

**$\beta$ -CDAAmMe- PEG<sub>2000</sub>:** polipseudorotaxano

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. IMPORTANCIA DE LOS BIOSENSORES Y MÉTODOS DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*

La aceptación de los diagnósticos moleculares para la medicina personalizada, la incidencia cada vez mayor de enfermedades crónicas, infecciosas y relacionadas con el estilo de vida, la creciente población geriátrica propensa a trastornos inmunológicos, y el aumento de la demanda de pruebas en el punto-de-atención (POC, *point-of-care*) están impulsando el crecimiento del mercado de diagnóstico *in vitro* (IVD).

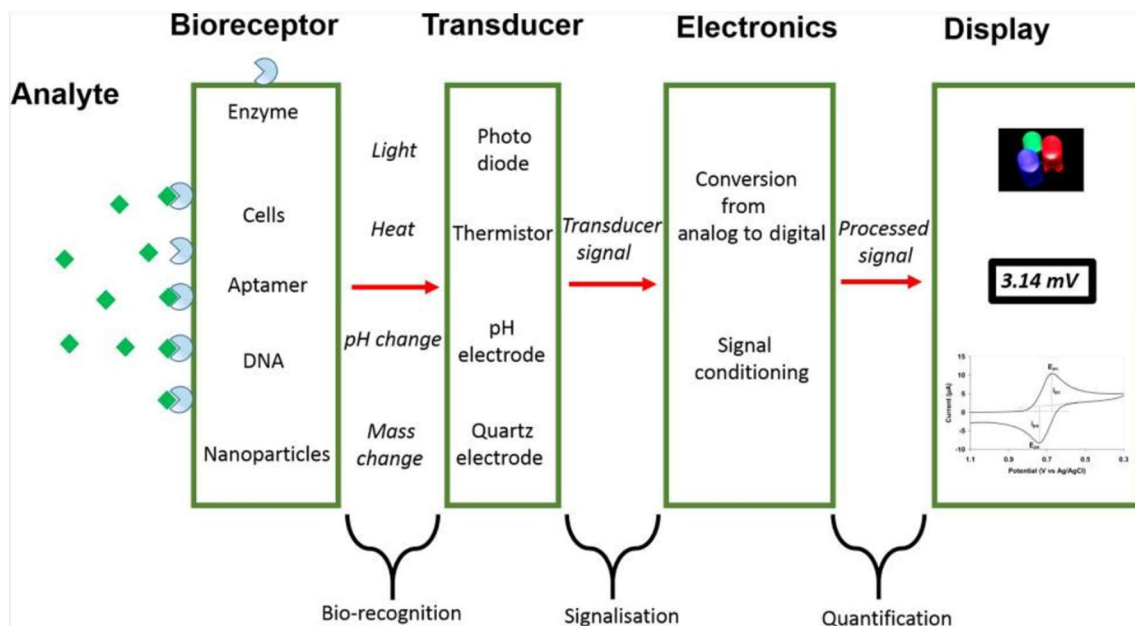
En las últimas dos décadas se ha centrado la atención en el desarrollo de nuevas tecnologías de IVD, debido a las ventajas que presentan, incluyendo la rápida obtención de resultados, su simplicidad, rentabilidad, la reducción del malestar del paciente y coste, y la capacidad de acceder a áreas remotas y realizar un diagnóstico temprano. Tradicionalmente el diagnóstico *in vitro* es llevado a cabo en laboratorios equipados con la instrumentación adecuada, utilizada siempre por personal capacitado encargado de la realización de las pruebas. Sin embargo, los últimos enfoques, en cuanto al desarrollo de este ámbito se refiere, van dirigidos cada vez más a posibilitar el IVD en sitios de testeo cada vez más cercanos al paciente. (Li, 2019)

En este contexto, el término POC, se refiere a pruebas o ensayos, principalmente para diagnóstico médico, que se realizan en el momento y lugar de la atención al paciente, entre los que se incluyen medidores de glucosa, analizadores de cuidados intensivos, análisis de metabolitos u orina, etc. (Dutta, 2015) (Goble *et al*, 2017) 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. De igual manera, este testeo tiene gran aplicabilidad en enfermedades no comunicables o no transmitibles que requieren un seguimiento continuo del paciente, como pueden ser la diabetes mellitus, hipertensión o la insuficiencia cardíaca congestiva. Actualmente, el diagnóstico POC se utiliza principalmente en pruebas de embarazo, cardio metabólicas, medidas de glucosa en sangre y enfermedades infecciosas como el VIH u otras enfermedades de transmisión sexual. (Chen *et al*, 2020) En definitiva, las pruebas POC proveen de resultados más rápidamente, permitiendo intervenir y prevenir riesgos y posibles complicaciones en un marco de tiempo más corto que lo esperable siguiendo una metodología tradicional, siendo también una opción que presenta un beneficio económico y social mayor. (Goble *et al*, 2017).

En este sentido, los biosensores se presentan como uno de los enfoques con más proyección de futuro en el creciente ámbito del IVD mediante pruebas POC y la introducción del diagnóstico molecular en la atención médica personalizada. Los biosensores desarrollados para aplicaciones *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. (Petrayeva *et al*, 2015)

Los biosensores, por definición, son dispositivos que combinan un elemento biológico (enzima, anticuerpo, tejido, orgánulo, ácido nucleico o célula completa) y una plataforma adecuada para la detección de uno o varios analitos, o un evento de reconocimiento biológico. (Van der Meer

*et al*, 2010) El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción entre el compuesto o microorganismo de interés (analito) y el elemento de reconocimiento (sonda). Como resultado de esta unión se produce la variación de una o varias propiedades fisicoquímicas (pH, transferencia de electrones, de temperatura, de masa, cambio de potencial, variación de las propiedades ópticas, etc.) que mide el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal electrónica indicativa de la presencia del analito en estudio o proporcional a su concentración en la muestra. (Sethi *et al*, 1994) (Jayanthi *et al*, 2017) En definitiva, un biosensor integra tres componentes básicos conectados en serie: un sistema de reconocimiento biológico, un transductor y un sistema de detección (Figura 1). Los métodos de transducción de señales están basados principalmente en las propiedades ópticas, físicas, químicas, electroquímicas, magnéticas o mecánicas de los materiales de bioreconocimiento funcionales.



**Figura 1.** Representación esquemática de un biosensor (Bhalla *et al*, 2016)

Del mismo modo, el interés en auge de los biosensores se relaciona también con la gran variedad de campos en los que se pueden utilizar los avances en biosensado, como el sector agroalimentario, industrial y de seguridad. Este interés se debe a que ofrecen alta sensibilidad, selectividad, especificidad, reproducibilidad y corto período de pretratamiento de muestras en matrices simples o complejas, permitiendo también realizar la detección del analito en tiempo real y, en el caso de los biosensores *label-free* sin necesidad de marcador, lo que implica una considerable reducción en el costo. (Bhalla *et al*, 2016) (Jiménez *et al*, 2009)

En sus inicios, alrededor de los años 60, estuvieron orientados al ámbito clínico y bioquímico, siendo el primer biosensor de carácter enzimático y capaz de determinar los niveles de glucosa en sangre mediante una reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa acoplada a un electrodo selectivo de oxígeno, también denominado sensor de Clark (1962). (Montañez *et al*, 2011) Desde hace más de 40 años se utilizan pruebas de embarazo en el hogar, consistiendo este biosensor en una tira reactiva que cambia de color, dando señal colorimétrica, cuando detecta hormonas del embarazo en la orina. Otro biosensor comúnmente utilizado es el

biosensor de estreptococos, permitiendo detectar la presencia de estas bacterias en la garganta del paciente en un corto período de tiempo con una certeza en torno al 95%. El desarrollo de los biosensores a lo largo del tiempo ha permitido su uso para la supervisión del estado de salud de pacientes que sufren enfermedades que requieren un control paramétrico continuo. Hoy en día, entre el extenso rango de aplicaciones que abarcan los biosensores, destacan la monitorización del medio ambiente, seguridad, calidad y trazabilidad alimentaria, descubrimiento de fármacos y detección de enfermedades. De hecho, una de las aplicaciones más interesantes y que toma una mayor relevancia es la detección de biomoléculas indicadoras de enfermedades (biomarcadores) o que pueden ser objetivo de fármacos, utilidades clasificadas dentro de la categoría de herramientas de análisis denominadas como *single-shot* o monitoreo a corto plazo.

A la hora de desarrollar un biosensor, entran en juego una gran variedad de conceptos físicos, químicos, bioquímicos, de ciencia de materiales, etc. La sensibilidad, selectividad, versatilidad, formato de ensayo, robustez, intervalo y tiempo de respuesta constituyen los principales parámetros en los cuales se centran las características ideales buscadas en el diseño de un biosensor. Una buena sensibilidad permite la detección de la mínima concentración requerida, mientras que una alta selectividad es requerida para detectar específicamente el analito de interés. Estas propiedades se logran mediante la incorporación de elementos específicos de reconocimiento biológico. Otro de los requisitos sería la operación en un intervalo de concentraciones de analito óptimo a tiempo real, siempre que las condiciones lo permitan. El desarrollo de sistemas robustos que permitan efectuar el ensayo a partir de muestras no tratadas es muy interesante, pues simplifica el análisis y reduce su duración. El dispositivo desarrollado debe ser de fácil manejo y no requerir personal especializado para su correcta utilización. La versatilidad también es una de las características deseables, pudiendo aplicarse el biosensor para la detección de distintos analitos o muestras. La capacidad del transductor para su miniaturización permitirá su integración en plataformas reducidas, pudiendo en un futuro trabajar con sistemas portátiles y manejar muestras de menor volumen. Además, para poder llevar a cabo la producción en masa de un biosensor, la fabricación del mismo ha de tener un bajo costo. Por su parte, la automatización de los sistemas de análisis podría permitir la incorporación de biosensores a procesos en línea.

## 1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSENSORES

En relación con la definición de biosensor mencionada con anterioridad, la clasificación de los biosensores puede realizarse atendiendo a distintos criterios. Existen tres categorías generales: según el transductor empleado, el elemento de reconocimiento y el método de detección.

Dependiendo del transductor empleado, el biosensor podrá clasificarse como un sensor eléctrico, mecánico, óptico o magnético. Este elemento está implicado en la sensibilidad, tamaño, composición y coste final del biosensor.

Los biosensores electroquímicos, generalmente, miden los cambios de una reacción química en la interfaz de un conductor eléctrico. Este tipo de sistema puede ser monitoreado *in vivo* y permite el desarrollo de dispositivos simples y de bajo costo. Como ejemplo de este tipo de biosensor, se encuentra aquel basado en un electrodo enzimático amperométrico para la detección peróxido de hidrógeno (Li *et al*, 1996). Por su parte, los biosensores conductimétricos

producen un cambio en la concentración iónica o conductividad eléctrica. Dentro de estos últimos, el más relevante es el sensor de urea. (Velychko *et al*, 2016)

Los biosensores mecánicos son capaces de detectar cambios debidos a una magnitud física. Entre las diferentes clases de biosensores mecánicos se encuentran aquellos capaces de detectar variaciones acústicas, en el espesor, o aquellos que detectan la unión formada en la superficie por un cambio en la frecuencia resonante o en el relieve de la misma. (Martínez *et al*, 2010)

Los biosensores ópticos se basan en la interacción entre la luz y la materia. En caso de ocurrir biorreconocimiento, se produce un cambio en el índice de refracción, lo que resulta en un cambio de alguna propiedad óptica, pudiendo relacionarse con la concentración del analito de interés. (Avella-Oliver *et al*, 2017) Este tipo de biosensores son, hoy en día, los más estudiados y desarrollados junto con los electroquímicos.

Los biosensores magnéticos permiten medir las variaciones del campo magnético creado por nanopartículas que se unen a moléculas específicas como marcadores, permitiendo el biorreconocimiento en un corto período de tiempo y con buena sensibilidad. Este tipo de sistemas tiende a imitar tecnologías desarrolladas con anterioridad. (Llandro *et al*, 2010)

Respecto a la clasificación atendiendo al elemento de reconocimiento biológico empleado para el biorreconocimiento del analito específico. Los elementos biológicos pueden ser simples, como enzimas, anticuerpos u oligonucleótidos, o más integrados y complejos como células, tejidos y/u organismos.

Por último, existe otra clasificación basada en la detección con o sin marcaje del analito. En el primer grupo, se utiliza el analito o un elemento de detección marcado con moléculas o partículas radioactivas, fluorescentes o magnéticas, de tal forma que la detección de dicho marcador se correlaciona con la concentración del analito de interés. Dentro del grupo de biosensores sin marcaje, conocidos a su vez bajo el nombre de *label-free*, (Borisov *et al*, 2008 no se utiliza ningún tipo de marcaje, permitiendo simplificar el proceso y realizar directamente la medición de la biointeracción sobre el transductor.

### 1.3. BIOCENSORES CON Y SIN MARCAJE (*LABEL-FREE*)

Como se ha comentado anteriormente, los biosensores, atendiendo al método de pueden clasificarse en biosensores con detección con marcaje o biosensores con detección sin marcaje, conocidos popularmente como *label-free* o LF.

La principal diferencia reside en la incorporación de una molécula adicional en las metodologías que emplean detección con marcaje. Estas moléculas denominadas “etiquetas” se unen mediante un enlace químico de forma permanente o temporal al analito de interés, incrementando la señal obtenida o facilitando al mismo tiempo la detección de la señal obtenida. A su vez los biosensores con marcaje pueden ser directos, en el caso de ser el analito de interés la molécula marcada, o indirectos, si la molécula marcada es la que reconoce al analito. (Tabla 1) Las etiquetas utilizadas en estos casos son muy variadas, pudiéndose hacer uso de cromóforos o colorantes, isótopos radioactivos, enzimas, moléculas fluorescentes, etc. (Tabla 1) Los procesos de marcaje presentan un límite de detección (LOD) muy bajo, necesitando poca muestra para permitir su detección, a la vez que proporcionan especificidad adicional mediante

la permisión de amplificaciones secundarias. Estos métodos también presentan varias desventajas, siendo necesaria una correcta selección, modificación, síntesis y purificación de reactivos, aumentando así el coste y complejidad del ensayo, pues aumenta el número de reactivos y pasos, lo que dificulta la monitorización cinética a tiempo real. Además, la existencia de la etiqueta incrementa el riesgo de modificar las propiedades de la molécula diana o analito estudiado por impedimento estérico u oclusión de los sitios de unión. (Sang *et al*, 2016)

**Tabla 1.** Técnicas de marcaje. (Yin *et al*, 2002)

	<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 proteica, teniendo que eliminar el marcador sin unir
<b>Marcaje indirecto</b>	Conjugados fluoróforo-anticuerpo secundario  Conjugados molécula específica-anticuerpos	La incubación con trazadores genéticos marcados es a menudo específica	Los trazadores genéricos marcados se pueden obtener comercialmente sin necesidad de un paso de marcaje	Requiere de un paso adicional de incubación, la necesidad de los analitos de poseer una etiqueta a la cual el trazador genérico se pueda unir y lavados exhaustivos
<b>Marcaje enzimático</b>	Conjugado anticuerpo-cebador, DNA circular, polimerasa, sondas de oligonucleótidos fluorescentes	Extensión del <i>primer</i> e hibridación de las sondas de oligonucleótidos marcadas	Unión directa o indirecta de las enzimas al analito	Se pueden dar grandes variaciones en función de los tiempos de incubación

NHS: N-hidroxisuccimida

Por otra parte, los biosensores LF, basados principalmente en la ausencia de etiquetas, ofrecen una detección directa a tiempo real, además de aportar información cinética y no alterar la conformación nativa de la proteína a detectar. Así, la cuantificación o detección de un biomarcador se puede realizar en un solo paso de forma simple y barata. Del mismo modo que



ocurre con los biosensores de detección con marcaje, en este conjunto también se encuentran limitaciones, como la necesidad de una unión no específica baja para conseguir una detección suficientemente sensible y también se requiere que la señal producida tras el reconocimiento sea lo suficientemente alta para diferenciarse claramente de la señal del ruido, evitando confusiones. (Khansili *et al*, 2018) (Sang *et al*, 2016)

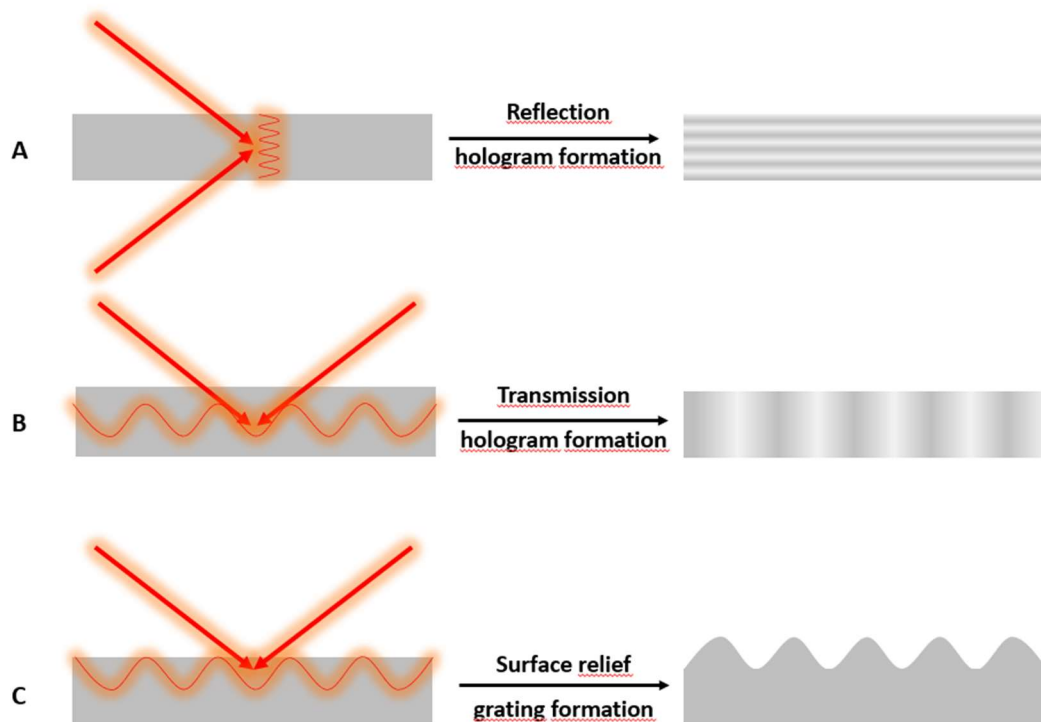
En lo que respecta a los biosensores *label-free*, han experimentado un desarrollo exponencial en las últimas décadas, llegando a abarcar una gran variedad de sectores. Los transductores, dentro de este grupo, pueden ser magnéticos, ópticos, mecánicos, piezoeléctricos, electroquímicos o entalpimétricos, En el caso de los biosensores ópticos *label-free*, el biorreconocimiento produce cambios en las propiedades ópticas de la luz como la longitud de onda, intensidad (debido a los cambios en la absorción o dispersión de la luz), polarización o velocidad de fase (cambios en el índice de refracción). (Patel *et al*, 2010) Las ventajas de estos sistemas son entre otras, una mayor sensibilidad, amplio rango dinámico, capacidad de producción a gran escala debido a su fácil fabricación o capacidad de multiplexado. Dentro de las técnicas de biosensado óptico *label-free* se encuentran la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR), los nanosensores de óptica integrada, la Interferometría de Polarización Dual (DPI) y los sensores holográficos en los que se centra este trabajo. Desde la comercialización del primer biosensor óptico LF en 1990 por parte de Biacore (Lechuga *et al*, 2005) los ámbitos en los que se han desarrollado este tipo de biosensores se han expandido, existiendo actualmente una gran variedad de aplicaciones. (Vestergaard *et al*, 2007) (Stern *et al*, 2007) (Hunt *et al*, 2010)

#### 1.4. BIOSENSORES BASADOS EN HOLOGRAFÍA

Una aproximación interesante para desarrollar biosensores ópticos *label-free* es el biosensado basado en holografía. Un sensor holográfico consiste en un dispositivo comprendido por un holograma incrustado en una matriz inteligente capaz de detectar determinadas moléculas o metabolitos. (Yetisen *et al*, 2014) Aquellos dispositivos basados en holografía se presentan como una opción interesante dentro de los biosensores ópticos, pudiendo usarse las redes de difracción holográficas como transductores.

El principio de la holografía se basa en la producción de un holograma o *grating* mediante la interferencia de dos o más láseres sobre un material fotosensible. El patrón formado consistirá en zonas expuestas y no expuestas a la luz, recibiendo el nombre de holograma. El *grating* fabricado es capaz de producir una señal, dependiente del periodo con el que ha sido fabricado, al exponerse a la luz, pues las zonas expuestas a la luz del material fotosensible sufrirán cambios en su coeficiente de absorción, índice de refracción o densidad.

Los hologramas se clasifican en sensores de volumen o redes de difracción de superficie, dependiendo de sus dimensiones (Figura 2). En el caso de los hologramas de volumen estos se caracterizan por ser la densidad o grosor del material donde se produce el grabado por la interferencia de los rayos láser mucho mayor que la longitud de onda empleada en la grabación. Si por el contrario, el patrón de interferencia genera un relieve periódico únicamente en la superficie del material, hablamos de “redes de relieve de superficie” (SRG). (Figura 2) Por otro lado, dependiendo de las direcciones de los rayos láser incidentes sobre el material fotosensible, los hologramas podrán ser clasificados en hologramas de reflexión o transmisión. (Lucío *et al*, 2022)



**Figura 2.** *Gratings* formados por interferencia de rayos láser. **a** Holograma de reflexión: los rayos láser interferentes se acercan al material desde dos lados opuestos. Aquí las franjas grabadas se encuentran paralelamente a la superficie del soporte. **b** Holograma de transmisión: los rayos láser interferentes se acercan al soporte desde un mismo lado. Las franjas son formadas perpendicularmente a la superficie del medio de grabado. **c** SRG (*Surface Relief Grating*): los rayos láser interferentes se acercan al soporte desde un mismo lado, generando un relieve perpendicular debido a la ablación láser del propio soporte de grabado. (Lucío *et al*, 2022)

Este tipo de sensores se encuentran en una etapa de desarrollo temprano. Sin embargo las características inherentes de este tipo de biosensado respecto a selectividad y sensibilidad les ha hecho estar en el punto de mira, habiéndose desarrollado y expandido en gran medida en los últimos años.

Existe literatura referida al desarrollo de sensores basados en holografía para la determinación de diferentes parámetros. Entre las diferentes posibilidades que estos ofrecen, a día de hoy pueden ser aplicables a la detección o medición de cambio de pH, detección iónica, sensado de humedad y temperatura, medidas de tensión en diferentes materiales, sensado de disolventes, monitoreo de los niveles de gases ambientales o glucosa en sangre, detección de anticuerpos y drogas tales como la cocaína, y/o monitoreo de crecimiento bacteriano. (Davies *et al*, 2021) Si bien las aplicaciones en sensado son muy extensas, para el caso del biosensado se encuentran todavía muy pocos desarrollos.

Entre todas estas posibles aplicaciones, la más estudiada y/o explotada, es el desarrollo de biosensores dirigidos hacia la detección de glucosa. Estos enfoques se basan en la unión de cis-dioles por derivados de ácido fenilborónico (PBA) que actúan como receptores específicos dentro de la matriz polimérica. (Ye *et al*, 2010) (Lee *et al*, 2004) (Kabilan *et al*, 2004). La coordinación de los cis-dioles desplaza el equilibrio hacia la forma tetraédrica cargada del

boronato, permitiendo el hinchamiento del hidrogel. Para que estos biosensores sean capaces de funcionar a pH fisiológico (Kabilan *et al*, 2004), el monómero empleado debe ser 3-acrilamida PBA. A pesar de ello no se presenta selectividad de la glucosa frente a otros azúcares. El sensor desarrollado con las características mencionadas pudo aplicarse al monitoreo del crecimiento de esporas bacterianas o a la detección de presencia de glucosa en orina.

El problema derivado de la falta de selectividad puede ser solventado o mejorado mediante la inclusión de monómeros de aminas o sales de amonio cuaternario en la matriz del hidrogel, permitiendo estas últimas la detección de glucosa en sangre. Otra mejora en selectividad se da al añadir conjuntamente aminas y sales de amonio con 2-acrilamido-PBA, pudiendo detectar glucosa en líquido lagrimal artificial independientemente del pH. (Yang *et al*, 2008)

En resumen, la selectividad y el pH compatible para el funcionamiento de este tipo de biosensado en cuanto a la detección de glucosa pueden ser modulados mediante la elección de la estructura derivada del ácido fenilborónico, la cantidad de monómero, el solvente y la combinación con derivados de aminas o amonio. Siguiendo esta formulación (sin *grating* en hidrogel), se han desarrollado lentes de contacto comerciales capaces de medir los niveles de glucosa a través un aplicación de teléfono móvil. (Elsherif *et al*, 2018)

Otra diana es el lactato (presenta mayores problemas de selectividad que la glucosa), sin embargo, hay más ejemplos de metabolitos y mediadores endógenos y exógenos que pueden ser detectados por este tipo de sensores basados en hidrogeles holográficos con SRG. De este modo se ha desarrollado la monitorización de urea y penicilina en la orina. Sin embargo, los sistemas desarrollados en cada caso, con hologramas sensibles a pH basado en acrilato y capaces de detectar los cambios de pH tras la conversión de ambos compuestos en sus respectivos ácidos, depende en gran medida de la fuerza iónica y de la capacidad amortiguadora del medio. Con relación a este último procedimiento, se ha aplicado al sensado de la inhibición de acetilcolinesterasa (AChE). (Tan *et al*, 2009). En este caso, el sistema se utilizó con el fin de estudiar la actividad enzimática de la AChE en presencia del sustrato y cinco inhibidores enzimáticos distintos, pudiendo determinar los diferentes grados de efecto inhibitorio de cada compuesto.

Sin embargo, aunque hay muchos sensores holográficos basados en hidrogel ya descritos en la literatura, que incluyen principalmente sensores de humedad, temperatura, iones, vapores orgánicos o pH (Yetisen *et al*, 2016) (Jiang *et al*, 2021), el caso de los biosensores holográficos basados en hidrogel aún no se ha desarrollado por completo. Si entendemos el biosensado como la detección específica de un analito por un bioreceptor específico; que comprende ácido nucleico, proteína, enzima, aptámero o incluso polímeros impresos molecularmente; se reportan muy pocos ejemplos de biosensores holográficos. Oliveira *et al*. utilizaron una matriz a base de acrilato y un ligando peptidomimético de reacción Ugi en fase sólida para detectar cocaína mediante un holograma de volumen de reflexión (Oliveira *et al*, 2018) y Fuchs *et al*. (Fuchs *et al*, 2013) desarrollaron películas holográficas de polímero de imprenta molecular, capaces de unirse específicamente a la testosterona. Pero los trabajos más significativos en biodetección están utilizando redes de relieve de superficie (SRG) holográfica (Ye *et al*, 2010) (Wang *et al*, 2013) (Zhao *et al*, 2020) (Lucío *et al*, 2021). Los sensores de red de difracción tienen varias propiedades óptimas para la detección de analitos LF. Por lo general, los SRG de hidrogel pueden traducir la presencia del analito en un cambio de señal de difracción debido a una modificación estructural del polímero inducida por el analito. El cambio de la señal de difracción puede involucrar la distancia entre los puntos de difracción de orden cero y de primer orden y/o la eficiencia de difracción (DE) (Peng *et al*, 2018).

Así, se han desarrollado SRG de hidrogel para detectar trombina (Wang *et al*, 2013) e IgG humana. (Ye *et al*, 2010) (Zhao *et al*, 2020) Sin embargo, estas aproximaciones, hacen uso de una reacción de desplazamiento (interacción indirecta) para producir los cambios volumétricos, en lugar de detectar la interacción directa. En línea con esto, nuestro grupo ha desarrollado recientemente un SRG holográfico para la detección específica de proteína C reactiva (CRP) en suero sanguíneo utilizando un hidrogel basado en fosforilcolina (Lucío *et al*, 2021), siendo la primera vez que la detección directa de analitos libres se logra en muestras reales, y con valores de sensibilidad en los valores clínicos de interés.

En definitiva, el desarrollo y optimización de nuevos hidrogeles que muestren propiedades adecuadas es necesario para utilizar este enfoque de biodetección en aplicaciones adicionales. Estas características incluyen propiedades tanto mecánicas (resistencia, elasticidad), como ópticas (transparencia), químicas (adecuada polimerización en el molde, capacidad de ser derivatizado químicamente) y bioquímicas (bajas uniones inespecíficas, biocompatibilidad, reconocimiento específico).

## 1.5. USO DE HIDROGELES PARA EL BIOSENSADO

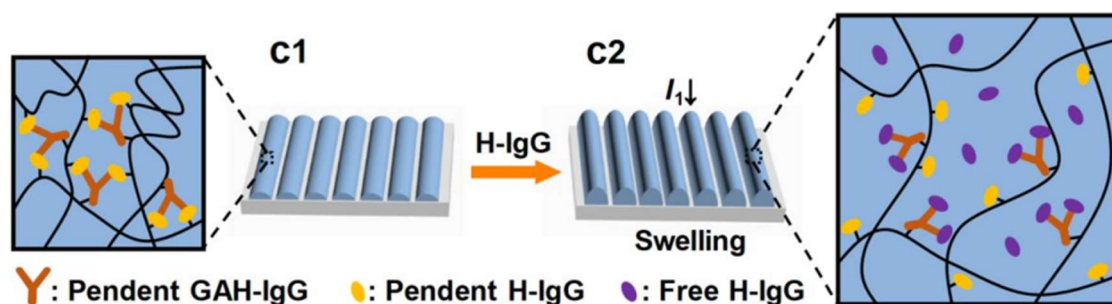
Aquellos sistemas holográficos basados en el uso de hidrogeles permiten realizar un biosensado eficiente de forma sencilla. Los hidrogeles son redes entrecruzadas permeables con una gran capacidad de retención de agua (hasta el 90%) capaces de mantener su estructura tridimensional. Estos materiales pueden ser fabricados por la polimerización de una gran variedad de monómeros (alquenos, acrilatos, alcoholes vinílicos, alginatos, polímeros naturales sintéticos, polisacáridos, etc.), reacciones (adición, autoensamblaje, gelificación) y métodos de activación (térmico, fotoquímico y químico). (Lucío *et al*, 2022)

Debido a sus características, los hidrogeles pueden aplicarse dentro de un amplio y creciente rango de campos. La polivalencia de estos materiales reside en las diferentes propiedades mecánicas (porosidad, tenacidad, elasticidad, permeabilidad), ópticas (transparencia), químicas (fácil fabricación) y bioquímicas (bioespecificidad y biocompatibilidad) que estos presentan. Uno de los ámbitos donde más notoriedad han alcanzado, es el biomédico, tomando un importante papel en aplicaciones tales como el biosensado, transporte de medicamentos, inmunoterapia, ingeniería tisular, cosmética o absorción de residuos. Esto es debido, principalmente, a su gran porosidad y naturaleza, lo que les confiere una mayor capacidad de carga y la capacidad de mimetizar condiciones fisiológicas.

Siguiendo con lo mencionado anteriormente, los hidrogeles son candidatos ideales en relación con la inmovilización de enzimas, ácidos nucleicos, péptidos o proteínas. Si bien es cierto que la inmovilización de ácidos nucleicos en soporte sólido es una técnica consolidada y ampliamente usada para la detección de biomoléculas como DNA, las matrices tridimensionales de los hidrogeles ofrecen ventajas a la hora de atrapar estas moléculas con respecto a los soportes sólidos con sustratos rígidos bidimensionales. (Zezza *et al*, 2022)

Combinando estos materiales con los conocimientos holográficos disponibles se pueden sintetizar hidrogeles con redes de difracción holográficas que permitan actuar al dispositivo como un transductor capaz de detectar moléculas específicamente sin marcaje. Como se ha comentado en el apartado anterior, ejemplos de este tipo de hidrogeles inteligentes que incorporan red de difracción en una de sus superficies fueron desarrollados con la finalidad de

detectar de forma selectiva y sensible inmunoglobulina G humana (H-IgG) (Figura 3) (Zhao *et al*, 2020) (Ye *et al*, 2010) y trombina (Wang *et al*, 2013). Esta técnica permite la transducción de la presencia del analito en la muestra a un cambio en la señal de difracción debido al cambio estructural producido en el polímero por la presencia de la molécula a detectar. Por su relación con el presente trabajo, se detallan aquí los desarrollados por Wang y colaboradores, basados en una reacción de desplazamiento, es decir, una reacción donde un elemento de un compuesto es sustituido por otro que interviene en la reacción. En la Figura 3 se observa como el reconocimiento de las moléculas de IgG humana libres en el medio por parte de GAH-IgG forma nuevos complejos con las mismas debido a la escisión de los complejos GAH-IgG con IgG humana colgante desnaturalizada. Esto es debido a que la constante de enlace de las GAH-IgG por las IgG humanas libres es mucho mayor que por aquellas con las que formaba el complejo anteriormente, estando estas en estado desnaturalizado como se ha mencionado anteriormente. La descomplejación producida, causa un hinchamiento del hidrogel, aumentando su volumen y por tanto, modificando las dimensiones de la red de difracción y variando la eficiencia de difracción (DE) obtenida al incidir un haz de luz colimada a través de ella. Debido a que la variación del volumen en el hidrogel tras el hinchamiento es producida por la deformación de los compuestos GAH-IgG e IgG humana previamente unida, estará correlacionada con la concentración de IgG humana libre.



**Figura 3.** Esquema del mecanismo de detección de IgG humana en un *grating* de hidrogel. GAH-IgG: IgG antihumana de cabra, H-IgG: inmunoglobulina G humana.

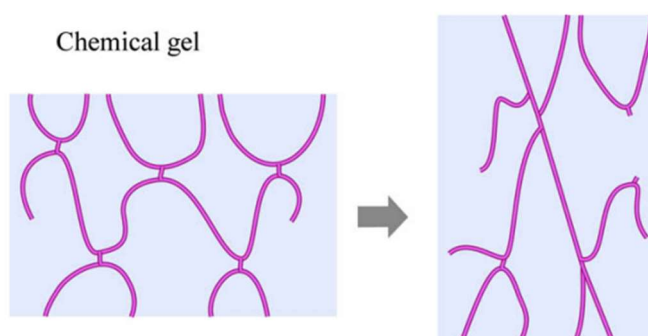
Al pasar un haz de luz colimada (rayos paralelos entre sí) por la red, se genera un patrón de difracción en el que las intensidades y las posiciones del orden u órdenes de difracción varían dependiendo de la geometría y características ópticas de la red. Al cambiar las propiedades del material y por ende de la red, el patrón también se ve afectado, observando una señal distinta que se puede relacionar con la concentración de analito.

En la misma línea que los desarrollos de Wang y colaboradores, en nuestro grupo de investigación se desarrolló un novedoso sistema de biosensado basado en hidrogeles con redes de difracción superficiales capaces de detectar selectivamente proteína C reactiva (CRP) en un rango de concentraciones aplicables a su uso en clínica haciendo uso de un equipo de medidas de ópticas casero. La determinación de la proteína específica en suero humano certificado fue llevada a cabo con recuperaciones de hasta el 100%. Este sistema abre el camino para nuevas estrategias con enfoques más baratos, simples y eficientes que permitan una detección de alto rendimiento.

En definitiva, este tipo de sistemas de biodetección han demostrado tener éxito en la determinación de presencia de biomoléculas y otros compuestos de bajo peso molecular, constituyendo un prometedor sistema de transducción más simple, económico y eficiente respecto a otros sistemas de detección sin marcaje.

## 1.6. ANTECEDENTES DE LOS SLIDE-RINGS

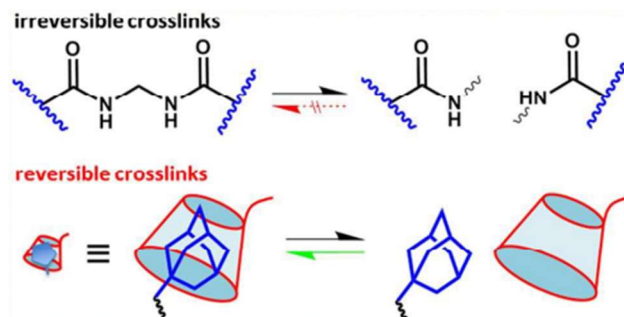
A pesar de todo, la composición química tradicional de los hidrogeles es responsable de la fragilidad y pobres propiedades mecánicas que estos presentan, pudiendo romperse tras un estiramiento uniaxial de 1,2 a 1,5 veces (Figura 4). A raíz de este inconveniente, se han desarrollado diferentes metodologías que permitan mejorar estas propiedades mecánicas (resistencia, elasticidad), así como sus propiedades ópticas, químicas y bioquímicas. Superando así el principal inconveniente presentado por estos materiales y permitiendo una correcta polimerización del hidrogel sobre el *master* con la red de difracción, así como un reconocimiento específico y una disminución de uniones no específicas o falta de especificidad. Entre las estrategias más comunes de disipación de energía mecánica y estrés interno se encuentran la introducción de enlaces no covalentes como puentes de hidrógeno en la matriz polimérica, interacciones *host-guest*, interacciones hidrofóbicas, etc. (Feng *et al*, 2020)



**Figura 4.** Esquema de la estructura de un hidrogel convencional en estado relajado (izquierda) y bajo estrés mecánico (derecha) (Ito, 2010).

Entrando un poco más en detalle en estas metodologías citadas, la reticulación de hidrogeles mediante interacciones *host-guest* atribuyen al material la capacidad de regresar a su forma original tras una fuerte deformación, debido a la rápida cinética de asociación y disociación de este tipo de interacciones. (Figura 5) En el caso de la adición de puentes de hidrógeno, estos pueden modular las propiedades del material sintetizado. (Yang *et al*, 2019) Los puentes de hidrógeno son un tipo de enlace no covalente. Dentro de los mismos encontramos dos tipos; fuertes y débiles. Los puentes de hidrógeno fuertes conducirán a propiedades más sólidas mientras que los débiles poseen un cambio de enlace muy rápido, derivando en la capacidad de responder ante diferentes estímulos. (Tee *et al*, 2019) Las interacciones hidrofóbicas, por su parte, se han utilizado ampliamente como espesantes asociativos. Un ejemplo bastante común son los uretanos etoxilados, macromoléculas anfifílicas cuyas partes hidrofóbicas son capaces de autoensamblarse en micelas en un medio acuoso. Como consecuencia se genera una mayor viscosidad en presencia de una red estructural física no permanente. La introducción de

interacciones hidrofóbicas en sistemas basados en hidrogeles tiene como objetivo la formación de entrecruzamientos reversibles, permitiendo una mayor y eficiente disipación de energía al someterse el material a un estrés mecánico externo, aumentando su resistencia en este tipo de situaciones que podrían producir la ruptura del material. (Mihajlovic *et al*, 2017)



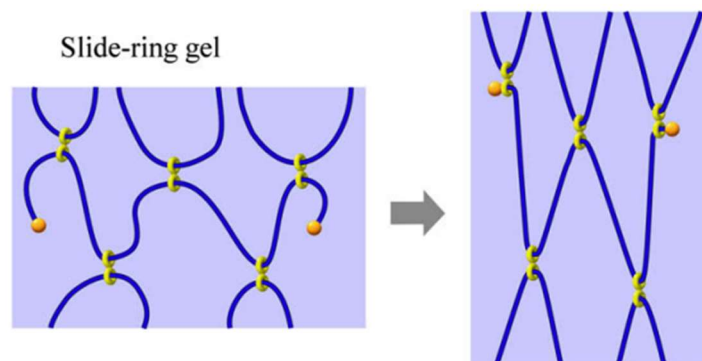
**Figura 5.** Representación gráfica de entrecruzamiento reversible e irreversible (Yang *et al*, 2013)

Otra metodología con grandes beneficios en cuanto a propiedades mecánicas y estabilidad estructural se refiere, es la optimización de la estructura de la red polimérica de hidrogeles químicamente reticulados. Existen diferentes ejemplos, siendo uno de los más comunes la utilización de gel de doble red, una estrategia basada en la intercalación de dos tipos de cadenas poliméricas con diferente longitud. En este caso, las cadenas cortas disipan el estrés mecánico y las largas mantienen la elasticidad característica del hidrogel. (Ito, 2010) Sin embargo, al igual que ocurre en muchos otros procedimientos de optimización, existe una limitación marcada por la difícil síntesis o preparación de estos entramados a raíz de la que surge la necesidad de encontrar nuevos polímeros que permitan obtener las propiedades deseadas.

Los polímeros de reciente aparición que reciben el nombre de *slide-rings* presentan propiedades reológicas que los convierten en una opción interesante para los objetivos perseguidos a la hora de crear un sistema de detección sin marcaje basado en la fabricación de hidrogeles biofuncionales con red de difracción.

A principios del 2000 Kohzo Ito y colaboradores sintetizan una nueva estructura entrecruzada basada en la arquitectura de los rotaxanos, a esta nueva red polimérica entrecruzada la bautizan con el nombre de *slide-ring material*. (Okumura *et al*, 2001) La estructura consiste en cadenas de polietilenglicol en las que se enhebran ciclodextrinas (CyD) formando polirotaxanos (PR). La unión de ciclodextrinas de diferentes cadenas entre sí genera un entrecruzamiento en forma de “ochos” donde las ciclodextrinas (“los ochos”) no están fijadas a la cadena de polietilenglicol sino que se mueven libremente, dando lugar a los que los autores llaman “efecto polea” (Ito, 2007) (Figura 6). Desde entonces, estos nuevos materiales han sido objeto de numerosos estudios, sobre todo enfocados a caracterizar y modelizar sus propiedades, que resultan extraordinarias en cuanto a elasticidad, resistencia al estrés mecánico y elongación. (Ito, 2012) (Gavrilov *et al*, 2018) Así, incorporando funcionalidades en las CyD o combinándolos con otros monómeros se han fabricado materiales que responden a estímulos como la temperatura, (Bin Imran *et al*, 2014) la presión (Katsuno *et al*, 2013) o la luz (Sakai *et al*, 2007), o con propiedades autoreparadoras. (Nakahata *et al*, 2014)





**Figura 6.** Esquema de la estructura de un hidrogel basado en un polímero *slide-ring* en estado relajado (izquierda) y bajo estrés mecánico (derecha). Se puede observar como el efecto polea o *pulley effect* permite dispersar las tensiones producidas en el polímero al someter el hidrogel a estrés mecánico, concentrando dicho estrés en las cadenas cortas del gel.

En la actualidad, a pesar del potencial derivado de sus propiedades mecánicas y gran estabilidad, no existen aplicaciones destinadas al ámbito del biosensado, pudiendo deberse en gran medida al tedio que supone la síntesis con materiales SR. Sin embargo, los materiales SR podrían ser la clave para una próxima generación de hidrogeles inteligentes con nuevas aplicaciones. En la actualidad, cada vez son más las aplicaciones que requieren unas mejores y más exigentes propiedades mecánicas.

### 1.7. MOTIVACIÓN PARA ELABORAR EL ENSAYO

En este proyecto se plantea ir un paso adelante en el diseño y puesta a punto de nuevos hidrogeles, y se estudiará la fabricación de hidrogeles biofuncionales con propiedades avanzadas, tanto en las propiedades mecánicas (físicas) como transparencia, resistencia, elongación, etc., como en sus capacidades de biosensado. Para ello usaremos un tipo de polímeros de reciente aparición, los polímeros SR que presentan propiedades reológicas realmente interesantes para nuestros propósitos.

Así, en esta propuesta se pretende explorar el potencial de este material para mejorar las propiedades de los hidrogeles en su aplicación para biosensado LF holográfico y refractométrico. Para ello, se deberá investigar y obtener un mayor cambio en el patrón de difracción y en la respuesta interferométrica por la elasticidad y flexibilidad del gel, con lo que se espera una mayor sensibilidad en la respuesta y además un mejor reconocimiento por parte de los biorreceptores que tienen mucha mayor libertad de movimiento que inmovilizados sobre una superficie o en un hidrogel convencional, pareciéndose mucho más a la ventajosa situación que se da en el formato homogéneo, pero manteniendo las ventajas del formato heterogéneo de ensayo.



## 2. OBJETIVOS

---

El objetivo general del TFG es desarrollar hidrogeles de proteína con propiedades óptimas para biosensado LF utilizando materiales avanzados basados en polímeros SR, y su aplicación a la preparación de biosensores basados en redes de difracción 2D holográficas.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos particulares:

- Optimización de los parámetros para la síntesis de hidrogeles inteligentes basados en polímeros SR.
- Modificación de proteína BSA utilizada como sistema modelo con grupos acrilato.
- Obtención de redes de difracción de superficie en los hidrogeles sintetizados mediante *replica molding* de un máster holográfico.
- Caracterización de SR hidrogeles (propiedades estructurales, porosidad, capacidad de hinchamiento, etc.).
- Estudio de la selectividad del hidrogel al anticuerpo específico (anti-BSA) mediante ensayos de fluorescencia.
- Estudio de la sensibilidad del hidrogel al anticuerpo de interés (anti-BSA) mediante medidas de difracción. Demostración de biosensado *label-free*.

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 3.1. MATERIALES

La albúmina de suero bovino  $\geq$  98% liofilizada en polvo (BSA), el anticuerpo de conejo anti-albúmina de suero bovino (anti BSA) y el éster NHS Alexa Fluor® 647 (éster de succinimidilo) fueron comprados a ThermoFisher Scientific (Madrid, España). El anticuerpo de cabra anticonejo (anti-rabbit), la acrilamida (AAm), el fenil-2,4,6-trimetil-benzoilfosfinato de litio (PBL), el glicerol, el glicidil metacrilato, el dimetilsulfóxido (DMSO), el ácido p-toluenosulfónico monohidrato, el PEG<sub>2000</sub>diacrilato, la  $\beta$ -ciclodextrina y la N, N-dimetilformamida (DMF) fueron comprados a Sigma Aldrich (Madrid, España). La N-hidroximetilacrilamida fue comprado a TCI (tecnología de control e instrumentación) (Madrid, España). El polimetilsiloxano (PDMS) Sylgard 184 fue comprado a Dow Corning (Wiesbaden, Alemania). Los *masters* de PET-G fueron fabricados por patrones de interferencia láser directa (DLIP) y comprados en el Fraunhofer IWS (Dresden, Alemania). Los tampones utilizados fueron: una solución salina tamponada de fosfato (PBS1X: fosfato disódico 0,008 M, fosfato monosódico 0,002 M, Cloruro sódico 137 mM, cloruro potásico 2,7 mM, pH 7,5), PBS-T (PBS1X conteniendo Tween20 0,05%) y tampón borato (0,01 M, pH=9,5). Todos los tampones y soluciones de lavado empleadas fueron filtradas previamente a su utilización a través de un poro de 0,22  $\mu$ m de membrana de nitrocelulosa de GE Whatman. La lámpara de irradiación ultravioleta (UV) fue comprada a Jelight Company Inc. (Irvine, CA, Estados Unidos). Los anticuerpos anti-BSA y anti-rabbit fueron marcados con Alexa Fluor 647 siguiendo las instrucciones del propio proveedor, obteniendo anti-BSA-Alexa<sub>647</sub> y anti-rabbit-Alexa<sub>647</sub>.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. PROTOCOLO MODIFICACIÓN DE BSA CON METACRILATO

El protocolo de modificación de BSA con metacrilato de adaptó de Berruex *et al.* y Jain *et al.* Para ello, 300 mg de BSA fueron disueltos en 30 mL de tampón de borato (pH = 9.5, 0.01 M). También se preparó una solución de metacrilato de glicidil en DMSO (50  $\mu$ mol mL<sup>-1</sup>, 13,6  $\mu$ L de metacrilato de glicidil en 2 mL de DMSO). En la solución de BSA se añadieron 1,8 mL de solución de metacrilato de glicidil y 7,2 mL de DMSO. La mezcla se agitó durante 4 h a 37 °C y pasado el tiempo de incubación se purificó la solución con filtrado por centrifuga (utilizando tubos Falcón con filtro de 10-30 kDa). Se repitió el proceso de centrifugación tres veces.

Una vez obtenido el producto, la muestra se sometió a un análisis mediante Nanodrop (Abs 280) para determinar su concentración. Se realizaron 10 medidas y se calculó la media aritmética para la obtención del valor. Finalmente se realizó un análisis mediante Espectrometría de Masas (MS) para confirmar la modificación de la BSA con metacrilato.

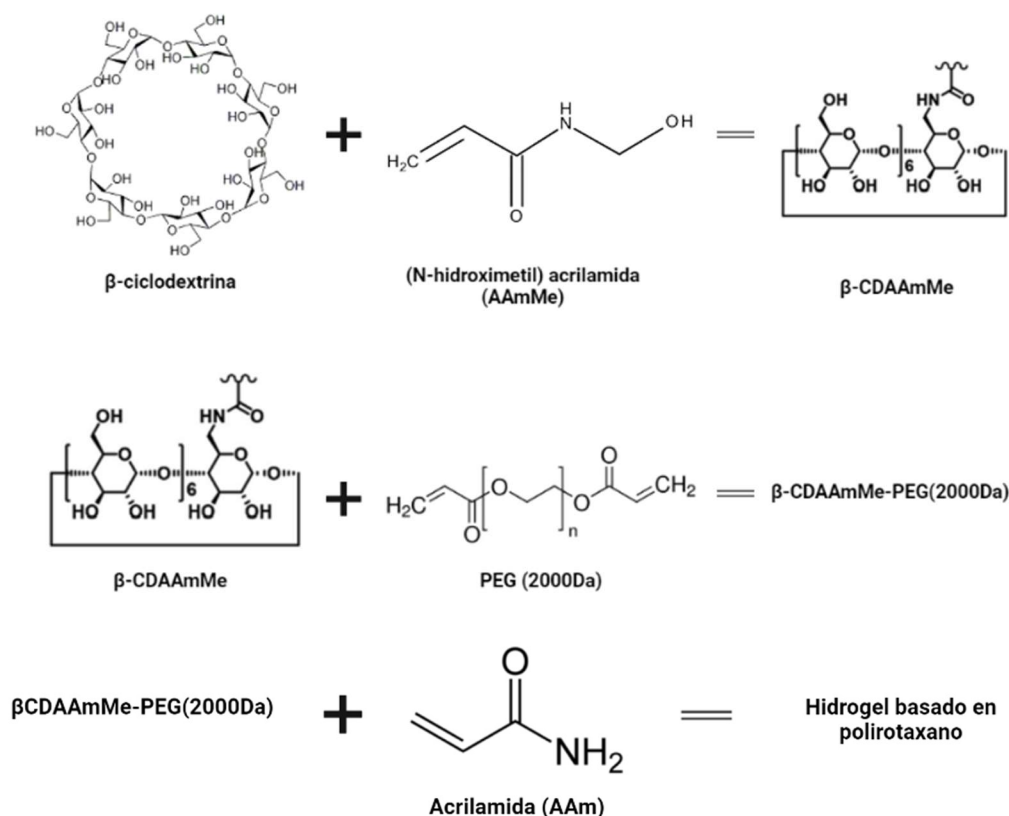
### 3.2.2. SÍNTESIS DE HIDROGELES

La reacción de síntesis de los hidrogeles adaptada de Takashima *et al.* y Feng *et al.* se llevó a cabo mediante tres pasos consecutivos representados en la Figura 7:

1) Inicialmente se hicieron reaccionar 15 g de  $\beta$ -ciclodextrina con 2 g de hidroximetilacrilamida disueltos en 100 mL de DMF. Tras añadir 500 mg de ácido p-toluenosulfónico se agitó la mezcla durante media hora a 80 °C en baño de aceite. Para purificar el producto se añadieron 500 mL de acetona y el precipitado fue lavado y filtrado con 30mL de acetona un total de tres veces. Se dejó secar el producto en estufa durante toda la noche, obteniendo finalmente  $\beta$ -CDAAmMe modificado con  $\beta$ -ciclodextrinas.

2) Para la obtención de polipseudorotaxano ( $\beta$ -CDAAmMe-PEG<sub>2000</sub>) se añadieron  $\beta$ -CDAAmMe y PEG<sub>2000</sub>diacrilato en una proporción 5:1 m/m sobre 10 mL de H<sub>2</sub>O. La mezcla se sometió a ultrasonidos durante 30 minutos y se dejó incubando durante 24 h a temperatura ambiente.

3) Posteriormente, 1 mL de esta última disolución, 3,64  $\mu$ L de BSA-acrilato y 4 mg de PBL (fotoiniciador) se añadieron sobre 3 mL de una mezcla acrilamida/H<sub>2</sub>O a una concentración de 300 mg mL<sup>-1</sup> y se agitó en ausencia de luz. Un volumen de 1,6 mL de la mezcla finalmente obtenida se vertió en un vial de vidrio (2 cm de diámetro). Después de 10 minutos de aplicación a vacío, la polimerización se llevó a cabo en presencia de luz UV ( $\lambda=254$  nm, 6 mW/cm<sup>2</sup>) y en ausencia total de luz durante 15 minutos.



**Figura 7.** Esquema de reacción por pasos para la obtención de hidrogeles basados en polirotaxanos.

### 3.2.3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE HINCHAMIENTO

Para estudiar el *swelling* o hinchamiento de los hidrogeles se utilizaron muestras liofilizadas de hidrogel. Las muestras, de alrededor de 1 cm fueron sumergidas en 20 mL de H<sub>2</sub>O a temperatura ambiente. Para el análisis, el peso de las muestras fue medido a diferentes tiempos hasta que los hidrogeles no fueron capaces de absorber más H<sub>2</sub>O. Previamente al pesaje, el exceso de H<sub>2</sub>O presente en la superficie de los hidrogeles fue eliminado con papel. La siguiente fórmula fue utilizada para medir el grado de *swelling*, siendo  $W_t$  el peso del hidrogel,  $t$  el tiempo que está sumergido en H<sub>2</sub>O y  $W_0$  el peso inicial del hidrogel antes de sumergirlo:

$$\% \text{ Swelling} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

### 3.2.4. ANÁLISIS POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Para observar la microestructura de los hidrogeles y la caracterización de la porosidad de los mismos, se realizó un análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) haciendo uso de un sistema Gemini SEM 500 (Zeiss). Se dejaron los hidrogeles en agua destilada hasta su completo hinchado y se congelaron a -20 °C durante toda noche. Los hidrogeles fueron liofilizados mediante un liofilizador Telstar Lyoquest, produciendo de este modo muestras de aerogel seco. Previamente al análisis, las muestras fueron recubiertas con platino en un sistema pulverizador BAL-TEC SCD 005 (Leyca microsystems).

### 3.2.5. ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA

Para analizar la capacidad del hidrogel de reconocer la proteína de suero bovino (BSA) se realizó un ensayo de espectroscopía de fluorescencia. Los anticuerpos fueron marcados usando el fluoróforo Alexa Fluor 647, siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor, consiguiendo de esta forma anticuerpos de BSA marcados (anti-BSA-Alexa<sub>647</sub>). Del mismo modo, se hizo un ensayo con anticuerpos de cabra anti-rabbit-Alexa<sub>647</sub> con el fin de tener un control negativo. Los hidrogeles fueron cortados en trozos de 4 x 4 x 2 mm. Se incubaron con 100 μL de anti-BSA-Alexa<sub>647</sub> y anti-rabbit-Alexa<sub>647</sub>, respectivamente, a 1, 10, 25, 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> en PBS-T. Este estudio se repitió un total de 3 veces. Se probaron 3 tiempos distintos tanto de incubación de los hidrogeles como en su posterior lavado con PBS-T (30 minutos, 1 hora y 4 horas).

Para la detección fluorescente se empleó un lector de fluorescencia de superficies de fabricación casera (SFR) que utiliza LEDs para la iluminación y una cámara CCD para la detección. (Mira *et al*, 2004) Para el análisis de datos se utilizó el paquete informático GenePix Pro 4000B.

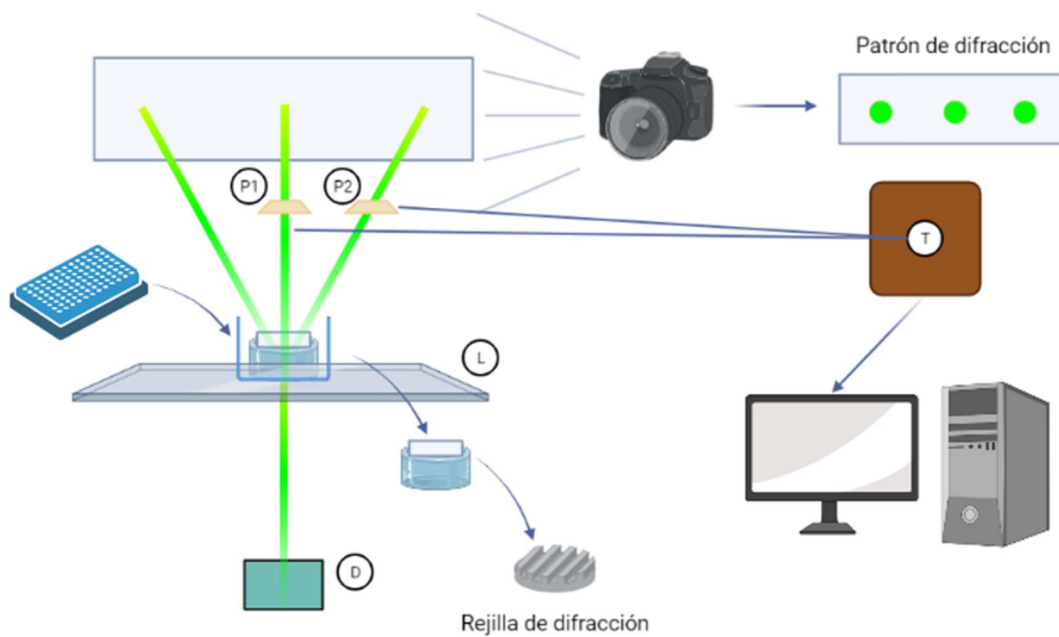
### 3.2.6. OBTENCIÓN DEL MOLDE DE PDMS MEDIANTE REPLICADO DEL *MASTER*

Los hidrogeles con *grating* sensibles a BSA fueron fabricados mediante la replicación de un *master* de PET-G con PDMS. El PDMS en estado líquido fue vertido en la cara del PET-G donde se encontraba el *grating* grabado. Para la eliminación de burbujas formadas y la obtención de una réplica correcta y funcional, las burbujas formadas fueron eliminadas sometiendo el recipiente con el *master* y el PDMS a vacío durante 15 minutos. La polimerización se realizó *overnight* a 60 °C. El molde de PDMS fue utilizado para las posteriores síntesis de hidrogeles holográficos con *grating*.

Para la síntesis de hidrogeles con *grating*, cada molde fue colocado en el interior de un pequeño vial de 2 cm de diámetro y pegado a su superficie basal con 2  $\mu$ L de pegamento. A este vial se le añadió 1,4 mL de la solución monomérica con fenil-2,4,6-trimetil-benzoilfosfinato de litio (fotoiniciador, I<sub>2959</sub>), entrando en contacto con el *master* de PDMS introducido con anterioridad. Tras realizar una purga al vacío durante 10 minutos, se expuso el hidrogel a luz UV durante 15 minutos. Una vez el hidrogel completó su polimerización, este fue extraído del vial donde se encontraba y sumergido en agua destilada durante 2 h para su lavado, haciendo uso de PBS-T fresco 3 veces para asegurar que los monómeros fueron eliminados. Finalmente, los hidrogeles obtenidos fueron almacenados para su posterior uso a 4°C.

### 3.2.7. MEDIDAS ÓPTICAS DE LOS *GRATINGS* FABRICADOS

Para medir la eficiencia de difracción se utilizó un equipo casero equipado con un láser (532 nm, 5 mW) y dos fotodiodos, expuesto en la Figura 8. El láser fue orientado ortogonalmente hacia un diafragma ajustable al portaobjetos con una apertura de 2 mm. Para un mejor enfoque de los haces de difracción se hizo uso de una lente móvil ( $f = 30$  mm) colocada en la parte superior de la placa. De este modo, al realizar las observaciones, el número de órdenes, así como su intensidad tras la difracción del haz de luz tras su paso por el *grating* presente en el hidrogel, dependieron de las características estructurales de los *gratings* y de la óptima síntesis del material. A lo largo de este ensayo solo se tuvieron en cuenta los órdenes 0 y 1.



**Figura 8.** Equipo utilizado para realizar las medidas de difracción. Donde: D=diafragma, L=lente móvil, P=fotodiodo y T=transductor.

Para medir la intensidad de la luz incidente procedente de la difracción del haz, se utilizaron dos fotodiodos. El primero de ellos se sitúa justo en el orden 0 de difracción mientras que el segundo lo hace respecto al orden 1. La corriente generada se convierte en voltaje gracias a las resistencias conectadas a los fotodiodos (360 and 3114 k $\Omega$  para el primer y segundo fotodiodo, respectivamente). La eficiencia de difracción se obtiene de calcular la relación de intensidades del orden 1 y 0 (Ec. 2). Donde  $DE$  es la eficiencia de difracción,  $I_1$  la intensidad del primer orden e  $I_0$  la intensidad del orden 0. Y finalmente, calculando la eficiencia de difracción relativa respecto a la inicial (Ec. 3) se pudo caracterizar la sensibilidad de la respuesta de los hidrogeles frente a la presencia de nuestro analito de interés (anti-BSA). Donde  $RDE$  (%) es la eficiencia de difracción relativa,  $DE_i$  es la eficiencia de difracción inicial tras el paso de homogeneización con PBS-T y  $DE_f$  es la eficiencia de difracción final tras la incubación y los lavados para el primer orden.

$$DE (\%) = \frac{I_1}{I_0} \times 100 \quad (2)$$

$$RDE (\%) = \frac{DE_f - DE_i}{DE_i} \times 100 \quad (3)$$

Varios *grating* de hidrogel (dimensiones 4 x 4 x 2 mm) en PBS-T, con el *grating* en la parte superior, se colocaron en diferentes pocillos de una placa ELISA de 96 pocillos y se midió su difracción inicial. Se prepararon diluciones de anti-BSA y anti-rabbit con diferentes concentraciones (0, 1, 10, 25, 50 y 100 mg L<sup>-1</sup>) en PBS-T. Después de las mediciones iniciales de difracción, se descartó la solución de PBS-T y los hidrogeles se incubaron a temperatura

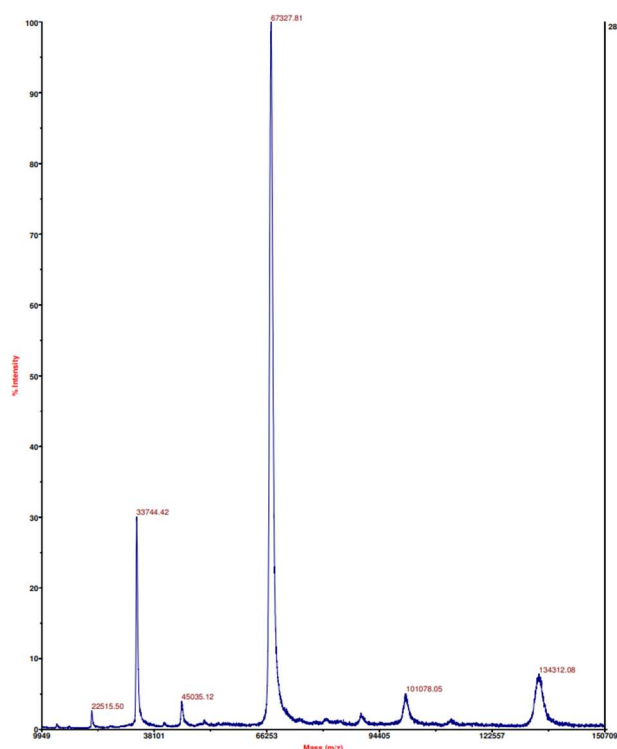
ambiente con 100  $\mu\text{L}$  de muestra de anti-BSA o anti-rabbit durante 4 h. Luego se descartó el exceso de solución de incubación, se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de PBS-T y, finalmente, la placa ELISA se colocó en un agitador orbital durante toda la noche para su lavado. Una vez lavado, se descartó la solución de PBS-T y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de PBS-T fresco para realizar las mediciones finales de difracción ( $I_0$  e  $I_1$ ) y caracterizar la sensibilidad de la respuesta de los hidrogeles frente a la presencia del analito de interés.

# 4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

## 4.1. MODIFICACIÓN DE BSA CON METACRILATO

En primer lugar se modificó proteína BSA con grupos metacrilato, siguiendo el protocolo adaptado de Berruex *et al.* y Jain *et al.* Se prepararon dos disoluciones distintas, una de BSA disuelta en tampón borato y otra de metacrilato de glicidil disuelto en DMSO. Parte de la segunda disolución conjuntamente con DMSO, fueron añadidos a la disolución preparada con BSA. Tras la correspondiente agitación e incubación, la solución fue purificada mediante filtrado por centrifuga.

La modificación de BSA con acrilato se realizó para permitir su polimerización dentro de la matriz conformada por el hidrogel. Siguiendo el protocolo, se obtuvo una muestra cuyo contenido era el producto de esta modificación (BSA-acrilato). Para determinar que el ensayo fue llevado a cabo con éxito, se realizó un análisis de espectrometría de masas sobre una muestra del producto modificado y una muestra que contenía BSA sin modificar (blanco). Obtenidos los resultados se observó que la BSA había sido modificada correctamente con acrilato. En el espectro de masas obtenido tras el análisis de la muestra del blanco se observó un pico de relación masa-carga ( $m/z$ ) de 66390.84. Por su parte, en el espectro resultante del análisis de la muestra con BSA-acrilato, este pico característico tenía un valor de 67327,81 (Figura 9). Calculando la diferencia entre ambos picos y dividiendo entre la masa molar ( $M_m$ ) del acrilato se pudo determinar el número de acrilatos presentes por mol de BSA, que resultó ser de 6,5501 acrilatos  $\text{mol}^{-1}$  BSA.



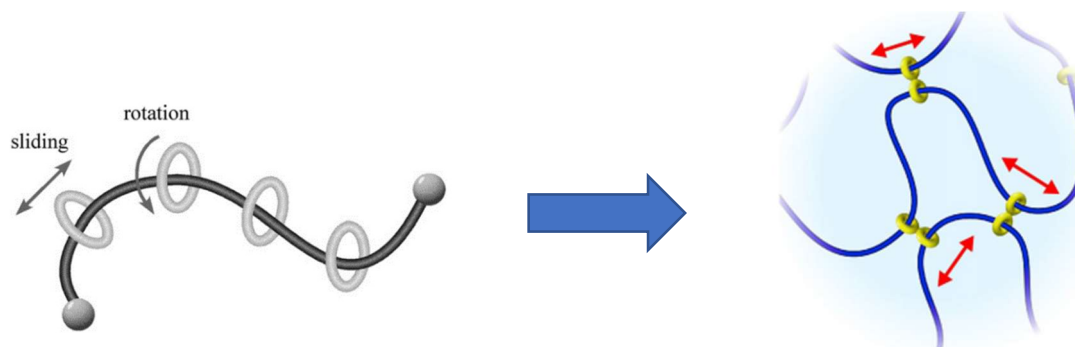
**Figura 9.** Análisis de espectrometría de masas de BSA modificado con acrilato (6,5504 acrilato  $\text{mol}^{-1}$  BSA).



## 4.2. SÍNTESIS DE HIDROGELES

Los hidrogeles pueden ser sintetizados mediante diferentes combinaciones de monómeros, entrecruzadores e iniciadores. La elección de estos componentes no debe ser aleatoria ya que de ellos dependen las características macroscópicas y propiedades del material sintetizado. Dependiendo de la finalidad, la composición variará entre unos hidrogeles u otros, sin embargo, si se requiere obtener hidrogeles que permitan moldear una red de difracción en su superficie con el fin de realizar un posterior biosensado, las propiedades más importantes a tener en cuenta son su transparencia, porosidad, estabilidad mecánica y maleabilidad, de tal manera que estas no se vean afectadas tras un reconocimiento y selección específica de un analito de interés.

Para la síntesis del material se escogió la acrilamida (AAm) como el monómero para la conformación del esqueleto del hidrogel, debido a la necesidad, como se ha mencionado anteriormente, de conseguir un producto transparente, estable y con propiedades mecánicas óptimas. Además, se incorporó a la mezcla de polimerización una cantidad optimizada de polirotaxano-acrilato. De este modo, la acrilamida copolimerizó con el polipseudorotaxano y la BSA, exponiendo la disolución a luz UV y utilizando PBL como fotoiniciador, dando lugar a un hidrogel basado en polirotaxano con propiedades mecánicas mejoradas gracias a la incorporación del material *slide-ring*. La mezcla de la polimerización incluyó también la BSA modificada, responsable de dotar al material del reconocimiento específico del analito (anti-BSA).



**Figura 10.** Izquierda: estructura molecular del polirotaxano. Derecha: esquema de la estructura de un material slide-ring con entrecruzamientos que permiten el efecto polea.

Como se ha explicado en detalle con anterioridad, la síntesis de los hidrogeles se llevó a cabo en tres pasos consecutivos. En un primer paso se hizo reaccionar la  $\beta$ -ciclodextrina con hidroximetilacrilamida disuelta en DMF. Tras la adición de ácido p-toluenosulfónico se agitó la mezcla y se adicionó acetona. El producto obtenido,  $\beta$ -CDAAmMe modificado con grupos acrilato se obtuvo tras realizar varios lavados y filtrados con acetona. El  $\beta$ -CDAAmMe obtenido fue mezclado con PEG<sub>2000</sub>diacrilato en H<sub>2</sub>O y la mezcla resultante fue sometida a ultrasonidos y posteriormente incubada para generar el polirotaxano. La disolución incubada fue añadida, junto a una pequeña cantidad de BSA-acrilato y fotoiniciador, a una mezcla preparada de acrilamida y H<sub>2</sub>O y se agitó en ausencia de luz. La disolución obtenida fue repartida en viales y sometida a vacío, para en un último paso, polimerizar en presencia de luz UV y en una cámara oscura.

En la Figura 11 se observa un hidrogel sintetizado sin *grating* en su forma hinchada, tras 48 horas en medio tampón PBS-T, junto a otro con *grating* sometido a las mismas condiciones. El material obtenido presenta unas características transparentes y uniformes en todo el hidrogel. Además, posee buenas propiedades mecánicas, superando así una de las principales limitaciones de los hidrogeles, su poca estabilidad estructural y capacidad de resistir el estrés mecánico.



**Figura 11.** Izquierda: hidrogel sintetizado en *bulk* (tras 48 horas sumergido en PBS-T) de apariencia transparente y uniforme en todos sus puntos y una morfología circular. Derecha: *grating* de hidrogel fabricado por réplica de molde holográfico (tras 48 horas sumergido en PBS-T).

### 4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES SINTETIZADOS

Los hidrogeles sintetizados fueron caracterizados para determinar las condiciones de síntesis más apropiadas para la posterior incorporación de las redes de difracción superficiales. Este proceso consistió en dos análisis diferenciados: un estudio de la cinética presentada por el hidrogel durante el proceso de hinchado, denominado *swelling*, y la observación de la porosidad y cavidades mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

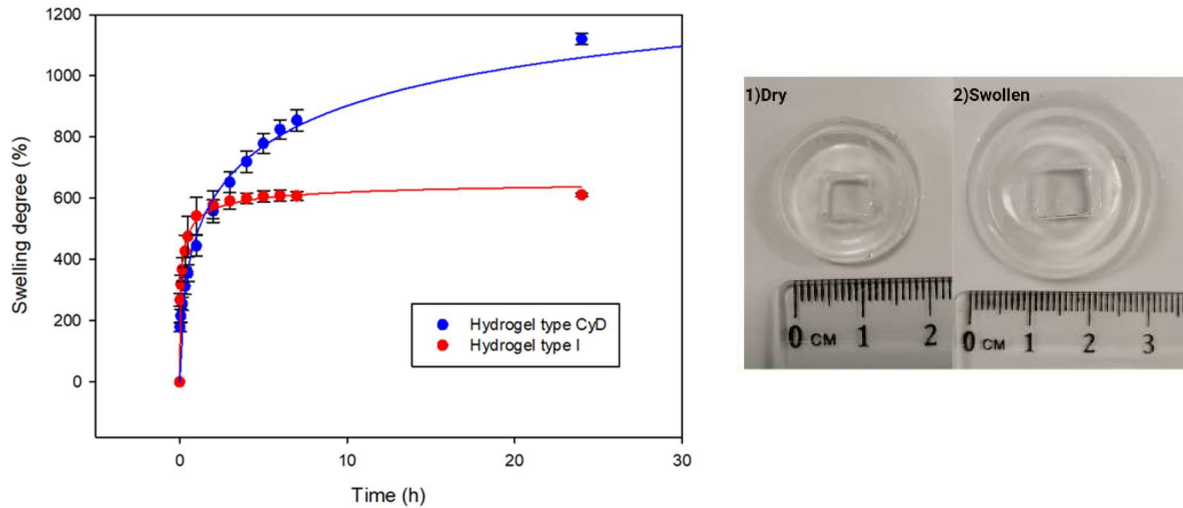
El disponer de esta información es importante para futuros diseños de nuevos hidrogeles, ya que permite relacionar la composición con la porosidad y las propiedades optomecánicas del material.

#### 4.3.1. CAPACIDAD DE HINCHAMIENTO

En la Figura 12, se puede observar el hidrogel en su estado seco e hinchado en H<sub>2</sub>O respectivamente. Una vez en su forma más hinchada e incapaz de absorber más agua, se aprecia una apariencia transparente y estable, así como una estructura moldeable. El grado de hinchamiento en medio H<sub>2</sub>O del hidrogel alcanza el 1200%, demostrando la gran capacidad de este material de absorber el medio líquido circundante y aumentar su tamaño en gran medida, manteniendo su estabilidad estructural y propiedades características.

Esta capacidad mayor de hinchamiento potencialmente aumentará la sensibilidad del hidrogel holográfico, ya que permitirá cambios mayores en las dimensiones del *grating*. El *swelling* del hidrogel sintetizado se comparó con el de un hidrogel de BSA sin polirotaxano sintetizado previamente en nuestro grupo de investigación. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad aumentada de hinchamiento que los primeros tenían frente a los segundos, pudiendo

determinar que aquellos hidrogeles que en su composición presentaban materiales SR, tenían aproximadamente una capacidad de hinchamiento dos veces superior (1200%) a aquellos que por el contrario, solo presentaban BSA (600%). (Figura 12)



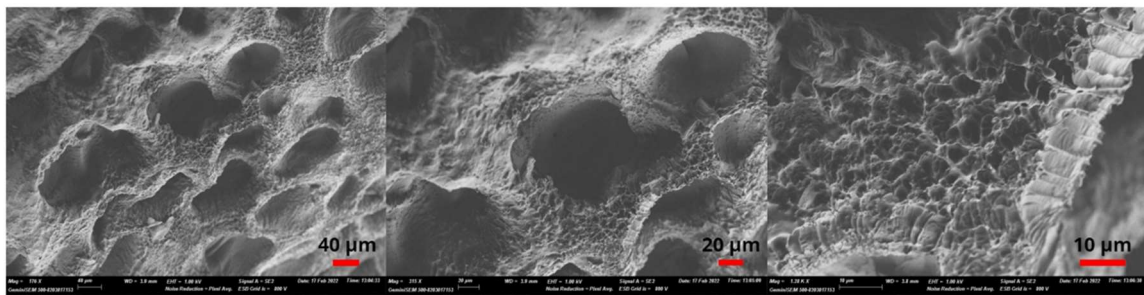
**Figura 12.** Izquierda: comparación del porcentaje de hinchamiento de hidrogeles con y sin polirotaxanos en PBS-T a diferentes tiempos (h) (gráfico). Derecha: medidas del tamaño de un hidrogel con polirotaxano en estado seco ( $\approx 2$  cm) (izquierda) e hinchado tras sumergirse en PBS-T durante 48 h ( $\approx 3$  cm) (derecha).

#### 4.3.2. ANÁLISIS POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La porosidad del material sintetizado se caracterizó haciendo uso de un microscopio de electrónico barrido, que permite observar claramente su estructura y morfología microscópica. Se pueden apreciar en la Figura 14, porosidades de alrededor de  $80 \mu\text{m}$  que a su vez albergan porosidades en sus cavidades que podrían llegar incluso a tamaños nanométricos. Este alto nivel de porosidad dota al hidrogel de mayor capacidad para absorber en mucha mayor medida el medio líquido (agua) en el que se encuentra. Además, esa mayor porosidad facilitará la entrada del analito y su difusión en el interior del polímero. El nivel de porosidad observado fue homogéneo en todas las regiones de los hidrogeles analizados.



**Figura 13.** Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Universidad Politécnica de Valencia). Modelo Gemini SEM500 (Zeiss).



**Figura 14.** Fotografías tomadas mediante un equipo de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (Gemini SEM500). De izquierda a derecha: porosidades a 176X, porosidades a 315X, microporosidades a 1.28 K X.

#### 4.4. CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO ESPECÍFICO DE ANTI-BSA MEDIANTE ENSAYOS DE FLUORESCENCIA

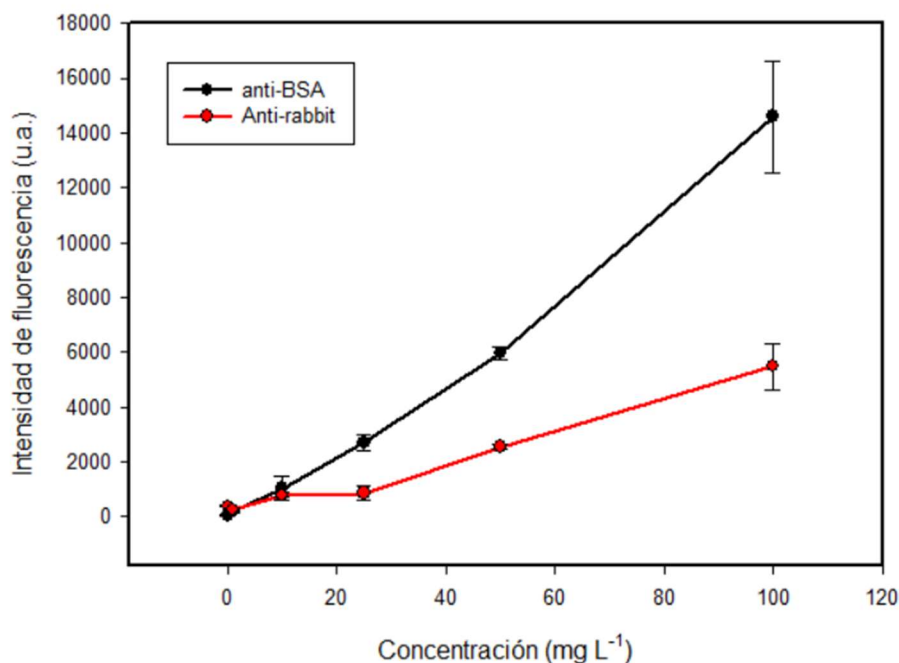
Un requisito indispensable en la obtención de hidrogeles biosensibles es que la proteína incorporada en su composición esté biodisponible, esto es, que sea capaz de reconocer de manera específica a su analito y no se haya desnaturalizado como consecuencia de las condiciones de reacción.

Para ello, previamente a los ensayos de difracción, se evaluó la capacidad de los hidrogeles para reconocer anti-BSA mediante espectrometría de fluorescencia. Así, las proteínas fueron marcadas con el reactivo fluorescente comercial Alexa<sub>647</sub> siguiendo las indicaciones del proveedor. De este modo se realizó el marcaje de anticuerpos anti-BSA (analito estudiado), y anti-rabbit para la realización de un control negativo, que evalúe la especificidad o selectividad de bioreconocimiento. Los hidrogeles fueron cortados en trozos de dimensiones 4 x 4 x 2 mm e incubados con 100 µL de anti-BSA-Alexa647 y anti-rabbit-Alexa647, respectivamente, a concentraciones crecientes en PBS-T. Respecto a la detección de la fluorescencia se hizo uso de

un lector de fluorescencia de superficies de fabricación casera (SFR), equipado con luces LED (iluminación) y una cámara CCD (detección) descrito en Mira *et al.*, mientras que para el procesamiento de datos se empleó el paquete informático GenePix Pro 4000B.

Tras la realización del ensayo, los resultados muestran que tanto los anticuerpos anti-BSA como anti-rabbit difunden en la matriz del hidrogel, pues se obtiene señal en las muestras incubadas con cualquiera de sendos anticuerpos. Sin embargo, tras el lavado, la señal de fluorescencia en aquellos hidrogeles incubados en solución de anti-rabbit disminuye considerablemente, mientras que permanece en el caso de anti-BSA, determinando la selectividad del hidrogel hacia este último, lo que indica que se ha producido bioreconocimiento por parte de la BSA presente en el polímero.

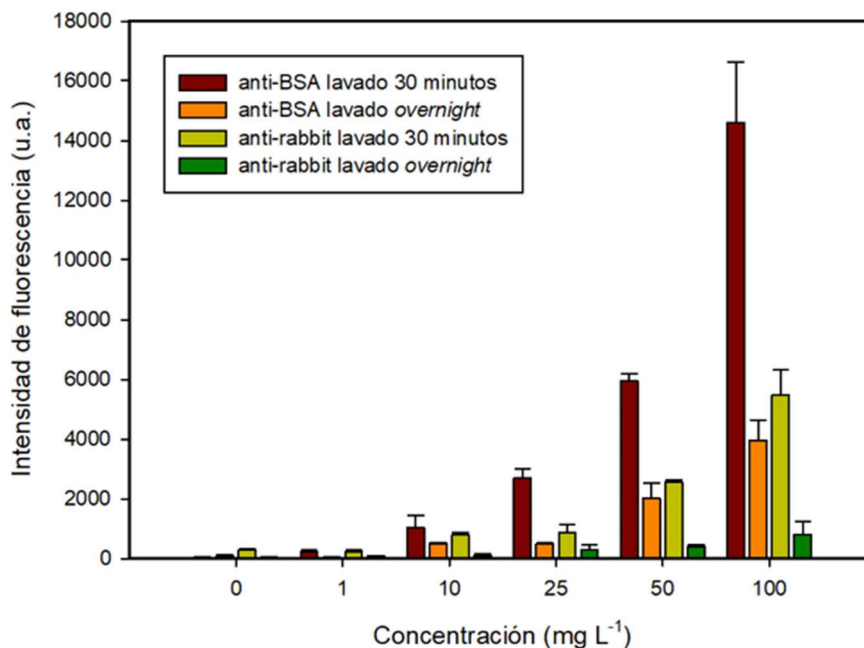
Este ensayo fue realizado a tres tiempos diferentes de incubación y lavado (30 minutos, 1 hora y 4 horas). Los resultados, tras diferentes combinaciones de tiempos de incubación y lavado, demostraron que era posible retener de forma selectiva el analito de interés en la matriz del hidrogel con tan solo 30 minutos de incubación. A su vez, 30 minutos de lavado en medio PBS-T sirvieron para eliminar en su mayoría el anticuerpo no específico, que había difundido en la misma matriz. (Figura 15) Se demostró a su vez, la capacidad de retención de anti-BSA que presentaban los hidrogeles incluso a largos tiempos de lavado. Tal como se observa en la Figura 15, la intensidad de fluorescencia en los hidrogeles aumenta conforme se incrementan las concentraciones de anti-BSA y anti-rabbit marcados con Alexa<sub>647</sub>, tras una incubación y lavado de 30 minutos. En ambos casos hay un incremento de señal de fluorescencia proporcional a las concentraciones de anti-BSA- Alexa<sub>647</sub> y anti-rabbit- Alexa<sub>647</sub>, sin embargo, la señal es mucho más reducida en anti-rabbit-Alexa<sub>647</sub> incluso a altas concentraciones (100 mg L<sup>-1</sup>), exhibiendo 3 veces menos fluorescencia que la señal producida por anti-BSA- Alexa<sub>647</sub> a la misma concentración. Los ensayos fueron realizados por triplicado, se calculó la media y desviación estándar de los valores obtenidos para la interpretación de los resultados.



**Figura 15.** Intensidad de fluorescencia de hidrogeles incubados en concentraciones crecientes de anti-BSA- Alexa<sub>647</sub> y anti-rabbit-Alexa<sub>647</sub> durante 30 minutos y lavado posterior en medio PBS-T durante 30 minutos.

Al observar la intensidad obtenida tras la realización del ensayo tras 30 minutos de incubación y lavado, tiempo que probó ser suficiente para la detección específica de BSA frente al control, se observan unos niveles de fluorescencia superiores respecto a las muestras sometidas a un mayor tiempo de lavado con PBS-T. Este incremento de la señal puede ser debido a la falta de actuación del tampón para eliminar toda la proteína retenida inespecíficamente en el interior de la matriz del hidrogel o por la acumulación de la misma en bordes y superficies del hidrogel, no habiéndose eliminado totalmente y produciendo señal en el análisis de fluorescencia realizado. Es posible determinar a su vez la capacidad selectiva de retención de la matriz del hidrogel frente a anti-BSA, ya que tras la prueba de varios tiempos de lavado en medio PBS-T, un porcentaje mucho mayor de esta proteína queda retenida en comparación con anti-rabbit, incluso tras lavados *overnight*. Así, incluso con tiempos de incubación cortos, la señal específica se distingue claramente de la inespecífica.

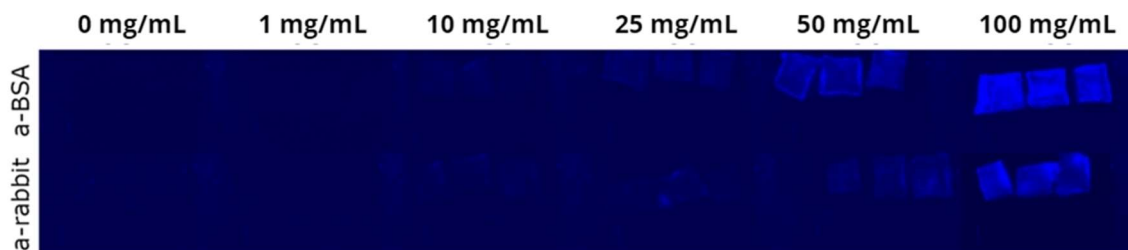
Para valorar el efecto de un mayor tiempo de lavado en las muestras, tras una incubación de 30 minutos con los anticuerpos marcados, una parte de los hidrogeles se sometió a un lavado con tampón PBS-T durante otros 30 minutos, mientras que el resto se mantuvieron en lavado *overnight*. (Figura 16) Al medir las intensidades de fluorescencia, aquellos hidrogeles cuyo tiempo de lavado había sido menor, 30 minutos, mantuvieron una mayor cantidad de proteína retenida en la matriz, presentando una mayor intensidad en comparación con las muestras que se sometieron a lavado *overnight*. Esto se aplicó tanto a las muestras incubadas con anti-BSA-Alexa<sub>647</sub> como con anti-rabbit-Alexa<sub>647</sub>.



**Figura 16.** Intensidad de fluorescencia de hidrogeles incubados con anti-BSA-Alexa<sub>647</sub> y anti-rabbit-Alexa<sub>647</sub> a diferentes concentraciones durante 30 minutos tras lavar con PBS-T a diferentes tiempos, 30 minutos y 14 horas.



En la Figura 17 se muestran las imágenes de fluorescencia obtenidas por los diferentes hidrogeles antes y después de lavar. En aquellos fragmentos de hidrogel incubados a diferentes concentraciones de anti-rabbit-Alexa<sub>647</sub>, se observa una menor intensidad en comparación con aquellos fragmentos incubados con anti-BSA, incluso a altas concentraciones de estos anticuerpos.



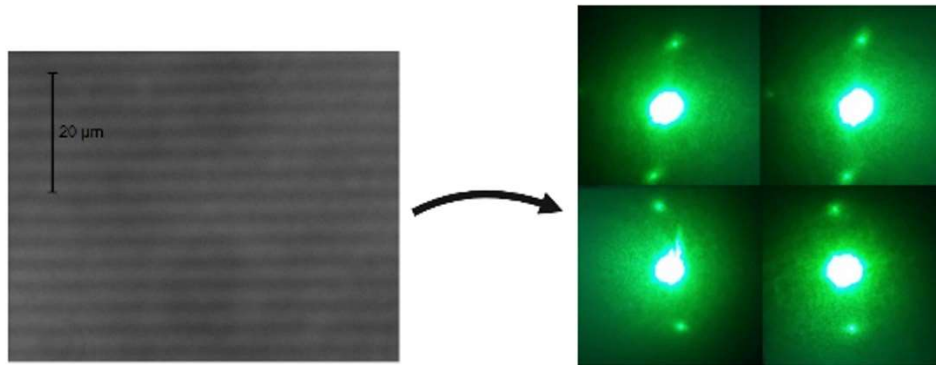
**Figura 17.** Fotografías tomadas en un lector de fluorescencia casero basado en cámara CCD (20s, 0g). Intensidades de fluorescencia de hidrogeles incubados durante 30 minutos con anti-BSA-Alexa<sub>647</sub> (fila 1) y anti-rabbit-Alexa<sub>647</sub> (fila 2) y lavados posteriormente con medio PBS-T fresco (30 minutos). Anti-BSA-Alexa<sub>647</sub> y anti-rabbit- Alexa<sub>647</sub>: concentraciones crecientes en incubado (0, 1, 10, 25, 50, 100 mg L<sup>-1</sup>).

#### 4.5. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DE LOS GRATINGS DE HIDROGEL

Una vez comprobada por fluorescencia la respuesta eficaz y selectiva del hidrogel, se estudió su capacidad para ser transformado en un transductor holográfico mediante la fabricación de redes superficiales de difracción (SRG). Para ello, en primer lugar, fue necesaria la producción de un *master* holográfico mediante *Direct Laser Interference Patterning* (DLIP) utilizando un sustrato de PET-G. La razón de utilizar esta técnica se debe a que, gracias al efecto interferente, es posible crear estructuras geométricas periódicas prácticamente sin defecto alguno. Por su parte, la elección de un termoplástico (PET-G) como sustrato frente a un *master* de metal se realizó debido a que los termoplásticos resisten la mayoría de los disolventes orgánicos, ácidos y bases, además de no ser materiales rígidos y ofrecer cierto grado de flexibilidad, permitiendo el desmoldeado tras la replicación sin dañar el sustrato utilizado. Se escogieron las condiciones para la obtención de *masters* con una periodicidad de 3  $\mu\text{m}$ . La fabricación de estos *masters* se realizó en el Fraunhofer IWS por un miembro del equipo de investigación. Obtenido el *master* de PET-G, se crearon negativos del *master* en PDMS mediante el moldeo de la réplica. Las redes de difracción del hidrogel sensible a BSA se realizaron por réplica sobre el negativo de PDMS, optimizando los tiempos de vacío y polimerización.

Haciendo referencia a lo mencionado anteriormente, para la obtención de negativos del *master* en PDMS, este fue vertido en estado líquido en la cara del PET-G con el *grating* grabado. Para la obtención de una réplica funcional y sin defectos, se sometió el recipiente con el *master* y el PDMS líquido a vacío y posteriormente se dejó polimerizar *overnight*, obteniendo como producto un molde de PDMS empleado en la síntesis de *gratings* de hidrogel. Para la síntesis de estos últimos, cada uno de los moldes producidos fue pegado a la superficie basal de un vial, al cual le fue añadido a continuación solución monomérica junto a PBL (fotoiniciador). Una vez entró en contacto la disolución con el molde, la muestra se sometió a vacío y finalmente se polimerizó bajo las condiciones explicadas en los apartados anteriores (presencia de luz UV en completa oscuridad).

A continuación, se estudió la difracción producida por el *grating* de hidrogel fabricado y se analizó la calidad de la red replicada. Para analizar la calidad del proceso de réplica, los *gratings* se caracterizaron por microscopía óptica (Figura 18), observando uniformidad en toda la superficie de la red y un espaciado entre franjas acorde a las dimensiones del *master* de PET-G empleado. Por otro lado, se midió la eficiencia de difracción de la red en distintos puntos (las cuatro esquinas), observándose que presentaban un patrón de difracción similar (Figura 18). Las eficiencias de difracción resultaron ser de alrededor del 1,41%, lo que se encuentra entre los valores habituales para este tipo de redes de difracción.



**Figura 18.** Izquierda: imagen obtenida mediante microscopía óptica del *grating* en el hidrogel hinchado. Derecha: medidas de difracción en 4 zonas (esquinas) de un *grating* de hidrogel. La replicación se llevó a cabo uniformemente en toda la red, permitiendo generar un patrón de difracción en cada uno de sus puntos, tal como se aprecia en la imagen.

#### 4.6. COMPARATIVA DE LOS PATRONES DE DIFRACCIÓN DE LOS *GRATING* DE HIDROGEL EN SECO E HIDRATADOS

Una vez comprobada la eficiencia de fabricación de redes de difracción superficiales en nuestro material, se procedió a estudiar los cambios en el patrón de difracción de la red tras ser incubada en disoluciones acuosas. Este paso no es trivial, ya que, en numerosas ocasiones, aunque es posible conseguir la réplica de la red, cuando el polímero se hidrata pierde la capacidad de difractar por el hinchamiento del polímero que genera la pérdida del patrón de la red.

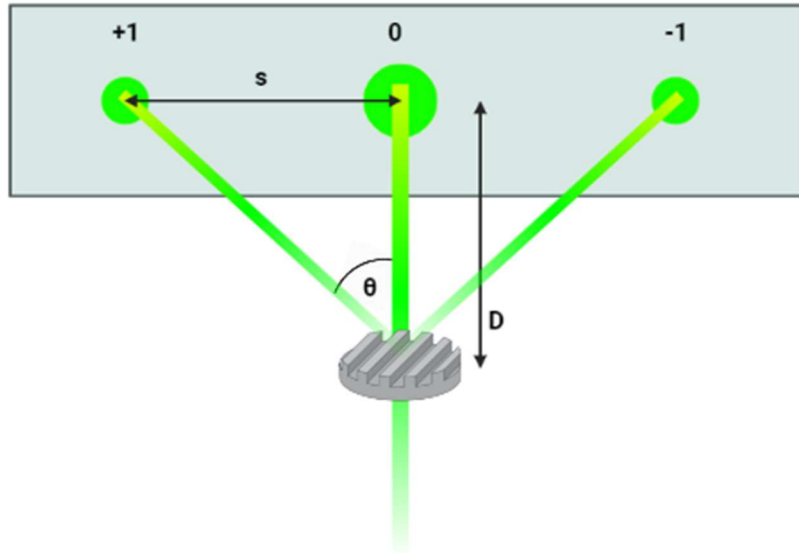
Además, estos estudios, son interesantes ya que permiten calcular la periodicidad del *grating* tras el hinchamiento mediante las ecuaciones 4 y 5, y por tanto estimar la magnitud del cambio de dimensiones producido en el material.

$$\tan(\theta) = \frac{s}{D} \quad (4)$$

$$\Lambda = \frac{n \times \lambda_0}{\sin(\theta)} \quad (5)$$

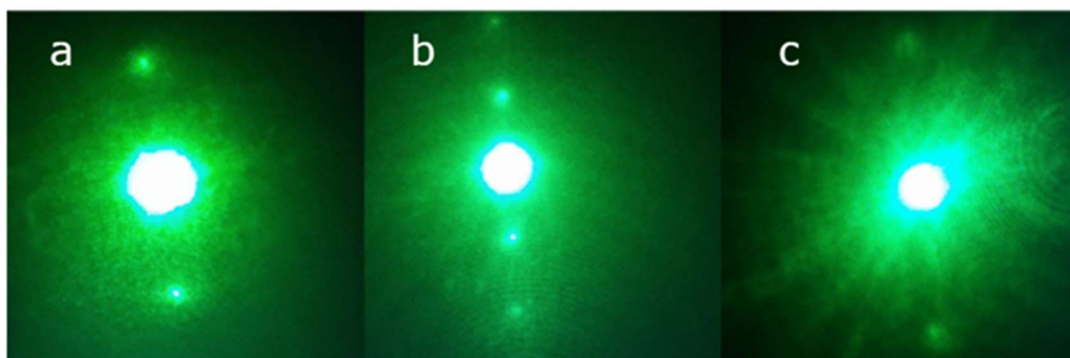


Donde:  $\theta$ =ángulo resultante de los rayos láser correspondientes a un orden determinado y el orden 0,  $s$ =distancia entre un orden determinado y el orden 0,  $D$ =distancia desde la cual se obtuvieron las imágenes (8 cm),  $n$ =orden,  $\lambda_0$ =longitud de onda del láser incidente (532 nm) y  $\Lambda$ =período ( $\mu\text{m}$ ) de la red. (Figura 19)



**Figura 19.** Esquema del montaje óptico utilizado para la determinación de los ángulos de difracción y periodicidad del *grating*. Donde:  $s$ =distancia entre un orden determinado y el orden 0,  $D$ =distancia desde la cual se obtuvieron las imágenes y  $\theta$ =ángulo resultante de los rayos láser correspondientes a un orden determinado y el orden 0.

Así, como se muestra en la Figura 20, se preparó un lote de tres *gratings* de hidrogel, en uno se midió la difracción recién sintetizado (sin hidratar) (Figura 19a), en el segundo se midió tras hidratarlo toda la noche en tampón PBS-T (Figura 19b), y el tercero se midió tras hidratación durante toda la noche en una disolución de anti-BSA en PBS-T (Figura 19c).



**Figura 20.** Comparativa de la capacidad de difracción de un *grating* de hidrogel sin hinchar (izquierda), uno hinchado tras ser sumergido en PBS-T durante 1 hora (centro) y uno tras una incubación de 1 hora con anti-BSA en PBS-T a una concentración de  $25 \text{ mg L}^{-1}$  (derecha). Una mayor amplitud del período se correlaciona con una menor distancia entre los órdenes 0 y 1 (centro).

#### 4.6.1. COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE DIFRACCIÓN DE UN *GRATING* DE HIDROGEL SECO Y UNO HINCHADO EN MEDIO PBS-T

Al comparar el patrón de difracción de un *grating* de hidrogel sin hinchar (Figura 20a) y uno hinchado en PBS-T (Figura 20b), como era de esperar se observaron diferencias en cuanto a las distancias del orden 0 respecto al orden 1. De este modo, en el caso del hidrogel en seco, la distancia entre ambos órdenes fue de 1,4 cm, 0,5 cm mayor de la misma distancia entre órdenes en el caso del hidrogel hinchado con PBS-T (0,9 cm). La disminución de la distancia entre órdenes en este último caso fue debida a la correlación existente entre la amplitud del período y la distancia entre órdenes. Así, se pudo determinar el cambio en el período de la red, que resultó ser de 4,76  $\mu\text{m}$ , esto es 1,65  $\mu\text{m}$  mayor que el período del hidrogel en seco.

**Tabla 2.** Datos del patrón de difracción (orden 1) en *grating* de hidrogel seco.

n	s (cm)	tan( $\theta$ )	$\theta$ ( $^\circ$ )	$\Lambda$ ( $\mu\text{m}$ )
1	1,4	0,175	9,93	3,01

**Tabla 3.** Datos del patrón de difracción (órdenes 1 y 2) en *grating* de hidrogel hinchado con PBS-T.

n	s (cm)	tan( $\theta$ )	$\theta$ ( $^\circ$ )	$\Lambda$ ( $\mu\text{m}$ )
1	0,85	0,106	6,06	5,04
2	1,7	0,213	12	5,18

#### 4.6.2. COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE DIFRACCIÓN DE UN *GRATING* DE HIDROGEL HINCHADO EN MEDIO PBS-T Y UNO INCUBADO CON ANTI-BSA

Una vez visto el cambio en la distancia entre los órdenes y en el período, se probó a incubar directamente un hidrogel seco con una disolución que contenía el analito de interés a 25 mg L<sup>-1</sup> (Figura 20c), para así cerciorarse del cambio de distancia entre los órdenes con respecto al hidrogel hinchado con PBS-T (Figura 20b). Para la comparación entre los *grating* de hidrogel entre un hidrogel hinchado con PBS-T y otro incubado con anti-BSA se tuvo en cuenta la distancia entre el orden 0 y el 2. Esto se debió a que a la hora de realizar las observaciones del patrón de difracción en la muestra de hidrogel incubada con anti-BSA, la intensidad del orden 0 fue muy superior a la del resto de órdenes, pudiendo haber ocultado completamente al orden 1 e imposibilitando las mediciones respecto a este orden. En este caso, la distancia entre los órdenes 0 y 2 fue de 1,9 cm. Al compararla con la distancia entre los mismos órdenes en el caso del hidrogel hinchado con PBS-T, esta fue ligeramente mayor (1,7 cm). Al igual que en la comparación previa, el período correspondiente al orden 2 del hidrogel hinchado con PBS-T (5,12  $\mu\text{m}$ ) fue mayor que el correspondiente al orden 2 del hidrogel incubado con el analito de interés (4,60  $\mu\text{m}$ ).

**Tabla 4.** Datos del patrón de difracción (orden 2) en *grating* de hidrogel incubado con anti-BSA a una concentración de 25 mg L<sup>-1</sup> en PBS-T.

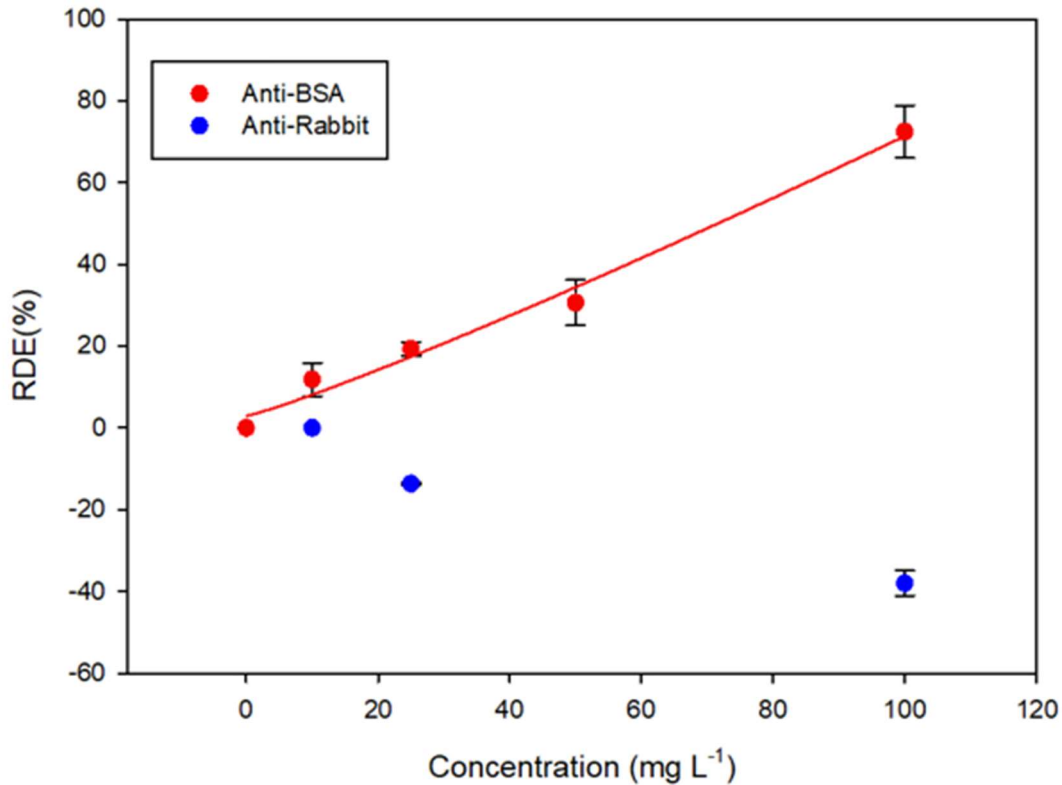
n	s (cm)	tan( $\theta$ )	$\theta$ (°)	$\Lambda$ ( $\mu$ m)
2	1,9	0,2125	12	4,60

En base a estos experimentos pudimos concluir que la red fabricada se mantiene tras la hidratación del material, y que su grado de cambio, con respecto al seco, es diferente en función de si el analito (anti-BSA) está presente o no en la disolución. Así, con todos estos resultados preliminares, se pasó a realizar la demostración de biosensado holográfico del sistema desarrollado.

#### 4.7. BIOSENSADO SIN MARCAJE DE ANTI-BSA MEDIANTE EL USO DE *GRATINGS* DE HIDROGEL, MEDIDAS DE DIFRACCIÓN

Las redes de difracción superficiales fueron preparadas siguiendo la metodología y condiciones optimizadas descritas con anterioridad. Una vez replicadas las redes de hidrogel, estas fueron cortadas y colocadas en pocillos de una placa ELISA.

Posteriormente a la incubación de los hidrogeles en los pocillos a diferentes concentraciones de anti-BSA (0, 10, 25, 50, 100 mg L<sup>-1</sup>) y anti-rabbit (10, 25, 100 mg L<sup>-1</sup>) en PBS-T durante 4h, estos fueron lavados con PBS-T fresco y la eficiencia de difracción relativa (RDE%) fue calculada para ambos tipos de anticuerpos. Para la correcta compilación de medidas, los fragmentos de hidrogel a analizar deben encontrarse en medio líquido con PBS-T a la hora de realizar el ensayo de difracción. Los trozos de hidrogel localizados en cada pocillo deben colocarse de manera que la cara que contiene el *grating* se encuentre situada en la parte superior. La intensidad de los rayos de luz difractados por el biosensor correspondientes a los órdenes 0 y 1 fue captada por los fotodiodos del equipo de medidas ópticas, incidiendo cada rayo de forma directa sobre un fotodiodo distinto. El potencial medido fue transformado en intensidad a través de la ley de Ohm, y las eficiencias de difracción, calculadas como la relación de intensidades  $I_1/I_0$  multiplicada por 100. Finalmente, la eficiencia de difracción relativa (Ecuación 3) se representó frente a la concentración de analito incubada (Figura 21).



**Figura 21.** Eficiencia de difracción relativa (RDE) de *gratings* de hidrogel incubados en concentraciones crecientes de anti-BSA y anti-rabbit durante 4h y posterior lavado en medio PBS-T durante toda la noche.

El aumento del RDE (%) tras la incubación con anti-BSA se debe al aumento de la modulación del índice de refracción de las redes tras el reconocimiento específico del analito. A más analito, más RDE (%), hasta llegar a un punto de saturación donde la pendiente se hace menos pronunciada. (Figura 21) Los resultados son claros indicadores de la capacidad de los hidrogeles tratados de dar una señal/respuesta específica en presencia de anti-BSA a las concentraciones dadas, presentando un rango dinámico lineal para un amplio intervalo de concentraciones.

Para el caso de anticuerpo no específico, no se observaron cambios, si bien la dispersión de los datos apunta a la conveniencia de repetir este experimento.

Obtenido el ajuste lineal de los datos, se pudo determinar la sensibilidad (pendiente de la recta de calibrado, K) de los hidrogeles fabricados a la hora de detectar el analito de interés dentro del rango de concentraciones estudiado, siendo esta de 0,691 %/mg L<sup>-1</sup>. Se alcanzó un LOD de 0,183 mg L<sup>-1</sup>, siendo este valor, la menor cantidad de anti-BSA cuya señal puede ser distinguida de la del ruido, y que fue determinado como 3 veces la desviación estándar obtenida dividido entre la pendiente de la recta. Por su parte, el LOQ obtenido fue de 0,608 mg L<sup>-1</sup>, calculado como la razón entre 10 veces la desviación estándar y la pendiente, representando este valor la concentración más baja del analito cuantificable de forma fiable

En conclusión, el material optimizado presenta la capacidad de detectar de forma específica y sensible, utilizando una fabricación y un sistema de medida muy sencillos y de bajo coste.

## 5. CONCLUSIONES

---

En resumen, se han desarrollado biosensores ópticos inteligentes basados en *gratings* de hidrogeles para la detección selectiva, sensible y sin etiquetas de anti-BSA en un amplio rango de concentraciones haciendo uso de un equipo de medición óptica casero. Este novedoso sistema sigue con el desarrollo de los biosensores basados en holografía en los que trabaja el grupo, abriendo las puertas a nuevos enfoques dirigidos a la detección de una mayor variedad de analitos o nuevas estrategias de amplificación.

Para la correcta detección de la proteína interés, anti-BSA, la proteína BSA empleada en la síntesis de los hidrogeles hubo de ser modificada con acrilato para permitir su correcta polimerización dentro de la matriz del polímero. Se desarrollaron hidrogeles basados en *sliding materials* con propiedades mecánicas superiores. Debido a la necesidad de obtener un material transparente y estable en conjunción con una gran resistencia mecánica, se empleó AAm como monómero.

El producto obtenido presentó un grado de hinchamiento del 1200%, demostrando su gran capacidad de carga y resistencia y estabilidad mecánica. Para la caracterización de la morfología del material se optó por la utilización de microscopía electrónica de barrido, observándose microporosidades que en ocasiones albergaban nanoporosidades. Este alto grado de porosidad dota a los hidrogeles obtenidos de una gran capacidad de absorción del medio líquido en el que se encuentran.

Para la determinación de la selectividad de los hidrogeles a la hora de detectar anti-BSA, se escogió como procedimiento un estudio de fluorescencia. Para ello, se realizó un efectivo marcaje de las proteínas anti-BSA y anti-rabbit con el fluoróforo Alexa<sub>647</sub>, y se incubaron los hidrogeles con los anticuerpos una vez marcados a diferentes concentraciones. Tras la realización del estudio se apreció un incremento de la señal correspondiente a la intensidad de fluorescencia en ambos casos. Sin embargo, la señal obtenida tras la incubación con anti-BSA marcado fue 3 veces superior a la obtenida con anti-rabbit a una misma concentración, demostrando una buena selectividad respecto al analito de interés.

Tras la evaluación de la selectividad, se midió, finalmente, la sensibilidad de los hidrogeles producidos de detectar anti-BSA dentro de un rango de concentraciones determinado. Para ello se llevó a cabo un estudio basado en el empleo de hidrogeles conteniendo SRGs haciendo uso de un equipo de mediciones ópticas casero. Las medidas de difracción obtenidas indicaron una clara respuesta específica de los *gratings* ante la presencia de anti-BSA en el rango de concentraciones estudiado.

El sistema de biosensado aquí estudiado abriría camino dentro del biosensado óptico *label-free*, presentándose como una alternativa a los sistemas ya desarrollados y empleados en la actualidad y ofreciendo relevantes ventajas, como su fácil fabricación y simplicidad. Sin embargo, para su mayor expansión y uso frente a otras alternativas, se deben realizar más estudios que permitan mejorar la selectividad y sensibilidad frente al analito de interés, así como demostrar su eficacia en muestras reales, que presentan matrices más complejas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

- ❖ Avella-Oliver, M., Carrascosa, J., Puchades, R., & Maquieira, Á. (2017). Diffractive protein gratings as optically active transducers for high-throughput label-free immunosensing. *Analytical Chemistry*, 89(17), 9002–9008.
- ❖ Berruex, L. G., Freitag, R., & Tennikova, T. B. (2000). Comparison of antibody binding to immobilized group specific affinity ligands in high performance monolith affinity chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(1), 95–104.
- ❖ Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1–8.
- ❖ Bin Imran, A., Esaki, K., Gotoh, H., Seki, T., Ito, K., Sakai, Y., & Takeoka, Y. (2014). Extremely stretchable thermosensitive hydrogels by introducing slide-ring polyrotaxane cross-linkers and ionic groups into the polymer network. *Nature Communications*, 5(1), 5124.
- ❖ Borisov, S. M., & Wolfbeis, O. S. (2008). Optical biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 423–461.
- ❖ Chen, Y.-T., Lee, Y.-C., Lai, Y.-H., Lim, J.-C., Huang, N.-T., Lin, C.-T., & Huang, J.-J. (2020). Review of integrated optical biosensors for point-of-care applications. *Biosensors*, 10(12), 209.
- ❖ Davies, S., Hu, Y., Jiang, N., Blyth, J., Kaminska, M., Liu, Y., & Yetisen, A. K. (2021). Holographic sensors in biotechnology. *Advanced Functional Materials*, 31(47), 2105645.
- ❖ Dutta, S. (2019). Point of care sensing and biosensing using ambient light sensor of smartphone: Critical review. *Trends in Analytical Chemistry: TRAC*, 110, 393–400.
- ❖ Elsharif, M., Hassan, M. U., Yetisen, A. K., & Butt, H. (2018). Wearable contact lens biosensors for continuous glucose monitoring using smartphones. *ACS Nano*, 12(6), 5452–5462.
- ❖ Feng, L., Jia, S.-S., Chen, Y., & Liu, Y. (2020). Highly elastic slide-ring hydrogel with good recovery as stretchable supercapacitor. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 26(62), 14080–14084.
- ❖ Fuchs, Y., Soppera, O., Mayes, A. G., & Haupt, K. (2013). Holographic molecularly imprinted polymers for label-free chemical sensing. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 25(4), 566–570.
- ❖ Gavrilov, A. A., Physics Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russian Federation. igor@polly.phys.msu.ru, & Potemkin, I. I. (2018). Adaptive structure of gels and microgels with sliding cross-links: enhanced softness, stretchability and permeability. *Soft Matter*, 14(24), 5098–5105.
- ❖ Goble, J. A., & Rocafort, P. T. (2017). Point-of-care testing: Future of chronic disease state management? *Journal of Pharmacy Practice*, 30(2), 229–237.
- ❖ Hunt, H. K., & Armani, A. M. (2010). Label-free biological and chemical sensors. *Nanoscale*, 2(9), 1544–1559.
- ❖ Ito, K. (2007). Novel cross-linking concept of polymer network: Synthesis, structure, and properties of slide-ring gels with freely movable junctions. *Polymer Journal*, 39(6), 489–499.

- ❖ Ito, K. (2010). Slide-ring materials using topological supramolecular architecture. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 14(2), 28–34.
- ❖ Ito, K. (2012). Novel entropic elasticity of polymeric materials: why is slide-ring gel so soft? *Polymer Journal*, 44(1), 38–41.
- ❖ Jain, S. R., Borowska, E., Davidsson, R., Tudorache, M., Pontén, E., & Emnéus, J. (2004). A chemiluminescence flow immunosensor based on a porous monolithic metacrylate and polyethylene composite disc modified with protein G. *Biosensors & Bioelectronics*, 19(8), 795–803.
- ❖ Jayanthi, V. S. P. K. S. A., Das, A. B., & Saxena, U. (2017). Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. *Biosensors & Bioelectronics*, 91, 15–23.
- ❖ Jiménez C, C., & León P, D. E. (2009). Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *Revista Vitae*, 16(1), 144–154.
- ❖ Kabilan, S., Marshall, A. J., Blyth, J., Hussain, A., Yang, X., Lee, M.-C., & Lowe, C. R. (2006). Selective holographic glucose sensors. *Proceedings of IEEE Sensors*, 2004.
- ❖ Katsuno, C., Konda, A., Urayama, K., Takigawa, T., Kidowaki, M., & Ito, K. (2013). Pressure-responsive polymer membranes of slide-ring gels with movable cross-links. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 25(33), 4636–4640.
- ❖ Khansili, N., Rattu, G., & Krishna, P. M. (2018). Label-free optical biosensors for food and biological sensor applications. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, 265, 35–49.
- ❖ Lechuga, L. M. (2005). Chapter 5 Optical biosensors. En *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques* (pp. 209–250). Elsevier.
- ❖ Lee, M.-C., Kabilan, S., Hussain, A., Yang, X., Blyth, J., & Lowe, C. R. (2004). Glucose-sensitive holographic sensors for monitoring bacterial growth. *Analytical Chemistry*, 76(19), 5748–5755.
- ❖ Li, C.-Z. (2019). Special topic: Point-of-care testing (POCT) and in vitro diagnostics (IVDs). *Journal of Analysis and Testing*, 3(1), 1–2.
- ❖ Li, J., Tan, S. N., & Ge, H. (1996). Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for hydrogen peroxide. *Analytica Chimica Acta*, 335(1–2), 137–145.
- ❖ Llandro, J., Palfreyman, J. J., Ionescu, A., & Barnes, C. H. W. (2010). Magnetic biosensor technologies for medical applications: a review. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 48(10), 977–998.
- ❖ Lucío, M. I., Cubells-Gómez, A., Maquieira, Á., & Bañuls, M.-J. (2022). Hydrogel-based holographic sensors and biosensors: past, present, and future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(2), 993–1014.
- ❖ Lucío, M. I., Montoto, A. H., Fernández, E., Alamri, S., Kunze, T., Bañuls, M.-J., & Maquieira, Á. (2021). Label-free detection of C-Reactive protein using bioresponsive hydrogel-based surface relief diffraction gratings. *Biosensors & Bioelectronics*, 193(113561), 113561.
- ❖ Martínez, A., Blasco, J., Sanchis, P., Galán, J. V., García-Rupérez, J., Jordana, E., Gautier, P., Lebour, Y., Hernández, S., Guider, R., Daldosso, N., Garrido, B., Fedeli, J. M., Pavesi, L., Martí, J., & Spano, R. (2010). Ultrafast all-optical switching in a silicon-nanocrystal-based silicon slot waveguide at telecom wavelengths. *Nano Letters*, 10(4), 1506–1511.
- ❖ Mihajlovic, M., Staropoli, M., Appavou, M.-S., Wyss, H. M., Pyckhout-Hintzen, W., & Sijbesma, R. P. (2017). Tough supramolecular hydrogel based on strong hydrophobic interactions in a multiblock segmented copolymer. *Macromolecules*, 50(8), 3333–3346.
- ❖ Mira, D., Llorente, R., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A., & Martí, J. (2004). High-throughput screening of surface-enhanced fluorescence on industrial standard digital

- recording media. En J. C. Carrano & A. Zukauskas (Eds.), *Optically Based Biological and Chemical Sensing for Defence*. SPIE.
- ❖ Montañez, J. L., Ramos, E. G., Alegret, S., & Delgado, R. J. (2011). Biosensor de Glucosa basado en un Biocompósito disperso de Grafito-Epoxi-Platino-Glucosa Oxidasa. *CIT Informacion Tecnologica*, 22(1), 29–40.
  - ❖ Nakahata, M., Mori, S., Takashima, Y., Yamaguchi, H., & Harada, A. (2016). Self-healing materials formed by cross-linked polyrotaxanes with reversible bonds. *Chem*, 1(5), 766–775.
  - ❖ Okumura, Y., & Ito, K. (2001). The polyrotaxane gel: A topological gel by figure-of-eight cross-links. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 13(7), 485–487.
  - ❖ Oliveira, N. C. L., Khoury, G. E., Versnel, J. M., Moghaddam, G. K., Leite, L. S., Lima-Filho, J. L., & Lowe, C. R. (2018). A holographic sensor based on a biomimetic affinity ligand for the detection of cocaine. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, 270, 216–222.
  - ❖ Patel, P.N., Mishra, D.V., & Mandloi, A. (2010). *OPTICAL BIOSENSORS: FUNDAMENTALS & TRENDS*.
  - ❖ Peng, H.-Y., Wang, W., Gao, F., Lin, S., Liu, L.-Y., Pu, X.-Q., Liu, Z., Ju, X.-J., Xie, R., & Chu, L.-Y. (2018). Ultrasensitive diffraction gratings based on smart hydrogels for highly selective and rapid detection of trace heavy metal ions. *Journal of Materials Chemistry. C, Materials for Optical and Electronic Devices*, 6(42), 11356–11367.
  - ❖ Petryayeva, E., & Algar, W. R. (2015). Toward point-of-care diagnostics with consumer electronic devices: the expanding role of nanoparticles. *RSC Advances*, 5(28), 22256–22282.
  - ❖ Sakai, T., Murayama, H., Nagano, S., Takeoka, Y., Kidowaki, M., Ito, K., & Seki, T. (2007). Photoresponsive slide-ring gel. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 19(15), 2023–2025.
  - ❖ Sang, S., Wang, Y., Feng, Q., Wei, Y., Ji, J., & Zhang, W. (2016). Progress of new label-free techniques for biosensors: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(3), 465–481.
  - ❖ Sethi, R. S. (1994). Transducer aspects of biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 9(3), 243–264.
  - ❖ Stern, E., Klemic, J. F., Routenberg, D. A., Wyrembak, P. N., Turner-Evans, D. B., Hamilton, A. D., LaVan, D. A., Fahmy, T. M., & Reed, M. A. (2007). Label-free immunodetection with CMOS-compatible semiconducting nanowires. *Nature*, 445(7127), 519–522.
  - ❖ Takashima, Y., Sawa, Y., Iwaso, K., Nakahata, M., Yamaguchi, H., & Harada, A. (2017). Supramolecular materials cross-linked by host–guest inclusion complexes: The effect of side chain molecules on mechanical properties. *Macromolecules*, 50(8), 3254–3261.
  - ❖ Tan, E. V., & Lowe, C. R. (2009). Holographic enzyme inhibition assays for drug discovery. *Analytical Chemistry*, 81(18), 7579–7589.
  - ❖ Tee, H. T., Koynov, K., Reichel, T., & Wurm, F. R. (2019). Noncovalent hydrogen bonds tune the mechanical properties of phosphoester polyethylene mimics. *ACS Omega*, 4(5), 9324–9332.
  - ❖ Van der Meer, J. R., & Belkin, S. (2010). Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(7), 511–522.
  - ❖ Velychko, T. P., Soldatkin, O. O., Melnyk, V. G., Marchenko, S. V., Kirdeciler, S. K., Akata, B., Soldatkin, A. P., El'skaya, A. V., & Dzyadevych, S. V. (2016). A novel conductometric urea biosensor with improved analytical characteristic based on recombinant urease adsorbed on nanoparticle of silicalite. *Nanoscale Research Letters*, 11(1), 106.



- ❖ Vestergaard, M. 'delanji, Kerman, K., & Tamiya, E. (2007). An overview of label-free electrochemical protein sensors. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 7(12), 3442–3458.
- ❖ Wang, X., & Wang, X. (2013). Aptamer-functionalized hydrogel diffraction gratings for the human thrombin detection. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 49(53), 5957–5959.
- ❖ Yang, B., Wei, Z., Chen, X., Wei, K., & Bian, L. (2019). Manipulating the mechanical properties of biomimetic hydrogels with multivalent host-guest interactions. *Journal of Materials Chemistry. B, Materials for Biology and Medicine*, 7(10), 1726–1733.
- ❖ Yang, X., Pan, X., Blyth, J., & Lowe, C. R. (2008). Towards the real-time monitoring of glucose in tear fluid: holographic glucose sensors with reduced interference from lactate and pH. *Biosensors & Bioelectronics*, 23(6), 899–905.
- ❖ Ye, G., & Wang, X. (2010). Glucose sensing through diffraction grating of hydrogel bearing phenylboronic acid groups. *Biosensors & Bioelectronics*, 26(2), 772–777.
- ❖ Ye, G., Yang, C., & Wang, X. (2010). Sensing diffraction gratings of antigen-responsive hydrogel for human immunoglobulin-g detection. *Macromolecular Rapid Communications*, 31(15), 1332–1336.
- ❖ Yetisen, A. K., Butt, H., Volpatti, L. R., Pavlichenko, I., Humar, M., Kwok, S. J. J., Koo, H., Kim, K. S., Naydenova, I., Khademhosseini, A., Hahn, S. K., & Yun, S. H. (2016). Photonic hydrogel sensors. *Biotechnology Advances*, 34(3), 250–271.
- ❖ Yetisen, A. K., Naydenova, I., da Cruz Vasconcellos, F., Blyth, J., & Lowe, C. R. (2014). Holographic sensors: three-dimensional analyte-sensitive nanostructures and their applications. *Chemical Reviews*, 114(20), 10654–10696.
- ❖ Yin, S., & Yu, F. T. S. (Eds.). (2002). *Fiber Optic Sensors*. CRC Press.
- ❖ Zezza, P., Lucío, M. I., Maquieira, Á., & Bañuls, M.-J. (2022). DNA -based hydrogels for high-performance optical biosensing application. *Talanta*, 244(123427), 123427.
- ❖ Zhao, J.-J., Wang, W., Wang, F., Zhao, Y., Cai, Q.-W., Xie, R., Ju, X.-J., Liu, Z., Faraj, Y., & Chu, L.-Y. (2020). Smart hydrogel grating immunosensors for highly selective and sensitive detection of human-igg. *industrial & engineering chemistry research*, 59(22), 10469–10475.