



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Síntesis de hidrogeles biofuncionalizados con BSA-CD
para biosensado óptico mediante holografía.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Nikolaev Parapanov, Kristian

Tutor/a: Bañuls Polo, María José

Cotutor/a: Lucío Benito, María Isabel

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural



Instituto Interuniversitario de Investigación de
Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL (ETSIAMN)

Síntesis de hidrogeles biofuncionalizados con BSA modificada con ciclodextrina para biosensado óptico mediante holografía.

Trabajo Fin de Grado
Grado en Biotecnología

AUTOR: Parapanov, Kristian Nikolaev

TUTORA: Bañuls Polo, María José

COTUTORA: Lucío Benito, María Isabel

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

SÍNTESIS DE HIDROGELES BIOFUNCIONALIZADOS CON BSA MODIFICADA CON CICLODEXTRINA (BSA-CD) PARA BIOSENSADO ÓPTICO MEDIANTE HOLOGRAFÍA.

Los biosensores ópticos sin marcaje *o label-free* han emergido como una tecnología que ha captado la atención en el ámbito de la investigación gracias a sus potenciales aplicaciones y a su capacidad para detectar interacciones biomoleculares sin la necesidad de etiquetas. Su aplicación es especialmente relevante en medicina, seguridad alimentaria y monitoreo ambiental, garantizando la detección precisa de biomarcadores, patógenos o contaminantes, lo que convierte al biosensado *label-free* en una tecnología de alto impacto para el bienestar de la sociedad.

Los hidrogeles son sistemas hidrofílicos reticulados capaces de retener una gran cantidad de agua en su estado hidratado, manteniendo su estructura tridimensional. Esta capacidad puede ser aprovechada grabando una red de difracción en el seno del hidrogel para transformarlo en un transductor óptico ya que, una vez tiene lugar el reconocimiento específico entre el biorreceptor y el analito de interés, se produce un cambio en el índice de refracción del material o en la periodicidad de la red y, en consecuencia, sucede un cambio en el patrón de difracción que puede ser medido y relacionado con la concentración de analito.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo se centra en el desarrollo de un biosensor óptico sin marcaje basado en hidrogeles holográficos. Para ello, se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de hidrogeles basados en polímeros de anillos deslizantes, concretamente pseudopolirotaxano. El hidrogel modelo integra ciclodextrinas modificadas con BSA como elementos de biorreconocimiento del analito de interés, en este caso, anti-BSA. Durante la fabricación del hidrogel, las ciclodextrinas conjugadas a BSA se ensartaron en las cadenas lineales que conforman el pseudopolirotaxano, obteniendo así hidrogeles más plásticos y muy resistentes al estrés mecánico. Además, se ha planteado la caracterización estructural y mecánica del hidrogel, así como de su capacidad de biorreconocimiento específico mediante ensayos de fluorescencia. Paralelamente, se ha establecido una comparativa en términos de sensibilidad y resistencia mecánica entre los hidrogeles fotoquímicamente activados y los hidrogeles térmicamente activados.

También se han explorado las dos técnicas empleadas hasta el momento para generar redes de difracción. Por un lado, la técnica de *replica molding* ha sido la estrategia de fabricación principalmente analizada y optimizada con el objetivo de obtener redes de relieve de superficie (SRGs) y, por otro lado, también se ha evaluado la fabricación de redes de volumen (VHG) en hidrogeles para su posterior aplicación en el biosensado óptico sin marcaje.

Palabras clave: biosensado óptico, hidrogeles, BSA, holografía, difracción, pseudopolirotaxano, redes de relieve de superficie, redes de volumen.

SYNTHESIS OF BIOFUNCTIONALIZED HYDROGELS WITH CYCLODEXTRIN-MODIFIED BSA (BSA-CD) FOR OPTICAL BIOSENSING BY HOLOGRAPHY.

Label-free optical biosensors have emerged as a technology that has captured the attention of the research community thanks to its potential applications and its ability to detect biomolecular interactions without the need for labels. Its application is especially relevant in medicine, food safety and environmental monitoring, ensuring the accurate detection of biomarkers, pathogens or contaminants, which makes label-free biosensing a high-impact technology for the welfare of society.

Hydrogels are cross-linked hydrophilic systems capable of retaining a large amount of water in their hydrated state, maintaining their three-dimensional structure. This ability can be exploited by etching a diffraction grating within the hydrogel to transform it into an optical transducer since, once the specific recognition between the bioreceptor and the analyte of interest takes place, a change in the refractive index of the material or in the periodicity of the grating occurs and, consequently, causes a change in the diffraction pattern that can be measured and related to the analyte concentration.

Therefore, the aim of this work is focused on the development of a label-free optical biosensor based on holographic hydrogels. For this purpose, the synthesis and characterization of hydrogels based on slip ring polymers, namely pseudopolyrotaxane, has been carried out. The model hydrogel integrates BSA-modified cyclodextrins as biorecognition elements of the analyte of interest, in this case, anti-BSA. During the fabrication of the hydrogel, the BSA-conjugated cyclodextrins were threaded into the linear chains that make up the pseudopolyrotaxane, thus obtaining more plastic hydrogels that are highly resistant to mechanical stress. In addition, the structural and mechanical characterization of the hydrogel, as well as its specific biorecognition capacity by means of fluorescence assays, has been proposed. In parallel, a comparison in terms of sensitivity and mechanical resistance between photochemically activated hydrogels and thermally activated hydrogels has been established.

Moreover, the two techniques used so far to generate diffraction gratings have been explored. The replica molding technique has been the fabrication strategy mainly analyzed and optimized with the aim of obtaining surface relief gratings (SRGs) and, on the other hand, the fabrication of volume gratings (VHG) in hydrogels has also been evaluated for their subsequent application in non-marking optical biosensing.

Keywords: optical biosensing, hydrogels, BSA, holography, diffraction, pseudopolyrotaxane, surface relief grating, volume holographic gratings.

AGRADECIMIENTOS

Para empezar, quería agradecer inmensamente a María José y Maribel la oportunidad que me han brindado de realizar este TFG en su grupo de investigación. Siempre les estaré muy agradecido por la paciencia, la comprensión, el apoyo, los momentos divertidos y la forma tan dedicada que han tenido de valorarme y enseñarme cómo es el mundo de la investigación. Aunque este no sea un camino de rosas, me ha resultado enriquecedor. Además, quería mencionar a todos los compañeros de laboratorio Pamela, Sofía, Yulieth, Will, Pilar, Aitor, Arturo, Iker, Jose, Pedro, Sara, Amadeo y Miquel que me han ayudado siempre que han podido, me han hecho reír y también me han tratado fenomenal durante toda mi estancia en el grupo de investigación.

Por otro lado, quería agradecer a José Luis Cruz, catedrático del departamento de Física Aplicada y miembro del grupo de investigación de Fibras Ópticas y Procesado de Señal en la Universidad de Valencia, por su colaboración con el sistema óptico de grabación láser UV, gracias al cual pude realizar experimentos clave que enriquecieron mi trabajo y ampliaron mis conocimientos en el campo de la óptica.

Obviamente no puede faltar el agradecimiento a mi madre y a mi hermano por todo el amor, cariño y apoyo que me han dado durante toda esta etapa. Los momentos estresantes no los hubiera podido gestionar mejor sin ellos, siempre han sabido como ayudarme y darme ese empujón de confianza que necesito a veces. Os quiero mucho.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 LOS BIOSENSORES Y SUS APLICACIONES	1
1.2 HIDROGELES APLICADOS AL BIOSENSADO.....	4
1.2.1 HIDROGELES HOLOGRÁFICOS COMO TRANSDUCTORES DE SEÑALES.....	6
1.2.2 POLÍMEROS DE TIPO SLIDE-RING (SR)	9
1.3 HIDROGELES DE PSEUDOPOLIROTAXANO BASADOS EN CICLODEXTRINAS	10
1.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS CICLODEXTRINAS	10
1.3.2 FORMACIÓN DEL PSEUDOPOLIROTAXANO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1 MATERIALES.....	13
3.2 MÉTODOS.....	14
3.2.1 MODIFICACIÓN DE BSA CON CICLODEXTRINA MEDIANTE LINKER BIFUNCIONAL GMBS.	14
3.2.2 SÍNTESIS DE PSEUDOPOLIROTAXANO	14
3.2.3 SÍNTESIS DEL NEGATIVO DE PDMS A PARTIR DE MÁSTER PET.....	15
3.2.4 SÍNTESIS DE HIDROGELES EN FORMA DE SRGs.....	15
3.2.5 ANÁLISIS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	16
3.2.6 CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LOS HIDROGELES.....	16
3.2.7 ENSAYOS DE FLUORESCENCIA EN HIDROGELES	16
3.2.8 FABRICACIÓN DE REDES DE VOLUMEN (VHG _s) EN FILMS DE HIDROGEL.....	17
3.2.9 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE DIFRACCIÓN MEDIANTE UN SISTEMA ÓPTICO	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1 ANCLAJE COVALENTE DE BSA A CICLODEXTRINA (BSA-CD)	19
4.2 FABRICACIÓN DE REDES DE RELIEVE DE SUPERFICIE (SRGs) EN HIDROGELES	20
4.3 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	25
4.4 CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LOS HIDROGELES.....	27
4.5 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO ESPECÍFICO DE ANTI-BSA MEDIANTE ENSAYOS DE FLUORESCENCIA	28
4.6 FABRICACIÓN DE REDES DE VOLUMEN EN HIDROGELES MEDIANTE ACTIVACIÓN FOTOQUÍMICA	34
5. CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema general de un biosensor.

Figura 2. Ilustración gráfica de los componentes de un biosensor óptico.

Figura 3. Representación esquemática de los tipos de hidrogeles en base al mecanismo de formación de su estructura.

Figura 4. Fabricación de los *gratings* por interferencia de dos láseres.

Figura 5. a) Diagrama esquemático del desplazamiento de las ciclodextrinas a lo largo de las cadenas de polietilenglicol, generando estructuras en forma de “ochos”. b) Demostración de las propiedades mecánicas extraordinarias mostradas por los polímeros SR.

Figura 6. Estructura molecular de la ciclodextrina y sus dimensiones geométricas.

Figura 7. Formación de los geles de pseudopoliritaxano con α -ciclodextrinas y PEG de alto peso molecular

Figura 8. Sistema óptico casero empleado para la caracterización y análisis de los patrones de difracción generados por las redes de relieve de superficie en hidrogeles.

Figura 9. Análisis por espectrometría de masas de la muestra de BSA conjugada a ciclodextrinas.

Figura 10. Esquema del proceso de modificación de BSA con ciclodextrina mediante el *linker* GMBS para obtener pseudopoliritaxano a partir de polietilenglicol diacrilato, BSA-CD y CD-AAm.

Figura 11. Esquema de la técnica de *replica molding* mediante la cual se obtuvieron los hidrogeles con SRGs en este trabajo.

Figura 12. Hidrogel sintetizado mediante polimerización con luz UV, donde se puede apreciar su alta transparencia óptica.

Figura 13. Patrón de difracción resultante de hacer incidir un láser en el *grating* de los hidrogeles fabricados con KPS y glicerol en presencia de luz (izquierda) y ausencia de luz (derecha).

Figura 14. Fotografías tomadas del interior de un hidrogel con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo. (SEM)

Figura 15. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo. Modelo GeminiSEM 500. (Universidad Politécnica de Valencia)

Figura 16. Curvas de tensión-deformación de 10 ciclos consecutivos de compresión-relajación para los hidrogeles sintetizados con activación fotoquímica (LAP, izquierda) y térmica (KPS, derecha) en PBS-T.

Figura 17. Imágenes obtenidas mediante el lector de fluorescencia de superficie casero acoplado a una cámara CCD a un tiempo de exposición de 5 segundos y ganancia de 1 g. Intensidad de fluorescencia de hidrogeles incubados durante 4 horas en concentraciones crecientes de GAR-Alexa₆₄₇ (primera fila) y anti-BSA-Alexa₆₄₇ (segunda fila) y lavados con PBS-T *overnight*.

Figura 18. Intensidad de fluorescencia (5s 1g) de hidrogeles incubados con anti-BSA-Alexa₆₄₇ y GAR-Alexa₆₄₇ a concentraciones crecientes durante 4 horas tras lavar con PBS-T *overnight*.

Figura 19. Izquierda: Gráfica de la intensidad de fluorescencia, medida a un tiempo de exposición de 10s y ganancia de 5, de hidrogeles incubados con anti-BSA-Alexa₆₄₇ a unas concentraciones crecientes entre 0 y 10 mg L⁻¹ durante 4 horas y tras lavar con PBS-T *overnight*. Derecha: Intensidad de fluorescencia, medida a un tiempo de exposición de 40s y una ganancia de 5, en el rango de concentraciones entre 0 y 1 mg L⁻¹ de anti-BSA.

Figura 20. Intensidad de fluorescencia (5s 1g) de hidrogeles polimerizados con KPS que fueron incubados con anti-BSA-Alexa₆₄₇ y GAR-Alexa₆₄₇ a concentraciones crecientes durante 4 horas y posteriormente, se lavaron con PBS-T *overnight*.

Figura 21. Izquierda: Sistema óptico empleado durante el proceso de grabado de *films* de hidrogel. Derecha: máscara de fase que produce el desfase entre los haces incidentes de luz, generando un patrón de difracción en el *film* de hidrogel.

Figura 22. Patrón de difracción producido por la red de volumen (VHG) generada en el *film* de hidrogel.

Tabla 1. Tabla comparativa entre los hidrogeles activados fotoquímicamente y los hidrogeles activados térmicamente en términos de sensibilidad, LOD y LOQ. (5s 1g)

ABREVIATURAS

AAm: Acrilamida

Anti-BSA: Anticuerpo frente a la albúmina de suero bovino

Anti-BSA-Alexa₆₄₇: Anticuerpo frente a la albúmina de suero bovino marcado con fluoróforo Alexa₆₄₇

BSA: Albúmina de suero bovino

BSA-CD: Albúmina de suero bovino conjugada a ciclodextrina

CCD: Dispositivo de carga acoplada (*Charge-Coupled Device*)

CD: Ciclodextrina

DE: Eficiencia de difracción (*Diffraction efficiency*)

DLIP: Litografía por interferencia láser directa (*Direct Laser Interference Patterning*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

FET: Transistor de efecto de campo (*Field-effect transistor*)

GAR: Anticuerpo de cabra anti-conejo (*Goat anti-Rabbit*)

GAR-Alexa₆₄₇: Anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con fluoróforo Alexa₆₄₇

GMBS: Éster N-hidroxisuccinimida de ácido 4-maleimidobutírico

KPS: Persulfato de potasio

LAP: fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

PBS-T: Tampón fosfato salino con Tween 20

PDMS: Polidimetilsiloxano

PEG: Polietilenglicol

PET: Tereftalato de polietileno

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

SEM: Microscopio electrónico de barrido

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

UV: Ultravioleta

VGH: Redes holográficas de volumen (*Volume Holographic Gratings*)

β -CD-AAm: β -ciclodextrina modificada con acrilamida

β -CDAAmMe-PEG: pseudopolitaxano

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 LOS BIOSENSORES Y SUS APLICACIONES

Un biosensor es un dispositivo analítico que integra un bioreceptor, que asegura el reconocimiento de la molécula diana, y un transductor de señal, que transforma el suceso de reconocimiento en una señal medible, permitiendo la detección de distintos analitos químicos o biológicos (Figura 1). (Thévenot *et al.*, 2001)

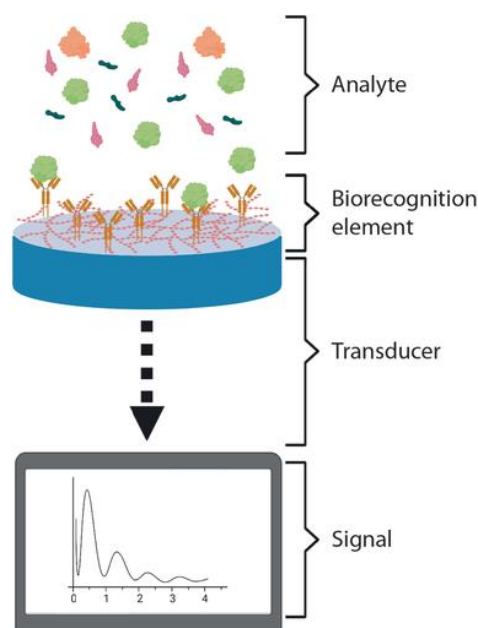


Figura 1. Esquema general de un biosensor. (Burtcher *et al.*, 2021)

En la actualidad, el desarrollo de dispositivos que permitan una monitorización autónoma y sean económicos y escalables, es fundamental para que se puedan emplear en el diagnóstico molecular de distintas enfermedades. Esto nos permite reducir la saturación de personal sanitario y, además, facilita la detección temprana de complicaciones médicas con el objetivo de gestionar los recursos sanitarios eficazmente y llevar a cabo intervenciones más rápidas y efectivas. (Lucío *et al.*, 2022) (Zezza *et al.*, 2023).

Los biosensores son tecnologías emergentes que pueden llegar a ser muy útiles en una amplia variedad de ámbitos como pueden ser la monitorización de la calidad del agua (Hui *et al.*, 2022), la ingeniería de tejidos (Ho *et al.*, 2022) o la medicina y la salud humana, llegando incluso a reformar distintas técnicas de la medicina moderna.

En este contexto, los biosensores con capacidad de ser dispositivos *point-of-care* (POC) resultan idóneos gracias a su capacidad de detección rápida y específica de analitos, alta sensibilidad y facilidad a la hora de interpretar sus resultados. (Lucío *et al.*, 2022).

Según el *Biosensors market size, share and trends report (2024)*, la relevancia económica de los biosensores se ve reflejada en el valor de su mercado global, que se encontraba en aproximadamente 28,9 billones de dólares en 2023 y se estima que crecerá un 8% hasta 2030.

Existe una amplia variedad de clasificaciones de los biosensores según distintos criterios, como puede ser el tipo de biorreceptor empleado. De acuerdo a este criterio, se habla de inmunosensores, biosensores enzimáticos, biosensores de ácidos nucleicos y aptasensores.

Otra clasificación muy interesante es la que organiza los biosensores en base al mecanismo de transducción que se utiliza. Así, se agrupan en biosensores electroquímicos, ópticos, másicos, termométricos, piezoeléctricos y nanomecánicos. De todos ellos, los más utilizados son los electroquímicos y los ópticos.

Los sensores electroquímicos comprenden cuatro tipos distintos: amperométricos (miden la corriente eléctrica resultante de una oxidación o reducción electroquímica de una especie electroactiva), potenciométricos (miden la diferencia de potencial entre un indicador y un electrodo de referencia, o dos electrodos de referencia separados por una membrana semipermeable), conductimétricos (son capaces de detectar variaciones en la conductividad eléctrica asociadas a cambios en la concentración iónica de la disolución) y biosensores basados en transistores de efecto de campo (detectan cambios en la densidad de carga-transistor FET) (Thévenot *et al.*, 2001)

En este trabajo nos centraremos en los biosensores basados en la transducción óptica (Figura 2).

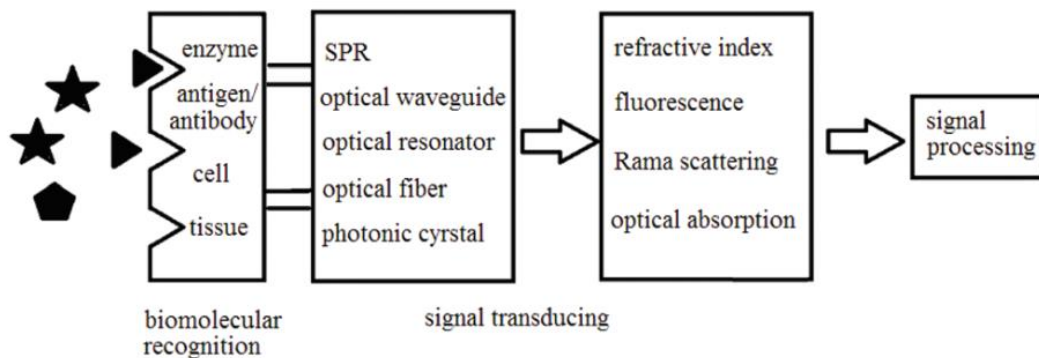


Figura 2. Ilustración gráfica de los componentes de un biosensor óptico. (Sang *et al.*, 2015)

Dentro de los mismos, encontramos dos grupos de biosensores: biosensores basados en marcaje y biosensores que no utilizan marcaje o *label-free*. (Kulkarni *et al.*, 2022)

Los biosensores basados en marcaje emplean *tags* o etiquetas para detectar un analito en particular dentro de un entorno con más moléculas. Para ello, existen distintas técnicas ya sean directas, basadas en marcar el analito de interés reversible o irreversiblemente, o bien técnicas indirectas en las que se marca una molécula, por ejemplo, un anticuerpo, que reconocerá el analito. De esta manera, la señal obtenida aumenta y, además, se facilita la detección. El tipo de detección puede basarse en fluorescencia, quimioluminiscencia o la radioactividad emitida dependiendo de la etiqueta que se ha escogido.

Sin embargo, este tipo de biosensado, presenta desventajas como puede ser la pérdida de muestra durante el proceso de marcaje y purificación o incluso la pérdida de funcionalidad de la biomolécula

marcada. Además, las etiquetas en algunos casos son bastante sensibles al entorno. Por ejemplo, la fluorescencia es altamente sensible a la luz y, por ello, se debe tener especial cuidado durante el proceso de tratamiento de muestra y su posterior conservación. (Sang *et al.*, 2015)

Por otro lado, y gracias a los avances en biotecnología, han ido surgiendo los biosensores sin marcaje o “*label-free*”. En este tipo de sensores se facilita el análisis de biomoléculas que son difícilmente marcables debido a sus características. Los ensayos sin marcaje han demostrado la capacidad de poder estudiar interacciones moleculares en tiempo real, proporcionar información acerca de la selectividad y afinidad e incluso analizar la termodinámica y cinética del proceso de unión entre dos moléculas de interés. También, permiten llevar a cabo la cuantificación de la concentración de la molécula de interés en un solo paso, reduciendo la complejidad de las etapas experimentales y el tiempo requerido. (Sang *et al.*, 2015) (Zeza *et al.*, 2023)

Los biosensores ópticos sin marcaje son muy interesantes ya que pueden estar compuestos por distintos materiales y combinar distintos tipos de detección (Lucío *et al.*, 2022). Estos han demostrado múltiples ventajas frente a las técnicas analíticas convencionales como pueden ser la detección directa y en tiempo real de sustancias biológicas, su alta sensibilidad, portabilidad, capacidad de multiplexado y elevada rentabilidad. (Zeza *et al.*, 2023)

Actualmente, las técnicas de biosensado sin marcaje se han centrado en desarrollar transductores de señal cada vez más refinados. Gran parte del avance en este sentido se debe al desarrollo de la nanotecnología, generando nuevas técnicas que emplean transistores de efecto de campo (FETs), biosensores magnetoelásticos, biosensores ópticos y biosensores basados en tensiones superficiales. (Sang *et al.*, 2015)

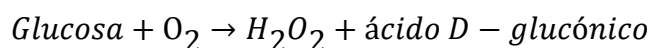
Las aproximaciones más significativas del biosensado óptico sin marcaje incluyen la resonancia de plasmón superficial (SPR), la interferometría de polarización dual (DPI), los biosensores ópticos basados en guías de onda y los sensores holográficos.

La técnica basada en plasmones superficiales (SPR) es una de las más extendidas, ya que permite la medición óptica de cambios en el índice de refracción asociados a la unión de moléculas de analito en la superficie de un metal (Chen *et al.*, 2020). Esto se logra mediante plasmones de superficie, que son ondas electromagnéticas que se generan cuando los fotones de una onda incidente interactúan con los electrones de la superficie metálica. Estas ondas se propagan a lo largo de la superficie metálica y un cambio en su velocidad permite detectar pequeñas modificaciones en la superficie del biosensor. (Piliarik *et al.*, 2009)

En definitiva, la capacidad de los biosensores ópticos sin marcaje para llevar a cabo una monitorización a tiempo real de distintos parámetros fisiológicos y bioquímicos, así como su flexibilidad, facilidad de uso y propiedades portátiles son características que nos indican su elevado potencial. (Wu *et al.*, 2022). La aplicabilidad de estos dispositivos en el campo del diagnóstico clínico y los análisis bioquímicos puede ser una interesante oportunidad mediante la cual analizar el estado de salud de los pacientes de una forma rápida y eficaz. Al detectar analitos asociados a distintas enfermedades con elevada sensibilidad, los biosensores podrían utilizarse en el diagnóstico y tratamiento temprano de alteraciones que, de otra forma, resultarían en un mal pronóstico del paciente.

Un biomarcador es un parámetro biológico medible y cuantificable que se puede utilizar como indicador a la hora de analizar el riesgo de desarrollar una enfermedad en el organismo. Los biosensores en este campo detectan la presencia de estos biomarcadores y nos permiten cuantificarlos, para llevar a cabo un análisis del perfil de salud del paciente. (Burtscher *et al.*, 2021)

El caso de éxito más claro, en este sentido, es el sensor de glucosa. Este biosensor electroquímico fue comercializado en 1975 y su mecanismo de acción aprovechaba la capacidad catalizadora de la enzima glucosa oxidasa en la reacción de oxidación de la glucosa. En esta reacción, la glucosa reacciona con el oxígeno para dar lugar a peróxido de hidrógeno y ácido D-glucónico. El peróxido de hidrógeno resultante de esta reacción es oxidado en la superficie de un electrodo de platino, produciendo una corriente eléctrica directamente proporcional a la cantidad de glucosa en la muestra analizada. (Updike *et al.*, 1967)



Desde este momento, el desarrollo de los biosensores resultó en aplicaciones muy prometedoras, que se encuentran en proceso de ensayos clínicos. Algunos ejemplos pueden ser la detección temprana de cáncer a través del reconocimiento de ciertos biomarcadores como PDL-1, detección de la fibrosis quística y la monitorización de la concentración de fármacos o ciertos metabolitos en sangre. En todos los casos se procede de manera similar, partiendo de distintos fluidos biológicos del paciente, el biosensor es capaz de detectar específicamente el biomarcador asociado a la enfermedad y transmitir esta información a través de una señal que es cuantificada y analizada según los parámetros normales del metabolito en cuestión. (Fernández *et al.*, 2011)

Por sus indiscutibles ventajas, se sigue investigando en el desarrollo de nuevas aproximaciones y aplicaciones de biosensado en el campo de la clínica, empleando principalmente transducción electroquímica u óptica. No obstante, el campo de los biosensores integra muchas más aplicaciones como pueden ser las relacionadas con el análisis de aguas potables, la monitorización de pesticidas, la trazabilidad y seguridad alimentaria y el descubrimiento de fármacos. (Mehrotra, 2016). Así, los avances en nuevos métodos de transducción pueden encontrar aplicación no solo en el ámbito en el que se realiza el desarrollo, sino que pueden potencialmente trasladarse a otros analitos de interés en otros campos.

1.2 HIDROGELES APLICADOS AL BIOSENSADO.

Los hidrogeles son sistemas hidrofílicos reticulados compuestos de polímeros naturales o sintéticos y que, en su estado totalmente hidratado, pueden retener grandes cantidades de agua manteniendo su estructura tridimensional. La estructura porosa y suave de los hidrogeles genera un microambiente que simula las condiciones fisiológicas normales y, en consecuencia, los hace un sistema idóneo para inmovilizar biomoléculas en su interior. (Lucío *et al.*, 2022)

La síntesis de los hidrogeles se realiza a partir de la polimerización de diferentes compuestos químicos como la acrilamida, los alginatos o los polímeros basados en polisacáridos. Las reacciones químicas empleadas incluyen la adición, el autoensamblaje o la gelificación. Además, la cinética de estas reacciones de polimerización requiere de un iniciador. Los iniciadores empleados son de distinta naturaleza según el estímulo que inicie la reacción. Los principales tipos de activación son térmica, química o fotoquímica. En función de la aplicación deseada y las características mecánicas requeridas del hidrogel, resultará más conveniente hacer uso de un tipo u otro.

Los hidrogeles se clasifican según el mecanismo de formación de sus redes poliméricas, en hidrogeles químicos o hidrogeles físicos (Figura 3). Los hidrogeles químicos presentan uniones

covalentes entre sus cadenas poliméricas y estas se forman mediante reacciones químicas. En consecuencia, presentan una estructura más estable, robusta y con mayor resistencia mecánica. En cuanto a los hidrogeles físicos, estos presentan una estructura formada por enlaces débiles que se forman y se rompen dinámicamente, presentando una menor estabilidad. Gracias a que son más lábiles, presentan una estructura mucho más flexible y suave. (Ho *et al.*, 2022)

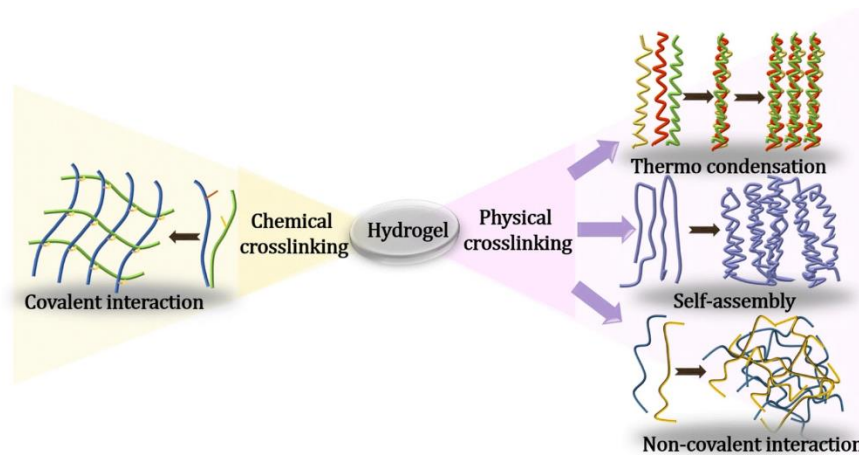


Figura 3. Representación esquemática de los tipos de hidrogeles en base al mecanismo de formación de su estructura. (Lu *et al.*, 2018)

Además del ámbito del biosensado, otros campos han estudiado la inclusión de los hidrogeles en distintas aplicaciones como son la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, tratando de diseñar parches o apósitos cuya finalidad sea promover la curación de heridas en la piel o incluso regenerar tejidos dañados por anomalías cardíacas, obteniendo resultados muy prometedores. (Chun *et al.*, 2018)

En definitiva, los hidrogeles pueden desempeñar su papel de biosensores al ser estructuras poliméricas que suelen ser biocompatibles. Sin embargo, en muchas ocasiones, los hidrogeles presentan unas propiedades mecánicas deficientes. Por ello, es interesante buscar nuevas composiciones que permitan un entrecruzamiento adecuado y mejoren sus propiedades para ser utilizados en distintas aplicaciones.

En el campo del biosensado, son interesantes los hidrogeles biosensibles o “*bioresponsive*”. Estos hidrogeles pueden responder a estímulos biológicos específicos, cambiando sus propiedades fisicoquímicas en respuesta a señales del entorno, pudiendo dar lugar, por tanto a biosensores. Con el objetivo de detectar eventos biológicos, existen dos aproximaciones de biosensado basado en hidrogeles.

Por un lado, se pueden emplear monómeros sensibles a cambios de pH o temperatura y, cuando se da el suceso biológico de interés, estos parámetros varían en el entorno del hidrogel, provocando un cambio en el grado de hinchamiento de este. En cuanto al segundo mecanismo de biosensado, este comprende la incorporación de un biorreceptor específico inmovilizado en el interior del hidrogel. Este biorreceptor interactuará con el analito de interés y desencadenará un cambio estructural en el hidrogel, dando lugar a un cambio de propiedad observable, medible y que se puede relacionar con la concentración del analito. (Lucío *et al.*, 2022)

Es importante destacar que la composición de los hidrogeles, al ser muy versátil, se puede ajustar en función de las características químicas, mecánicas y biológicas de interés, permitiendo la incorporación de sondas específicas de naturaleza proteica y ácidos nucleicos.

Una vez producido el biorreconocimiento, es necesario que el cambio estructural o de hinchamiento producido en el hidrogel se traduzca a una señal medible y relacionable con la cantidad de analito. Una estrategia para conseguir esto consiste en transformar el propio hidrogel en un transductor óptico mediante el grabado de una red de difracción en el seno del hidrogel biosensible. Si la red se genera con fenómenos de holografía se da lugar a lo que denominamos “hidrogel holográfico”, que es el objetivo perseguido en este trabajo.

1.2.1 HIDROGELES HOLOGRÁFICOS COMO TRANSDUCTORES DE SEÑALES.

La transducción óptica en hidrogeles biosensibles presenta una oportunidad innovadora de implementar nuevos modos de detección compatibles con dispositivos de lectura sencillos que además llevan a cabo mediciones cuantitativas. Por otro lado, pueden diseñarse para permitir una detección visual directa. Entre las configuraciones de lectura óptica se encuentran las matrices de cristal coloidal incrustadas, rejillas de difracción de Bragg grabadas en hidrogeles, rejillas difractadas de Bragg moldeadas en la superficie (SRG), resonancia de plasmones superficiales (SPR) o interferometría. (Lucío *et al.*, 2022)

Los sensores holográficos están emergiendo como una nueva tecnología para el desarrollo de dispositivos analíticos portátiles para aplicaciones *label-free*. De esta manera, se pueden eliminar diversos pasos de procesamiento previo al análisis químico convencional, reduciendo la complejidad del proceso. (Davies *et al.*, 2021)

Estos sensores pertenecen a la categoría de sensores ópticos y su funcionamiento se basa en redes holográficas cuyo patrón de difracción se modifica en presencia del analito y este cambio, permite determinar la concentración del analito diana.

La ventaja principal que presentan los sensores holográficos con respecto a otros sensores es que proporcionan un método de transducción de señal directo basado en la luz, que además ofrece una respuesta rápida y altamente sensible.

El mecanismo de transducción, en este caso, consiste en generar una estructura periódica (*grating*) insertada en el hidrogel. Dicha estructura actúa como red de difracción de manera que, cuando la luz incide sobre el hidrogel, es difractada generando un patrón de difracción que depende de la periodicidad de la red y de la modulación en el índice de refracción. Cuando, en presencia del estímulo, el hidrogel varía su volumen o su índice de refracción, este cambio afecta a la periodicidad de la red o a la modulación de su índice. En consecuencia, se produce un cambio en la difracción de la luz que es medible y es posible correlacionarlo con la concentración de analito presente en la muestra. En definitiva, una variación en la eficiencia de difracción, o en la distancia entre los órdenes de difracción, se puede correlacionar con la presencia de interacciones con la biomolécula diana. (Davies *et al.*, 2021)

Como se ha comentado anteriormente, las rejillas o “*gratings*” son patrones regulares grabados en un material. Para que estas rejillas holográficas funcionen adecuadamente, la capa de hidrogel en la que se graban debe permitir el paso de la luz sin dispersión significativa, presentar una buena

calidad óptica (sin irregularidades en el hidrogel que distorsionen el paso de la luz) y ser altamente permeable. (Zezza *et al.*, 2023)

En el contexto de hidrogeles, un factor fundamental es el grado de entrecruzamiento o “*cross-linking*”, es decir, la relación entre monómero y entrecruzante. Al aumentar el grado de entrecruzamiento, dispondremos de una estructura más estable y rígida. Este grado de entrecruzamiento también es importante para que los hidrogeles retengan los hologramas grabados sobre ellos. Sin embargo, aquellos hidrogeles con mayor grado de entrecruzamiento presentan cadenas poliméricas firmemente unidas entre sí y, por lo tanto, una estructura más rígida. Al ser una estructura poco flexible, la capacidad de hinchamiento ante estímulos es limitada y, en consecuencia, la sensibilidad es menor. Por lo tanto, el grado de entrecruzamiento debe optimizarse para alcanzar la mayor sensibilidad posible y asegurar el grabado de los hologramas sobre el hidrogel. (Contessi Negrini *et al.*, 2021)

En cuanto a los métodos de fabricación de los *gratings* en el hidrogel, se encuentran en bibliografía dos técnicas principales: la técnica de *replica molding* a partir de un máster para generar redes de relieve de superficie (SRGs) y la generación de redes holográficas de volumen (*Volume Holographic Gratings*, VHGs).

En este trabajo, se ha empleado principalmente la técnica de *replica molding* a partir de un máster de polietilentereftalato (PET) fabricado por la técnica holográfica *Direct Laser Interference Patterning* (DLIP) (Figura 4.c). La técnica de *replica molding* consiste en realizar, en un primer lugar, un negativo en PDMS a partir del *grating* del máster PET. Seguidamente, sobre este negativo, se vierte la mezcla monomérica de síntesis para que se integre en las almenas del *grating* y que una vez se active la polimerización, se pueda generar la forma original de máster PET sobre el hidrogel en forma de red de relieve de superficie (SRG). (Zezza *et al.*, 2022)

En cuanto a la segunda forma de generar *gratings*, se basa en una técnica de generación de redes holográficas de volumen (VHGs). Esta consiste en embeber el seno del hidrogel, fabricado en forma de lámina fina (*film*), en una mezcla monomérica fotosensible cuya polimerización se activa mediante luz. La mezcla monomérica es sometida a una irradiación holográfica a partir de la interferencia de dos láseres, generándose así un patrón intermitente de zonas irradiadas que polimerizan y zonas oscuras que no polimerizan, obteniendo una red de volumen (VHG). Aquellas zonas que hayan sido expuestas a la luz, al estar polimerizadas, modificarán sus propiedades en cuanto al coeficiente de absorción, el índice de refracción y su espesor. El proceso se esquematiza en la Figura 4a y b. (Lucío *et al.*, 2022)

Esta técnica, en definitiva, consiste en la formación de un patrón de interferencia a partir de cambios en la intensidad de la luz en diferentes puntos donde los láseres se intersectan. Esto es debido a que hay zonas del material en las que se da una interferencia constructiva en la cual, las dos ondas de luz se encuentran en fase, es decir, sus máximos y mínimos se alinean y, en consecuencia, ocurre la polimerización. Por otro lado, también hay zonas en las que se da una interferencia destructiva en la que las ondas de luz se encuentran en oposición de fase, ya que el máximo de una onda lumínica coincide con el mínimo de la otra y, en consecuencia, se anulan. (Sola *et al.*, 2018)

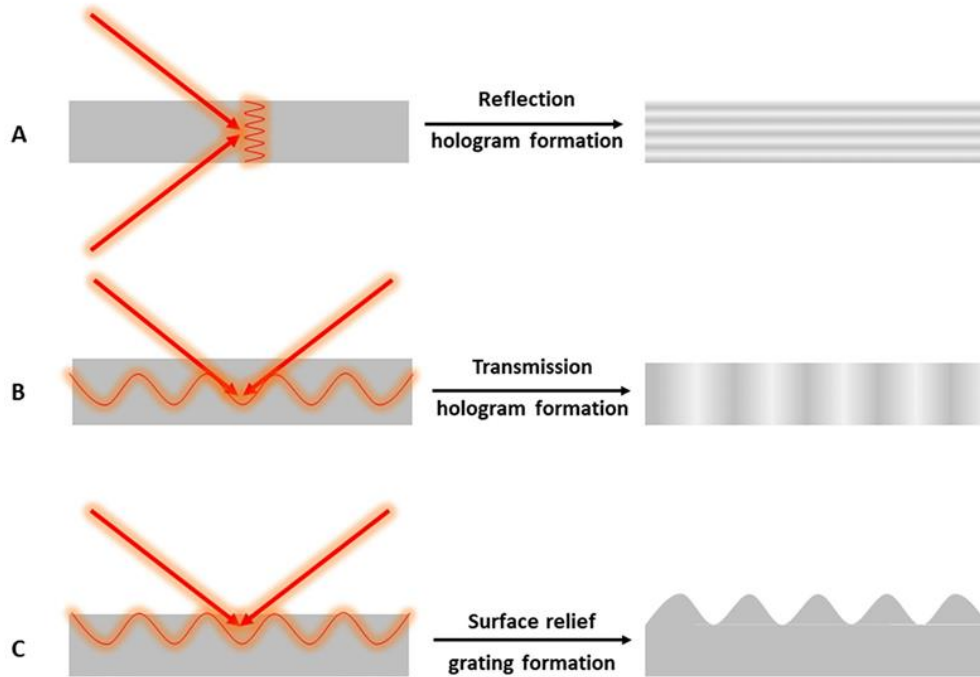


Figura 4. Fabricación de los *gratings* por interferencia de dos láseres: **A.** Hologramas de reflexión mediante una interferencia de láseres opuestos, produciéndose franjas paralelas en la superficie. **B.** Hologramas de transmisión mediante una interferencia de láseres que inciden en el material desde el mismo lado, creando franjas perpendiculares a la superficie del soporte de grabación. **C.** Redes de relieve de superficie (SRGs) fabricadas a partir de la interferencia de láseres desde el mismo lado que genera un relieve perpendicular. (Lucío *et al.*, 2022)

Independientemente del proceso de generación de la red que se emplee, es necesario que el propio hidrogel presente unas características mecánicas adecuadas. En numerosas ocasiones, la fragilidad y poca elasticidad de los hidrogeles provoca que se produzcan roturas o arrugas durante el proceso de grabado. Por otro lado, si se mejora la capacidad de hinchamiento del hidrogel, esto se puede traducir en una mejor sensibilidad del biosensor, al producirse cambios más acusados tras el reconocimiento del analito.

En este sentido, una alternativa interesante, no explorada aún en la bibliografía, consiste en hacer uso de hidrogeles covalentes, pero basados en el fenómeno de los anillos deslizantes o *Slide-Ring* que se explican a continuación.

1.2.2 POLÍMEROS DE TIPO SLIDE-RING (SR)

Los polímeros *Slide-Ring* (SR), presentan una serie de propiedades reológicas realmente interesantes para el propósito del presente trabajo. En 2001, el investigador Kohzo Ito y su equipo de trabajo, inspirados por el trabajo de Gennes, (Okumura *et al.*, 2001) fabricaron una novedosa estructura entrecruzada cuya organización molecular se inspiraba en la arquitectura de los rotaxanos. A esta nueva red polimérica la denominaron “*slide-ring material*”. (Ito *et al.*, 2007)

La estructura resultante exhibía una serie de cadenas de polietilenglicol en las cuales se ensartaron ciclodextrinas, formando así los polirotaxanos. En estos polirotaxanos, se observó que las ciclodextrinas ensartadas en distintas cadenas se unían, generando entrecruzamientos en forma de “ochos”. En estos puntos de unión, las ciclodextrinas no se encontraban fijas, sino que eran capaces de desplazarse libremente a lo largo de la cadena de polietilenglicol. Este fenómeno fue definido por los autores como “efecto polea”. (Figura 5a) (Ito *et al.*, 2007)

Desde ese momento, los polirotaxanos se sometieron a diversos estudios cuya finalidad era la caracterización y modelización de sus propiedades, que resultaban excepcionales en cuanto a elasticidad, elongación y resistencia a la deformación mecánica. (Gavrilov *et al.*, 2018) (Kato *et al.*, 2009). Este hecho causó un inminente interés relacionado con incorporar funcionalidades en las ciclodextrinas, llegando a fabricar materiales que mejoraban significativamente las propiedades con respecto de los polímeros análogos que no contenían el polirotaxano. (Figura 5b) (Soleimani *et al.*, 2018) (Bin Imran *et al.*, 2014).

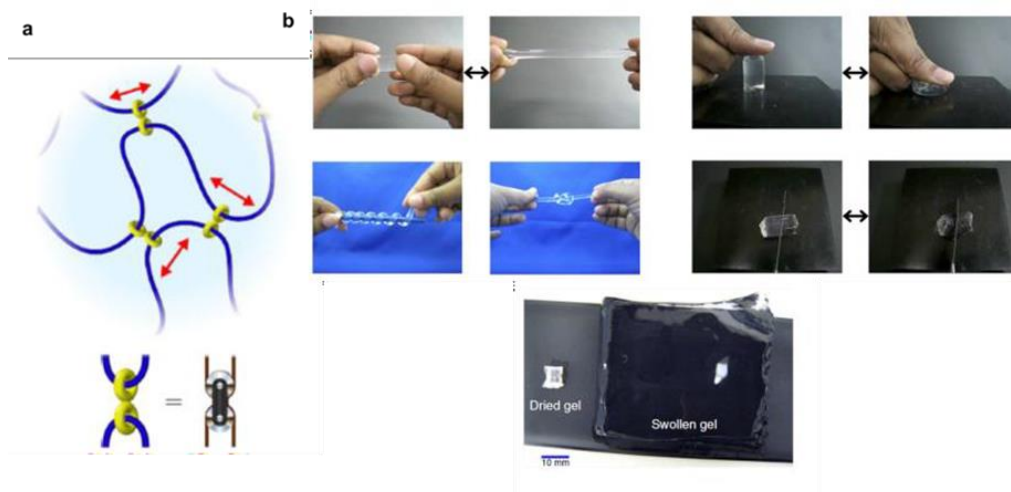


Figura 5. a) Diagrama esquemático del desplazamiento de las ciclodextrinas a lo largo de las cadenas de polietilenglicol, generando estructuras en forma de “ochos”. (reproducido de K. Ito, *Polym. J.*, 2007, 39, 489–499) **b)** Demostración de las propiedades mecánicas extraordinarias mostradas por los polímeros SR. (reproducido de A. Bin Imran, K. Esaki, H. Gotoh, T. Seki, K. Ito, Y. Sakai and Y. Takeoka, *Nat. Commun.*, 2014, 5, 5124)

Incluso, se han diseñado algunos hidrogeles basados en polímeros SR que responden a una variedad de estímulos como pueden ser la temperatura, la presión (Katsuno *et al.*, 2013), la luz (Sakai *et al.*, 2007) o con propiedades autoregenerativas (Nakahata *et al.*, 2016). Es tal el potencial de los SR, que su creador en 2005 fundó una empresa en base a esta tecnología, *Advanced Softmaterials Inc* (ASM), dedicada a la venta y desarrollo de materiales de propiedades avanzadas.

Como ya se ha comentado, a pesar de su gran potencial, el mayor interés generado por los SR se ha centrado en estudiar y comprender sus propiedades reológicas. Sin embargo, no se encuentra ninguna aplicación en el campo de biosensado.

1.3 HIDROGELES DE PSEUDOPOLIROTAXANO BASADOS EN CICLODEXTRINAS

1.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS CICLODEXTRINAS

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos con enlaces alfa-1,4 entre las unidades de glucopiranosas en forma de cono cuya estructura consiste en un exterior hidrofílico y una cavidad hidrófoba que permite la formación de complejos de inclusión con ciertos compuestos. Esta conformación se debe a la orientación de los grupos hidroxilo (-OH) que provienen de las unidades de glucopiranosas. Los grupos OH primarios se encuentran en la parte más estrecha de la ciclodextrina mientras que los secundarios se encuentran en la parte más ancha. (Liu *et al.*, 2021) (Domiński *et al.*, 2019)

Las CDs más comunes son α -CD, β -CD y γ -CD, que están compuestas por seis, siete y ocho unidades de D-glucopiranosas, respectivamente. Teniendo en cuenta que la α -CD presenta una cavidad relativamente pequeña y la γ -CD tiene alto coste de producción, la β -CD parece ser la mejor opción gracias a su cavidad de mayor tamaño y su bajo coste de producción. (Zhang *et al.*, 2018)

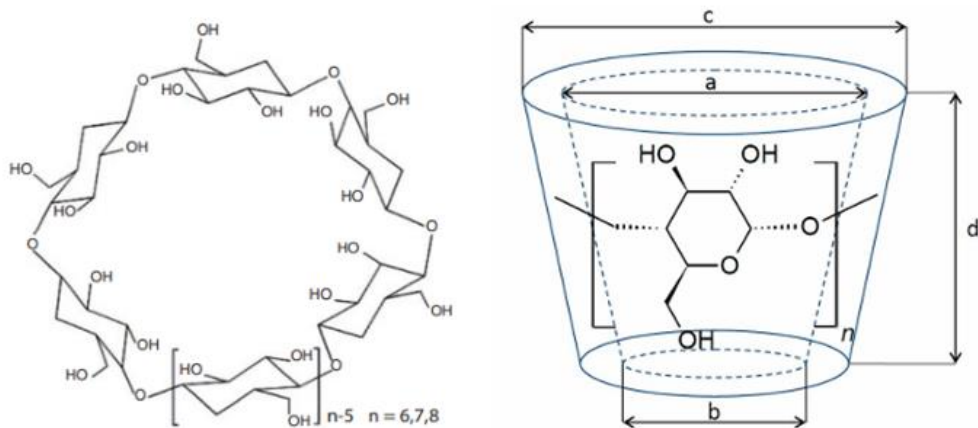


Figura 6. Estructura molecular de la ciclodextrina y sus dimensiones geométricas. (Huang *et al.*, 2014)

Las ciclodextrinas (CDs) son materiales biocompatibles, degradables y no tóxicos. Su cavidad central es capaz de cargar moléculas hidrófobas mediante interacciones débiles como fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Esta capacidad se aprovecha sobre todo en aplicaciones relacionadas con la liberación controlada de fármacos y el transporte de moléculas hidrofóbicas.

Durante la fabricación del hidrogel, las ciclodextrinas se incorporan en cadenas lineales poliméricas. La inclusión de CDs en la estructura de los hidrogeles ha demostrado mejorar las propiedades mecánicas de los hidrogeles, mejorando su flexibilidad. (Liu *et al.*, 2021)

Además, en este trabajo se pretende emplear estas ciclodextrinas con el objetivo de mejorar la movilidad del bioreceptor que se encargará de reconocer el analito diana, pudiendo así incrementar

la sensibilidad del biosensor. Para ello, se plantea la unión covalente de la proteína BSA, que actuará como biorreceptor, a la CD, para después utilizarla en la formación de un pseudopolirotaxano que al polimerizar dará lugar al hidrogel. Se ha seleccionado como sistema modelo la interacción entre BSA y su anticuerpo específico anti-BSA porque es un sistema ampliamente trabajado en el grupo de investigación, del cual se poseen numerosos datos, y permite realizar mejoras comparativas.

1.3.2 FORMACIÓN DEL PSEUDOPOLIROTAXANO.

Los hidrogeles supramoleculares presentan una estructura y una serie de propiedades gracias a que están constituidos por interacciones físicas no covalentes. Este tipo de enlaces son los enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones *host-guest*, enlaces iónicos y fuerzas de Van der Waals. Al tratarse de enlaces no covalentes, el hidrogel adopta una serie de ventajas como la reversibilidad y la dinamicidad de su estructura, siendo capaz de volver a formar los enlaces una vez sean destruidos por un estrés del entorno. (Domiński *et al.*, 2019)

La síntesis de hidrogeles supramoleculares se puede llevar a cabo mediante dos mecanismos principalmente: la formación de complejos de inclusión entre las ciclodextrinas y pequeñas moléculas o mediante la introducción de cadenas poliméricas lineales en las cavidades de las ciclodextrinas dando lugar a lo que se conoce como pseudopolirotaxano (PPR).

A diferencia del polirotaxano convencional, en el cual las moléculas ensartadas (cavitandos) quedan retenidas debido a la presencia de especies químicas voluminosas a los extremos de la cadena polimérica, el pseudopolirotaxano carece de estas moléculas a los extremos y es por ello por lo que los cavitandos pueden desenhebrarse con relativa facilidad ante ciertas condiciones. (Domiński *et al.*, 2019).

En general, los pseudopolirotaxanos están basados en α -CD o β -CD y homopolímeros o copolímeros de polietilenglicol (PEG), polietilenoóxido (PEO) y polipropilenoóxido (PPO).

La formación del pseudopolirotaxano ocurre gracias a dos etapas principales. En primer lugar, las interacciones *host-guest* permiten que la cadena polimérica penetre en las cavidades de las ciclodextrinas. Posteriormente, las ciclodextrinas cercanas forman enlaces de hidrógeno entre sí y se agrupan en complejos cristalinos. Gracias a estos complejos, que actúan como puntos de unión o "nudos", la red polimérica se estabiliza. (Huang *et al.*, 2014)

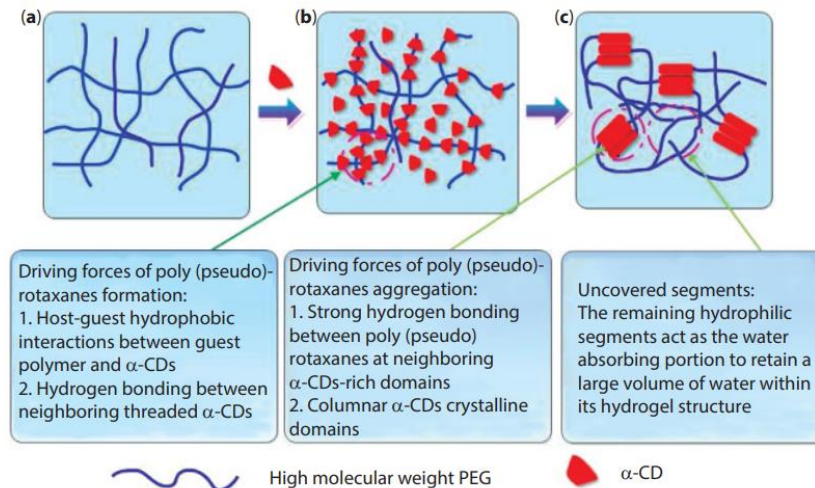


Figura 7. Formación de los geles de pseudopolirrotaxano con α -ciclodextrinas y PEG de alto peso molecular. En la imagen (a) se observa la solución acuosa de PEG; en la imagen (b) se adicionan las α -ciclodextrinas que se ensartan al PEG para formar el pseudopolirrotaxano; (c) la agregación de los pseudopolirrotaxanos y los segmentos hidrofílicos de PEG que dan la estructura del hidrogel. (Huang *et al.*, 2014)

Los hidrogeles de pseudopolirrotaxanos basados en ciclodextrinas son realmente interesantes en el campo de los biosensores gracias a que han demostrado mejorar las propiedades mecánicas estándar de los hidrogeles. Este hecho permite ajustar la robustez de la red tridimensional que conforma los hidrogeles, haciéndolos más flexibles y capaces de alcanzar un mayor grado de hinchamiento, que a su vez es interesante para mejorar la sensibilidad y favorecer la transducción de señales en el biosensado. (Liu *et al.*, 2021) (Domiński *et al.*, 2019). Además, la simplicidad técnica de su síntesis facilita el proceso de escalado en futuras aplicaciones prácticas. (Huang *et al.*, 2014)

Por todo ello, en este trabajo se propone la optimización de hidrogeles holográficos basados en pseudopolirrotaxanos modificados con proteína BSA y su estudio de prestaciones.

En este contexto, esta investigación se centrará en poner a punto un biosensor óptico sin marcaje (*label-free*) basado en hidrogeles holográfico. Estos hidrogeles serán sintetizados de manera que contengan la biomolécula de reconocimiento que se unirá al analito de interés. Como se ha comentado anteriormente, trabajaremos con un sistema modelo que comprende la BSA como elemento de bioreconocimiento de anticuerpos anti-BSA.

Hasta el momento, en el grupo de investigación en el cual se enmarca este trabajo, se ha trabajado con hidrogeles que presentaban la BSA unida covalentemente a las cadenas poliméricas. Sin embargo, este enfoque muestra una limitación significativa: la reducida movilidad de la BSA dentro de la estructura del hidrogel, lo que resulta en una pérdida de sensibilidad durante el biosensado.

Para brindar una solución, se plantea una alternativa en la que la BSA se conjuga a las β -ciclodextrinas que se ensartan en el pseudopolirrotaxano. Partiendo de este enfoque, se conseguiría aumentar la movilidad del elemento de bioreconocimiento (BSA) a lo largo de la cadena de polietilenglicol, facilitando la detección de la anti-BSA y, en consecuencia, mejorando la sensibilidad del biosensor. Para confirmar este incremento en la sensibilidad, se estudiará la capacidad de biodetección mediante ensayos de fluorescencia.

Además, el uso de pseudopoliotaxanos permite sintetizar hidrogeles con unas mejores propiedades mecánicas, como mayor plasticidad y resistencia, con respecto a los hidrogeles convencionales. Para confirmar experimentalmente estas mejoras, se llevará a cabo una caracterización mecánica de los hidrogeles.

2. OBJETIVOS.

El objetivo principal de este trabajo fin de grado es el desarrollo de hidrogeles holográficos basados en pseudopoliotaxano y funcionalizados con BSA unida a ciclodextrinas para biosensado sin marcaje. Este enfoque permitirá, potencialmente, aumentar la sensibilidad con respecto a los hidrogeles que contienen BSA unida covalentemente al poliotaxano. El sistema modelo BSA/anti-BSA será empleado a modo de interacción biológica cuya señal nos servirá para realizar una determinación cuantitativa del analito.

Para la consecución de este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Conjugación de la proteína BSA a β -ciclodextrinas.
- Síntesis de hidrogeles con pseudopoliotaxano que contiene BSA conjugada a ciclodextrinas.
- Caracterización estructural y mecánica de los hidrogeles sintetizados.
- Estudio de la capacidad de biosensado y análisis de la especificidad y sensibilidad de los hidrogeles frente a anti-BSA, realizando ensayos de fluorescencia.
- Fabricación de redes de relieve de superficie (SRGs) mediante réplica *molding* y su optimización en hidrogeles.
- Fabricación de VHGs en *films* de hidrogel.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 MATERIALES.

La albúmina de suero bovino liofilizada en polvo (BSA), la acrilamida (AAm), el dimetilsulfóxido (DMSO), el éster N-hidroxisuccinimida de ácido 4-maleimidobutírico (GMBS), el fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio (LAP), el Tween 20, la β -ciclodextrina, el polietilenglicol (PEG₂₀₀₀₀), la trietanolamina (TEA) y la tetrametiletilediamina (TEMED) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). La N-N'-metilenbisacrilamida (MBA) se obtuvo de la casa comercial Merck (Madrid, España) y el glicerol se adquirió en Scharlab (Barcelona, España). El persulfato de potasio (KPS), el fluoróforo Alexa-647 y los anticuerpos anti-BSA y de cabra anti-conejo marcado con Alexa-647 se adquirieron de ThermoFisher Scientific (Madrid, España). El anticuerpo anti-BSA se modificó previamente en el grupo de investigación con Alexa-647 siguiendo las indicaciones del fabricante

para conseguir el anticuerpo marcado anti-BSA-Alexa₆₄₇. La β -CD-AAm fue previamente sintetizada por un integrante del grupo de investigación. El polidimetilsiloxano (PDMS) fue adquirido de Dow Corning (Wiesbaden, Alemania). En cuanto a los másteres de PET, se obtuvieron gracias a una colaboración con Fraunhofer IWS (Dresden, Alemania) y se fabricaron empleando la técnica DLIP. La lámpara de luz ultravioleta se adquirió de Jelight Company Inc. (Irvine, Estados Unidos). Las soluciones tampón empleadas fueron: PBS1X (cloruro sódico 137 mM, fosfato monopotásico 0,002 M, fosfato disódico 0,008 M, cloruro potásico 2,7 mM, pH 7,4) y PBS-T (PBS1X con Tween20 al 0,05%). Todas las sales se obtuvieron de Scharlau (Barcelona, España). En ambos casos, las soluciones tampón fueron filtradas mediante dos filtros hidrofílicos de jeringa que contenían poros de 0,22 μ m de diámetro, adquiridos de GE Whatman (Madrid, España).

3.2 MÉTODOS.

3.2.1 MODIFICACIÓN DE BSA CON CICLODEXTRINA MEDIANTE LINKER BIFUNCIONAL GMBS.

Para obtener la BSA conjugada a ciclodextrinas, primero se pesaron 125 mg de BSA que fueron disueltos en 12,5 mL de PBS1X. Por otro lado, se pesaron 40 mg de GMBS y se disolvieron en 2 mL de DMSO. Posteriormente, 1,58 mL de la disolución de GMBS se añadieron a la disolución de BSA. La disolución resultante se agitó durante 2h a temperatura ambiente. Por otro lado, se preparó una disolución de CD tiolada (200 mg) en 10 mL de PBS1X. Una vez transcurrido el tiempo de agitación de la disolución de BSA y GMBS, se le añadieron 3,25 mL de la disolución de CD tiolada. La mezcla se mantuvo en agitación durante 16h a temperatura ambiente. Después, la disolución fue filtrada mediante centrifugación en un tubo Falcon con filtro de 30kDa. Se centrifugó a 4200 rpm durante 15 minutos en una centrífuga Mixtasel-BLT. Finalmente, se lavó la muestra mediante tres lavados consecutivos con 10 mL de PBS1X usando el mismo sistema de filtración/centrífuga y se concentró hasta obtener aproximadamente 1,5 mL de disolución de BSA modificada en PBS1X.

Una vez transformada la BSA, se determinó la concentración de proteína mediante espectroscopía UV con el equipo Nanodrop 2000. Para ello se hizo uso de una dilución 1:100 y se repitió la medida en tres ocasiones. Además, se tomó una alícuota que fue enviada a la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid para su caracterización mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

3.2.2 SÍNTESIS DE PSEUDOPOLIROTAXANO

Dentro de un vial, se pesaron 250 mg de β -CD-AAm y 50 mg de polietilenglicol diacrilato (PEG_{20000Da}) para posteriormente añadir 10 mL de agua destilada y 38,1 μ L de BSA conjugada a β -ciclodextrina a 78,75 mg/mL. Finalmente, la mezcla se mantuvo en agitación magnética durante 72h a una temperatura de 4°C.

3.2.3 SÍNTESIS DEL NEGATIVO DE PDMS A PARTIR DE MÁSTER PET

En primer lugar, se preparó una mezcla de 150 mg de PDMS y 15 mg de iniciador que se homogeneizó durante 5 minutos. A continuación, se introdujo el máster PET-DLIP en una pequeña caja cuadrada de 3 cm altura x 3 cm anchura que nos sirvió para hacer el molde negativo. Se vertió PDMS sobre la cara del máster que contiene el *grating* grabado hasta alcanzar unos 2 mm de espesor. Después, se llevó a vacío durante 15 minutos y se introdujo en la estufa a 60°C *overnight*. Una vez transcurrido el tiempo, se desmoldó cuidadosamente el PDMS y se cortó la zona del *grating* replicado en cuatro fragmentos cuadrados. Por último, cada fragmento fue adherido con 2 µL de pegamento en la base de un vial de 2 cm de diámetro. De esta manera, se obtuvieron cuatro viales molde que fueron usados durante la síntesis de los hidrogeles. Durante este proceso, se trabajó con dos másteres PET con un mismo periodo (3 µm) pero distinta profundidad de almenas, uno con una profundidad baja (3.1.L) y el otro con una profundidad alta (3.1.H), respectivamente.

3.2.4 SÍNTESIS DE HIDROGELES EN FORMA DE SRGs

Para fabricar SRGs mediante la técnica de réplica *molding*, se sintetizaron dos tipos de hidrogeles en base al tipo de iniciador empleado.

Por un lado, se fabricaron hidrogeles mediante activación fotoquímica. Para ello, se pesaron 900 mg de acrilamida y 4 mg del fotoiniciador fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio(LAP) en un vial. Después, se añadieron 3 mL de agua destilada y se dejó la mezcla en agitación magnética durante 15 minutos y en ausencia de luz. A continuación, se adicionó 1mL del pseudopolirrotaxano preparado previamente y se agitó durante 15 minutos adicionales. Posteriormente, se pipetearon 1,4 mL de la mezcla de monómeros a cada uno de los viales con molde de PDMS. Después de esto, los viales se sometieron a vacío hasta eliminar las burbujas de aire durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, los viales fueron irradiados con una lámpara de luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) durante 15 minutos. Finalmente, se desmoldaron los hidrogeles y se almacenaron en un vaso de precipitados sumergidos en PBS-T a 4°C.

Por otro lado, se fabricaron hidrogeles mediante activación térmica. Para ello, se pesaron 900 mg de acrilamida y 20 mg de persulfato de potasio (KPS) en un vial. A continuación, se añadieron 2 mL de agua y 1 mL de glicerol. La mezcla se agitó durante 15 minutos para después pipetear 1 mL de pseudopolirrotaxano y volver a agitar la mezcla 15 minutos adicionales. Una vez se obtuvo una mezcla homogénea, se introdujeron 1,4 mL de ella en cada vial con molde PDMS y se sometieron a vacío durante 15 minutos para confirmar la ausencia de burbujas de aire. Después, los viales se taparon y se introdujeron en una estufa a 37°C durante 4 horas. Finalmente, se retiraron los hidrogeles de cada vial y se almacenaron en un vaso de precipitados, sumergidos en PBS-T a 4°C.

Por otro lado, se hizo un estudio de distintas condiciones de reacción y fabricación que se detallarán en la discusión de resultados.

3.2.5 ANÁLISIS MEDIANTE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Con el objetivo de estudiar la microestructura de los hidrogeles y caracterizar su porosidad, se realizó un análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) en un equipo Gemini SEM500 (Zeiss, Terrassa, España). Inicialmente, los hidrogeles se sumergieron en agua destilada hasta hincharse completamente y se congelaron a una temperatura de -60°C durante una noche. Posteriormente, se liofilizaron en un liofilizador Telstar LyoQuest. A continuación, el hidrogel seco se fragmentó y se fijó sobre el portamuestras. La muestra se recubrió con una fina capa de oro y finalmente se analizó mediante SEM.

3.2.6 CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LOS HIDROGELES

El estudio de las propiedades mecánicas de cada tipo de hidrogel requirió la fabricación de hidrogeles en forma de cilindro. Para ello, se llevó a cabo la mezcla monomérica pertinente y de ella se tomaron 1,5 mL que se añadieron a un tubo eppendorf de 2 mL. Tras ello, se activó la polimerización mediante luz UV en el caso de aquellos hidrogeles con fotoiniciador fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio y, en cuanto a los hidrogeles con iniciador térmico persulfato potásico, se polimerizó en estufa a 37° . En cada caso se fabricaron tres réplicas. Una vez polimerizados los hidrogeles, se retiraron del tubo eppendorf y se mantuvieron sumergidos en PBS-T durante 3 días.

Una vez sintetizados los hidrogeles con forma cilíndrica se cortaron en porciones de 15 cm de altura y 12 cm de diámetro, y se procedió a la caracterización mecánica según un ensayo de compresión en el equipo Mecmesin Multitest 2.5-i Dynamic Mechanical Analyser (Landes Poli Ibérica S.L., Barcelona, España). El ensayo consistió en realizar 10 ciclos consecutivos de compresión y descompresión uniaxial hasta el 20%, 40%, 60% y 80% de la compresión a una velocidad de 25 mm min^{-1} y usando una célula de carga de 25 N. El módulo de Young se calculó a partir de las curvas típicas de tensión-deformación como la pendiente entre los valores de 5 % y 15 % de deformación.

3.2.7 ENSAYOS DE FLUORESCENCIA EN HIDROGELES

Para analizar la capacidad del hidrogel que contiene BSA de reconocer específicamente al anticuerpo anti-BSA, se realizó un ensayo de bioreconocimiento basado en fluorescencia. En primer lugar, los hidrogeles se cortaron en trozos de $4 \times 4 \times 2\text{ mm}$ y se colocaron en una placa ELISA no tratada. Se incubaron con $100\text{ }\mu\text{L}$ de anti-BSA-Alexa₆₄₇ y GAR-Alexa₆₄₇, respectivamente, a 1, 10, 25, 50 y 100 mg L^{-1} en PBS-T durante 4 horas en agitación orbital y ausencia de luz. Para cada concentración se llevaron a cabo tres réplicas. Se lavó cada hidrogel con $100\text{ }\mu\text{L}$ PBS-T *overnight*. Por último, se retiró el PBS-T y se midió la fluorescencia de cada hidrogel a distintos tiempos de exposición y ganancia (5s 1g, 5s 5g, 10s 1g, 10s 5g, 20s 1g, 20s 5g). Además, este ensayo se repitió a concentraciones menores de Anti-BSA (0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 y 10 mg L^{-1}) y se incluyeron mayores tiempos de exposición (30s 1g, 30s 5g, 40s 1g, 40s 5g).

La detección de la fluorescencia emitida por el fluoróforo Alexa₆₄₇ se llevó a cabo mediante un lector de fluorescencia superficial (SFR) casero equipado con una cámara CCD. Además, la cuantificación y el tratamiento de datos fue llevado a cabo mediante el software Genepix Pro 4000B.

3.2.8 FABRICACIÓN DE REDES DE VOLUMEN (VHGs) EN FILMS DE HIDROGEL

Para obtener los *films* de hidrogel, se pesaron 450 mg de acrilamida y 5 mg de KPS que se disolvieron en 1,5 mL de agua destilada y 0,5 mL de pseudopoliritaxano. Tras homogeneizar esta mezcla monomérica durante 15 minutos en un agitador magnético, se dividió en dos tubos Eppendorf con 1 mL cada uno. A continuación, se trasladaron a una vitrina de gases para añadir 4 μ L de TEMED a uno de ellos y depositar 1 mL de esta mezcla en la parte central de un portaobjetos. En el portaobjetos se habían colocado previamente dos adhesivos superpuestos en forma de marco para contener la mezcla añadida. Para completar el ensamblaje, se colocó otro portaobjetos sobre el primero y se mantuvieron unidos mediante pinzas en ambos extremos durante 40 minutos. Finalizada la polimerización, se retiraron del portamuestras y se lavaron en agua destilada *overnight*.

A. Incubación.

Al día siguiente, los *films* se cortaron en pequeños fragmentos de aproximadamente 2,5 x 2,5 cm y se dejaron secar 40 minutos a 37°C en estufa. Después, se preparó la disolución incubadora pesando 532 mg de acrilamida, 267 mg de MBA, 73,5 mg de fotoiniciador LAP que se disolvieron en 0,5 mL de trietanolamina (TEA) y 2 mL de DMSO. A continuación, se depositaron 150 μ L de disolución incubadora sobre cada trozo de hidrogel en oscuridad. Los *films* se dejaron incubando *overnight* en ausencia de luz y al día siguiente se quitó el exceso de disolución incubadora. Por último, se pegaron 4 adhesivos en los bordes laterales del portamuestras.

B. Grabado.

La irradiación de los *films* de hidrogel se llevó a cabo utilizando un sistema óptico equipado con un láser de 244 nm. Los parámetros del proceso de irradiación se configuraron para obtener una potencia de láser de 80 mW y una velocidad de barrido de 10.000 ciclos por segundo. A continuación, se colocó una máscara de fase entre la fuente láser y el hidrogel para generar un patrón de interferencia en el volumen del hidrogel.

3.2.9 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE DIFRACCIÓN MEDIANTE UN SISTEMA ÓPTICO

El sistema láser de medida empleado para la caracterización y análisis de la difracción generada se puede observar en la Figura 8. Este equipo consta de un láser cuyo haz se dirige ortogonalmente, a través de un diafragma, hacia la plataforma portamuestras. El láser puede ser de distinta longitud de onda. Sobre esta plataforma se puede colocar una placa Elisa de 96 pocillos que puede desplazarse para posicionar el pocillo analizado sobre el haz incidente. El sistema cuenta con una lente delgada biconvexa que es móvil y permite enfocar el haz si es necesario. Por otro lado, dispone de un sistema de lectura al que se pueden conectar distintos fotodiodos que registran la intensidad de los haces incidentes, transmitidos o difractados. La corriente generada se transforma en voltaje gracias a las resistencias ancladas a los fotodiodos. El voltaje de los órdenes 0, 1 y -1 se registra para posteriormente calcular la intensidad de cada orden y obtener la eficiencia de difracción para cada

hidrogel. Además, puede incorporar una pantalla en la parte superior sobre la que se proyecta la imagen del patrón de difracción generado, pudiendo registrarse mediante una cámara fotográfica.

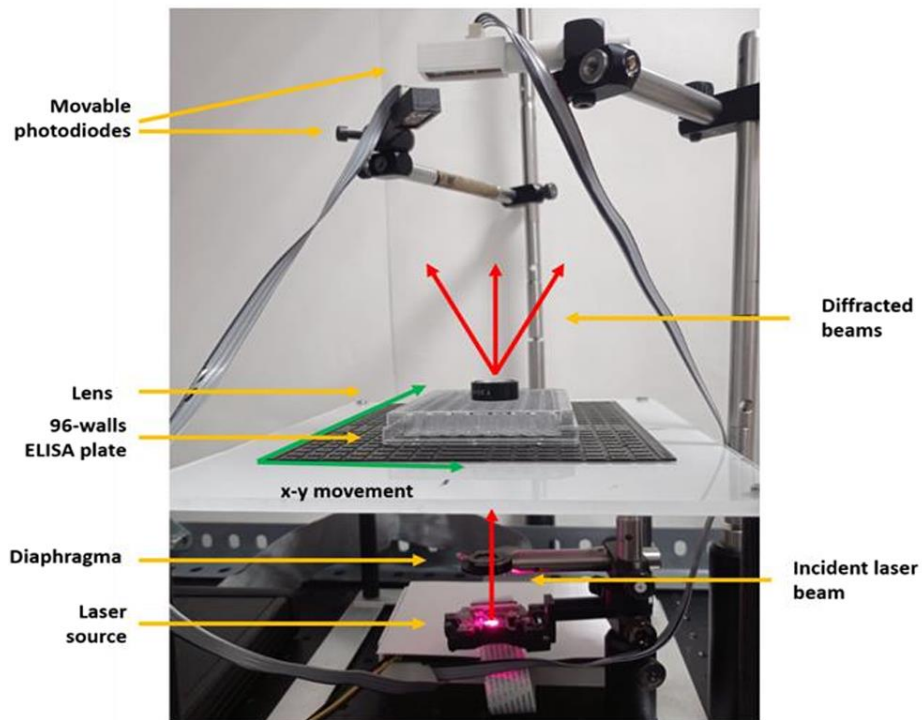


Figura 8. Sistema óptico casero empleado para la caracterización y análisis de los patrones de difracción generados por las redes de relieve de superficie en hidrogeles. (Lucío *et al.*, 2022)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANCLAJE COVALENTE DE BSA A CICLODEXTRINA (BSA-CD)

El primer paso en la síntesis de los hidrogeles diseñados consistió en unir covalentemente la proteína seleccionada como sistema modelo (albúmina de suero bovino, BSA), a las ciclodextrinas que posteriormente se ensartarán en la cadena de polietilenglicol para generar el pseudopolitaxano. Al ensartar en la cadena las unidades de CD, estas se pueden desplazar libremente a lo largo de ella, dotando de una mayor movilidad a la BSA; en comparación con otras técnicas de anclaje más convencionales. Así, para la conjugación de BSA a ciclodextrinas, en primer lugar, se preparó una disolución de BSA en PBS1X (10 mg mL^{-1}) y una disolución del *crosslinker* heterobifuncional éster N-hidroxisuccinimida de ácido 4-maleimidobutírico (GMBS) (20 mg mL^{-1}). Se mezclaron ambas disoluciones y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Por último, se preparó una tercera disolución de β -ciclodextrina modificada con grupos tiol (20 mg mL^{-1}) que se añadió a la disolución inicial de BSA y GMBS. La mezcla se mantuvo en agitación durante 16 horas y, a continuación, se purificó para eliminar la ciclodextrina no conjugada mediante filtración por centrifugación.

El éxito en la conjugación se evaluó por espectrometría de masas. El espectro obtenido por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF se muestra en la Figura 9. Con fines comparativos se analizó tanto la BSA modificada con β -CD, como una muestra de BSA sin modificar que desempeñó el papel de blanco.

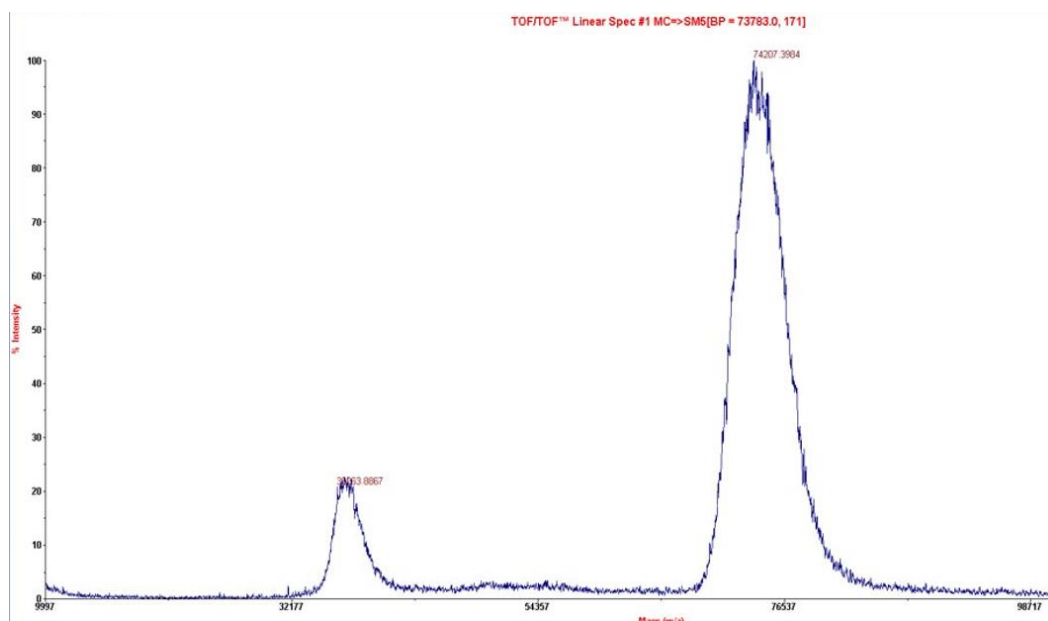


Figura 9. Análisis por espectrometría de masas de la muestra de BSA conjugada a ciclodextrinas.

La presencia de un pico de relación masa-carga de 74207,39 en el espectro de masas, nos confirmó que la modificación de la BSA con ciclodextrinas fue exitosa. Este pico mostró una apariencia ancha, pues en la muestra se hallaron múltiples formas de BSA que difieren en el número de ciclodextrinas conjugadas y, por lo tanto, en su masa.

Para calcular la relación entre los moles de ciclodextrina unida a GMBS por mol de BSA, se tomó el pico de valor 74207,39 y se calculó la diferencia con respecto del pico perteneciente al calibrado de BSA comercial cuyo valor fue de 66445. Luego, se dividió entre la masa molar de la ciclodextrina unida al *linker* GMBS. Esta operación permitió determinar que en la muestra se obtuvieron, aproximadamente, 6 moles de ciclodextrina unida a GMBS por mol de BSA. En consecuencia, se pudo confirmar que la mayoría de BSA presente en la muestra se encontraba conjugada a 6 ciclodextrinas.

Una vez que se comprobó que la transformación de la BSA fue exitosa, se determinó la concentración de proteína mediante espectroscopía UV con un equipo Nanodrop 2000. Para ello, se aprovechó el calibrado interno específico para BSA que tenía almacenado el equipo. Los resultados de las tres mediciones sobre una dilución 1:100 en PBS1X fueron 0,79 mg mL⁻¹, 0,80 mg mL⁻¹ y 0,81 mg mL⁻¹. Se promediaron estas tres concentraciones y se determinó la concentración inicial de la muestra, obteniendo finalmente una concentración de 80 mg mL⁻¹.

4.2 FABRICACIÓN DE REDES DE RELIEVE DE SUPERFICIE (SRGs) EN HIDROGELES

Los hidrogeles, en función de la aplicación a la cual irán destinados, presentarán una estructura formada por un tipo de monómero, iniciador y entrecruzante determinados. Su síntesis se puede llevar a cabo a partir de la polimerización de compuestos como la acrilamida, los alginatos o los polímeros basados en polisacáridos. En el contexto del biosensado, para la fabricación de una red de relieve de superficie (SRG), se requieren una serie de propiedades fundamentales por parte de los hidrogeles sintetizados como pueden ser la transparencia, la resistencia y reversibilidad mecánica, la porosidad y la maleabilidad.

Para la fabricación de hidrogeles con BSA móvil se partió de la BSA modificada anteriormente, y se ensartó en cadenas de polietilenglicol terminadas con grupos acrilato, además de CD modificadas con BSA (BSA-CD) se usaron también CD modificadas con grupos acrilato (β -CD-AAm). Estas últimas fueron sintetizadas con anterioridad por miembros del grupo de investigación donde se realizó este TFG. El ensamblaje de las CD a la cadena de PEG se consiguió por agitación a 4°C durante 72 h. Una vez ensartadas las CD en la cadena lineal, se polimerizó con monómeros de acrilamida mediante activación fotoquímica o térmica. En el caso de la activación fotoquímica se utilizó fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio (LAP) como fotoiniciador y se irradió con luz UV durante 15 minutos. En el caso de la activación térmica se utilizó KPS y una temperatura de 37°C durante 4 horas. El proceso global de preparación de los hidrogeles es el que se muestra en la Figura 10.

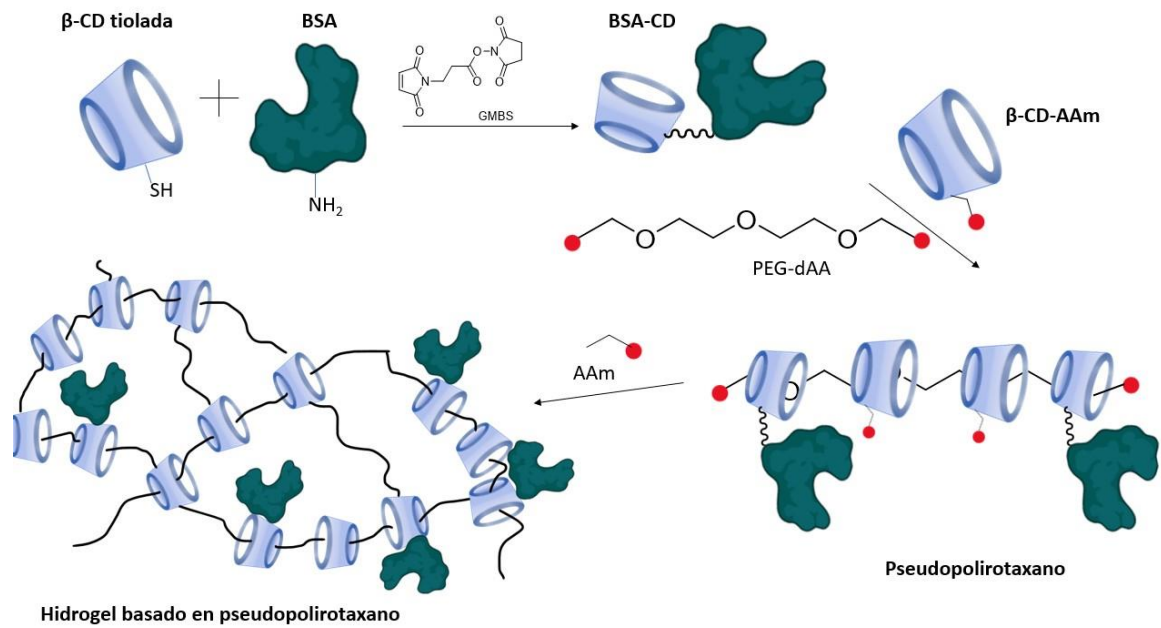


Figura 10. Esquema del proceso de modificación de BSA con ciclodextrina mediante el *linker* GMBS para obtener pseudopolirrotaxano a partir de polietilenglicol diacrilato, BSA-CD y CD-AAm. Tras la polimerización, se obtiene el hidrogel basado en pseudopolirrotaxano.

Para convertir estos hidrogeles en transductores por difracción, se planteó la fabricación con ellos de redes de relieve de superficie (SRG). Según se comentó anteriormente, la fabricación de dichas redes se llevó a cabo mediante la técnica de *replica molding* (Figura 11).

La composición de la mezcla de síntesis consistió en acrilamida como monómero, LAP o KPS como iniciador, agua destilada y pseudopolirrotaxano. El pseudopolirrotaxano integró en su estructura tanto β-CD-AAm como BSA-CD ensartados en una cadena lineal de polietilenglicol diacrilato. La presencia de BSA conjugada a ciclodextrinas, dota a la BSA de una movilidad aumentada con respecto a los hidrogeles que presentan la BSA anclada covalentemente a la red polimérica. Al ser la BSA la molécula que actúa como biorreceptor, si se permite su libre movimiento, se podrá aumentar su capacidad de reconocer específicamente al analito de interés (en nuestro caso, la anti-BSA) mejorando así la sensibilidad y eficacia del biosensor.

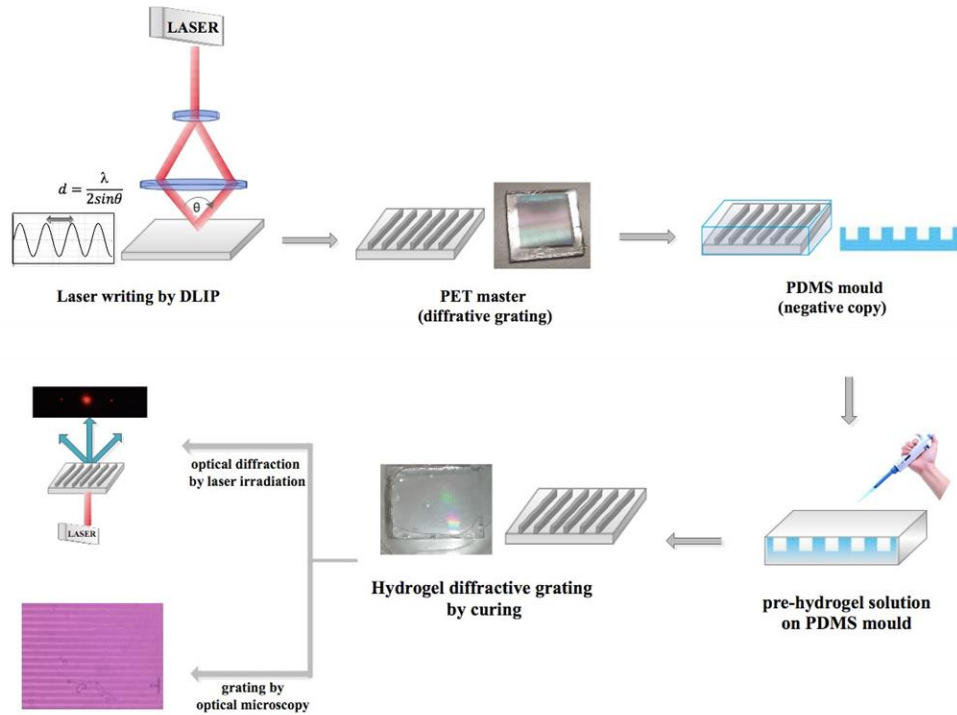


Figura 11. Esquema de la técnica de *replica molding* mediante la cual se obtuvieron los hidrogeles con SRGs en este trabajo. A partir de un máster PET, en el que se ha grabado un *grating* mediante una técnica holográfica DLIP, se generó un molde negativo de PDMS. Posteriormente, este molde se utilizó para depositar sobre él la mezcla de síntesis y que esta se integre en las almenas del *grating*. Después de esto, se activó la polimerización para generar los hidrogeles con la red de difracción original del máster PET. (Zezza *et al.*, 2022)

La mezcla de síntesis mencionada fue distribuida en varios viales con moldes de PDMS para, posteriormente, someterlos a vacío con el objetivo de eliminar las burbujas de aire y favorecer que los canales de la red de PDMS se llenen de la mezcla prepolimérica. La presencia de burbujas de aire puede afectar negativamente a la homogeneidad de la estructura polimérica, creando irregularidades en los patrones de difracción.

Una vez eliminadas las burbujas de aire, los viales fueron irradiados con luz UV para activar el mecanismo de polimerización del fotoiniciador fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio. Su mecanismo de acción, en presencia de luz UV, implica su descomposición para generar radicales libres fosfinato y fenilo que son altamente reactivos y activan la propagación radicalaria. En este proceso de polimerización, se generaron cadenas de poli(acrilamida), así como copolimerizaciones entre la acrilamida y el pseudopolitaxano. Terminada la polimerización, los hidrogeles fueron sumergidos en PBS-T para lavar los monómeros y residuos restantes de la reacción. El PBS-T fue elegido como tampón de lavado para los hidrogeles ya que mantiene un entorno similar a las condiciones fisiológicas y, además, evita uniones inespecíficas.

Los hidrogeles sintetizados, como el que se puede observar en la Figura 12, presentaron una estructura homogénea, transparente y suave.

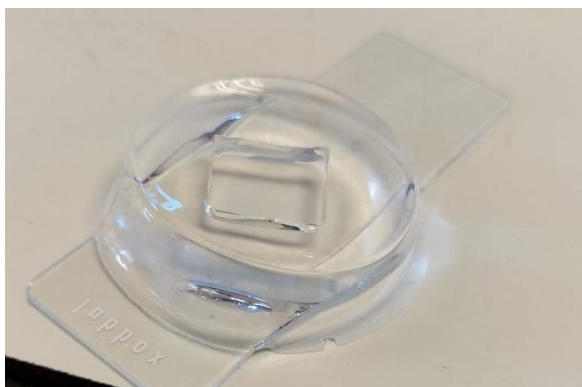


Figura 12. Hidrogel sintetizado mediante polimerización con luz UV, donde se puede apreciar su alta transparencia óptica.

Los bordes del polímero, que no habían estado en contacto con el molde de PDMS y, por tanto, no tenían la red de difracción, se cortaron en fragmentos cuadrados de 4 x 4 x 2 mm y se emplearon para los ensayos de fluorescencia que se detallan más adelante. La parte central del hidrogel en la que se había replicado la red se utilizó para analizar la calidad del patrón de difracción generado. Para ello se empleó el sistema óptico de fabricación casera mostrado en la Figura 8.

No obstante, aunque la fabricación de SRG sobre el hidrogel parecía satisfactoria no se observó el patrón de difracción esperado.

Se analizó el PDMS empleado como molde y, en el mismo, sí que se pudo apreciar el patrón de difracción replicado, por lo que se concluyó que durante la polimerización en las condiciones ensayadas, no se había replicado la red. En consecuencia, a partir de la composición inicial empleada para la síntesis, se exploraron distintas condiciones en el proceso de fabricación de SRGs sobre el hidrogel con el propósito de optimizar la replicación.

Inicialmente, se aumentó el tiempo de agitación de la mezcla de síntesis de 15 minutos a 30 minutos para asegurar una correcta homogeneización de sus componentes. Por otro lado, se decidió llevar a cabo dos experimentos adicionales: el primero consistió en duplicar el tiempo de vacío a 30 minutos mientras que el segundo consistió en centrifugar la mezcla de síntesis sobre el molde PDMS adherido a un tubo Falcon. En ambos experimentos se pretendía favorecer la entrada de la mezcla monomérica en las almenas del *grating* de PDMS. Sin embargo, ninguna de estas opciones resultó en un grabado favorable.

El PDMS es un tipo de polímero bastante hidrofóbico y es por ello por lo que se decidió dar un enfoque distinto basado en la activación del molde PDMS para aumentar su hidrofilia. Para llevar a cabo esta activación se hizo uso del equipo de limpieza de superficies con plasma *Harrick Plasma High Power Plasma Cleaner*. Utilizando este equipo, se propuso un tratamiento con plasma de aire sobre varios moldes PDMS y, análogamente, un tratamiento con plasma de argón sobre otros moldes. Estos tratamientos con plasma produjeron una oxidación en las cadenas del polidimetilsiloxano, generando grupos hidroxilo en su superficie y aumentando así su hidrofilia.

Además, se estudió otra opción en la cual se llevaba a cabo un tratamiento del molde PDMS con ácido sulfúrico 1M durante 5 minutos para, posteriormente, someterlo a plasma de aire durante 1 minuto. Estas condiciones fueron seleccionadas como las óptimas según un análisis de ángulo de contacto hecho por una integrante del grupo de investigación. No obstante, no se consiguió obtener SRGs aceptables en ninguno de los casos ensayados.

El hecho de que estas variaciones en el modo de fabricación del SRG no fueran fructíferas, hizo que se reflexionara sobre posibles cambios en la composición usada hasta el momento.

En un primer momento, se incorporó Tween-20 al 1% a la mezcla de síntesis. Este compuesto es un agente surfactante que reduce la tensión superficial y promueve la entrada de la mezcla monomérica en las pequeñas ranuras del *grating* de PDMS. Los hidrogeles sintetizados con este compuesto demostraron una viscosidad incrementada pero tampoco consiguieron grabar la SRG.

Como se ha comentado previamente en el trabajo, el grado de entrecruzamiento o *cross-linking* es fundamental a la hora de modificar la estructura del hidrogel. Al aumentar la relación entrecruzante-monomero se obtendrá una estructura más compacta y robusta. En los hidrogeles, es necesario contar con un cierto grado de entrecruzamiento para retener la SRG en su estructura.

En consecuencia, se planteó otro experimento en el cual se reducía a la mitad el volumen empleado en la mezcla de síntesis, pasando a 1,5 mL de agua destilada y 0,5 mL de pseudopolirotaxano. De esta forma, se sintetizaron hidrogeles con una concentración duplicada de acrilamida (450 mg mL^{-1}) con respecto a los hidrogeles estándar (225 mg mL^{-1}). A pesar de que, al aumentar la concentración del monómero, se obtuvo una estructura más estable, no fue efectivo a la hora de replicar la SRG sobre el hidrogel.

Por otro lado, se planteó la adición de metilbisacrilamida (MBA) como agente entrecruzante, ya que previamente había sido empleado en otro tipo de hidrogeles que demostraban una difracción eficaz. Este compuesto aumentó la rigidez del hidrogel y disminuyó su flexibilidad al formar enlaces covalentes entre sus cadenas poliméricas. El fundamento de su aplicación se basó en la mayor capacidad de retención de redes de difracción por parte de los hidrogeles más robustos. A pesar de esto, no se consiguió fabricar la red de difracción de relieve en superficie que se esperaba y, además, la pérdida de las excepcionales propiedades mecánicas observadas hasta el momento provocó que esta opción fuera descartada.

Por último, se planteó un cambio del fotoiniciador de la polimerización usado hasta el momento (fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio) y la activación catalizada por luz a un iniciador térmico, persulfato de potasio (KPS), y por tanto una activación de la polimerización por temperatura. Es conocido que el modo de activación afecta a las propiedades finales del polímero obtenido.

Tras tratar de replicar la red con estas condiciones, se observó que, una vez sintetizados los hidrogeles, al retirarlos del vial, la polimerización había ocurrido mayoritariamente en los extremos y, en el centro donde se encontraba el molde de PDMS adherido, no se había producido polimerización. Este problema se solucionó añadiendo glicerol a la mezcla de síntesis. Al ser un disolvente polar consiguió mejorar la solubilidad de los monómeros dando lugar a una dispersión más uniforme a lo largo de la mezcla que, a su vez, permitió obtener una estructura mucho más homogénea en el hidrogel.

En este último experimento, la fabricación de la red de relieve en superficie se replicó con éxito a partir del molde PDMS. El patrón de difracción obtenido se muestra en la Figura 13.

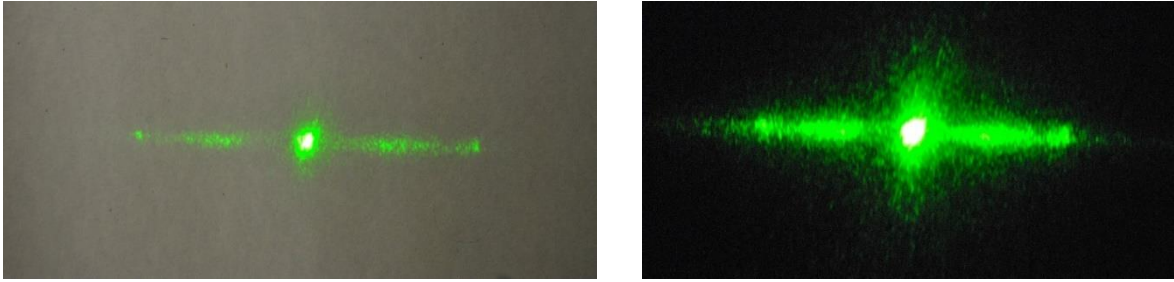


Figura 13. Patrón de difracción resultante de hacer incidir un láser en el *grating* de los hidrogeles fabricados con KPS y glicerol en presencia de luz (izquierda) y ausencia de luz (derecha).

En la Figura 13, se demuestra que los hidrogeles polimerizados con KPS y glicerol fueron capaces de replicar el *grating* en forma de red de relieve en superficie (SRG) obteniendo finalmente, un patrón de difracción. Como se puede observar, el patrón de difracción se caracteriza por un orden 0 central y, equidistantes a este, dos órdenes -1 y 1, respectivamente. Aun así, el patrón de difracción que se aprecia no está perfectamente definido, probablemente debido a irregularidades en la superficie del hidrogel que provocan el fenómeno de dispersión o “*scattering*” de la luz. Esto indica que, aunque estas condiciones permiten generar la red, la calidad de esta debería ser mejorada para poder utilizarse en medidas de biosensado, donde el cambio en la relación de intensidades entre el orden 0 y el 1 debe registrarse con la mayor precisión posible.

Si bien, dada la duración de este trabajo, no se pudieron ensayar más condiciones de optimización, se decidió ensayar otra vía de generación de redes, en este caso, redes holográficas de volumen (VHG) que se detallan más adelante.

En paralelo a las pruebas de replicación de redes de relieve de superficie, se realizó la caracterización estructural, mecánica y de capacidad de biorreconocimiento específico de los hidrogeles fabricados. Para la caracterización estructural se empleó la técnica de microscopía electrónica de barrido, y en el caso de la caracterización mecánica se realizaron pruebas de compresión con un equipo Mecmesin Multitest 2.5-i Dynamic Mechanical Analyser. Para evaluar la capacidad de reconocer específicamente al anticuerpo anti-BSA por parte de la BSA presente en el hidrogel se empleó la técnica de fluorescencia, usando anticuerpos marcados con el fluoróforo Alexa-647. A continuación, se detallan todos estos estudios.

4.3 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Para evaluar la porosidad y homogeneidad en la estructura del hidrogel, se empleó la técnica de microscopía electrónica de barrido, para ello se hizo uso de muestras liofilizadas. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 14 y el equipo empleado se muestra en la Figura 15.

Tal y como se puede apreciar en la Figura 14, la microestructura del hidrogel presenta una elevada porosidad. Esta característica favorece la difusión del analito de interés hacia el interior del hidrogel. La mayoría de los poros que podemos observar son de gran tamaño (100 μm) y se encuentran distribuidos a lo largo de toda la estructura polimérica. La muestra se tomó de hidrogeles cuya polimerización se llevó a cabo fotoquímicamente mediante luz UV. Este mecanismo presenta importantes ventajas como la alta velocidad de polimerización. No obstante, una desventaja que se

ha analizado en diversos estudios es que afecta negativamente a la homogeneidad de los hidrogeles. (Contessi Negrini *et al.*, 2021) (Lim *et al.*, 2019) (Zezza *et al.*, 2023)

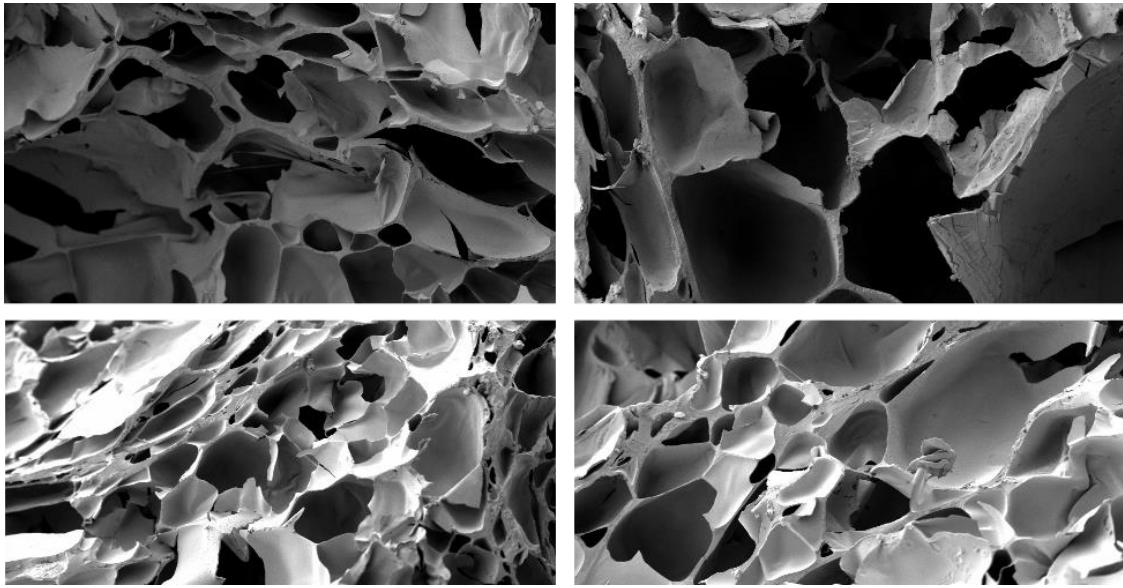


Figura 14. Fotografías tomadas del interior de un hidrogel sintetizado con activación fotoquímica con un microscopio electrónico de barrido (SEM)

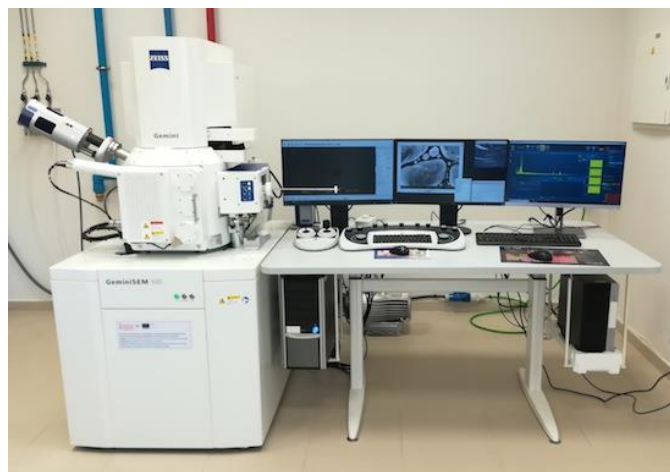


Figura 15. Microscopio electrónico de barrido. Modelo GeminiSEM 500. (Universidad Politécnica de Valencia)

4.4 CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LOS HIDROGELES

Para llevar a cabo la caracterización mecánica de los hidrogeles, se sintetizaron hidrogeles en forma cilíndrica mediante activación fotoquímica con fotoiniciador LAP e hidrogeles térmicamente activados con KPS y se cortaron en porciones de 15 cm de altura y 12 cm de diámetro. Posteriormente, cada tipo de hidrogel se sometió a un ensayo de compresión-relajación uniaxial de 10 ciclos consecutivos alcanzando el 20%, 40%, 60% y 80% de deformación.

Los resultados se muestran en la Figura 16. En referencia a ellos, podemos deducir que todos los hidrogeles analizados vuelven a su estado inicial tras ser sometidos hasta a 10 ciclos de compresión-relajación. Ambos tipos de hidrogel integran pseudopoliritaxano en su estructura, y por ello, han demostrado una elevada elasticidad y plasticidad. Además, el hecho de que no lleguen a romperse pone de manifiesto que poseen una gran tenacidad. Por otro lado, los hidrogeles no muestran histéresis cuando son comprimidos al 20 % y 40 % de deformación. No obstante, cuando se alcanza el 60 % y 80% de deformación, las curvas de carga y descarga no se superponen perfectamente mostrando una histéresis evidente, siendo más acusada en el caso de los hidrogeles fabricados mediante activación térmica.

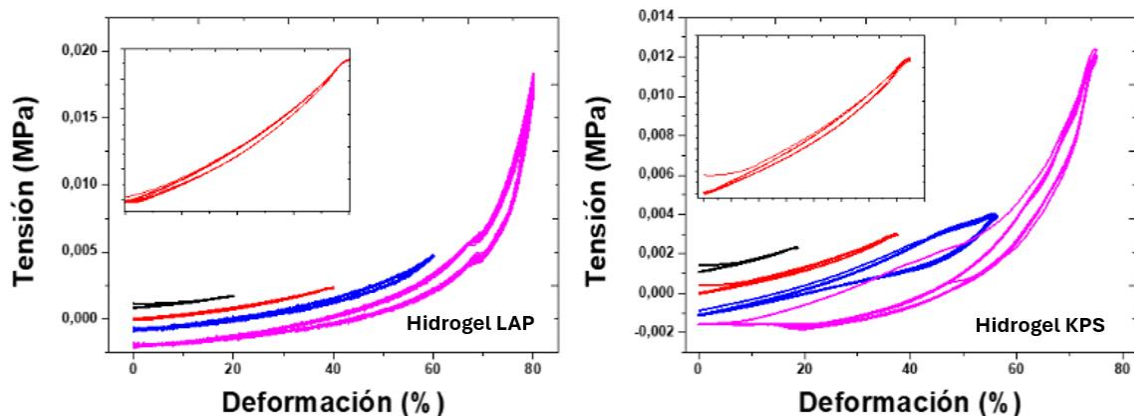


Figura 16. Curvas de tensión-deformación de 10 ciclos consecutivos de compresión-relajación para los hidrogeles sintetizados con activación fotoquímica (LAP, izquierda) y térmica (KPS, derecha) en PBS-T. Las curvas con diferente deformación final se representan en diferentes colores. Además, las curvas se han desplazado para mejorar la claridad. Los recuadros muestran la curva a 40 % de deformación.

Los hidrogeles sintetizados mediante activación fotoquímica (LAP, izquierda) muestran un Módulo de Young de 4,25 kilopascales, mientras que los hidrogeles sintetizados mediante activación térmica (KPS, derecha) muestran un Módulo de Young de 6 kilopascales. Los valores son bajos y similares (del mismo orden de magnitud), lo que corrobora la gran plasticidad y flexibilidad que presentan ambos tipos de hidrogel. Estas características son fundamentales teniendo en cuenta que las propiedades mecánicas son el principal factor limitante a la hora de emplear hidrogeles en diversas aplicaciones.

Cabe destacar que los Módulos de Young están en el mismo orden de magnitud que los que se encuentran en la piel humana (5-10 kPa), confirmando así su potencial para el desarrollo de futuras aplicaciones médicas relacionadas con el formato de apósitos. (Liu *et al.*, 2015)

4.5 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO ESPECÍFICO DE ANTI-BSA MEDIANTE ENSAYOS DE FLUORESCENCIA

Los hidrogeles, gracias a su estructura porosa y suave, así como por la elevada proporción de agua que albergan en su interior en estado hidratado, crean un entorno de condiciones fisiológicas muy favorables para inmovilizar biomoléculas en su interior y que mantengan su capacidad de biorreconocimiento específico. En este caso, al incorporar BSA en la composición del hidrogel, es crucial confirmar su estabilidad y funcionalidad. Así, aseguraremos que se encuentre funcional, que conserve su conformación nativa y sea capaz de reconocer específicamente al analito de interés, concretamente, el anti-BSA.

Por ello, se llevó a cabo un ensayo mediante detección fluorescente utilizando reactivos marcados con un fluoróforo (Alexa₆₄₇) que nos permitió analizar la capacidad de reconocimiento específico de anti-BSA por parte de la BSA incluida en el hidrogel. Así, los hidrogeles fueron cortados en fragmentos de 4 x 4 x 2 mm y posteriormente incubados en 100 µL de una disolución que contenía anti-BSA-Alexa₆₄₇ en PBS-T. Como control negativo, para evaluar la interacción no específica, se empleó un anticuerpo anti-IgG de conejo producido en cabra, también marcado con fluoróforo (goat anti-rabbit, GAR-Alexa₆₄₇). Se emplearon concentraciones crecientes de ambos anticuerpos en un intervalo entre 0 y 100 mg L⁻¹.

En cuanto a la medición de la fluorescencia, se llevó a cabo mediante un lector de fluorescencia de superficie casero acoplado a una cámara CCD (Mira *et al.*, 2004). Las imágenes obtenidas a través de este fueron tratadas mediante el programa Genepix Pro 4000B para cuantificar la intensidad de fluorescencia.

Se tomaron imágenes a distintos tiempos de exposición y ganancia. En los ensayos de fluorescencia, estos dos parámetros son muy importantes ya que afectan a la captura y a la calidad de las imágenes. El tiempo de exposición es el período de tiempo durante el cual la cámara CCD se encuentra recolectando fotones emitidos por la muestra fluorescente. Por ello, a mayor tiempo de exposición, la cámara recolectará una mayor cantidad de fotones y esto resulta en una mayor intensidad de señal. En cuanto a la ganancia, esta es un factor de amplificación que se aplica a la señal recibida por la cámara. Si la ganancia aumenta, también se incrementará la señal fluorescente captada, así como el ruido de fondo.

Por lo tanto, es fundamental la optimización del tiempo de exposición, así como de la ganancia aplicada para obtener una relación señal/ruido adecuada que permita un análisis preciso de la fluorescencia emitida por los hidrogeles.

En el primer ensayo de fluorescencia, se estudió la intensidad de fluorescencia con respecto a concentraciones crecientes de anti-BSA y GAR a 1, 10, 25, 50 y 100 mg L⁻¹. Los datos fueron tratados para distintos tiempos de exposición y ganancia (5s 1g, 5s 5g, 10s 1g, 10s 5g, 20s 1g y 20s 5g). El análisis se realizó haciendo uso de 3 réplicas para cada concentración, permitiendo calcular una

señal de fluorescencia media. En cada condición estudiada, se calculó la diferencia entre la señal fluorescente total y la señal del fondo. Además, se determinó la desviación estándar entre las señales de fluorescencia que presentaba cada concentración ensayada.

Las imágenes obtenidas para 5s 1g se muestran en la Figura 17. En ella se observó que los hidrogeles permitían la difusión de ambos anticuerpos a través de sus poros, tanto en presencia de GAR-Alexa₆₄₇ como de anti-BSA-Alexa₆₄₇, ya que se obtuvo señal en ambas muestras. Sin embargo, la selectividad se demostró después del lavado con PBS-T. Aquellos hidrogeles incubados con anti-BSA-Alexa₆₄₇, demostraron una intensidad de fluorescencia significativamente más elevada en comparación a los hidrogeles incubados con GAR-Alexa₆₄₇. Este hecho confirmó la elevada selectividad del hidrogel gracias al bioreconocimiento específico entre BSA y anti-BSA que tiene lugar en el interior de la estructura polimérica, demostrando, por un lado, la incorporación de las unidades de BSA en el proceso de polimerización y por otro lado, la conservación de sus propiedades de reconocimiento específico una vez incorporada a la estructura polimérica (biodisponibilidad).

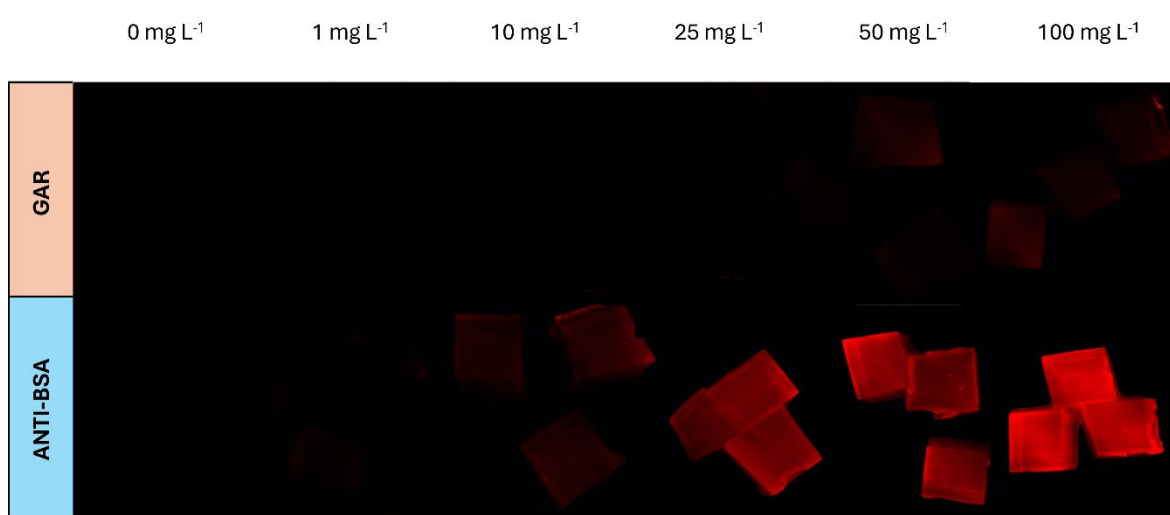


Figura 17. Imágenes obtenidas mediante el lector de fluorescencia de superficie casero acoplado a una cámara CCD a un tiempo de exposición de 5 segundos y ganancia de 1 g. Intensidad de fluorescencia de hidrogeles incubados durante 4 horas en concentraciones crecientes de GAR-Alexa₆₄₇ (primera fila) y anti-BSA-Alexa₆₄₇ (segunda fila) y lavados con PBS-T *overnight*.

El resultado del tratamiento de las imágenes se aprecia en la Figura 18. En ella, la intensidad de fluorescencia en los hidrogeles se ve incrementada proporcionalmente conforme se aumenta la concentración de anti-BSA-Alexa₆₄₇ y GAR-Alexa₆₄₇. Sin embargo, aquellos hidrogeles incubados con anti-BSA-Alexa₆₄₇ han demostrado un aumento de la fluorescencia mucho más acusado, alcanzando valores considerablemente mayores a los medidos en los hidrogeles incubados con GAR-Alexa₆₄₇. Incluso a concentraciones elevadas de 100 mg L⁻¹ de cada anticuerpo, se observa como los hidrogeles incubados con anti-BSA-Alexa₆₄₇ exhiben una señal fluorescente 6 veces mayor a la mostrada por los hidrogeles incubados en GAR-Alexa₆₄₇.

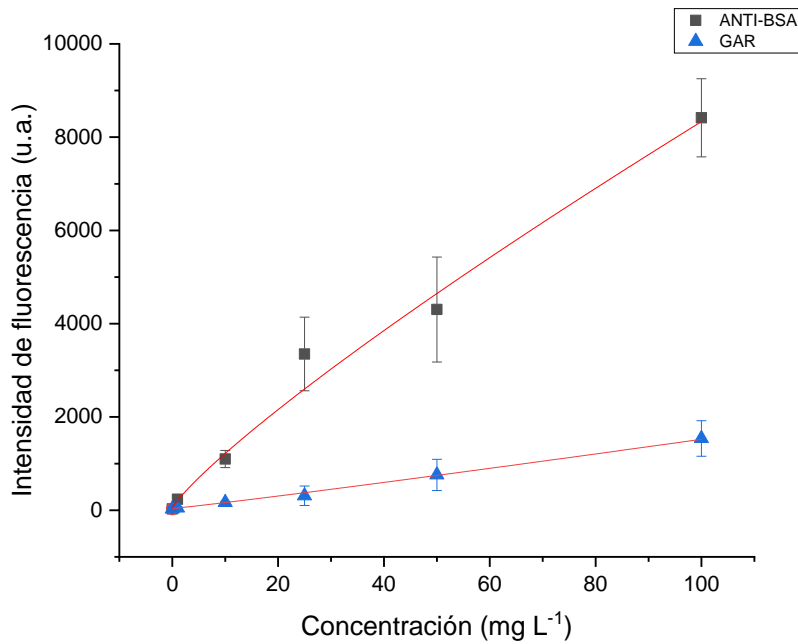


Figura 18. Intensidad de fluorescencia (5s 1g) de hidrogel incubados con anti-BSA-Alexa₆₄₇ y GAR-Alexa₆₄₇ a concentraciones crecientes durante 4 horas tras lavar con PBS-T *overnight*.

El crecimiento de la intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de anti-BSA-Alexa₆₄₇ fue modelizado al concluir que seguía una tendencia sigmoide. Concretamente, los datos experimentales se ajustaban a una función logística con un R² de 0,989.

Una vez demostrada la selectividad, se evaluó la sensibilidad de los hidrogel. Para ello, se llevó a cabo el ensayo de fluorescencia a concentraciones menores de anti-BSA (0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 y 10 mg L⁻¹). Los resultados se muestran en la Figura 19, en la que se observa una apreciable tendencia lineal. Se tomaron imágenes a tiempos de exposición y ganancia mayores (30s 1g, 30s 5g, 40s 1g, 40s 5g) para observar con más claridad la tendencia que muestra la intensidad de fluorescencia con respecto de la concentración de anti-BSA y determinar los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).

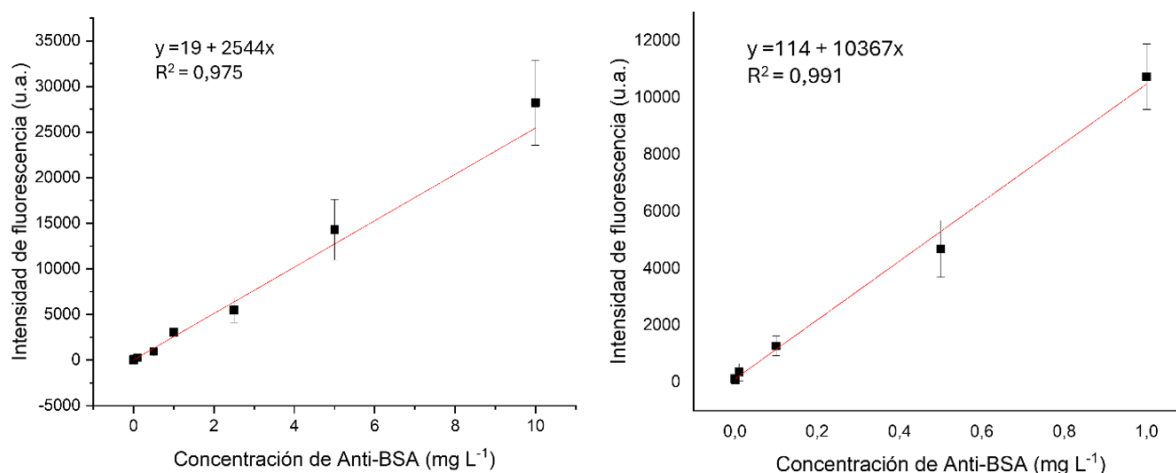


Figura 19. Izquierda: Gráfica de la intensidad de fluorescencia, medida a un tiempo de exposición de 10s y ganancia de 5, de hidrogeles incubados con anti-BSA-Alexa₆₄₇ a unas concentraciones crecientes entre 0 y 10 mg L⁻¹ durante 4 horas y tras lavar con PBS-T *overnight*. **Derecha:** Intensidad de fluorescencia, medida a un tiempo de exposición de 40s y una ganancia de 5, en el rango de concentraciones entre 0 y 1 mg L⁻¹ de anti-BSA.

La primera gráfica, representa los datos experimentales de intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de anti-BSA entre 0 y 10 mg L⁻¹, exhibiendo un ajuste lineal con un R² de 0,975 y una pendiente de 2544 L mg⁻¹ que representa la sensibilidad en las condiciones estudiadas (10s 5g). Su límite de detección (LOD) fue de 0,011 mg L⁻¹ de anti-BSA y el límite de cuantificación (LOQ) fue de 0,034 mg L⁻¹ de anti-BSA.

La segunda gráfica se realizó para analizar, detalladamente, cambios en la intensidad de fluorescencia entre concentraciones bajas (dentro del rango de 0 a 1 mg L⁻¹) de anti-BSA que, en otras condiciones de tiempo de exposición y ganancia menores, no se observarían con claridad. Los datos experimentales representados en ella se ajustaron a una recta con un R² de 0,991 y una pendiente de 10367 L mg⁻¹ que corresponde a la sensibilidad en las condiciones estudiadas (40s, 5g). El límite de detección (LOD) calculado fue de 0,023 mg L⁻¹ de anti-BSA y el límite de cuantificación (LOQ) de 0,075 mg L⁻¹ de anti-BSA. El LOD se obtuvo de interpolar en la recta de calibrado la señal obtenida por el blanco más 3 veces su desviación estándar, mientras que el LOQ se obtuvo por interpolación de la señal del blanco más 10 veces su desviación.

La pendiente de cada recta refleja como varía la intensidad de fluorescencia con respecto a un cambio en la concentración de anti-BSA, es decir, la sensibilidad. En este sentido, la segunda gráfica muestra una sensibilidad mucho más elevada (10367 L mg⁻¹) con respecto de la primera gráfica (2544 L mg⁻¹) ya que, en las condiciones empleadas (40s, 5g), pequeños cambios en la concentración de anti-BSA, provocan grandes cambios en la intensidad de fluorescencia.

No obstante, aun mostrando una mayor sensibilidad, su límite de detección también es mayor con respecto a la primera gráfica ya que, al trabajar en condiciones más drásticas de tiempo de exposición y ganancia, se detecta una mayor señal de fondo y, en este caso, una mayor desviación estándar del blanco. Para solucionar este problema se podrían llevar a cabo un mayor número de mediciones de la señal del blanco, reduciendo así su desviación estándar.

Es posible afirmar que, en ambas gráficas, nos encontramos dentro del rango lineal de detección de los hidrogeles, es decir, el intervalo de concentraciones donde la señal fluorescente es directamente proporcional a la concentración de anti-BSA. Esta relación lineal simplifica el proceso de cuantificación del analito estudiado.

Por otro lado, puesto que en las únicas condiciones que lograron replicar las redes de relieve de superficie en el hidrogel se basaron en la polimerización por activación térmica incluyendo glicerol y no fotoquímica, y para evaluar si el tipo de activación afectaba al anclaje y biodisponibilidad de la BSA, se estudió también la capacidad de biorreconocimiento específico por parte de los hidrogeles sintetizados con KPS a 37°C. Para ello, este tipo de hidrogeles se cortaron e incubaron en presencia de concentraciones crecientes de anti-BSA-Alexa₆₄₇ y GAR-Alexa₆₄₇, respectivamente. Las condiciones experimentales empleadas fueron las mismas que las descritas anteriormente, de manera que se pudiera establecer una comparativa entre ambos tipos de hidrogel. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20.

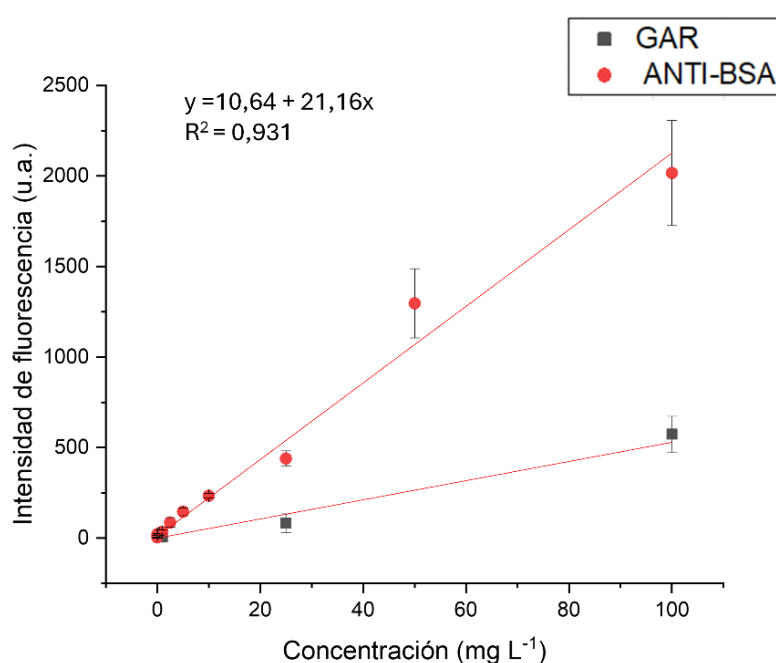


Figura 20. Intensidad de fluorescencia (5s 1g) de hidrogeles polimerizados con KPS que fueron incubados con anti-BSA-Alexa₆₄₇ y GAR-Alexa₆₄₇ a concentraciones crecientes durante 4 horas y posteriormente, se lavaron con PBS-T *overnight*.

Según podemos apreciar en la Figura 20, la relación que muestran los hidrogeles incubados con anti-BSA a distintas concentraciones es lineal, con un R² de 0,931. Por otro lado, podemos confirmar que los hidrogeles con KPS y glicerol también demostraron ser selectivos. Esto se comprueba ya que, tras el lavado con PBS-T, aquellos hidrogeles incubados con anti-BSA-Alexa₆₄₇ emitieron una mayor señal fluorescente debido a que fueron capaces de reconocer específicamente el anticuerpo anti-BSA y retenerlo gracias a su unión con la BSA presente en su estructura. Tomando la intensidad de fluorescencia de la máxima concentración incubada (100 mg L⁻¹) de ambos anticuerpos marcados, los hidrogeles incubados con anti-BSA-Alexa₆₄₇ mostraron una señal fluorescente 4 veces mayor en comparación a los hidrogeles incubados con GAR-Alexa₆₄₇. El GAR, al no interactuar con la BSA, fue eliminado mediante los lavados.

Es importante mencionar que, en comparación a la gráfica obtenida en los hidrogeles con fotoiniciador, la intensidad de fluorescencia que se alcanza es considerablemente menor. Las principales causas podrían estar asociadas al estrés térmico prolongado durante la polimerización que, sinérgicamente con los radicales libres generados por la acción del KPS, provoca pequeñas modificaciones oxidativas en los residuos aminoacídicos de la BSA. Esto puede conllevar a una desnaturalización parcial de la BSA, afectando a los epítomos que reconoce el anti-BSA y, en consecuencia, reduciendo la capacidad de biorreconocimiento de la BSA. Por otro lado, debido al mecanismo de polimerización, es probable que se haya creado un mayor grado de compactación en el hidrogel, limitando así la entrada del anti-BSA en la estructura polimérica y disminuyendo la cinética de unión entre BSA y Anti-BSA.

Finalmente, y, aunque presente un ajuste menos exacto, se trataron los datos de los hidrogeles sintetizados con fotoiniciador para obtener un ajuste lineal, dando lugar a la recta $y = 85,48 + 89,29x$ con una R^2 de 0,968. Este peor ajuste, no obstante, nos permitió llevar a cabo una comparación en términos de sensibilidad, LOD y LOQ de estos con respecto a los hidrogeles sintetizados con KPS. Los datos se trataron en condiciones 5s 1g y el resultado de esta comparativa se muestra en la Tabla 1.

INICIADOR	SENSIBILIDAD (L mg ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
FOTOQUÍMICO	89,29	0,19	0,64
TÉRMICO	21,16	0,25	1,24

Tabla 1. Tabla comparativa entre los hidrogeles activados fotoquímicamente y los hidrogeles activados térmicamente en términos de sensibilidad, LOD y LOQ. (5s 1g)

Según los datos proporcionados, podemos afirmar que los hidrogeles activados fotoquímicamente son 4 veces más sensibles en comparación a los hidrogeles activados térmicamente. Además, tanto el LOD como el LOQ calculados, han resultado inferiores en el caso de los hidrogeles activados con fotoiniciador. Si bien el LOD varía ligeramente entre ambos tipos de hidrogel, el LOQ de los hidrogeles activados térmicamente es prácticamente el doble al LOQ de los hidrogeles fotoquímicamente activados. En conclusión, los hidrogeles activados fotoquímicamente han demostrado ser más sensibles y capaces de detectar y cuantificar concentraciones menores de anti-BSA en comparación a los hidrogeles activados térmicamente. Es por ello que, puesto que no se podían utilizar para fabricar SRGs como se ha visto previamente, se planteó una estrategia alternativa a la consecución de un patrón de difracción en el seno del hidrogel.

4.6 FABRICACIÓN DE REDES DE VOLUMEN EN HIDROGELES MEDIANTE ACTIVACIÓN FOTOQUÍMICA

Puesto que la capacidad de biorreconocimiento de la BSA en los hidrogeles activados fotoquímicamente era mayor que en los hidrogeles activados térmicamente, se planteó otra estrategia para la consecución de redes de difracción en el hidrogel. La estrategia consistió en fabricar redes de volumen (Zezza *et al.*, 2023).

Este tipo de redes consisten en generar una modulación periódica en el índice de refracción dentro del hidrogel, lo que genera un patrón periódico tridimensional en el seno del material. Para ello, se prepara una solución con monómeros, agentes entrecruzantes, e iniciadores. Los monómeros son las unidades básicas que formarán la red de polímeros, los agentes entrecruzantes ayudarán a formar la estructura tridimensional y los iniciadores activarán la reacción de polimerización. Esta disolución se embebe en el seno del hidrogel, y a continuación, se utiliza un sistema de exposición a luz láser coherente para crear una red de difracción dentro del hidrogel. Los dos haces láser coherentes se hacen interferir dentro del *film* de hidrogel. La interferencia de estos haces crea un patrón de intensidad luminosa periódica en tres dimensiones dentro del hidrogel. La exposición del hidrogel a este patrón de interferencia de luz inicia la polimerización en las regiones iluminadas. Las áreas expuestas a la máxima intensidad de luz polimerizan más rápido y se entrecruzan más que las áreas con menor intensidad. De esta manera, se genera el patrón de difracción.

En nuestro caso, se fabricaron *films* de hidrogel. Para su síntesis, inicialmente se realizó una disolución de acrilamida y KPS en agua destilada y pseudopolitaxano. Esta mezcla se agitó durante 15 minutos y se dividió en tubos Eppendorf. A continuación, se añadieron 4 μL de TEMED a cada uno y se depositó la mezcla sobre el portamuestras con dos adhesivos superpuestos que definen una celda para contener la disolución. Después, se colocó un portaobjetos adicional encima del primero y se ejerció presión sobre el montaje con pinzas hasta completar los 40 minutos de polimerización. Finalmente, se retiraron del portamuestras y se dejaron lavando en agua destilada *overnight*.

Tras su fabricación y lavado, se embebieron con la disolución de grabado, que contenía acrilamida, MBA, fotoiniciador LAP, trietilamina y DMSO.

Posteriormente, los *films* de hidrogel se irradiaron con un láser de luz ultravioleta (244 nm) a través de una máscara de fase. Los cambios de fase introducidos por la máscara causaron que distintas partes del frente de onda interfirieran entre sí, generando un patrón de interferencia constructiva-destructiva en el *film* de hidrogel. En este patrón, las zonas del hidrogel expuestas a interferencias constructivas, donde las ondas están en fase, recibieron una mayor intensidad lumínica y, por lo tanto, desarrollaron un mayor grado de polimerización. En cuanto a las zonas sometidas a interferencias destructivas, donde las ondas se encuentran en oposición de fase, estas recibieron una menor cantidad de luz y por ello, desarrollaron un grado de polimerización menor. Así, se obtuvo la red de volumen (VHG) en el *film* de hidrogel.

El sistema óptico y la máscara de fase empleados para el proceso de grabado se muestran en la Figura 21.

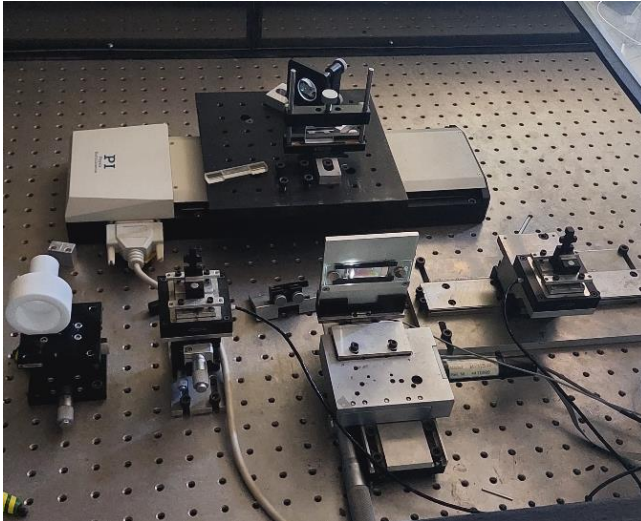


Figura 21. Izquierda: Sistema óptico empleado durante el proceso de grabado de *films* de hidrogel. **Derecha:** máscara de fase que genera el patrón de interferencia constructiva-destructiva en el *film* de hidrogel.

El proceso de grabado en los *films* de hidrogel se realizó en colaboración con José Luis Cruz, miembro del grupo de investigación de Fibras Ópticas y Procesado de Señal y catedrático de Física Aplicada en la Universidad de Valencia.

Las redes de volumen generadas en los *films* de hidrogel se evaluaron con el equipo óptico casero para observar el patrón de difracción. Finalmente, se concluyó que el proceso de grabado había sido exitoso ya que se pudo observar un patrón de difracción consistente y bien definido que se muestra en la Figura 22. Los órdenes -1 y 1 que se observan son mucho más intensos y delimitados con respecto al patrón de difracción obtenido mediante *replica molding*. (Figura 13).

Este patrón de difracción, al demostrar una elevada calidad, ha implicado un avance muy positivo para el futuro de la fabricación de redes de volumen dentro del grupo de investigación.



Figura 22. Patrón de difracción producido por la red de volumen (VHG) generada en el *film* de hidrogel.

5. CONCLUSIONES

En resumen, se ha conseguido sintetizar hidrogeles con pseudopoliritaxano que integraba BSA móvil conjugada a ciclodextrinas en su estructura. Aunque el proceso de fabricación de redes de relieve de superficie se dificultó, se exploraron variaciones en las condiciones de fabricación y composición del hidrogel obteniendo finalmente una red de difracción irregular en el hidrogel activado térmicamente.

Durante el transcurso de este trabajo, se ha conseguido conjugar la proteína BSA con β -ciclodextrinas mediante el *linker* heterobifuncional GMBS, determinando una relación de marcaje de seis ciclodextrinas por BSA mediante análisis por espectrometría de masas.

La síntesis de hidrogeles basados en pseudopoliritaxano con BSA móvil conjugada a ciclodextrinas también se consiguió con éxito, obteniendo hidrogeles transparentes con propiedades ópticas realmente interesantes. Además, se analizó la flexibilidad y la resistencia al estrés mecánico mediante una caracterización mecánica que consistió en ciclos de compresión-relajación. Los hidrogeles exhibieron una resistencia a la deformación formidable y unas propiedades mecánicas excepcionales con respecto a los hidrogeles convencionales sin pseudopoliritaxano cuyo factor limitante principal es su deficiente resistencia mecánica. Los módulos de Young de los hidrogeles sintetizados resultaron análogos al de la piel, apuntando al potencial de estos materiales para la fabricación de dispositivo de tipo parches cutáneos para determinar, por ejemplo, biomarcadores de interés en sudor.

Mediante ensayos de fluorescencia, se consiguió evaluar la selectividad y la sensibilidad de los hidrogeles frente al anticuerpo anti-BSA. Aquellos hidrogeles incubados con anti-BSA-Alexa₆₄₇ demostraron retener el anticuerpo en su estructura polimérica a diferencia de los hidrogeles incubados con GAR-Alexa₆₄₇. Por lo tanto, se concluyó que los hidrogeles habían inmovilizado exitosamente la BSA; manteniendo su biodisponibilidad. Además, los hidrogeles se incubaron a concentraciones menores de anti-BSA con el propósito de determinar el límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ), que resultaron ser del orden de 0,1-0,3 mg L⁻¹ y 0,6-1,2 mg L⁻¹, respectivamente.

También se estableció una comparativa entre los hidrogeles fotoquímicamente activados y los térmicamente activados, concluyendo que los que mejores prestaciones de biorreconocimiento específico presentaban eran los primeros.

En cuanto a la fabricación de redes de relieve de superficie (SRG), esta ha sido analizada exhaustivamente con el objetivo de optimizar las condiciones del proceso. Si bien se ha conseguido replicar una red de difracción en los hidrogeles térmicamente activados, la calidad de la misma debe ser mejorada para poder llevar a cabo medidas de la intensidad lumínica de los órdenes refractados.

Aunque por falta de tiempo no se ha podido seguir avanzando en el desarrollo y la optimización de SRGs en hidrogeles, se ha conseguido abrir una vía de fabricación de redes de volumen (VHG) muy interesante por su sencillez, rapidez y efectividad, sobre los hidrogeles fotoquímicamente activados, ya que son los que mejores prestaciones de biorreconocimiento han mostrado en los ensayos de fluorescencia. Debido a esto, las redes de volumen seguirán siendo objeto de estudio para optimizar la fabricación de redes de difracción en ellos y posteriormente, poder aplicarlos en el biosensado óptico sin marcaje.

BIBLIOGRAFÍA

- 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), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms6124>
- Biosensors market size, share and trends report, 2030. (2024). <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biosensors-market>
- Burtscher, B., Manco Urbina, P. A., Diacci, C., Borghi, S., Pinti, M., Cossarizza, A., Salvarani, C., Berggren, M., Biscarini, F., Simon, D. T., & Bortolotti, C. A. (2021). Sensing inflammation biomarkers with electrolyte-gated organic electronic transistors. *Advanced Healthcare Materials*, 10(20). <https://doi.org/10.1002/adhm.202100955>
- Chen, C., & Wang, J. (2020). Optical biosensors: an exhaustive and comprehensive review. *The Analyst*, 145(5), 1605–1628. <https://doi.org/10.1039/c9an01998g>
- Chun, H. J., Park, K., Kim, C.-H., & Khang, G. (Eds.). (2018). *Novel Biomaterials for Regenerative Medicine* (1st ed.). Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-981-13-0947-2>
- Contessi Negrini, N., Angelova Volponi, A., Sharpe, P. T., & Celiz, A. D. (2021). Tunable cross-linking and adhesion of gelatin hydrogels via bioorthogonal click chemistry. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(9), 4330–4346. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00136>
- 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). <https://doi.org/10.1002/adfm.202105645>
- Domiński, A., Konieczny, T., & Kurcok, P. (2019). α -cyclodextrin-based polypseudorotaxane hydrogels. *Materials*, 13(1), 133. <https://doi.org/10.3390/ma13010133>
- Gavrillov, A. A., & 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. <https://doi.org/10.1039/c8sm00192h>
- Ho, T.-C., Chang, C.-C., Chan, H.-P., Chung, T.-W., Shu, C.-W., Chuang, K.-P., Duh, T.-H., Yang, M.-H., & Tyan, Y.-C. (2022). Hydrogels: Properties and applications in biomedicine. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(9), 2902. <https://doi.org/10.3390/molecules27092902>
- Huang, J., Hao, J., Anderson, D. P., & Chang, P. R. (2014). Supramolecular hydrogels based on cyclodextrin poly(pseudo)rotaxane for new and emerging biomedical applications. In *Advanced Healthcare Materials* (pp. 405–438). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118774205.ch11>

- Hui, Y., Huang, Z., Alahi, M. E. E., Nag, A., Feng, S., & Mukhopadhyay, S. C. (2022). Recent advancements in electrochemical biosensors for monitoring the water quality. *Biosensors*, 12(7), 551. <https://doi.org/10.3390/bios12070551>
- 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. <https://doi.org/10.1295/polymj.pj2006239>
- Kato, K., Inoue, K., Kidowaki, M., & Ito, K. (2009). Organic–Inorganic hybrid slide-ring gels: Polyrotaxanes consisting of poly(dimethylsiloxane) and γ -cyclodextrin and subsequent topological cross-linking. *Macromolecules*, 42(18), 7129–7136. <https://doi.org/10.1021/ma9011895>
- 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. <https://doi.org/10.1002/adma.201301252>
- Kulkarni, M. B., Ayachit, N. H., & Aminabhavi, T. M. (2022). Biosensors and microfluidic biosensors: From fabrication to application. *Biosensors*, 12(7), 543. <https://doi.org/10.3390/bios12070543>
- Lim, K. S., Klotz, B. J., Lindberg, G. C. J., Melchels, F. P. W., Hooper, G. J., Malda, J., Gawlitta, D., & Woodfield, T. B. F. (2019). Visible light cross-linking of gelatin hydrogels offers an enhanced cell microenvironment with improved light penetration depth. *Macromolecular Bioscience*, 19(6). <https://doi.org/10.1002/mabi.201900098>
- Liu, J., Zheng, H., Poh, P., Machens, H.-G., & Schilling, A. (2015). Hydrogels for engineering of perfusable vascular networks. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15997–16016. <https://doi.org/10.3390/ijms160715997>
- Liu, J., Tian, B., Liu, Y., & Wan, J.-B. (2021). Cyclodextrin-containing hydrogels: A review of preparation method, drug delivery, and degradation behavior. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13516. <https://doi.org/10.3390/ijms222413516>
- Lu, H., Yuan, L., Yu, X., Wu, C., He, D., & Deng, J. (2018). Recent advances of on-demand dissolution of hydrogel dressings. *Burns & Trauma*, 6. <https://doi.org/10.1186/s41038-018-0138-8>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03746-1>
- Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- Mira, R. Llorente, S. Morais, R. Puchades, A. Maquieira, J. Martí, 2004. High-throughput screening of surface-enhanced fluorescence on industrial standard digital recording media. *Opt. Based Biol. Chem. Sens. Def 5617*, 364. <https://doi.org/10.1117/12.578301>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2016.09.013>
- 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. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200104\)13:7<485::aid-adma485>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200104)13:7<485::aid-adma485>3.0.co;2-t)
- Piliarik, M., Vaisocherová, H., & Homola, J. (2009). Surface plasmon resonance biosensing. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 503, 65–88. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-567-5_5
- Sakai, T., Murayama, H., Nagano, S., Takeoka, Y., Kidowaki, M., Ito, K., & Seki, T. (2007). Photoresponsive slide-ring gel. *Advanced Materials*, 19(15), 2023–2025. <https://doi.org/10.1002/adma.200700457>
- Sang, S., Wang, Y., Feng, Q., Wei, Y., Ji, J., & Zhang, W. (2015). Progress of new label-free techniques for biosensors: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1–17. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.991270>
- Silva Fernández, L., Barbadillo Mateos, C., Fernández Castro, M., & Otón Sánchez, T. (2011). Los otros biomarcadores. ¿Qué debe saber el reumatólogo? *Seminarios de la Fundacion Espanola de Reumatologia*, 12(3), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.semreu.2011.02.002>
- Sola, D., Lavieja, C., Orera, A., & Clemente, M. J. (2018). Direct laser interference patterning of ophthalmic polydimethylsiloxane (PDMS) polymers. *Optics and Lasers in Engineering*, 106, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2018.03.007>
- Soleimani, K., Dadkhah Tehrani, A., & Adeli, M. (2018). Preparation of new GO-based slide ring hydrogel through a convenient one-pot approach as methylene blue absorbent. *Carbohydrate Polymers*, 187, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.084>
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS: RECOMMENDED DEFINITIONS AND CLASSIFICATION*. *Analytical Letters*, 34(5), 635–659. <https://doi.org/10.1081/al-100103209>
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification1International union of pure and applied chemistry: Physical chemistry division, commission I.7 (biophysical chemistry); Analytical chemistry division, commission V.5 (electroanalytical chemistry).1. *Biosensors & Bioelectronics*, 16(1–2), 121–131. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(01)00115-4)
- Updike, S. J., & Hicks, G. P. (1967). The enzyme electrode. *Nature*, 214(5092), 986–988. <https://doi.org/10.1038/214986a0>
- Wu, W., Wang, L., Yang, Y., Du, W., Ji, W., Fang, Z., Hou, X., Wu, Q., Zhang, C., & Li, L. (2022). Optical flexible biosensors: From detection principles to biomedical applications. *Biosensors & Bioelectronics*, 210(114328), 114328. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114328>

- Zezza, P., Lucío, M. I., Fernández, E., Maquieira, Á., & Bañuls, M.-J. (2023). Surface micro-patterned biofunctionalized hydrogel for direct nucleic acid hybridization detection. *Biosensors*, 13(3), 312. <https://doi.org/10.3390/bios13030312>
- Zezza, P., Lucío, M. I., Maquieira, Á., & Bañuls, M.-J. (2022). DNA -based hydrogels for high-performance optical biosensing application. *Talanta*, 244(123427), 123427. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123427>
- Zezza, P., Lucío, M. I., Naydenova, I., Bañuls, M.-J., & Maquieira, Á. (2023). Holographic recording of unslanted volume transmission gratings in Acrylamide/Propargyl Acrylate hydrogel layers: Towards nucleic acids biosensing. *Gels* (Basel, Switzerland), 9(9), 710. <https://doi.org/10.3390/gels9090710>
- Zhang, Y., Sun, T., & Jiang, C. (2018). Biomacromolecules as carriers in drug delivery and tissue engineering. *Acta Pharmaceutica Sinica*. B, 8(1), 34–50. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.11.005>