



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

Nanoestructuras difractivas de proteínas para el análisis  
directo en muestras biológicas

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Haro Villarroya, Malena de

Tutor/a: Avellá Oliver, José Miguel

Director/a Experimental: Patrone García, Arturo

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

# Nanoestructuras difractivas de proteínas para el análisis directo en muestras biológicas

Trabajo Final de Grado

Universitat Politècnica de València – ETSEAMN – Biotecnología

2023-2024

Realizado por: Malena de Haro Villarroya

Dirigido por: Miquel Avellá Oliver

Tutor experimental: Arturo Patrone García

Valencia, Julio de 2024

## **Nanoestructuras difractivas de proteínas para el análisis directo en muestras biológicas.**

### **Resumen**

Este proyecto se centra en la creación de redes difractivas de proteínas y en su uso como transductores ópticos para el desarrollo de biosensores. Entre otras ventajas, este tipo de nanoestructuras simplifican el proceso analítico, permiten detección sin marcaje, y evitan problemas de adsorción inespecífica en el análisis de muestras complejas. El proyecto a continuación estudia la fabricación de estas redes sobre sustratos sólidos, su optimización, y su aplicación para el análisis directo de analitos proteicos en muestras de origen biológico, empleando un inmunoensayo modelo para la detección de anticuerpos. Se trata de una investigación multidisciplinar entre la química, biología, óptica, nanociencia e ingeniería, y persigue el desarrollo de un inmunosensor que aporte soluciones para escenarios point-of-care.

### **Abstract**

This project focuses on creating protein diffractive networks and their use as optical transducers for the development of biosensor. Among other advantages, this type of nanostructures simplifies the analytical process, enables label-free detection, and avoids problems of nonspecific adsorption in the analysis of complex samples. The project investigates the fabrication of these networks on solid substrate substrates, their optimization, and their application for the direct analysis of protein analytes in biological samples, using a model immunoassay to detect antibodies. It is a multidisciplinary research involving chemistry, biology, optics, nanoscience, and engineering, aiming to develop an immunosensor that provides solutions for point-of-care scenarios.

**Palabras clave:** Biosensor; inmunoensayo; difracción; label-free; point-of-care; biograting.

**Key words:** Biosensor; immunoassay; diffraction; label-free; point-of-care; biograting.

Autora: Malena de Haro Villarroya

Tutor académico: Miquel Avellá Oliver

Tutor experimental: Arturo Patrone García

València, Julio 2024

En primer, me gustaría agradecer a mi tutor Miquel, su implicación y dedicación conmigo, pues creo que no podía haber tenido un tutor mejor, he aprendido mucho, tanto de los contenidos del TFG como de otros temas.

Después a mis compañeros de laboratorio, en especial a Arturo Patrone, mi tutor experimental, no se cuantas veces he dicho tu nombre para preguntarte dudas jeje; muchísimas gracias por tu amabilidad y por estar dispuesto siempre a ayudar, tampoco podría haber estado mano a mano mejor con otra persona. También a los demás investigadores del laboratorio, Pilar, Sofía, Pamela, Blanca, Pedro, Will,..., gracias por hacerme sentir que era una compañera más. Y a mis compañeros de clase y de laboratorio, aunque estuviera agobiada, verlos siempre era un buen motivo para sonreír y sentirse acompañado.

Y a mis amigas de la carrera, pues estos años han sido difíciles, pero los hemos superado juntas. He aprendido mucho de todas ellas y siempre las llevaré en mi corazón.

También a mis amigos de Teruel, en especial a Javi, siempre han sido un soplo de aire fresco en cada viernes o puente en Teruel que nos veíamos, estar con ellos es renovar energías.

Naturalmente, no puedo no agradecer mi experiencia Erasmus, con los lugares visitados y amigos con los que compartirlos. La experiencia en Madeira me recordó que la vida es maravillosa, sólo que a veces se nos olvida.

Y para ir terminando porque viene telita, agradecer a mi familia (incluido a Roberto) y a los caninos de mi vida Coque y Vana, por arroparme en los momentos flojos y creer en mí, que yo podía con todo lo que tenía, eso me ha ayudado siempre a hacerlo yo también, destacar a mis abuelos, a los que les admiro, son mayores pero con unas ganas de vivir que desafían a la muerte, sois los mejores.

Y en especial a mi mamá María Jesús, no sería quien soy si no me hubiera tocado en la lotería de la vida ser tu hija, te estaré eternamente agradecida, te quiero.

Puede que me haya extendido, pero esto es el final de una etapa, espero no dejarme nada ni a nadie, estoy muy agradecida por todo.

# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Introducción a los biosensores .....	1
1.2.	Detección sin marcaje .....	3
1.3.	Difracción y biogratings.....	4
1.4.	Adsorción inespecífica .....	6
1.5.	Hipótesis de partida .....	7
2.	OBJETIVOS .....	8
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1.	Materiales .....	8
3.2.	<i>Microcontact-printing</i> .....	9
3.3.	Inmunoensayos.....	10
3.4.	Medidas de difracción .....	11
3.5.	Métodos de caracterización .....	13
3.6.	Cromatografía de inmutafinidad .....	14
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
4.1.	Caracterización de los biogratings.....	14
4.1.1.	Ángulo de contacto.....	15
4.1.2.	Escáner de fluorescencia .....	17
4.1.3.	Ensayo con revelado de plata .....	18
4.1.4.	Estudio del patrón de difracción .....	19
4.1.5.	Microscopía de fuerza atómica.....	21
4.2.	Transducción .....	23
4.2.1.	Transducción sin marcaje .....	23
4.2.2.	Transducción con marcaje .....	24
4.2.3.	Comparación .....	25
4.3.	<i>Wash-free</i> .....	26
4.3.1.	Transducción <i>wash-free</i> .....	27
4.3.2.	Selectividad .....	28
4.4.	Preacondicionamiento y muestras reales .....	29
5.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	33
6.	BIBLIOGRAFÍA .....	34

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ángulos de difracción del orden 1 y periodos resultantes del estudio de las dimensiones del patrón de difracción de biogratings BSA irradiados a distintas longitudes de onda.....	20
<b>Tabla 2.</b> Parámetros obtenidos a partir de las cross-section de las imágenes de AFM. ....	22
<b>Tabla 3.</b> Comparación de distintos parámetros para distintas modalidades de ensayo en biogratings.....	26

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema general de un biosensor. ....	1
<b>Figura 2.</b> (A) Esquema de ensayo con marcaje con etiqueta enzimática (HRP) y revelado de ODP que causa un cambio colorimétrico. (B) Esquema de ensayo sin marcaje.....	3
<b>Figura 3.</b> Esquema de la difracción de la luz al interaccionar con (A) una rendija, (B) dos rendijas, y (C) una red de difracción. ....	5
<b>Figura 4.</b> Esquema de la transducción sin marcaje basada en biogratings y medidas de difracción óptica.....	6
<b>Figura 5.</b> Esquema de cómo puede afectar la adsorción inespecífica a un biograting. Biograting tras incubación de analito (A) sin adsorción inespecífica y (B) con adsorción inespecífica. Se observa como la adsorciones inespecíficas no modifican la diferencia de altura entre strip y gap ( $c = a + b$ ), y con ello no modifica la señal difractiva.....	7
<b>Figura 6.</b> Obtención sellos de PDMS a partir de molde de silicio o <i>master</i> . ....	9
<b>Figura 7.</b> Representación del proceso de $\mu$ CP para generar fabricar biogratings de proteínas sobre superficies de vidrio.....	10
<b>Figura 8.</b> Esquema de incubación y limpieza.....	10
<b>Figura 9.</b> Esquemas de inmunoensayo con marcaje: (A) Biograting, (B) tras incubar analito, (C) tras incubar GAR-Au, (D) después de la precipitación de plata.....	11
<b>Figura 10.</b> Esquema del montaje de medida para analizar los patrones de difracción. ....	12
<b>Figura 11.</b> (A) Esquema y (B) fotografía del montaje utilizado para cuantificación de la intensidad de difracción. Para medir la intensidad del orden 0, se situaba el detector al punto en rojo de la figura B. ....	12
<b>Figura 12.</b> Medidas del ángulo de contacto de una gota de agua sobre distintas superficies: vidrio, biograting de BSA, biograting tras de incubar 100 $\mu$ g/mL IgGs antiBSA purificadas, y biograting de BSA después de incubar 100 $\mu$ g/mL de anticuerpo antiBSA en antisuero. (A) Resultados del ángulo de contacto. (B) Imágenes tomadas de las gotas que se originaban en las distintas muestras. ....	16
<b>Figura 13.</b> Caracterización con escáner de fluorescencia: (A) esquema del ensayo: (B) Imágenes de los biogratings capturadas con el escáner de fluorescencia. (C) Intensidades de fluorescencia registradas en las distintas condiciones. ....	17
<b>Figura 14.</b> (A) Esquema del ensayo con revelado de plata. (B) Fotografía de biogratings de BSA tras incubar 0 $\mu$ g/mL (izquierda) y 100 $\mu$ g/mL (derecha) de antiBSA. (C) Fotografías de la difracción de luz blanca en biogratings de BSA tras realizar el ensayo (100 $\mu$ g/mL de antiBSA) y realizar revelados con plata, capturadas desde distintos ángulos.....	18
<b>Figura 15.</b> Fotografías del patrón de difracción de (A) un biograting de BSA y (B) un biograting de BSA tras incubar 100 $\mu$ g/mL antiBSA, irradiados con láseres de distintas longitudes de onda: 405 nm (color azul), 532 nm (color verde), 647 nm (color rojo). (C) Fotografías del patrón de difracción con láser de 405 nm donde la muestra se encuentra a distintas distancias del plano de proyección del patrón de difracción. La distancia aumenta en las imágenes de arriba abajo. ....	19
<b>Figura 16.</b> Imágenes obtenidas por microscopía de fuerza atómica y sus secciones transversales correspondientes, de biogratings de BSA (A) antes y (B) después de incubar anticuerpo selectivo (100 $\mu$ g/mL antiBSA purificado en PBS-T).....	21
<b>Figura 17.</b> Curva dosis respuesta sin marcaje con antisuero antiBSA en PBS-T. Regresión sigmoideal ajustado con los parámetros $a = 2,31 \cdot 10^{-4}$ , $b = -1,59$ , $x_0 = 17,8 \mu\text{g/mL}$ , $y_0 = 1,48 \cdot 10^{-4}$ . ....	23
<b>Figura 18.</b> Detección colorimétrica con marcaje. (A) Portaobjetos tras el revelado con plata. (B) Curva dosis-respuesta obtenida tras escaneado y escalado de grises. Regresión	

sigmoidal ajustado con los parámetros $a = 1,81 \cdot 10^{-4}$ , $b = -0,90$ , $x_0 = 4,38 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ , $y_0 = 8770$ .....	24
<b>Figura 19.</b> Curva dosis respuesta resultante de las medidas difractivas de muestras reveladas con plata con antisuero antiBSA en PBS-T. Regresión sigmoidal ajustado con los parámetros $a = 1,51 \cdot 10^{-3}$ , $b = -2,56$ , $x_0 = 0,31 \mu\text{g/mL}$ , $y_0 = 2,65 \cdot 10^{-6}$ . .....	25
<b>Figura 20.</b> Curva dosis respuesta aplicando el método <i>wash-free</i> con antisuero antiBSA en PBS-T. Regresión sigmoidal ajustado con los parámetros $a = 7,28 \cdot 10^7$ , $b = -1$ , $x_0 = 5,21 \cdot 10^8$ , $\mu\text{g/mL}$ , $y_0 = 0,19$ .....	27
<b>Figura 21.</b> Resultados del estudio de selectividad. Eficiencias de difracción obtenidas tras incubar distintas disoluciones sobre biogratings de BSA y de HSA. ....	28
<b>Figura 22.</b> Medidas difractivas del experimento de preacondicionamiento en una muestra de agua. Empleando dos concentraciones de antiBSA o $0 \mu\text{g/mL}$ o $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . ....	30
<b>Figura 23.</b> Resultados del análisis de suero humano puro (sin diluir) dopado con antiBSA. ...	31
<b>Figura 24.</b> Resultados del análisis de zumo de manzana puro (sin diluir) dopado con antiBSA. .....	31



# ABREVIATURAS

<b>AFM</b>	Microscopía de fuerza atómica
<b>antiBSA</b>	Anticuerpo específico (IgG) contra BSA
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>ED</b>	Eficiencia de difracción
<b>GAR</b>	Goat anti rabbit antibody
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>HSA</b>	Seroalbúmina humana
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>LOD</b>	Límite de detección
<b>LOC</b>	Límite de cuantificación
<b>PBS</b>	Tampón de sodio fosfato
<b>PBS-T</b>	PBS con polisorbato 20
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano
<b>SPR</b>	Surface Plasmon resonance
<b>SERS</b>	Surface Enhanced Raman Spectroscopy
<b>μCP</b>	Microcontact-printing (Impresión por microcontacto)

## Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre 0				X
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento	X			
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades	X			
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables				X
ODS 13. Acción por el clima				X
ODS 14. Vida submarina	X			
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres	X			
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos				X

Los ODS 3 y 10 se alinean con los criterios ASSURED descritos por la organización mundial de la salud, que persigue la investigación bioanalítica desarrollada en este trabajo. Estos criterios son: asequible (*affordable*), sensible (*sensitive*), específico (*specific*), fácil para el usuario (*user friendly*), rápido (*rapid*), robusto (*robust*), sin equipamientos (*equipment-free*) y transferible a la sociedad (*deliverable to end-users*). Pues el dispositivo pretende mejorar la salud y bienestar de toda la población, reduciendo las desigualdades, ya que será asequible por todo el mundo.

Los criterios ASSURED se enfocan en el desarrollo de productos potencialmente transferibles, que requiere de industria e innovación, alineándose con el ODS 9.

En una primera instancia, se dirige a mejorar el diagnóstico en humanos, pero al tratarse de un biosensor, cambiando la molécula de captura del analito que se desee detectar y si se desarrolla adecuadamente será igualmente útil para control de contaminación en aguas (agua limpia y saneamiento, ODS 6), la vida submarina (ODS 14) y la vida en los ecosistemas terrestres (ODS 15).

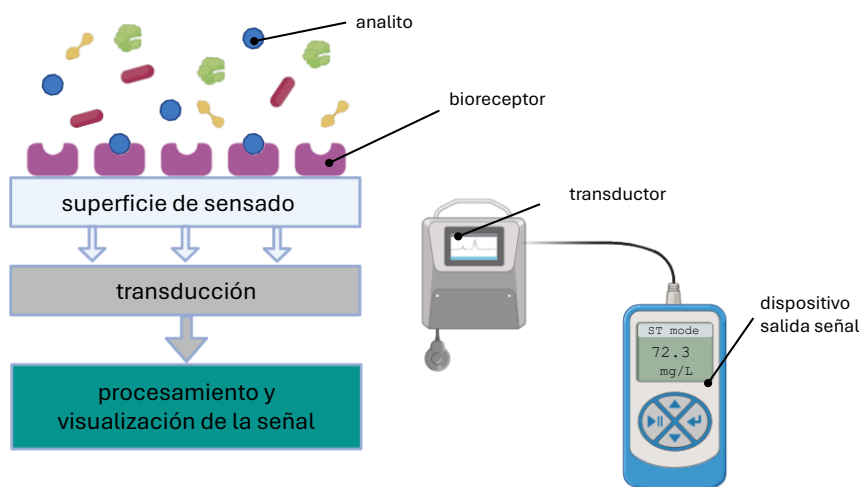
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Introducción a los biosensores

El avance tecnológico y científico y el nivel de bienestar de la sociedad actual, no se concibe sin la disponibilidad de sistemas analíticos capaces de cuantificar parámetros químicos de nuestro entorno y de nuestro propio cuerpo. Un parámetro especialmente relevante es la concentración de compuestos químicos y bioquímicos (biomarcadores, contaminantes, fármacos, nutrientes, patógenos, alérgenos) presentes en una muestra, lo cual tiene un impacto muy alto en multitud ámbitos como la industria agroalimentaria, el diagnóstico clínico, la protección del medio ambiente o el desarrollo de medicamentos.<sup>1</sup>

Para estos análisis durante muchos años se han empleado técnicas instrumentales clásicas (cromatografía, espectrofotometría, electroforesis, espectrometría de masas, microscopía, etc.).<sup>2</sup> Estas técnicas presentan muchas ventajas, pero también tienden a ser caras, complejas, y requerir de personal muy especializado para realizar los análisis e interpretar los resultados. Estas limitaciones dan pie a un modelo de laboratorios centralizados que no resuelve bien las necesidades de obtener el resultado del análisis en el mismo momento y lugar en el que este análisis se requiere.

Una alternativa es el análisis mediante biosensores. De acuerdo con la IUPAC un biosensor se trata de un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células enteras para detectar compuestos químicos normalmente mediante señales eléctricas, térmicas u ópticas.<sup>3</sup> El esquema clásico que define a un biosensor (Figura 1) incluye las siguientes partes principales: un bioreceptor o elemento de reconocimiento biológico (biomacromoléculas, células, tejidos, etc.) responsable del reconocimiento selectivo de la especie química cuya concentración se pretende cuantificar (analito), un transductor fisicoquímico (electroquímico, óptico, etc.) que transforma el evento de reconocimiento receptor-analito en una señal medible, y un detector que cuantifica la señal generada.<sup>1,4-7</sup>



**Figura 1.** Esquema general de un biosensor.

La principal ventaja de los biosensores es la alta selectividad por el analito debido a la interacción de bioreconocimiento típico de las biomacromoléculas. Esta interacción específica permite evitar la interferencia de señales procedentes de otras sustancias, y que las únicas moléculas que se detecten sean los analitos.<sup>5</sup> Para favorecer su impacto social, el desarrollo de biosensores debe combinar esta selectividad con otros parámetros clave sugeridos por la Organización Mundial en el criterio ASSURED: Affordable, Sensitive, Specific, User-Friendly, Rapid, Equipment-Free, Deliverable to end-users (Asequible, Sensible, Específica, Fácil de usar, Rápida y robusta, Sin equipamiento y Entregable a los usuarios finales). Para conseguir esto es necesario propiciar una operatividad sencilla, alta especificidad, portabilidad, bajo costo y la ausencia de requisitos de personal especializado para su uso, así se convertirán en soluciones para la atención en lugares donde no se dispone de laboratorios ni equipos costosos (Point-of-care).<sup>8</sup>

Como resultado, estos biosensores se han convertido en herramientas de uso cotidiano en diversas áreas. Estas ventajas han ampliado sus aplicaciones en áreas como el autocontrol diabético y cardíaco, investigaciones forenses, descubrimiento de fármacos, detección agrícola y medioambiental, la industria alimentaria y la biodefensa. Sin embargo, la comercialización futura de los biosensores depende de la mejora en selectividad, sensibilidad, estabilidad, reproducibilidad y portabilidad, todo ello a un menor costo.<sup>4,5,9</sup> Los ingresos generados por los biosensores en el mercado mundial alcanzaron los 25.5 mil millones de dólares en 2021, y se prevé un aumento un valor de 36.7 mil millones de dólares en 2026.<sup>10</sup>

Led y Clark desarrollaron el primer biosensor de oxígeno en la década de los 50. Desde entonces, los biosensores han sido objeto de gran atención por parte de los investigadores y empresas. En los últimos 50 años aproximadamente la vida del diabético se ha facilitado enormemente, gracias al desarrollo de glucosímetros que ya permiten medir la glucosa en sangre en presencia sustancias intervinientes, y una monitorización a tiempo real. También la rápida propagación del coronavirus (COVID-19) creó una demanda en dispositivos de biosensado que se pudieran usar en los domicilios. Otros casos de éxito social son los tests de embarazo y los biosensores para detección de drogas.<sup>11</sup> La investigación en torno al biosensado y el desarrollo de biosensores son áreas altamente multi e interdisciplinar que requieren de la interacción de multitud de áreas como la química, la biotecnología, la física, la bioingeniería, la ciencia de materiales, la nanotecnología, y las ciencias clínicas.<sup>12</sup>

Así pues, es necesaria la colaboración de muchos profesionales para llegar a alcanzar los criterios ASSURED que sirven como directriz fundamental para garantizar que las pruebas diagnósticas no sólo sean eficaces, sino también prácticas para un uso generalizado y diverso, especialmente en entornos con recursos limitados.<sup>13</sup> El desarrollo de estos dispositivos fáciles de usar también tiene implicaciones económicas, tanto para personas con menos recursos con imposibilidad de acceder a análisis clásicos, como para personas con el deseo de participar en la gestión de su propia salud. Este último punto subraya el impacto en la asistencia sanitaria moderna, pero ambos casos son situaciones point-of-care.<sup>14</sup> Para poder conseguir esto, es necesario el diseño de nuevos dispositivos o realizar un rediseño o modificación de otros y buscar nuevas estrategias para la simplificación de ellos. Cuanto más simple, más público y mercado se abrirá al biosensor.

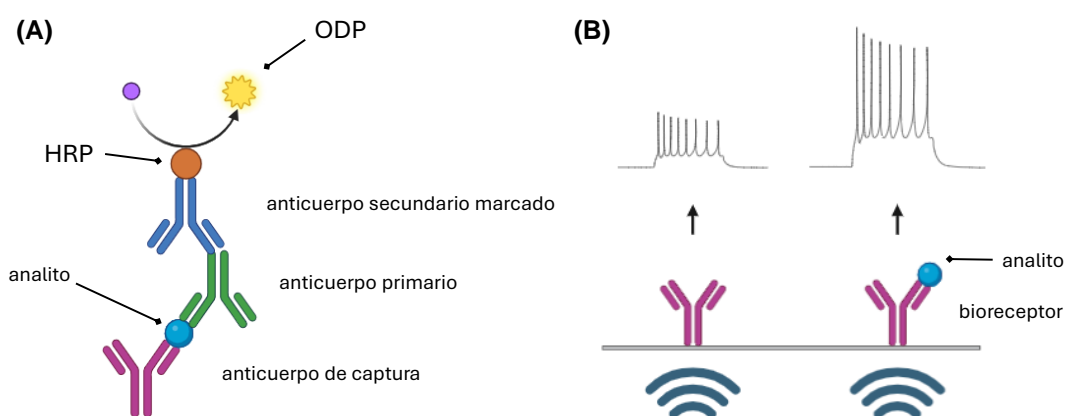
Mi TFG se centra en el desarrollo y caracterización de un biosensor óptico para el análisis directo, estando también enfocado en la simplificación de este, de modo que se van a introducir las bases de estos biosensores.

## 1.2. Detección sin marcaje

Generalmente, los eventos de reconocimiento bioreceptor-analito no son capaces de generar señales detectables por sí mismos, por lo que es necesario incorporar al ensayo elementos de marcaje conocidos como etiquetas (*labels*).<sup>15</sup> Estas etiquetas deben de conjugarse a los analitos o a bioreactivos que interactúen con ellas, algunas etiquetas ampliamente usadas en biosensado óptico son fluoróforos, enzimas, nanopartículas y radioisótopos (Figura 2A).<sup>15,16</sup> Estos sistemas basados en marcaje suelen requerir también de etapas de amplificación empleando sustratos enzimáticos y reveladores metálicos para obtener señales medibles.

Alternativamente, es posible también diseñar estrategias de biosensado en las que la unión entre el analito y el bioreceptor genera por sí misma una señal medible. Estas estrategias de transducción no requieren de la incorporación de marcadores, por lo que se conocen como sistemas sin marcaje (*label-free*)<sup>17</sup>(Figura 2B). Los sistemas con marcaje están muy instaurados en el campo, con ejemplos muy representativos como los ensayos tipo ELISA, y suelen presentar ventajas en cuanto a la sensibilidad resultante del ensayo. Por otro lado, el desarrollo de sistemas *label-free* es un campo emergente principalmente motivado por las soluciones que pueden aportar estos biosensores, de entre las cuales pueden desatacarse las siguientes:

- **Fiabilidad del resultado.** Existen fenómenos que pueden modificar las propiedades de los marcadores, generar señales que no provienen de la biointeracción de interés, y dar lugar a resultados erróneos (por ejemplo, falsos positivos y negativos). Algunos ejemplos de estos fenómenos son el quenching y photobleaching en fluoróforos, o la desnaturalización de enzimas de marcaje. Este problema se evita con sistemas *label-free* en los que la señal proviene directamente de la biointeracción de interés.<sup>17</sup>
- **Simplicidad.** Los sistemas *label-free* minimizan el número de etapas y la cantidad de bioreactivos necesarios para llevar a cabo el ensayo. Esta simplificación es especialmente interesante en el diseño de biosensores destinados a usuarios no especializados.



**Figura 2.** (A) Esquema de ensayo con marcaje con etiqueta enzimática (HRP) y revelado de ODP que causa un cambio colorimétrico. (B) Esquema de ensayo sin marcaje.

Un camino para el desarrollo de estos biosensores ópticos *label-free* es a través de la nanociencia y nanotecnología, que consigue aprovechar fenómenos de interacción luz-materia a escala nanoscópica para transducir eventos de bioreconocimiento.<sup>15</sup> Estos sistemas suelen basarse en superficies o interfaces nanoestructuradas sobre las cuales se dispone un ensayo de bioreconocimiento. Cuando los bioreceptores sobre la superficie se

unen a su analito, aumenta el grosor de la capa biológica en esta interfase. Estos nanomateriales están diseñados para modificar propiedades básicas de la luz (amplitud, fase, dirección, polarización, etc.) en función de este grosor.<sup>18</sup> Algunas de las técnicas más relevantes en el estado del arte que explotan estos fenómenos fisicoquímicos para biosensado óptico sin marcaje son:

- **Resonancia de plasmón superficial (SPR)**  
Se basa en la oscilación de electrones localizados en la superficie de nanoestructuras metálicas (plasmones) generada por una luz incidente.<sup>15,19</sup> Cuando las biomoléculas se unen a la superficie, se modifica la frecuencia resonante de los plasmones, y la medida de esta frecuencia permite transducir los eventos de bioreconocimiento.<sup>20,21</sup>
- **Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)**  
Consiste superficies metálicas nanoestructurada que, a través de fenómenos plasmónicos, consiguen amplificar la señal Raman de las biomoléculas que se encuentran sobre esta superficie.<sup>22</sup> De esta manera se obtiene la señal tipo *fingerprint* característica del espectro Raman, muy útil en la identificación de biomoléculas, en biocapas de grosor nanométrico y sin marcaje.<sup>23,24</sup>
- **Interferometría**  
La interferometría se basa en el análisis de la interferencia generada cuando dos o más haces de luz se combinan, y engloba muchas técnicas de biosensado *label-free* diferentes.<sup>15</sup> Una estrategia típica de biosensado interferométrico en el estado del arte emplea una configuración tipo interferómetro Mach-Zehnder.<sup>25</sup> En esta configuración, se divide un haz incidente en dos brazos, se realiza un ensayo en uno de ellos, y se combina de nuevo los dos brazos para generar la interferencia. La magnitud de esta interferencia depende del desfase introducido por el brazo con el ensayo, que a su vez depende del grosor de la biocapa.<sup>26</sup>

El proyecto de investigación de este trabajo fin de grado se centra en un nuevo fenómeno de transducción, poco explorado aun en el estado del arte, basado en la difracción óptica y en redes de difracción (*gratings*). En el siguiente apartado se revisan los principios fundamentales de las redes de difracción óptica y se introduce el concepto de Biogratings para biosensado sin marcaje.

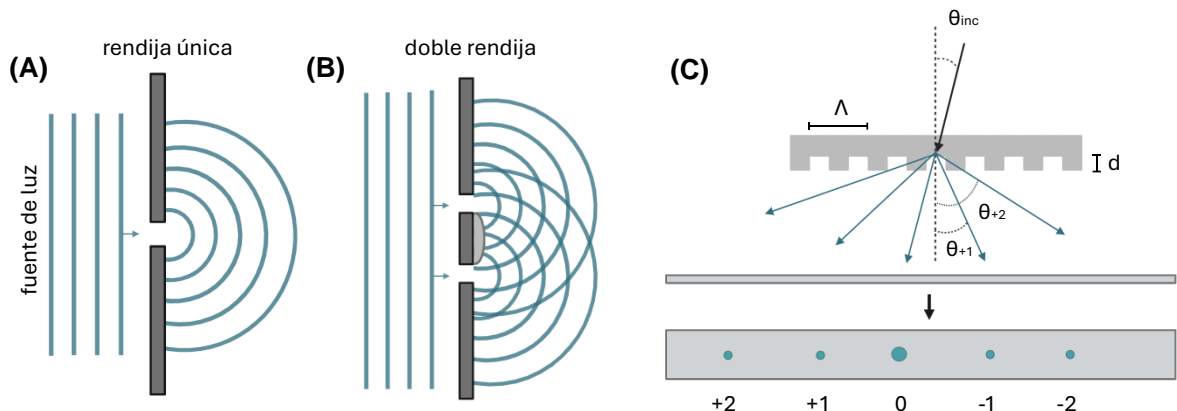
### 1.3. Difracción y biogratings

La difracción de la luz se debe a la naturaleza ondulatoria de esta. Cuando un haz de luz que se propaga mediante un frente de ondas plano interacciona con una rendija se generan nuevos frentes de onda curvados.<sup>18</sup> En este contexto entendemos como rendija cualquier elemento que introduzca una perturbación en la propagación de la luz, como por ejemplo una absorción de la radiación o un cambio en el índice de refracción. En el caso de una única rendija, la luz sufre una curvatura esférica y la apertura actúa como una fuente puntual de ondas circulares (Figura 3A). Si existen múltiples rendijas, las ondas circulares que emergen de cada apertura se solapan en fases diferentes, lo que genera interferencias constructivas y destructivas en la luz propagada (Figura 3B). Cuando múltiples rendijas se distribuyen de forma periódica, las interferencias en las ondas propagadas pueden dar lugar a múltiples haces que emergen con ángulos distintos. Llamamos órdenes de difracción a estos nuevos haces y patrón de difracción a su proyección sobre un plano (Figura 3C). Estos conjuntos de

rendijas que generan patrones de difracción se denominan redes de difracción, rejillas de difracción, o *gratings*, y este fenómeno ocurre cuando se cumplen las condiciones descritas en la ecuación del *grating*:<sup>27</sup>

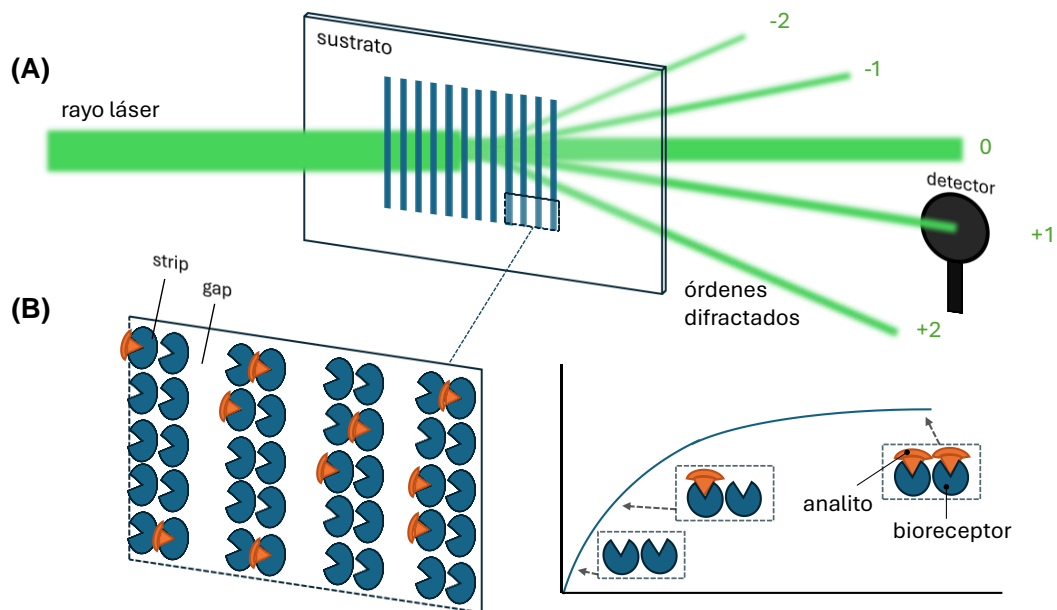
$$n_{trans} \cdot \sin \theta_m = n_{inc} \cdot \sin \theta_{inc} - m \cdot \frac{\lambda_0}{\Lambda} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

En esta ecuación, el índice de refracción del medio de propagación de la luz incidente y transmitida se denotan como  $n_{inc}$  y  $n_{trans}$ , respectivamente.  $\theta_m$  es el ángulo en el que incide la luz en la muestra,  $\Lambda$  es el periodo del *grating*,  $\lambda$  es la longitud de onda de la fuente de luz y los números enteros  $m$  se denominan órdenes de difracción y definen varios ángulos discretos ( $\theta_m$ ) que cumplen la condición de interferencias constructivas.



**Figura 3.** Esquema de la difracción de la luz al interactuar con (A) una rendija, (B) dos rendijas, y (C) una red de difracción.

El término *biograting* se refiere a una red difractiva formada por biorreceptores inmovilizados sobre sustratos sólidos planos (Figura 4). Es decir, son nanoestructuras difractivas donde las rendijas están constituidas por las propias biomacromoléculas. Por un lado, éstas introducen una modulación periódica del índice de refracción, que puede dar lugar a patrones de difracción. Por el otro, estas biomacromoléculas pueden también tener funciones de bioreconocimiento de otras biomoléculas. Cuando se incubaba una muestra sobre los *biogratings*, los eventos de unión entre biorreceptores inmovilizados y sus compuestos diana presentes en la muestra aumentan la cantidad de materia que constituye los *strips* en los *biogratings* (Figura 4B).<sup>28</sup> Cuando la cantidad de materia que constituye el *biograting* aumenta, se incrementa la intensidad luminosa de los órdenes difractados (Figura 4B). Como resado, eventos de bioreconocimiento se pueden cuantificar de forma simple y sin marcaje, empleando un detector de luz.<sup>28,29</sup>



**Figura 4.** Esquema de la transducción sin marcaje basada en biogratings y medidas de difracción óptica.

Hay pocos trabajos en el estado del arte en torno a los biogratings, que se centran principalmente en pruebas de concepto y demostración en inmunoensayos modelo para la determinación de analitos proteicos y compuestos orgánicos de bajo peso molecular,<sup>28,29</sup> en explorar estrategias de fabricación de estas nanoestructuras,<sup>30-32</sup> y en la integración de biogratings en sistemas miniaturizados basados en guías de onda.<sup>33,34</sup> También, los biogratings presentan un potencial único para minimizar los problemas asociados a la adsorción inespecífica en el análisis de muestras complejas. Esta capacidad ha sido explorada en investigaciones previas<sup>31,33</sup> y se describe más en detalle en la siguiente sección.

## 1.4. Adsorción inespecífica

La adsorción no específica o *non-specific binding* es un problema persistente que afecta negativamente a los biosensores, disminuyendo la sensibilidad, la especificidad y la reproducibilidad. Esta tiene lugar cuando se da la adhesión de moléculas/partículas en una superficie mediante fisorción, que es el resultado de fuerzas intermoleculares entre bioreceptores y moléculas de la muestra, siendo estas: fuerzas hidrofóbicas, interacciones iónicas, fuerzas de van der Waals y enlaces de hidrógeno.<sup>35</sup>

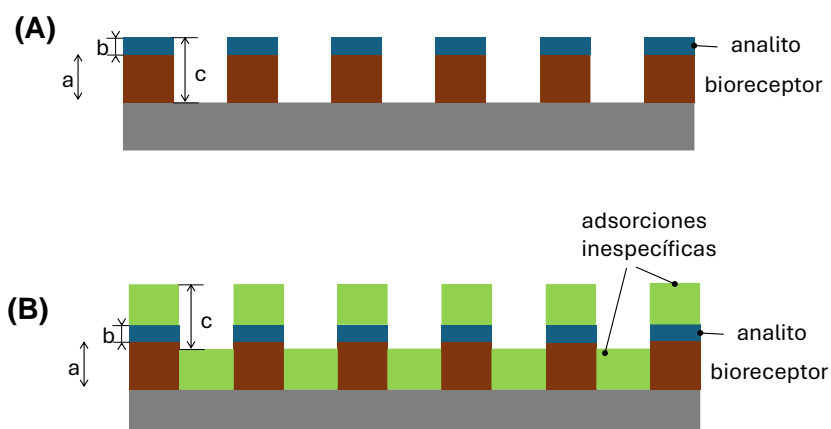
Esta es un problema crítico en la detección sin marcaje basada en superficies debido a la incapacidad de distinguir la señal que genera las uniones específicas de las inespecíficas, afectando la precisión y fiabilidad de los biosensores.<sup>21</sup> Es un fenómeno difícil de evitar, pues las superficies de los sensores entran en contacto con mezclas complejas de proteínas y otras moléculas la incubación de las muestras, y estas mismas son susceptibles a que se adsorban estos componentes.<sup>35</sup> En los métodos de detección sin marcaje clásicos (SPR, Interferometrías, etc.), esta adsorción provoca interferencias que dificultan la discriminación entre la señal específica y la no específica<sup>15,21</sup> que con frecuencia imposibilita el análisis directo de muestras reales.



La reducción de la adsorción inespecífica es crucial para mejorar la sensibilidad y especificidad de estos sistemas de detección.<sup>21</sup> Para tratar de minimizarla, con frecuencia estas superficies son pretratadas mediante agentes bloqueantes y el pretratamiento de muestras.<sup>36</sup> Sin embargo, estas estrategias no consiguen eliminar el problema en sistemas sin marcaje, y algunas de ellas como el pretratamiento de la muestra se alejan del criterio ASSURED.

Los biosensores ópticos basados en la difracción de sistemas de biograting presentan un potencial único para minimizar el efecto de las uniones no específicas. En estos sistemas, la adsorción inespecífica es un proceso aleatorio que no sigue ningún patrón definido, es decir, no genera acumulaciones periódicas de materia sobre la superficie. Las medidas basadas en la difracción tienen la característica de que la señal no se verá alterada si las contribuciones al crecimiento de la biocapa (o diferencia de altura entre strip y gap) no son periódicas.

En caso de que la adsorción inespecífica causara una acumulación uniforme, esta sería igual tanto en los *strips* como en *gaps*, no modificando la diferencia de altura entre ellos, la cual es responsable de generar variaciones en la intensidad de la señal. Sin embargo, los eventos de biorreconocimiento solo ocurren en las tiras del *grating* donde están inmovilizados los biorreceptores y sí siguen el patrón periódico del *grating*. Por lo tanto, si el biograting está diseñado y fabricado adecuadamente, únicamente la presencia de eventos específicos de biorreconocimiento promoverá la variación de intensidad de señales difractadas (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema de cómo puede afectar la adsorción inespecífica a un biograting. Biograting tras incubación de analito (A) sin adsorción inespecífica y (B) con adsorción inespecífica. Se observa como la adsorción inespecífica no modifica la diferencia de altura entre strip y gap ( $c = a + b$ ), y con ello no modifica la señal difractiva.

## 1.5. Hipótesis de partida

Tal y como se ha comentado anteriormente, las acumulaciones de materia que sigan una distribución aleatoria no generan una variación en la respuesta difractiva de los biogratings. Tan solo las acumulaciones periódicas y con el periodo definido por los biogratings generan una señal medible, y este fenómeno permite resolver problemas asociados con la adsorción inespecífica en el análisis de muestras reales complejas.

Este TFG persigue aprovechar este mismo principio para simplificar aun más el biosensado sin marcaje, omitiendo la etapa de limpieza tras la incubación de la muestra. En lugar de ello,

se propone simplemente retirar la disolución agitando el portaobjetos de vidrio y a continuación dejar secar a temperatura ambiente antes de registrar la señal. Tras este proceso, todos los componentes no volátiles presentes en la muestra quedarán depositados sobre la superficie de sensado, lo cual generaría una señal imposible de discriminar de la señal de interés en sistemas label-free convencionales. Sin embargo, puesto que esta acumulación de materia debe seguir una distribución aleatoria, tiene el potencial de no generar interferencias en el análisis con biogratings.

Esta estrategia, que llamamos *wash-free*, simplifica el proceso de análisis para usuarios no especializados, y se aproxima a las directrices ASSURED. Uno de los intereses principales de este trabajo es explorar esta capacidad.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es aprovechar las capacidades de los biogratings para simplificar aún más el proceso de análisis sin marcaje, para el desarrollo de biosensores point-of-care alineados con las directrices ASSURED.

Para la consecución de este objetivo general, se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Fabricar y caracterizar biogratings.
- Demostrar las capacidades de transducción sin marcaje de los biogratings.
- Explorar el análisis directo en una única etapa (*wash-free*) y su aplicación en muestras reales.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Materiales

Se preparó tampón fosfato sódico (PBS, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH = 7,4) y PBS-T (PBS con polisorbato 20 al 0,05% v/v), tampón de acoplamiento (200 mM NaHCO<sub>3</sub>, 500 mM NaCl, pH = 8,3), tampón A (500 mM etanolamina, 500 mM NaCl, pH = 8,3), tampón B (100 mM de acetato de sodio, 500 mM NaCl, pH = 4), tampón de unión (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,15 M NaCl, pH = 7,4), tampón de elución (100 mM glicina, 500mM NaCl, pH = 3), y tampón de almacenamiento (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7). Todos los tampones se prepararon con agua ultra pura (Milli-Q, Millipore Ibérica, Darmstadt, Alemania) y se filtraron a través de membranas de polietersulfona de 0,2 µm (Merck, Darmstadt, Alemania).

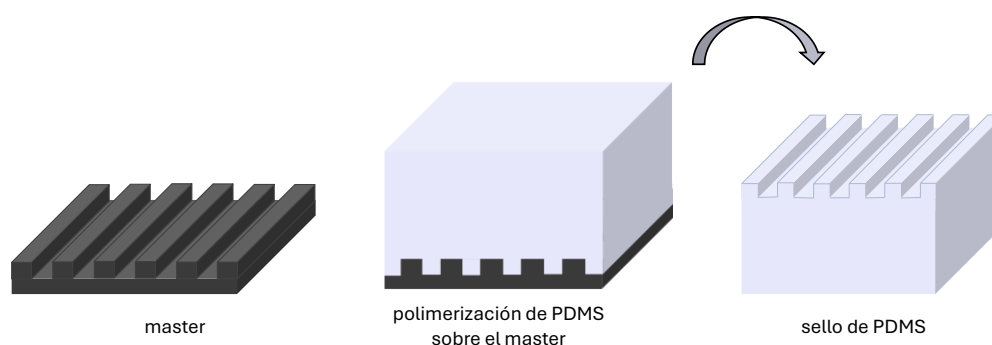
Albúmina sérica bovina (BSA), albúmina sérica humana (HSA), antisuero de IgGs policlonales antiBSA producida en conejo (antiBSA), anticuerpos anticonejo producidos en cabra (GAR), GAR marcados con nanopartículas de oro de 5 nm (GAR-Au), suero humano, desarrolladores de señal de plata, y polisorbato 20 (Tween 20) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España), Zumo de manzana (Granini, contenido en proteínas < 5 g/L, contenido en azúcares

97 g/L). Kit de conjugación a Alexa Fluor 647 fue adquirido de Abcam (Cambridge, Reino Unido). El polidimetilsiloxano (PDMS) Sylgard 184 fue suministrado por Dow Corning (Wiesbaden, Alemania). Los portaobjetos de vidrio (25 × 75 × 1 mm) se adquirieron de Labbox (Barcelona, España), columna de purificación antiBSA (HiTrap NHS-activated HP) fue proporcionada por Cytiva (Uppsala, Suecia).

### 3.2. *Microcontact-printing*

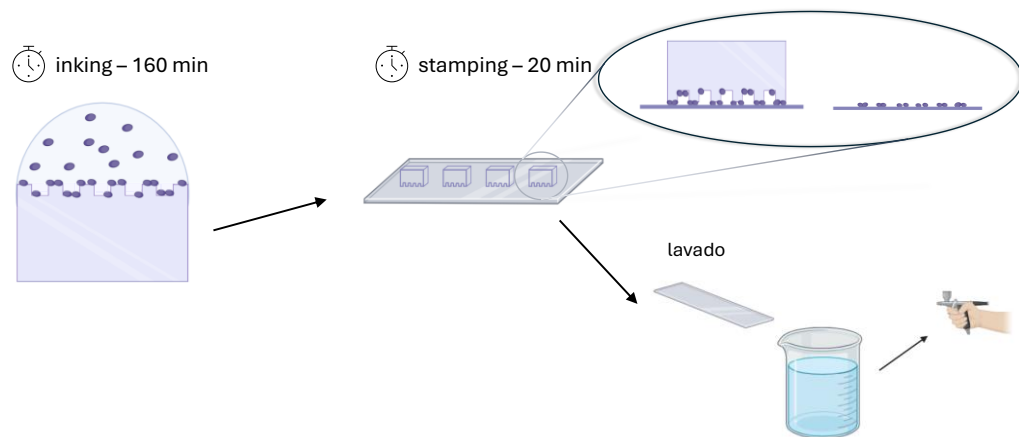
Los biogratings, en este TFG se fabricaron sobre portaobjetos de vidrio mediante *microcontact-printing* ( $\mu$ CP). Esta técnica involucra tres pasos principales: la fabricación de sellos de PDMS, el “*inking*” de proteínas, y el estampado.

Para fabricar los sellos (Figura 6) se vertió PDMS (elastómero:agente de curado, 10:1 v/v) sobre un molde nanoestructurado (*master*) de silicio (555 nm de periodo, adquirido de LightSmyth) se desgasificó en una cámara de vacío durante unos 10 minutos, y se dejó polimerizar durante la noche a 60 °C. Posteriormente se separó el sello de PDMS del patrón o master y se cortó en piezas cuadradas de unos 4x4 mm. Antes de ser utilizados, los sellos cortados y portaobjetos de vidrio se lavaron 3 veces (durante 5 min) en una solución de lavado (30 % de etanol en agua) en baño de ultrasonidos, y después se secaron bajo una corriente de aire.<sup>29</sup> También se colocaron sobre los portaobjetos de vidrio adhesivos con un orificio circular para cada biograting para delimitar la zona de incubación de las distintas muestras en las etapas posteriores.



**Figura 6.** Obtención sellos de PDMS a partir de molde de silicio o *master*.

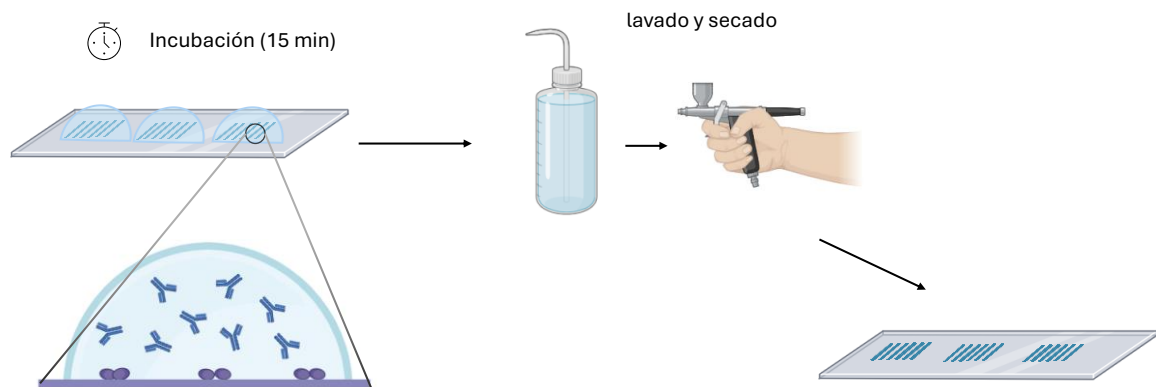
Para realizar el *inking* (Figura7), se incubó 45  $\mu$ L de disolución de proteína sonda (BSA o HSA) a 250  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  en tampón PBS durante 160 min sobre el lado nanoestructurado de los sellos de PDMS con el fin de que la proteína se quede adsorbida. A continuación, los sellos se lavaron por inmersión con agua ultra pura y se secaron bajo una corriente de aire. Para estampar el patrón en el sustrato (Figura 7), el lado nanoestructurado del sello de PDMS se puso en contacto con el sustrato de vidrio, e inmediatamente después se aplicó una leve presión sobre el sello estampado para eliminar el aire que pudiera quedar entre el sello y el sustrato. Los sellos permanecieron durante 20 min en el sustrato (tiempo de *stamping*), para que por fisiorción o adsorción pasiva las proteínas queden inmobilizadas en el sustrato. Pasado este tiempo, se retiraron los sellos del sustrato de vidrio y los portaobjetos se lavaron con agua ultrapura y se secaron con una corriente de aire.



**Figura 7.** Representación del proceso de  $\mu$ CP para generar fabricar biogratings de proteínas sobre superficies de vidrio.

### 3.3. Inmunoensayos

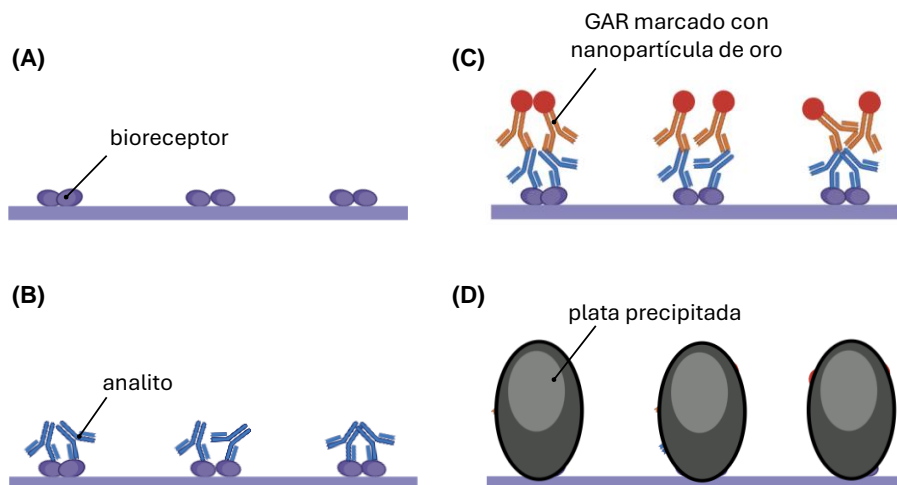
Para realizar los ensayos convencionales sin marcaje, se incubaron 50  $\mu$ L de las disoluciones de muestra a temperatura ambiente durante 15 min, sobre los biogratings previamente fabricados por *microcontact-printing*. A continuación, las zonas de ensayo fueron lavadas con PBS-T y agua, y secadas bajo una corriente de aire (Figura 8). Se fabricaban 4 réplicas para cada condición de ensayo en cada portaobjetos.



**Figura 8.** Esquema de incubación y limpieza.

Para realizar los ensayos con marcaje, el protocolo anterior se continuó incubando un anticuerpo secundario con nanopartículas de oro (GAR-Au) a dilución 1:100 en PBS-T durante 15 min. Seguidamente, se incubaron 50  $\mu$ L de disolución reveladora de plata en cada zona de ensayo, y pasados 8 minutos se retiró la disolución, se lavó con agua pura, y se secó en corriente de aire. Este revelado de señal genera una coloración gris sobre las zonas de ensayo gracias a que las nanopartículas de oro son capaces de actuar como centros de nucleación de la plata metálica fruto de la reducción de iones de plata en presencia de un agente reductor (hidroquinona) (Figura 9).<sup>37</sup>

Para realizar los ensayos convencionales sin marcaje y sin lavado (*wash-free*), se incubaron 50  $\mu\text{L}$  de las disoluciones de muestra a temperatura ambiente durante 15 min, sobre los biogratings. A continuación, se detuvo el inmunoensayo volcando el portaobjetos de vidrio y sacudiéndolo moderadamente para retirar la muestra líquida, y se esperó hasta que el líquido evaporase en su totalidad.



**Figura 9.** Esquemas de inmunoensayo con marcaje: (A) Biograting, (B) tras incubar analito, (C) tras incubar GAR-Au, (D) después de la precipitación de plata.

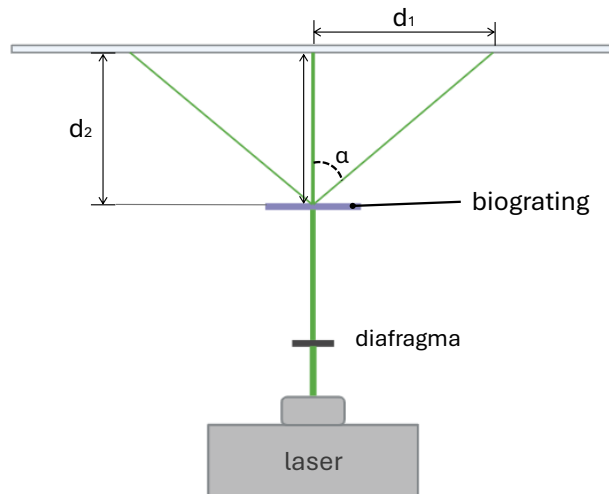
### 3.4. Medidas de difracción

Se realizaron dos tipos de medidas de la respuesta difractada de biogratings empleando montajes optomecánicos distintos: medida de los patrones difracción y cuantificación de la intensidad de difracción.

Para las medidas del patrón de difracción se irradiaron los biogratings con láseres de distintas longitudes de onda: 405 nm (100 mW, MLL-III-405, CNI, Changchun, China), 532 nm (100 mW, 100 mW, MGL-III-532/1, CNI, Changchun, China) y 642 nm (100 mW, MLL-III-647, CNI, Changchun, China). En todos los casos se colocó un diafragma entre el láser y el biograting para minimizar el ruido luminoso. Para los láseres de 405 y 532 nm, el portaobjetos de vidrio se colocó a 29 cm del láser en posición ortogonal, y el láser incidió con un ángulo de  $90^\circ$ . El montaje para el láser de 642 nm se diseñó para que el ángulo de incidencia fuera aproximadamente  $45^\circ$  respecto al plano ortogonal, para que se cumplieran las condiciones de difracción en *gratings* de 555 nm para esa longitud de onda. Los órdenes de difracción se proyectaron sobre un plano ortogonal a la fuente laser y se tomaron las distancias desde los órdenes 1 hasta el orden 0 (Figura 3C). Una vez tomadas las medidas, se calculó el ángulo de difracción empleando la siguiente relación trigonométrica:

$$\alpha = \tan^{-1} \left( \frac{d_1}{d_2} \right) \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Donde  $\alpha$  es el ángulo de difracción del orden 1,  $d_1$  es la distancia desde el orden 0 hasta el orden 1 en el patrón de difracción, y  $d_2$  es la distancia desde el biograting al plano de proyección del patrón de difracción (Figura 10).

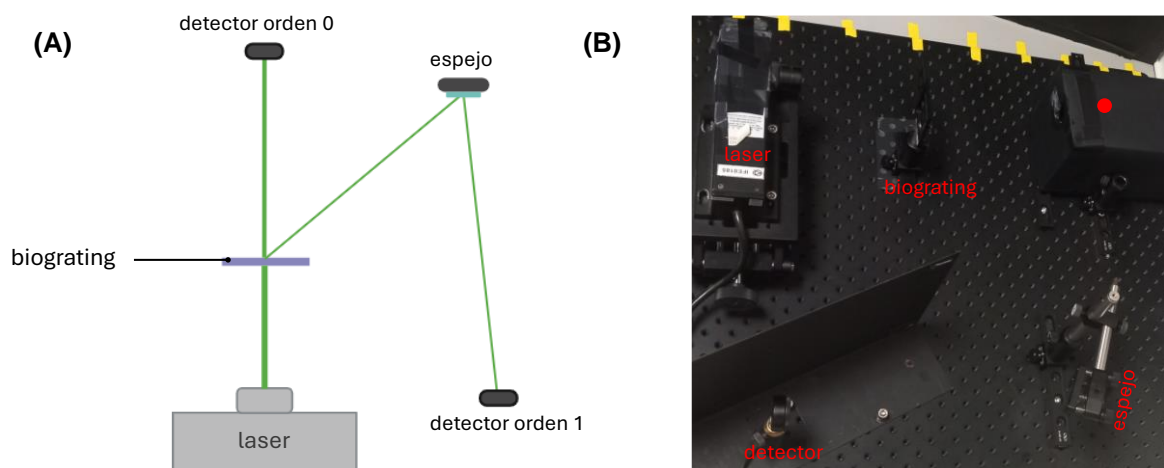


**Figura 10.** Esquema del montaje de medida para analizar los patrones de difracción.

Para la cuantificación de la intensidad de difracción, se montó un sistema con la configuración mostrada en la Figura 11. Los portaobjetos de vidrio se ajustaron para ser irradiados ortogonalmente en la zona del biograting de proteínas por una fuente láser de 532 nm. La intensidad del orden 0 y del orden 1 de cada biograting se cuantificó utilizando un fotosensor puntual (PM100D, Thorlabs, EE.UU.). En este trabajo, se empleó la eficiencia de difracción (ED) de los biogratings de proteínas como la señal analítica, que se calculó a partir de estas medidas como se indica en la siguiente ecuación:

$$ED = \frac{\text{Intensidad orden 1}}{\text{Intensidad orden 0}} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

El resultado para una medición se obtiene con la media y desviación estándar de las 4 réplicas fabricadas para cada condición.



**Figura 11.** (A) Esquema y (B) fotografía del montaje utilizado para cuantificación de la intensidad de difracción. Para medir la intensidad del orden 0, se situaba el detector al punto en rojo de la figura B.

Tras haber obtenido los datos de las medidas difractivas, se empleó el software Sigmaplot para ajustar los datos experimentales a una curva sigmoideal (4 parámetros, Ecuación 3).

$$y = y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

También se estimó el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOC) para cada caso. Se determinaron los límites estimados a partir de 4 réplicas del blanco o 0 para cada ensayo. Las señales de LOD y de LOC se calculan según las siguientes ecuaciones:

$$S_{LOD} = \bar{x}_B + 3S_B \quad \text{(Ecuación 5)}$$

$$S_{LOC} = \bar{x}_B + 10S_B \quad \text{(Ecuación 6)}$$

Donde S es la señal,  $\bar{x}_B$  es la media de todas las medidas del blanco, y  $S_B$  es la desviación estándar de las réplicas del blanco. Para conocer las concentraciones de LOD y de LOC se interpolan estos valores en la ecuación correspondiente en cada caso.

### 3.5. Métodos de caracterización

Las medidas de ángulo de contacto se realizaron empleando un equipo comercial específico para estas medidas (Attension Theta Lite, Biolin Scientific, Gotemburgo, Suecia). Básicamente, el equipo consiste un soporte para la muestra que se desea analizar, una jeringa sobre este, una cámara que registra los volúmenes y las gotas dispensadas, y un software que calcula el ángulo entre la superficie y la tangente de la gota. En este estudio se emplearon gotas de 2  $\mu$ L de agua pura.

Para cuantificar las señales de fluorescencia en los inmunoensayos con anticuerpos marcados con fluoróforos, se empleó un escáner de fluorescencia comercial (Sensospot, Miltenyi Imaging). Las medidas se realizaron con 100 ms de exposición en el láser rojo y la cámara situada a 6 mm de altura. Los datos resultantes se analizaron con el software GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices, San José, California, EE.UU.).

Para registrar las señales colorimétricas obtenidas en el ensayo con revelado de plata, se realizaron fotografías de los portaobjetos de vidrio con los biogratings revelados, usando un teléfono móvil convencional. La intensidad de negro de estas señales colorimétricas se analizó con el software Genepix pro 6.0.

La topografía de las nanoestructuras resultantes se analizó mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) utilizando un microscopio Bruker Multimode 8 (Bruker, Massachusetts, EE.UU.) con sondas RFESPA (MPP-21120-10 Bruker). Las imágenes AFM se analizaron utilizando el software Nanoscope (Bruker). Para calcular los perfiles de sección transversal promediados, se aplanaron todas las imágenes utilizando un ajuste polinómico del orden conveniente, esto permitió corregir los errores de deformación del plano que a veces comete el equipo de medición, y se promedió la altura de cada fila de datos a lo largo de la dirección longitudinal de las tiras de patrón. A partir de estas secciones transversales, la modulación de altura se calculó como el promedio de la altura máxima del strip restada a la mínima del gap. El periodo se calculó como el promedio de la distancia entre un máximo de un strip y el máximo del

siguiente strip. Y, el ciclo de trabajo se calculó como el porcentaje de la anchura promediada de los strips con respecto al periodo.

### 3.6. Cromatografía de inmunoafinidad

El antisuero antiBSA fue purificado para aislar los anticuerpos específicos del resto de especies contenidas en el suero, mediante cromatografía de inmunoafinidad. Este proceso consta de varias etapas y se realizó con columnas comerciales funcionalizadas para el anclaje covalente del antígeno (columna HiTRAP NHS, Fisher Scientific). La primera etapa es el acoplamiento del antígeno a la fase estacionaria de la columna, para lo cual se disolvieron 10 mg de proteína BSA en 1 ml de tampón de acoplamiento, se eluyó esta disolución por la columna, se cerró la columna por ambos extremos y se dejó incubar 2 horas a 4 °C. Pasado este tiempo, para el lavado y desactivación de la columna, se eluyó por la columna 2 ml de tampón A 3 veces, seguido de 2 ml de tampón B, y ambos lavados se repitieron del mismo modo 2 veces más.

Para cargar los anticuerpos en la columna, se eluyeron 3 ml de tampón de unión, 3 ml de tampón de elución y 10 ml de tampón de unión. Paralelamente se preparó el antisuero a purificar diluyendo 1,2 ml de antisuero en 2,5 ml de tampón de unión, y filtrándolo con un filtro previamente limpiado tampón de unión. A continuación, la disolución de antisuero se eluyó por la columna y se dejó recirculando toda la noche a 4 °C con la ayuda de una bomba peristáltica. Al día siguiente se lavó la columna con 10 ml de tampón de unión y se prepararon 7 tubos de 1.5 mL con 100 µl de tampón TRIS 1 M. Se eluyó con 7 ml de tampón de elución recogiendo fracciones de 1 ml sobre los tubos preparados. Tras utilizar la columna, se re-equilibró eluyendo 10 ml de tampón de unión y se guardó con tampón de almacenamiento. Se midieron en nanodrop las concentraciones de proteína obtenidas en las distintas fracciones. Finalmente, se agruparon las fracciones eluidas y se les realizó un cambio de tampón (de tampón de elución a PBS) utilizando filtros de centrifugación (30 KDa, 14000 rev/min durante 5 min a 4°C) (Pierce Concentrator ,PES, 3K MWC0, 0.5 ml,Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización de los biogratings

La primera etapa experimental en esta investigación pasa por la fabricación de nanoestructuras difractivas de proteínas (biogratings) sobre superficies sólidas. El proyecto persigue una prueba de concepto empleando un inmunoensayo modelo basado en BSA como receptores proteicos y anticuerpos selectivos antiBSA como analitos. Éste es un sistema modelo representativo y ampliamente utilizado en el área del biosensado para estudios de demostración de concepto.<sup>38</sup> Se fabricaron biogratings de BSA sobre sustratos de vidrio mediante *microcontact-printing*, y esta sección se centra en estudiar los biogratings resultantes a tres niveles de caracterización:



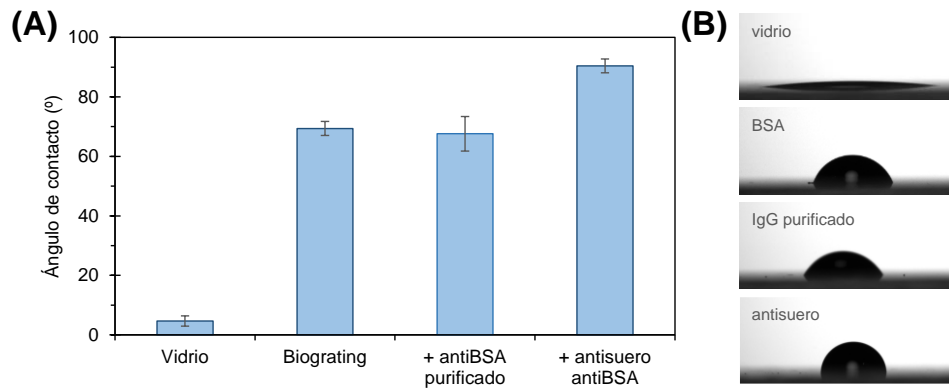
- Inmovilización:  
Que la proteína se encuentre inmovilizada en la zona de ensayo del portaobjetos de vidrio implica que la transferencia por *microcontact-printing* ha sido exitosa y la proteína ha quedado adsorbida sobre la superficie. La inmovilización es el primer paso para que la proteína que actúe como bioreceptor y esté disponible para interactuar con el analito presente en la muestra.
  
- Funcionalidad:  
El término funcionalidad denota que la estructura tridimensional de la proteína es la adecuada y para que posea su actividad biológica. En este estudio, la funcionalidad implica que la proteína puede actuar como molécula de bioreconocimiento uniendo las moléculas diana. Es decir, que los parátomos de la BSA mantienen su conformación tras la inmovilización. Este es un parámetro clave a estudiar, ya que se ha reportado que la *microcontact-printing* puede comprometer esta funcionalidad.<sup>30</sup>
  
- Estructuración:  
La obtención de una red periódica nanoestructurada de proteínas es fundamental en estos biosensores ópticos difractivos, ya que, la periodicidad del *grating* es el origen de la difracción, y su intensidad es la señal que será cuantificada. El término estructuración denota que proteína se ha inmovilizado siguiendo este patrón nanoestructurado.

A continuación, se presentan y discuten evidencias experimentales obtenidas mediante distintas técnicas que se complementan para la caracterización los biogratings a estos tres niveles.

#### 4.1.1. Ángulo de contacto

Este ensayo consiste en medir el ángulo que forma la tangente del contorno de una gota de agua cuando se encuentra en contacto con una superficie sólida. El ángulo de contacto varía en función de la hidrofilia o polaridad de la superficie en cuestión. En el caso de gotas de agua, el ángulo de contacto disminuye cuando la polaridad (o hidrofilia) de la superficie aumenta.

Se midió el ángulo de contacto entre una gota de 2  $\mu\text{l}$  de agua y las siguientes superficies: vidrio, biograting de BSA, biograting de BSA tras incubar 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de antiBSA purificado, biograting de BSA tras incubar 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de antisuero antiBSA. Como se observa en la Figura 12, el agua se expande muy fácilmente sobre la superficie de vidrio, formando un ángulo de contacto reducido debido a la alta polaridad del vidrio. En cambio, en el resto de superficies no se encuentra una expansión semejante. Considerando la composición de las superficies, el vidrio presenta una mayor hidrofilia en comparación con las biocapas de proteínas. Aunque las proteínas contienen grupos polares y cargados, su polaridad neta total es menor en comparación con la del vidrio cuyo enlace Si-O es altamente polar.



**Figura 12.** Medidas del ángulo de contacto de una gota de agua sobre distintas superficies: vidrio, biograting de BSA, biograting tras de incubar 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IgGs antiBSA purificadas, y biograting de BSA después de incubar 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpo antiBSA en antisuero. (A) Resultados del ángulo de contacto. (B) Imágenes tomadas de las gotas que se originaban en las distintas muestras.

El aumento del ángulo de contacto de más de  $60^\circ$  desde el vidrio al resto de superficies indica una disminución en la hidrofilia de la superficie (Figura 12). Este cambio hacia mayor hidrofobicidad evidencia que hay proteína inmovilizada en la superficie, y que el proceso de *microcontact-printing* ha logrado satisfactoriamente la transferencia e inmovilización de proteína.

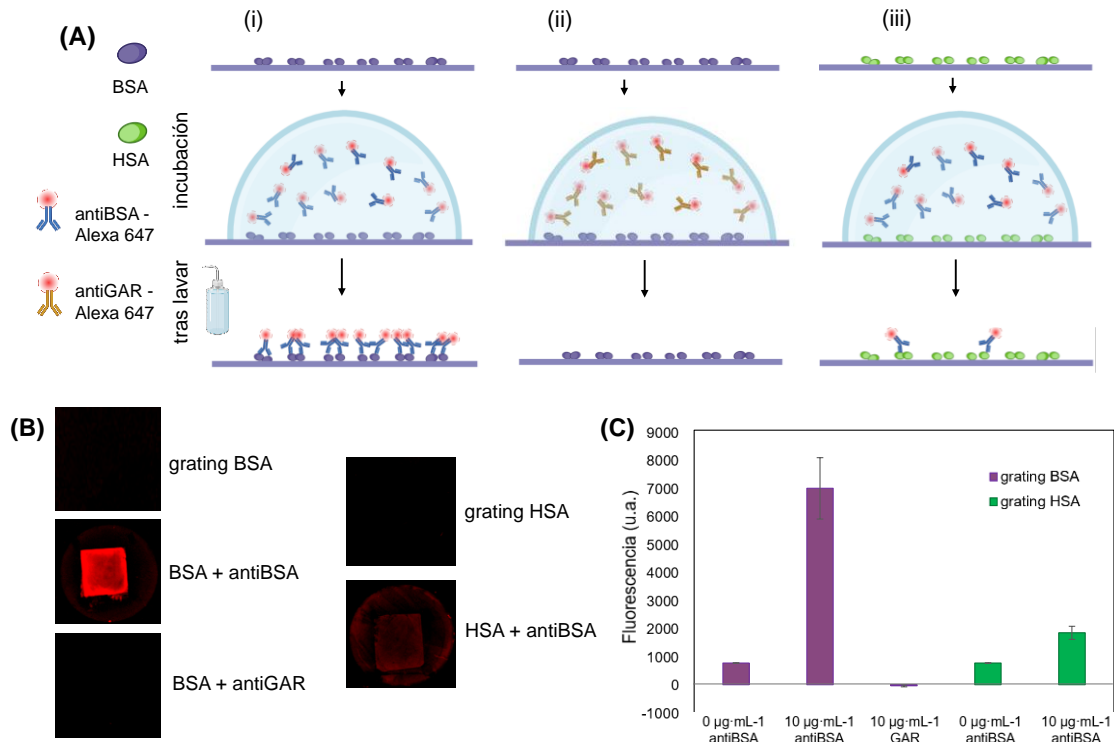
Por otra parte, se puede contemplar que el ángulo de contacto no aumenta entre las superficies de biograting de BSA antes y después de incubar anticuerpo específico purificado. Un incremento en la biocapa podría suponer un aumento de la hidrofobicidad de la superficie. Sin embargo, este aumento de la biocapa puede referirse tanto al espesor como al porcentaje de recubrimiento de la superficie de vidrio. Que en este ensayo no haya un cambio en el ángulo de contacto entre estas dos condiciones, no permite determinar si la proteína inmovilizada es funcional o no.

Por otro lado, se observa un aumento significativo del ángulo de contacto en el conjunto de muestras al haber incubado antisuero de antiBSA. Esta variación en el ángulo refleja un aumento de la hidrofobia de la superficie, que a su vez implica que sí ha habido un aumento de la biocapa. Este fenómeno puede atribuirse al hecho de que el suero que se incubaba no está purificado y contiene muchos otros componentes (en su mayoría proteínas), estos se habrían adsorbido inespecíficamente en strips y gaps del *grating*, aumentando la biocapa y provocando el cambio en la hidrofilia de la superficie. Si este proceso ocurre en los gaps del biograting, se incrementa la superficie de vidrio cubierta por proteína.

Este experimento pone de manifiesto que se logra la inmovilización de la proteína, y también que pueden existir procesos de adsorción inespecífica en la incubación de muestras reales.

#### 4.1.2. Escáner de fluorescencia

Para caracterizar los biogratings de BSA, se estudian también las nanoestructuras mediante escáner de fluorescencia, utilizando anticuerpos marcados con fluoróforos. Para ello, se incubó antiBSA marcado con Alexa 647 sobre biogratings de BSA (Figura 13 A i), y se incluyeron también controles negativos con biogratings de BSA (Figura 13 A ii) y HSA (Figura 13 A iii). En este experimento, las señales de fluorescencia en las áreas en la que se encuentran los biogratings provienen de la unión específica del anticuerpo a su antígeno. Por tanto, estas señales indican que la proteína está inmovilizada y que la proteína es funcional.



**Figura 13.** Caracterización con escáner de fluorescencia: (A) esquema del ensayo: (B) Imágenes de los biogratings capturadas con el escáner de fluorescencia. (C) Intensidades de fluorescencia registradas en las distintas condiciones.

Según se aprecia en las imágenes de fluorescencia (Figura 13 B) los controles negativos de este ensayo (*grating* BSA, *grating* de BSA + antiGAR y *grating* HSA) no emitieron ninguna señal de fluorescencia. Sí lo hicieron el control positivo con *grating* de BSA con incubación de antiBSA marcado, como era de esperar. Se observa también una señal baja en el biograting de HSA con incubación de antiBSA marcado en toda la zona de ensayo, no sólo donde se encuentra el biograting si no también en la superficie de vidrio sin biograting.

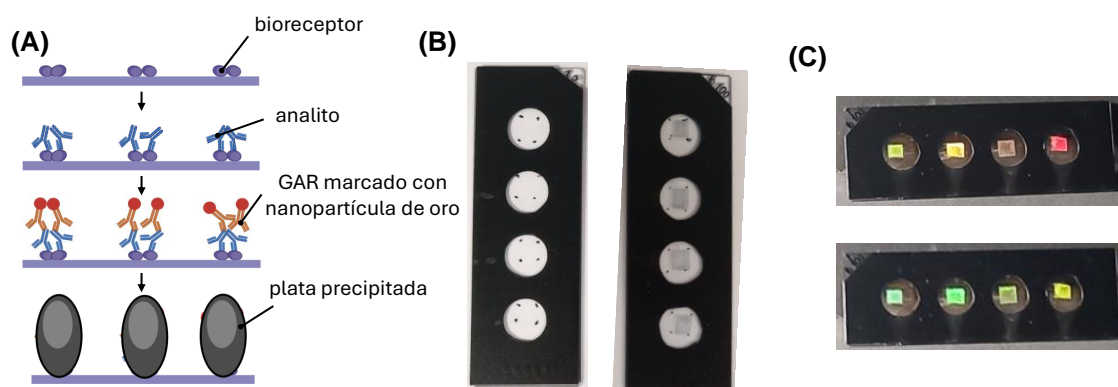
En la Figura 13 C se observa la correlación entre la intensidad de fluorescencia y las imágenes vistas a través del escáner. La señal mostrada por las muestras de *grating* de BSA y de HSA, es ruido de fondo, proviene de la dispersión de la luz del escáner. La señal negativa para la muestra de *grating* de BSA habiendo incubado antiGAR marcado podría provenir de una ligera adsorción de las proteínas marcadas en el antisuero GAR, en la zona del sustrato de vidrio no cubierta con proteína (fuera del biograting). También, en el control positivo de biograting de BSA con antiBSA marcado, la fluorescencia observada fue muy superior a las demás muestras. En cuanto a la baja fluorescencia mostrada en la muestra *grating* HSA + 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$

antiBSA Alexa 647, resulta ligeramente más intensa en la zona del biograting. Esto se podría deber a una ligera reactividad cruzada del anticuerpo, ya que HSA y BSA son proteínas homólogas y poseen regiones comunes que podrían actuar como parátomos para los anticuerpos policlonales utilizados.

Recapitulando, la BSA inmovilizada cumple su función como molécula de captura de su analito (antiBSA). Asimismo, además de la funcionalidad, estos resultados corroboran de nuevo que al proteína está inmovilizada, ya que en caso contrario no habrían señales de fluorescencia en la zona de ensayo.

#### 4.1.3. Ensayo con revelado de plata

El revelado de plata es una técnica de marcaje que permite la visualización directa del biograting. Tras el ensayo convencional, este revelado incluye la incubación de un anticuerpo selectivo marcado con nanopartículas de oro, y posteriormente la incubación de una disolución acuosa de  $\text{Ag}^+$  junto con hidroquinona.<sup>37</sup> Los cationes  $\text{Ag}^+$  se reducen al reaccionar con la hidroquinona y precipitan como plata metálica sobre las nanopartículas de oro que actúan como centro de nucleación (Figura 14 A). Esta precipitación es observable a simple vista con una coloración gris metálico.



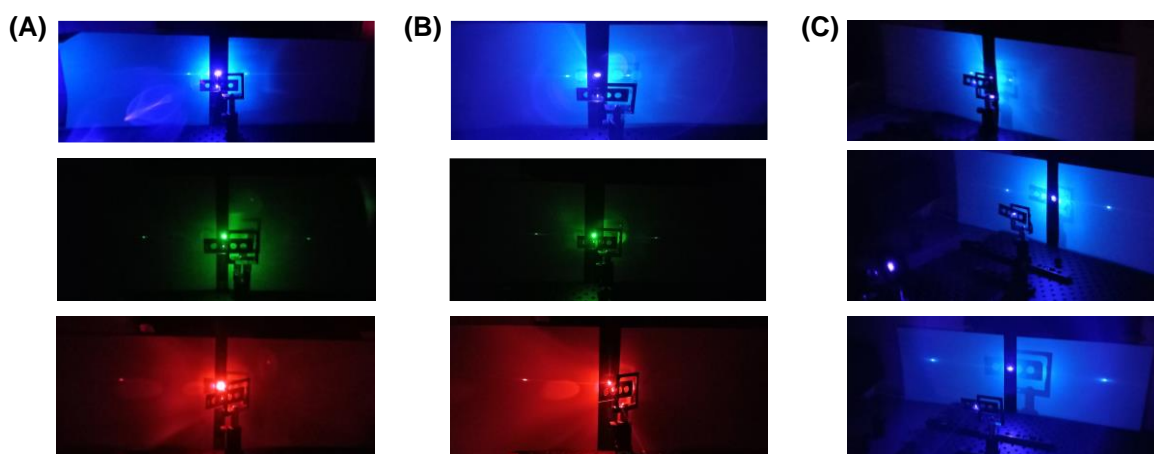
**Figura 14.** (A) Esquema del ensayo con revelado de plata. (B) Fotografía de biogratis de BSA tras incubar 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (izquierda) y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (derecha) de antiBSA. (C) Fotografías de la difracción de luz blanca en biogratis de BSA tras realizar el ensayo (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de antiBSA) y realizar revelados con plata, capturadas desde distintos ángulos.

Presentados los resultados de la Figura 14 B, se observa un cambio de intensidad de color gris en la zona del biograting al incubar el anticuerpo específico y revelar con plata. Esto evidencia tanto la presencia de la proteína estampada inicialmente (inmovilización), así como que la proteína BSA es funcional, pues fue capaz de unirse a su analito antiBSA en la primera etapa de este ensayo (Figura 14 A).

Además de la visualización de las señales colorimétricas, se estudió también la respuesta difractiva de los biogratings tras el revelado con plata. Se observó una descomposición de la luz blanca en la zona de los biogratings (Figura 14 C), con la iridiscencia típica de los *gratings* de difracción. La precipitación de la plata provoca que la modulación del índice de refracción del *grating* se incremente masivamente, y esto da lugar a que las propiedades ópticas del *grating* puedan observarse a simple vista. Así pues este resultado indica que el biograting está nanoestructurado según una estructura de *grating* de difracción.

#### 4.1.4. Estudio del patrón de difracción

Para estudiar el patrón de difracción, se irradian los mismos biogratings con láseres de distintas longitudes de onda (405 nm, 532 nm, y 647 nm). Los resultados mostrados en la Figura 15 evidencian que la proteína ha sido inmovilizada, y principalmente que esta inmovilización se encuentra nanoestructurada según un patrón periódico que cumple con las condiciones descritas en la ecuación del *grating* para las longitudes de onda empleadas (Ecuación 1).



**Figura 15.** Fotografías del patrón de difracción de (A) un biograting de BSA y (B) un biograting de BSA tras incubación 100 µg/mL antiBSA, irradiados con láseres de distintas longitudes de onda: 405 nm (color azul), 532 nm (color verde), 647 nm (color rojo). (C) Fotografías del patrón de difracción con láser de 405 nm donde la muestra se encuentra a distintas distancias del plano de proyección del patrón de difracción. La distancia aumenta en las imágenes de arriba abajo.

En la Figura 15 A y B se observa a simple vista que la distancia del orden 0 a los órdenes -1 y +1 se incrementa conforme aumenta la longitud de onda del láser que la irradia. Asimismo, no se muestran cambios en las distancias entre el orden 0 y 1 antes y después de incubación con el analito, lo que indica que esta incubación no modifica el periodo del biograting.

Por un lado, la aparición del patrón de difracción proporciona evidencias sobre la nanoestructuración de las proteínas inmovilizadas. Por el otro, estas medidas permiten caracterizar parámetros estructurales del biograting. A partir de las distancias entre el orden 1 y el 0 se puede determinar el ángulo de difracción del orden 1 trigonométricamente (Ecuación 2), y a partir de este ángulo se puede determinar el periodo de la nanoestructura empleando la ecuación del *grating* (Ecuación 1). Los resultados (Tabla 1) muestran un periodo para el biograting de unos 550 nm, lo cual es consistente con el máster empleado para fabricar los sellos de PDMS, que tiene un periodo de 555 nm.

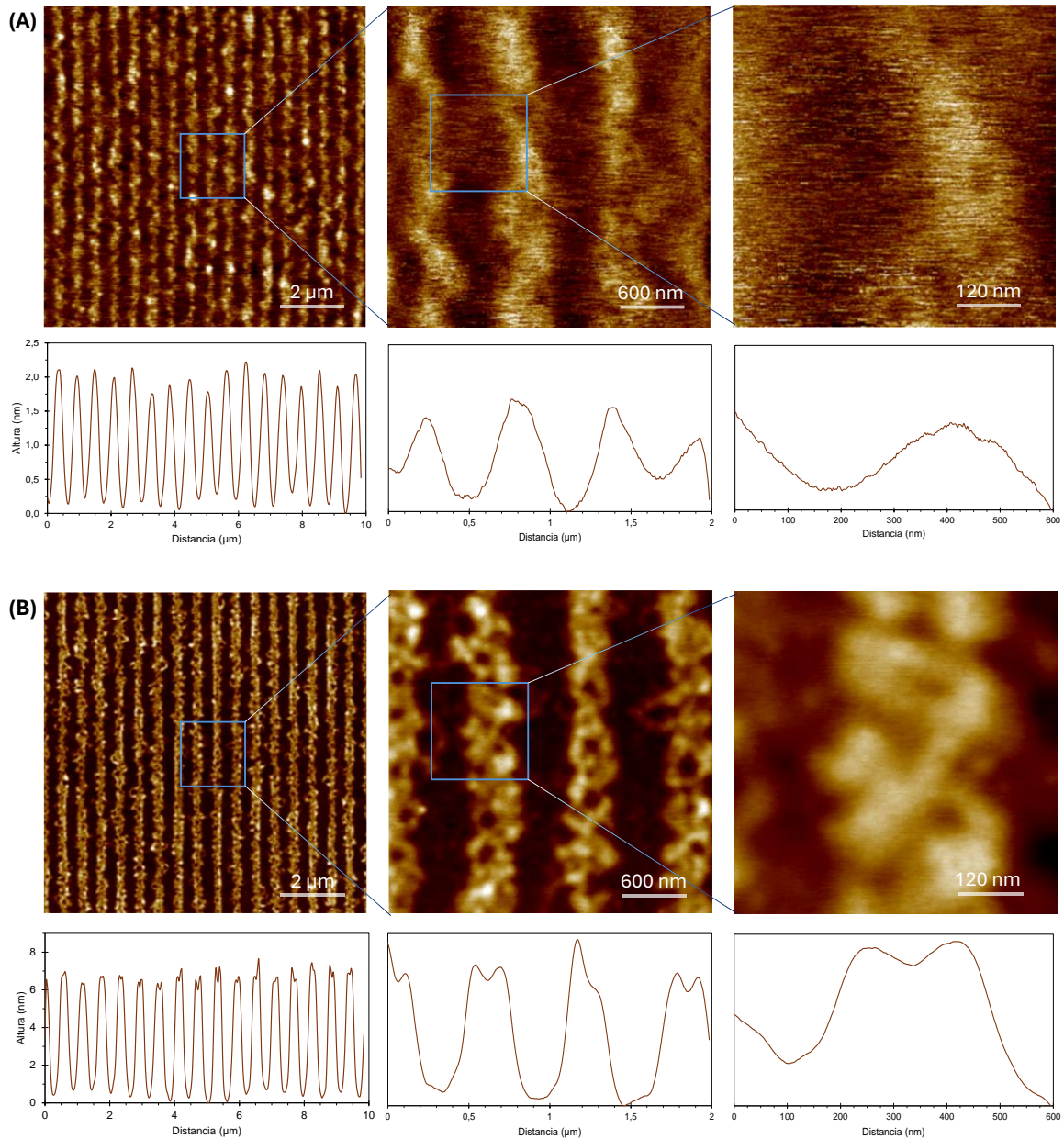
Como una confirmación adicional de la nanoestructuración de las biocapas, la Figura 15 C muestra como la distancia que separa los órdenes difractados a una misma longitud de onda, varía junto con la distancia entre las muestras y el plano de proyección del patrón de difracción, de acuerdo con lo esperado para *gratings* de difracción (Ecuación 1 y 2).

**Tabla 1.** Ángulos de difracción del orden 1 y periodos resultantes del estudio de las dimensiones del patrón de difracción de biogratings BSA irradiados a distintas longitudes de onda.

	<b>Láser azul</b> $\lambda = 405 \text{ nm}$	<b>Láser verde</b> $\lambda = 532 \text{ nm}$	<b>Láser rojo</b> $\lambda = 647 \text{ nm}$
Ángulo de difracción (°)	47,3 ± 0,5	75,8 ± 0,4	28,0 ± 0,9
Periodo (nm)	552 ± 4	548,8 ± 0,4	550 ± 7

#### 4.1.5. Microscopía de fuerza atómica

Finalmente se estudió la topografía de los biogratings a escala nanométrica mediante microscopía de fuerza atómica. Entre otros aspectos, esta técnica permite mapear la profundidad de los rasgos estructurales del biograting.



**Figura 16.** Imágenes obtenidas por microscopía de fuerza atómica y sus secciones transversales correspondientes, de biogratings de BSA (A) antes y (B) después de incubar anticuerpo selectivo (100 μg/mL antiBSA purificado en PBS-T).

Tal y como se muestra en la Figura 16, se confirma por las diversas imágenes que el biograting está inmobilizado y correctamente estructurado con gaps y strips bien definidos. En cuanto a la altura de las biocapas de BSA, se obtuvo que la diferencia de altura entre strip y gap fue de  $1,85 \pm 0,15$  nm (Tabla 2). Para interpretar este resultado es necesario saber que la proteína BSA es una proteína globular, constituida principalmente por largas  $\alpha$  hélices que conforman

una estructura de elipsoide prolato ( $14 \times 4 \times 4$  nm) de 66,5 kDa. Estos resultados sugieren que los strips de proteína podrían estar inmovilizados con densidades cercanas a la monocapa, con el eje ecuatorial de la proteína estando ortogonal a la superficie de vidrio<sup>28</sup>. Además, que la altura media de strip respecto al gap sea 1,85 nm, comparado con los 4 nm de altura de BSA, sugiere que el strip no está cubierto uniformemente por monocapa proteica si no que habrá espacios del strip sin proteína. No obstante, las dimensiones conocidas de la BSA son para esta proteína en fase cristalina. En este sistema la proteína se encontraba adsorbida en una superficie, y las dimensiones de la BSA adsorbida sobre vidrio no están reportadas en la literatura científica.

Las imágenes de AFM de las muestras de biograting tras incubar anticuerpo purificado (Figura 16 B) confirman que la estructuración se mantiene, mientras que la altura entre strip y gap aumenta a  $6,5 \pm 0,4$  nm (Tabla 2). Este aumento proviene de la unión del anticuerpo a la BSA formando el inmunocomplejo, poniendo de manifiesto otra vez que la proteína BSA es funcional. En este caso, nuevamente se enfrenta el conflicto de no conocer las dimensiones exactas en los distintos estados de estas proteínas e inmunocomplejos cuando se encuentran en superficies. La BSA, cuando está unida a ligandos, también puede experimentar cambios conformacionales que alteran su estructura global y, por lo tanto su altura. Al igual que para el anticuerpo.

A partir de estos registros de AFM se obtuvo un periodo promedio de  $587 \pm 46$  nm (Tabla 2), es ligeramente distinto al periodo del master empleado en la fabricación de los sellos (555,5 nm), pero considerando la imprecisión obtenida ( $\pm 46$  nm) el resultado es consistente con el periodo del master utilizado así como con el dato obtenido en el estudio del patrón de difracción. Una posible hipótesis para esta diferencia sería que durante el proceso de *stamping* se aplica una ligera presión al sello que puede provocar una expansión uniforme de este. Por otro lado, durante el tiempo de *inking* (2 h 40 min) el agua podría penetrar en el sello, hidratándolo y aumentando su tamaño uniformemente. Otra posible explicación es que en la polimerización del PDMS sobre el master, la temperatura se eleva hasta  $60^\circ$ , pudiendo dilatar del master y aumentar su periodo.

A partir de estos registros de AFM se calculó también el ciclo de trabajo de las nanoestructuras, y se obtuvo un promedio de  $46 \pm 3$  % (Tabla 2). Es decir, el strip de proteína ocupa el 46 % de la superficie, que es también consistente con el ciclo de trabajo del 50 % presente en el máster de partida.

**Tabla 2.** Parámetros obtenidos a partir de las cross-section de las imágenes de AFM.

	$\Delta$ Altura (nm)	Periodo (nm)	Ciclo de trabajo (%)
Biograting BSA	$1,85 \pm 0,15$	$580 \pm 30$	$45 \pm 2$
Biograting BSA + 100 $\mu$ g/mL antiBSA	$6,5 \pm 0,4$	$590 \pm 60$	$46 \pm 4$
	media	$587 \pm 46$	$46 \pm 3$



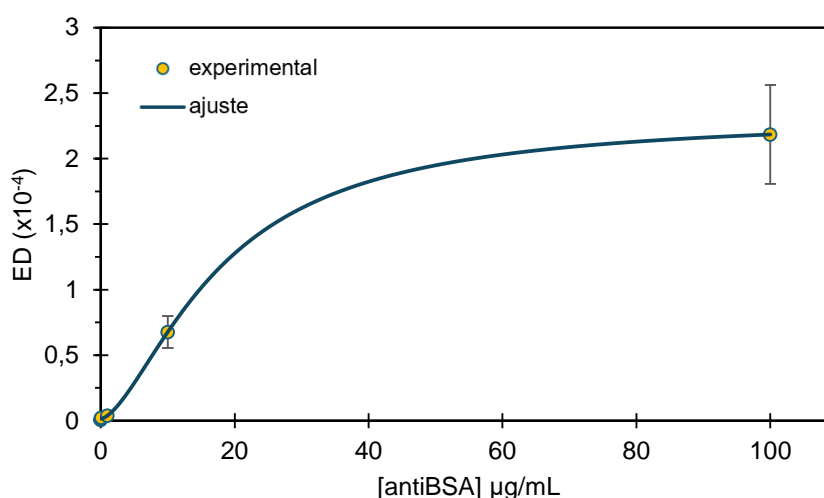
## 4.2. Transducción

Una vez caracterizados los biogratings fabricados por *microcontact-printing*, este apartado de resultados se centra en la demostración de las capacidades de transducción de este sistema de biosensado. Es decir, los siguientes los experimentos de esta sección se centran en demostrar cómo los biogratings son capaces de generar una señal medible (con y sin marcaje) cuya magnitud depende de la concentración de analito presente en la muestra que se ha incubado sobre la red de bioreceptores.

### 4.2.1. Transducción sin marcaje

Nos centramos primero en demostrar las capacidades sin marcaje de los biogratings. Un experimento clave para caracterizar y demostrar los principios de transducción son las curvas dosis-respuesta o curvas de calibrado. Este experimento persigue establecer qué relación de proporcionalidad existe entre la concentración de analito y la intensidad de la señal. En este caso, se incuban sobre los biogratings de BSA disoluciones con concentraciones de antiBSA conocidas, se registran las intensidades del haz de luz difractado (orden 1) y del haz transmitido (orden 0) para cada biograting, y se calcula la magnitud denominada eficiencia de difracción (ED).

Como se observa en los resultados de esta curva dosis-respuesta (Figura 17), esta técnica brinda una buena correlación señal-concentración a lo largo de un rango amplio de concentraciones, lo que demuestra las capacidades *label-free* de la técnica. La señal aumenta junto con la concentración de anticuerpo, tal y como se esperaba a más cantidad de anticuerpo más diferencia de altura habrá entre strip y gap, y con ello una mayor eficiencia de difracción. Los datos se correlacionan bien con una tendencia sigmoideal ( $R^2 = 0.999$ ), y a partir de este ajuste se pueden estimar un límite de detección de  $0,17 \mu\text{g/mL}$  y un límite de cuantificación de  $0,95 \mu\text{g/mL}$  de anticuerpo en este sistema sin marcaje (Tabla 3).



**Figura 17.** Curva dosis respuesta sin marcaje con antisuero antiBSA en PBS-T. Regresión sigmoideal ajustado con los parámetros  $a = 2,31 \cdot 10^{-4}$ ,  $b = -1,59$ ,  $x_0 = 17,8 \mu\text{g/mL}$ ,  $y_0 = 1,48 \cdot 10^{-4}$ .

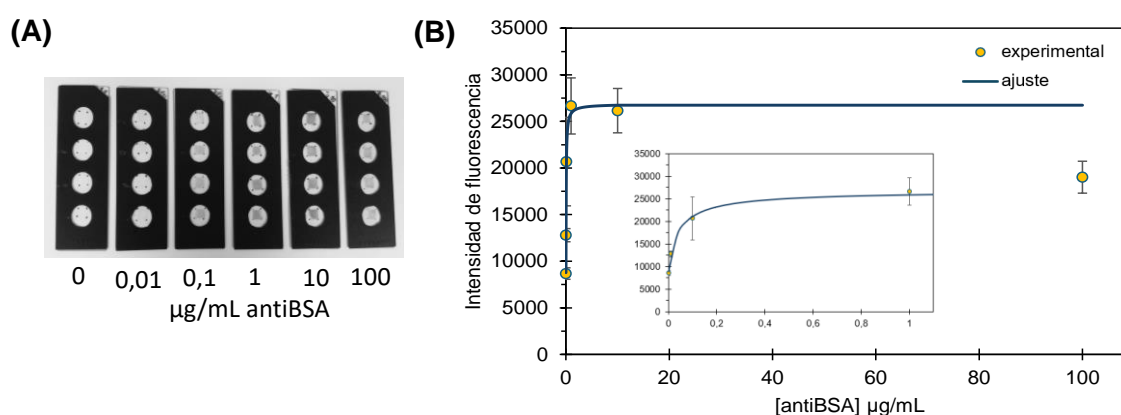
## 4.2.2. Transducción con marcaje

En el apartado anterior se demostró la capacidad de los biogratings para biosensado sin marcaje, y en esta sección se estudia la compatibilidad de este sistema con detección con marcaje. Para ello se emplea el sistema de marcaje basado en anticuerpos secundarios marcados con nanopartículas de oro y el posterior desarrollo de señal con precipitación de sales de plata (Figura 15).

Este sistema de marcaje está diseñado para que una mayor concentración de anticuerpo antiBSA genere una mayor precipitación de plata. La magnitud de esta precipitación puede medirse de forma colorimétrica, escaneando las zonas de ensayo con un escáner óptico y cuantificando la intensidad de color en la escala blanco-negro (Figura 18 A).

En los resultados de la curva dosis-respuesta de la detección colorimétrica (Figura 18 B) se percibe una pendiente muy acusada en respuesta al aumento de la concentración de anticuerpo desde 0 hasta 1  $\mu\text{g/mL}$  de antiBSA, la señal se mantiene hasta 10  $\mu\text{g/mL}$  de antiBSA, pero decae a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Este decaimiento es una anomalía observada con frecuencia en sistemas bioanalíticos, típicamente denominada como *Hook effect* <sup>39</sup>.

Los datos, omitiendo la concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ , se correlacionan bien con una tendencia sigmoideal ( $R^2 = 0.999$ ), partir de la cual se estimó un límite de detección de 0,0036  $\mu\text{g/mL}$  y un límite de cuantificación de 0,02  $\mu\text{g/mL}$  de anticuerpo para este sistema de marcaje medido por colorimetría.



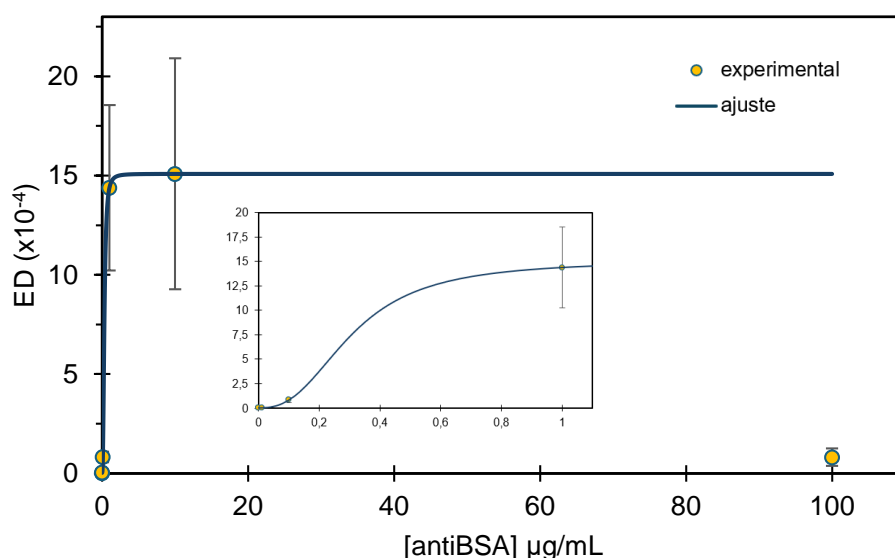
**Figura 18.** Detección colorimétrica con marcaje. (A) Portaobjetos tras el revelado con plata. (B) Curva dosis-respuesta obtenida tras escaneado y escalado de grises. Regresión sigmoideal ajustado con los parámetros  $a = 1,81 \cdot 10^{-4}$ ,  $b = -0,90$ ,  $x_0 = 4,38 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ ,  $y_0 = 8770$ .

Además de detección colorimétrica, la implementación en biogratings del sistema de marcaje basado en revelado de plata es compatible también con la detección difractiva. Tal y como se muestra en la Figura 15 C, este revelado mantiene la estructura difractiva de la red, por lo que a continuación estudiamos la curva-dosis respuesta de este sistema a partir de las eficiencias de difracción obtenidas tras medir las mismas muestras que fueron escaneadas (Figura 18A).

En la curva dosis-respuesta con marcaje se observan cómo las eficiencias de difracción aumentan considerablemente tras incubar el reactivo de plata, respecto del ensayo sin marcaje. Como se muestra en la Figura 19, en el intervalo de concentraciones desde 0 a hasta 100  $\mu\text{g/mL}$  de anticuerpo, la eficiencia de difracción aumentó hasta en 3 órdenes de magnitud.

Esta amplificación de señales es consistente con la precipitación de plata sobre el inmunocomplejo y el aumento correspondiente de altura de los strips. Sin embargo, a concentraciones de anticuerpo mayores, la eficiencia de difracción experimenta una caída abrupta que no sigue la tendencia esperada. Una explicación razonable para este fenómeno es que, debido a la gran cantidad de moléculas de GAR-Au unidas a antiBSA, la plata precipita de forma caótica y la nanoestructura pierde su ordenación periódica que le confiere propiedades difractivas.<sup>40</sup>

De nuevo, las eficiencias de difracción se correlacionan bien con una tendencia sigmoideal ( $R^2 = 0.999$ ). A partir de estos datos se pueden estimar un límite de detección de  $0,036 \mu\text{g/mL}$  y un límite de cuantificación de  $0,055 \mu\text{g/mL}$  de anticuerpo en este sistema con marcaje (Tabla 3).



**Figura 19.** Curva dosis respuesta resultante de las medidas difractivas de muestras reveladas con plata con antisuero antiBSA en PBS-T. Regresión sigmoideal ajustado con los parámetros  $a = 1,51 \cdot 10^{-3}$ ,  $b = -2,56$ ,  $x_0 = 0,31 \mu\text{g/mL}$ ,  $y_0 = 2,65 \cdot 10^{-6}$ .

### 4.2.3. Comparación

Los resultados de los apartados anteriores demuestran que la transducción bioanalítica con biogratings permite detección sin marcaje, mientras que también es compatible con detección con marcaje (colorimétrica y difractiva). Tal y como se muestra en la Tabla 3, la sensibilidad es mayor en los sistemas con marcaje, en torno a 1-2 órdenes de magnitud. Sin embargo, los métodos con marcaje triplican el número de etapas necesarias para llevar a cabo el ensayo en comparación con la detección sin marcaje, lo que limita su aplicación en entornos fuera de laboratorios y reduce su potencial para desarrollar dispositivos point-of-care. También, los sistemas con marcaje pueden dar lugar a resultados menos fiables, debidos cambios en la señal que provienen del propio marcaje en lugar de del ensayo de interés. Las disminuciones de señal obtenidas en concentraciones altas de anticuerpos en este ensayo son ejemplos de este problema, que se ha corregido con la detección sin marcaje.

En conjunto, al considerar las diversas ventajas e inconvenientes, se puede concluir que la elección de un sistema u otro debe basarse en las necesidades específicas de cada ocasión. Si se requiere una mayor sensibilidad y se dispone de más recursos, el método con marcaje es el ideal. Por otro lado, si se busca un dispositivo que cumpla con los criterios ASSURED, los métodos sin marcaje son más apropiados, ya que mejoran la fiabilidad, y son más prácticos, económicos y fáciles de usar.

**Tabla 3.** Comparación de distintos parámetros para distintas modalidades de ensayo en biogratings.

<b>Estrategia</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>LOQ (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Número de etapas</b>
Marcaje <i>detección colorimétrica</i>	0,0036	0,02	6
Marcaje <i>detección difractiva</i>	0,036	0,055	6
<i>Label-free</i>	0,17	0,95	2
<i>Wash-free</i>	0,068	1,86	1

### 4.3. *Wash-free*

Tal y como se ha introducido anteriormente (sección 1.5), denominamos método *wash-free* a omitir el paso de lavado después de la incubación de la muestra sobre los biogratings. Esto minimiza el procedimiento experimental que el usuario ha de llevar a cabo para realizar el ensayo y lo reduce a una única etapa, la incubación de la muestra sobre el biograting. Tras esta incubación, la reacción se detiene sacudiendo el portaobjetos para retirar la disolución de muestra y dejando evaporar la disolución que queda sobre la superficie. Esto significa que las sales y otros compuestos presentes en la muestra quedarán depositados sobre el biograting y la zona de ensayo.

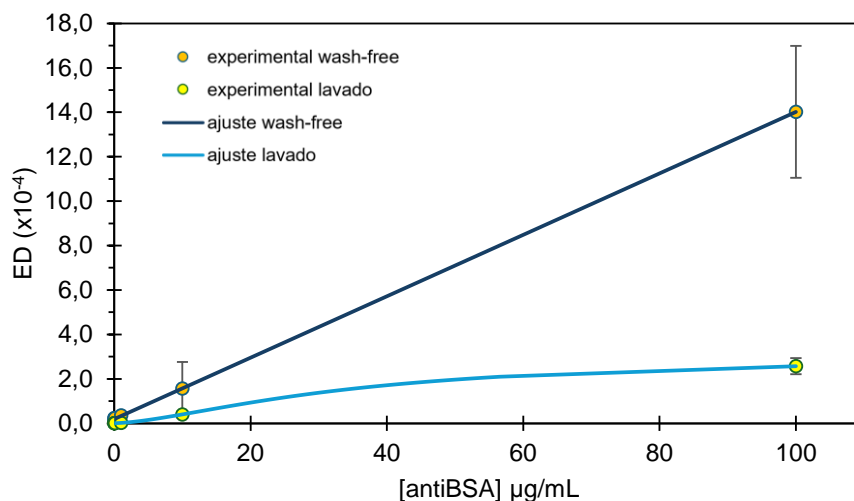
Dado los principios anteriormente comentados sobre la adsorción inespecífica en biogratings, nuestra hipótesis de partida plantea que esta deposición seguirá una distribución aleatoria y uniforme, tanto sobre los strips como sobre los gaps del biograting, y no generará una variación neta en la altura de los strips. Es decir, no interferirá en la señal obtenida.

### 4.3.1. Transducción *wash-free*

Para estudiar esta estrategia *wash-free*, se realiza experimentalmente una curva dosis-respuesta en la que se registra la eficiencia de difracción sin incluir etapa de limpieza tras retirar la muestra (*wash-free*) y después limpiar la muestra (método convencional). Tal y como se observa en la Figura 20, se confirma la correlación entre dosis y respuesta planteada en la hipótesis de partida. Es decir, el método *wash-free* es compatible con biogratings. Las medidas tomadas antes y después de lavar siguen tendencias idénticas, esto indica que el método *wash-free* no desestructura ni lo degrada el biograting.

Se puede observar que las señales obtenidas en la modalidad *wash-free* son considerablemente superiores a las obtenidas cuando se realiza el lavado, especialmente a altas concentraciones. Es decir, no solo es compatible, sino que este método mejora la transducción amplificando las señales obtenidas. Una posible explicación a este fenómeno de amplificación es que la precipitación de las sales contenidas en la disolución tampón tiene lugar de una manera ordenada y selectiva sobre las proteínas.

Los datos experimentales se ajustan bien a una curva sigmoide ( $R^2 = 0,999$ ), y a partir de ellos se estima un límite de detección de  $0,068 \mu\text{g/mL}$  y un límite de cuantificación de  $1,86 \mu\text{g/mL}$  de anticuerpo en este sistema sin marcaje. La curva dosis respuesta obtenida tras limpiar es análoga a la obtenida en el experimento equivalente anterior (Figura 17). Tal y como se indica en la tabla 3, estos límites de detección y cuantificación del sistema *wash-free* son ligeramente mejores que en la estrategia *label-free* convencional, probablemente gracias al aumento de señal al que da lugar esta nueva estrategia. Asimismo, la magnitud de estas sensibilidades es comparable a la de otros desarrollos de biosensado óptico sin marcaje reportados en el estado del arte (algunas de ellas empleando los mismos bioreactivo) basadas en SPR<sup>41,42</sup>, interferometría<sup>43</sup>, y otros principios de transducción incluyendo biosensado difractivo<sup>30,38,44</sup>.



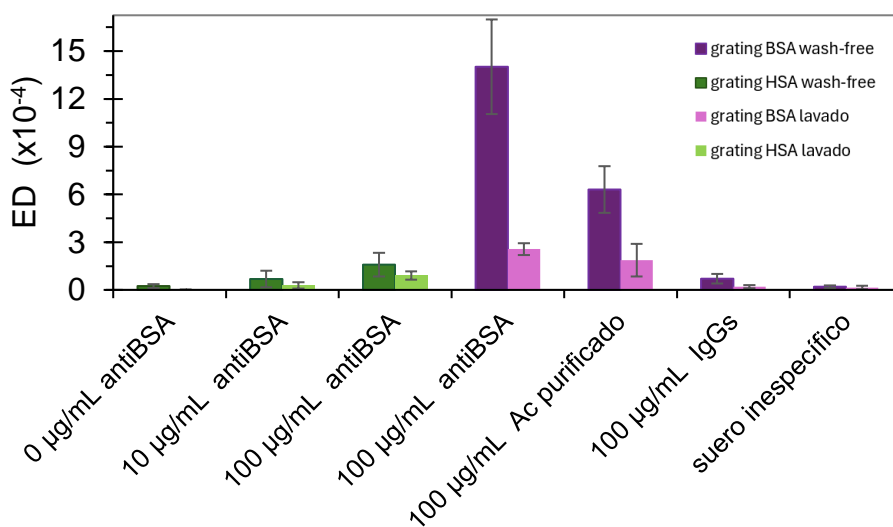
**Figura 20.** Curva dosis respuesta aplicando el método *wash-free* con antisuero antiBSA en PBS-T. Regresión sigmoide ajustado con los parámetros  $a = 7,28 \cdot 10^7$ ,  $b = -1$ ,  $x_0 = 5,21 \cdot 10^8 \mu\text{g/mL}$ ,  $y_0 = 0,19$ .

### 4.3.2. Selectividad

La selectividad de un sensor constituye un indicador fundamental de su calidad, refiriéndose este término a la capacidad del sensor para distinguir y cuantificar un analito específico en presencia de otros componentes potencialmente interferentes en una muestra. Para evaluarla se estudia la respuesta difractiva de biogratings tras analizar diferentes muestras en formato *wash-free*. Estas pruebas implican comparar objetivamente la respuesta del biosensor a concentraciones conocidas del analito y otros compuestos, con el fin de asegurar que la señal detectada es específica del analito en cuestión.

En este experimento, por un lado se fabrican biogratings de HSA donde se incubó distintas concentraciones de antisuero de antiBSA a distintas concentraciones. Por el otro, se estudian biogratings de BSA sobre los que se incubó antiBSA, antiBSA purificado, una disolución de IgGs no selectivas, y un suero inespecífico con el mismo factor de dilución que el antisuero de antiBSA a 100 µg/mL (1/40 en PBS-T). Notar que todas las condiciones estudiadas actúan como controles negativos, salvo antiBSA (antisuero y purificado) que actúan como controles positivos para la selectividad.

Se analizaron las señales de eficiencia de difracción tanto en *wash-free* como después de lavar las propias muestras. La característica más evidente a primera vista es que la tendencia de los valores de las señales de difracción entre las medidas de las muestras en *wash-free* y tras haberse lavado no cambia, únicamente hay variaciones en la magnitud de la señal, lo que valida de nuevo la viabilidad de *wash-free* (Figura 21).



**Figura 21.** Resultados del estudio de selectividad. Eficiencias de difracción obtenidas tras incubarse distintas disoluciones sobre biogratings de BSA y de HSA.

Los resultados (Figura 21) muestran una correlación entre la eficiencia de difracción y las distintas concentraciones de antisuero de antiBSA en controles negativos de biogratings de HSA. Aún así a 100 µg/mL de antiBSA aplicando el método *wash-free*, la señal es 15 veces menor que la obtenida en un biograting de BSA. Al realizarse el lavado, la señal es algo menos de la mitad en comparación con el control positivo lavado. Este resultado no es el esperado, considerando que el anticuerpo antiBSA no es específico para HSA. Sin embargo, se plantea como hipótesis de este fenómeno la similitud entre HSA y BSA. Estas proteínas homólogas presentan aproximadamente un 76% de identidad en su secuencia de aminoácidos, siendo

muy similares también en su estructura.<sup>45</sup> Además, los anticuerpos antiBSA empleados son policlonales, es decir, hay muchos tipos distintos de anticuerpos que se unen a distintas partes o epítomos de BSA. Por lo que esta pequeña contribución de señal registrada en los biogratings de HSA podría proceder de reactividad cruzada del anticuerpo, y no de un problema en el fenómeno de transducción.

Por otro lado, al comparar las señales obtenidas en los controles positivos, se observa que la señal obtenida con el antisuero completo es alrededor del doble de la obtenida en el antisuero purificado. Estos datos aportan indicios sobre cómo afecta la adsorción inespecífica en este ensayo, pues después de lavar las muestras de anticuerpo purificado y antisuero de antiBSA las eficiencias de difracción son equiparables. Este antisuero completo se trata de un antisuero de un conejo que ha sido inmunizado para que produzca anticuerpos antiBSA, pero que también contiene otros anticuerpos y componentes séricos, con una concentración total de proteínas de 48,11 mg/mL. Los valores de las señales de difracción del conjunto de biogratings de BSA sugieren que hay una adsorción inespecífica, como se sospechaba a partir de los estudios de ángulo de contacto (Figura 12).

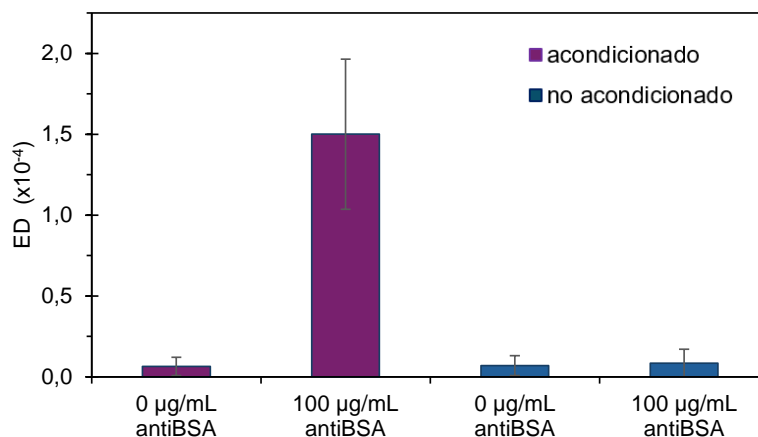
Estos resultados plantean la cuestión de cuanta señal corresponde a la adsorción inespecífica de los componentes séricos y cuanta a la unión específica de anticuerpo. Los controles negativos sobre biogratings de BSA (incubación IgGs inespecíficas y antisuero inespecífico) aportan datos en esta línea. En ambos casos se registra un aumento muy bajo de la señal difractada. Una posible explicación para esta observación es que los anticuerpos unidos a la BSA podrían facilitar la precipitación preferencial y selectiva en los strips. Así, los componentes del suero no contribuyen a la señal por sí solos, sino en combinación con el reconocimiento específico de BSA y antiBSA. Se trata de un primer resultado que necesitaría ser replicado e investigado más en detalle.

#### 4.4. Preacondicionamiento y muestras reales

Hemos denominado con el término preacondicionamiento a depositar en la zona de ensayo, previamente a la incubación de la muestra, los componentes que le faltan al disolvente de la muestra para asemejarlo al PBS-T y favorecer con ello la biointeracción receptor-analito. La naturaleza del disolvente donde tiene lugar la reacción de bioconocimiento es crucial, pues cambios en el pH y la fuerza iónica pueden alterar la protonación de grupos ionizables que pueden causar desnaturalizaciones parciales que afectan a la estructura tridimensional y funcionalidad tanto del anticuerpo como de la proteína, comprometiendo su funcionalidad.

El objetivo de este conjunto de ensayos es evaluar la viabilidad en la realización de este preacondicionamiento. La implementación de dicho procedimiento permitiría dejar listo el sistema de biosensado para que el usuario lo utilice sin preparación de muestra, lo que representaría una simplificación significativa y una ventaja práctica en su aplicación.

La primera muestra utilizada para evaluar el preacondicionamiento es el agua ultrapura. El preacondicionamiento en este ensayo se realiza dispensando y dejando secar PBS-T sobre el biograting, de forma que al incubar la muestra se disuelvan en esta las sales y tensioactivos (tween 20) necesarios para un bioconocimiento óptimo. En este estudio se comparan las respuesta difractiva sin lavar (*wash-free*), con y sin preacondicionamiento, en el análisis de agua dopada con antiBSA (0 y 100 ppm).



**Figura 22.** Medidas difractivas del experimento de preacondicionamiento en una muestra de agua. Empleando dos concentraciones de antiBSA o 0 µg/mL o 100 µg·mL<sup>-1</sup>.

Tal y como muestra la Figura 22, en las muestras preacondicionadas se observa un aumento en la eficiencia de difracción tras la incubación de la muestra de agua dopada con antiBSA, indicando un cambio en la diferencia de altura entre los strips y gaps, indicando que la biointeracción entre la BSA y su anticuerpo ha tenido lugar. Por el contrario, en la serie no preacondicionada, la eficiencia de difracción no aumenta, lo que implica que la biointeracción no ha ocurrido. El agua ultrapura no contiene las sales necesarias para tamponar el medio y aportar la fuerza iónica necesaria para que los bioactivos realicen la biointeracción.

Se puede observar también que la señal a la concentración de 100 µg·mL<sup>-1</sup> de antiBSA es significativamente menor en comparación con la obtenida sin preacondicionamiento, posiblemente debido a la desadsorción de la BSA causada por el medio líquido de preacondicionamiento sobre el biograting. Esto reduce la cantidad de BSA disponible para la unión de antiBSA, disminuyendo la señal detectada.

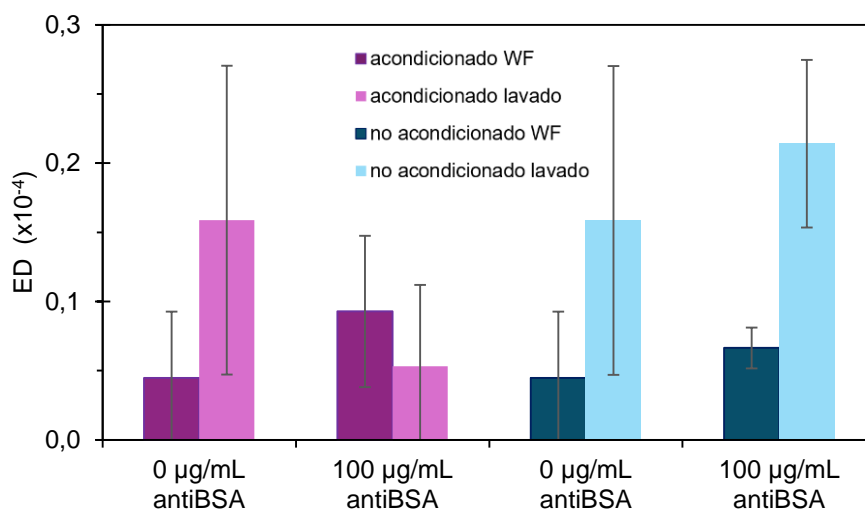
Estos resultados demuestran que esta técnica no solo simplifica los pasos de preparación de la muestra para el usuario, sino que es esencial para que las biointeracciones ocurran adecuadamente. Para el análisis de aguas, este preacondicionamiento es clave para realizar el ensayo en un único paso por parte del usuario final.

A continuación, se evalúa el potencial de esta estrategia en muestras reales complejas de origen biológico. Con este propósito, se preparan biogratings preacondicionados y no preacondicionados para el análisis de suero humano y zumo de manzana, ambos sin diluir y dopados con antiBSA (0 y 100 µg·mL<sup>-1</sup>), y se comparan las eficiencias de difracción antes (*wash-free*) y después de lavar. En el caso del suero, el preacondicionamiento tan solo contiene Tween 20, ya que el suero posee un pH y fuerza iónica similares al tampón PBS. En cambio, para el zumo, el preacondicionamiento se incluye PBS-T completo.

Tras realizar el método *wash-free*, se observó un fenómeno distinto al de casos anteriores, la aparición de una película translúcida en toda el área de sensado y ocasionalmente, pequeños cristales precipitados sobre los biogratings. Esta película proviene de la deposición de todos los componentes no volátiles de las muestras, y en el caso del zumo adquiriría matices ligeramente brillantes.

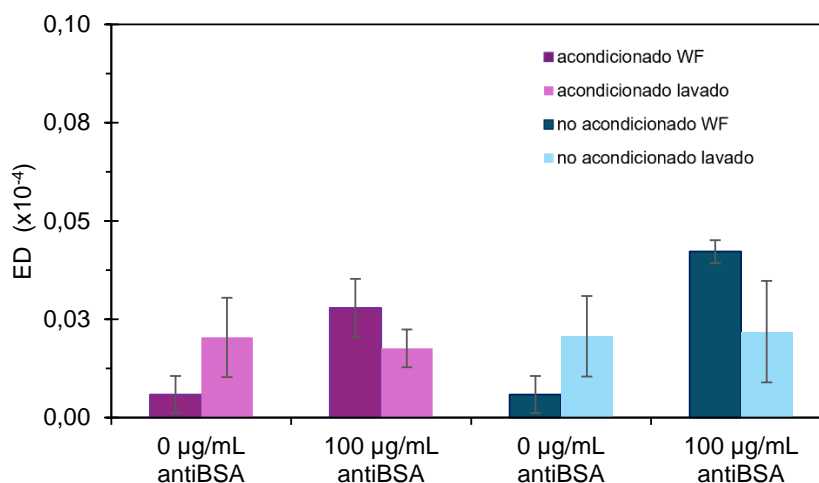


Como se observa en la Figura 23, las señales después de lavar son mayores a las obtenidas midiendo en *wash-free*, contrario a lo esperado para este sistema de transducción. Este fenómeno podría deberse a que los componentes del suero que se depositan en el grating, lo hacen preferiblemente sobre los gaps, y con ello disminuyen la eficiencia de difracción del biograting.



**Figura 23.** Resultados del análisis de suero humano puro (sin diluir) dopado con antiBSA.

En el análisis de zumo de manzana, las señales obtenidas son casi un orden de magnitud menores que con suero. En este caso, la película depositada sobre el biogratings tras la incubación resulta en este caso más opaca, lo que disminuye la cantidad de luz que atraviesa la superficie de sensado.



**Figura 24.** Resultados del análisis de zumo de manzana puro (sin diluir) dopado con antiBSA.

En general, en ambos ensayos (zumo y suero) con y sin preacondicionamiento la imprecisión de las medidas resulta muy grande en relación con la señal, lo que dificulta la obtención de conclusiones a partir de estos resultados. En cuanto a la diferencia entre la serie acondicionada y no acondicionada no se observan diferencias notables. Una posible fuente de estos problemas es que existe una interacción de componentes como lípidos del suero o azúcares del zumo con el analito o la proteína del biograting, que podría modificar su estructura o adsorberse sobre estos dificultando las reacciones de bioreconocimiento. Otra

hipótesis es que el método *wash-free* en su versión actual no admite deposiciones inespecíficas tan grandes de materia sobre los biogratings. Estas deposiciones masivas podrían interferir de forma negativa en propiedades ópticas como la transmisión, aumentar demasiado la proporción de luz dispersada, o degradar la estructura strip-gap necesaria para la difracción.

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados obtenidos en las investigaciones incluidas en este trabajo permiten obtener las siguientes conclusiones generales:

- El *microcontact-printing* permite fabricar nanoestructuras periódicas de proteínas sobre sustratos sólidos. En el caso de la BSA como bioreceptor, esta técnica da lugar a biogratings de proteína inmovilizada, funcional, y nanoestructurada según un patrón de difracción con características estructurales equivalentes a la nanoestructura maestra (*master*) de partida.
- Los biogratings actúan como transductores ópticos difractivos para biosensado. Además de permitir detección sin marcaje, son también compatibles con ensayos con marcaje y desarrolladores de señal. Frente a los sistemas con marcaje, la detección sin marcaje reporta sensibilidades límites de detección 1-2 órdenes de magnitud mayores, mientras que también.
- El método denominado como *wash-free* es posible y compatible con biogratings. Esta estrategia no solo reduce a una las etapas requeridas por el usuario para hacer el ensayo, sino que también amplifica considerablemente las eficiencias de difracción obtenidas sin marcaje.
- El preacondicionamiento de biogratings supone una ventaja de la técnica al omitir la etapa de preparación de muestra en el análisis directo de muestras reales por parte de usuarios no especializados. En su versión actual se ha demostrado en agua, pero presenta problema en muestras biológicas complejas.

Estos resultados y conclusiones abren la puerta a perspectivas e investigaciones futuras, algunas de las cuales de enumeran a continuación:

- Resolver la precisión moderada en la obtención de resultados, típica del *microcontact-printing*. Una estrategia para abordar esta cuestión sería reduciendo la componente manual de automatizando el proceso de *microcontact-printing*, el registro de señales de difracción, y la realización del método *wash-free*.
- Determinar el efecto de variables clave sobre el proceso *wash-free* para mejorar sus prestaciones (temperatura, humedad, composición y concentración de sales, estrategias de secado tras la incubación, etc.).
- Estudiar la reactividad cruzada de BSA cuando la proteína sonda es HSA, y explorar la implementación de estos sistemas de biosensado en otros ensayos de bioreconocimiento.
- Caracterizar bien el problema con las muestras complejas en *wash-free*, y la influencia de las diferentes variables implicadas (temperatura, concentración de proteínas, concentración de azúcares, etc.), para diseñar estrategias que resuelvan este problema y/o establezcan qué tipos de muestras son compatibles con este método.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Monošík, R., Stredanský, M. & Šturdík, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca* **5**, 109–120 (2012).
2. Bard, A. J. Fundamentals of analytical chemistry (Skoog, Douglas A.; West, Donald M.). *J Chem Educ* **40**, 614 (1963).
3. Dellweg, H. *et al.* *Glossary for chemists of terms used in biotechnology*. *Pure & Appl. Chem* vol. 64 (1992).
4. Kim, J., Campbell, A. S., de Ávila, B. E. F. & Wang, J. Wearable biosensors for healthcare monitoring. *Nature Biotechnology* vol. 37 389–406 (2019).
5. Ensafi, A. A. An introduction to sensors and biosensors. in *Electrochemical Biosensors* 1–10 (Elsevier, 2019).
6. Pandey, C. M. & Malhotra, B. D. *Biosensors : Fundamentals and Applications* (2017).
7. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G. S. & Thévenot, D. R. *Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification*. *Biosensors & Bioelectronics* vol. 16 (2001).
8. Otoo, J. A. & Schlappi, T. S. REASSURED Multiplex Diagnostics: A Critical Review and Forecast. *Biosensors* vol. 12 (2022).
9. Wang, C. *et al.* Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices. *Nano Today* vol. 37 (2021).
10. Biosensors Market-Global Forecast to 2026. Markets and Markets, 2021.
11. Haleem, A., Javaid, M., Singh, R. P., Suman, R. & Rab, S. Biosensors applications in medical field: A brief review. *Sensors International* vol. 2 (2021).
12. Liu, G. Grand Challenges in Biosensors and Biomolecular Electronics. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, (2021).
13. Toskin, I. *et al.* Point-of-care tests for STIs: the way forward. *Sexually transmitted infections* vol. 93 (2017).
14. Wang, P. & Kricka, L. J. Current and emerging trends in point-of-care technology and strategies for clinical validation and implementation. *Clinical Chemistry* vol. 64 1439–1452 (2018).
15. Dolz, A. J., Supervisors, P., Oliver, M. A., Maquieira, Á. & Valencia, C. *Biogratings: Diffractive Transducers for Biosensing in Photonic Platforms*. (2023).
16. Canalejas Tejero, V. *Desarrollo de superficies nanoestructuradas para biosensores ópticos y sensores biomiméticos*. (2016).
17. Chalyan, T., Ottevaere, H. & Pasquardini, L. Optical biosensors: from working principles to detection methods of label-free devices. in *Biophotonics and Biosensing* 15–48 (Elsevier, 2024).
18. Vijayakumar, A. & Bhattacharya, S. *Design and Fabrication of Diffractive Optical Elements with MATLAB*. (2017).

19. Maity, A. & Das, P. Nanoplasmonics: Fundamentals and Recent Developments. in *Encyclopedia of Materials: Electronics* vols 1–3 V2-6-V2-19 (Elsevier, 2023).
20. Peltomaa, R., Glahn-Martínez, B., Benito-Peña, E. & Moreno-Bondi, M. C. Optical Biosensors for Label-Free Detection of Small Molecules. *Sensors (Basel, Switzerland)* vol. 18 (2018).
21. Nguyen, H. H., Park, J., Kang, S. & Kim, M. Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications. *Sensors (Switzerland)* vol. 15 10481–10510 (2015).
22. Haynes, C. L. Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications Edited by Katrin Kneipp (Harvard University Medical School, Boston), Martin Moskovits (University of California, Santa Barbara), and Harald Kneipp (Harvard University Medical School). Springer: Berlin, Heidelberg, New York. 2006. *J Am Chem Soc* **129**, 2197–2198 (2007).
23. Magdy, M. A Conceptual Overview of Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Plasmonics* vol. 18 803–809 (2023).
24. Cialla-May, D. *et al.* Raman Spectroscopy and Imaging in Bioanalytics. *Analytical Chemistry* vol. 94 86–119 (2022).
25. Angelopoulou, M., Petrou, P. & Kakabakos, S. Advances in interferometric sensors for the detection of food contaminants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **175**, 117714 (2024).
26. Nolte, D. *Optical Interferometry for Biology and Medicine. Optical Interferometry for Biology and Medicine: , Bioanalysis, Volume 1. Springer Science+Business Media, LLC, 2012* (2012).
27. Palmer, C. & Loewen, E. *Diffraction grating handbook Sixth Edition.* (2005).
28. Avella-Oliver, M., Carrascosa, J., Puchades, R. & Maquieira, Á. Diffractive Protein Gratings as Optically Active Transducers for High-Throughput Label-free Immunosensing. *Anal Chem* **89**, 9002–9008 (2017).
29. Avella-Oliver, M., Ferrando, V., Monsoriu, J. A., Puchades, R. & Maquieira, A. A label-free diffraction-based sensing displacement immunosensor to quantify low molecular weight organic compounds. *Anal Chim Acta* **1033**, 173–179 (2018).
30. Juste-Dolz, A., Avella-Oliver, M., Puchades, R. & Maquieira, A. Indirect microcontact printing to create functional patterns of physisorbed antibodies. *Sensors (Switzerland)* **18**, (2018).
31. Juste-Dolz, A. *et al.* Denaturing for Nanoarchitectonics: Local and Periodic UV-Laser Photodeactivation of Protein Biolayers to Create Functional Patterns for Biosensing. *ACS Appl Mater Interfaces* **14**, 41640–41648 (2022).
32. Juste-Dolz, A., Fernández, E., Puchades, R., Avella-Oliver, M. & Maquieira, Á. Patterned Biolayers of Protein Antigens for Label-Free Biosensing in Cow Milk Allergy. *Biosensors (Basel)* **13**, (2023).
33. Juste-Dolz, A. *et al.* BIO bragg gratings on microfibers for label-free biosensing. *Biosens Bioelectron* **176**, (2021).

34. Juste-Dolz, A. *et al.* Surface Bragg gratings of proteins patterned on integrated waveguides for (bio)chemical analysis. *Microchimica Acta* **191**, (2024).
35. Lichtenberg, J. Y., Ling, Y. & Kim, S. Non-specific adsorption reduction methods in biosensing. *Sensors (Switzerland)* vol. 19 (2019).
36. Frutiger, A. *et al.* Nonspecific Binding - Fundamental Concepts and Consequences for Biosensing Applications. *Chemical Reviews* vol. 121 8095–8160 (2021).
37. Liu, R., Zhang, Y., Zhang, S., Qiu, W. & Gao, Y. Silver Enhancement of Gold Nanoparticles for Biosensing: From Qualitative to Quantitative. *Appl Spectrosc Rev* **49**, 121–138 (2014).
38. Sancho-Fornes, G. *et al.* Disk-based one-dimensional photonic crystal slabs for label-free immunosensing. *Biosens Bioelectron* **126**, 315–323 (2019).
39. Cavalera, S. *et al.* Investigation of the “Antigen Hook Effect” in Lateral Flow Sandwich Immunoassay: The Case of Lumpy Skin Disease Virus Detection. *Biosensors (Basel)* **12**, (2022).
40. Juste-Dolz, Augusto Miguel; Avella-Oliver, Miquel; Angel Maquieira Catala; Puchades, Rosa; Sancho-Fornes, Gabriel (2018). Metallic Nanostructures Of Metallica. EN XII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition (IWOSMOR 2018).
41. Hao, D., Hu, C., Grant, J., Glidle, A. & Cumming, D. R. S. Hybrid localized surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance sensor for label free biosensing. *Biosens Bioelectron* **100**, 23–27 (2018).
42. Makhneva, E. *et al.* Maleic anhydride and acetylene plasma copolymer surfaces for SPR immunosensing. *Anal Bioanal Chem* **411**, (2019).
43. Sancho-Fornes, G., Avella-Oliver, M., Carrascosa, J., Puchades, R. & Maquieira, Á. Interferometric multilayered nanomaterials for imaging unlabeled biorecognition events. *Sens Actuators B Chem* **331**, 129289 (2021).
44. Gatterdam, V. *et al.* Focal molography is a new method for the in situ analysis of molecular interactions in biological samples. *Nat Nanotechnol* **12**, 1089–1095 (2017).
45. Nusrat, S. *et al.* A comprehensive spectroscopic and computational investigation to probe the interaction of antineoplastic drug nordihydroguaiaretic acid with serum albumins. *PLoS One* **11**, (2016).