

## Resumen

En la actualidad, existe un especial interés por sistemas que permitan analizar muestras allá donde sea necesario y sin necesidad de operarios especializados. Estos dispositivos tienen aplicación en diferentes ámbitos, como el monitoreo ambiental, industria alimentaria, defensa, investigación, y en especial, en el campo médico y cuidado de la salud. Los dispositivos con este fin se engloban dentro del marco *point-of-care* y deben ser exactos, sensibles, portátiles, fáciles de utilizar y económicos. Dentro de estos dispositivos destacan los biosensores.

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), un biosensor se define como un dispositivo que usa reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas, anticuerpos, tejidos, orgánulos o células completas para detectar compuestos químicos generalmente mediante señales eléctricas, térmicas u ópticas.

Los biosensores se pueden clasificar según la naturaleza del elemento de bioreconocimiento (proteínas, ADN, células, etc.), el tipo del transductor empleado y el formato de ensayo. Aquellos que utilizan un transductor óptico y no emplean marcadores para su funcionamiento, se denominan biosensores ópticos *label-free* y se caracterizan por su elevada sensibilidad y selectividad.

El interés en este tipo de biosensores reside en que se evitan ciertos problemas relacionados con el proceso de marcaje, reduciendo el coste y tiempo de ensayo. Sin embargo, la dificultad de fabricación de las nanoestructuras necesarias en estos transductores y la baja escalabilidad han ralentizado su expansión a nivel comercial.

En esta tesis se ha abordado el desarrollo de biosensores ópticos *label-free*, basados en tecnología de disco compacto, permitiendo así abaratar y simplificar su fabricación. El trabajo llevado a cabo ha consistido en estudiar diferentes propiedades físico-químicas desarrolladas por diversos materiales. Ello ha

---

permitido obtener sistemas compactos y accesibles, capaces de sensar, con buenas prestaciones analíticas, en diferentes escenarios.

En el capítulo 1 se presenta un estudio de inhibición enzimática sobre discos Blu-ray como plataforma de ensayo para el cribado de fármacos. Para ello, se inmoviliza orientadamente una glicoenzima, de la familia de las peroxidasa sobre la superficie del disco, cuya actividad se relaciona con los compuestos a cribar. Después de ensayar cada compuesto, se determina el grado de inhibición enzimática mediante la adición de un sustrato. La cantidad de producto obtenido, inversamente proporcional al potencial inhibitorio del compuesto en estudio, es cuantificado con un lector de discos que registra las variaciones en la intensidad del haz laser reflejado debidas al producto enzimático. Ello permite realizar más de 1700 ensayos simultáneos en un único disco Blu-ray lo que muestra su potencial en análisis masivo de alto rendimiento. Además, se plantea una estrategia basada en hipersuperficies para el análisis de la elevada cantidad de datos que se generan en las etapas del proceso de descubrimiento de fármacos.

En el capítulo 2 se aborda el estudio de una metodología para reducir el ruido generado en la lectura de resultados obtenidos con biosensores ópticos, mejorando así su sensibilidad. Para ello, se plantea la estructuración del ensayo en forma de franjas en lugar del tradicional *microarray*, generando una señal periódica sinusoidal al ser escaneadas. Al analizar dicha señal en dominio de frecuencias, ésta se concentra en un pico a la frecuencia del ensayo, mientras que la mayor parte del ruido aparece a frecuencias mucho más altas. Inicialmente se quería reducir al máximo el ruido, para diferenciar las interacciones moleculares en formato *label-free*. Sin embargo, los ensayos realizados con discos DVD no generaron suficiente señal, teniendo que recurrir en esta ocasión al marcaje para la cuantificación de inmunoglobulinas G y de caseína. Pese a ello, la metodología

desarrollada también se puede aplicar en biosensores tipo *label-free*, reduciendo el ruido y mejorando su sensibilidad.

El capítulo 3 se centra en el desarrollo de sustratos interferométricos multicapa que varían la intensidad de la luz reflejada al realizar un ensayo analítico en su superficie. Los sustratos fueron fabricados utilizando los materiales que componen los DVD-RW, depositados en capas de espesor controlado con el fin de obtener la máxima respuesta. A su vez, se diseñaron de tal forma que uno de ellos disminuya la intensidad del haz reflejado como respuesta a las interacciones moleculares, mientras que el otro la aumenta. El trabajo incluye la utilización de principios y materiales de la tecnología de disco compacto para el desarrollo del sistema de detección. Para ello, se emplea el cabezal de un lector de DVD, ya que dispone de un láser y de todos los elementos ópticos necesarios para el escaneado vertical. Con este sistema se cuantifican con éxito y sin marcaje inmunoglobulinas G y sulfasalazina, una macromolécula y un fármaco de masa molecular reducida.

El capítulo 4 consiste en la fabricación de un cristal fotónico utilizando la estructura de los discos compactos cubiertos con una película de óxido de titanio. Se han estudiado las propiedades físico-químicas de estos sustratos y se han caracterizado sus propiedades fotónicas. Todo ello está en concordancia con los resultados obtenidos mediante simulaciones. Para interrogar los cristales fotónicos fueron necesarios una fuente de luz blanca y un espectrofotómetro, además de los elementos ópticos necesarios para guiar la luz. La respuesta del cristal fotónico se caracterizó utilizando disoluciones patrón de índice de refracción conocido y registrando el espectro de transmisión para cada uno de ellos. Finalmente, estos cristales fueron empleados para cuantificar, mediante inmunoensayo directo sin marcaje, inmunoglobulina G, proteína C-reactiva, y deshidrogenasa láctica, mostrando buena sensibilidad y elevada selectividad.