

## **Título de la tesis**

Towards label-free biosensing in compact disk technologies for point-of-need analysis

## **Autor**

Miquel Avella-Oliver

## **Directores**

Angel Maquieira

Rosa Puchades

## **Resumen**

El auge de la instrumentación en las ciencias analíticas ha dado lugar un amplio abanico de sistemas analíticos que juegan un papel crucial en multitud de áreas clave para los estándares de vida actuales, tales como el diagnóstico médico, la seguridad alimentaria y el control medioambiental, entre muchas otras. Sin embargo, estos sistemas de referencia tienden a ser caros, grandes, complejos y suelen involucrar procedimientos de análisis tediosos y altamente especializados. Este hecho restringe enormemente la difusión de las ciencias analíticas en entornos no especializados o con escasos recursos, como por ejemplo el diagnóstico en casa, áreas remotas y países en desarrollo.

Esta tesis persigue explotar el gran potencial de los productos electrónicos de consumo para concebir sistemas bioanalíticos baratos, portables, rápidos, simples, robustos, sensibles y con gran capacidad de trabajo. Los discos compactos son tecnologías de consumo maduras que se producen de forma masiva a nivel mundial y que están dotadas de elementos ópticos, mecánicos y electrónicos muy sofisticados, a coste extremadamente bajo. En esta línea, aunar el análisis químico con estas tecnologías plantea el desarrollo de dispositivos analíticos simples que afronten las restricciones comentadas anteriormente. Por otro lado, la integración de materiales biológicos amplía el alcance de estos sistemas y los sitúa dentro del marco del biosensado, lo que les proporciona un gran potencial para alcanzar las premisas que motivan este proyecto. Por ejemplo, esto hecho favorece el desarrollo de sistemas sencillos y altamente selectivos para detectar compuestos diana clínicamente importantes, entre otras capacidades.

Esta tesis explora nuevos avances en química analítica usando tecnologías de biosensado basadas en sistemas de disco compacto, y comprende seis publicaciones científicas distribuidas a lo largo de cuatro capítulos. Los estudios se han centrado en la tecnología *Thermochromic Etching Disks* (TED) (Capítulo 1), el diseño racional de ensayos de bioreconocimiento en discos compactos (Capítulo 2), y la detección sin marcaje para realizar análisis *in situ* (Capítulos 3 y 4).

Esta investigación comienza estudiando las posibilidades que ofrecen los sistemas TED para el desarrollo de nuevos biosensores basados en disco. Primero, enmarcado en una discusión del estado del arte y futuras tendencias en biosensado foto y termocrómico, se presenta un nuevo sistema (basado en discos y lectores TED) mediado por luz para el desarrollo de señales en ensayos de bioreconocimiento. Ésta constituye una estrategia novedosa para aprovechar el foto y termocromismo en biosensado, y presenta un gran potencial para simplificar los procesos de desarrollo de señal en sistemas bioanalíticos.

A continuación, se aborda cómo transformar la tecnología TED en sistemas analíticos integrados basados en discos compactos. TED ha demostrado ser una herramienta muy versátil para analizar, de forma sensible, ensayos de bioreconocimiento usando plataformas y escáneres fácilmente obtenidos a partir de discos y lectores convencionales, respectivamente. Un único disco ha mostrado poder albergar varios ensayos biológicos importantes y de distinta naturaleza (micromatriz, cultivos celulares, inmunofiltración, turbidimetría, etc.), para ser analizados de forma sensible a través de imágenes. Este estudio remarca el potencial de los sistemas microfluídicos y la detección sin marcaje para ser implementados en los biosensores TED.

En cuanto al diseño racional, se presenta un método teórico-experimental (INSEL), basado en modelos cinéticos y de transporte de masa, para optimizar ensayos de bioreconocimiento y explorar su comportamiento. INSEL se ha implementado como una herramienta *in silico* que permite caracterizar biointeracciones mediante mínima experimentación, realizar optimizaciones dirigidas a objetivos particulares definidos por el usuario, y computar el efecto de variables críticas de forma sencilla y sin experimentos adicionales. También, este estudio demuestra las capacidades de los microinmunoensayos en disco compacto como técnica de rutina para estudiar biointeracciones.

Las técnicas bioanalíticas de detección sin marcaje permiten analizar eventos de bioreconocimiento sin incorporar elementos de señalización. Este tipo de detección presenta muchas ventajas para el desarrollo de biosensores, tales como protocolos de ensayo más simples y una mayor fiabilidad de los resultados. Sin embargo, estas técnicas tienden a requerir materiales nanoestructurados y equipos de medida caros y complejos, y suelen presentar capacidades de trabajo relativamente bajas. Así pues, este trabajo pretende afrontar esas limitaciones, mediante el aprovechamiento de los elementos integrados en las tecnologías de

disco compacto, para desarrollar biosensores que permitan detección sin marcaje. En esta línea, los discos compactos convencionales contienen una nanoestructura en forma de surco en espiral, cuya adaptación como transductor ópticamente activo para biosensado sin marcaje ha sido abordada en los siguientes estudios.

*Surface-enhanced Raman spectroscopy* (SERS) es una técnica que permite análisis sensibles y selectivos, posibilitando en algunos casos la detección sin marcaje de analitos biológicos. En este trabajo, las nanoestructuras en forma de surco obtenidas a partir de discos regrabables convencionales (CD-R y DVD-R) fueron recubiertas con plata y adaptadas para ser activas en SERS. Esta estrategia supone una alternativa, económicamente efectiva e industrialmente escalable, a los sustratos SERS típicamente usados en bioanálisis. Estos materiales han mostrado respuestas plasmónicas sintonizables, una amplificación Raman significativa, y han permitido analizar muestras biológicas complejas (como proteínas y exosomas) mediante SERS sin usar marcadores. Además de introducir sustratos SERS grandes y baratos, este trabajo también sugiere el desarrollo de escáneres Raman basados en lectores de disco.

Otra aproximación presentada en esta tesis aborda la implementación de DBS (*diffraction-based sensing*) en tecnologías TED, con el fin de desarrollar biosensores para detección sin marcaje basados en discos y lectores convencionales. DBS se fundamenta en monitorizar cambios en los patrones difractados por redes constituidas por receptores biológicos (*biogratings*). Primero, se presenta una amplia evaluación experimental de las posibilidades analíticas ofrecidas por DBS. Este estudio describe cómo aprovechar esta técnica para desarrollar biosensores con capacidades interesantes, tales como detección sin marcaje, análisis en tiempo real, alta compatibilidad de materiales sustrato, y determinación sensible de compuestos orgánicos de bajo peso molecular (como por ejemplo atrazina).

Finalmente, a partir del conocimiento sobre DBS obtenido en los estudios previos, se investiga la fabricación de multitud de *biogratings* de proteínas sobre discos TED mediante impresión por microcontacto. En lugar de materiales nanoestructurados caros, en este estudio hemos propuesto utilizar las nanoestructuras tipo surco de discos convencionales como patrones para crear *biogratings*. Con estas matrices de *biogratings* de proteínas sobre discos compactos, se ha demostrado la determinación sensible y sin marcaje de anticuerpos, usando lectores TED adaptados como escáneres analíticos. Esta investigación ha probado el concepto para la detección sin marcaje en sistemas TED convencionales, e introduce avances importantes que apuntan al desarrollo de materiales funcionales y sistemas de detección, baratos e industrialmente escalables, que aprovechen las tecnologías de consumo para realizar biosensado sin marcaje.