



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Modulación de la hidrofobicidad de superficies de fibra de vidrio como mejora para el desarrollo de inmunoensayos heterogéneos

TRABAJO FIN DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA
CURSO 2017-2018

Autor: Carlos de Barutell Arnal

Tutoras: Pilar Aragón Revuelta y Patricia Noguera Murray

Valencia, septiembre de 2018

Licencia Creative Commons By-Nc

Modulación de la hidrofobicidad de superficies de fibra de vidrio como mejora para el desarrollo de inmunoensayos heterogéneos

Hidrofobicidad, interacción biotina-estreptavidina

En el presente trabajo se propone el empleo de microfibras de vidrio como un soporte sólido para reacciones de reconocimiento molecular, en especial interacciones proteína-proteína. Como prueba de concepto, se ha escogido la interacción Biotina-Estreptavidina. Con este fin, se modificará la hidrofobicidad de superficies de microfibra empleando diversos alcoxisilanos con diversa longitud de cadena, bien sea individualmente o mezclados con un fluoroalcoxisilano a determinados porcentajes. A continuación, se fijarán a la superficie *arrays* de una biotina tiolada mediante la reacción fotoquímica del tiol-eno. Finalmente, se llevará a cabo una reacción entre la estreptavidina-Cy5 y la biotina anclada, y la imagen de los puntos de fluorescencia obtenidos será tratada informáticamente para obtener la intensidad, tamaño y SNR (ratio señal sobre ruido) de los mismos.

Los resultados nos permitirán estudiar cómo la hidrofobicidad (estudiada con el ángulo de contacto del agua, WCA) afecta a las señales obtenidas en las diferentes superficies, aumentando la calidad de los puntos según las superficies se vuelven más hidrofóbicas, debido bien al uso de un silano más hidrofóbico (cadena más larga) o bien a la adición del fluoroalcoxisilano. Los valores de la intensidad WCA y SNR nos permitirán comparar diferentes tratamientos de superficie y comprobar su viabilidad en procesos de reconocimiento molecular.

Para verificar su aplicabilidad en el ámbito de los biosensores, se empleará un segundo esquema: la adaptación a un inmunoensayo heterogéneo indirecto típico. En este caso, un anticuerpo policlonal antibiotina de conejo reaccionará con la biotina tiolada fijada a las superficies por la reacción tiol-eno y seguidamente se aplicará un anticuerpo secundario anticonejo con marcaje Alexa-fluor 647. Los resultados permitirán estudiar cómo la hidrofobicidad afecta a las señales conseguidas en las diferentes superficies examinadas mostrando cómo éstas pueden usarse en aplicaciones biológicas.

Autor: *Carlos de Barutell Arnal*

Tutoras: *Pilar Aragón Revuelta y Patricia Noguera Murray*

Licencia: *Creative Commons By-Nc*

Valencia, septiembre de 2018

Hydrophobicity modulation of glass fiber surfaces to improve the development of heterogeneous immunoassays

hydrophobicity, biotin-streptavidin interaction

In this work it is proposed the use of glass microfibers as solid support for biomolecular recognition reactions, especially protein-protein interactions. As a proof of concept, the interaction biotin-streptavidin has been chosen. For this, wettability of microfiber surfaces will be modified either using individual alkenyl silanes (with different chain length) or the same alkoxy silanes mixed with a fluoroalkoxy silane at different percentages. Next, arrays of a thiol-biotin derivative will be anchored by means of the photochemical click *thiol-ene* reaction on the surfaces. Finally, streptavidin-Cy5 will be allowed to react with the anchored biotin and the image of the fluorescence spots attained will be appropriately treated to achieve their intensity, size and SNR (signal to noise ratio).

Results will allow to study how hydrophobicity (measured with water contact angle, WCA) affects signals attained on the different surfaces, improving the quality of the spots as the surfaces becomes more hydrophobic, due to the use of a more hydrophobic silane (longer chain) or to the addition of the fluoroalkoxy silane. WCA, SNR and intensity values will allow to compare different surface treatments and show their feasibility in biomolecular recognition events.

To verify the application of these surfaces in biosensing fields, a second scheme will be used: a typical indirect heterogeneous immunoassay arrangement. In this case, a rabbit anti-biotin polyclonal antibody will be allowed to react with the biotin anchored to the derivatized surfaces using the photochemical click *thiol-ene* reaction, and, subsequently, a secondary alexa-fluor 647 labelled goat anti-rabbit will be applied. Results will allow studying how hydrophobicity affects the signal achieved on the different surfaces tested showing how these can be used in biological applications.

Author: *Carlos de Barutell Arnal*

Supervisors: *Pilar Aragón Revuelta y Patricia Noguera Murray*

License: *Creative Commons By-Nc*

Valencia, September 2018

Agradecimientos

A mis tutoras, Pilar y Patricia, por su intensísima paciencia y dedicación.

También a Miguel Ángel González, por ponerme en contacto con ellas y animarme a participar en el XII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition, de la mano del IDM (Interuniversity Research Institute for Molecular Recognition and Technological Development).

Gracias a ellos, y también al resto del IDM y del Departamento de Química de la UPV, tanto por proporcionarme la posibilidad y los medios de llevar a cabo este trabajo, como por el ambiente de compañerismo que allí se respira. Gracias.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Biosensores y reconocimiento molecular	1
1.2 La mojabilidad	2
1.3 Modulación de la mojabilidad	2
1.4 Reacción del tiol-eno	3
1.5 Reacciones de reconocimiento de la biotina	4
1.6 Transducción de la señal	4
2. Objetivos	5
3. Materiales y Métodos	6
3.1 Materiales	6
3.2 Silanización de superficies	6
3.3 Caracterización de las superficies	7
3.4 Fijación de la biotina tiolada a las superficies	7
3.5 Reacción de reconocimiento de la biotina	8
3.5a Reacción de reconocimiento mediada por estreptavidina-Cy5	9
3.5b Reacción de reconocimiento mediada por anticuerpos	9
3.6 Tratamiento estadístico de datos WCA	10
3.7 Tratamiento de imagen	10
3.8 Ajuste de los datos de fluorescencia y determinación del intervalo de trabajo	10
4. Resultados	11
4.1 Estudios Preliminares	11
4.1.1 Optimización del método de silanización	11
4.1.2 Sistemas de aplicación de los biorreactivos	14
4.1.3 Sistemas de lavado de los chips	15
4.2 Reconocimiento mediado por estreptavidina-Cy5	16
4.3 Resultados del reconocimiento mediado por anticuerpos	18
4.4 Ajuste de los datos y determinación del intervalo de trabajo	20
4.4.1 Reconocimiento con estreptavidina-Cy5	21
4.4.2 Reconocimiento con anticuerpos	24
5. Conclusiones	29
6. Bibliografía	30
ANEXOS	32
Anexo I. Resultados reconocimiento mediado por estreptavidina-Cy5	32
Anexo II. Resultados reconocimiento mediado por anticuerpos 2,5-0,02 mM	36
Anexo III. Resultados reconocimiento mediado por anticuerpos a altas concentraciones de BT	40

Figuras

Figura 1: Estructura Química de un silano con cadena lateral de 4 carbonos (C4)	3
Figura 2: Reacción del Tiol-eno	4
Figura 3: Estructura química y degradación del silano C4	7
Figura 4: Distribución de los puntos en chip impreso con BT	8
Figura 5: Esquema del proceso completo.....	9
Figura 6: Ecuación de la curva logística de 4 parámetros, donde min es el mínimo de la curva, max el máximo, EC50 la ordenada en la que se halla el punto de inflexión, y p el coeficiente de Hill, que determina la pendiente.....	10
Figura 7: Comparación de Chips C11 con ambas estrategias. Silanización del filtro entero (izquierda) y de chip ya recortado (derecha)	13
Figura 8: Comparación de metodologías de aplicación del fluoróforo en superficie hidrófila (C3). Por plastón (a), capilaridad (b) e inmersión individual (c)	15
Figura 9: Evolución de la señal y el WCA al aumentar la hidrofobicidad al usar un silano con cadena más larga (izq.) o añadir el silano fluorado C10F* (der.)	18
Figura 10: Comparativa de silanos con arrays de biotina revelados con anticuerpos. La intensidad vira desde el rojo (nula) hasta el cian (saturada) pasando por el verde. Se pueden observar el C2 (a), C3 (b), C4 (c) y C11(d).....	20
Figura 11: Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C2 (abajo izq.) y los parámetros calculados (abajo der.)	21
Figura 12: Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C2+2% C10F* (abajo izq.) y los parámetros calculados (abajo der.).....	22
Figura 13: Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C4 (abajo izq.) y los parámetros calculados (abajo der.)	23
Figura 14: Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C11+1% de C10F* (abajo izq.) y los parámetros calculados (abajo der.)	24
Figura 15: Curva, imagen de fluorescencia y tabla con los datos obtenidos de un chip con el silano C11 (en la imagen de la curva). No es posible calcular los parámetros	25
Figura 16: Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos empleados y los parámetros obtenidos en un chip con el silano C11 en rango 50-0,4 mM.....	26
Figura 17: Curva de chip con el silano C11 iterado con los datos de la Figura 15 y los 5 datos superiores iterados de la Figura 16	26
Figura 18: Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos empleados y los parámetros obtenidos en un chip con el silano C11+1% C10F* en rango 50-0,02 mM	27
Figura 19: Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos empleados y los parámetros obtenidos en un chip con el silano C11+2% C10F* en rango 50-0,02 mM	28

Tablas

Tabla 1: WCA obtenido en las dos estrategias de silanización	12
Tabla 2: Prueba de múltiples rangos con C11 y C22 de un ANOVA unidimensional	13
Tabla 3: Tabla ANOVA del WCA de los chips ya recortados. Se observa cómo tanto la longitud del silano como la adición de C10F* y su interacción son significativos	14
Tabla 4: Prueba de múltiples rangos de los distintos tratamientos obtenida mediante un ANOVA unidimensional.....	14
Tabla 5: Resultados de los chips revelados con Estreptavidina-Cy5	17
Tabla 6: Resultados de los chips revelados con IgG-AF647	19

Abreviaturas

AB: anticuerpo

ADN: ácido desoxirribonucleico

AF-647: Alexa flúor 647, un fluoróforo sintético

BT: biotina tiolada

C2: viniltrimetoxisilano

C3: aliltrimetoxisilano

C4: butiltriétoxosilano

C8: 7-octenilmetoxisilano

C11: 10-undeceniltrimetoxisilano

C22: docoseniltriétoxosilano

C10F*: 1,1,2,2-perfluorodeciltriétoxosilano

Cy5: cianina 5, un fluoróforo sintético

IgG: inmunoglobulina G

SFR: *surface fluorescence reader*, lector de fluorescencia de superficie

SNR: *signal-to-noise ratio*, ratio de la señal sobre el ruido

Ta: temperatura ambiente

WCA: *Water Contact Angle*, ángulo de contacto del agua

1. Introducción

1.1 Biosensores y reconocimiento molecular

El estudio y comprensión de los procesos de reconocimiento biomolecular resulta de vital interés en áreas tales como la tecnología de microarrays, la inmunología o los biosensores, dado que todas estas técnicas están basadas en interacciones moleculares específicas entre dos moléculas determinadas.

Los biosensores son dispositivos analíticos capaces de convertir una respuesta biológica, como pueda ser un reconocimiento biomolecular, en una señal detectable que, en última instancia, sea transducible a una señal eléctrica para su análisis. Han de ser específicos, independientes de parámetros físicos ambientales, como el pH o la temperatura y, a ser posible, reutilizables (Mehrotra, 2016).

Una de las clases más ampliamente utilizadas de biosensores son aquellos basados en el empleo de proteínas unidas a fluoróforos, los cuales actúan como transductor de la reacción de reconocimiento, generando una señal lumínica detectable por un sensor óptico. Se distinguen dos grandes grupos de biosensores basados en proteínas fluorescentes. Por un lado, aquellos obtenidos directamente mediante la tecnología del ADN recombinante, en los que la proteína de interés (la que se desea estudiar, o que se empleará en el ensayo) se codifica ya unida al fluoróforo (a menudo proteína verde fluorescente o sus variantes) en un vector con el que se transforman las células deseadas, resultando de gran utilidad en ensayos *in vivo*. En la otra categoría entran todos aquellos obtenidos mediante síntesis química, en los que la proteína de interés, sea natural o recombinante, se une a moléculas fluorescentes sintéticas *in vitro* (Wang *et al.*, 2009).

Al añadir el fluoróforo *in vitro*, es imprescindible cerciorarse de que la unión se realiza en un punto que no afecte a la funcionalidad de la proteína, lo que a menudo hace descartar métodos simples como las reacciones químicas específicas de ciertos tipos de aminoácidos, dado que no es posible garantizar en cuántos o qué aminoácidos de cada proteína se va a producir la unión; por ello se ha de recurrir a estrategias más complejas como técnicas químicas de *protein-labeling* (marcaje de proteínas) o la mutagénesis dirigida para obtener una unión covalente específica y reproducible (Wang *et al.*, 2009).

Al desarrollar un nuevo sistema de reconocimiento molecular, como pueda ser un biosensor, comúnmente se pretende maximizar la interacción específica deseada, al mismo tiempo que se trata de evitar cualquier otra interacción no específica (Mehrotra, 2016). Una de las estrategias para alcanzar este objetivo es la modulación de la mojabilidad de la superficie, esto es, la tendencia a mantener el contacto entre la superficie y el agua cuando se establece el equilibrio mecánico sólido-líquido-aire por acción de las fuerzas adhesivas y cohesivas. Esta propiedad puede afectar a la tendencia de las moléculas de interés, presentes en el líquido, a estar en el lugar apropiado para el proceso de reconocimiento biomolecular, por lo que su modulación resulta de primordial interés. Por ejemplo, en un caso en que se pretenda detectar un analito en una muestra acuosa, se puede emplear una superficie hidrofóbica sobre la que estén dispuestas agrupaciones o puntos (*spots*) de una sonda más hidrofílica (como una inmunoglobulina), con lo que se reducirá la adsorción

inespecífica fuera de las zonas con sondas, en las cuales se concentrará la reacción de reconocimiento molecular (Zhang et al., 2008).

1.2 La mojabilidad

La mojabilidad depende de la naturaleza del material de partida, así como del tratamiento o funcionalización al que éste sea sometido. Así pues, la elección del material inicial determina en gran parte todo el devenir posterior de los resultados o aplicaciones obtenidos sobre el mismo (González-Martínez *et al.*, 2006). El material empleado ha de ser estable física y químicamente, ha de ser posible transducir la señal obtenida con la menor pérdida de información, y ha de tener algún mecanismo que permita el anclaje de las sondas empleadas (Mehrotra, 2016). Estas propiedades pueden ser propias del material, pero también pueden obtenerse durante su funcionalización.

La determinación de la mojabilidad se lleva a cabo mediante la medición del ángulo de contacto del agua (WCA, *Water Contact Angle*). Si bien existen multitud de metodologías para realizar esta medición, es preferible escoger un protocolo bien establecido y que sea posible emplear en superficies en un amplio rango de hidrofobicidad. Así, uno de los más empleados es el método de la gota estática o *sessile-drop method*, en que se mide el ángulo de una gota de agua en reposo, posada sobre la superficie (Drelich, 2013). Este ángulo se determina al hallar las rectas tangentes a la gota y a la superficie. Para ello, se suele perfilar el perímetro completo de la gota empleando la ecuación Young-Laplace, y obteniendo el punto de corte con la línea de superficie. Aunque este sistema de medición se considera adecuado, se ha de tener en cuenta que en el caso de superficies microscópicamente irregulares (prácticamente todas las que no han sido artificialmente pulidas o son resultado de alguna cristalización mineral), se obtiene un ángulo de contacto *aparente* o global, que diferiría de los múltiples ángulos obtenibles a nivel *microscópico* o local (Drelich, 2013). Además, al medir el ángulo de contacto en superficies porosas (filtros, materiales celulósicos o arcillosos, matrices de fibras, etc.), si la hidrofobicidad no alcanza un umbral determinado por las características de la superficie, la gota atravesará o será absorbida por el material y se obtendrá un ángulo nulo. Este ángulo es solamente representativo para el agua, y si bien sirve como referencia al emplear otras sustancias en disoluciones acuosas, esas disoluciones no tienen por qué comportarse exactamente igual que el agua pura. Por ello, si se desea predecir con mayor exactitud el comportamiento en condiciones reales, es apropiado realizar mediciones adicionales empleando disoluciones lo más próximas posible a las que se emplearán más adelante (Kontogeorgis y Kiil, 2016). Por ejemplo, si se pretende fijar una sonda disuelta en PBS-G (tampón PBS con Glicerol al 5%), estudiar cómo se comporta el PBS-G sobre la superficie de sensor puede ayudar a explicar los datos que se obtengan al caracterizarlo en el futuro.

1.3 Modulación de la mojabilidad

Se han realizado estudios previos en chips de vidrio sobre cómo la modulación de la mojabilidad, realizada mediante la funcionalización de la superficie al ser recubierta con una selección de alcoxisilanos de distinta longitud de cadena, puede afectar a las reacciones de reconocimiento biomolecular (Aragón *et al.*, 2018). Estos estudios concluyeron que, como norma general, una elevada hidrofobicidad podía aumentar la relación señal-ruido (SNR) en un orden de magnitud respecto a una superficie de mojabilidad moderada, al incrementar la densidad óptica (relación señal/área) de los puntos y además reducir la señal de fondo.

Los alcoxisilanos (en adelante, simplemente silanos) son moléculas sintéticas compuestas por un átomo de silicio unido a una cadena carbonada. Los otros tres electrones de valencia del átomo de silicio están unidos mediante átomos de oxígeno a grupos alquilo, generalmente metilos o etilos (Figura 1). Su hidrofobicidad dependerá de la longitud y los grupos funcionales presentes en la cadena lateral.

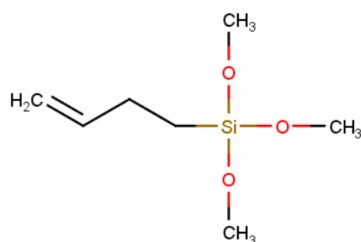


Figura 1: Estructura Química de un silano con cadena lateral de 4 carbonos (C4)

Para funcionalizar una superficie de vidrio (o de microfibra de vidrio) con los silanos en primer lugar es preciso activar la superficie, esto es, generar radicales libres en la misma a los cuales se puedan unir los silanos mediante el establecimiento de enlaces covalentes con el átomo de silicio (Aragón *et al.*, 2018). Existen dos estrategias: la primera, vía “húmeda”, consiste en la inmersión en un medio extremadamente oxidante, como la llamada “disolución piraña”, consistente en una mezcla de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y la segunda, vía “seca”, consistente en la exposición del material a radiación ultravioleta. Esta estrategia es mucho más sencilla, segura, barata (sólo se consume electricidad), respetuosa con el medio ambiente e incluso reproducible, al estar los tiempos de exposición totalmente automatizados.

1.4 Reacción del tiol-eno

Existen multitud de técnicas que permiten anclar una molécula de interés a un determinado material o superficie. La técnica escogida para ello depende de la estructura química de ambos elementos. En el caso de funcionalizar superficies con silanos con un doble enlace terminal ($R-CH=CH_2$) se tienen dos ventajas: puede controlarse la hidrofobicidad y el doble enlace les otorga una amplia reactividad química en la que dicho enlace se rompe con el fin de que los carbonos adyacentes se unan a nuevos sustituyentes.

La biotina tiolada, al incorporar un grupo tiol en el extremo ($R-SH$), es capaz de reaccionar con el doble enlace terminal de los silanos y formar un enlace covalente. Esta reacción, denominada reacción del tiol-eno (Figura 2), se trata de una de las principales reacciones de la *Click Chemistry*, una rama de la química popularizada por el nobel K. Barry Sharpless, dedicada a la búsqueda de un conjunto de reacciones potentes, rápidas, sencillas, específicas y reproducibles que permitan obtener rápidamente nuevos compuestos al generar enlaces heteroatómicos ($C-X-C$) (Kolb *et al.*, 2001). Esta reacción no sucede de forma espontánea a velocidad apreciable y ha de ser catalizada, para lo que existen otras dos estrategias: la primera consiste en la exposición de ambos compuestos en contacto a radiación ultravioleta; en la segunda, llamada adición de Michael, se añade una base que actúa como catalizador. Resulta preferible la radiación UV, por ser más sencilla, segura, barata y reproducible.

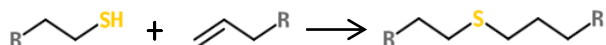


Figura 2: Reacción del Tiol-eno

La biotina tiolada, al actuar como el biorreceptor inmovilizado o “sonda”, constituye el corazón de este biosensor, dado que no es sólo el agente que lleva a cabo la reacción de reconocimiento molecular, sino también el puente o *linker* que anclará todo el complejo a la superficie, puesto que estará unida a los silanos. Todos estos elementos afectarán a la reacción de reconocimiento. Además, la biotina tiolada también determina la metodología usada para establecer el puente que la una a la superficie, debido a la presencia del grupo tiol.

1.5 Reacciones de reconocimiento de la biotina

La biotina es una molécula muy popular en los ensayos de puesta a punto de nuevos sistemas de reconocimiento debido que se halla implicada en múltiples reacciones de reconocimiento molecular con una altísima constante de afinidad (K_a).

La primera de estas reacciones, con la avidina, fue descubierta a mediados del siglo pasado, y se estableció una K_a igual a 10^{15} mol^{-1} (Green, 1963), constituyendo la interacción no-covalente más fuerte conocida, debido a la formación de ocho puentes de hidrógeno y a la actuación de fuerzas electroestáticas, debidas a la elevada hidrofobicidad del sitio activo de la avidina. Al año siguiente, se descubrió un análogo funcional de origen bacteriano (Chaiet y Wolf, 1964), la estreptavidina, con una K_a aproximada de 10^{14} mol^{-1} (Howarth *et al.*, 2006). Ambas moléculas se han venido empleando desde entonces para poner a prueba nuevos sistemas de reconocimiento molecular, dado que su elevadísima afinidad permite obtener resultados incluso en condiciones todavía sin optimizar.

Siendo la biotina una biomolécula tan empleada, se ha desarrollado una amplia gama de anticuerpos (AB) anti-biotina. Compañías tan importantes como ThermoFisher Scientific, Sigma-Aldrich, Abcam o Biologend producen múltiples preparados, mono o policlonales, obtenidos en ratón, conejo o cabra. Además de los anticuerpos purificados, también disponen de anticuerpos conjugados con fluoróforos o metales nobles, lo que indica la popularidad de la biotina también en inmunoensayos (a menudo es usada como marcador o *label*).

1.6 Transducción de la señal

Como se ha indicado previamente, una de las características necesarias de un biosensor es que produzca algún tipo de señal que se pueda transducir a una señal eléctrica. En el caso de los biosensores basados en fluorescencia asociada a proteínas, la señal obtenida mediante un sensor óptico puede codificarse principalmente en dos tipos de archivo: un archivo que recoja únicamente la intensidad total de la fluorescencia detectada por el sensor (muy sencillo, pero útil para procesos automatizados), o una imagen del área escaneada, en la que cada píxel viene definido por unas coordenadas espaciales y tiene asociada la intensidad alcanzada en ese punto. La imagen la suele producir un tipo de sensor óptico denominado lector de fluorescencia de superficie (SFR, Surface Fluorescence Reader), más complejo y que es gobernado por software especializado desde un PC. La imagen, además de permitir trabajar con un *array*, permite determinar una serie de parámetros importantes para caracterizar adecuadamente el sensor.

2. Objetivos

El objetivo principal del presente Trabajo Fin de Grado consiste en el desarrollo de un biosensor fluorescente basado en interacciones entre proteínas empleando como sustrato material una matriz de microfibra de vidrio, la cual será funcionalizada con distintos alcoxisilanos. Esto permitirá, además de alterar la mojabilidad, anclar posteriormente una molécula que emplearemos como sonda (en este caso, Biotina Tiolada, BT) en una matriz de múltiples bioensayos simultáneos o *array*.

Como objetivos secundarios, se tratarán de desarrollar estrategias tales que optimicen el consumo de tiempo y recursos (reactivos, instrumental de uso común, etc.) y den lugar a las mejores prestaciones, sensibilidad especialmente, del sistema final a aplicar. Con el fin de observar el comportamiento en un caso más próximo a una aplicación real, se estudiará un inmunoensayo indirecto que emplea dos anticuerpos.

Este proyecto se enmarca en una línea de trabajo sobre la modulación de la mojabilidad en superficies de vidrio realizados por el grupo SyM (Señal y Medida) del Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM).

3. Materiales y Métodos

3.1 Materiales

Como superficies modulables se han empleado filtros de microfibras de vidrio GF/C de 90 mm, con un diámetro de poro de 1,2 μm (Whatman plc. Maidstone, UK).

Los silanos estudiados en este trabajo han sido: viniltrimetoxisilano (C_{02} -VTMS), aliltrimetoxisilano (C_{03} -ATMS), butiltriethoxisilano (C_{04} -BTES), 7-octenilmetoxisilano (C_{08} -OTMS), 10-undeceniltrimetoxisilano (C_{11} -UTMS), docoseniltriethoxisilano (C_{22} -DFES) y 1,1,2,2-perfluorodeciltriethoxisilano (C_{10F^*} -FTES), suministrados por Gelest, Inc. (Morrisville, PA, USA)

Se han empleado los siguientes biorreactivos: biotina tiolada (síntesis propia del grupo de investigación a 1 g/L siguiendo el protocolo de Weinrich *et al.*, 2009), estreptavidina-Cy5 a 1 g/L (GE HealthCare UK Limited), Inmunoglobulina G antibiotina de conejo a 1 g/L (Abcam plc, Cambridge CB4 0FL, UK.), e inmunoglobulina G anticonejo de cabra fusionado al fluoróforo Alexa-Fluor-647 a 2 g/L (Eugene, Oregón, USA.).

Los tampones empleados han sido PBS (Na_3PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4), PBS-G (PBS con 5% de Glicerol) y PBS-T (PBS con 0.05% de Tween 20).

Como disolventes se ha empleado tolueno en grado de síntesis, isopropanol y agua Milli-Q® (*Milli-Q® water*).

3.2 Silanización de superficies

Los filtros de microfibras se recortaron en fragmentos rectangulares (“chips”) de 25x15 mm. En primer lugar, se procede a la activación de la superficie, para lo cual los chips se introdujeron en la cámara ultravioleta UV-OH 150 Lab (FHR, Ottendorf-Okrilla, Germany) y se irradiaron durante 10 minutos.

La silanización se realizó por la vía húmeda, para lo cual se preparó una disolución del silano correspondiente al 1% en tolueno (grado de síntesis). La mojabilidad de la superficie dependerá de la longitud de cadena del silano empleado. Todos se presentan en estado líquido a temperatura ambiente a excepción del silano de 22 carbonos (docoseniltriethoxisilano, C_{22} -DFES) que, debido a su elevado peso molecular, está en estado sólido.

Debido a que los silanos van degradándose, perdiendo la capacidad de adhesión a la superficie una vez están expuestos a la humedad ambiental (Arkles *et al.*, 2014), los viales que los contienen se rellenan de gas argón (gas noble de alta densidad) y se sellan con Parafilm tan pronto se ha obtenido la alícuota que se va a emplear. Por otro lado, una vez realizadas las disoluciones correspondientes de los silanos, está establecido que se dispone de unas dos horas hasta que el silano quede inservible (Aragón *et al.*, 2018). Esto limita la cantidad de repeticiones que se pueden realizar en serie con una misma alícuota. En presencia de agua, incluyendo la de la humedad ambiental, los grupos metilo/etilo se liberan formando metanol, y el átomo de silicio queda unido a grupos hidroxilo, sin la capacidad de reaccionar con los radicales de la superficie (Figura 3).

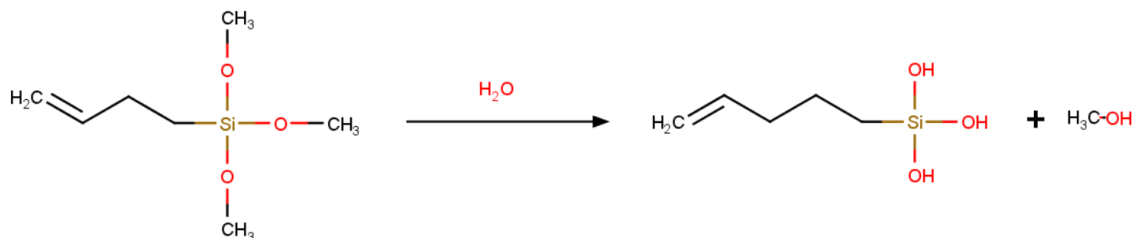


Figura 3: Estructura química y degradación del silano C4

La funcionalización se realizó en viales individuales, en cada uno de los cuales se depositó un chip, que permanecieron 15 minutos en la disolución.

Posteriormente se realizó el lavado con isopropanol, para lo cual se realizan dos inmersiones sucesivas y se finalizó con un lavado a chorro. Finalmente, las superficies se dejaron secar al aire y se introdujeron en estufa a 150°C toda la noche (Noguera *et al.*, 2017).

Paralelamente, y con el fin de aumentar la hidrofobicidad de las superficies, también se silanizaron algunas réplicas adicionando el silano fluorado 1,1,2,2-perfluorodeciltrietoxisilano (C_{10F₁₉}-FTES) en concentración 1/10.000 o 2/10.000 v/v. Dado que la disolución del silano no fluorado en tolueno es al 1%, una vez concluida la silanización el C10F* quedará al 1 o 2% de concentración en relación con el silano, respectivamente. Este silano no puede realizar la reacción tiol-eno al carecer de doble enlace (C=C) terminal, por lo que no se le puede anclar la molécula de biotina tiolada, pero puede unirse covalentemente a la superficie, al igual que los otros silanos, contribuyendo a la modulación de la superficie. Cada tratamiento se llevó a cabo sobre 10 chips, en dos tandas de 5.

3.3 Caracterización de las superficies

Para evaluar la mojabilidad de las superficies se midió el ángulo de contacto estático con gotas de agua Milli-Q® (WCA) usando el equipo Attension Theta Lite (Biolin Scientific AB.) junto al software OneAttension, en el que se programa un sistema de medición automático.

El procedimiento seguido para examinar este parámetro consistió en 3 gotas de 3 µL medidas en cada una de 3 réplicas de cada tratamiento. Para ello, se programa un iniciador que detecta la caída de la gota e inicia una cuenta atrás de 3 segundos (tiempo para que la gota se estabilice), tras lo que se graban imágenes de la gota durante 4 segundos a 26 fps (fotogramas por segundo). Una vez establecida la línea de la superficie, el programa estima el ángulo medio, su desviación típica y el volumen aproximado empleando la ecuación de Young-Laplace.

El procedimiento se repitió con PBS-G (PBS con Glicerol al 5%), el tampón que se emplearía a continuación para llevar a cabo la fijación de la biotina tiolada.

3.4 Fijación de la biotina tiolada a las superficies

Con el fin de que la biotina tiolada (BT) se fijara sobre las superficies y fueran reconocibles, los chips rectangulares de 25x15mm se identificaron y se fijaron sobre portaobjetos de vidrio empleando adhesivo en cinta de dos caras libre de disolventes.

A continuación, empleando un Biodot AD1500 (Biodot Inc., Alton Pkwy, Irvine, CA, USA) se depositaron gotas de 50 nL (8 líneas) de biotina tiolada (BT, capaz de realizar la reacción tiol-eno) en PBS-G en concentraciones decrecientes (rango 2,5-0,02 mM), ocupando una matriz de 72 puntos (8x9). Asimismo, entre las filas 5 y 6 (0,16-0,08mM) se dejó un espacio equivalente a una línea vacía sobre el que no se imprimió (Figura 4). La línea vacía permite posteriormente obtener el fondo y le confiere asimetría a la matriz para confirmar que la orientación es correcta.

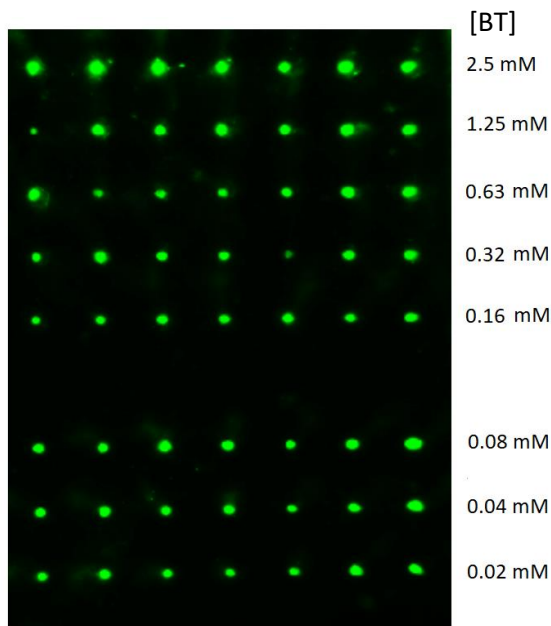


Figura 4: Distribución de los puntos en chip impreso con BT

Seguidamente, y para que la reacción del tiol-eno se produjera y la BT se uniera covalentemente al silano del chip, éstos se introdujeron en la cámara ultravioleta UV-OH 150 Lab y se irradiaron durante 30 segundos, activando la fotocatalisis e iniciando la reacción. Tras esto, se dejaron 10 minutos en oscuridad para que la reacción se completara y se eliminó el exceso de biotina mediante dos lavados sucesivos con PBS-T (PBS al 0.05% de Tween20) y otro con agua destilada.

3.5 Reacción de reconocimiento de la biotina

Para determinar el efecto de la mojabilidad en el reconocimiento biomolecular, se llevaron a cabo dos ensayos: a la mitad de las réplicas se les añadió una disolución de estreptavidina-Cy5 (como prueba de concepto, ver Figura 5), y en las otras se empleó en primer lugar un anticuerpo antibiotina de conejo, tras lo cual se añadió un segundo anticuerpo marcado con Alexa-Fluor-647 (sistema AB1/AB2-AF*) que reconoce la región constante (FC) de los anticuerpos de conejo, (simulando un inmunoensayo con dos anticuerpos implicados, ver Figura 5). La fluorescencia obtenida en ambos casos se registró mediante un lector de fluorescencia de superficie (SFR, *Surface Fluorescence Reader*) de fabricación propia (Mira *et al.*, 2004). Las señales se analizaron para obtener determinados valores como la intensidad de la señal, el fondo producido por la superficie y especialmente el SNR (*signal-to-noise ratio* o relación señal/ruido), obtenido al dividir la intensidad de los puntos por la desviación típica del fondo producido por el chip (Johnson, 2006). Esta intensidad de fondo se obtiene al restar la luminiscencia residual de la superficie (consecuencia de la excitación lumínica anterior o de la refracción de la fluorescencia) a la del fondo del sensor, una

superficie de cuarzo mineral negro pulido, en una serie de puntos tomados como controles negativos. Como norma general, en los artículos relacionados con los biosensores se exige una SNR superior a 10 para considerar que se está produciendo una señal detectable. Como se está poniendo a prueba una plataforma nueva, se ha optado por incrementar dicho umbral hasta una SNR de 20, con el fin de tener mayor fiabilidad.

3.5a Reacción de reconocimiento mediada por estreptavidina-Cy5

Cada chip, ya con el *array* de BT impreso, se sumergió boca abajo en un pocillo con una disolución de estreptavidina-Cy5 a 5 mg/L en PBS-T (o se dejó flotando, si es una superficie superhidrofóbica, poniendo atención en que no queden burbujas de aire entre ambas superficies). Los pocillos con los chips se mantuvieron una hora en oscuridad y agitación constante a temperatura ambiente (T_a). Completada la reacción, en la que la estreptavidina-Cy5 reconoce la biotina (Figura 5), se realizaron 3 lavados consecutivos en PBS-T de 5, 10 y 10 minutos de duración respectivamente (también en oscuridad para prevenir la degradación del fluoróforo). Finalmente, se realizó un lavado con agua destilada a vacío en un embudo Buchner que también sirvió para secar rápidamente los chips. Tras esto, se llevaron al SFR, con el que se obtuvieron imágenes con un segundo de exposición, y a ganancia 1x.

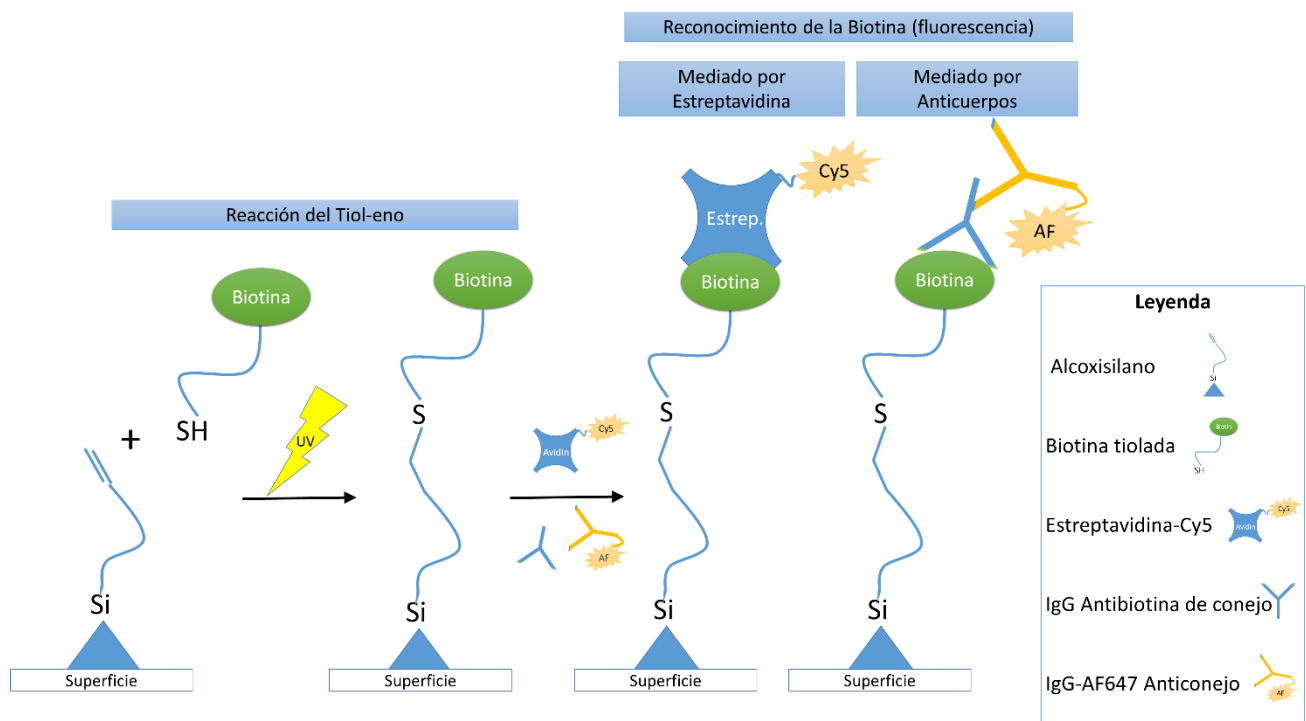


Figura 5: Esquema del proceso completo

3.5b Reacción de reconocimiento mediada por anticuerpos

Para verificar que el sistema modelo es aplicable a otras reacciones de reconocimiento molecular, se realizó un inmunoensayo. Para ello se preparó una disolución con el anticuerpo antibiotina de conejo a 0.5 mg/L en PBS-T, con la que se recubrió el chip, en el que previamente se había impreso el *array* de BT, y se dejó incubar durante una hora (T_a). Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados sucesivos con PBS-T por inmersión en agitación y otro con agua destilada para eliminar el

exceso de anticuerpo no unido. A continuación, se preparó otra disolución con un anticuerpo anticonejo marcado con el fluoróforo Alexa-Fluor-647 a 5 mg/L y se recubrió el chip con ella, incubándolo una hora en oscuridad hasta que la reacción se completó (Figura 5). Trascurrido este tiempo, se sucedieron de nuevo lavados con PBS-T seguidos de un lavado con agua destilada a vacío en un embudo Buchner para secarlos. Finalmente, se llevaron al SFR, con el que se obtuvieron imágenes en las mismas condiciones.

3.6 Tratamiento estadístico de datos WCA

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó con el programa Statgraphics Centurion XVII, donde se realizaron dos tipos de análisis de varianza con características similares.

Un análisis ANOVA multifactorial, tomando el WCA como variable dependiente y la longitud de cadena del silano y la cantidad de silano fluorado como factores. Con este análisis se determinó si, efectivamente, ambos factores tenían una incidencia significativa sobre la mojabilidad, además de informar también sobre la interacción entre los mismos.

Un análisis ANOVA Simple: tomando el ángulo como variable dependiente y el tratamiento, consistente en el silano empleado y la cantidad de fluorado presente, como factor. Se empleó para visualizar rápidamente diferencias significativas entre las medias, así como desviaciones típicas para cada tratamiento y clasificarlos en una prueba de múltiples rangos.

3.7 Tratamiento de imagen

Las imágenes obtenidas se trataron empleando el programa TotalLab™ Quant v13.2 con el fin de cuantificar la señal de los puntos obtenidos con las distintas concentraciones de biotina tiolada. Así se obtuvieron diversos parámetros (SNR, intensidad total, diámetro de los puntos), y se emplearon para determinar el umbral mínimo detectable, estipulado como SNR>20.

Los puntos anómalos (con intensidad anormalmente elevada o reducida respecto al resto de puntos a su misma concentración) se eliminaron en esta etapa para no contaminar el resto de los procedimientos.

3.8 Ajuste de los datos de fluorescencia y determinación del intervalo de trabajo

Finalmente, con el fin de caracterizar en mayor detalle determinados tratamientos en los que se hubiera obtenido una SNR significativa, se ajustaron los resultados obtenidos a una curva logística (sigmoideal) de 4 parámetros (Figura 6) empleando el programa SigmaPlot (2014).

$$y(x) = \min + \frac{(\max - \min)}{\left(1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^{-p}\right)}$$

Figura 6: Ecuación de la curva logística de 4 parámetros, donde min es el mínimo de la curva, max el máximo, EC50 la ordenada en la que se halla el punto de inflexión, y p el coeficiente de Hill, que determina la pendiente

Como variable Y se tomó la fluorescencia detectada y como variable X la concentración de biotina de dicha fluorescencia. Además, para visualizar la curva correctamente, el eje X se ha de expresar en

forma logarítmica, de tal forma que, al mantener una misma ratio de disolución (por ejemplo, $\frac{1}{2}$), los puntos queden regularmente espaciados. Esto obliga a sustituir el blanco ($[BT]=0$) por un valor cuasi nulo, habiéndose escogido 10^{-4} mM.

4. Resultados

4.1 Estudios Preliminares

El material empleado no ha sido utilizado anteriormente como superficie de funcionalización. Al presentar una estructura totalmente distinta al vidrio, hubo que dedicar un tiempo considerable a adaptar los protocolos para el vidrio a un material poroso. En los siguientes apartados se muestran, de forma abreviada, los criterios seguidos para adaptar el formato a silanizar, el procedimiento de aplicación de los biorreactivos y el protocolo de lavado.

4.1.1 Optimización del método de silanización

Inicialmente, la funcionalización de la superficie se llevaba a cabo no con los chips ya recortados, como se ha descrito en el procedimiento experimental, sino silanizando los filtros completos de 90 mm mediante inmersión por agitación en placas Petri durante 15 minutos. Una vez silanizados dos lotes de filtros, el primero se destinó a medir el WCA (como se indica en el apartado 3.3) y el segundo fue sometido a la reacción del tiol-eno sobre un *array* de biotina y revelado con estreptavidina-Cy5 (como se indica en los apartados 3.4 y 3.5). Con este sistema de silanización de filtro completo se observaron dos deficiencias. La primera era una falta de homogeneidad en la silanización, ya que se comprobó que el recubrimiento obtenido resultaba más intenso en la periferia del filtro que en su área central, probablemente debido a la fuerza centrífuga, que provocaba la acumulación de la disolución de silanización en el borde de las placas Petri, mientras que apenas cubría la zona central.

El efecto se manifestó en una elevada dispersión de los valores de WCAs en el filtro (Tabla 1), así como por variaciones en el diámetro de los puntos de algunos chips.

Por otro lado, al cortar el filtro completo (después de ser silanizado), los bordes de los chips no quedaron sellados y los reactivos penetraban en el material desde los bordes por capilaridad, resultando prácticamente imposibles de eliminar a posteriori, lo que impedía realizar mediciones próximas a la periferia del chip (Figura 7). Este efecto es mucho más notorio en los tratamientos de silanización más hidrofóbicos.

A la vista de estos resultados se repitieron los mismos ensayos partiendo de chips de microfibras de vidrio recortados previamente a la silanización, en rectángulos de 25x15 mm, como se describe en el apartado 3.2. Las medidas de los WCAs obtenidos con esta técnica se recogen en la última columna de la Tabla 1.

Tabla 1: WCA obtenido en las dos estrategias de silanización

Tratamientos ensayados: viniltrimetoxisilano (C2), aliltrimetoxisilano (C3), butiltrióxido (C4), 7-octenilmetoxisilano (C8), 10-undeceniltrimetoxisilano (C11) y el docoseniltrióxido (C22); al 0, 1 y 2% de 1,1,2,2-perfluorodeciltrióxido (C10F*-FTES)

Surface	C10F* (%)	WCA (°)	
		Filtros enteros	Chips
T	0	0	0
T	1	114 ± 10	128 ± 2
T	2	92 ± 20	134 ± 2
C2	0	0	0
C2	1	0	0
C2	2	126 ± 9	125 ± 1
C3	0	0	0
C3	1	0	0
C3	2	131 ± 6	137 ± 2
C4	0	0	0
C4	1	124 ± 3	135 ± 2
C4	2	125 ± 9	138 ± 2
C8	0	124 ± 3	-
C8	1	130 ± 6	-
C8	2	132 ± 6	-
C11	0	127 ± 6	140 ± 2
C11	1	136 ± 4	138 ± 2
C11	2	136 ± 7	142 ± 2
C22	0	130 ± 5	-
C22	1	137 ± 7	-
C22	2	133 ± 7	-

Como se observa en la tabla, hay dos silanos que no se han repetido en las medidas de WCA sobre el formato con el chip recortado y, por tanto, no forman parte del ensayo definitivo. En el caso del silano C8, un fallo en la cadena de suministro ha causado un retraso superior a 5 meses en la entrega de la nueva remesa del producto, necesario para continuar los ensayos, al haber terminado ya el lote anterior. En el caso del C22, no se ha observado ningún cambio estadísticamente significativo respecto al C11 (Tabla 2). Además, debido a su elevado peso molecular, el C22 es sólido y presenta gran dificultad para disolverse de forma homogénea, presentando una textura pastosa que es preciso manipular con espátulas y pesar en balanza analítica. Teniendo en cuenta que los silanos tienen una escasa vida útil fuera de una atmósfera protectora y que pierden la capacidad de adhesión, la lentitud en la manipulación del C22 contribuye a introducir un factor de incertidumbre en los datos obtenidos, por lo que se decidió prescindir de él, al disponer ya de las variantes del C11 como escenarios superhidrofóbicos.

Tabla 2: Prueba de múltiples rangos con C11 y C22 de un ANOVA unidimensional

Método: 95,0 porcentaje LSD

Silano	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
C11	27	133,343	1,09865	x
C22	27	133,399	1,09865	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
C11 - C22		-0,055556	3,12399

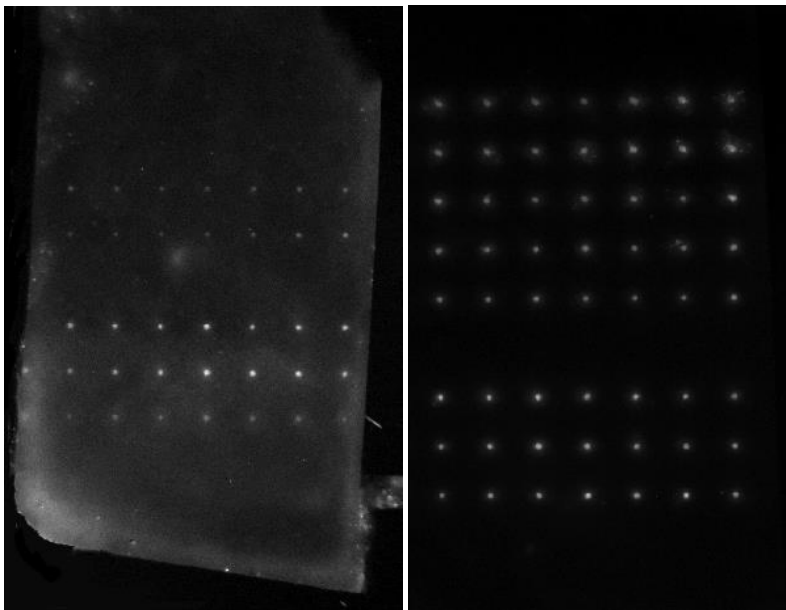


Figura 7: Comparación de Chips C11 con ambas estrategias. Silanización del filtro entero (izquierda) y de chip ya recortado (derecha)

Tras las diferentes pruebas de la etapa de silanización se llegó a concluir que el mejor sistema era la silanización de chips ya recortados con las medidas finales de 15x20 mm, en pocillos individuales, tanto para mejorar su recubrimiento en los bordes y obtener puntos más nítidos como para mejorar la homogeneidad de la silanización, y consecuentemente, la hidrofobicidad.

La comparación entre los WCA de las superficies silanizadas nos revela que los silanos C3, C3 y C4 son hidrófilos (la gota se absorbe y el WCA se anota como cero), mientras que los de cadena larga, C8, C11 y C22, son hidrófobos, con WCAs superiores a 120°.

Cabe destacar que el comportamiento hidrófilo-hidrófobo de los distintos silanos puede modularse adicionando una pequeña cantidad del silano fluorado C10F*, en una proporción respecto al silano base de un 1 ó 2%. Así pues, una adición del 2% de C10F* permite obtener una superficie hidrófoba en C2, C3 y C4, siendo insuficiente un 1%.

Como parte de estos ensayos también se investigó si con la adición de concentraciones intermedias, entre el 0, 1 y 2%, de C10F* se lograban obtener WCAs intermedios (50-120°), como los que el grupo de investigación había obtenido sobre vidrio (Noguera *et al.*, 2017), pero los resultados fueron negativos por tratarse en nuestro caso de una superficie rugosa y porosa. En los tratamientos que estaban en el límite de los 120°, había gotas que mantenían los 120° y gotas que eran absorbidas, obteniéndose un WCA de 0° en ellas (datos no mostrados). Esto sugiere que el C10F* no estaba en suficiente concentración como para conseguir una superficie homogénea.

Los ANOVAS realizados sobre los datos recabados corroboraron de forma objetiva que tanto el silano escogido para el recubrimiento, como la adición del silano superhidrofóbico C10F* modulaban significativamente la hidrofobicidad de nuestro material (Tabla 3), y que además tenían una interacción significativa entre ellos (lógicamente, el C10F* aumenta más la hidrofobicidad con un silano hidrófilo como C2 que con uno superhidrofóbico como el C11). Además, un ANOVA unifactorial (Tabla 4) permitió agrupar los tratamientos en función de su hidrofobicidad.

Tabla 3: Tabla ANOVA del WCA de los chips ya recortados. Se observa cómo tanto la longitud del silano como la adición de C10F* y su interacción son significativos

Análisis de Varianza para Ángulo - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Silano	172861,	4	43215,1	2213,73	0,0000
B:% C10F*	258851,	2	129426,	6629,93	0,0000
INTERACCIONES					
AB	163371,	8	20421,4	1046,10	0,0000
RESIDUOS	2342,57	120	19,5214		
TOTAL (CORREGIDO)	597426,	134			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla 4: Prueba de múltiples rangos de los distintos tratamientos obtenida mediante un ANOVA unidimensional

Método: 95,0 porcentaje LSD

ID:	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C2 1	9	0	X
C3 1	9	0	X
T 0	9	0	X
C3 0	9	0	X
C2 0	9	0	X
C4 0	9	0	X
C2 2	9	124,946	X
T 1	9	128,91	X
T 2	9	134,178	X
C4 1	9	135,248	X
C3 2	9	136,874	XX
C11 1	9	137,399	XX
C4 2	9	138,083	XXX
C11 0	9	139,893	XX
C11 2	9	142,056	X

4.1.2 Sistemas de aplicación de los biorreactivos

Una vez estudiada la hidrofobicidad de las superficies obtenidas se pasó a optimizar la aplicación de los biorreactivos.

La inmersión en pocillos individuales en oscuridad y agitación conlleva el gasto de una gran cantidad de reactivos, por lo que antes de decidir su empleo se evaluaron tres métodos de aplicación del fluoróforo estreptavidina-Cy5 a superficies silanizadas y biotiniladas.

El primero fue el método del “plastón”, consistente en dejar caer una gota de aproximadamente 25 μL en el centro del chip o área a medir, depositando suavemente encima un cubreobjetos de 25x25 mm que aplasta la gota y la extiende, recubriendo la totalidad del chip con una fina película del reactivo. Este método resulta muy útil al trabajar con superficies impermeables, pero en nuestro caso, exceptuando chips con tratamientos muy hidrofóbicos como C4+2 o los C11, que en la práctica son impermeables, las gotas acababan filtrándose en el chip, tras lo que se expandían por capilaridad, pudiéndose observar una estructura en “halo”, dentro de la cual aún se podían percibir algunos de los puntos del *array* (Figura 8a).

El segundo método estudiado fue la distribución del fluoróforo por capilaridad, depositándolo en uno de los extremos alargados del chip y permitiendo su difusión por capilaridad; sin embargo, la estreptavidina carecía de la movilidad suficiente como para alcanzar un reparto homogéneo en un periodo de incubación razonable que, además, tenía que transcurrir en oscuridad (Figura 8b).

En último lugar, se ensayó la incubación por inmersión en oscuridad y agitación, tanto en pocillos individuales como en un mismo recipiente, y tras constatar que, al estar juntos, los chips tendían a formar agregados que impedían una exposición homogénea de su superficie al medio con el biorreactivo, se optó por realizar inmersiones individuales (Figura 8c).

En las imágenes obtenidas con estas metodologías, se puede observar que en la última (Figura 8c) se distinguen claramente todos los puntos del *array*, por lo que fue elegida para los ensayos, considerando que, en todo caso, los chips hidrofóbicos impermeables obtenían con el plastón unos resultados similares con un consumo menor de los reactivos que los empleados para la inmersión.

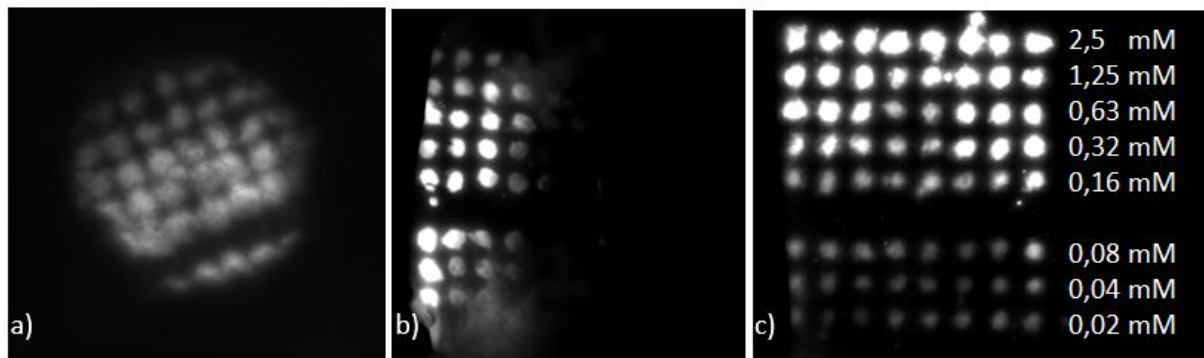


Figura 8: Comparación de metodologías de aplicación del fluoróforo en superficie hidrófila (C3). Por plastón (a), capilaridad (b) e inmersión individual (c)

4.1.3 Sistemas de lavado de los chips

Con el fin de eluir todo el reactivo no unido covalentemente para reducir el ruido de fondo, se evaluaron tres sistemas: lavado a chorro, lavado con filtración a vacío e inmersión del material en agitación.

En el caso del lavado a chorro, consistente en 3 lavados consecutivos primero con PBS-T, y después con agua destilada, se observó que con los chips más hidrófobos el protocolo se demostró rápido y efectivo; en los chips hidrófilos, en los que la biotina y los reactivos penetran en el interior, el lavado no lograba eluir el exceso de reactivos presente en el interior, lo que causaba un brillo

considerable en el fondo del chip al medir la fluorescencia, deteriorando en gran medida las mediciones.

La segunda metodología probada fue la filtración a vacío en embudo Büchner. Este método eliminaba con mayor éxito los reactivos que hubieran penetrado en el chip al generarse un gradiente de presión que forzaba al PBS-T y al agua destilada a travesar el chip, aunque en el caso de los chips hidrófobos no se observaba ninguna diferencia, dado que no tenían reactivos en su interior, y además su hidrofobicidad evitaba que el agente de lavado los atravesara. Además, este sistema era lento y no era posible realizarlo en oscuridad completa.

Con el tercer sistema, la inmersión en agitación, se pretendía que la movilidad de los chips y la presencia de un gran volumen relativo de PBS-T facilitarían una limpieza por difusión. La ventaja de este método es que permite trabajar en paralelo, dado que pueden tenerse varios chips en un mismo recipiente (como una placa Petri), y se podía llevar a cabo fácilmente en oscuridad. Se optimizaron el tiempo de lavado y los volúmenes de PBS-T necesarios y se corroboró que este sistema lograba unos resultados similares a los del lavado a vacío. Los ensayos determinaron que 3 lavados sucesivos de 5, 10 y 10 minutos con 4 mL de PBS-T por chip eran suficientes. Así pues, se escogió este sistema de lavado en agitación en oscuridad para los estudios siguientes.

4.2 Reconocimiento mediado por estreptavidina-Cy5

Una vez optimizados los métodos de incubación de los reactivos y de lavado se compararon los tratamientos de silanización seleccionados (C2, C3, C4 y C11, al 0, 1 y 2% de C10F*. Para ello se tuvieron en cuenta las siguientes variables: intensidad de la señal, SNR y los valores de los ángulos de contacto del agua y del PBS-G (llamado GCA para abreviar, no confundir con *Glicerol Contact Angle*).

Las superficies funcionalizadas, tras ser biotiniladas (apartado 3.4) se revelaron con estreptavidina-Cy5. El intervalo de BT empleado fue de 2,5-0,02 mM. Los resultados completos (con datos de las medias de cada fila de cada chip) pueden hallarse en el Anexo I. De las 8 concentraciones de biotina tiolada que componen las filas de la matriz, se seleccionó la de 0,63 mM, que se corresponde con la tercera fila, como valor representativo. Los valores medios de dicha fila (9 repeticiones) se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Resultados de los chips revelados con Estreptavidina-Cy5

Silano	C10F* (%)	Menor [BT] detectada ^[1] (mM)	Area del punto (mm ²) ^[2]	Intensidad de la señal ^[2] (pixel*10 ⁶)	SNR ^[2]	Intensidad/Area (pixel*10 ⁶ /mm ²) ^[2]	WCA (°)	GCA (°)
T	0	0,08	1,0634	108 ± 22	72,94	101,56	0	0
T	1	-	1,0634	3 ± 0,9	2,68	2,82	128 ± 2	0
T	2	-	0,7813	0,6 ± 0,2	-	0,77	134 ± 2	125 ± 3
C2	0	0,08	1,1408	38 ± 9	63,92	33,31	0	0
C2	1	0,04	1,0636	23 ± 3	135,8	21,62	0	0
C2	2	<0,02	1,0636	15 ± 4	319,7	14,10	125 ± 1	0
C3	0	0,08	1,1408	31 ± 7	41,4	27,17	0	0
C3	1	0,08	0,9168	71 ± 6	67,0	77,45	0	0
C3	2	0,04	0,1099	0,6 ± 0,2	74,3	5,46	136 ± 2	124 ± 3
C4	0	0,08	1,1408	45 ± 4	49,55	39,45	0	0
C4	1	0,08	1,1408	37 ± 5	81,14	32,43	135 ± 2	123 ± 3
C4	2	-	0,0489	0,008 ± 0,002	6,63	0,16	138 ± 2	128 ± 3
C11	0	<0,02	0,0665	0,6 ± 0,1	717,7	9,02	140 ± 2	131 ± 3
C11	1	<0,02	0,0665	1,5 ± 0,4	590,4	22,55	138 ± 2	130 ± 3
C11	2	0,04	0,0665	0,7 ± 0,2	770,1	10,53	142 ± 2	139 ± 3

^[1] Concentración de BT más baja detectada con SNR>20. Esto es mayor que el valor normal de 10, pero queremos asegurarnos de que la fluorescencia del punto se reconoce claramente sobre el fondo

^[2] Datos para puntos con [BT]=0,63 mM

En primer lugar, es destacable la gran intensidad de señal obtenida en los chips de tolueno. El tolueno, suministrado en grado de pureza de síntesis, no se une a los filtros ni puede causar la fijación de la biotina, por lo que la totalidad de la señal de los chips del tratamiento T0 se debe a la adsorción inespecífica de la biotina a una superficie de por sí muy hidrofílica. Resulta notable que al funcionalizar los chips con el silano fluorado superhidrofóbico C10F* en tolueno, aunque este silano tampoco pueda realizar la reacción del tiol-eno para fijar la biotina al carecer de doble enlace terminal, la intensidad de la señal se reduzca uno o dos órdenes de magnitud, lo que constata que al aumentar la hidrofobicidad estamos reduciendo la adsorción inespecífica al material.

En los tratamientos con silanos muy hidrófilos, C2 y C3, se puede observar cómo la concentración más baja detectada de biotina tiolada es de 0,08 mM, y se puede apreciar cómo al añadir el silano fluorado C10F* para aumentar la hidrofobicidad se detectan concentraciones cada vez menores, pese a que la intensidad de la señal tienda a disminuir. Esto se debe a que la adsorción inespecífica (señal del fondo y, por ende, la desviación típica del mismo) disminuye en mayor proporción de lo que se reduce la intensidad de la señal al dificultar o impedir la entrada de los biorreactivos al interior del chip (Figura 9).

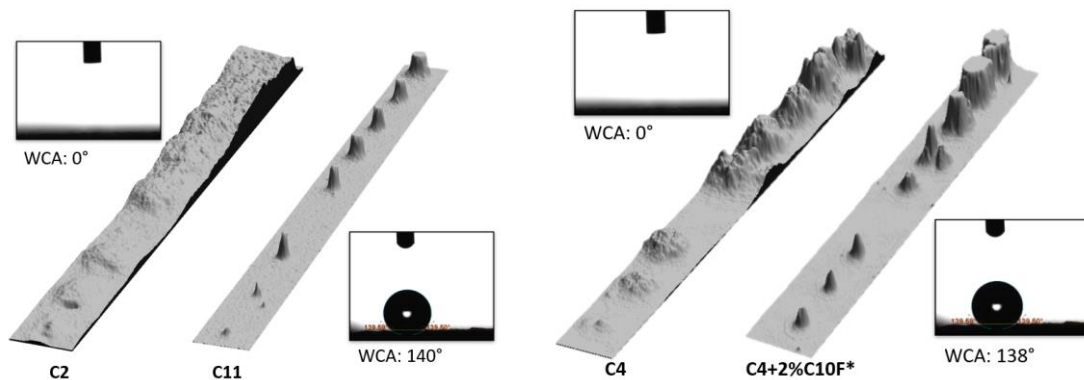


Figura 9: Evolución de la señal y el WCA al aumentar la hidrofobicidad al usar un silano con cadena más larga (izq.) o añadir el silano fluorado C10F* (der.)

Al suceder esto, la superficie de contacto se reduce en gran medida, dado que la biotina sólo puede anclarse en la interfase gota-superficie (chips con área de punto <0.1 mm), en vez de infiltrarse y dispersarse por capilaridad (área de punto >0.1 mm).

En el caso del silano C4, se observa una tendencia similar a la de los silanos C2 y C3 tanto en ausencia de C10F* como al 1% dado que, aunque al 1% presente un WCA hidrofóbico, la fluorescencia obtenida es similar al C2 y C3 al 1%. En cambio, el C4+2 se comporta de forma especial. Como se puede consultar (Tabla 5), este tratamiento produce un WCA similar al del C11, y de hecho se observa una señal de fondo mínima, característica de las superficies más hidrofóbicas. Sin embargo, a diferencia del C11, la señal obtenida tiene tan poca intensidad que no permite obtener una SNR significativa.

Los chips de C11 componen el extremo más hidrofóbico del espectro de mojabilidad estudiado. Todos tienen WCAs en torno a 140, y la adición de C10F* no tiene efectos apreciables excepto en la disminución del área de los *spots*. En la última columna de la Tabla 5 se recogen los valores del ángulo de contacto del PBS-G, que se incrementa al adicionar el C10F* a la superficie silanizada. En ellos se obtienen elevadas SNRs, en general de un orden de magnitud mayor, debido a que, pese a que la unión de la biotina tiene lugar en un área muy reducida de la superficie del chip, la estreptavidina con el fluoróforo ha acabado muy concentrada sobre los *spots* de biotina, siendo repelida en el resto del material. Esto se debe a la elevada hidrofobicidad del chip funcionalizado, que produce un fondo muy oscuro con mínima interacción inespecífica y escasa desviación típica, lo que aumenta en gran medida la ratio señal/ruido o SNR.

4.3 Resultados del reconocimiento mediado por anticuerpos

Dados los óptimos resultados obtenidos con el sistema anterior, considerado una prueba de concepto, se procedió a aplicar un sistema equivalente a una reacción concreta de reconocimiento biomolecular: un bioensayo, cuyas condiciones se definen en el apartado 3.5. Los resultados obtenidos se muestran resumidos en la Tabla 6. De nuevo, de las 8 concentraciones de biotina tiolada que componen las filas del matiz, se seleccionó la de 0,63 mM, que se corresponde con la tercera fila desde arriba, como valor representativo obteniéndose la media de las 9 repeticiones de esa fila. Los resultados completos (con datos de las medias de cada fila de cada chip) pueden hallarse en el Anexo II.

Tabla 6: Resultados de los chips revelados con IgG-AF647

Silano	C10F* (%)	Menor [BT] detectada ^[1] (mM)	Area del punto (mm ²) ^[2]	Intensidad de la señal ^[2] (pixel*10 ⁶)	SNR ^[2]	Intensidad/Area (pixel*10 ⁶ /mm ²) ^[2]	WCA (°)	GCA (°)
T	0	-	0,5983	0,6 ± 0,2	12,53	1,00	0	0
T	0	-	0,4394	0,38 ± 0,09	4,42	0,86	128 ± 2	0
T	0	-	0,0217	0,019 ± 0,008	0,94	0,88	134 ± 2	125 ± 3
C2	0	-	-	-	-	-	0	0
C2	1	0,63	0,5983	0,32 ± 0,04	28,61	0,53	0	0
C2	2	-	0,2659	0,1 ± 0,02	10,57	0,38	125 ± 1	0
C3	0	-	-	-	-	-	0	0
C3	1	-	0,5426	0,8 ± 0,1	13,90	1,47	0	0
C3	2	1,25	0,0665	0,028 ± 0,005	17,44	0,42	136 ± 2	124 ± 3
C4	0	2,5	0,7175	1,7 ± 0,3	16,96	2,37	0	0
C4	1	0,31	0,4394	0,35 ± 0,08	36,86	1,13	135 ± 2	123 ± 3
C4	2	<0,02	0,0489	0,04 ± 0,01	231,9	0,82	138 ± 2	128 ± 3
C11	0	<0,02	0,0868	0,15 ± 0,03	133,2	1,73	140 ± 2	131 ± 3
C11	1	<0,02	0,0868	0,19 ± 0,05	183,3	2,19	138 ± 2	130 ± 3
C11	2	<0,02	0,0339	0,09 ± 0,02	134,6	2,65	142 ± 2	139 ± 3

^[1] Concentración de BT más baja detectada con SNR>20. Esto es mayor que el valor normal de 10, pero queremos asegurarnos de que la fluorescencia del punto se reconoce claramente sobre el fondo

^[2] Datos para puntos con [BT]=0,63 mM

En primer lugar, resulta destacable que los chips hidrófilos no presenten SNRs aceptables (>20), salvo en el caso del C2+1. Esto se debe a que los anticuerpos empleados son mucho más propensos a adherirse a superficies hidrofílicas de forma inespecífica que la estreptavidina empleada en el experimento anterior, dado el mayor tamaño de estos (cada uno de ellos con el triple de masa molecular que la estreptavidina, aproximadamente 150 frente a 52 kDA). Además, la intensidad total es sensiblemente inferior, debido a que se trata de un sistema distinto que además emplea un fluoróforo diferente. Por otro lado, como se ha descrito anteriormente, la constante de afinidad de la estreptavidina-biotina es de 10^{14} mol^{-1} (Howarth *et al.*, 2006), lo que constituye una de las interacciones no covalentes más fuertes conocidas, y es además la razón por la que tan a menudo este par de moléculas se empleen para evaluar sistemas nuevos como el presente. Si bien el segundo AB puede amplificar la señal, al poder unirse varios a un mismo AB primario, eso no es suficiente como para compensar la pérdida de intensidad, que también explica la disminución del diámetro de los puntos de fluorescencia (aun cuando la distribución de la BT no varíe).

Respecto a los ensayos testigo con tolueno, en el que no hay ningún silano que permita la unión covalente de la biotina mediante la reacción del tiol-eno, se puede observar cómo en este caso, la mayor irregularidad del fondo y la menor intensidad impiden la obtención de una SNR detectable. Los chips con tolueno y C10F*, al ser más hidrofóbicos, disminuyen la adsorción inespecífica de la biotina, mejorando considerablemente el fondo.

En los chips recubiertos con silanos muy hidrófilos, como C2 y C3, la adsorción inespecífica de los anticuerpos es tan abundante que las señales de biotina quedan totalmente enmascaradas y no resulta posible la estimación de su diámetro (Figura 10 a y b). La adición de C10F* reduce la adsorción inespecífica, permitiendo delimitar los puntos, aunque las SNR continúan siendo muy bajas, sin superar en general el umbral de 20 excepto por el caso del C2+1 (aunque una SNR de 28 sigue siendo muy baja para una concentración de 0,63). La adsorción inespecífica de la inmunoglobulina G a superficies hidrófilas es harto conocida y ha sido descrita en multitud de

estudios sobre diversas superficies, en ocasiones dedicados en exclusiva a este aspecto (You y Lowe, 1996).

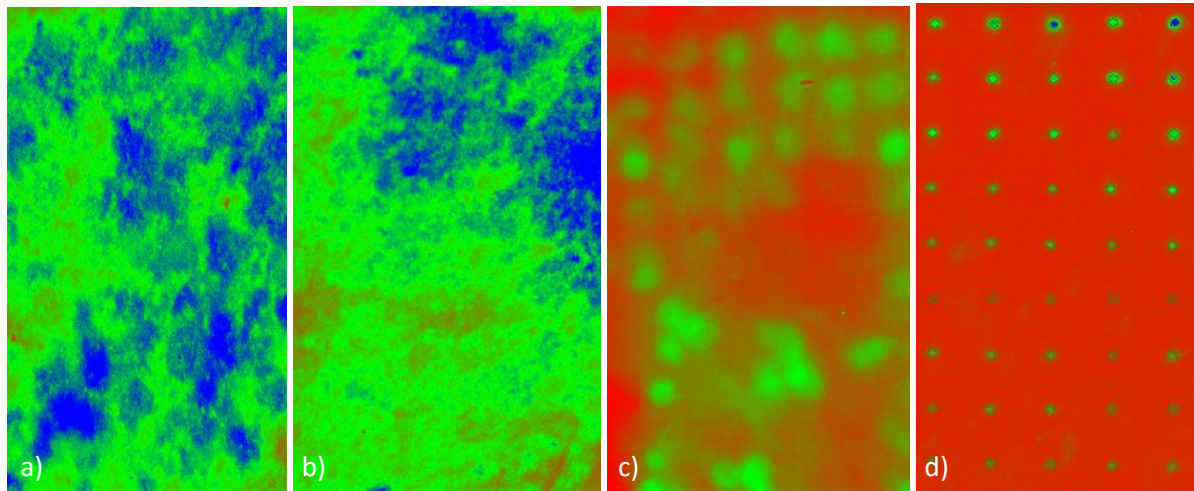


Figura 10: Comparativa de silanos con arrays de biotina revelados con anticuerpos. La intensidad vira desde el rojo (nula) hasta el cian (saturada) pasando por el verde. Se pueden observar el C2 (a), C3 (b), C4 (c) y C11(d)

El C4 es el primer silano en que la adsorción inespecífica comienza a remitir, debido a su menor mojabilidad. En el tratamiento sin C10F*, todavía persiste bastante interferencia, y se obtiene una SNR en el límite para la concentración mayor de biotina, 2,5 mM. Al añadir C10F*, la capacidad de detección va mejorando conforme aumenta la hidrofobicidad, llegando a 0,31 mM al 1% y a un valor inferior a 0,02 mM al 2%. Este comportamiento se debe a la progresiva disminución de la interacción inespecífica, que compensa con creces la progresiva disminución de la intensidad de los *spots* (igual que se ha explicado en el caso de la estreptavidina-Cy5), y evidencia que los anticuerpos funcionan mejor en medios con una hidrofobicidad más elevada.

Por último, se dispone de los chips de C11. En todos ellos la SNR es muy elevada debido a la escasa adsorción inespecífica de los anticuerpos al chip, repelidos por su elevada hidrofobicidad, al igual que sucedía con la estreptavidina. En este caso, por las razones explicadas en el primer párrafo de esta sección, la SNR es menor que con la estreptavidina debido a que la intensidad total es menor. De nuevo la adición de C10F* no produce efectos apreciables en la SNR, si bien es capaz de concentrar más las gotas de biotina, aumentando la densidad óptica, debido no al incremento del WCA, sino al del PBS-G, que se va incrementando con la concentración de C10F* llegando hasta 140°.

4.4 Ajuste de los datos y determinación del intervalo de trabajo

A partir de la ecuación de la curva logística obtenida, cuya calidad evaluamos mediante el test Chi-cuadrado (R^2), se pueden determinar rápidamente una serie de parámetros relevantes. Para ello, se normaliza la curva asignando el valor 0 mínimo y 1 al máximo, y se despejan los parámetros, definidos como la concentración de analito (en este trabajo, biotina tiolada) en el que se alcanza un determinado percentil. Así, el límite de detección (LD) se define como la concentración de BT para la cual se alcanza EC10, el límite de cuantificación (LQ) EC20, el límite de linealidad (LL) como IC80, el intervalo de trabajo (IT) como el intervalo entre los dos anteriores (EC20, EC80), y la sensibilidad como EC50. Las características de la curva logística determinan que un mayor intervalo de trabajo

suela conllevar un EC50 mayor (una sensibilidad peor), por lo que generalmente lo mejor es conseguir un compromiso entre ambos parámetros.

Nuevamente, estos parámetros son sólo representativos de los métodos de reconocimiento de la biotina empleados en este trabajo (estreptavidina-Cy5 o igG Antibiotina + igG-AF647 Anticonejo) sobre la superficie en la que se han obtenido estos datos, sin poder extenderse a otros protocolos o aplicaciones.

4.4.1 Reconocimiento con estreptavidina-Cy5

Las siguientes figuras muestran chips representativos impresos con *arrays* de biotina tiolada (2,5-0,02 mM) y revelados con estreptavidina-Cy5 a 5 g/L. Se comenzará con el chip con C2, el silano más hidrófilo (Figura 11), y se continuará con chips progresivamente más hidrofóbicos.

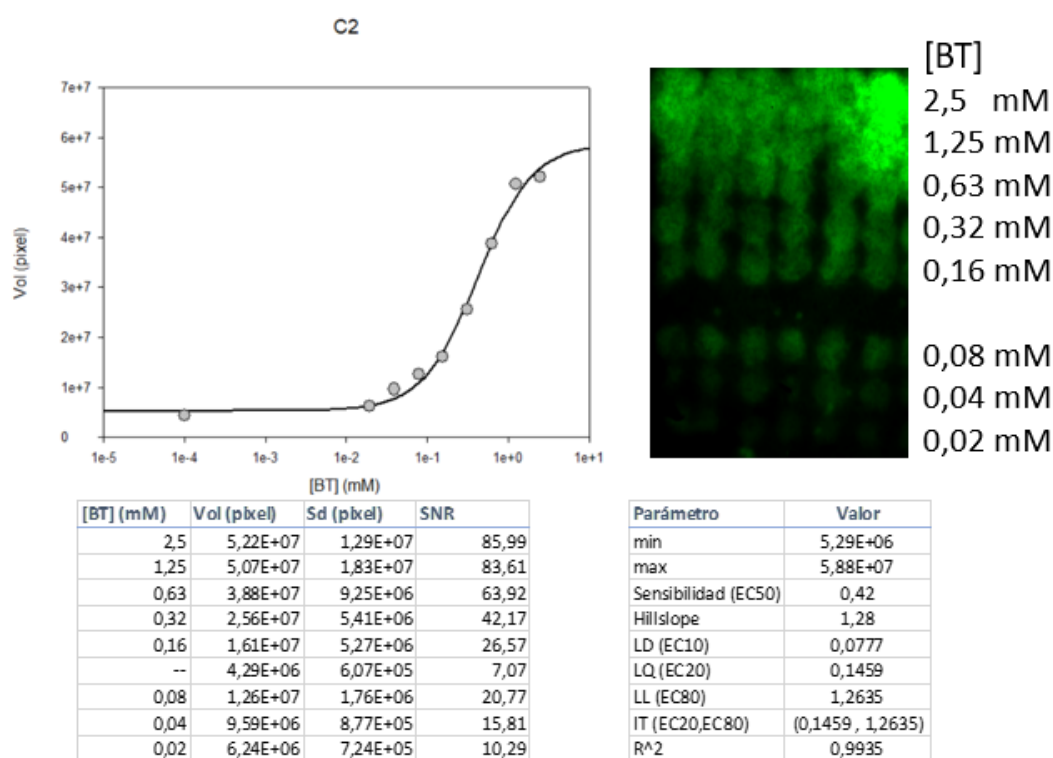


Figura 11: Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C2 (abajo izq.) y los parámetros calculados (abajo der.)

El silano C2 conforma el caso más hidrófilo de las superficies estudiadas (Figura 11). Como se puede observar, los puntos están prácticamente solapados en las primeras filas, y hay una región anormalmente saturada, que se descartó. Los datos se ajustan bastante bien a la curva logística ($R^2=0,9935$), si bien al carecer de datos totalmente saturados, la estimación del máximo de la curva tiene un intervalo de confianza alto. Al comparar el LQ y LD con las SNRs de la tabla de los datos usados, observamos que el límite de detección calculado (0,08 mM) prácticamente coincide con la concentración a la que se alcanza una SNR de 20, mientras que el de cuantificación (inicio del IT) casi duplica esa concentración. El intervalo de trabajo es reducido, algo menor a un orden de magnitud, y pese a ello la sensibilidad es alta.

La adición de C10F* para aumentar la hidrofobicidad (Figura 12) mejora la sensibilidad al desplazar la curva hacia la izquierda (lo que reduce la concentración de BT en EC50). Este hecho también afecta al intervalo de trabajo, que, si bien sigue siendo inferior a un orden de magnitud, permite determinar concentraciones menores (0,03-0,25 mM frente a 0,15-1,26 mM). Nuevamente se puede observar que el LD (0,017 mM) se halla muy cerca de la concentración de biotina tiolada en la que se obtuvo una SNR superior a 20 (0,02 mM). El ajuste de los datos a la curva es de calidad algo inferior ($R^2=0,9828$), posiblemente debido a la saturación de la señal en 0,63 mM.

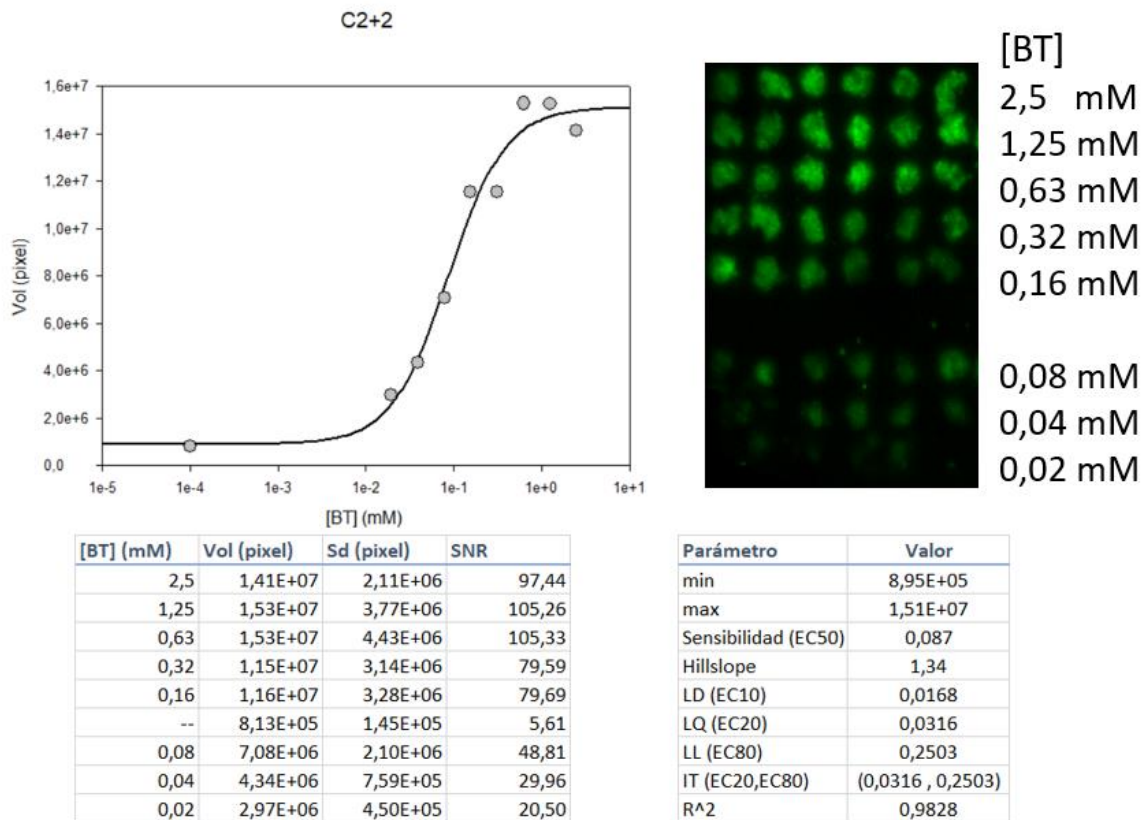


Figura 12: Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C2+2% C10F* (abajo izq.) y los parámetros calculados (abajo der.)

A continuación, se ha ajustado la curva con los resultados correspondientes a un chip silanizado con C4, de hidrofobicidad intermedia (Figura 13). El ajuste de los datos a la curva es muy bueno, con una R^2 igual a 0,996 (los puntos anormales que se observan en la imagen se descartaron conforme se indica en el apartado 3.7). Si bien no es lo suficientemente hidrofóbico como para impermeabilizar el chip (por lo que las gotas de biotina se introducen igualmente en su interior), su comportamiento difiere ya del de un chip con un tratamiento muy hidrofílico, como el C2 (Figura 11) o el C3. Los LD (0,017) y LQ (0,032) son notablemente inferiores a los obtenidos con el silano más hidrófilo C2. El intervalo de trabajo vuelve a ser algo menor a un orden de magnitud, pero tiene lugar en un intervalo de concentraciones más bajo. Consecuentemente, la sensibilidad (EC50) es cinco veces menor que con el C2 (0,085 frente a 0,42).

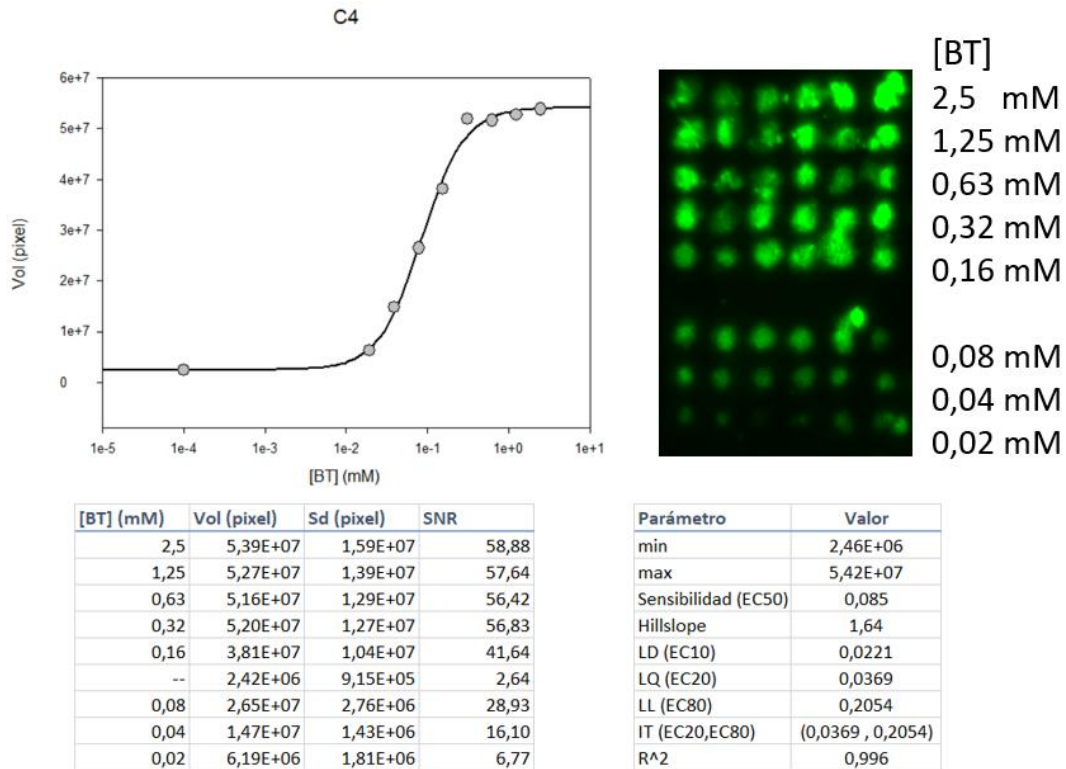


Figura 13: Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C4 (abajo izq.) y los parámetros calculados (abajo der.)

Por último, se estudió el ajuste de los datos a la curva sigmoideal de los chips funcionalizados con el silano C11 con y sin adición de C10F*. De éstos, se ha escogido representar aquí el C11+1% C10F* (Figura 14) por presentar claramente saturación de la señal (lo que es necesario para representar la curva logística con fiabilidad). Es un chip muy hidrofóbico, que impide el acceso de la biotina y los biorreactivos a su interior. Los puntos de biotina están muy concentrados y el fondo es totalmente oscuro, lo que produce unas SNRs muy elevadas. El LD y el LQ son ligeramente superiores a los del silano C4, y el intervalo de trabajo es menor (apenas medio orden de magnitud, 0,0419-0,1911 mM) debido a que la señal se satura a baja concentración (0,32 mM). Estos valores son similares a los obtenidos con el silano C4, y la sensibilidad obtenida es similar en ambos chips (0,088 en C11 frente a 0,085 en C4), aun cuando el comportamiento de la biotina tiolada difiere totalmente. El límite de detección se corresponde con la menor concentración de biotina tiolada ensayada (0,02 mM), y tiene una SNR de 159, muy superior a 20. Por ello, el intervalo de concentraciones estudiado cubre adecuadamente el intervalo de trabajo estimado.

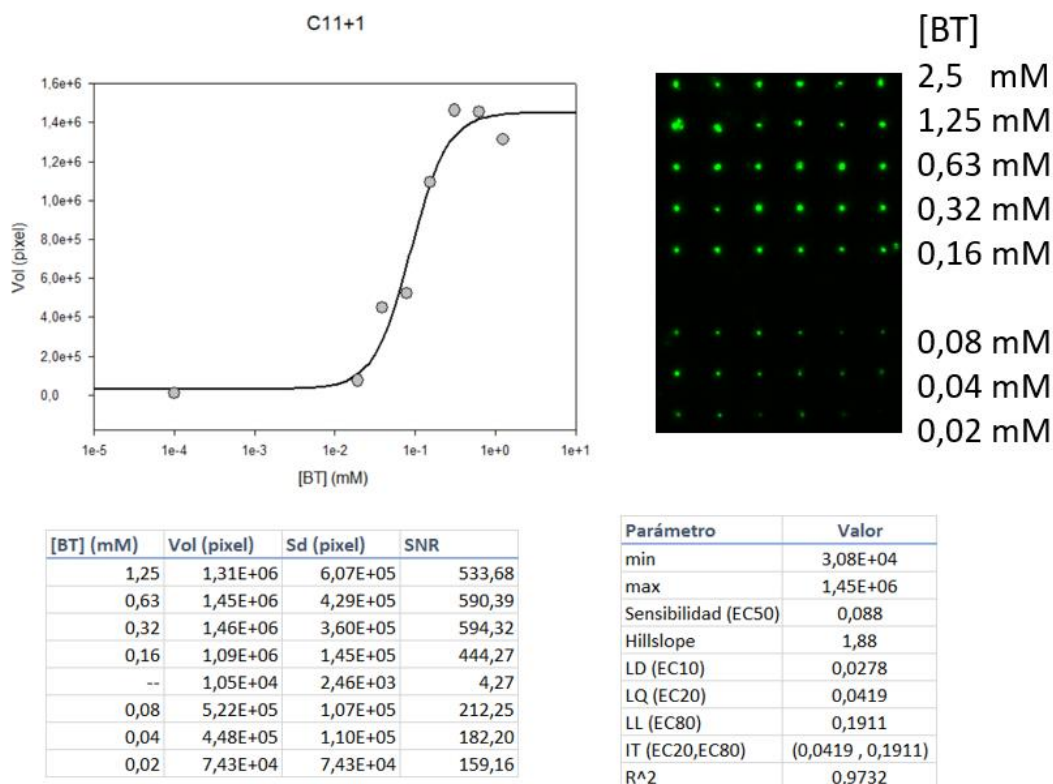


Figura 14: Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos obtenidos de un chip con el silano C11+1% de C10F* (abajo izq.) y los parámetros calculados (abajo der.)

4.4.2 Reconocimiento con anticuerpos

Las siguientes figuras muestran chips representativos impresos con *arrays* de biotina tiolada (2,5-0,02 mM) y revelados con los dos anticuerpos (IgG de conejo antibiotina + IgG-AF647 anticonejo). En el caso de los ensayos con anticuerpos, sólo fue posible cuantificar los chips con tratamientos muy hidrofóbicos (ver Tabla 6), que eran el C4+2% C10F*, C11, C11+1 y C11+2. Sin embargo, el intervalo de concentraciones ensayado (el mismo que en el estudio anterior con estreptavidina-Cy5) resultó insuficiente para obtener la curva sigmoideal ajustada (Figura 15).

La tendencia de las inmunoglobulinas a adherirse inespecíficamente a superficies hidrófilas obliga a emplear únicamente tratamientos muy hidrofóbicos, con WCAs alrededor de 140° obteniéndose fondos muy limpios.

Como se puede observar, los datos se ajustan bien a la curva logística de 4 parámetros ($R^2=0,9809$), pero todos parecen estar situados antes del punto de inflexión, el EC50, con lo que es imposible calcular el máximo de la curva y todos los percentiles y parámetros de interés.

Este comportamiento se observó en todas las superficies estudiadas por el sistema de reconocimiento con anticuerpos. Por esto, se realizó un último ensayo imprimiendo *arrays* con concentraciones de BT en rango 50-0,4 mM a razón 1/2 y 50-0,02mM a razón 1/3. Ésta fue la única modificación realizada respecto a lo descrito en el apartado "Materiales y Métodos", siguiéndose el protocolo común en el resto de las etapas del procedimiento, y los datos completos de estos chips se encuentran en el Anexo III.

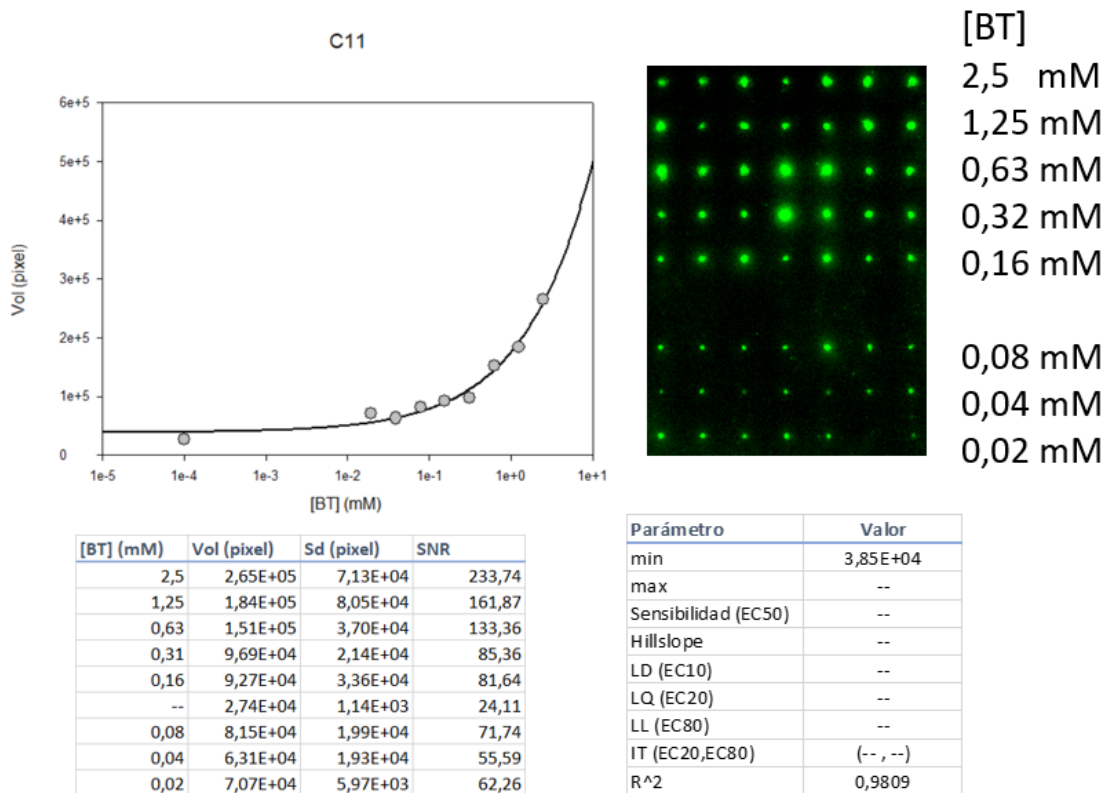
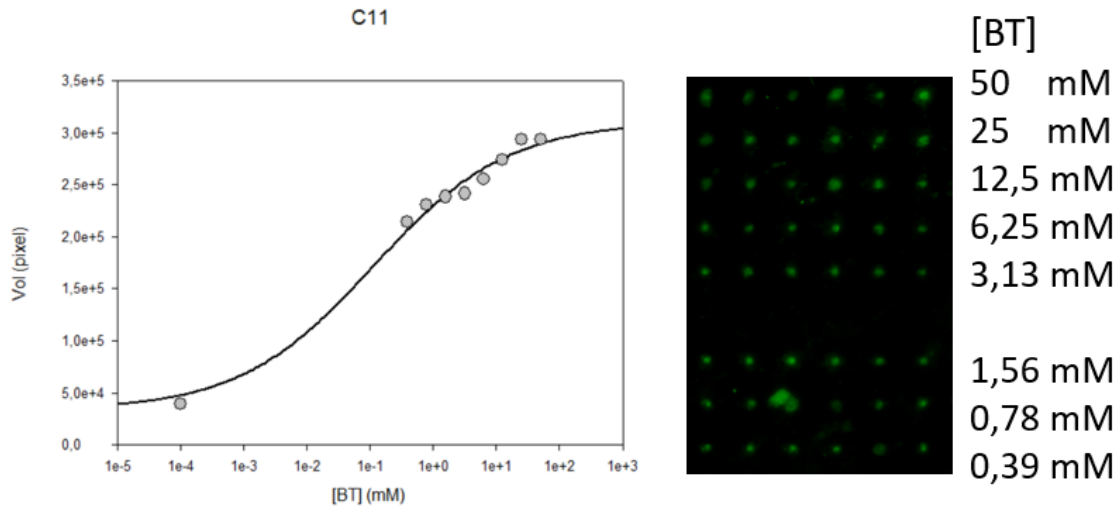


Figura 15: Curva, imagen de fluorescencia y tabla con los datos obtenidos de un chip con el silano C11 (en la imagen de la curva). No es posible calcular los parámetros

En primer lugar, se probaron diluciones 1/2 en un chip de C11, que producían un intervalo de concentraciones de biotina tiolada de 50 a 0,4 mM (Figura 16). Se observó que las concentraciones de biotina tiolada se ajustaban a la curva logística ($R^2=0,9925$), pero todas las señales correspondían a la segunda mitad de la curva más allá del EC50. Aunque esta distribución tampoco era adecuada para la obtención de una curva (dado que el único dato por debajo de EC50 era el 0), se obtuvieron los parámetros de relevancia con el fin de poderlos comparar con los estudios siguientes. Así, se obtuvo un LD de $5,23 \cdot 10^{-4}$ mM, y un LQ $3,65 \cdot 10^{-3}$, junto a un amplio intervalo de trabajo (0,004-3,277 mM), de tres órdenes de magnitud. La sensibilidad, de 0,11 mM, era un poco más alta que las obtenidas con los chips hidrófobos con estreptavidina. Sin embargo, estos valores son demasiado bajos a consecuencia del intervalo de concentraciones ensayado que no abarcó todo el intervalo de trabajo.

Puesto que se disponía de datos de C11 a concentraciones inferiores al EC50 (Figura 15) y por encima de él (Figura 16), se decidió iterar los datos correspondientes a las concentraciones de biotina de las 5 primeras filas respecto al primer chip, para así obtener un conjunto de datos comparables que pudieran ajustarse sobre ambos lados de la curva (Figura 17). Esta curva obtenida por iteración tenía peor sensibilidad (1,6 frente a 0,11 mM) que la de la Figura 16, y un intervalo de trabajo menor (aunque sigue siendo superior a un orden de magnitud), e incluso su ajuste a la curva es peor ($R^2=0,9862$), pero describe mejor el comportamiento de la señal que cualquiera de los dos resultados parciales anteriores.



[BT] (mM)	Vol (pixel)	Sd (pixel)	SNR
50	2,94E+05	8,49E+04	38,38
25,00	2,93E+05	4,39E+04	38,33
12,50	2,74E+05	5,79E+04	35,82
6,25	2,55E+05	4,96E+04	33,34
3,13	2,42E+05	4,76E+04	31,59
--	3,97E+04	7,65E+03	5,18
1,56	2,38E+05	3,03E+04	31,17
0,78	2,31E+05	7,03E+04	30,18
0,39	2,15E+05	7,78E+04	28,04

Parámetro	Valor
min	3,29E+04
max	3,11E+05
Sensibilidad (EC50)	0,111
Hillslope	0,41
LD (EC10)	5,23E-04
LQ (EC20)	3,65E-03
LL (EC80)	3,277
IT (EC20,EC80)	(0,00365 , 3,277)
R^2	0,9925

Figura 16: Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos empleados y los parámetros obtenidos en un chip con el silano C11 en rango 50-0,4 mM

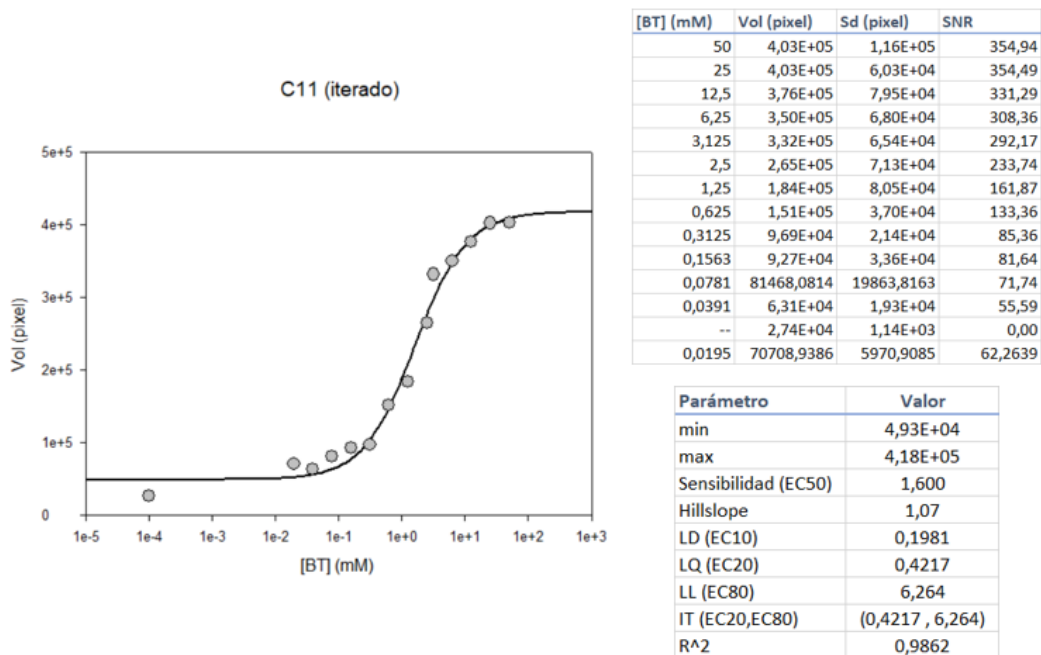


Figura 17: Curva de chip con el silano C11 iterado con los datos de la Figura 15 y los 5 datos superiores iterados de la Figura 16

Con el fin de ampliar el rango de concentraciones que se podía ensayar en un mismo chip, en los siguientes *arrays* se usó una razón de dilución 1/3, por lo que los chips disponen de un intervalo de concentraciones 50-0,02 mM.

En el chip con el tratamiento del silano C11+1% de C10F* se descartó la fila de 50mM por presentar una intensidad anormalmente baja (Anexo III, imagen “C11+1 (II) 1s 1g”). El ajuste de la curva es bueno ($R^2=0,992$), los LD y LQ son ligeramente menores que los del C11 (0,049 y 0,142 frente a 0,198 y 0,422) y el intervalo de trabajo es mayor, al llegar hasta 7,216.

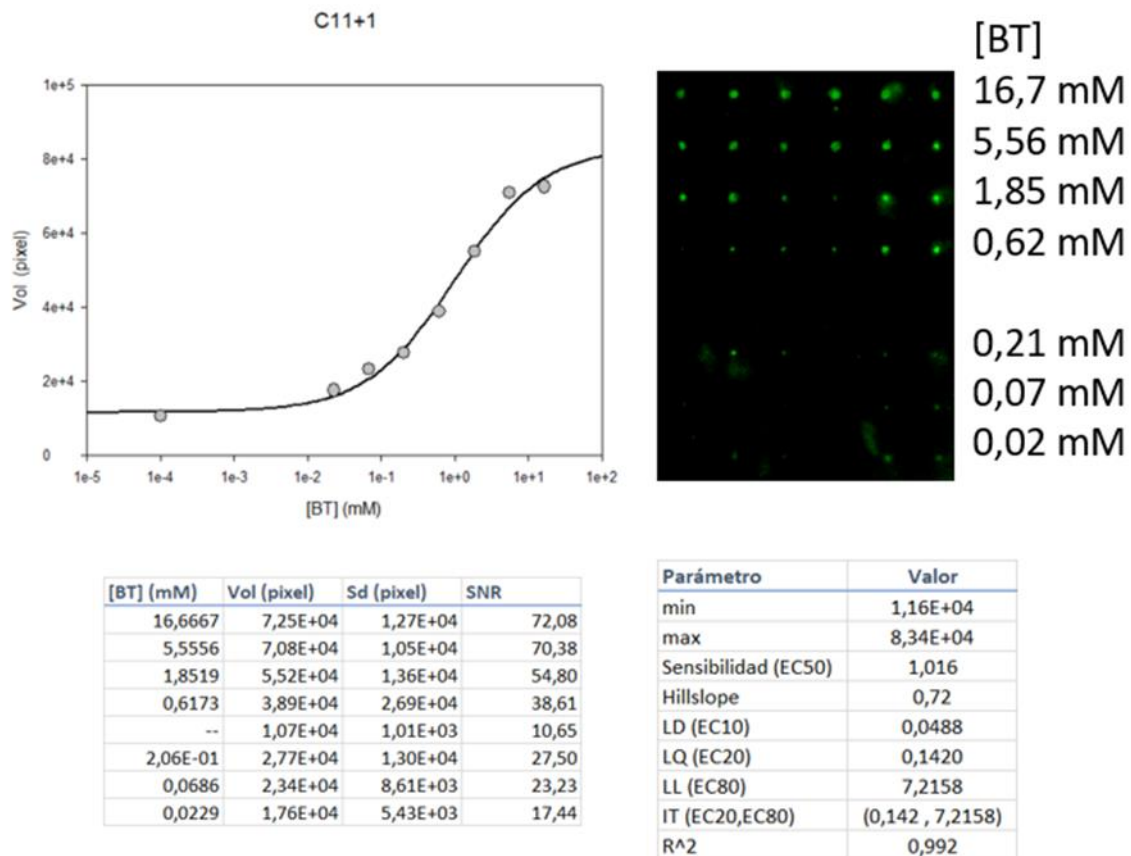


Figura 18: Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos empleados y los parámetros obtenidos en un chip con el silano C11+1% C10F* en rango 50-0,02 mM

El último chip cuyos datos se ajustaron a la curva sigmoideal fue el C11+2% de C10F*, empleando el mismo intervalo de concentraciones que en el caso anterior. En la Figura 19 se muestra la curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos empleados y los parámetros obtenidos en un chip con el silano C11+2% C10F* en un intervalo de concentraciones de biotina de 50-0,02 mM. La fila correspondiente a 50 mM aparece ligeramente desalineada debido a un desplazamiento accidental del chip dentro del Biodot al final de la impresión, pero no afecta a la fluorescencia. Los datos se ajustan bien a la curva logística ($R^2=0,9794$), los parámetros LD (0,002 mM) y LQ (0,01 mM) son mejores que en los otros casos, más bajos que en el C11 o el C11+1, y el intervalo de trabajo es el más amplio, superior a dos órdenes de magnitud (0,011-1,12 mM). Como está desplazado hacia la izquierda, en un rango de concentraciones inferior, presenta mejor sensibilidad (0,108 mM).

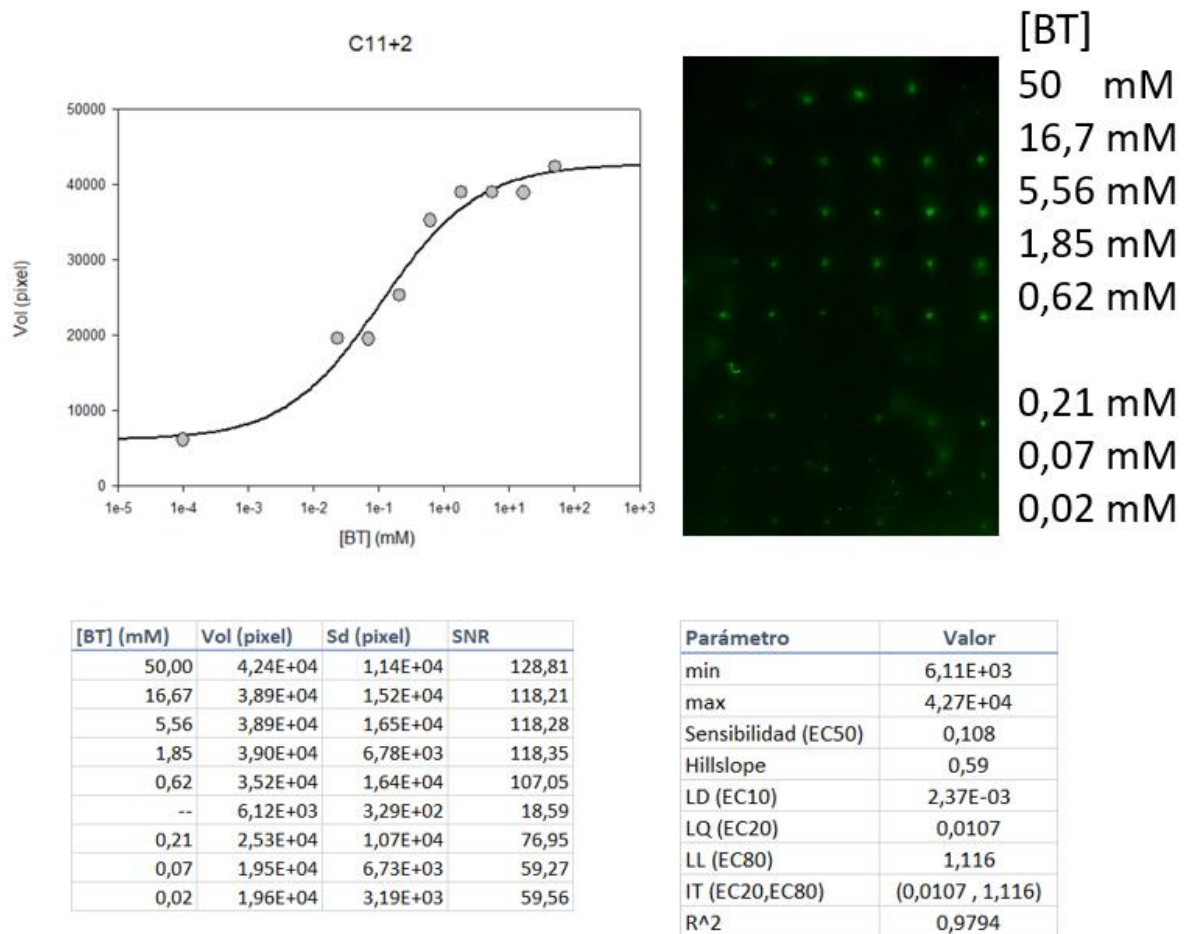


Figura 19: Curva, imagen de fluorescencia y tablas con los datos empleados y los parámetros obtenidos en un chip con el silano C11+2% C10F* en rango 50-0,02 mM

Estos resultados pueden relacionarse con el aumento de la hidrofobicidad al adicionar C10F*, dado que, aunque el WCA se mantenga en 140° en varias de las superficies ensayadas, el ángulo de contacto del PBS-G (tampón en que se imprimió la biotina tiolada) aumenta al adicionar el silano fluorado al 2% (Tabla 6), lo que favorece una mayor concentración de los biorreactivos en el lugar de deposición del *spot* y una mejor integración de la señal al no presentar interacción inespecífica apreciable como se discute en el apartado 4.3. Estas mejoras parecen confirmar la hipótesis de que el aumento de la hidrofobicidad mejora la sensibilidad del sensor y permite trabajar en un intervalo de concentraciones más reducido.

5. Conclusiones

La hidrofobicidad de la superficie de microfibra de vidrio se puede modular mediante la funcionalización con alcoxisilanos entre 2 y 11 carbonos utilizando la reacción del tiol-eno.

La adición de alcoxisilano fluorado C10F* (1,1,2,2-perfluorodeciltrióxidosilano) permite un ajuste más fino de esta hidrofobicidad.

Al tratarse de un material poroso y de elevada rugosidad, los resultados obtenidos son claramente distintos a los ensayos de silanización realizados anteriormente sobre chips de vidrio, abriéndose un nuevo campo de aplicaciones. No obstante, es posible lograr la impermeabilización de la microfibra de vidrio al funcionalizarla con un recubrimiento hidrofóbico cuyo WCA sea superior a los 120°.

La impermeabilización reduce en gran medida la intensidad total y el diámetro de los puntos, dado que el área de contacto es mucho menor, así como la adsorción. No obstante, aun cuando no se alcance la impermeabilización, un aumento moderado de la hidrofobicidad también reduce el diámetro de los puntos del *array* y la adsorción inespecífica.

El aumento de hidrofobicidad disminuye los límites de detección y cuantificación, y mejora la sensibilidad en los dos sistemas ensayados: estreptavidina-Cy5 y el mediado por anticuerpos.

La tendencia de las inmunoglobulinas a adherirse inespecíficamente a superficies hidrófilas obliga a emplear únicamente tratamientos muy hidrofóbicos, con WCAs alrededor de 140°, obteniéndose fondos muy limpios. En cambio, en los ensayos con estreptavidina-Cy5, a diferencia de con las inmunoglobulinas, es posible eliminarla de las superficies hidrófilas, si se eluye adecuadamente con el sistema de lavado propuesto.

La funcionalización de la superficie de fibra de vidrio con silano C11 (10-undeceniltrimetoxisilano) con la adición de C10F* al 2% ha proporcionado una base óptima para desarrollar un biosensor basado en fluorescencia sobre el que diseñar inmunoensayos muy sensibles. Además, posibilita la fijación con otras muchas sondas derivatizadas con un grupo tiol, con las sondas de DNA tioladas, abriendo el espectro de aplicaciones.

6. Bibliografía

- ARAGÓN, P., NOGUERA, P., BAÑULS, M., PUCHADES, R., MAQUIEIRA, Á. AND GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M. (2018). Modulating receptor-ligand binding in biorecognition by setting surface wettability. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1247-8>
- ARKLES, B., MADDOX, A., SINGH, M., ZAZYCZNY, J. AND MATISONS, J. (2014). Silane Coupling Agents: Connecting Across Boundaries. 3rd ed. [eBook] Morrisville, PA: Gelest, Inc, p.3. Available at: <https://www.gelest.com/wp-content/uploads/Goods-PDF-brochures-couplingagents.pdf> [Acceso el 1 Jul. 2018].
- CHAIET, L. AND WOLF, F. (1964). The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by Streptomyces. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 106, pp.1-5.
- DRELICH, J. (2013). Guidelines to measurements of reproducible contact angles using a sessile-drop technique. *Surface Innovations*, 1(4), pp.248-254.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M., PUCHADES, R. AND MAQUIEIRA, A. (2006). Optical immunosensors for environmental monitoring: How far have we come? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(1), pp.205-218.
- GREEN, N. (1963). AVIDIN. 1. The use of [14C] Biotin for Kinetic Studies and for Assay. *Biochemical Journal*, 89(3), pp.585-591.
- HOWARTH, M., CHINNAPEN, D., GERROW, K., DORRESTEIN, P., GRANDY, M., KELLEHER, N., EL-HUSSEINI, A. AND TING, A. (2006). A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. *Nature Methods*, 3(4), pp.267-273.
- JOHNSON, D. H. (2006) Signal-to-noise ratio. *Scholarpedia*, 1(12):2088.
- KOLB, H., FINN, M. AND SHARPLESS, K. (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(11), pp.2004-2021.
- KONTOGEOORGIS, G. AND KIIL, S. (2016). Intermolecular and Interparticle Forces. *Introduction to Applied Colloid and Surface Chemistry*, pp.11-33.
- MEHROTRA, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), pp.153-159.
- MIRA, D., LLORENTE, R., MORAIS, S., PUCHADES, R., MAQUIEIRA, A. AND MARTI, J. (2004). High-throughput screening of surface-enhanced fluorescence on industrial standard digital recording media. *Optically Based Biological and Chemical Sensing for Defence*.
- NOGUERA, P., ARAGÓN, P., GONZÁLEZ MARTÍNEZ, M., BAÑULS, M., PUCHADES, R. AND MAQUIEIRA, Á. (2017). Surface Biosensing Improvement by Wettability Modulation. [Poster] Valencia: *XI International Workshop on Sensors and Molecular Recognition*.
- SigmaPlot. (2014). San Jose, California, USA: SYSTAT SOFTWARE INC.

- Statgraphics Centurion XVII. (2018). The Plains, Virginia 20198, USA: STATGRAPHICS TECHNOLOGIES, INC.
- TotalLab™ Quant. (2018). Keel House, Garth Heads, Newcastle upon Tyne NE1 2JE, UK: TOTALLAB LTD
- WANG, H., NAKATA, E. AND HAMACHI, I. (2009). Recent Progress in Strategies for the Creation of Protein-Based Fluorescent Biosensors. *ChemBioChem*, 10(16), pp.2560-2577.
- WEINRICH, D., KÖHN, M., JONKHEIJM, P., WESTERLIND, U., DEHMELT, L., ENGELKAMP, H., CHRISTIANEN, P., KUHLMANN, J., MAAN, J., NÜSSE, D., SCHRÖDER, H., WACKER, R., VOGES, E., BREINBAUER, R., KUNZ, H., NIEMEYER, C. AND WALDMANN, H. (2009). Preparation of Biomolecule Microstructures and Microarrays by Thiol-ene Photoimmobilization. *ChemBioChem*, 11(2), pp.235-247.
- YOU, H. AND LOWE, C. (1996). AFM Studies of Protein Adsorption: 2. Characterization of Immunoglobulin G Adsorption by Detergent Washing. *Journal of Colloid and Interface Science*, 182(2), pp.586-601.
- ZHANG, X., SHI, F., NIU, J., JIANG, Y. AND WANG, Z. (2008). Superhydrophobic surfaces: from structural control to functional application. *J. Mater. Chem.*, 18(6), pp.621-633.

ANEXOS

Anexo I. Resultados reconocimiento mediado por estreptavidina-Cy5

Se han resaltado en verde las SNR superiores a 20, consideradas significativas. En los casos en que hay una SNR elevada, pero ésta se debe a anomalías de la superficie (como un fondo heterogéneo), el resaltado es amarillo. La columna “imagen” indica el tratamiento, réplica, exposición y ganancia, respectivamente.

Imagen	[BT]	Intensidad de la señal (pixel)	Desviación estandar	Desviación relativa	SNR	Diámetro de los puntos (mm)	Intensidad/Área (pixel/mm ²)
T (II) 1s 1g	2,5000	1,07E+08	1,92E+07	18%	72,40	0,5818	1,00E+08
T (II) 1s 1g	1,2500	9,66E+07	6,92E+06	7%	65,51	0,5818	9,08E+07
T (II) 1s 1g	0,6250	1,08E+08	2,27E+07	21%	72,94	0,5818	1,01E+08
T (II) 1s 1g	0,3125	7,51E+07	2,08E+07	28%	50,94	0,5818	7,06E+07
T (II) 1s 1g	0,1563	6,29E+07	1,83E+07	29%	42,68	0,5195	7,42E+07
T (II) 1s 1g	0,0000	4,65E+06	1,47E+06	32%	0,00	0,5195	5,48E+06
T (II) 1s 1g	0,0781	3,75E+07	4,21E+06	11%	25,45	0,3532	9,57E+07
T (II) 1s 1g	0,0391	2,25E+07	4,41E+06	20%	15,25	0,2909	8,46E+07
T (II) 1s 1g	0,0195	1,31E+07	1,85E+06	14%	8,88	0,2493	6,70E+07
T+1 (II) 1s 1g	2,5000	5,55E+06	1,03E+06	19%	4,85	0,5818	5,22E+06
T+1 (II) 1s 1g	1,2500	3,56E+06	5,42E+05	15%	3,11	0,5818	3,35E+06
T+1 (II) 1s 1g	0,6250	3,06E+06	9,78E+05	32%	2,68	0,5818	2,88E+06
T+1 (II) 1s 1g	0,3125	3,41E+06	9,51E+05	28%	2,98	0,5818	3,21E+06
T+1 (II) 1s 1g	0,1563	3,15E+06	9,55E+05	30%	2,75	0,5818	2,96E+06
T+1 (II) 1s 1g	0,0000	2,28E+06	1,14E+06	50%	0,00	0,5818	2,14E+06
T+1 (II) 1s 1g	0,0781	3,76E+06	1,48E+06	39%	3,28	0,5818	3,53E+06
T+1 (II) 1s 1g	0,0391	4,32E+06	1,09E+06	25%	3,77	0,5818	4,06E+06
T+1 (II) 1s 1g	0,0195	3,42E+06	8,90E+05	26%	2,99	0,5818	3,22E+06
T+2 1s 1g	2,5000	6,17E+05	2,72E+05	44%	12,88	0,4987	7,90E+05
T+2 1s 1g	1,2500	6,25E+05	2,58E+05	41%	13,05	0,4987	8,00E+05
T+2 1s 1g	0,6250	5,95E+05	1,58E+05	27%	12,41	0,4987	7,61E+05
T+2 1s 1g	0,3125	5,21E+05	2,04E+05	39%	10,87	0,4987	6,67E+05
T+2 1s 1g	0,1563	5,30E+05	3,33E+05	63%	11,07	0,4987	6,79E+05
T+2 1s 1g	0,0000	3,00E+05	4,79E+04	16%	0,00	0,4987	3,83E+05
T+2 1s 1g	0,0781	7,51E+05	3,14E+05	42%	15,68	0,4987	9,61E+05
T+2 1s 1g	0,0391	7,74E+05	2,62E+05	34%	16,16	0,4987	9,91E+05
T+2 1s 1g	0,0195	8,01E+05	2,56E+05	32%	16,72	0,4987	1,03E+06
C2 (II) 1s 1g	2,5000	5,22E+07	1,29E+07	25%	85,99	0,6026	4,57E+07
C2 (II) 1s 1g	1,2500	5,07E+07	1,83E+07	36%	83,61	0,6026	4,45E+07
C2 (II) 1s 1g	0,6250	3,88E+07	9,25E+06	24%	63,92	0,6026	3,40E+07
C2 (II) 1s 1g	0,3125	2,56E+07	5,41E+06	21%	42,17	0,6026	2,24E+07
C2 (II) 1s 1g	0,1563	1,61E+07	5,27E+06	33%	26,57	0,6026	1,41E+07
C2 (II) 1s 1g	0,0000	4,29E+06	6,07E+05	14%	0,00	0,6026	3,76E+06
C2 (II) 1s 1g	0,0781	1,26E+07	1,76E+06	14%	20,77	0,6026	1,10E+07
C2 (II) 1s 1g	0,0391	9,59E+06	8,77E+05	9%	15,81	0,6026	8,41E+06
C2 (II) 1s 1g	0,0195	6,24E+06	7,24E+05	12%	10,29	0,6026	5,47E+06

Imagen	[BT]	Intensidad de la señal (pixel)	Desviación estandar	Desviación relativa	SNR	Diámetro de los puntos (mm)	Intensidad/Área (pixel/mm ²)
C2+1 1s 1g	2,5000	3,05E+07	6,33E+06	21%	177,37	0,5818	2,87E+07
C2+1 1s 1g	1,2500	2,65E+07	4,24E+06	16%	154,10	0,5818	2,49E+07
C2+1 1s 1g	0,6250	2,34E+07	3,54E+06	15%	135,76	0,5818	2,20E+07
C2+1 1s 1g	0,3125	1,74E+07	2,48E+06	14%	100,95	0,5818	1,63E+07
C2+1 1s 1g	0,1563	1,27E+07	1,22E+06	10%	73,58	0,5818	1,19E+07
C2+1 1s 1g	0,0000	1,07E+06	1,72E+05	16%	0,00	0,5818	1,01E+06
C2+1 1s 1g	0,0781	8,32E+06	2,22E+06	27%	48,33	0,5818	7,82E+06
C2+1 1s 1g	0,0391	5,54E+06	1,46E+06	26%	32,20	0,5818	5,21E+06
C2+1 1s 1g	0,0195	2,45E+06	7,33E+05	30%	14,23	0,5818	2,30E+06
C2+2 1s 1g	2,5000	1,41E+07	2,11E+06	15%	97,44	0,5818	1,33E+07
C2+2 1s 1g	1,2500	1,53E+07	3,77E+06	25%	105,26	0,5818	1,44E+07
C2+2 1s 1g	0,6250	1,53E+07	4,43E+06	29%	105,33	0,5818	1,44E+07
C2+2 1s 1g	0,3125	1,15E+07	3,14E+06	27%	79,59	0,5818	1,09E+07
C2+2 1s 1g	0,1563	1,16E+07	3,28E+06	28%	79,69	0,5818	1,09E+07
C2+2 1s 1g	0,0000	8,13E+05	1,45E+05	18%	0,00	0,5818	7,64E+05
C2+2 1s 1g	0,0781	7,08E+06	2,10E+06	30%	48,81	0,5818	6,66E+06
C2+2 1s 1g	0,0391	4,34E+06	7,59E+05	17%	29,96	0,5818	4,09E+06
C2+2 1s 1g	0,0195	2,97E+06	4,50E+05	15%	20,50	0,5818	2,80E+06
C3 1s 1g	2,5000	5,88E+07	1,10E+07	19%	78,27	0,6026	5,16E+07
C3 1s 1g	1,2500	4,22E+07	9,90E+06	23%	56,12	0,6026	3,70E+07
C3 1s 1g	0,6250	3,11E+07	7,28E+06	23%	41,40	0,6026	2,73E+07
C3 1s 1g	0,3125	2,11E+07	3,53E+06	17%	28,04	0,6026	1,85E+07
C3 1s 1g	0,1563	1,64E+07	4,00E+06	24%	21,78	0,6026	1,44E+07
C3 1s 1g	0,0000	4,58E+06	7,52E+05	16%	0,00	0,6026	4,02E+06
C3 1s 1g	0,0781	1,67E+07	1,94E+06	12%	22,25	0,6026	1,47E+07
C3 1s 1g	0,0391	9,27E+06	2,09E+06	23%	12,33	0,6026	8,12E+06
C3 1s 1g	0,0195	5,39E+06	8,51E+05	16%	7,17	0,6026	4,72E+06
C3+1 1s 1g	2,5000	1,10E+08	1,13E+07	10%	102,50	0,5402	1,20E+08
C3+1 1s 1g	1,2500	1,04E+08	1,37E+07	13%	96,93	0,5402	1,13E+08
C3+1 1s 1g	0,6250	7,18E+07	6,30E+06	9%	66,92	0,5402	7,83E+07
C3+1 1s 1g	0,3125	5,41E+07	4,22E+06	8%	50,38	0,5402	5,90E+07
C3+1 1s 1g	0,1563	3,70E+07	5,61E+06	15%	34,52	0,5402	4,04E+07
C3+1 1s 1g	0,0000	5,67E+06	1,07E+06	19%	0,00	0,5402	6,19E+06
C3+1 1s 1g	0,0781	2,61E+07	3,99E+06	15%	24,36	0,5402	2,85E+07
C3+1 1s 1g	0,0391	1,85E+07	3,17E+06	17%	17,24	0,5402	2,02E+07
C3+1 1s 1g	0,0195	1,33E+07	1,05E+06	8%	12,43	0,5402	1,45E+07

Imagen	[BT]	Intensidad de la señal (pixel)	Desviación estandar	Desviación relativa	SNR	Diámetro de los puntos (mm)	Intensidad/Área (pixel/mm ²)
C3+2 1s 1g	2,5000	6,91E+05	1,57E+05	23%	79,37	0,1870	6,29E+06
C3+2 1s 1g	1,2500	1,59E+06	5,73E+05	36%	182,85	0,1870	1,45E+07
C3+2 1s 1g	0,6250	6,47E+05	2,27E+05	35%	74,31	0,1870	5,89E+06
C3+2 1s 1g	0,3125	4,89E+05	1,33E+05	27%	56,14	0,1870	4,45E+06
C3+2 1s 1g	0,1563	3,83E+05	1,28E+05	33%	44,02	0,1870	3,49E+06
C3+2 1s 1g	0,0000	7,00E+04	8,71E+03	12%	0,00	0,1870	6,37E+05
C3+2 1s 1g	0,0781	2,33E+05	6,53E+04	28%	26,79	0,1870	2,12E+06
C3+2 1s 1g	0,0391	1,78E+05	4,50E+04	25%	20,43	0,1870	1,62E+06
C3+2 1s 1g	0,0195	1,41E+05	2,54E+04	18%	16,21	0,1870	1,28E+06
C4 1s 1g	2,5000	5,39E+07	1,59E+07	30%	58,88	0,6026	4,72E+07
C4 1s 1g	1,2500	5,27E+07	1,39E+07	26%	57,64	0,6026	4,62E+07
C4 1s 1g	0,6250	4,53E+07	4,30E+06	9%	49,55	0,6026	3,97E+07
C4 1s 1g	0,3125	5,20E+07	1,27E+07	24%	56,83	0,6026	4,56E+07
C4 1s 1g	0,1563	3,81E+07	1,04E+07	27%	41,64	0,6026	3,34E+07
C4 1s 1g	0,0000	2,42E+06	9,15E+05	38%	0,00	0,6026	2,12E+06
C4 1s 1g	0,0781	2,65E+07	2,76E+06	10%	28,93	0,6026	2,32E+07
C4 1s 1g	0,0391	1,47E+07	1,43E+06	10%	16,1	0,6026	1,29E+07
C4 1s 1g	0,0195	6,19E+06	1,81E+06	29%	6,77	0,6026	5,42E+06
C4+1 1s 1g	2,5000	7,15E+07	2,12E+07	30%	157,67	0,6026	6,27E+07
C4+1 1s 1g	1,2500	4,87E+07	9,94E+06	20%	107,38	0,6026	4,27E+07
C4+1 1s 1g	0,6250	3,68E+07	5,30E+06	14%	81,14	0,6026	3,23E+07
C4+1 1s 1g	0,3125	2,69E+07	3,00E+06	11%	59,23	0,6026	2,36E+07
C4+1 1s 1g	0,1563	1,67E+07	2,18E+06	13%	36,72	0,6026	1,46E+07
C4+1 1s 1g	0,0000	2,64E+06	4,54E+05	17%	0,00	0,6026	2,31E+06
C4+1 1s 1g	0,0781	1,30E+07	3,38E+06	26%	28,71	0,6026	1,14E+07
C4+1 1s 1g	0,0391	8,79E+06	1,18E+06	13%	19,38	0,6026	7,71E+06
C4+1 1s 1g	0,0195	6,57E+06	8,99E+05	14%	14,48	0,6026	5,76E+06
C4+2 1s 1g	2,5000	6,91E+03	2,42E+03	35%	5,66	0,1247	1,41E+05
C4+2 1s 1g	1,2500	7,11E+03	1,74E+03	25%	5,82	0,1247	1,46E+05
C4+2 1s 1g	0,6250	8,09E+03	2,18E+03	27%	6,63	0,1247	1,66E+05
C4+2 1s 1g	0,3125	1,05E+04	3,93E+03	38%	8,57	0,1247	2,14E+05
C4+2 1s 1g	0,1563	1,56E+04	6,08E+03	39%	12,82	0,1247	3,20E+05
C4+2 1s 1g	0,0000	5,58E+03	1,22E+03	22%	0,00	0,1247	1,14E+05
C4+2 1s 1g	0,0781	1,74E+04	4,87E+03	28%	14,22	0,1247	3,55E+05
C4+2 1s 1g	0,0391	2,48E+04	6,03E+03	24%	20,33	0,1247	5,08E+05
C4+2 1s 1g	0,0195	2,92E+04	1,22E+04	42%	23,95	0,1247	5,99E+05

Imagen	Intensidad de la [BT]	Intensidad de la señal (pixel)	Desviación estandar	Desviación relativa	SNR	Diámetro de los puntos (mm)	Intensidad/ Area (pixel/mm ²)
C11 1s 1g	2,5000	1,29E+06	2,59E+05	20%	1432,48	0,1455	1,94E+07
C11 1s 1g	1,2500	6,22E+05	1,17E+05	19%	691,71	0,1455	9,36E+06
C11 1s 1g	0,6250	6,45E+05	1,36E+05	21%	717,66	0,1455	9,71E+06
C11 1s 1g	0,3125	4,69E+05	1,33E+05	28%	522,16	0,1455	7,06E+06
C11 1s 1g	0,1563	3,54E+05	7,93E+04	22%	394,09	0,1455	5,33E+06
C11 1s 1g	0,0000	9,19E+03	8,99E+02	10%	0,00	0,1455	1,38E+05
C11 1s 1g	0,0781	1,55E+05	2,81E+04	18%	172,63	0,1455	2,34E+06
C11 1s 1g	0,0391	4,28E+04	1,19E+04	28%	47,65	0,1455	6,45E+05
C11 1s 1g	0,0195	4,90E+04	1,21E+04	25%	54,46	0,1455	7,37E+05
C11+1 1s 1g	2,5000	1,06E+06	5,07E+05	48%	429,53	0,1455	1,59E+07
C11+1 1s 1g	1,2500	1,31E+06	6,07E+05	46%	533,68	0,1455	1,98E+07
C11+1 1s 1g	0,6250	1,45E+06	4,29E+05	30%	590,39	0,1455	2,19E+07
C11+1 1s 1g	0,3125	1,46E+06	3,60E+05	25%	594,32	0,1455	2,20E+07
C11+1 1s 1g	0,1563	1,09E+06	1,45E+05	13%	444,27	0,1455	1,65E+07
C11+1 1s 1g	0,0000	1,05E+04	2,46E+03	23%	0,00	0,1455	1,58E+05
C11+1 1s 1g	0,0781	5,22E+05	1,07E+05	21%	212,25	0,1455	7,86E+06
C11+1 1s 1g	0,0391	4,48E+05	1,10E+05	24%	182,2	0,1455	6,75E+06
C11+1 1s 1g	0,0195	3,92E+05	7,43E+04	19%	159,16	0,1455	5,89E+06
C11+2 1s 1g	2,5000	6,67E+04	1,31E+04	20%	74,75	0,1455	1,00E+06
C11+2 1s 1g	1,2500	6,14E+05	2,20E+05	36%	688,93	0,1455	9,24E+06
C11+2 1s 1g	0,6250	6,87E+05	2,19E+05	32%	770,13	0,1455	1,03E+07
C11+2 1s 1g	0,3125	3,38E+05	1,04E+05	31%	378,62	0,1455	5,08E+06
C11+2 1s 1g	0,1563	1,67E+05	9,56E+04	57%	187,11	0,1455	2,51E+06
C11+2 1s 1g	0,0000	8,03E+03	8,92E+02	11%	0,00	0,1455	1,21E+05
C11+2 1s 1g	0,0781	1,27E+05	1,03E+04	8%	141,89	0,1455	1,90E+06
C11+2 1s 1g	0,0391	2,66E+04	9,28E+03	35%	29,88	0,1455	4,01E+05
C11+2 1s 1g	0,0195	1,46E+04	3,63E+03	25%	16,32	0,1455	2,19E+05

Anexo II. Resultados reconocimiento mediado por anticuerpos 2,5-0,02 mM

Se incluyen los chips con concentraciones de biotina tiolada en rango 2,5-0,02 mM. Los chips con la biotina a 50 mM se hallan en el Anexo III. Se han resaltado en verde las SNR superiores a 20, consideradas significativas. En los casos en que hay una SNR elevada, pero ésta se debe a anomalías de la superficie (como un fondo heterogéneo), el resaltado es amarillo. En los casos en que los puntos de biotina tiolada están totalmente enmascarados por la señal inespecífica, y es impracticable toda medición, se han colocado guiones (--). La columna "imagen" indica el tratamiento, réplica, exposición y ganancia, respectivamente

Imagen	[BT]	Intensidad de la señal (pixel)	Desviación estandar	Desviación relativa	SNR	Diámetro de los puntos (mm)	Intensidad/Área (pixel/mm ²)
T (II) 1s 1g	2,5000	1,00E+06	1,41E+05	14%	18,93	0,4364	1,68E+06
T (II) 1s 1g	1,2500	7,09E+05	1,13E+05	16%	13,36	0,4364	1,18E+06
T (II) 1s 1g	0,6250	6,65E+05	1,55E+05	23%	12,53	0,4364	1,11E+06
T (II) 1s 1g	0,3125	6,88E+05	1,82E+05	26%	12,97	0,4364	1,15E+06
T (II) 1s 1g	0,1563	4,86E+05	6,28E+04	13%	9,16	0,4364	8,12E+05
T (II) 1s 1g	0,0000	3,44E+05	5,30E+04	15%	6,49	0,4364	5,75E+05
T (II) 1s 1g	0,0781	5,79E+05	8,99E+04	16%	10,92	0,4364	9,68E+05
T (II) 1s 1g	0,0391	4,58E+05	8,36E+04	18%	8,65	0,4364	7,66E+05
T (II) 1s 1g	0,0195	7,82E+05	1,14E+05	15%	14,75	0,4364	1,31E+06
T+1 1s 1g	2,5000	4,31E+05	8,75E+04	20%	5,08	0,3740	
T+1 1s 1g	1,2500	4,04E+05	7,11E+04	18%	4,77	0,3740	9,20E+05
T+1 1s 1g	0,6250	3,75E+05	9,53E+04	25%	4,42	0,3740	8,52E+05
T+1 1s 1g	0,3125	4,19E+05	2,23E+05	53%	4,95	0,3740	9,54E+05
T+1 1s 1g	0,1563	3,49E+05	9,54E+04	27%	4,12	0,3740	7,95E+05
T+1 1s 1g	0,0000	2,79E+05	8,47E+04	30%	3,29	0,3740	6,34E+05
T+1 1s 1g	0,0781	5,12E+05	1,54E+05	30%	6,04	0,3740	1,16E+06
T+1 1s 1g	0,0391	4,41E+05	1,21E+05	27%	5,21	0,3740	1,00E+06
T+1 1s 1g	0,0195	4,43E+05	2,23E+05	50%	5,23	0,3740	1,01E+06
T+2 1s 1g	2,5000	3,19E+03	2,32E+03	73%	0,16	0,0831	1,47E+05
T+2 1s 1g	1,2500	1,08E+04	4,46E+03	41%	0,54	0,0831	4,99E+05
T+2 1s 1g	0,6250	1,89E+04	7,89E+03	42%	0,94	0,0831	8,70E+05
T+2 1s 1g	0,3125	2,07E+04	1,15E+04	56%	1,02	0,0831	9,52E+05
T+2 1s 1g	0,1563	2,05E+04	1,46E+04	71%	1,01	0,0831	9,43E+05
T+2 1s 1g	0,0000	2,95E+04	2,02E+04	68%	1,46	0,0831	1,36E+06
T+2 1s 1g	0,0781	3,33E+04	1,92E+04	58%	1,65	0,0831	1,53E+06
T+2 1s 1g	0,0391	2,11E+04	1,09E+04	52%	1,05	0,0831	9,74E+05
T+2 1s 1g	0,0195	2,44E+04	1,35E+04	56%	1,21	0,0831	1,12E+06
C2 (II) 1s 1g	2,5000	--	--	--	--	--	--
C2 (II) 1s 1g	1,2500	--	--	--	--	--	--
C2 (II) 1s 1g	0,6250	--	--	--	--	--	--
C2 (II) 1s 1g	0,3125	--	--	--	--	--	--
C2 (II) 1s 1g	0,1563	--	--	--	--	--	--
C2 (II) 1s 1g	0,0000	--	--	--	--	--	--
C2 (II) 1s 1g	0,0781	--	--	--	--	--	--
C2 (II) 1s 1g	0,0391	--	--	--	--	--	--
C2 (II) 1s 1g	0,0195	--	--	--	--	--	--

Imagen	[BT]	Intensidad de la señal (pixel)	Desviación estandar	Desviación relativa	SNR	Diámetro de los puntos (mm)	Intensidad/Área (pixel/mm ²)
C2+1 1s 1g	2,5000	4,77E+05	1,29E+05	27%	42,51	0,4364	7,98E+05
C2+1 1s 1g	1,2500	4,15E+05	1,06E+05	26%	36,93	0,4364	6,93E+05
C2+1 1s 1g	0,6250	3,21E+05	4,21E+04	13%	28,61	0,4364	5,37E+05
C2+1 1s 1g	0,3125	3,09E+05	5,23E+04	17%	27,52	0,4364	5,17E+05
C2+1 1s 1g	0,1563	2,52E+05	2,92E+04	12%	22,43	0,4364	4,21E+05
C2+1 1s 1g	0,0000	1,60E+05	1,12E+04	7%	14,24	0,4364	2,67E+05
C2+1 1s 1g	0,0781	2,49E+05	4,25E+04	17%	22,20	0,4364	4,17E+05
C2+1 1s 1g	0,0391	2,89E+05	3,99E+04	14%	25,71	0,4364	4,83E+05
C2+1 1s 1g	0,0195	2,53E+05	5,65E+04	22%	22,51	0,4364	4,23E+05
C2+2 1s 1g	2,5000	1,15E+05	2,91E+04	25%	12,09	0,2909	4,31E+05
C2+2 1s 1g	1,2500	1,08E+05	1,80E+04	17%	11,39	0,2909	4,06E+05
C2+2 1s 1g	0,6250	1,00E+05	2,03E+04	20%	10,57	0,2909	3,77E+05
C2+2 1s 1g	0,3125	9,48E+04	2,53E+04	27%	10,00	0,2909	3,57E+05
C2+2 1s 1g	0,1563	9,18E+04	1,30E+04	14%	9,69	0,2909	3,45E+05
C2+2 1s 1g	0,0000	7,29E+04	9,48E+03	13%	7,69	0,2909	2,74E+05
C2+2 1s 1g	0,0781	1,01E+05	2,33E+04	23%	10,66	0,2909	3,80E+05
C2+2 1s 1g	0,0391	7,92E+04	1,14E+04	14%	8,36	0,2909	2,98E+05
C2+2 1s 1g	0,0195	1,16E+05	2,97E+04	26%	12,24	0,2909	4,37E+05
C3 1s 1g	2,5000	--	--	--	--	--	--
C3 1s 1g	1,2500	--	--	--	--	--	--
C3 1s 1g	0,6250	--	--	--	--	--	--
C3 1s 1g	0,3125	--	--	--	--	--	--
C3 1s 1g	0,1563	--	--	--	--	--	--
C3 1s 1g	0,0000	--	--	--	--	--	--
C3 1s 1g	0,0781	--	--	--	--	--	--
C3 1s 1g	0,0391	--	--	--	--	--	--
C3 1s 1g	0,0195	--	--	--	--	--	--
C3+1 1s 1g	2,5000	8,64E+05	4,05E+05	47%	14,94	0,4156	1,59E+06
C3+1 1s 1g	1,2500	8,98E+05	2,39E+05	27%	15,54	0,4156	1,66E+06
C3+1 1s 1g	0,6250	8,03E+05	1,45E+05	18%	13,90	0,4156	1,48E+06
C3+1 1s 1g	0,3125	7,83E+05	1,81E+05	23%	13,54	0,4156	1,44E+06
C3+1 1s 1g	0,1563	6,74E+05	2,00E+05	30%	11,66	0,4156	1,24E+06
C3+1 1s 1g	0,0000	3,97E+05	5,78E+04	15%	6,86	0,4156	7,31E+05
C3+1 1s 1g	0,0781	7,43E+05	2,14E+05	29%	12,85	0,4156	1,37E+06
C3+1 1s 1g	0,0391	6,84E+05	1,08E+05	16%	11,83	0,4156	1,26E+06
C3+1 1s 1g	0,0195	5,93E+05	1,51E+05	25%	10,26	0,4156	1,09E+06

Imagen	[BT]	Intensidad de la señal (pixel)	Desviación estandar	Desviación relativa	SNR	Diámetro de los puntos (mm)	Intensidad/Área (pixel/mm ²)
C3+2 1s 1g	2,5000	3,09E+04	3,95E+03	13%	19,27	0,1455	4,64E+05
C3+2 1s 1g	1,2500	3,14E+04	3,56E+03	11%	19,64	0,1455	4,73E+05
C3+2 1s 1g	0,6250	2,79E+04	5,37E+03	19%	17,44	0,1455	4,20E+05
C3+2 1s 1g	0,3125	2,24E+04	4,07E+03	18%	14,00	0,1455	3,37E+05
C3+2 1s 1g	0,1563	2,18E+04	2,69E+03	12%	13,63	0,1455	3,28E+05
C3+2 1s 1g	0,0000	2,26E+04	1,60E+03	7%	0,00	0,1455	3,41E+05
C3+2 1s 1g	0,0781	3,51E+04	1,04E+04	30%	21,90	0,1455	5,28E+05
C3+2 1s 1g	0,0391	3,35E+04	9,27E+03	28%	20,93	0,1455	5,04E+05
C3+2 1s 1g	0,0195	4,18E+04	1,22E+04	29%	26,08	0,1455	6,28E+05
C4 1s 1g	2,5000	2,13E+06	3,91E+05	18%	20,44	0,4779	2,96E+06
C4 1s 1g	1,2500	1,97E+06	6,32E+05	32%	18,92	0,4779	2,74E+06
C4 1s 1g	0,6250	1,77E+06	2,76E+05	16%	16,96	0,4779	2,46E+06
C4 1s 1g	0,3125	--	--	--	--	--	--
C4 1s 1g	0,1563	--	--	--	--	--	--
C4 1s 1g	0,0000	9,86E+05	1,04E+05	11%	9,47	0,4779	1,37E+06
C4 1s 1g	0,0781	--	--	--	--	--	--
C4 1s 1g	0,0391	--	--	--	--	--	--
C4 1s 1g	0,0195	--	--	--	--	--	--
C4+1 (II) 1s 1g	2,5000	4,04E+05	1,03E+05	26%	30,31	0,3740	9,19E+05
C4+1 (II) 1s 1g	1,2500	3,61E+05	8,59E+04	24%	27,04	0,3740	8,20E+05
C4+1 (II) 1s 1g	0,6250	3,58E+05	8,51E+04	24%	26,86	0,3740	8,15E+05
C4+1 (II) 1s 1g	0,3125	3,02E+05	6,63E+04	22%	22,63	0,3740	6,86E+05
C4+1 (II) 1s 1g	0,1563	2,28E+05	5,47E+04	24%	17,09	0,3740	5,18E+05
C4+1 (II) 1s 1g	0,0000	1,85E+05	1,33E+04	7%	13,91	0,3740	4,22E+05
C4+1 (II) 1s 1g	0,0781	--	--	--	--	--	--
C4+1 (II) 1s 1g	0,0391	--	--	--	--	--	--
C4+1 (II) 1s 1g	0,0195	--	--	--	--	--	--
C4+2 1s 1g	2,5000	8,12E+04	3,21E+04	40%	467,18	0,1247	1,66E+06
C4+2 1s 1g	1,2500	6,25E+04	1,87E+04	30%	359,62	0,1247	1,28E+06
C4+2 1s 1g	0,6250	4,03E+04	1,40E+04	35%	231,86	0,1247	8,25E+05
C4+2 1s 1g	0,3125	3,44E+04	9,66E+03	28%	197,72	0,1247	7,04E+05
C4+2 1s 1g	0,1563	3,02E+04	9,13E+03	30%	173,92	0,1247	6,19E+05
C4+2 1s 1g	0,0000	4,68E+03	1,74E+02	4%	26,92	0,1247	9,58E+04
C4+2 1s 1g	0,0781	2,36E+04	1,03E+04	44%	135,56	0,1247	4,83E+05
C4+2 1s 1g	0,0391	1,14E+04	3,31E+03	29%	65,77	0,1247	2,34E+05
C4+2 1s 1g	0,0195	2,33E+04	1,10E+04	47%	133,81	0,1247	4,76E+05

Imagen	Intensidad de [BT]	Intensidad de la señal (pixel)	Desviación estandar	Desviación relativa	SNR	Diámetro de los puntos (mm)	Intensidad/Área (pixel/mm ²)
C11 (II) 1s 1g	2,5000	2,65E+05	7,13E+04	27%	233,74	0,1662	3,06E+06
C11 (II) 1s 1g	1,2500	1,84E+05	8,05E+04	44%	161,87	0,1662	2,12E+06
C11 (II) 1s 1g	0,6250	1,51E+05	3,70E+04	24%	133,36	0,1662	1,74E+06
C11 (II) 1s 1g	0,3125	9,69E+04	2,14E+04	22%	85,36	0,1662	1,12E+06
C11 (II) 1s 1g	0,1563	9,27E+04	3,36E+04	36%	81,64	0,1662	1,07E+06
C11 (II) 1s 1g	0,0000	2,74E+04	1,14E+03	4%	24,11	0,1662	3,15E+05
C11 (II) 1s 1g	0,0781	8,15E+04	1,99E+04	24%	71,74	0,1662	9,38E+05
C11 (II) 1s 1g	0,0391	6,31E+04	1,93E+04	31%	55,59	0,1662	7,27E+05
C11 (II) 1s 1g	0,0195	7,07E+04	5,97E+03	8%	62,26	0,1662	8,15E+05
C11+1 1s 1g	2,5000	3,17E+05	1,02E+05	32%	315,22	0,1662	3,65E+06
C11+1 1s 1g	1,2500	2,77E+05	3,91E+04	14%	275,30	0,1662	3,19E+06
C11+1 1s 1g	0,6250	1,84E+05	5,33E+04	29%	183,28	0,1662	2,12E+06
C11+1 1s 1g	0,3125	1,55E+05	4,57E+04	29%	154,59	0,1662	1,79E+06
C11+1 1s 1g	0,1563	1,46E+05	2,58E+04	18%	145,15	0,1662	1,68E+06
C11+1 1s 1g	0,0000	2,58E+04	1,00E+03	4%	25,72	0,1662	2,98E+05
C11+1 1s 1g	0,0781	1,10E+05	1,66E+04	15%	109,18	0,1662	1,26E+06
C11+1 1s 1g	0,0391	1,18E+05	3,80E+04	32%	117,14	0,1662	1,36E+06
C11+1 1s 1g	0,0195	1,11E+05	3,06E+04	27%	110,94	0,1662	3,52E+05
C11+2 1s 1g	2,5000	8,82E+04	2,20E+04	25%	171,99	0,1039	2,60E+06
C11+2 1s 1g	1,2500	1,09E+05	4,19E+04	38%	212,95	0,1039	3,22E+06
C11+2 1s 1g	0,6250	6,48E+04	1,83E+04	28%	126,40	0,1039	1,91E+06
C11+2 1s 1g	0,3125	5,93E+04	1,43E+04	24%	115,60	0,1039	1,75E+06
C11+2 1s 1g	0,1563	5,47E+04	1,72E+04	31%	106,57	0,1039	1,61E+06
C11+2 1s 1g	0,0000	1,03E+04	5,13E+02	5%	20,16	0,1039	3,05E+05
C11+2 1s 1g	0,0781	4,96E+04	1,37E+04	28%	96,66	0,1039	1,46E+06
C11+2 1s 1g	0,0391	2,76E+04	6,96E+03	25%	53,79	0,1039	8,14E+05
C11+2 1s 1g	0,0195	3,83E+04	1,23E+04	32%	74,67	0,1039	1,13E+06

Anexo III. Resultados reconocimiento mediado por anticuerpos a altas concentraciones de BT

En primer lugar, hay un chip con razón de dilución 1/2 (rango 50-0,4 mM), al que siguen 3 chips con dilución 1/3 (rango 50-0,02 mM). Se han resaltado en verde las SNR superiores a 20, consideradas significativas. La columna "imagen" indica el tratamiento, réplica, exposición y ganancia, respectivamente.

Imagen	[BT]	Intensidad de la señal (pixel)	Desviación estandar	Desviación relativa	SNR	Diámetro de los puntos (mm)	Intensidad/Área (pixel/mm ²)
C11 1s 1g	50,00	2,94E+05	8,49E+04	29%	38,38	0,1455	4,42E+06
C11 1s 1g	25,00	2,93E+05	4,39E+04	15%	38,33	0,1455	4,41E+06
C11 1s 1g	12,50	2,74E+05	5,79E+04	21%	35,82	0,1455	4,12E+06
C11 1s 1g	6,25	2,55E+05	4,96E+04	19%	33,34	0,1455	3,84E+06
C11 1s 1g	3,13	2,42E+05	4,76E+04	20%	31,59	0,1455	3,64E+06
C11 1s 1g	0,00	3,97E+04	7,65E+03	19%	5,18	0,1455	5,97E+05
C11 1s 1g	1,56	2,38E+05	3,03E+04	13%	31,17	0,1455	3,59E+06
C11 1s 1g	0,78	2,31E+05	7,03E+04	30%	30,18	0,1455	3,47E+06
C11 1s 1g	0,39	2,15E+05	7,78E+04	36%	28,04	0,1455	3,23E+06
C11 (II) 1s 1g	50,00	7,76E+04	2,17E+04	28%	36,85	0,1247	1,59E+06
C11 (II) 1s 1g	16,67	7,53E+04	4,21E+04	56%	35,75	0,1247	1,54E+06
C11 (II) 1s 1g	5,56	7,74E+04	1,72E+04	22%	36,78	0,1247	1,59E+06
C11 (II) 1s 1g	1,85	8,84E+04	9,08E+03	10%	41,98	0,1247	1,81E+06
C11 (II) 1s 1g	0,62	7,37E+04	8,71E+03	12%	35,02	0,1247	1,51E+06
C11 (II) 1s 1g	0,00	1,20E+04	2,11E+03	18%	5,70	0,1247	2,46E+05
C11 (II) 1s 1g	0,21	5,33E+04	1,17E+04	22%	25,34	0,1247	1,09E+06
C11 (II) 1s 1g	0,07	4,79E+04	1,37E+04	29%	22,73	0,1247	9,80E+05
C11+1 (II) 1s 1g	50,00	3,56E+04	1,11E+04	31%	35,40	0,1247	7,30E+05
C11+1 (II) 1s 1g	16,67	7,25E+04	1,27E+04	18%	72,08	0,1247	1,49E+06
C11+1 (II) 1s 1g	5,56	7,08E+04	1,05E+04	15%	70,38	0,1247	1,45E+06
C11+1 (II) 1s 1g	1,85	5,52E+04	1,36E+04	25%	54,80	0,1247	1,13E+06
C11+1 (II) 1s 1g	0,62	3,89E+04	2,69E+04	69%	38,61	0,1247	7,96E+05
C11+1 (II) 1s 1g	0,00	1,07E+04	1,01E+03	9%	10,65	0,1247	2,20E+05
C11+1 (II) 1s 1g	0,21	2,77E+04	1,30E+04	47%	27,50	0,1247	5,67E+05
C11+1 (II) 1s 1g	0,07	2,34E+04	8,61E+03	37%	23,23	0,1247	4,79E+05
C11+1 (II) 1s 1g	0,02	1,76E+04	5,43E+03	31%	17,44	0,1247	3,60E+05
C11+2 (II) 1s 1g	50,00	4,24E+04	1,14E+04	27%	128,81	0,0831	1,95E+06
C11+2 (II) 1s 1g	16,67	3,89E+04	1,52E+04	39%	118,21	0,0831	1,79E+06
C11+2 (II) 1s 1g	5,56	3,89E+04	1,65E+04	42%	118,28	0,0831	1,79E+06
C11+2 (II) 1s 1g	1,85	3,90E+04	6,78E+03	17%	118,35	0,0831	1,80E+06
C11+2 (II) 1s 1g	0,62	3,52E+04	1,64E+04	47%	107,05	0,0831	1,62E+06
C11+2 (II) 1s 1g	0,00	6,12E+03	3,29E+02	5%	18,59	0,0831	2,82E+05
C11+2 (II) 1s 1g	0,21	2,53E+04	1,07E+04	42%	76,95	0,0831	1,17E+06
C11+2 (II) 1s 1g	0,07	1,95E+04	6,73E+03	34%	59,27	0,0831	8,99E+05
C11+2 (II) 1s 1g	0,02	1,96E+04	3,19E+03	16%	59,56	0,0831	9,04E+05