



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

# **Integración de diferentes fenómenos fotónicos en tecnología de disco compacto para el desarrollo de biosensores *label-free***

Memoria de tesis presentada para optar al grado de Doctor en Química por  
la Universitat Politècnica de València por:

**Gabriel Sancho Fornes**

Tesis dirigida por:

**Ángel Maquieira Catalá**

Valencia, julio de 2019



***“Haz las cosas lo más simple que puedas, pero no te limites a lo simple.”***

*Atribuido a Albert Einstein*



## **Agradecimientos**

Me gustaría aprovechar estas líneas para agradecer a todas las personas que me han acompañado en esta aventura y me han ayudado de algún modo a alcanzar la meta.

En primer lugar, quiero agradecer a Ángel Maquieira la oportunidad de unirme al Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) y la confianza para realizar esta tesis doctoral en su grupo de investigación. Aún recuerdo cuando recibí esa primera llamada preguntándome si era de Chiva y comentándome que los de Chiva y Cheste no se llevaban bien. Por supuesto, una anécdota graciosa que dio el pistoletazo de salida a un aprendizaje continuo, tanto en el ámbito científico como en el personal.

También quiero agradecer especialmente a los compañeros y compañeras con los que he tenido el placer y el honor de trabajar: Sergi Morais y Paulina Dobosz que me recibieron con los brazos abiertos en el laboratorio y me introdujeron en el mundo de los biosensores, la tecnología de disco compacto y los inmunoensayos; Ernest Peris y David Giménez por enseñarme y ayudarme en el desarrollo de ensayos de inhibición enzimática empleando discos Blu-ray; Raquel Montón por enseñarme la interferometría y por todo lo que aprendí de ella cada día; Javier Carrascosa ya que sin su ayuda nada de esto habría sido posible; Estrella Fernández y Ángel López por sus aportaciones en momentos claves que marcan la diferencia entre el éxito y el fracaso; y por supuesto Miquel Avellà por su ayuda, apoyo, consejos, tiempo... gracias por ser un grandísimo compañero y un mejor amigo.

Y por supuesto a todos los que, pese a no haber trabajado juntos, han sido muy buenos compañeros y hemos compartido el día a día. Rosa Puchades, María José Bañuls, Luis Tortajada, Miguel Ángel González, Núria Pastor, Julia Atienza, Pilar Aragón, Patricia Noguera, Jose Luis López, Enrique Guijarro y Eva M. Brun agradeceros que siempre que os he necesitado habéis estado para atenderme. Y a mis compañeros en el laboratorio Natalia Sacco, Cristina

Ripollés, Noelia Carbó, Elisabeth Hevia, Salvador Mena, Regina Niñoles, Jorge Escorihuela, Noelle do Nascimento, Sara Santiago, Ahmed Ali, Eric Yamanaka, Ismael Guerrero, Adrián Poveda, Juan Chorro, Beatriz Lucas, Pilar Jiménez, Edurne Peña, Zeneida Díaz, Rafael Alonso, Victoria González, Sara Martorell, Ana Lázaro, Pedro Quintero, Maribel Lucío, Cynthia Collantes y en especial al tercer integrante del lab 1.5 Daniel González, y al grupo del almuerzo compuesto por Salvador Más, María José Juárez y Augusto Juste.

No podría faltar mi más profundo y sincero agradecimiento a mi familia, en especial a mis padres y hermana por haberme dado una educación, valores y principios de los que me enorgullezco y me siento muy afortunado. Sin las oportunidades que me han brindado nada de esto habría sido posible. E igual que siempre están en mi memoria, quiero acordarme de mis seres queridos que han faltado. Os echo mucho de menos. Y por supuesto a Jessica Verelst, por todo lo que me aporta, por su amor incondicional, por ser la fortaleza y pilar fundamental de mi vida, muchísimas gracias.

También quiero dar las gracias a mis amigos por el interés mostrado en la consecución del doctorado, interesándose en lo que hago y en cómo me va, aunque no entendieran lo que les contaba. Así como a los integrantes del Club Frontenis Alboraya, que me han permitido crecer y continuar con mi pasión por el frontenis a la vez que me dedicaba en cuerpo y alma al desarrollo de esta tesis doctoral.

Todos los aquí mencionados, y muchos más, han ayudado a que los ánimos no decayeran en los malos momentos y, por consiguiente, tuviera las fuerzas necesarias para conseguir los objetivos propuestos. De verdad, ¡muchas gracias a todos!

## 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.



## Resum

En l'actualitat, hi ha un especial interès per sistemes que permetin analitzar mostres allà on sigui necessari i sense necessitat d'operaris especialitzats. Aquests dispositius tenen aplicació en diferents àmbits, com el monitoratge ambiental, indústria alimentària, defensa, investigació, i especialment, en el camp mèdic i cura de la salut. Els dispositius amb aquesta finalitat s'engloben dins el marc *point-of-care* i han de ser exactes, sensibles, portàtils, fàcils d'utilitzar i econòmics. Dins d'aquests dispositius destaquen els biosensors.

D'acord amb la Unió Internacional de Química Pura i Aplicada (IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), un biosensor es defineix com un dispositiu que fa servir reaccions bioquímiques específiques intervingudes per enzims, anticossos, teixits, orgànuls o cèl·lules completes per detectar compostos químics generalment mitjançant senyals elèctriques, tèrmiques o òptiques.

Els biosensors es poden classificar segons la naturalesa de l'element de bioreconeixement (proteïnes, ADN, cèl·lules, etc.), el tipus del transductor empleat i el format d'assaig. Aquells que utilitzen un transductor òptic i no utilitzen marcadors per al seu funcionament, es denominen biosensors òptics *label-free* i es caracteritzen per la seua elevada sensibilitat i selectivitat.

L'interès en aquest tipus de biosensors és que s'eviten certs problemes relacionats amb el procés de marcatge, reduint el cost i temps d'assaig. No obstant això, la dificultat de fabricació de les nanoestructures necessàries en aquests transductors i la baixa escalabilitat han alentit la seua expansió a nivell comercial.

En aquesta tesi s'ha abordat el desenvolupament de biosensors òptics *label-free*, basats en tecnologia de disc compacte, permetent així abaratir i simplificar la seua fabricació. El treball dut a terme ha consistit en estudiar diferents propietats fisicoquímiques desenvolupades per diversos materials. Això ha permès obtenir

---

sistemes compactes i accessibles, capaços de sensar, amb bones prestacions analítiques, en diferents escenaris.

En el capítol 1 es presenta un estudi d'inhibició enzimàtica sobre discos Blu-ray com a plataforma d'assaig per al cribratge de fàrmacs. Per a això, s'immobilitza de manera orientada una glicoenzima de la família de les peroxidases sobre la superfície del disc, i la seua activitat es relaciona amb els compostos a garbellar. Després d'assajar cada compost, es determina el grau d'inhibició enzimàtica mitjançant l'addició d'un substrat. La quantitat de producte obtingut, inversament proporcional al potencial inhibitori del compost en estudi, és quantificat amb un lector de discos que registra les variacions en la intensitat del làser reflectit degudes al producte enzimàtic. Això permet realitzar més de 1700 assajos simultanis en un únic disc Blu-ray el que mostra el seu potencial en anàlisi massiva d'alt rendiment. A més, es planteja una estratègia basada en hipersuperfícies per a l'anàlisi de l'elevada quantitat de dades que es generen en les etapes del procés de descobriment de fàrmacs.

En el capítol 2 s'aborda l'estudi d'una metodologia per reduir el soroll generat en la lectura de resultats obtinguts amb biosensors òptics, millorant així la seua sensibilitat. Per a això, es planteja l'estructuració de l'assaig en forma de franges en lloc del tradicional *microarray*, generant un senyal periòdic sinusoidal en ser escanejades. En analitzar aquest senyal en domini de freqüències, aquesta es concentra en un pic a la freqüència de l'assaig, mentre que la major part del soroll apareix a freqüències molt més altes. Inicialment es volia reduir al màxim el soroll, per diferenciar les interaccions moleculars en format *label-free*. No obstant això, els assajos realitzats amb discos DVD no van generar prou senyal, havent de recórrer en aquesta ocasió al marcatge per a la quantificació d'immunoglobulines G i de caseïna. Malgrat això, la metodologia desenvolupada també es pot aplicar en biosensors tipus *label-free*, reduint el soroll i millorant la seua sensibilitat.

El capítol 3 es centra en el desenvolupament de substrats interferomètrics multicapa que varien la intensitat de la llum reflectida en realitzar un assaig analític en la seua superfície. Els substrats van ser fabricats utilitzant els materials que componen els DVD-RW, dipositats en capes de gruix controlat per tal d'obtenir la màxima resposta. Al seu torn, es van dissenyar de tal manera que un d'ells disminueixi la intensitat del feix reflectit com a resposta a les interaccions moleculars, mentre que l'altre l'augmenta. El treball inclou la utilització de principis i materials de la tecnologia de disc compacte per al desenvolupament del sistema de detecció. Per a això, es va utilitzar el capçal d'un lector de DVD, ja que disposa d'un làser i de tots els elements òptics necessaris per a l'escanejat vertical. Amb aquest sistema es quantifiquen amb èxit i sense marcatge immunoglobulines G i sulfasalazina, un macromolècula i un fàrmac de massa molecular reduïda.

El capítol 4 consisteix en la fabricació d'un cristall fotònic utilitzant l'estructura dels discos compactes coberts amb una pel·lícula d'òxid de titani. S'han estudiat les propietats fisicoquímiques d'aquests substrats i s'han caracteritzat les propietats fotòniques. Tot això està en concordança amb els resultats obtingut mitjançant simulacions. Per interrogar els cristalls fotònics van ser necessaris una font de llum blanca i un espectrofotòmetre, a més dels elements òptics necessaris per guiar la llum. La resposta del cristall fotònic es va caracteritzar utilitzant dissolucions patró d'índex de refracció conegut i registrant l'espectre de transmissió per a cada un d'ells. Finalment, aquests vidres van ser empleats per quantificar, mitjançant immunoassaig directe sense marcatge, immunoglobulina G, proteïna C-reactiva, i deshidrogenasa làctica, mostrant bona sensibilitat i elevada selectivitat.



## **Abstract**

At present, there is a special interest in systems that allow samples to be analysed wherever necessary and without the need for specialized operators. These devices can be applied in different fields, such as environmental monitoring, the food industry, defence, research, and especially in the medical and health care fields. Devices for this purpose fall within the point-of-care framework and must be accurate, sensitive, portable, easy to use and economical. Within these devices we can highlight biosensors.

According to the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), a biosensor is defined as a device that uses specific biochemical reactions mediated by enzymes, antibodies, tissues, organelles or whole cells to detect chemical compounds usually by electrical, thermal or optical signals.

Biosensors can be classified according to the nature of the biorecognition element (proteins, DNA, cells, etc.), the type of transducer used and the test format. Those that use an optical transducer and do not use labels for its operation are called label-free optical biosensors and are characterized by their high sensitivity and selectivity.

The interest in this type of biosensors lies in avoiding certain problems related to the labelling process, reducing the cost and testing time. However, the costly fabrication of the necessary nanostructures in these transducers and the low scalability have slowed down their commercial expansion.

In this thesis the development of label-free optical biosensors, based on compact disc technology, has been approached, thus making their manufacture cheaper and simpler. The work carried out has consisted of studying different physical-chemical properties manifested with several materials. This has allowed to obtain compact

and accessible systems, capable of sensing with a great analytical performance in different scenarios.

Chapter 1 presents an enzymatic inhibition study on Blu-ray discs as a test platform for drug screening. For this purpose, a glycoenzyme of the peroxidase family is immobilized on the surface of the disc whose activity is related to the compounds to be screened. After testing each compound, the degree of enzymatic inhibition is determined by adding the enzymatic substrate. The amount of product obtained is inversely proportional to the inhibitory potential of the compound, and is quantified with a disk reader that records the variations in the intensity of the reflected laser beam due to the enzymatic product. In addition, more than 1700 tests are performed on a single Blu-ray disc as proof of concept for application in high performance analysis and a hypersurface based strategy is proposed for the analysis of the large amount of data generated in the stages of the drug discovery process.

Chapter 2 deals with the study of a methodology to reduce noise generated in the reading of results obtained with optical biosensors, hence improving their sensitivity. For this purpose, the structure of the test is proposed in the form of stripes instead of the traditional *microarray*, generating a sinusoidal periodic signal when they are scanned. When analysing this signal in frequency domain, it is concentrated in a peak at the frequency of the test, while most of the noise appears at much higher frequencies. Initially, the aim was to reduce noise as much as possible in order to differentiate molecular interactions in a label-free format. However, the tests carried out on a DVD did not generate enough signal, having to resort to labelling on this occasion for the quantification of immunoglobulins G and casein. Nevertheless, the methodology developed can be applied to label-free biosensors, reducing noise and improving sensitivity.

Chapter 3 focuses on the development of multilayer interferometric substrates that vary the intensity of reflected light when performing an analytical test on their

---



surface. The substrates were manufactured using the materials that make up the DVD-RW, deposited in layers of controlled thickness in order to obtain maximum response. At the same time, they were designed in such a way that one of them decreased the intensity of the reflected beam as a response to molecular interactions, while the other increased it. The work includes the use of principles and materials from compact disc technology for the development of the detection system. For this, the head of a DVD reader is used, as it has a laser and all the optical elements necessary for vertical scanning. With this system, immunoglobulins G and sulfasalazine, a macromolecule and a drug with reduced molecular mass are successfully quantified without labelling.

Chapter 4 consists of the fabrication of a photonic crystal using the structure of the compact discs covered with a titanium oxide layer. The physical-chemical properties of these substrates have been studied and their photonic properties have been characterized. All this is in accordance with the results obtained through simulations. To interrogate the photonic crystals, a white light source and a spectrophotometer were needed, as well as the optical elements necessary to guide the light. The response of the photonic crystal was characterized using standard solutions of known refractive index and recording the transmission spectrum for each of them. Finally, these crystals were used to quantify, by direct label-free immunoassay, immunoglobulin G, C-reactive protein, and lactic dehydrogenase, showing a good sensitivity and high selectivity.



## Publicaciones y otros resultados relacionados con la Tesis

Los trabajos presentados en esta tesis han originado las siguientes publicaciones científicas:

- Artículos en revistas científicas indexadas:
  1. Gabriel Sancho-Fornes, Ernest Peris, David Giménez-Romero, Sergi Morais, Ángel Maquieira, “*Enzyme inhibition microassays on Blu-ray disks for drug discovery*”, ACS Omega, **2019**, 4, 5595-5600.
  2. Gabriel Sancho-Fornes, Miquel Avella-Oliver, Javier Carrascosa, Sergi Morais, Rosa Puchades, Ángel Maquieira, “*Enhancing the sensitivity in optical biosensing by striped arrays and frequency-domain analysis*”, Sens. Actuators B, **2019**, 281, 432-438.
  3. Gabriel Sancho-Fornes, Miquel Avella-Oliver, Javier Carrascosa, Rosa Puchades, Ángel Maquieira, “*Interferometric multilayered nanomaterials to quantify unlabeled biorecognition assays by imaging*”, Anal. Chem., Submitted 10/05/2019.
  4. Gabriel Sancho-Fornes, Miquel Avella-Oliver, Javier Carrascosa, Estrella Fernandez, Eva M. Brun, Ángel Maquieira, “*Disk-based one-dimensional photonic crystal slabs for label-free immunosensing*”, Biosens. Bioelectron., **2019**, 126, 315-323.

- Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales:
  1. Raquel Montón-Molina, Gabriel Sancho-Fornes, Rosa Puchades, Ángel Maquieira, “*Label-free interferometric biosensors on multilayered chips. A simulated approach*”, Europt[r]ode XIII, Graz (Austria), **2016**.
  2. Gabriel Sancho-Fornes, Miquel Avella-Oliver, Rosa Puchades, Ángel Maquieira, “*Cristales fotónicos basados en discos compactos*”, X International Workshop on Sensors and Molecular Recognition, Burjassot (España), **2016**.
  3. Miquel Avella-Oliver, Gabriel Sancho-Fornes, Rosa Puchades, S. Wachsmann-Hogiu, Ángel Maquieira, “*Protein and exosome analysis with SERS-active substrates from consumer electronics*”, X International Workshop on Sensors and Molecular Recognition, Burjassot (España), **2016**.
  4. Gabriel Sancho-Fornes, Miquel Avella-Oliver, Javier Carrascosa, Rosa Puchades, Ángel Maquieira, “*Compact biosensing system based on thin-film interference*”, XI International Workshop on Sensors and Molecular Recognition, Valencia (España), **2017**.
  5. Javier Carrascosa, Gabriel Sancho-Fornes, Miquel Avella-Oliver, Rosa Puchades, Ángel Maquieira, “*Utilización de un cabezal óptico de DVD para la medida de la onda reflejada en biosensores ópticos*”, XI International Workshop on Sensors and Molecular Recognition, Valencia (España), **2017**.
  6. Miquel Avella-Oliver, Gabriel Sancho-Fornes, Noelle M. Nascimento, Rosa Puchades, Ángel Maquieira, “*Antibody fragmentation for selective*

*capturing on SERS detection*”, XI International Workshop on Sensors and Molecular Recognition, Valencia (España), **2017**.

7. Gabriel Sancho-Fornes, Miquel Avella-Oliver, Javier Carrascosa, Sergi Morais, Rosa Puchades, Ángel Maquieira, “*A practical method to increase sensitivity in optical biosensing*”, XXI Reunión SEQA. Sociedad Española de Química Analítica, Valencia (España), **2017**.
8. Miquel Avella-Oliver, Gabriel Sancho-Fornes, Noelle M. Nascimento, Rosa Puchades, Ángel Maquieira, “*Highly specific label-free biorecognition assay by surface-enhanced raman scattering on silvered polycarbonate structures*”, XXI Reunión SEQA. Sociedad Española de Química Analítica, Valencia (España), **2017**.
9. Miquel Avella-Oliver, Gabriel Sancho-Fornes, Rosa Puchades, Ángel Maquieira, “*Approaching point-of-care biosensing by new light scattering strategies*”, XXVIII Anniversary World Congress on Biosensors, Miami (USA), **2018**.
10. Gabriel Sancho-Fornes, Miquel Avella-Oliver, Javier Carrascosa, Rosa Puchades, Ángel Maquieira, “*Desarrollo de un biosensor label-free basado en espectroscopia de interferencia por reflexión*”, XII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition, Burjassot (España), **2018**.
11. Miquel Avella-Oliver, Gabriel Sancho-Fornes, Javier Carrascosa, Rosa Puchades, Ángel Maquieira, “*Boosted sensitivity for casein immunosensing by fourier domain analysis*”, XII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition, Valencia (España), **2018**.

12. Augusto Juste-Dolz, Miquel Avella-Oliver, Gabriel Sancho-Fornes, Rosa Puchades, Ángel Maquieira, “*Metallic nanostructures of metallica*”, XII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition, Valencia (España), **2018**.

## Abreviaturas, siglas y acrónimos

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AFM</b>	Microscopía de fuerza atómica
<b>AIC</b>	Criterio de información de Akaike
<b>ALPC</b>	Control automático de potencia láser
<b>AP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>APTES</b>	(3-aminopropil)triethoxisilano
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BD</b>	Disco Blu-ray
<b>BD-R</b>	Disco Blu-ray grabable
<b>BIC</b>	Criterio de información bayesiano
<b>BLI</b>	Interferometría de biocapa
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>BSI</b>	Interferometría por retrodispersión
<b>CAB</b>	Tampón activador de ConA
<b>CB</b>	Tampón carbonato
<b>CD</b>	Disco compacto
<b>CDI</b>	1,1-carbonildiimidazol
<b>CD-R</b>	Disco compacto grabable
<b>CitB</b>	Tampón citrato
<b>ConA</b>	Concanavalina A
<b>CRP</b>	Proteína C reactiva
<b>Da</b>	Dalton (g/mol)
<b>DBS</b>	Biosensor basado en difracción
<b>DCC</b>	N,N-diciclohexilcarbodiimida
<b>DF</b>	Filtrado digital
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido

## Abreviaturas, siglas y acrónimos

---

<b>DPI</b>	Interferometría de polarización dual
<b>DSC</b>	Sarbonato de disuccinimidilo
<b>DVD</b>	Disco versátil digital
<b>DVD-R</b>	Disco versátil digital grabable
<b>DVD-RW</b>	Disco versátil digital regrabable
<b>EBL</b>	Litografía por haz de electrones
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>FDA</b>	Análisis en dominio de frecuencias
<b>FIB</b>	Litografía de haces de iones enfocados
<b>GAR</b>	IgG producida en cabra anti IgG de conejo
<b>GMR</b>	Resonancia de modo guiado
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>HTS</b>	Cribado de alto rendimiento
<b>IgG</b>	Inmunoglobulinas tipo G
<b>IUPAC</b>	Unión internacional de química pura y aplicada
<b>Láser</b>	Amplificación de luz por emisión estimulada de radiación
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LOD</b>	Límite de detección
<b>LOQ</b>	Límite de cuantificación
<b>LPO</b>	Lactoperoxidasa
<b>M</b>	Molar (mol/L)
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>NHS</b>	N-hidroxisuccinimida
<b>OVA</b>	Ovoalbúmina
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PBS-T</b>	PBS con 0.05% de Tween-20



<b>PC</b>	Cristal fotónico
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano
<b>POC</b>	Punto de atención
<b>ppb</b>	Partes por billón ( $\mu\text{g/L}$ )
<b>ppm</b>	Partes por millón ( $\text{mg/L}$ )
<b>PVC</b>	Policloruro de vinilo
<b>RI</b>	Índice de refracción
<b>RIfS</b>	Espectroscopía de interferencia por reflexión
<b>RIU</b>	Unidad de índice de refracción
<b>RM</b>	Espejo resonante
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RR</b>	Anillo resonante
<b>RSD</b>	Desviación estándar relativa
<b>RWG</b>	Rejilla de guía de onda resonante
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>SERS</b>	Espectroscopía Raman mejorada en superficie
<b>SNR</b>	Relación señal-ruido
<b>SPDP</b>	Sulfosuccinimidil 6-[3'(2-piridilditio)- propionamido] hexanoato
<b>SPR</b>	Resonancia de plasmón superficial
<b>TE</b>	Modo transversal eléctrico
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>TgC</b>	Compuesto objetivo
<b>TM</b>	Modo transversal magnético
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
<b>TPO</b>	Tiroperoxidasa



---

## Índice

Resumen .....	i
Resum .....	v
Abstract.....	ix
Publicaciones y otros resultados relacionados con la Tesis.....	xiii
Abreviaturas, siglas y acrónimos .....	xvii
1. Introducción.....	1
1.1. Dispositivos <i>point-of-care</i> .....	3
1.2. Biosensores.....	5
1.2.1. Elementos de reconocimiento.....	8
1.2.2. Soportes y materiales.....	10
1.2.3. Estrategias de inmovilización .....	11
1.2.4. Formatos de ensayo .....	19
1.2.5. Transductores.....	21
1.3. Biosensores ópticos .....	23
1.4. Biosensores ópticos en formato <i>label-free</i> .....	24
1.4.1. Resonancia de plasmón superficial.....	25
1.4.2. Cristales fotónicos .....	26
1.4.3. Espectroscopía de interferencia por reflexión .....	28
1.4.4. Dispositivos comerciales .....	29
1.4.5. Problemáticas.....	31
1.5. Tecnología de disco compacto .....	32
1.5.1. Biosensado con marcaje .....	35
1.5.2. Biosensado sin marcaje .....	39
1.6. Referencias .....	42
2. Objetivos .....	65

---

## Índice

---

3.	Parte experimental y resultados .....	69
	Capítulo 1. Cribado de fármacos inhibidores de la actividad enzimática .....	71
	Capítulo 2. Análisis en dominio de frecuencias en biosensado óptico.....	101
	Capítulo 3. Biosensado interferométrico sin marcaje.....	139
	Capítulo 4. Cristales fotónicos para biosensado <i>label-free</i> .....	173
4.	Discusión general de los resultados .....	219
5.	Conclusiones.....	231

# **1. Introducción**



## 1.1. Dispositivos *point-of-care*

Tradicionalmente, el diagnóstico clínico ha dependido de tecnologías sofisticadas que solo profesionales entrenados eran capaces de utilizar.<sup>1</sup> Investigaciones recientes, aprovechando los avances en miniaturización, nanotecnología, microfluídica, y conectividad,<sup>2</sup> han permitido crear herramientas de diagnóstico *point-of-care* (POC). Estos dispositivos se caracterizan por ser portátiles y fáciles de utilizar, pudiendo ser empleados por cualquier usuario sin necesidad de preparación alguna.

Los dispositivos POC han mejorado la calidad y disponibilidad de la información analítica. Son esenciales para una rápida detección de analitos cerca del paciente, lo que facilita mejores diagnósticos clínicos, su monitorización y su seguimiento.<sup>3</sup> Un ejemplo clásico es el cuidado de la diabetes, ya que mediante estos dispositivos se puede hacer un seguimiento de la cantidad de glucosa en sangre sin necesidad de desplazarse al hospital, pudiendo dispensar la medicación necesaria en cada momento.<sup>4</sup> Otro ejemplo muy conocido son los kits para las pruebas de embarazo o fertilidad.<sup>5</sup> Además de estas, muchas son las aplicaciones que se les ha dado, desde la detección de drogas en saliva u orina, hasta la detección de enfermedades vasculares o el cáncer. La Tabla 1 recopila algunos de los tests tipo *point-of-care* disponibles actualmente en el ámbito sanitario.<sup>6</sup>

Para la clasificación de estos dispositivos no había unas directrices establecidas, y por lo tanto las características de estos variaban dependiendo de quien las definiese. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud estableció un conjunto de criterios sobre las características ideales que deberían cumplir todos los dispositivos para realizar ensayos POC. Como se muestra en la Figura 1, el acrónimo ASSURED<sup>7</sup> resume las características más relevantes: bajo coste, sensibles, específicos, fáciles de usar, rápidos, robustos, no requerir equipos aparatosos y estar disponibles para aquellos que lo necesiten.

---

**Tabla 1.** Ejemplos de tests de diagnóstico *point-of-care* disponibles en la actualidad en el ámbito sanitario.

Enfermedad o especialidad médica	Test de diagnóstico <i>point-of-care</i>
Cardiología	Mioglobina, <sup>8,9</sup> Troponina I y T <sup>8,9</sup>
Endocrinología	Colesterol, <sup>10,11</sup> Proteína C-reactiva, <sup>12</sup> Glucosa, <sup>11,13</sup> Hemoglobina, <sup>14</sup> Lactato <sup>15</sup>
Gastroenterología	Sangre oculta en heces <sup>16</sup>
Genética	Alelo CYP2C 19*2 <sup>17</sup>
Hematología	Dímero D, <sup>9,18</sup> Hemoglobina, <sup>19</sup>
VIH/SIDA	Antígenos y Anticuerpos VIH <sup>20,21</sup>
Cáncer	Antígeno hCFHrp <sup>22</sup>
Enfermedades infecciosas	Sífilis, <sup>23</sup> Hepatitis C, <sup>24,25</sup> Tétano, <sup>26</sup> Tuberculosis <sup>27</sup>
Obstetricia	Test de embarazo <sup>5</sup> y predictivos de ovulación <sup>28</sup>
Abuso de sustancias	Nivel de alcohol <sup>29</sup> y presencia de drogas en sangre <sup>30,31</sup>

**A**ffordable **S**ensitive **S**pecific **U**ser-friendly **R**apid&robust **E**quipment-free **D**elivered

**Figura 1:** Conjunto de características que deben cumplir todos aquellos dispositivos *point-of-care* recogidos en el criterio ASSURED, establecido por la Organización Mundial de la Salud.



En general, los dispositivos POC no son tan precisos como los de un laboratorio clínico centralizado y, por tanto, la calidad de los resultados puede resultar comprometida. Además, muchas pruebas no necesitan un tiempo de respuesta rápido ni necesitan ser realizadas fuera del laboratorio. Estos dispositivos son concebidos para complementar a los laboratorios clínicos, nunca para reemplazarlos. Por lo tanto, las pruebas POC y las centralizadas en el laboratorio clínico siguen enfoques complementarios.

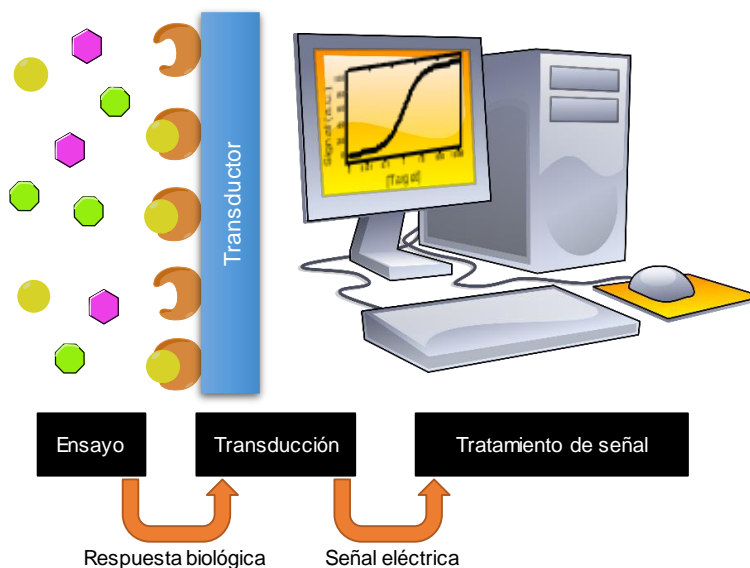
### 1.2. Biosensores

Los biosensores, por definición, son dispositivos que combinan un elemento biológico (enzima, anticuerpo, tejido, orgánulo, ácido nucleico o célula completa) y una plataforma adecuada para la detección de uno o varios analitos, o un efecto biológico.<sup>32</sup> Muchos ellos, se incluyen en la categoría de sistemas *point-of-care* o *point-of-need*.

El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción entre el compuesto o microorganismo de interés (analito) y el elemento de reconocimiento (sonda). Como resultado de esta unión se produce la variación de una o varias propiedades físico-químicas (pH, transferencia de electrones, de temperatura, de masa, cambio de potencial, variación de las propiedades ópticas, etc.) que mide el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal electrónica indicativa de la presencia del analito en estudio o proporcional a su concentración en la muestra.<sup>33,34</sup> En definitiva, un biosensor integra tres componentes básicos conectados en serie: un sistema de reconocimiento biológico, un transductor y un sistema de detección (Figura 2).

El primer biosensor del que se tiene constancia en la historia es el desarrollado por Clark y Lyons en 1962.<sup>35</sup> En 1956 Clark desarrolló un electrodo de O<sub>2</sub> y lo combinó con la enzima glucosa oxidasa permitiendo relacionar directamente la

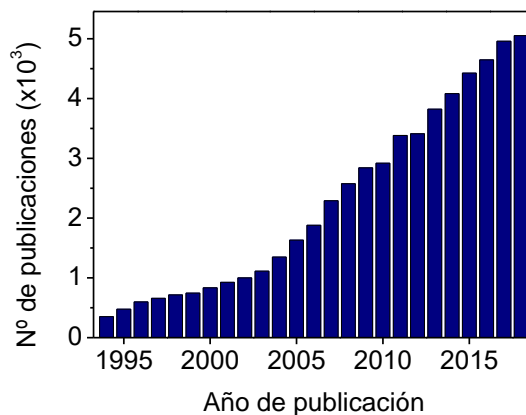
disminución de la concentración de oxígeno con la concentración de glucosa. En el terreno comercial, no se haría presente hasta 1975, año en el que la empresa *Yellow Springs Instrument Company* lo comercializó exitosamente como el primer analizador de glucosa en sangre.<sup>36</sup>



**Figura 2:** Representación esquemática de un biosensor.

En la actualidad hay un gran interés en el desarrollo de biosensores que se traduce en un incremento constante del número de publicaciones relacionadas con estos. De hecho, como puede apreciarse en la Figura 3, en los últimos 25 años ha habido un incremento constante en publicaciones que contienen el concepto “*Biosensor*” alcanzando más de 5000 publicaciones en 2018. También es muy significativo el reciente estudio de mercado realizado por “*MarketsandMarkets*”, una firma global de investigación y consultoría de mercado,<sup>37</sup> en el que tomando como año base 2016, evalúa el mercado de los biosensores en unos 13.600 millones de euros y pronostica un incremento constante hasta los 23.100 millones de euros en el año 2022. Este incremento lo atribuyen a los continuos avances tecnológicos incorporados en el

campo de los biosensores y, entre otros, al aumento de la población mundial con diabetes pronosticado para los próximos años que, según la Federación Internacional de la Diabetes, pasará de 415 millones en 2015 a 642 millones en 2040.



**Figura 3:** Número de publicaciones por año relacionadas con el concepto “Biosensor” encontrados en la base de datos *Web of Science*, en los últimos 25 años.

En el campo de la medicina, los biosensores de diagnóstico son los más exitosos y variados. El 50% del total de los comercializados en el mundo son empleados para determinar los niveles de glucosa en sangre, mientras que el 50% restante se emplea principalmente en el control de colesterol, detección de malaria, VIH, ácido úrico, biomarcadores cardiacos y cáncer.

Otro motivo por el que los biosensores están en auge actualmente es el aumento de su uso para aplicaciones no médicas, como por ejemplo en industria alimentaria, monitoreo ambiental o defensa.<sup>38-42</sup> En todos ellos el requisito básico es que tiene que poder utilizarse allá donde se requiera, es decir, ha de ser portátil, entre otras muchas prestaciones exigidas. Todo ello se traduce en un amplio abanico de biosensores disponibles en el mercado.<sup>43</sup>

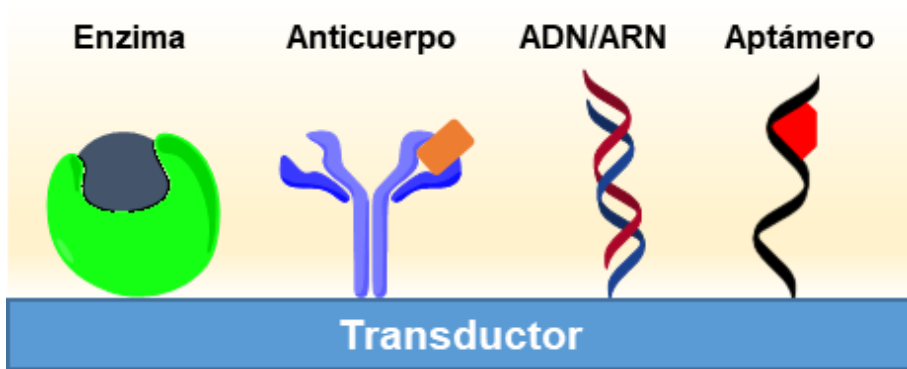
### 1.2.1. Elementos de reconocimiento

Los biosensores tienen dos principios fundamentales de funcionamiento: el reconocimiento y el sensado. El reconocimiento es llevado a cabo mediante elementos biológicos que utilizan mecanismos bioquímicos. Estos elementos de bioreconocimiento son clave para la selectividad final del biosensor y pueden ser clasificados según su naturaleza en cuatro grandes grupos (Figura 4): enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, que se dividen a su vez en ADN/ARN, y aptámeros.<sup>44</sup> Estos elementos de reconocimiento son también conocidos como bioreceptores o sondas, ya que habitualmente se encuentran anclados junto con el transductor y actúan como receptores selectivos del analito de interés.

Los bioreceptores más empleados en el desarrollo de biosensores son las enzimas. Estas, a excepción de un pequeño grupo de moléculas ácido ribonucleicas, son de naturaleza proteica. Ellas catalizan reacciones químicas energéticamente favorables, incrementando su velocidad.<sup>45,46</sup> La principal ventaja de estos bioreceptores es su elevada sensibilidad y selectividad hacia las moléculas objetivo gracias a su capacidad de unión específica y actividad catalítica. Sin embargo, también presentan desventajas que limitan su uso *in vitro*, como falta de estabilidad química y térmica. Por ello, una exposición a ciertas condiciones, como elevadas temperaturas o disolventes orgánicos, pueden provocar su desnaturalización y la consiguiente pérdida de actividad.

Otro grupo de bioreceptores muy empleado en el desarrollo de biosensores son los anticuerpos, generalmente inmunoglobulinas tipo G (IgG). Los anticuerpos son proteínas cuya masa molecular del monómero es de 150 kDa, aproximadamente. La mayoría de IgGs están compuestas por dos cadenas pesadas y largas (aproximadamente 450-600 aminoácidos) y dos cadenas ligeras y cortas (aproximadamente 220 aminoácidos) que ensambladas mediante puentes disulfuro toman forma de Y. Son producidas por la respuesta inmunológica a agentes

externos, también conocidos como antígenos. Los anticuerpos se unen al antígeno objetivo con una alta afinidad. Esta característica proporciona una elevadísima selectividad y sensibilidad a los ensayos que utilizan anticuerpos como bioreceptores.<sup>47-49</sup>



**Figura 4:** Tipos de bioreceptores más comunes usados para el desarrollo de biosensores.

Los anticuerpos empleados en el desarrollo de inmunosensores pueden ser policlonales o monoclonales. Los anticuerpos policlonales son menos selectivos que los monoclonales, ya que reconocen diferentes epítomos en sus antígenos, por lo que la reactividad cruzada es un problema a tener en cuenta. Por otro lado, los anticuerpos monoclonales son idénticos unos a otros y se unen al mismo epítomo de su antígeno específico, haciéndolos altamente selectivos.<sup>44</sup>

Menos empleados, pero no por ello menos interesantes, son los ácidos nucleicos. Los bioreceptores basados en ácidos nucleicos se pueden dividir en dos grupos: ADN y ARN principalmente, y otras moléculas derivadas de estos como aptámeros. El ADN es una molécula bicatenaria formada al entrelazarse dos cadenas de nucleótidos (Figura 4). Estas dos cadenas, si son homologas, muestran una elevadísima afinidad entre ellas, por lo que la unión entre ambas tiene una alta

selectividad. Esta es la razón de que pueden emplearse como elementos de reconocimiento biológico.<sup>50,51</sup>

Por otro lado, están los aptámeros, ligandos artificiales de una cadena de ácidos nucleicos sin fosfatos, que forman estructuras tridimensionales y puede unirse selectivamente a una amplia gama de moléculas diana. Los aptámeros muestran capacidad de reconocimiento y afinidad comparable a los anticuerpos, y ofrecen algunas ventajas sobre estos tales como mayor estabilidad química y térmica, facilidad de síntesis, y tiempo y coste de producción inferior. Además, su tamaño (30-100 nucleótidos) y facilidad de funcionalización y marcaje en comparación con otras moléculas como anticuerpos y enzimas, permite su inmovilización eficiente con una elevada densidad.<sup>44,52,53</sup>

### **1.2.2. Soportes y materiales**

La elección del material para la fabricación del soporte donde desarrollar los ensayos analíticos se debe realizar teniendo en cuenta el tipo de biosensor que se pretende desarrollar. Estos materiales tienen que permitir inmovilizar los bioreceptores con la estrategia de inmovilización deseada. Además, deben otorgar propiedades que permitan el sensado en el dispositivo final. Para conseguir estas propiedades, en ocasiones, los materiales tienen que funcionalizarse dotándolos de grupos reactivos adecuados y nanoestructurarse mediante técnicas de fabricación *ad hoc*.

Entre los materiales más utilizados en el desarrollo de los soportes se encuentran diferentes familias de polímeros sintéticos (policarbonato, poliéster, polietileno, polímero de olefina cíclica, etc.), materiales inorgánicos (silicio, óxido de silicio, óxido de titanio, sulfuro de zinc, etc.), compuestos de carbono (principalmente grafito y grafeno, aunque también diamante) y metales (oro, plata, cobre, platino, etc. con sus combinaciones y aleaciones), entre otros.<sup>54,55</sup>

Los materiales escogidos para el desarrollo de biosensores electroquímicos son generalmente materiales conductores con una ventana potencial relativamente amplia, mientras que para el desarrollo de dispositivos resonadores se utilizan aquellos con propiedades piezoeléctricas. El desarrollo de soportes para biosensores ópticos suele utilizar materiales con unas propiedades ópticas determinadas como, por ejemplo, elevados o bajos índices de refracción, transparencia, o que generen una onda evanescente. También se utilizan soportes con propiedades mecánicas y, en otros casos, materiales estructurables de modo que se les dote de propiedades adicionales debidas a resonadores, redes, interferómetros, etc.

### **1.2.3. Estrategias de inmovilización**

En las secciones anteriores, se vieron los materiales con los que se fabrican los soportes y los tipos de bioreceptores que se utilizan habitualmente en el desarrollo de biosensores. Ellos tienen la función de interactuar selectivamente con el analito de interés de modo que se genere una señal en el transductor. Para ello, el bioreceptor tiene que encontrarse en las proximidades del transductor.

La inmovilización de los bioreceptores es una etapa determinante en el diseño del biosensor. El bioreceptor puede ser inmovilizado de múltiples modos, en función del material del transductor, el tipo de bioreceptor y de sus grupos funcionales, y de la finalidad del biosensor.<sup>56</sup> Cada método de inmovilización presenta ventajas y desventajas, y la elección del más apropiado se realizará en función de la sensibilidad, la estabilidad, la reproducibilidad, el coste o la dificultad del proceso deseado.<sup>57</sup>

Dependiendo del formato de ensayo, los métodos de inmovilización de bioreceptores más empleados en el desarrollo de biosensores son: adsorción pasiva, inmovilización covalente, atrapamiento, y por afinidad. En la Tabla 2 se resumen las principales características de los diferentes métodos de inmovilización.<sup>58</sup>

**Tabla 2.** Métodos de inmovilización de bioreceptores.

Método inmovilización	Interacción	Ventajas	Desventajas
Adsorción pasiva	Reversible	Simple Rápido Bajo coste	Orientación aleatoria Desorción
Covalente	Irreversible	Estabilidad Fuerza de unión Orientación	Desnaturalización del bioreceptor Coste
Atrapamiento	Irreversible	Estabilidad Elevada densidad Similar a in-vivo	Limitado por la transferencia de materia
Afinidad	Reversible	Buena orientación Alta especificidad Alta selectividad Alta funcionalidad	Poca versatilidad Coste del reactivo genérico

La **adsorción pasiva** sobre los soportes del bioreceptor representa el método más sencillo de inmovilización física, especialmente en plásticos. Para ello, el bioreceptor es disuelto en un medio adecuado, generalmente un tampón, y puesto en contacto con el soporte solido durante un tiempo y condiciones determinadas. El bioreceptor no adsorbido se elimina mediante un lavado con tampón. El mecanismo de adsorción se basa en enlaces débiles tipo fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas.<sup>59</sup> Esta técnica no incluye ninguna funcionalización del soporte y generalmente no afecta a la actividad del bioreceptor. Sin embargo, debido a que la unión entre bioreceptor y soporte no es



muy fuerte, cambios de temperatura, pH y fuerza iónica pueden producir la desorción de la biomolécula.

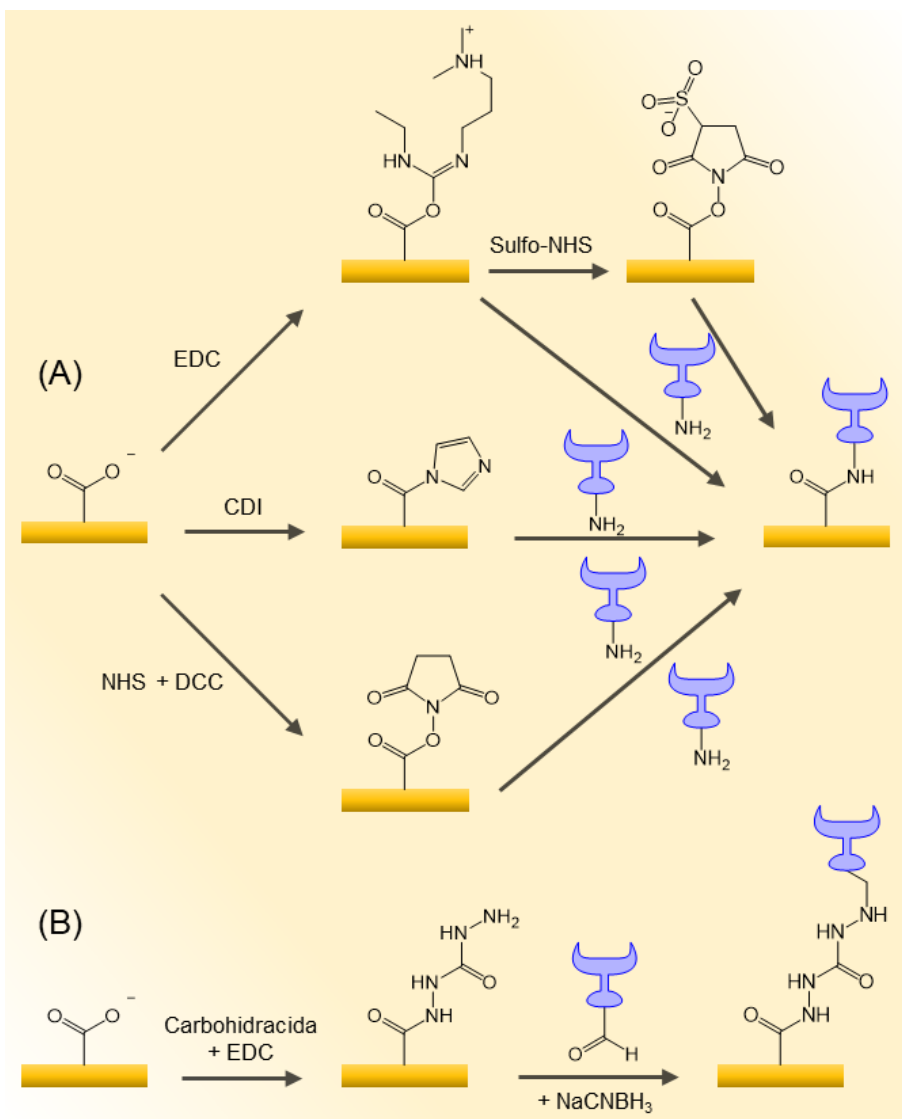
En el caso de proteínas, las interacciones tienen lugar entre aminoácidos, aromáticos o no polares, y la superficie del soporte. Normalmente, estos aminoácidos se encuentran mayoritariamente en el núcleo de la proteína, por lo que la interacción involucra cambios conformacionales significativos en la estructura de la misma. Estos cambios conformacionales pueden traducirse en una desnaturalización completa de la primera capa adsorbida sobre el sustrato.<sup>60</sup> Las siguientes moléculas de proteínas que se unen o añaden a esta capa inicial son adsorbidas mediante uniones proteína-proteína ordenados o por agregación al azar. Estas últimas sí que mantienen una conformación más próxima a la nativa y, por tanto, su actividad. Sin embargo, un exceso de proteína puede generar una estructura inestable que lixivie parte de la proteína adsorbida. Controlando las condiciones del ensayo, adaptándolas a cada soporte y sonda, se obtiene una capa de biomoléculas adsorbida, estable y bien dispuesta.

La **inmovilización covalente** de bioreceptores sobre los transductores es uno de los métodos más empleados para el desarrollo de biosensores. En esta aproximación, los bioreceptores se unen a la superficie a través de grupos funcionales que no son esenciales para su función.<sup>61</sup> Para ello, generalmente, la superficie tiene que activarse y funcionalizarse, previamente al acoplamiento del bioreceptor.

En la elección de la estrategia de inmovilización covalente más apropiada hay que tener en consideración varios criterios. El método utilizado para activar la superficie y unir la sonda debe ser compatible con ambos. Se debe tener en cuenta el medio de reacción, ya que, en ocasiones, se requiere el uso de disolventes orgánicos que pueden dañar el material del soporte o la funcionalidad de la sonda. También se debe considerar la propia naturaleza de los reactivos, la velocidad y rendimiento de reacción, su reproducibilidad y su escalabilidad. Por ello, se han

## Introducción

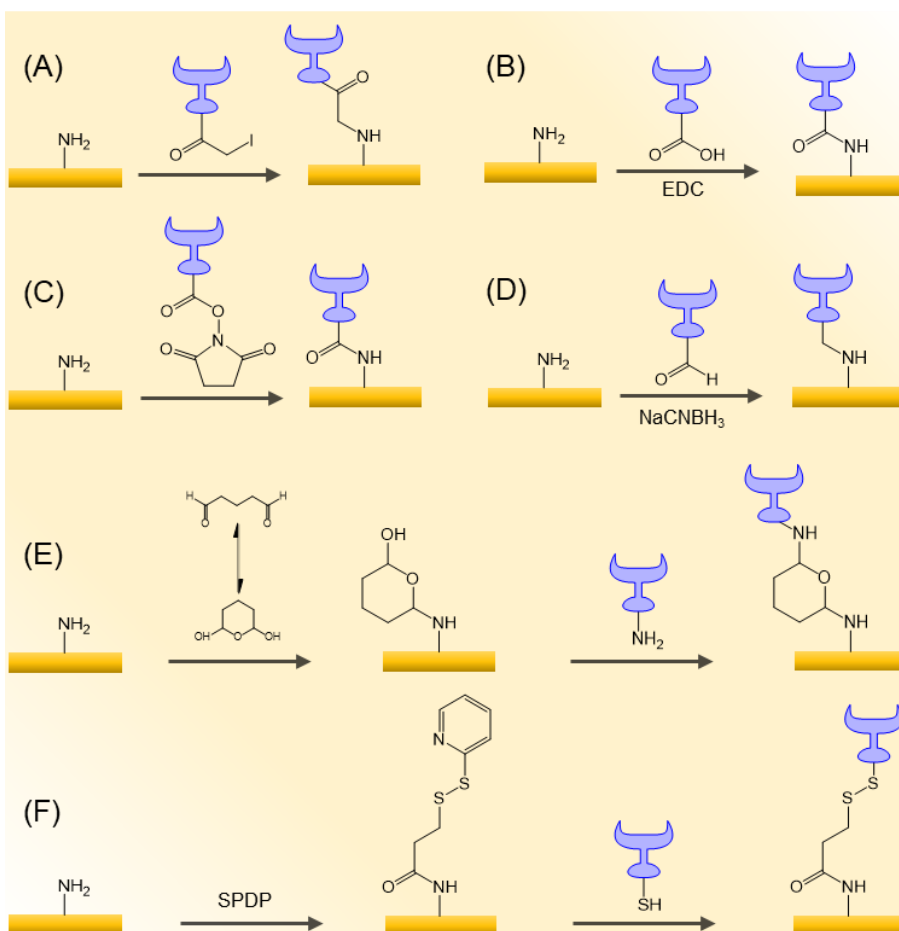
descrito muchos protocolos de trabajo adaptados al tipo de soporte, naturaleza del bioreceptor y de la muestra, así como el formato de ensayo y tipo de detector utilizado.<sup>62,63</sup>



**Figura 5.** Estrategias de inmovilización covalente sobre soportes con carboxilatos de sondas (A) con aminas y (B) carbonilos libres.

Uno de los grupos funcionales más comunes en los soportes descritos es el formado por los carboxilatos, ya que estos pueden ser activados por varias estrategias que generan intermedios de reacción capaces de reaccionar con los nucleófilos presentes en las biomoléculas (Figura 5). La mayoría de estas estrategias utilizan las aminas libres que se unen al soporte a través de la formación de enlaces amida (Figura 5 (A)). No obstante, también se pueden inmovilizar covalentemente sondas que contengan carbonilos libres sobre soportes con carboxilatos mediante la formación de hidracidas (Figura 5 (B)).

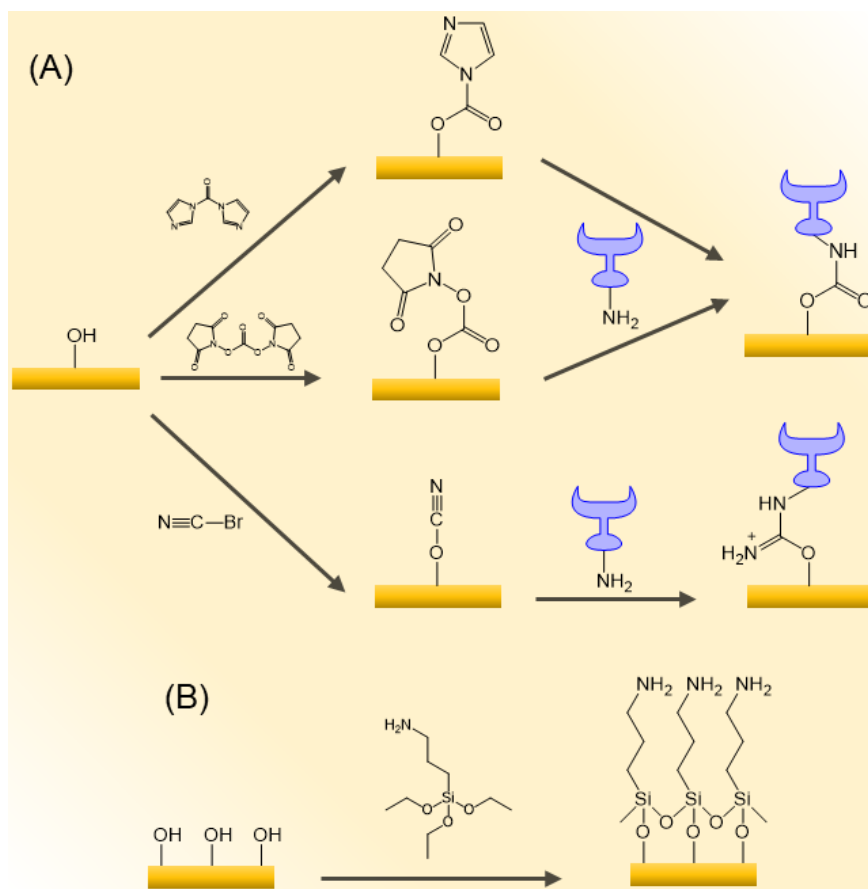
Otro grupo funcional habitualmente empleado en los soportes para la inmovilización covalente de biomoléculas son las aminas (Figura 6), especialmente las aminas primarias. Las estrategias utilizadas para estos grupos funcionales son las mediadas por carboimidias que, a diferencia de lo visto en el caso de los carboxilatos, la activación del carboxilato se produce en la biomolécula y no en el soporte (Figura 6 (A-D)). En ocasiones esto puede generar problemas añadidos, ya que no se podrá emplear EDC en una única etapa cuando las biomoléculas contengan aminas además de los carboxilatos a activar, debido a posibles reacciones consigo mismas. Otras alternativas a estas estrategias son las basadas en el empleo de reactivos bifuncionales para unir el soporte y la biomolécula (Figura 6 (E)) o de sulfosuccinimidil 6-[3'(2-piridilditio)-propionamido] hexanoato (SPDP) para inmovilizar sondas tioladas (Figura 6 (F)).



**Figura 6.** Estrategias de inmovilización covalente sobre soportes aminados para sondas con (A) yodoacetilos, (B) carboxilatos, (C) ésteres activos, (D) aldehídos, (E) aminas, y F) tioles libres.

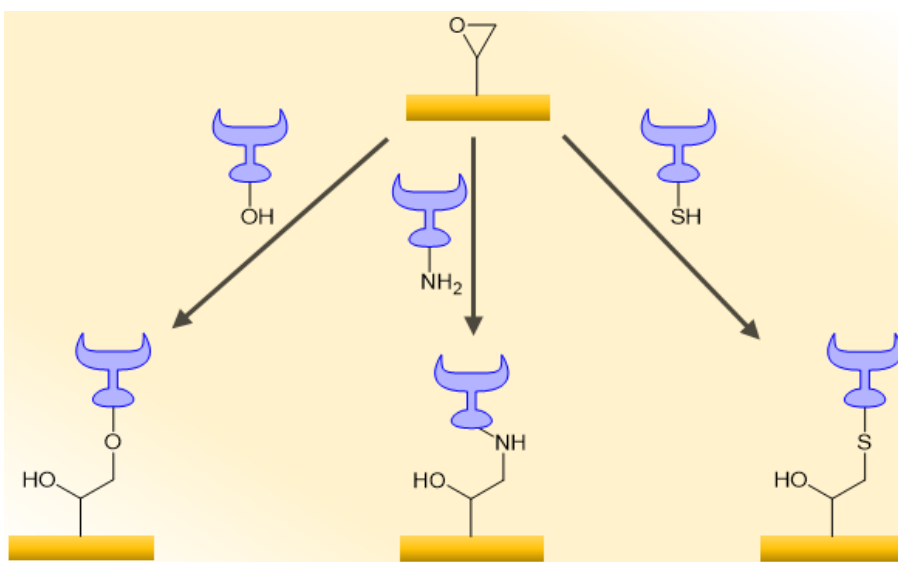
Los hidroxilos son grupos funcionales que se encuentra en multitud de sustratos de ensayo. Aunque no reaccionan espontáneamente con los grupos funcionales de las sondas, los hidroxilos pueden activarse mediante diferentes mecanismos de reacción para la inmovilización covalente para la inmovilización de bioreceptores con aminas libres (Figura 7 (A)).

En otras ocasiones se puede optar por introducir grupos amino libres en los sustratos (Figura 7(B)). En este caso se utiliza (3-aminopropil)trietoxisilano (APTES) para la inmovilización en sustratos que presentan silanoles o hidroxilos, dejando libre el extremo donde se encuentra la amina. Así, de un modo sencillo, queda el sustrato funcionalizado con grupos amino libres que pueden enlazarse al receptor covalentemente mediante las diferentes estrategias vistas anteriormente.



**Figura 7.** (A) Estrategias de inmovilización covalente sobre soportes con hidroxilos para sondas con grupos amino libres. (B) Estrategia para generar un soporte modificado con aminas libres a partir de un soporte con grupos hidroxilo,

Uno de los grupos funcionales más polivalentes en un soporte es el formado por epóxidos. Estos pueden ser introducidos en el material mediante reacciones químicas entre alquenos y peroxiácidos o halohidrinás, y mediante recubrimientos con polímeros que contienen epóxidos en su estructura, como el SU-8.<sup>64,65</sup> Estos pueden ser utilizados para inmovilizar covalentemente tanto sondas que contengan aminas, como aquellas que contengan hidroxilos o tioles libres a través de la apertura del anillo bajo condiciones alcalinas (Figura 8). Sondas con tioles libres son inmovilizadas covalentemente a pH entre 7.5 y 8.5, mientras que aquellas con aminas libres necesitan un pH entre 9 y 11. Si la sonda contiene hidroxilos se necesitarán condiciones muy alcalinas, con pH superior a 11.



**Figura 8.** Estrategias de inmovilización covalente sobre soportes con epóxidos para sondas con hidroxilos, aminas, y tioles libres.

Cuando se utilizan proteínas como receptores, estos grupos funcionales están presentes en su estructura. Los grupos aminos libres se encuentran en las lisinas y los ácidos carboxílicos en los ácidos glutámicos y aspárticos, mientras que los tioles

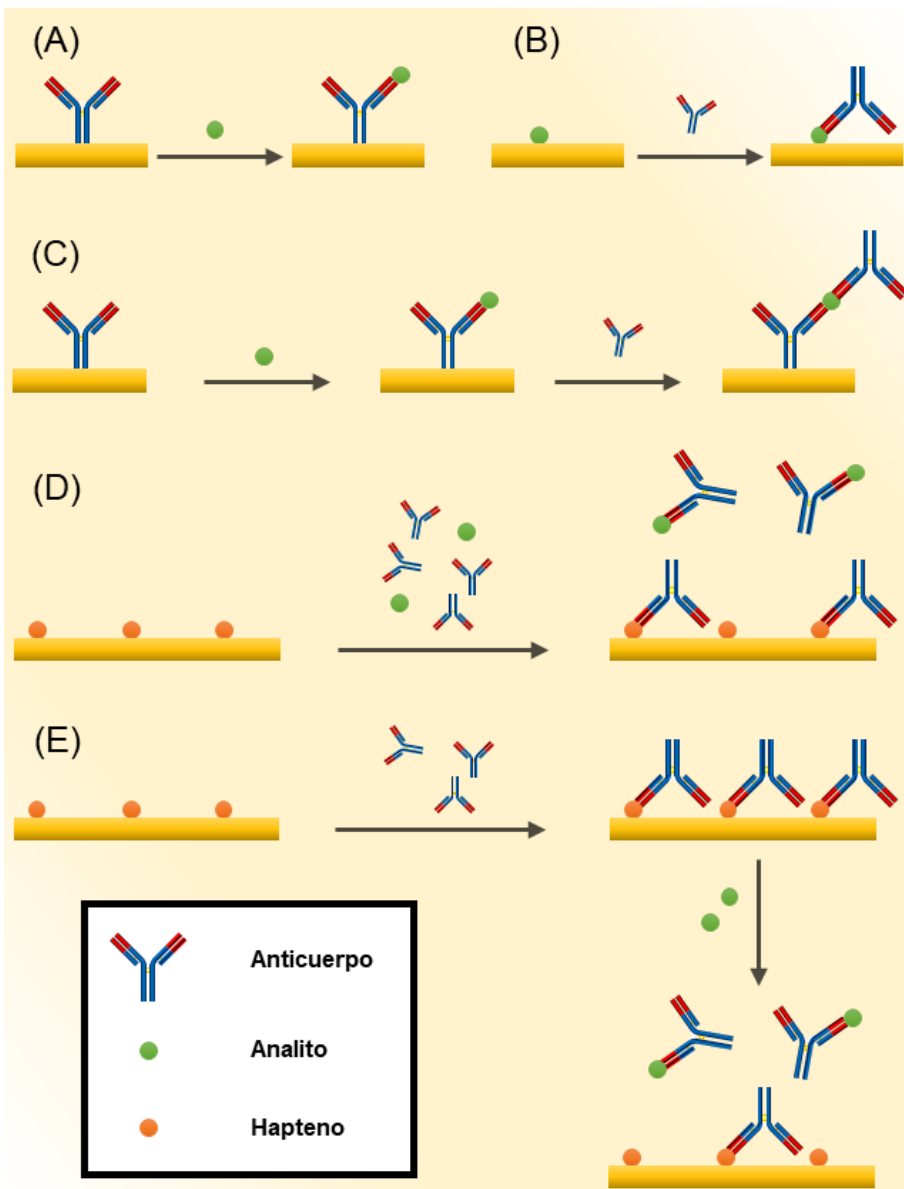
están presentes en las cisteínas. Siempre y cuando estos residuos estén disponibles podrán utilizarse para la inmovilización covalente.

El método de **atrapamiento** está basado en la oclusión de las biomoléculas en un material polimérico que permita el paso a las disoluciones de reactivos y muestras.<sup>66</sup> Para ello existen diferentes protocolos como los que utilizan geles y fibras. A nivel práctico, este método está generalmente limitado por la transferencia de masa a través de las membranas o geles que constituyen los soportes.<sup>59</sup>

La inmovilización por **afinidad** aprovecha la fuerte interacción específica entre ciertas biomoléculas complementarias tales como biotina-avidina (o streptavidina), Proteína A o G – anticuerpo, lectina-azúcar, y otras sustancias.<sup>67</sup> En este tipo de inmovilizaciones, uno de los elementos tiene que ser anclado sobre la superficie del transductor para, a su vez, anclar el complementario, el cual está presente en el bioreceptor o se ha introducido previamente.<sup>56</sup> Esta estrategia permite la inmovilización orientada del bioreceptor de un modo reversible, ya que variando las condiciones del medio se puede romper el enlace entre las biomoléculas complementarias, permitiendo la reutilización del material.

### 1.2.4. Formatos de ensayo

Otro aspecto a tener en cuenta en el desarrollo de un biosensor es el formato de ensayo. Como es natural, hay diferentes formatos de ensayo en función del bioreceptor. En el caso de los biosensores enzimáticos se pueden distinguir dos tipos de ensayo: un primer grupo en el que la enzima detecta la presencia de un sustrato o cofactor, como por ejemplo en el biosensor para glucosa; y un segundo grupo basado en la detección de inhibidores en presencia de un sustrato, entre los que destacan aquellos destinados a la detección de compuestos organofosforados usados como pesticidas, entre otros muchos ejemplos.<sup>52,68</sup>



**Figura 9:** Esquema de los formatos de ensayo *label-free* utilizando anticuerpos. Ensayo directo (A y B), sándwich (C), competitivo (D) y de desplazamiento (E).



Los formatos de trabajo utilizados en el caso de inmunosensores son ensayos directos, indirectos, sándwich, competitivos o de desplazamiento.<sup>69</sup> El formato más simple es el directo, que consiste en la inmovilización del receptor sobre el transductor y la detección de la unión del antígeno directamente (Figura 9 (A y B)).<sup>70</sup> En el ensayo indirecto y sándwich (Figura 9 (C)) se detecta la presencia de un segundo anticuerpo.<sup>71-73</sup> En los ensayos competitivos y de desplazamiento (Figura 9 (D y E)) el analito compite con una molécula muy semejante por los sitios de unión del receptor.<sup>74-76</sup>

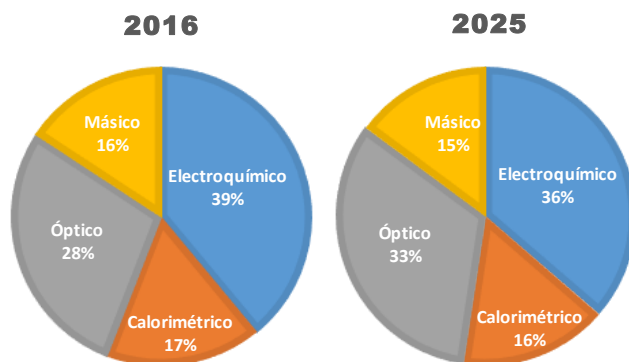
Siempre que el sistema de transducción y detección lo permita, estos formatos pueden generar una señal directamente relacionada con la interacción sonda-diana. Si, por el contrario, deben utilizarse marcadores para generar la señal, se requiere que uno de los reactivos esté marcado o realizar una etapa extra con un reactivo marcado (trazador) indirectamente relacionado con la biointeracción.

En el caso de los ácidos nucleicos, hay que hacer una distinción entre ADN y aptámeros. El formato de ensayo con ADN se basa en la hibridación entre hebras complementarias.<sup>77</sup> Entre sus múltiples aplicaciones, puede utilizarse para detectar y cuantificar la hebra complementaria o genes mutantes mediante el genotipado de polimorfismos de uno o varios nucleótidos. En el caso de los aptámeros, los formatos de ensayo son análogos a los descritos anteriormente utilizando anticuerpos.<sup>78</sup>

### **1.2.5. Transductores**

Cuando se realiza un ensayo y el analito diana se une al bioreceptor, se produce un cambio físico-químico que es medido y convertido por el transductor en una señal detectable proporcional a la concentración de analito. Existen transductores cuya naturaleza permite clasificar a los biosensores en cuatro grandes grupos: electroquímicos, ópticos, calorimétricos o entalpimétricos, y másicos.<sup>34,44</sup>

Los biosensores electroquímicos son los más extendidos debido a su bajo coste, portabilidad y buenas prestaciones analíticas.<sup>79</sup> Los transductores electroquímicos más empleados son los amperométricos, voltamétricos, potenciométricos y de espectroscopia de impedancia.<sup>80</sup> Por otro lado, los transductores másicos engloban los piezoeléctrico y el AFM, entre otros. Los cristales piezoeléctricos correlacionan el cambio en la frecuencia de oscilación con los cambios de masa producidos por las biointeracciones.<sup>81–83</sup> En comparación, los biosensores calorimétricos o entalpimétricos utilizan termistores que son capaces de registrar los cambios de entalpía que conllevan la mayoría de las reacciones bioquímicas.<sup>84</sup> Sin embargo, son poco utilizados ya que los otros detectores son más versátiles y pueden utilizarse con muchas más aplicaciones.



**Figura 10:** Estudio de mercado de los biosensores según el tipo de transductor realizado por “Credence Research” tomando como año base el año 2016 y pronosticando la evolución hasta el año 2025.

Los biosensores ópticos son los más extendidos tras los electroquímicos, sin embargo, están ganando demanda en el mercado actual y, según un estudio elaborado por “Credence Research”, una firma mundial de investigación y asesoramiento de mercado, se espera que tengan un crecimiento constante en el periodo de previsión hasta el 2025 (Figura 10).<sup>85</sup> En el mismo estudio apuntan a la

mínima invasión necesaria en los sensores ópticos, interfiriendo menos con el bioprocesamiento y proporcionando una optimización más rápida de la muestra.

Los biosensores ópticos presentan gran facilidad de uso, elevada rapidez de respuesta, portabilidad, sensibilidad, robustez, capacidad de detectar múltiples analitos y, especialmente, presentan menos interferencias que los electroquímicos.<sup>86</sup> Estos dispositivos aprovechan las múltiples propiedades de la luz como la transmisión, reflexión, dispersión, fluorescencia, intensidad, fase, polarización, interferometría, resonancia de plasmones, etc. En el siguiente apartado se presentan los tipos de biosensores ópticos que existen en la actualidad, haciendo especial hincapié en los que no usan marcadores.

### 1.3. Biosensores ópticos

Los biosensores en general, y los ópticos en particular, se pueden clasificar en dos categorías generales: aquellos que necesitan un marcador que genere o amplifique la señal y aquellos que por sí mismos generan una señal cuantificable, conocidos como *label-free*.<sup>39</sup>

Entre los biosensores ópticos, los más extendidos son aquellos que emplean fluoróforos para el desarrollo de una señal medible. Se pueden utilizar con diferentes esquemas, siendo los más empleados los que miden la intensidad de emisión y el tiempo de decaimiento.<sup>87</sup> La variedad de fluoróforos empleados para marcar y generar una señal relacionada con la concentración de analito es muy amplia.<sup>88</sup>

Otra de las especies muy utilizadas como marcadores son las enzimas. Estas se unen a uno de los elementos responsables de la biointeracción y generan un producto enzimático responsable de la señal analítica. Al presentar las enzimas una actividad catalítica se consigue que pequeñas concentraciones de analito sean capaces de

generar suficiente señal para ser cuantificable, mejorando ampliamente los límites de detección.

Menos empleadas, pero no por ello menos importantes, es la utilización de nanopartículas. Las nanopartículas de oro son las más utilizadas como marcadores, especialmente de anticuerpos secundarios y menos en oligonucleótidos. Son empleadas en biosensores ópticos directamente, como se ha demostrado en nuestro grupo en un estudio de selección de tamaño y concentración de nanopartículas.<sup>89</sup> En otros casos, se utiliza una disolución de sal de plata como revelador generando un precipitado de plata metálica que aumenta la sensibilidad significativamente.<sup>90,91</sup>

Las nanopartículas metálicas, especialmente las de oro y plata, también dan muy buenos resultados cuando se recurre a SERS para la detección del ensayo analítico. En estos casos, las nanopartículas, generalmente, se encuentran en suspensión y se aproximan unas a otras por el reconocimiento molecular, y cuando son irradiados por un láser determinado, éste es dispersado inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado.<sup>92</sup> Este hecho genera un espectro Raman característico de cada compuesto, como si de su huella dactilar se tratase.

### **1.4. Biosensores ópticos en formato *label-free***

El uso de marcadores ha permitido, durante muchos años, el desarrollo de biosensores capaces de cubrir las necesidades analíticas del momento. Sin embargo, el proceso presenta varias desventajas relacionadas con el mecanismo de reconocimiento, ya que los marcadores pueden unirse en los sitios específicos del bioreceptor, afectando a la capacidad de unión y reconocimiento.<sup>39,93-96</sup> Por otro lado, el número de marcadores unido a cada biomolécula (relación de marcaje) puede no ser controlado con precisión, por lo que en ocasiones, puede presentar una

---

dificultad añadida en los ensayos cuantitativos.<sup>97</sup> Además, el formato con marcaje suele ser más largo al incorporar una o dos etapas a los ensayos y se encarece al utilizar más reactivos.

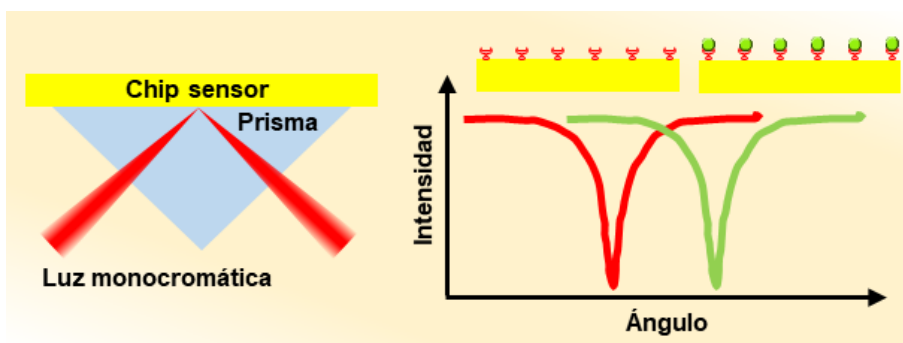
Los avances en nanofabricación han permitido el desarrollo de tecnologías y estructuras que son capaces de detectar biointeracciones por sí mismas, sin la necesidad de usar marcadores. Estructuras de orden nanométrico como anillos resonantes, multicapas, *gratings*, pilares, etc., presentan propiedades muy interesantes para el sensado sin marcaje; ya que son sensibles a las variaciones producidas por las biointeracciones. Así, ha surgido en los últimos años un amplio abanico de biosensores ópticos *label-free* que presentan características muy interesantes.

A modo de resumen, se han desarrollado biosensores basados en resonancia de plasmón superficial (SPR),<sup>98-101</sup> espejos resonantes (RM),<sup>102</sup> anillos resonantes (RR, *ring resonator*),<sup>103,104</sup> cristales fotónicos (PC),<sup>105-107</sup> interferometría de polarización dual (DPI),<sup>108</sup> espectroscopía de interferencia por reflexión (RIFS),<sup>109,110</sup> biosensores basados en difracción (DBS),<sup>111</sup> interferometría por retrodispersión (BSI),<sup>112</sup> interferometría de biocapa (BLI),<sup>113,114</sup> espectroscopía Raman mejorada en superficie (SERS),<sup>115,116</sup> etc. A continuación, se presentan aquellos que tienen especial importancia para el desarrollo de esta tesis, ya sea por ser los de referencia en la actualidad o por el principio físico utilizado.

### **1.4.1. Resonancia de plasmón superficial (SPR)**

El biosensor óptico *label-free* referente en la actualidad es el SPR. Los plasmones superficiales son conocidos desde 1957 y consisten en oscilaciones coherentes de electrones que ocurren en la interfase entre dos materiales, normalmente un metal y un dieléctrico.<sup>117</sup> Cuando un haz de luz incide sobre la superficie del substrato, por ejemplo oro, a un ángulo determinado (llamado

habitualmente crítico), una proporción de la luz viaja entre los dos materiales bajo una reflexión total interna e interactúa con los plasmones superficiales (Figura 11). A su vez, genera una onda evanescente que viaja por toda la superficie y decae exponencialmente al alejarse de esta.<sup>118</sup> La clave es que la onda evanescente es muy sensible a cambios en el índice de refracción (RI), por lo que interacciones moleculares que ocurran en las proximidades de la superficie del biosensor pueden ser detectadas.<sup>119</sup> Esta técnica se ha empleado en multitud de casos que van desde el descubrimiento de fármacos hasta el estudio de enfermedades como la malaria o el cáncer.<sup>120-123</sup> Todo ello con una elevada sensibilidad, alcanzando límites de detección del orden de pM.



**Figura 11:** Esquema de un biosensor basado en SPR y su respuesta.

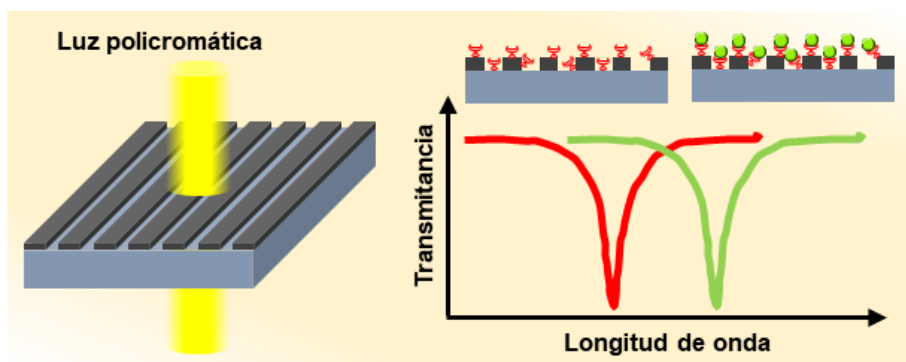
### 1.4.2. Cristales fotónicos (PC)

Los PC son estructuras periódicas de materiales transparentes de alto índice de refracción, en una, dos o tres dimensiones.<sup>124</sup> Cuando estas estructuras son iluminadas por un haz de luz, ciertas longitudes de onda se difractan, generándose varios haces de transmisión (distintos órdenes de difracción), mientras que el resto de longitudes de onda son transmitidas casi en su totalidad.<sup>125</sup> Cuando el ángulo de uno de estos haces difractados coincide con el ángulo de un modo guiado se produce

el fenómeno físico de resonancia de modo guiado (GMR) y se acoplan a lo largo del material en el modo guiado.

Sin embargo, estos modos guiados son también conocidos como “modos con fugas” (*leaky modes*), ya que los fotones no permanecen guiados hasta el infinito. Estos fotones “fugados” de la guía de ondas interactúan con los incidentes produciendo una interferometría constructiva con los reflejados y destructiva con los transmitidos.<sup>125,126</sup> Así, en el espectro de reflexión se aprecia un pico de intensidad y un valle en el espectro de transmisión. La longitud de onda que cumple la condición GMR depende de las dimensiones y material de la estructura, además del índice de refracción que está en contacto con la superficie del cristal fotónico, debido a la presencia del campo evanescente del modo guiado (Figura 12).

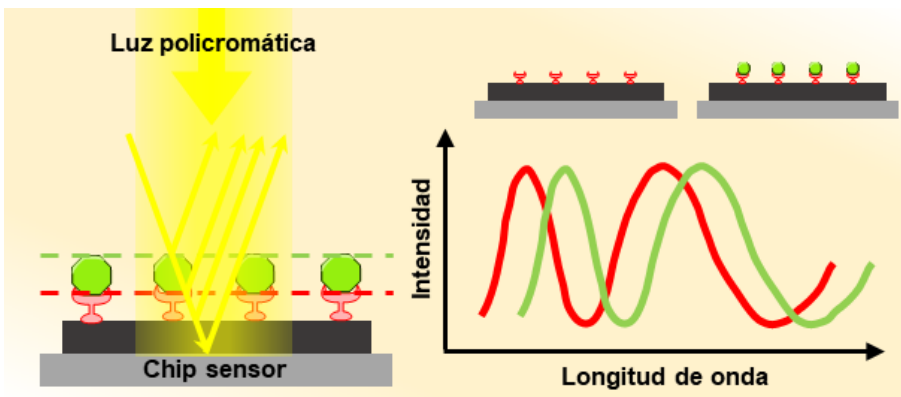
Este hecho puede emplearse para el seguimiento, monitorización y biosensado de las interacciones moleculares, las cuales, por su naturaleza, provocan una variación en el índice de refracción sobre la superficie. Este seguimiento se puede realizar con dos estrategias distintas: haciendo un seguimiento del desplazamiento de la longitud de onda del GMR o monitorizando la variación de intensidad a una longitud de onda determinada debida al desplazamiento del GMR.



**Figura 12:** Esquema de un biosensor basado en un cristal fotónico 1D y su respuesta.

### 1.4.3. Espectroscopía de interferencia por reflexión (RIfS)

La espectroscopía de interferencia por reflexión o RIfS, es una técnica descubierta en 1991 por Gauglitz que consiste en la medida de la interferencia de la luz blanca cuando esta es reflejada.<sup>127</sup> Para ello, se hace incidir luz blanca perpendicularmente sobre un sustrato de varias capas nanométricas, habitualmente de SiO<sub>2</sub> (RI bajo) y de Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (RI alto). Los haces se dividen en dos, uno se refleja y otro se transmite hasta la siguiente capa donde vuelve a ocurrir los mismos fenómenos ópticos (Figura 13). De este modo, se generan varios haces reflejados que al diferir en la longitud de sus caminos ópticos tienen diferente fase e interfieren, constructiva o destructivamente, obteniéndose un espectro de interferencia reflejado.<sup>128</sup>



**Figura 13:** Esquema de un biosensor basado en RIfS y su respuesta.

Como en las técnicas anteriores, la captura de un analito por un bioreceptor inmovilizado en el material soporte se traduce en un incremento del espesor de la biocapa, variando el índice de refracción sobre la superficie del interferómetro, lo que modifica el camino óptico de los haces de la luz y, consecuentemente, varía el patrón interferométrico. Estos cambios son proporcionales al incremento del



espesor de la biocapa y puede ser correlacionado con la concentración del analito de interés.<sup>129</sup>

En los últimos años, se han empleado también otros materiales para el desarrollo de sustratos interferométricos como silicio poroso, silicio poroso con óxido crecido térmicamente, u óxido de titanio.<sup>109</sup> Además, se han utilizado para la detección de compuestos orgánicos volátiles, monitorización de reacciones biomoleculares, y determinación de multi-analitos.<sup>130</sup> Por ejemplo, se han logrado límites de detección de 0.35 ppb para atrazina en muestras de agua,<sup>131</sup> y de 63.8 ppb para CRP en muestras acondicionadas,<sup>132</sup> todo ello con la mayor ventaja de este tipo de biosensores: su elevada resistencia a cambios de temperatura de estos materiales.<sup>129</sup>

### 1.4.4. Dispositivos comerciales

Todas estas técnicas de biosensado tienen sus inicios en el trabajo de diferentes grupos de investigación. Poco a poco algunas de ellas se han ido trasladando al mercado hasta llegar a convertirse en productos muy exitosos. El mayor exponente en este sentido es Biacore,<sup>133</sup> el primer biosensor óptico comercial *label-free*. Este dispositivo se basa en la tecnología SPR y se viene comercializando desde los años 90; actualmente la empresa líder en el mercado, GE Healthcare, tiene 6 modelos diferentes en venta.<sup>134</sup>

Sin embargo, otros productos no han tenido la misma fortuna. Este es el caso de AnaLight, un dispositivo basado en DPI que salió al mercado en 2002 alcanzando un enorme éxito. La particularidad de estos dispositivos es que permiten calcular simultáneamente el índice de refracción y el grosor de una capa generada por el ensayo con un sencillo chip. En 2010 los derechos de explotación fueron vendidos a la empresa Biolin Scientific por un valor de 2.5 millones de dólares y en la actualidad se ha dejado de comercializar.

## Introducción

De todos los tipos de biosensores ópticos *label-free* que existen hoy en día, solo algunos son comerciales. La Tabla 4 reúne los dispositivos comerciales más representativos que se pueden adquirir en la actualidad. Las características de los dispositivos son adquiridas de las páginas web de las compañías que los comercializan.

**Tabla 4.** Ejemplos representativos de biosensores ópticos *label-free* comercializados en la actualidad.

Técnica	Principio	Dispositivo	Soporte	Sensibilidad
SPR	Plasmones superficiales	Biacore	Oro	> 1 pM
		IBIS	Oro	-
		OWLS	Oro	1 ng/cm <sup>2</sup>
		FT-SPR 100	Oro	-
		SPRm 200	Oro	-
DBS	Difracción	Axela	Silicio	> 1 pM
BLI	Interferometría	Octet	Capa óptica	0.1 ng/cm <sup>2</sup>
RR	Interferometría	Maverick	Silicio	-
RWG/ PC	Difracción	BIND	Óxido de titanio	> 1 nM
		Epic	Polímero	0.5 ng/cm <sup>2</sup>
SERS	Raman	SERStrate	Oro y plata	> ppb
		SERSitive	Oro y plata	-
		RAM-SERS	Oro y plata	> ppb
		SERS Strips	Oro	-
		SERS Horiba	Oro, plata y cobre	-
		Q-SERS	Oro	> ppb

### 1.4.5. Problemáticas

Como se ha comentado anteriormente, para la fabricación de las nanoestructuras necesarias para el desarrollo de los biosensores *label-free* se emplean tecnologías de nanofabricación que pueden clasificarse en dos grupos: *top-down* y *bottom-up*.<sup>135-137</sup> Las técnicas *top-down* (de arriba a abajo) son aquellas en las que se comienza con una cantidad grande de material y se reduce para estructurarlo. Ello se consigue cavando, gastando, moliendo y/o cortando el material, y se realiza utilizando técnicas como fotolitografía, litografía por haz de electrones (EBL) y de haces de iones enfocados (FIB).<sup>138,139</sup> Por otro lado, las técnicas *bottom-up* (de abajo a arriba) son aquellas que se basan en el crecimiento de nanocapas y nanoestructuras utilizando átomos y moléculas como bloques de construcción. El auto-ensamblaje molecular, la litografía blanda, la deposición por vapor o el *sputtering* son las estrategias utilizadas en estos casos.<sup>140</sup>

El elevado coste de estas técnicas de nanofabricación es algo que prácticamente todas ellas comparten.<sup>141</sup> Estos métodos de fabricación no son muy accesibles a nivel económico, lo que hace que muchos de los trabajos realizadas con estas estructuras se queden en el ámbito de la investigación y no vean la luz a nivel comercial. En el mejor de los casos, aunque salga al mercado, el coste es tan elevado que solo se utiliza para aplicaciones particulares. Además, en general son dispositivos voluminosos que requieren preparación técnica para su uso. Debido a estos problemas, entre otros,<sup>141</sup> los biosensores ópticos *label-free* que existen actualmente aún no han alcanzado las prestaciones requeridas para su uso en *point-of-care*.

Para tratar de solventar todos estos inconvenientes se está trabajando desde distintos ámbitos; entre las muchas posibilidades, son interesantes aquellas que emplean el software, el hardware y el equipamiento de material consumible de un mismo sistema, como son los teléfonos inteligentes, las pantallas táctiles, los

---

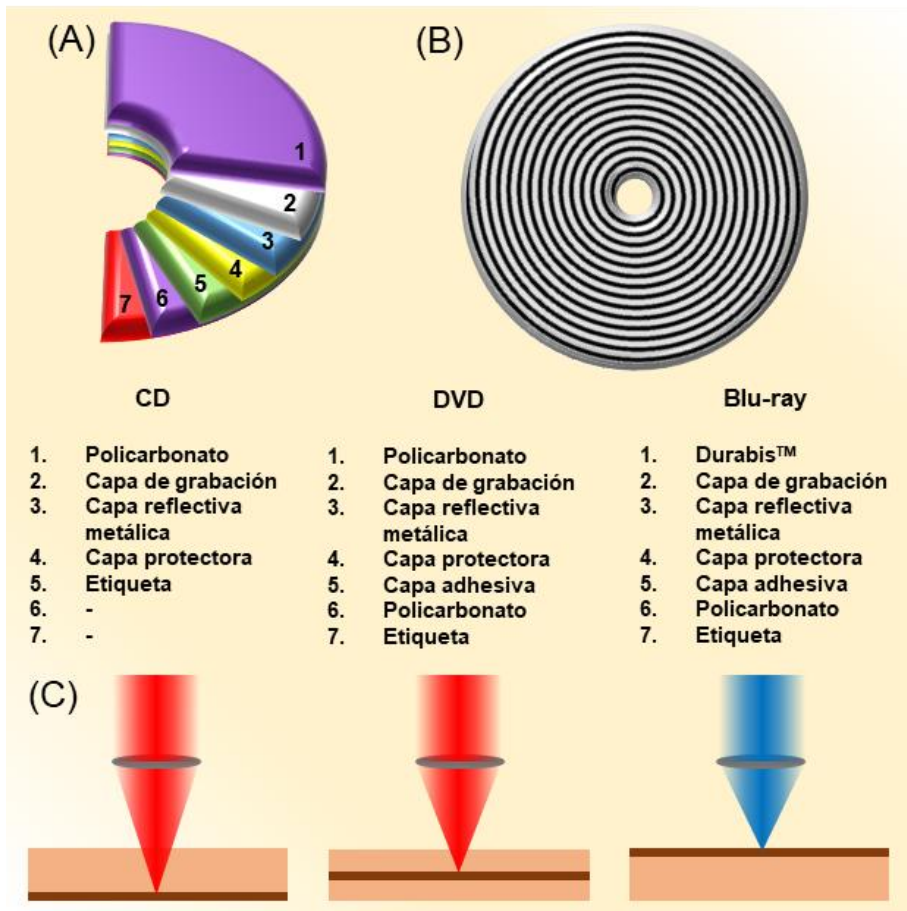
escáneres convencionales, los discos compactos, etc.<sup>142</sup> Al ser tecnologías tan extendidas a todos los niveles, han conseguido que la fabricación de sus dispositivos se realice de forma masiva, abaratando los costes de fabricación y aumentando los estándares de calidad. Además, sus elementos tienen una elevada reproducibilidad, robustez, fiabilidad y versatilidad, con precios muy competitivos y mantenimiento mínimo.

### 1.5. Tecnología de disco compacto

Esta tecnología parece que lleva toda la vida con nosotros, pero nada más lejos de la realidad. El disco compacto (CD) se creó en 1979, fruto de la colaboración entre Philips y Sony para el desarrollo de un sistema robusto y compacto de audio digital.<sup>143</sup> El DVD surgió en 1996 de la necesidad de disponer de un medio capaz de almacenar contenido audiovisual que mejorara en calidad al VHS y que tuviera mayor capacidad que el CD. Finalmente, con el objetivo de poder reproducir todo tipo de documentos audiovisuales en alta definición, Sony, Philips y Pioneer anunciaron oficialmente en 2002 la creación del disco Blu-ray, que tenía una capacidad cinco veces mayor a la del DVD.<sup>143</sup> Por otro lado, en 2004 surge la tecnología LightScribe, que permite grabar una imagen en la etiqueta del disco utilizando el lector, tanto para CD como DVD. Con ello se consiguen etiquetas más profesionales y fáciles de aplicar que las etiquetas adhesivas.

A simple vista todos ellos parecen iguales, una plataforma circular de policarbonato de 12 cm de diámetro (que corresponde con la anchura de los bolsillos superiores de las camisas, para que se pueda transportar con comodidad) con un grosor de 1.2 mm y una perforación central de 1.5 cm de diámetro. Sin embargo, las capas que los componen y la estructura interna responsable del almacenamiento de datos poseen claras diferencias (Figura 14 (A)). Esta estructura interna (*track*) consiste en un surco en forma de espiral desde la parte interna del disco hasta la externa (Figura 14 (B)). El tamaño de este surco marcará la capacidad de

almacenamiento de cada disco. En la Tabla 5 se recogen las características más relevantes de los tres tipos de disco.



**Figura 14:** Esquema de los discos compactos más comunes. (A) Conjunto de capas que forman un disco compacto, (B) estructura interna en forma de espiral que conforman la pista de datos de un disco grabable, y (C) posición del disco donde se encuentra la estructura interna del disco y se enfoca el láser del lector.

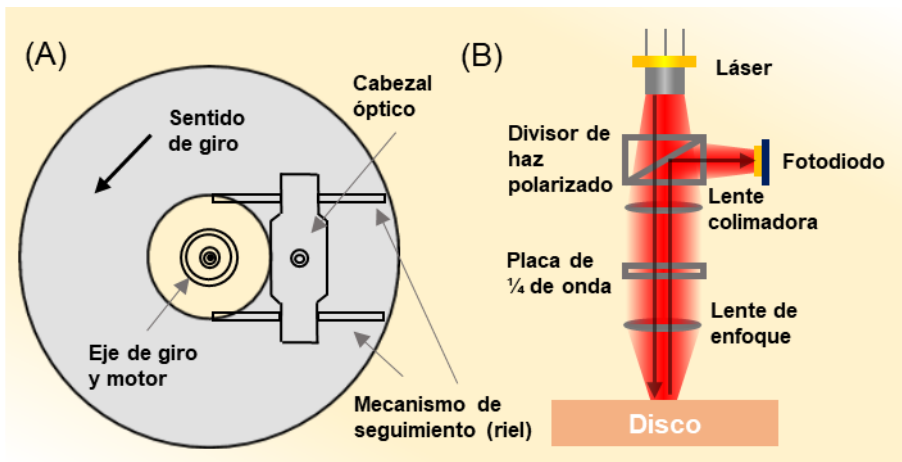
## Introducción

Cada tipo de disco tiene esta estructura en diferentes posiciones (Figura 14 (C)). En los CDs la estructura está en la parte superior del disco, mientras que los DVDs compuesto por dos discos de policarbonato de 0.6 mm de espesor la tienen en la parte central. Los discos Blu-ray tienen la estructura en la parte inferior del disco, protegida por una lámina muy resistente e hidrofóbica. Todos ellos tienen una capa metálica, habitualmente de aluminio, recubriendo su estructura interna para reflejar el haz laser del lector.

**Tabla 5.** Características de las estructuras internas de los discos compactos.<sup>144,145</sup>

Disco	Periodo (nm)	Anchura <sup>a</sup> (nm)	Ciclo de trabajo	Profundidad (nm)
CD	1600	881	55:45	203
DVD	740	393	53:47	175
Blu-ray	320	160	50:50	20

<sup>a</sup> Anchura de la parte superior de la rejilla



**Figura 15:** (A) Esquema de un lector de discos compactos con sus componentes más destacados y (B) diagrama del interior de un cabezal óptico.

Por otro lado, los lectores de discos tienen muchos elementos en común; todos ellos tienen un eje de giro y un motor donde se acopla el disco para comenzar a girar (Figura 15 (A)); un cabezal que integra tanto la fuente láser como todos los elementos ópticos necesarios para recoger el haz láser reflejado y separarlo del incidente (Figura 15 (B)); y un riel con motor encargado de mover el láser de manera horizontal, lo que permite escanear todos los radios del disco.

El hecho de que la tecnología de disco compacto se haya asentado en nuestra sociedad de manera masiva ha propiciado que los estándares de fabricación sean de alta calidad con un coste reducido. Un lector de discos convencional ronda 30 € y los discos céntimos.<sup>142</sup> Dadas las ventajas de esta tecnología y su bajo precio, además de para la función para la que fue concebida, se ha aplicado al campo de la analítica, y más concretamente al biosensado.

### **1.5.1. Biosensado con marcaje**

Los discos compactos (CD, DVD, Blu-ray, LightScribe, etc.) son una plataforma ideal para el biosensado. La superficie de los discos está formada de policarbonato, un material idóneo para la inmovilización de sondas diana. Esta inmovilización se puede realizar mediante adsorción pasiva,<sup>146</sup> gracias a las interacciones electroestáticas e hidrofóbicas entre el sustrato y la sonda; o covalente, ya que el policarbonato se puede modificar químicamente con cierta facilidad, permitiendo introducir los grupos funcionales necesarios para el enlace con la sonda.<sup>147</sup> Por otro lado, su forma circular de 12 centímetro de diámetro tiene una superficie útil de aproximadamente 94 cm<sup>2</sup>, pudiéndose realizar cientos de ensayos en un único disco.<sup>142</sup> Además, su bajo coste, su alta calidad, su fabricación masiva y su ubicuidad, lo hace un sustrato ideal para el biosensado.

En toda plataforma analítica, hay un sustrato donde se realiza el ensayo y un dispositivo que lo interroga para obtener los resultados analíticos. En la tecnología

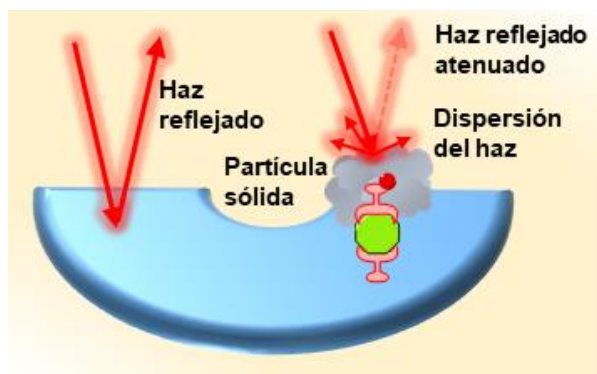
de disco compacto el dispositivo que interroga el sustrato es el lector de discos, dispositivo óptico de tamaño reducido que escanea toda la superficie del ensayo con alta precisión. El escaneado se basa en la incidencia del láser sobre su superficie, el cuál pasa a través del policarbonato y se enfoca en la capa metálica reflectante, donde se encuentra el surco interno del disco.<sup>148</sup> El láser sigue este surco desde el interior al exterior mientras gira el disco, por lo que se consigue un escaneado de toda su superficie.<sup>142</sup> La luz del láser es reflejada de vuelta al cabezal óptico del lector, el cual lo redirige hacia el fotodiodo, registrando, convirtiendo y amplificando continuamente la señal del láser reflejado en una señal analógica (vídeos, audios, imágenes, etc.).

El hecho de que el disco gire y se lea en movimiento continuo permite usar esta plataforma como sistema centrífugo de análisis, lo que facilita realizar el tratamiento de la muestra en el propio disco incorporando filtros y utilizando la fuerza centrípeta para dirigir los reactivos por los filtros y compartimentos deseados. Además, dotando al disco de un sistema fluídico mediante micro canales se facilita la automatización de los ensayos.

La base del principio de detección mediante la tecnología de disco compacto reside en la variación de las propiedades ópticas de los discos debido a eventos de reconocimiento molecular (Figura 16). El haz del láser, al incidir sobre elementos más pequeños que éste genera errores de lectura, mientras que los más grandes generan una atenuación de la intensidad del láser reflejado. Como la mayoría de biomoléculas (proteínas, anticuerpos, oligonucleótidos, etc.) son más pequeñas que el haz del láser, no generan una atenuación suficiente como para ser detectada y diferenciada del ruido propio del sistema de lectura. Por ello, las señales producidas por los eventos de reconocimiento molecular tienen que ser amplificadas.<sup>142</sup> Se han desarrollado varias metodologías para generar dicha variación, como el empleo de



colorantes orgánicos, micro y nanopartículas metálicas o dieléctricas, disoluciones metálicas y sustratos enzimáticos.



**Figura 16:** Representación esquemática del mecanismo del lector de discos aplicado al biosensado. Las partículas sólidas generadas como resultado del reconocimiento molecular interfieren con el láser en el proceso de lectura del disco, dispersando dicho haz y reduciendo la intensidad reflejada hacia el fotodiodo.

Una de las estrategias más empleada utiliza como modelo la técnica ELISA, en la que un analito inmovilizado sobre una placa se detecta mediante un anticuerpo marcado con una enzima que genera un producto detectable al añadirle el sustrato adecuado. En el caso del disco, la enzima que actúa como marcador debe tener un sustrato cuyo producto sea un sólido insoluble que se quede adherido en la zona de ensayo sobre la superficie del disco. La enzima más utilizada para este propósito es la peroxidasa de rábano picante (HRP) debido a su gran estabilidad, facilidad de conjugación y la disponibilidad de sustratos comerciales.<sup>73</sup> Menos utilizada, pero también válida para utilizarse en disco es la fosfatasa alcalina (AP),<sup>149</sup> cuyo producto de la reacción no es termodinámicamente favorable sin la enzima, es decir, solo se genera el producto en su presencia. Esto añade fiabilidad a los ensayos, evitando los falsos positivos debido al proceso de amplificación de la señal.

Para amplificar la señal en tecnología de disco compacto, también se han utilizado biomoléculas marcadas con nanopartículas de oro junto a disoluciones de cationes de plata.<sup>142</sup> Las nanopartículas conjugadas a las biomoléculas actúan como punto de nucleación, catalizando la reducción de los cationes plata y generando un depósito de plata metálica de aspecto grisáceo adsorbido sobre la superficie del disco.

La lectura de los discos puede realizarse mediante el análisis de los errores en la lectura o mediante el análisis de la atenuación del láser reflejado.<sup>150,151</sup> El análisis de los errores en la lectura se puede realizar con un lector de discos comercial sin ningún tipo de modificación y con un software comercial.<sup>150</sup> Sin embargo, esta estrategia muestra una elevada señal de fondo, proporcionando una baja relación señal-ruido (SNR) y, por tanto, una baja sensibilidad. La estrategia basada en el análisis de la atenuación del láser reflejado muestra mejores sensibilidades que la anterior, aunque requiere modificar ligeramente el lector de discos.<sup>151</sup> En este caso, al lector se le añade una tarjeta de adquisición de datos que recoge las señales de la medida y las digitaliza para almacenarlas, analizarlas y representarlas en un ordenador. De este modo, se obtiene una imagen con los valores de la intensidad de reflexión de toda la zona de ensayo.

La tecnología de disco compacto se ha empleado en numerosas ocasiones para el análisis de muestras de diversa naturaleza, desde contaminantes de agua hasta biomarcadores de enfermedades, pasando por fármacos o material genético. Por ejemplo, los CDs se han utilizado para el análisis de herbicidas y plaguicidas como hidroxiatrazina,<sup>152</sup> carbaril,<sup>152</sup> molinato,<sup>152</sup> atrazina,<sup>147,149,151</sup> clorpirifos,<sup>147,151</sup> ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propionico,<sup>147</sup> y metacloro;<sup>151</sup> para seguir interacciones bioquímicas como la unión biotina-estreptavidina,<sup>150</sup> hibridación de hebras de ADN<sup>150</sup> e interacciones proteína-proteína;<sup>150</sup> para la detección de biomarcadores tumorales como alfa-fetoproteína;<sup>149</sup> para la detección de antibióticos como

sulfametoxazol,<sup>153</sup> sulfatiazol<sup>151</sup> y tetraciclina;<sup>151</sup> para la detección de biotoxinas como microcistina LR;<sup>146</sup> y de patógenos como salmonela.<sup>154</sup> Así como la determinación de alérgenos en alimentos<sup>155,156</sup> y en diagnóstico de alergias en humanos (cobiophad).<sup>157</sup>

Utilizando DVD como plataforma de ensayo se ha realizado la detección de alérgenos como avellana,<sup>155</sup> cacahuete,<sup>155,158</sup> soja,<sup>155</sup> gliadina,<sup>156</sup> caseína,<sup>156</sup>  $\beta$ -lactoglobulina<sup>156</sup> y ovalbumina;<sup>156</sup> la detección de virus como influenza A;<sup>73</sup> la detección de patógenos como salmonella spp.,<sup>158-164</sup> campilobacter spp.<sup>158,161</sup> y cronobacter spp.;<sup>159,162,164</sup> la detección de insecticidas y herbicidas como atrazina,<sup>89,91</sup> clorpirifos,<sup>91,165</sup> ácido 3-fenoxibenzoico,<sup>91</sup> malatión,<sup>91</sup> alacloro,<sup>91</sup> 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propionico<sup>91</sup> y fentión;<sup>91,165</sup> el diagnóstico de embarazo detectando la hormona Gonadotropina coriónica humana en muestras de orina;<sup>166</sup> y la detección de fármacos y drogas como sulfasalazina,<sup>8991</sup> morfina<sup>167</sup> y cocaína.<sup>167</sup>

Por último, los discos Blu-ray se han utilizado para seguir interacciones bioquímicas como la unión biotina-estreptavidina;<sup>168</sup> la detección de biotoxinas como la microcistina LR;<sup>169</sup> de patógenos como la salmonella spp.<sup>169</sup> y cronobacter spp.;<sup>169</sup> de biomarcadores como la proteína C-reactiva,<sup>170</sup> mioglobina<sup>170</sup> y troponina cardíaca.<sup>170</sup>

### **1.5.2. Biosensado sin marcaje**

En el apartado anterior hemos visto como la tecnología de disco compacto, sin apenas modificaciones, se ha empleado en multitud de ocasiones para el biosensado con marcaje. Sin embargo, la tecnología de disco compacto, desde las estructuras internas de los discos hasta los elementos que componen los lectores de discos, tiene características muy interesantes para el desarrollo de plataformas analíticas de biosensado sin marcaje. A continuación, se comenta el estado del arte en lo que a biosensado sin marcaje se refiere, empleando la tecnología de disco compacto.

La primera aproximación de la que se tiene constancia fue la realizada por Gopinath *et al.* entre los años 2008 y 2009.<sup>171,172</sup> Ellos fabricaron un disco conocido como BioDVD que consiste en una estructura compuesta por capas nanométricas de metales, dieléctricos y materiales de cambio de fase. Estos materiales son algunos de los que se emplean para la fabricación de los DVD-RW. La combinación de los grosores de estas capas consigue modular la interferencia de la luz reflejada, para que pequeños cambios en el índice de refracción sobre su superficie genere una variación en la intensidad de dicha luz. Estos cambios en el índice de refracción pueden ser generados debido a la interacción entre el receptor y el analito. Además, como sistema de interrogación emplearon un lector de DVD (más concretamente, un probador de unidad de discos compactos) para la medida de los cambios en la intensidad de la luz reflejada. Esta fue la primera vez que se empleó un componente de la tecnología de disco compacto para el biosensado sin marcaje, logrando analizar interacciones entre RNA y pequeños ligandos, RNA y proteínas, anticuerpos y antígenos e hibridaciones de ácido nucleicos.

Los lectores de DVD comerciales se han empleado para el sensado de interacciones biomoleculares leyendo la desviación de *cantilevers* y la frecuencia de resonancia. Con este sistema se ha detectado la unión de estreptavidina y anticuerpos,<sup>173</sup> y la presencia de trazas de DNT, un compuesto altamente explosivo.<sup>174</sup>

Por otro lado, los discos comerciales también han sido empleados para el biosensado sin marcaje. Por ejemplo, los CD que contienen una capa de oro de entre 50 y 100 nm han sido empleados en el desarrollo de un inmunosensor electroquímico para el diagnóstico del virus del dengue. Además, la estructura interna de los discos (CD, DVD y Blu-ray) recubierta de una capa de oro de diferentes grosores se ha utilizado para desarrollar sustratos para el sensado mediante SPR.<sup>175</sup> Por otro lado, se ha fabricado un SPR basado en aluminio

nanoestructurado sobre policarbonato con el que se ha analizado la interacción biotina-dextrano-lipasa que podría ser fácilmente implementado tanto en CD, como en DVD y en Blu-ray.<sup>176</sup>

Durante la realización de esta tesis se han publicado varios trabajos que están en esta línea, lo que pone en valor el interés y la novedad de la misma. Zhang *et al.* emplearon la estructura interna del CD como una unidad dispersiva del espectro para el desarrollo de un biosensor sin marcaje cuya iluminación y detección se realizaron con un teléfono inteligente.<sup>177</sup> Yang *et al.* desarrollaron un biosensor optomagnético basado en aptámeros para la detección de biomarcadores de baja masa molecular utilizando elementos de tecnología Blu-ray no integrados en la plataforma tal y como se comercializa.<sup>178</sup>

Por otro lado, la estructura interna de los discos ha despertado un enorme interés dentro del campo del biosensado. El surco, que presenta forma de espiral a nivel macroscópico, se aproxima a un *grating* cuando se enfoca muy de cerca la parte exterior del disco. Las dimensiones del *grating* hacen que este sea capaz de interactuar con la luz visible, y actuar por ejemplo como *grating* difractivo.

Avella-Oliver *et al.* utilizaron la estructura interna de los discos como master para producir sellos nanoestructurados de PDMS, con el negativo de la estructura de los discos.<sup>179</sup> Estos sellos se emplearon para inmovilizar bioreceptores con dicho patrón sobre la parte plana y no estructurada de un CD LightScribe, el cual difracta la luz a la longitud de onda del láser del CD.<sup>180</sup> Con este sistema, en el que se utiliza el lector de discos como plataforma analítica, el disco como sustrato y la estructura de los discos como patrón difractivo, los autores han cuantificado anticuerpos mediante inmunoensayo con límites de detección a nivel nM.

Además, estas estructuras se han utilizado recubiertas por metales para desarrollar sustratos plasmónicos. López-Muñoz *et al.* han recubierto la estructura

interna de los Blu-ray con una capa de oro y con una triple capa de oro-plata-oro para desarrollar un sustrato que exhibe una banda plasmónica en la región del visible.<sup>181,182</sup> Midiendo el espectro de reflectividad de estos materiales analizan las interacciones entre proteínas para la detección de anticuerpos específicos contra la proteína GTF2b, que está relacionada con el cáncer colorrectal, y para la detección de proteína C-reactiva. Por otro lado, Avella-Oliver *et al.* utilizaron la estructura interna de CDs y DVDs recubiertos con una capa de plata metálica para desarrollar sustratos SERS. Estos sustratos mostraron un significativo aumento de la señal Raman que fue aplicado a la obtención del espectro Raman de hemoglobina y de exosomas.<sup>144</sup>

### 1.6. Referencias

1. Narayan, R. *Medical biosensors for point of care (POC) applications*; Woodhead Publishing: Duxford (United Kingdom), 2016, pp. 316; ISBN 9780081000786.
2. Zarei, M. Advances in point-of-care technologies for molecular diagnostics. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 98, 494–506.
3. Vashist, S.K. Point-of-care diagnostics: Recent advances and trends. *Biosensors* **2017**, 7, 62.
4. <https://www.es.abbott/> (accessed on Apr 26, 2019)
5. <https://es.clearblue.com/> (accessed on Apr 9, 2019)
6. Drain, P.K.; Hyle, E.P.; Noubary, F.; Freedberg, K.A.; Wilson, D.; Bishai, W.R.; Rodriguez, W.; Bassett, I. V Evaluating diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings. *Lancet. Infect. Dis.* **2014**, 14, 239–249.

7. Kettler, H.; White, K.; Hawkes, S. Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections: Key findings and recommendations. *Unicef/Undp/World Bank/Who* **2004**, 1–44.
8. Kost, G.J.; Tran, N.K. Point-of-care testing and cardiac biomarkers: the standard of care and vision for chest pain centers. *Cardiol. Clin.* **2005**, *23*, 467–490.
9. <https://www.praxisdienst.es/> (accessed on Apr 9, 2019)
10. Phillips, S.; Wyndham, L.; Shaw, J.; Walker, S.F. How accurately does the Reflotron dry-chemistry system measure plasma total cholesterol levels when used a community-screening device. *Med. J. Aust.* **1988**, *149*, 122–125.
11. <https://www.girodmedical.es/> (accessed on Apr 9, 2019)
12. Diar, H.A.; Nakwa, F.L.; Thomas, R.; Libhaber, E.N.; Velaphi, S. Evaluating the QuikRead® C-reactive protein test as a point-of-care test. *Paediatr. Int. Child Health* **2012**, *32*, 35–42.
13. Elusiyan, J.B.E.; Adeodu, O.O.; Adejuyigbe, E.A. Evaluating the validity of a bedside method of detecting hypoglycemia in children. *Pediatr. Emerg. Care* **2006**, *22*, 488–490.
14. Wood, J.R.; Kaminski, B.M.; Kollman, C.; Beck, R.W.; Hall, C.A.; Yun, J.P.; Cengiz, E.; Haller, M.J.; Hassan, K.; Klingensmith, G.J.; et al. Accuracy and precision of the axis-shield Afinion hemoglobin A1c measurement device. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2012**, *6*, 380–386.
15. Baig, M.A.; Shahzad, H.; Hussain, E.; Mian, A. Validating a point of care lactate meter in adult patients with sepsis presenting to the emergency

- department of a tertiary care hospital of a low- to middle-income country. *World J. Emerg. Med.* **2017**, *8*, 184–189.
16. Pollock, N.R.; Rolland, J.P.; Kumar, S.; Beattie, P.D.; Jain, S.; Noubary, F.; Wong, V.L.; Pohlmann, R.A.; Ryan, U.S.; Whitesides, G.M. A paper-based multiplexed transaminase test for low-cost, point-of-care liver function testing. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 152ra129.
  17. Roberts, J.D.; Wells, G.A.; Le May, M.R.; Labinaz, M.; Glover, C.; Froeschl, M.; Dick, A.; Marquis, J.-F.; O'Brien, E.; Goncalves, S.; et al. Point-of-care genetic testing for personalisation of antiplatelet treatment (RAPID GENE): a prospective, randomised, proof-of-concept trial. *Lancet* **2012**, *379*, 1705–1711.
  18. Verdú, J.M.; Comín-Colet, J.; Domingo, M.; Lupón, J.; Gómez, M.; Molina, L.; Casacuberta, J.M.; Muñoz, M.A.; Mena, A.; Bruguera-Cortada, J. Rapid point-of-care NT-proBNP optimal cut-off point for heart failure diagnosis in primary care. *Rev. española Cardiol.* **2012**, *65*, 613–619.
  19. Hawkes, M.; Conroy, A.L.; Opoka, R.O.; Namasopo, S.; Liles, W.C.; John, C.C.; Kain, K.C. Performance of point-of-care diagnostics for glucose, lactate, and hemoglobin in the management of severe malaria in a resource-constrained hospital in Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *90*, 605–608.
  20. Arora, D.R.; Maheshwari, M.; Arora, B. Rapid point-of-care testing for detection of HIV and clinical monitoring. *ISRN AIDS* **2013**, *2013*, 287269.
  21. <https://www.alere.com/> (accessed on Apr 18, 2019)
  22. <https://www.sysmex.es/> (accessed on Apr 19, 2019)
  23. Mabey, D.; Peeling, R.W.; Ballard, R.; Benzaken, A.S.; Galban, E.;
-



- Changalucha, J.; Everett, D.; Balira, R.; Fitzgerald, D.; Joseph, P.; et al. Prospective, multi-centre clinic-based evaluation of four rapid diagnostic tests for syphilis. *Sex. Transm. Infect.* **2006**, *82*, v13–v16.
24. Shivkumar, S.; Peeling, R.; Jafari, Y.; Joseph, L.; Pant Pai, N. Accuracy of rapid and point-of-care screening tests for hepatitis C. *Ann. Intern. Med.* **2012**, *157*, 558–566.
25. Lamoury, F.M.J.; Bajis, S.; Hajarizadeh, B.; Marshall, A.D.; Martinello, M.; Ivanova, E.; Catlett, B.; Mowat, Y.; Marks, P.; Amin, J.; et al. Evaluation of the Xpert HCV viral load finger-stick point-of-care assay. *J. Infect. Dis.* **2018**, *217*, 1889–1896.
26. Hatamabadi, H.R.; Abdalvand, A.; Safari, S.; Kariman, H.; Dolatabadi, A.A.; Shahrami, A.; Alimohammadi, H.; Hosseini, M. Tetanus Quick Stick as an applicable and cost-effective test in assessment of immunity status. *Am. J. Emerg. Med.* **2011**, *29*, 717–720.
27. Boehme, C.C.; Nabeta, P.; Hillemann, D.; Nicol, M.P.; Shenai, S.; Krapp, F.; Allen, J.; Tahirli, R.; Blakemore, R.; Rustomjee, R.; et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 1005–1015.
28. Eichner, S.F.; Timpe, E.M. Urinary-based ovulation and pregnancy: point-of-care testing. *Ann. Pharmacother.* **2004**, *38*, 325–331.
29. Watson, I.D.; Bertholf, R.L.; Hammett-Stabler, C. Drugs and ethanol testing at the point of care. *Point Care J. Near-Patient Test. Technol.* **2007**, *6*, 227–230.
30. Lager, P.S.; Attema-de Jonge, M.E.; Gorzeman, M.P.; Kerkvliet, L.E.; Franssen, E.J.F. Clinical value of drugs of abuse point of care testing in an

- emergency department setting. *Toxicol. Reports* **2018**, *5*, 12–17.
31. <https://www.girodmedical.es/> (accessed on Apr 25, 2019)
  32. Van Der Meer, J.R.; Belkin, S. Where microbiology meets microengineering: Design and applications of reporter bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 511–522.
  33. Sethi, R.S. Transducer aspects of biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, 243–264.
  34. Jayanthi, V.S.P.K.S.A.; Das, A.B.; Saxena, U. Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *91*, 15–23.
  35. Clark, L.C.; Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29–45.
  36. <https://www.yisi.com/> (accessed on Apr 13, 2019)
  37. <https://www.marketsandmarkets.com/> (accessed on Apr 17, 2019)
  38. Turemis, M.; Silletti, S.; Pezzotti, G.; Sanchís, J.; Farré, M.; Giardi, M.T. Optical biosensor based on the microalga-paramecium symbiosis for improved marine monitoring. *Sens. Actuators B* **2018**, *270*, 424–432.
  39. Khansili, N.; Rattu, G.; Krishna, P.M. Label-free optical biosensors for food and biological sensor applications. *Sens. Actuators B* **2018**, *265*, 35–49.
  40. Qi, Y.; Xiu, F.; Weng, Q. A novel and convenient chemiluminescence sensing of DNA: Nanometer interface effect and DNA action mechanism. *Sens. Actuators B* **2018**, *260*, 303–310.

41. Han, S.-M.; Kim, Y.-W.; Kim, Y.-K.; Chun, J.-H.; Oh, H.-B.; Paek, S.-H. Performance characterization of two-dimensional paper chromatography-based biosensors for biodefense, exemplified by detection of bacillus anthracis spores. *BioChip J.* **2018**, *12*, 59–68.
  42. Justino, C.; Duarte, A.; Rocha-Santos, T. Recent progress in biosensors for environmental monitoring: a review. *Sensors* **2017**, *17*, 2918.
  43. Mahato, K.; Maurya, P.K.; Chandra, P. Fundamentals and commercial aspects of nanobiosensors in point-of-care clinical diagnostics. *3 Biotech* **2018**, *8*, 149.
  44. Karunakaran, C.; Bhargava, K.; Benjamin, R. *Biosensors and Bioelectronics*; Elsevier: Amsterdam (Netherlands), 2015, pp. 320; ISBN 9780128031018.
  45. Smith, A.D.; Datta, S.P.; Smith, G.H.; Campbell, P.N.; Bentley, R.; McKenzie, H.; Bender, D.A.; Harris, A.; Goodwin, T.W.; Parish, J.H.; et al. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*; Oxford University Press: Oxford (United Kingdom), 1997, pp. 736; ISBN 0198547684.
  46. Díez-Buitrago, B.; Briz, N.; Liz-Marzán, L.M.; Pavlov, V. Biosensing strategies based on enzymatic reactions and nanoparticles. *Analyst* **2018**, *143*, 1727–1734.
  47. Yoon, J.Y. *Introduction to Biosensors: From Electric Circuits to Immunosensors*; Springer: New York (USA), 2016, pp. 331; ISBN 9783319274133.
  48. Lee, D.; Hwang, J.; Seo, Y.; Gilad, A.A.; Choi, J. Optical immunosensors for the efficient detection of target biomolecules. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2018**, *23*, 123–133.
-

49. Farka, Z.; Juřík, T.; Kovář, D.; Trnková, L.; Skládal, P. Nanoparticle-based immunochemical biosensors and assays: Recent advances and challenges. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 9973–10042.
50. Yang, F.; Li, Q.; Wang, L.; Zhang, G.-J.; Fan, C. Framework-nucleic-acid-enabled biosensor development. *ACS Sensors* **2018**, *3*, 903–919.
51. Huang, R.; He, N.; Li, Z. Recent progresses in DNA nanostructure-based biosensors for detection of tumor markers. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *109*, 27–34.
52. Farzin, L.; Shamsipur, M.; Samandari, L.; Sheibani, S. Advances in the design of nanomaterial-based electrochemical affinity and enzymatic biosensors for metabolic biomarkers: A review. *Microchim. Acta* **2018**, *185*, 276.
53. Khedri, M.; Ramezani, M.; Rafatpanah, H.; Abnous, K. Detection of food-born allergens with aptamer-based biosensors. *Trends Anal. Chem.* **2018**, *103*, 126–136.
54. Sandulescu, R.; Tertis, M.; Cristea, C.; Bodoki, E. New materials for the construction of electrochemical biosensors. In *Biosensors - micro and nanoscale applications*; InTech: London (United Kingdom), 2015, pp. 1–36; ISBN 9789535121732.
55. Spetz, A.L.; Nakagomi, S.; Wingbrant, H.; Andersson, M.; Salomonsson, A.; Roy, S.; Wingqvist, G.; Katardjiev, I.; Eickhoff, M.; Uvdal, K.; et al. New materials for chemical and biosensors. *Mater. Manuf. Process.* **2006**, *21*, 253–256.
56. Trilling, A.K.; Beekwilder, J.; Zuilhof, H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. *Analyst* **2013**, *138*, 1619–1627.

57. Sassolas, A.; Blum, L.J.; Leca-Bouvier, B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 489–511.
58. Lí, S.; Drago, G.A. Bioconjugation and stabilisation of biomolecules in biosensors. *Essays Biochem.* **2016**, *60*, 59–68.
59. Karav, S.; Cohen, J.L.; Barile, D.; de Moura Bell, J.M.L.N. Recent advances in immobilization strategies for glycosidases. *Biotechnol. Prog.* **2017**, *33*, 104–112.
60. Butler, J.E.; Ni, L.; Brown, W.R.; Joshi, K.S.; Chang, J.; Rosenberg, B.; Voss, E.W. The immunochemistry of sandwich elisas—VI. Greater than 90% of monoclonal and 75% of polyclonal anti-fluorescyl capture antibodies (CAbs) are denatured by passive adsorption. *Mol. Immunol.* **1993**, *30*, 1165–1175.
61. Wong, L.S.; Khan, F.; Micklefield, J. Selective covalent protein immobilization: strategies and applications. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4025–4053.
62. Rao, S. V; Anderson, K.W.; Bachas, L.G. Oriented immobilization of proteins. *Mikrochim. Acta* **1998**, *128*, 127–143.
63. Hermanson, G.T. *Bioconjugate techniques*; Elsevier: London (United Kingdom), 2013, pp. 1146; ISBN 9780123822390.
64. Holgado, M.; Barrios, C.A.; Ortega, F.J.; Sanza, F.J.; Casquel, R.; Laguna, M.F.; Bañuls, M.J.; López-Romero, D.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Label-free biosensing by means of periodic lattices of high aspect ratio SU-8 nanopillars. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2553–2558.
65. Peris, E.; Bañuls, M.-J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Photoattachment of

- thiolated DNA probes on SU-8 spin-coated Blu-ray disk surfaces for biosensing. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 6245–6253.
66. Iype, T.; Thomas, J.; Mohan, S.; Johnson, K.K.; George, L.E.; Ambattu, L.A.; Bhati, A.; Ailsworth, K.; Menon, B.; Rayabandla, S.M.; et al. A novel method for immobilization of proteins via entrapment of magnetic nanoparticles through epoxy cross-linking. *Anal. Biochem.* **2017**, *519*, 42–50.
67. Li, Z.; Chen, G.-Y. Current conjugation methods for immunosensors. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 278.
68. Bucur, B.; Munteanu, F.-D.; Marty, J.-L.; Vasilescu, A. Advances in enzyme-based biosensors for pesticide detection. *Biosensors* **2018**, *8*, 27.
69. Bilitewski, U. Protein-sensing assay formats and devices. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *568*, 232–247.
70. Gutiérrez-Sanz, Ó.; Andoy, N.M.; Filipiak, M.S.; Haustein, N.; Tarasov, A. Direct, label-free, and rapid transistor-based immunodetection in whole serum. *ACS Sensors* **2017**, *2*, 1278–1286.
71. Lv, R.; Chen, Y.; Xia, N.; Liang, Y.; He, Q.; Li, M.; Qi, Z.; Lu, Y.; Zhao, S. Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection to C-peptide in human urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *162*, 179–184.
72. Cao, Y.; Zhou, W.; Xing, X.; Zhang, J.; Fu, Y.; Li, K.; Sun, P.; Li, P.; Bai, X.; Ma, X.; et al. Indirect ELISA using a multi-epitope recombinant protein to detect antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O in pigs. *J. Virol. Methods* **2018**, *262*, 26–31.
73. Bañuls, M.-J.; González-Pedro, M.-V.; Puchades, R.; Maquieira, Á.

- Influenza A virus infection diagnosis based on DVD reader technology. *Anal. Methods* **2012**, *4*, 3133–3139.
74. Li, L.; Ren, S.; Shao, M.; De Saeger, S.; Song, S.; Yan, L. A competitive immunoassay for zearalenone with integrated poly(dimethylsiloxane) based microarray assay. *Anal. Methods* **2018**, *10*, 4036–4043.
75. Avella-Oliver, M.; Ferrando, V.; Monsoriu, J.A.; Puchades, R.; Maquieira, Á. A label-free diffraction-based sensing displacement immunosensor to quantify low molecular weight organic compounds. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1033*, 173–179.
76. Ngo, T.T. Ligand displacement immunoassay. *Anal. Lett.* **2005**, *38*, 1057–1069.
77. Janse, I.; Bok, J.M.; Hamidjaja, R.A.; Hodemaekers, H.M.; van Rotterdam, B.J. Development and comparison of two assay formats for parallel detection of four biothreat pathogens by using suspension microarrays. *PLoS One* **2012**, *7*, e31958.
78. Song, S.; Wang, L.; Li, J.; Fan, C.; Zhao, J. Aptamer-based biosensors. *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 108–117.
79. Alhadrami, H.A. Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. *Int. Union Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *65*, 497–508.
80. Grieshaber, D.; Mackenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E. Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. *Sensors* **2008**, *8*, 1400–1458.
81. Makhneva, E.; Farka, Z.; Skládal, P.; Zajíčková, L. Cyclopropylamine plasma polymer surfaces for label-free SPR and QCM immunosensing of
-

- Salmonella. *Sens. Actuators B* **2018**, 276, 447–455.
82. do Nascimento, N.M.; Juste-Dolz, A.; Bueno, P.R.; Monzó, I.; Tejero, R.; Lopez-Paz, J.L.; Maquieira, Á.; Morais, S.; Gimenez-Romero, D. Mapping molecular binding by means of conformational dynamics measurements. *RSC Adv.* **2018**, 8, 867–876.
83. do Nascimento, N.M.; Juste-Dolz, A.; Grau-García, E.; Román-Ivorra, J.A.; Puchades, R.; Maquieira, Á.; Morais, S.; Gimenez-Romero, D. Label-free piezoelectric biosensor for prognosis and diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 90, 166–173.
84. Sawant, S.N. Development of biosensors from biopolymer composites. In *Biopolymer Composites in Electronics*; Elsevier: Mumbai (India), 2017, pp. 353–383; ISBN 9780128092613.
85. <https://www.credenceresearch.com/> (accessed on Apr 26, 2019)
86. Yoo, S.M.; Lee, S.Y. Optical biosensors for the detection of pathogenic microorganisms. *Trends Biotechnol.* **2016**, 34, 7–25.
87. Borisov, S.M.; Wolfbeis, O.S. Optical biosensors. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 423–461.
88. <https://www.thermofisher.com/> (accessed on Apr 27, 2019)
89. Dobosz, P.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Nanogold bioconjugates for direct and sensitive multiplexed immunosensing. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 69, 294–300.
90. Arnandis-Chover, T.; Morais, S.; González-Martínez, M.Á.; Puchades, R.; Maquieira, Á. High density microarrays on Blu-ray discs for massive



- screening. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *51*, 109–114.
91. Dobosz, P.; Morais, S.; Bonet, E.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Massive immuno multiresidue screening of water pollutants. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9817–9824.
  92. Mosier-Boss, P. Review of SERS Substrates for Chemical Sensing. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 142.
  93. Sun, Y.S.; Landry, J.P.; Fei, Y.Y.; Zhu, X.D.; Luo, J.T.; Wang, X.B.; Lam, K.S. Effect of fluorescently labeling protein probes on kinetics of protein-ligand reactions. *Langmuir* **2008**, *24*, 13399–13405.
  94. Kodadek, T. Protein microarrays: prospects and problems. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 105–115.
  95. Fechner, P.; Bleher, O.; Ewald, M.; Freudenberger, K.; Furin, D.; Hilbig, U.; Kolarov, F.; Krieg, K.; Leidner, L.; Markovic, G.; et al. Size does matter! Label-free detection of small molecule-protein interaction. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 4033–4051.
  96. Fan, X.; White, I.M.; Shopova, S.I.; Zhu, H.; Suter, J.D.; Sun, Y. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *620*, 8–26.
  97. Cunningham, B.T.; Li, P.; Schulz, S.; Lin, B.; Baird, C.; Gerstenmaier, J.; Genick, C.; Wang, F.; Fine, E.; Laing, L. Label-free assays on the BIND system. *J. Biomol. Screen.* **2004**, *9*, 481–490.
  98. Zhang, C.G.; Chang, S.J.; Settu, K.; Jung Chen, C.; Liu, J.T. High-sensitivity glycosylated hemoglobin (HbA1c) aptasensor in rapid-prototyping surface plasmon resonance. *Sens. Actuators B* **2019**, *279*, 267–273.

99. Nasrin, F.; Chowdhury, A.D.; Takemura, K.; Lee, J.; Adegoke, O.; Deo, V.K.; Abe, F.; Suzuki, T.; Park, E.Y. Single-step detection of norovirus tuning localized surface plasmon resonance-induced optical signal between gold nanoparticles and quantum dots. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *122*, 16–24.
100. Anker, J.N.; Hall, W.P.; Lyandres, O.; Shah, N.C.; Zhao, J.; Van Duyne, R.P. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 442–453.
101. Homola, J.; Yee, S.S.; Gauglitz, G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sens. Actuators B* **1999**, *54*, 3–15.
102. Gupta, R.; Goddard, N.J. A polymeric waveguide resonant mirror (RM) device for detection in microfluidic flow cells. *Analyst* **2013**, *138*, 3209–3215.
103. Gaur, G.; Hu, S.; Mernaugh, R.L.; Kravchenko, I.I.; Retterer, S.T.; Weiss, S.M. Label-free detection of Herceptin® using suspended silicon microring resonators. *Sens. Actuators B* **2018**, *275*, 394–401.
104. Corcione, C.; Troia, B.; De Leonardis, F.; Passaro, V.M.N. Investigation of a fiberoptic device based on a long period grating in a ring resonator. *Sensors* **2016**, *16*, 1357.
105. Kurucz, I.; Peter, B.; Prosz, A.; Szekacs, I.; Horvath, R.; Erdei, A. Label-free optical biosensor for on-line monitoring the integrated response of human B cells upon the engagement of stimulatory and inhibitory immune receptors. *Sens. Actuators B* **2017**, *240*, 528–535.
106. Zaytseva, N.; Lynn, J.G.; Wu, Q.; Mudaliar, D.J.; Sun, H.; Kuang, P.Q.; Fang, Y. Resonant waveguide grating biosensor-enabled label-free and fluorescence detection of cell adhesion. *Sens. Actuators B* **2013**, *188*, 1064–

- 1072.
107. Konopsky, V.N.; Alieva, E. V. Photonic crystal surface mode imaging biosensor based on wavelength interrogation of resonance peak. *Sens. Actuators B* **2018**, *276*, 271–278.
108. HU, T.; YANG, F.; YANG, X.-R. Real-time study of interaction between adenosine triphosphate and its aptamer using dual polarization interferometry. *Chinese J. Anal. Chem.* **2017**, *45*, 944–950.
109. Nagatsuka, T.; Uzawa, H.; Tanaka, D.; Oba, Y.; Nishida, Y.; Iwasa, T.; Tayama, K.; Yoshida, T.; Ezaki, T.; Seto, Y. Preparation of silicon nitride biochips for reflectometric interference spectroscopic (RIfS) analysis of biological toxins and *E. coli* O157:H7 strain. *Sens. Actuators B* **2017**, *246*, 937–942.
110. Koukouvinos, G.; Petrou, P.; Misiakos, K.; Drygiannakis, D.; Raptis, I.; Stefanitsis, G.; Martini, S.; Nikita, D.; Goustouridis, D.; Moser, I.; et al. Simultaneous determination of CRP and D-dimer in human blood plasma samples with White Light Reflectance Spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *84*, 89–96.
111. Lv, C.; Jia, Z.; Liu, Y.; Mo, J.; Li, P.; Lv, X. Angle-resolved diffraction grating biosensor based on porous silicon. *Cit. J. Appl. Phys.* **2016**, *119*, 094502.
112. Saetear, P.; Chamieh, J.; Kammer, M.N.; Manuel, T.J.; Biron, J.-P.; Bornhop, D.J.; Cottet, H. Taylor dispersion analysis of polysaccharides using backscattering interferometry. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 6710–6718.
113. Ouyang, S.; Hu, B.; Zhou, R.; Liu, D.; Peng, D.; Li, Z.; Li, Z.; Jiao, B.; Wang, L. Rapid and sensitive detection of nodularin-R in water by a label-
-

- free BLI aptasensor. *Analyst* **2018**, *143*, 4316–4322.
114. Zhou, W.; Lin, S.; Chen, R.; Liu, J.; Li, Y. Characterization of antibody-C1q interactions by Biolayer Interferometry. *Anal. Biochem.* **2018**, *549*, 143–148.
115. Cheng, J.; Wang, S.; Zhang, S.; Wang, P.; Xie, J.; Han, C.; Su, X.-O. Rapid and sensitive determination of clenbuterol residues in animal urine by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Sens. Actuators B* **2019**, *279*, 7–14.
116. Liang, A.; Wang, H.; Yao, D.; Jiang, Z. A simple and sensitive SERS quantitative analysis method for urea using the dimethylglyoxime product as molecular probes in nanosilver sol substrate. *Food Chem.* **2019**, *271*, 39–46.
117. Ritchie, R.H. Plasma losses by fast electrons in thin films. *Phys. Rev.* **1957**, *106*, 874–881.
118. Guo, X. Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review. *J. Biophotonics* **2012**, *5*, 483–501.
119. Schasfoort, R.B.M. *Handbook of surface plasmon resonance*; Royal Society of Chemistry: Twente (Netherlands), 2017, pp. 403; ISBN 978-1-78262-730-2.
120. Wang, Y.; Zhang, C.; Zhang, Y.; Fang, H.; Min, C.; Zhu, S.; Yuan, X.-C. Investigation of phase SPR biosensor for efficient targeted drug screening with high sensitivity and stability. *Sens. Actuators B* **2015**, *209*, 313–322.
121. Zhu, Z.Z.; Feng, M.; Zuo, L.; Zhu, Z.Z.; Wang, F.; Chen, L.; Li, J.; Shan, G.; Luo, S.-Z. An aptamer based surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in wine and peanut oil. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *65*, 320–326.

122. He, L.; Pagneux, Q.; Larroulet, I.; Serrano, A.Y.; Pesquera, A.; Zurutuza, A.; Mandler, D.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. Label-free femtomolar cancer biomarker detection in human serum using graphene-coated surface plasmon resonance chips. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *89*, 606–611.
123. Sikarwar, B.; Sharma, P.K.; Srivastava, A.; Agarwal, G.S.; Boopathi, M.; Singh, B.; Jaiswal, Y.K. Surface plasmon resonance characterization of monoclonal and polyclonal antibodies of malaria for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *60*, 201–209.
124. Nair, R. V; Vijaya, R. Photonic crystal sensors: An overview. *Prog. Quantum Electron.* **2010**, *34*, 89–134.
125. Inan, H.; Poyraz, M.; Inci, F.; Lifson, M.A.; Baday, M.; Cunningham, B.T.; Demerci, U. Photonic crystals: emerging biosensors and their promise for point-of-care applications. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *366*, 366–388.
126. Troia, B.; Paolicelli, A.; Leonardis, F. De; Passaro, V.M.N. Photonic crystals for optical sensing: a review. In *Advances in photonic crystals*; InTech: London (United Kingdom), 2013, pp. 241–295; ISBN 9789535109549.
127. Gauglitz, G.; Nahm, W. Observation of spectral interferences for the determination of volume and surface effects of thin films. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **1991**, *341*, 279–283.
128. Krieg, A.K.; Gauglitz, G. An optical sensor for the detection of human pancreatic lipase. *Sens. Actuators B* **2014**, *203*, 663–669.
129. Proll, G.; Markovic, G.; Fechner, P.; Proell, F.; Gauglitz, G. Reflectometric interference spectroscopy. In *Methods in molecular biology*; Humana Press: New York (USA), 2017, pp. 207–220; ISBN 9781603275675.

130. Koukouvinos, G.; Petrou, P.; Goustouridis, D.; Misiakos, K.; Kakabakos, S.; Raptis, I. Development and bioanalytical applications of a white light reflectance spectroscopy label-free sensing platform. *Biosensors* **2017**, *7*, 46.
131. Mouvet, C.; Amalric, L.; Broussard, S.; Lang, G.; Brecht, A.; Gauglitz, G. Reflectometric interference spectroscopy for the determination of atrazine in natural water samples. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 1846–1851.
132. Murata, A.; Ooya, T.; Takeuchi, T. Two-layer reflectometric interference spectroscopy-based immunosensing for C-reactive protein. *Microchim. Acta* **2015**, *182*, 307–313.
133. Myszka, D.G.; He, X.; Dembo, M.; Morton, T.A.; Goldstein, B. Extending the range of rate constants available from BIACORE: interpreting mass transport-influenced binding data. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 583–594.
134. <https://www.gelifesciences.com/> (accessed on Apr 24, 2019)
135. Iqbal, P.; Preece, J.A.; Mendes, P.M. Nanotechnology: the “top-down” and “bottom-up” approaches. In *Supramolecular chemistry*; John Wiley & Sons: Chichester (United Kingdom), 2009, pp. 899–939; ISBN 9780470661345.
136. Sarangan, A. Nanofabrication. In *Fundamentals and Applications of Nanophotonics*; Woodhead Publishing: Duxford (United Kingdom), 2016, pp. 149–184; ISBN 9781782424871.
137. Betancourt, T.; Brannon-Peppas, L. Micro-and nanofabrication methods in nanotechnological medical and pharmaceutical devices. *Int. J. Nanomedicine* **2006**, *1*, 483–495.
138. Chen, Y. Nanofabrication by electron beam lithography and its applications: A review. *Microelectron. Eng.* **2015**, *135*, 57–72.

139. Rajput, N.S.; Luo, X. FIB micro-/nano-fabrication. In *Micromanufacturing engineering and technology*; William Andrew Publishing: Glasgow (United Kingdom), 2015, pp. 61–80; ISBN 9780323312677.
140. Sarakinos, K.; Alami, J.; Konstantinidis, S. High power pulsed magnetron sputtering: A review on scientific and engineering state of the art. *Surf. Coatings Technol.* **2010**, *204*, 1661–1684.
141. Pan, Z.; Yu, Y.F.; Valuckas, V.; Yap, S.L.K.; Vienne, G.G.; Kuznetsov, A.I. Plasmonic nanoparticle lithography: Fast resist-free laser technique for large-scale sub-50 nm hole array fabrication. *Appl. Phys. Lett.* **2018**, *112*, 223101.
142. Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Disc-based microarrays: principles and analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 4523–4534.
143. Kumagai, O.; Ikeda, M.; Yamamoto, M. Application of laser diodes to optical disk systems: the history of laser diode development and mass production in three generations of optical disk systems. *Proc. IEEE* **2013**, *101*, 2243–2254.
144. Avella-Oliver, M.; Puchades, R.; Wachsmann-Hogiu, S.; Maquieira, Á. Label-free SERS analysis of proteins and exosomes with large-scale substrates from recordable compact disks. *Sens. Actuators B* **2017**, *252*, 657–662.
145. Kaplan, B.; Guner, H.; Senlik, O.; Gurel, K.; Bayindir, M.; Dana, A. Tuning optical discs for plasmonic applications. *Plasmonics* **2009**, *4*, 237–243.
146. Morais, S.; Tamarit-López, J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Determination of microcystins in river waters using microsensor arrays on disk. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 9024–9029.

147. Tamarit-López, J.; Morais, S.; Bañuls, M.-J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Development of hapten-linked microimmunoassays on polycarbonate discs. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1954–1963.
148. Sherman, C. *The CD-ROM handbook*; Intertext Publications: Detroit (USA), 1994, pp. 579; ISBN 0070566933.
149. Morais, S.; Tamarit-López, J.; Carrascosa, J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Analytical prospect of compact disk technology in immunosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2837–2844.
150. Li, Y.; Ou, L.M.L.; Yu, H.-Z. Digitized molecular diagnostics: reading disk-based bioassays with standard computer drives. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8216–8223.
151. Morais, S.; Tortajada-Genaro, L.A.; Arandis-Chover, T.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Multiplexed microimmunoassays on a digital versatile disk. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5646–5654.
152. Kido, H.; Maquieira, Á.; Hammock, B.D. Disc-based immunoassay microarrays. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *411*, 1–11.
153. Pastor-Navarro, N.; Brun, E.M.; Gallego-Iglesias, E.; Maquieira, Á.; Puchades, R. Development of immunoassays to determinate sulfamethoxazole residues in wastewaters. *J. Environ. Monit.* **2009**, *11*, 1094–1100.
154. Tamarit-López, J.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Oxygen plasma treated interactive polycarbonate DNA microarraying platform. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 2573–2580.
155. Tortajada-Genaro, L. a; Santiago-Felipe, S.; Morais, S.; Gabaldón, J.A.;



- Puchades, R.; Maquieira, Á. Multiplex DNA detection of food allergens on a digital versatile disk. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 36–43.
156. Badran, A.A.; Morais, S.; Maquieira, Á. Simultaneous determination of four food allergens using compact disc immunoassaying technology. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 2261–2268.
157. <https://www.cobiophad.eu/> (accessed on Apr 30, 2019)
158. Santiago-Felipe, S.; Tortajada-Genaro, L.A.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Parallel solid-phase isothermal amplification and detection of multiple DNA targets in microliter-sized wells of a digital versatile disc. *Microchim. Acta* **2016**, *183*, 1195–1202.
159. Arnandis-Chover, T.; Morais, S.; Tortajada-Genaro, L.A.; Puchades, R.; Maquieira, Á.; Berganza, J.; Olabarria, G. Detection of food-borne pathogens with DNA arrays on disk. *Talanta* **2012**, *101*, 405–412.
160. Santiago-Felipe, S.; Tortajada-Genaro, L.A.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. One-pot isothermal DNA amplification – Hybridisation and detection by a disc-based method. *Sens. Actuators B* **2014**, *204*, 273–281.
161. Tortajada-Genaro, L.A.; Rodrigo, A.; Hevia, E.; Mena, S.; Niñoles, R.; Maquieira, Á. Microarray on digital versatile disc for identification and genotyping of Salmonella and Campylobacter in meat products. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 7285–7294.
162. Santiago-Felipe, S.; Tortajada-Genaro, L.A.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Isothermal DNA amplification strategies for duplex microorganism detection. *Food Chem.* **2015**, *174*, 509–515.
163. Santiago-Felipe, S.; Tortajada-Genaro, L.A.; Carrascosa, J.; Puchades, R.;
-

- Maquieira, Á. Real-time loop-mediated isothermal DNA amplification in compact disc micro-reactors. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *79*, 300–306.
164. Lucas-Garrote, B.; Morais, S.; Maquieira, Á. Dual signal amplification for highly sensitive hybridization microassays on chemically activated surfaces. *Sens. Actuators B* **2017**, *246*, 1108–1115.
165. Navarro, P.; Morais, S.; Gabaldón, J.A.; Pérez, A.J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Arrays on disc for screening and quantification of pollutants. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *784*, 59–64.
166. Li, X.; Weng, S.; Ge, B.; Yao, Z.; Yu, H.-Z. DVD technology-based molecular diagnosis platform: quantitative pregnancy test on a disc. *Lab Chip* **2014**, *14*, 1686–1694.
167. Zhang, L.; Li, X.; Li, Y.; Shi, X.; Yu, H.-Z. Indirect competitive assays on DVD for direct multiplex detection of drugs of abuse in oral fluids. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1896–1902.
168. Shi, M.; Weng, S.S.H.; Li, X.; Yu, H.-Z. Digitized molecular detection on off-the-shelf Blu-ray discs: Upgraded resolution and enhanced sensitivity. *Sens. Actuators B* **2017**, *242*, 79–86.
169. Arnandis-Chover, T.; Morais, S.; González-Martínez, M.Á.; Puchades, R.; Maquieira, Á. High density microarrays on Blu-ray discs for massive screening. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *51*, 109–114.
170. Weng, S.; Li, X.; Niu, M.; Ge, B.; Yu, H.-Z. Blu-ray technology-based quantitative assays for cardiac markers: from disc activation to multiplex detection. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6889–6896.
171. Gopinath, S.C.B.; Awazu, K.; Tominaga, J.; Kumar, P.K.R. Monitoring
-

- biomolecular interactions on a digital versatile disk: A BioDVD platform technology. *ACS Nano* **2008**, *2*, 1885–1895.
172. Gopinath, S.C.B.; Awazu, K.; Fons, P.; Tominaga, J.; Kumar, P.K.R. A sensitive multilayered structure suitable for biosensing on the BioDVD platform. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4963–4970.
173. Bosco, F.G.; Hwu, E.-T.; Chen, C.-H.; Keller, S.; Bache, M.; Jakobsen, M.H.; Hwang, I.-S.; Boisen, A. High throughput label-free platform for statistical bio-molecular sensing. *Lab Chip* **2011**, *11*, 2411–2416.
174. Bosco, F.G.; Bache, M.; Hwu, E.-T.; Chen, C.H.; Andersen, S.S.; Nielsen, K.A.; Keller, S.S.; Jeppesen, J.O.; Hwang, I.-S.; Boisen, A. Statistical analysis of DNT detection using chemically functionalized microcantilever arrays. *Sens. Actuators B* **2012**, *171*, 1054–1059.
175. Dou, X.; Phillips, B.M.; Chung, P.-Y.; Jiang, P. High surface plasmon resonance sensitivity enabled by optical disks. *Opt. Lett.* **2012**, *37*, 3681–3683.
176. Barrios, C.A.; Canalejas-Tejero, V.; Herranz, S.; Moreno-Bondi, M.C.; Avella-Oliver, M.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Aluminum nanohole arrays fabricated on polycarbonate for compact disc-based label-free optical biosensing. *Plasmonics* **2014**, *9*, 645–649.
177. Zhang, J.; Khan, I.; Zhang, Q.; Liu, X.; Dostalek, J.; Liedberg, B.; Wang, Y. Lipopolysaccharides detection on a grating-coupled surface plasmon resonance smartphone biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *99*, 312–317.
178. Yang, J.; Donolato, M.; Pinto, A.; Bosco, F.G.; Hwu, E.-T.; Chen, C.-H.; Alstrøm, T.S.; Lee, G.-H.; Schäfer, T.; Vavassori, P.; et al. Blu-ray based optomagnetic aptasensor for detection of small molecules. *Biosens.*

- Bioelectron.* **2016**, 75, 396–403.
179. Garcia-Cruz, A.; Lee, M.; Marote, P.; Zine, N.; Sigaud, M.; Bonhomme, A.; Pruna, R.; Lopez, M.; Bausells, J.; Jaffrezic, N.; et al. Large area *in situ* fabrication of poly(pyrrole)-nanowires on flexible thermoplastic films using nanocontact printing. *Mater. Res. Express* **2016**, 3, 085018.
180. Avella-Oliver, M.; Carrascosa, J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Diffractive protein gratings as optically active transducers for high-throughput label-free immunosensing. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 9002–9008.
181. López-Muñoz, G.A.; Estevez, M.-C.C.; Peláez-Gutierrez, E.C.; Homs-Corbera, A.; García-Hernandez, M.C.; Imbaud, J.I.; Lechuga, L.M. A label-free nanostructured plasmonic biosensor based on Blu-ray discs with integrated microfluidics for sensitive biodetection. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 96, 260–267.
182. López-Muñoz, G.A.; Estévez, M.-C.; Vázquez-García, M.; Berenguel-Alonso, M.; Alonso-Chamarro, J.; Homs-Corbera, A.; Lechuga, L.M. Gold/silver/gold trilayer films on nanostructured polycarbonate substrates for direct and label-free nanoplasmonic biosensing. *J. Biophotonics* **2018**, 11, e201800043.

## **2. Objetivos**



El objetivo principal de esta tesis es el estudio de nuevas metodologías y sistemas de transducción y detección para el biosensado sin marcaje, empleando elementos y materiales derivados de la tecnología de disco compacto, bajo el criterio ASSURED establecido por la Organización Mundial de la Salud para dispositivos *point-of-care*.

El desarrollo experimental y los resultados alcanzados se han plasmado en cuatro capítulos. Cada uno de ellos aborda una problemática diferente, aportando resultados dentro del objetivo general de esta tesis.

1. Desarrollo de un sistema para cribado de compuestos inhibidores de la actividad enzimática de peroxidasas con potencial farmacológico, utilizando tecnología Blu-ray como plataforma de ensayo.
2. Diseño e implementación de una metodología para la reducción del ruido de fondo del sistema óptico y la mejora de la sensibilidad analítica, fundamentada en ensayos con un patrón periódico en forma de franjas y en el análisis en el dominio de frecuencias.
3. Desarrollo de un sustrato interferométrico multicapa a partir de materiales de discos DVD-RW, aplicable a biosensado *label-free*. Puesta a punto de un biosensor basado en interferometría por reflexión.
4. Estudio y fabricación de cristales fotónicos, basados en el track del disco Blu-ray recubierto con una capa nanométrica de un material de índice de refracción elevado, que permitan el análisis de biointeracciones a través del seguimiento del desplazamiento del GMR en el espectro visible, sin necesidad de marcaje.



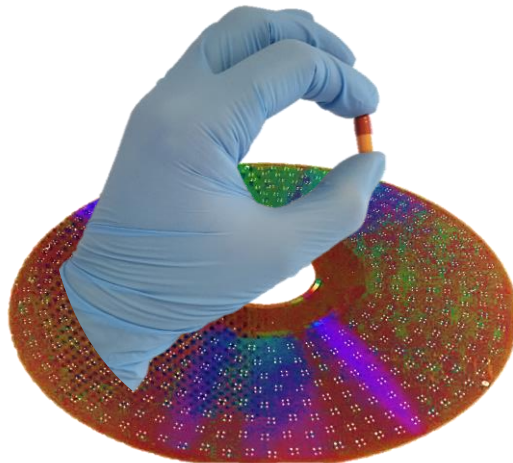


### **3. Parte experimental y resultados**



## Capítulo 1

# Cribado de fármacos inhibidores de la actividad enzimática





### **Introducción**

El proceso de descubrimiento y selección de fármacos se realiza desde muchos puntos de vista. Consta de etapas en las que se identifican los compuestos con potencial y, si es necesario, se modifican para producir fármacos minimizando los efectos secundarios u otra propiedad necesaria para mejorar la eficacia del producto y su formulación. En ellas se emplean muchos recursos económicos y humanos durante años, en los que se estudian bibliotecas de miles de moléculas, analizando e interpretando una gran cantidad de datos. Para ello se hace uso de diferentes técnicas con gran capacidad de trabajo, capaces de efectuar, en algunos casos y etapas del proceso, más de 100.000 ensayos cada día.

Las peroxidasas son una gran familia de enzimas involucradas en infinidad de procesos biológicos en los seres vivos. Algunos ejemplos son la tiroperoxidasa (TPO, *thyroidperoxidase enzyme*), la mieloperoxidasa (MPO, *myeloperoxidase enzyme*) y la lactoperoxidasa (LPO, *lactoperoxidase enzyme*) cuyas disfunciones se traducen en enfermedades varias. Compuestos que ayudan a la regulación de su actividad son administrados como fármacos contra dichas enfermedades.

En este capítulo se presentan los resultados de un estudio cuyo objetivo es demostrar que se puede efectuar cribado masivo de sustancias con potencial farmacológico utilizando desarrollos tecnológicos muy competitivos y herramientas informáticas potentes, para llevar a cabo simultáneamente un gran número de ensayos y el tratamiento del importante volumen de información generado, de modo que se disponga de una metodología efectiva y competitiva. Para ello, se estudia la capacidad inhibitoria por la actividad enzimática de la HRP por una colección de moléculas modelo, estableciendo un sistema para la interpretación de resultados basado en la representación de hipersuperficies. En este caso, se ha tomado como modelo de la familia de las peroxidasas a la HRP debido a que es una proteína muy

estudiada, de la que se tiene una gran cantidad de información estructural, a su buena estabilidad, reducido tamaño, disponibilidad comercial y bajo coste. Todo ello se realiza empleando la tecnología Blu-ray: por un lado, el disco actúa como plataforma de ensayo y por otro, el lector lo hace como detector de los resultados analíticos de inhibición de la actividad enzimática.

El trabajo se ha abordado en las siguientes etapas:

- Acondicionamiento de la superficie de discos Blu-ray con lectina (Concanavalina A) para la posterior inmovilización de la enzima HRP.
- Estudio de condiciones para la inmovilización de la enzima utilizando la bioafinidad de las glicoenzimas y lectinas.
- Estudio de variables para el desarrollo de la señal generada por la actividad enzimática.
- Determinación de los parámetros y las constantes de la actividad enzimática.
- Estudio de la capacidad de inhibición de los compuestos y determinación de sus parámetros de afinidad.
- Comparación de la actividad enzimática obtenida después de la aplicación de cada compuesto empleando hipersuperficies para su análisis.
- Demostración del potencial de la metodología desarrollada.

## Enzyme Inhibition Microassays on Blu-ray Disks for Drug Discovery

Gabriel Sancho-Fornes,<sup>a</sup> Ernest Peris,<sup>a</sup> David Giménez-Romero,<sup>b</sup> Sergi Morais,<sup>a,c</sup>  
and Ángel Maquieira<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Universitat Politècnica de València, Universitat de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain.

<sup>b</sup> Departamento de Química-Física, Facultad de Química, Universitat de València, Avda. Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain.

<sup>c</sup> Departamento de Química, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain.

Reprinted with permission from **ACS Omega** 2019, 4, 5595-5600.

Copyright © 2011 American Chemical Society

### Abstract

An enzyme inhibition-based assay for drug discovery developed by microarraing on Blu-ray disks is presented. As a proof-of-concept, the system screens a selected molecule library of potential chemical inhibitors against the glycoenzyme peroxidase, identifying the promising lead compounds with high selectivity using standard Blu-ray disks and drives. In order to face the first drug discovery stages,

we establish the bases for a high-throughput screening assay and a methodology based on hypersurfaces suitable to manage a high number of data as well.

**Keywords:** Biochemical analysis; Enzyme kinetics; Medicinal chemistry

### Introduction

High-throughput screening (HTS) techniques for drug discovery identify hits during primary single-point screening, followed by lead generation using dose–response analyses.<sup>1–3</sup> These techniques transformed drug discovery, surpassing traditional screening methodologies and allowing researchers to approach potential candidates in a rational manner.<sup>4,5</sup> Although target compounds are able to display complex concentration-dependent relationships and structure–activity ratios, usually a single measurement at a single concentration is taken per compound in the chemical library during a primary drug screening.<sup>6</sup> This working strategy results in low performances in terms of characterizing compounds and poor quality data.

HTS assays based on enzyme inhibition have been widely employed for drug discovery.<sup>7–10</sup> Most of the enzymes are proteins that take part in a wide variety of processes inside living organisms, such as signal transduction and cell regulation. In this sense, several human diseases are associated with enzyme regulation.<sup>11,12</sup> For example, Alzheimer’s disease is treated by the inhibition of acetylcholinesterase,<sup>13</sup> diabetes mellitus through the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase,<sup>14</sup> or cardiovascular diseases where the treatment is based on the regulation of thrombin.<sup>15</sup> Discovering new enzyme inhibitors that treat diseases or improve those that exist in the actuality are important for the human health point of view.<sup>16–21</sup>

We present a methodology that uses Blu-ray-based microarray technology (disks as assay platform and a disk-player as detector) to perform assays for drug screening

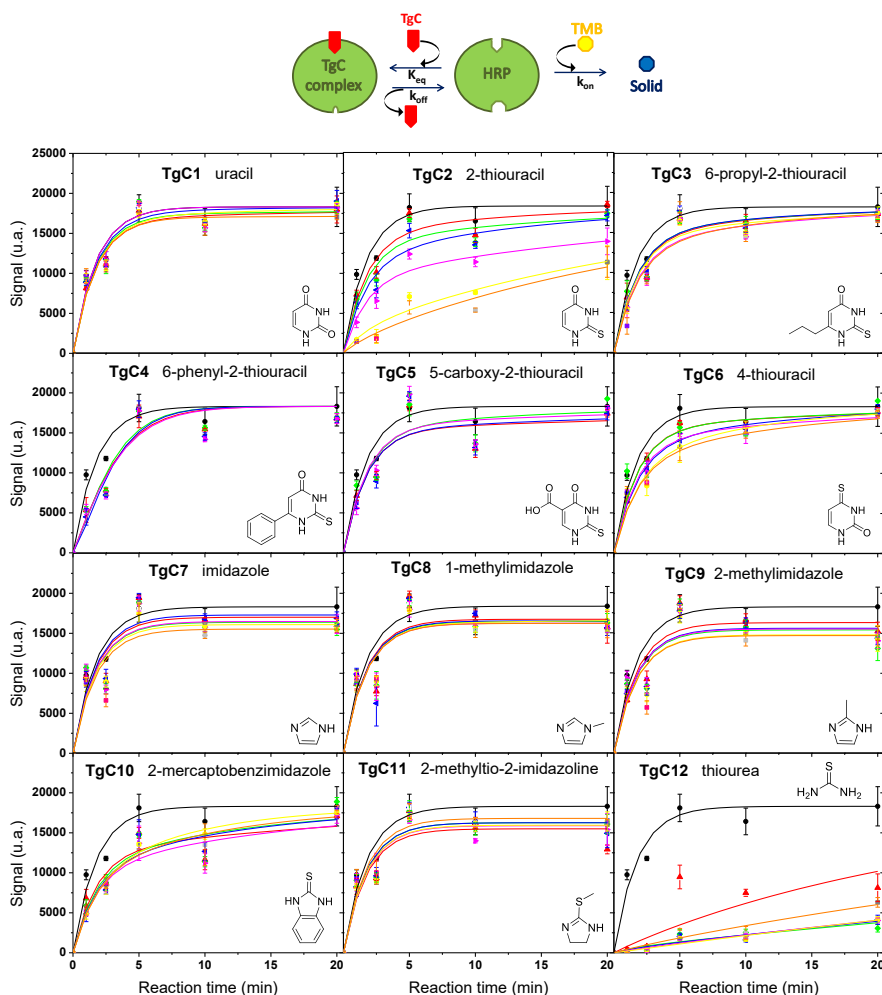


of inhibitors against horseradish peroxidase (HRP) as a member of the glycoenzymes superfamily.<sup>22</sup> We establish the basis for the development of high-throughput screening assay using compact disk technology and develop a novel strategy based on kinetic and thermodynamic parameters for drug discovery, identifying hits during primary screening stages.

### **Results and discussion**

Blu-ray disks have a reliable surface for creating and handling high-density microarrays.<sup>23,24</sup> In this article, we perform a screening assay of inhibitors against HRP as a proof-of-concept of the potential use of Blu-ray technology for drug screening. For that, HRP was anchored in an oriented manner, utilizing bioaffinity-based immobilization on Concanavalin A (ConA) microarrays. The strong affinity of lectins (ConA) for glycoenzymes (HRP) was employed for this purpose as this immobilization procedure exhibited high catalytic activity and improved stability against denaturation (see Figure S1).<sup>25</sup>

First, the relationship between the signals generated by the activated ConA/HRP system and the ConA concentration was established. As is shown in Figure S2B, the curve displayed a typical pattern with no distinguishable signal at the low ConA concentration values (i.e., not enough protein to bind HRP), followed by an increase between 10 and 40 mg/L and a final plateau at higher lectin values. From these data, 40 mg/L was chosen to be the optimum ConA concentration value after considering that slight experimental errors in ConA steps did not affect the signal. The results obtained with the nonactivated ConA shows that the nonspecific interaction between ConA and HRP was not observed. This was probably because  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  were absent. Indeed, these cations are essential to allow lectin to fold in a tertiary structure that is complementary to glycoprotein sugar residues.<sup>26</sup>



**Figure 1.** Schematic theoretical model representing the process of HRP–TgC complex formation. The plots show the signal registered from bioimmobilized HRP reaction toward TMB substrate in the presence of the target compounds at different concentrations (blank [black circle], 0.64 mM [red triangle], 1.25 mM [green diamond], 2.5 mM [blue left pointing triangle], 5 mM [pink right pointing triangle], 10 mM [yellow hexagon], and 20 mM [orange rectangle]). Each result is the mean  $\pm$  sd of 6 values and lines correspond to data fittings to eq 1.

In order to select the suitable concentration of HRP to perform the assays, the effect on the ConA/HRP signal was recorded after developing with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). The data are shown in Figure S2C. A linear correlation was obtained within the concentration range between 5 and 40, 20 mg/L being suitable for the signal intensity requirements of the BD-player.

HRP activity was monitored from 1 to 20 min at room temperature by time-course curves using a simple kinetic model in an enzyme-catalyzed direct reaction (see Figure S2). These assays were performed in the absence of TgCs as reference for full enzymatic activity (blank). The HRP activity is accurately obtained by 36 data points (each array containing 6 spots and 6 reaction times were analyzed), measuring the conversion of the TMB substrate into an insoluble colored product. The measurements were taken through reading the BD by the disk drive, as described elsewhere.<sup>27</sup> The obtained data were exponentially fitted to  $S = S_{\text{Max}}(1 - e^{(-k_{\text{on}}t)})$ , which provided a maximum signal value  $S_{\text{Max}} = 18\,300 \pm 1400$  (a.u.) and a rate constant value of  $k_{\text{on}} = 0.57 \pm 0.14 \text{ min}^{-1}$  ( $R^2 = 0.963$ ). These two parameters were required to accomplish subsequent data fittings to eq 1 in order to obtain the inhibition parameters with maximum precision.

In order to demonstrate the concept, 12 target compounds (TgCs) were screened for HRP activity inhibition (see the amount of data obtained from each drug target (6 concentrations per drug, 6 different reaction times of TMB, and 6 replicates) involved an accurate analysis of the time-course curves to collect as much information as possible. For that, a data fitting using a basic competitive inhibition-based model was performed and evaluated by the Bayesian information criterion (see Table S1). In the competitive inhibition assay format, the inhibitor vies with the substrate for the free enzyme, but each precludes the binding of the other. The scheme of the model is depicted in Figure 1. This implies that both the inhibitor and

substrate bind to the active site, which is generally true. Thus, the corresponding mathematical expression to describe this reaction mechanism is shown in eq 1.

$$S=S_{Max}+\frac{e^{-(k_{on}+k_{off})t}\left(-S_{Max}\cdot e^{(k_{on}t)}\cdot CK_{eq}\cdot k_{on}+S_{Max}\cdot e^{(k_{off}t)}\left(-k_{on}+k_{off}+CK_{eq}k_{off}\right)\right)}{(1+CK_{eq})\cdot(k_{on}-k_{off})} \quad (1)$$

where S denotes the signal obtained at a certain time (t) and TgC concentration (C).  $S_{Max}$  is the signal at an infinite time,  $K_{eq}$  is the constant of equilibrium for the TgC complex and the free enzyme,  $k_{off}$  is the dissociation rate constant for the TgC complex, and  $k_{on}$  is the rate constant for the formation of the enzymatic product.

The inhibiting capacities of TgCs might be related to their concentration and affinity to the native enzyme, which can be quantified with the parameter  $CK_{eq}$  that equals the inhibitor concentration multiplied by the equilibrium constant. This parameter discriminates potential inhibitors ( $CK_{eq} > 0$ , i.e., favorable HRP–TgC complex formation) from noninhibitors ( $CK_{eq} \approx 0$ , i.e., low HRP–TgC complex formation). Note how low  $CK_{eq}$  values indicate high free enzyme population on the microarray surface, which result in high optical density precipitates (signal). The  $k_{off}$  parameter is a guideline of HRP–TgC binding strength, and the possible release of TgC from the enzymatic active site depends entirely on the nature of the compound, and could be used to discern between reversible ( $k_{off} > 0$ ) and irreversible ( $k_{off} \approx 0$ ) inhibitors. Hence, 216 data per drug target were analyzed to characterize the enzyme inhibitor capacity of each compound in a total time of 40 min.

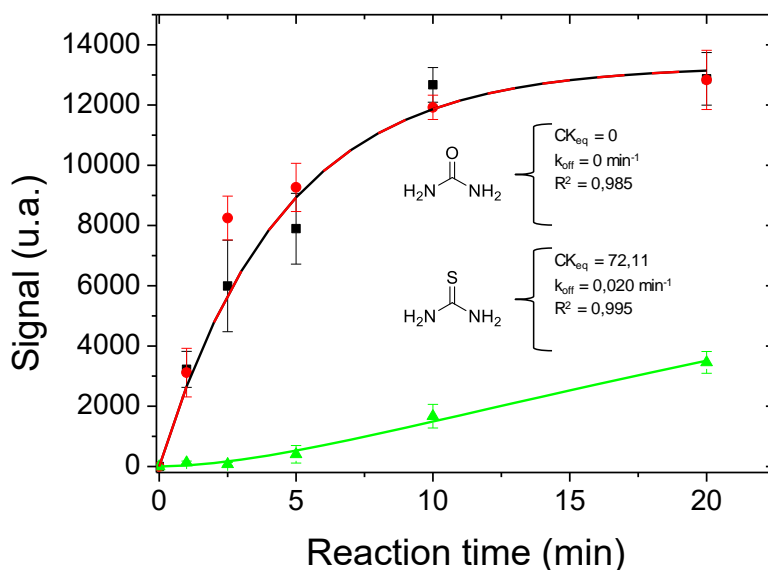
The experimental inhibitor capacity and the accuracy of the mathematical approach in reproducing the screening data are shown in the plots of Figure 1. These inhibition parameters (Table S2) were analyzed in an attempt to decide which of the initial TgC selection hypotheses displayed real importance. After evaluating the  $CK_{eq}$  values for compounds TgC1, TgC5, TgC7, TgC8, TgC9, and TgC11, it was

ruled out that the HRP–TgC complex was not extensively formed and the target substance would not be considered an inhibitor. Thus, only TgC2, TgC3, TgC4, TgC6, TgC10, and TgC12 showed inhibition activity.

Regarding the presence of heteroatoms, the existence of a ketonic oxygen at position 2 on the main aromatic ring did not retrieve any inhibitory behavior (TgC1), nor when a thioureide group (TgC11) was tested. Thus, when comparing the inhibitory capacity of TgC1, 7–9 and 11 to the other targeted compounds, position 2 should be occupied by a sulphur atom in the thione form. The behaviors of TgC1 and TgC11 were ascribed to the distinct electronegative charge distribution for the keto–enol equilibrium in the former, and the impossibility to achieve the corresponding thione–thiol equilibrium in the latter. Although TgC5 had a thioureide group at position 2, no HRP inhibition was recorded. This could be related to the position of the ring substituent, which might not only affect the optimal size distribution of the target substance, but also the inefficient charge interactions of the deprotonated carboxylic group ( $pK_a$  4.7 vs inhibition step pH 7.5) with the amino acid residues located in the enzyme cavity. Besides, the existence of secondary amines at positions 1 and 3 on the aromatic ring was not the only requisite for binding TgC7 to the enzyme active site, nor was there a clear effect of the presence of a methyl residue at position 2 or 3, as occurred with TgC8 and TgC9. The other TgC2–4, TgC6, and TgC10 compounds had a clearer inhibition effect on HRP activity because of the presence of the preferred thione group surrounded by secondary amines (i.e., the thioureide functional group).

TgC6 was tested to ensure that the relative thioureide group position on the aromatic ring was determinant for the interaction with the enzyme. When compared to TgC2, an 8-fold lower inhibitory character was observed for the equivalent experiments at the 10 mM level. Consequently, the position of the thione atoms was concluded to be key.

The presence of propyl-(TgC3) and phenyl-(TgC4) hydrocarbonated substituents on the thiouracil ring was also tested. Results showed that the existence of such pendant moieties could cause steric hindrance during the interaction of these substances with the enzyme, which would hinder their access to the heme cavity and, thus, their inhibitory power compared to TgC2. The interaction seemed, however, more favorable in TgC4 than in TgC3, which was possibly because of the affinity of the phenyl substituent for the hydrophobic environment inside the enzyme cavity.



**Figure 2.** Signal registered from bioimmobilized HRP reaction toward the TMB substrate in the absence [black square] and presence of 5 mM of urea [red circle] or 5 mM of thiourea [green triangle]. The values are the mean of six values. Lines correspond to data fittings to eq 1.

HRP activity was also analyzed by considering the rigidity of the target structure. Here, TgC10 was a less powerful inhibitor compared to TgC4 (3-fold at 0.64 mM),

which was possibly because of the restricted spatial conformation of the phenyl substituent (fused to the principal ring in TgC10, but possessed higher freedom degrees in TgC4). Finally, the substantial inhibitory power of the TgC12 compound was explained after assuming that it possessed the predicted thioureide functional group to bind the HRP heme site with no steric hindrance. This conclusion was confirmed as is shown in Figure 2, which depicts how the thiourea compound is a powerful enzyme inhibitor, while urea is not.

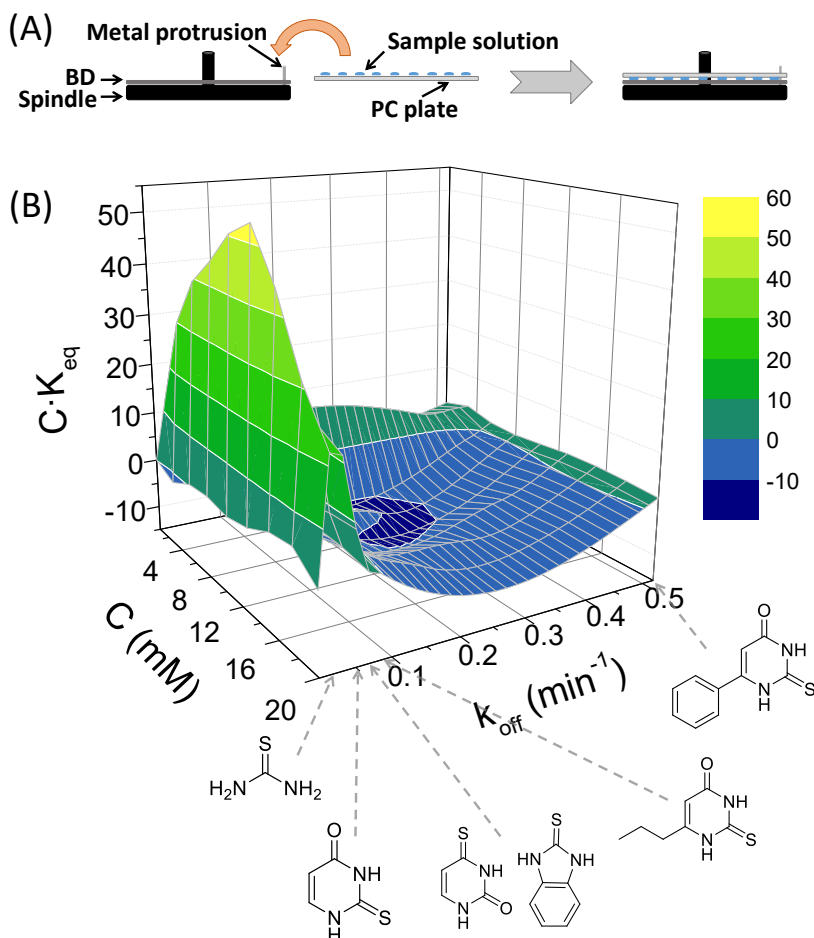
In view of these data, it is possible to state that the exposed screening process exploits the structure–activity ratios to identify promising lead compounds. To this end, each inhibitor candidate was defined by a three-dimensional vector, ( $[TgC]$ ,  $[TgC] \times K_{eq}$ ,  $k_{off}$ ). These vectors considered the concentration ( $[TgC]$  coordinate), inhibitory strength ( $[TgC] \times K_{eq}$  coordinate), and reversibility ( $k_{off}$  coordinate) behaviors of any potential lead compound. Hence, this vector allows active compounds to be identified ( $K_{eq}$  and  $k_{off}$ ) and quantified ( $[TgC]$ ) in only one assay. As mentioned above, this novel vector greatly reduced the occurrence of outlying data points, and generated much more helpful data than those produced by currently available assays. The three-dimensional vector provided information on the structure and inhibitory mechanism of the unknown TgC.

### **Multidrug screening results**

In order to exploit the working capacity of Blu-ray-based microarray technology and the versatility of the three-dimensional vector approach, a multiple high-density microarray format was developed. As shown in Figure S3, 367 arrays of different TgC solutions with four replicates each were performed on a BD, corresponding to a total of 1468 assays (see HTS Experimental Section in Supporting Information). The TgC solutions were previously dropped on a polycarbonate (PC) plate with a pattern that matches with the arrays of HRP immobilized on the BD surface

## Parte experimental y resultados

(Figure 3A). This suggests that, whenever required and depending on the chemical system, a Blu-ray disk surface can be employed as a high-density microarraying platform by covering it with over thousands drops by simply reducing the sample volume, being able to address multiple drug screenings and hit to lead stages.



**Figure 3.** (A) Scheme depicts the protocol to create a drop pattern of 367 different TgC solutions on the Blu-ray surface. (B) Hypersurface generated from the panel of TgCs analyzed as bioimmobilized HRP inhibitors.  $k_{off}$  ( $\text{min}^{-1}$ ), [TgC] (mM) and  $CK_{eq}$  are plotted on the X, Y, and Z axis, respectively.



All these data allow the characterization of multiple TgCs by means of the three-dimensional vector. This information must be processed properly in order to avoid tedious interpretation process. For that, the three-dimension characterization vectors are organized and hierarchized to display the information to the analyst. To do this, the three-dimensional vectors were visualized by means of a 3D graphic hypersurface (Figure 3B). Note that the nD graphic hypersurfaces were traced if the n-dimensional vectors were defined what might increase the sensitivity and selectivity of the screening assay. It is also worth mentioning that n-dimensional vectors might be achieved by measuring more parameters. This treatment allowed the immediate visual grouping of the targeted compounds through the existence of peaks and valleys that enabled the easy analysis of structural-activity ratios. Hypersurfaces locate the hotspot areas of any biochemical system and relate them to the n-dimensional parameters under study<sup>28</sup> to select the most promising lead compound.

As a proof-of-concept, we introduce the hypersurface term using the parameters obtained in the enzyme inhibition study. In a real situation, we should simply perform the same assay, but the selected TgCs could be many more, such as the hypersurface concept supports. Accordingly, Figure 3B shows the hypersurface generated from the panel of TgCs analyzed as bioimmobilized HRP inhibitors. This figure shows a clear peak that was differentiated on the hypersurface located within the  $K_{eq}$  and  $k_{off}$  0.24–47.68 and 0–0.01  $\text{min}^{-1}$  ranges, respectively. For the higher  $k_{off}$  values, a deeper valley covered the area to 0.520  $\text{min}^{-1}$ , when a new land tended to rise. Overall, two hotspot areas were detected to be of great interest for further research. However, the promising lead compound was located very easily on these hypersurfaces by tracking the maxima because this peak corresponded to the most potent inhibitors (high  $K_{eq}$  values). In this demonstration model, the lead compound that predicted the drawn hypersurface was thiourea as previously confirmed. It is possible to say that this drug screening assay might facilitate the interpretation

process, as well as its implementation on a robotic platform for quantitative high-throughput screening in microarray format.

### **Conclusions**

We have developed an enzyme inhibition assay to test the pharmacological potential of several compounds. The results presented herein demonstrate that Blu-ray disk microarray technology allows inhibitor compounds to be discriminated, identified, characterized, and quantified in a single assay. Large amounts of information have been obtained from small sample volumes (more than 200 data points per drug), which have allowed to obtain the parameters that evaluate the binding affinity of the drug and the enzyme. The proposed methodology exploits the information on inhibitory strength and reversibility behaviors of any TgC to identify promising lead compounds.

This approach works well mainly for enzymes that directly convert a substrate into an insoluble reaction product, but it is possible to use indirect developers such as nanoparticles to open the field of applications.

Our development based on Blu-ray technology is a realistic option to optimize physicochemical and biopharmaceutical properties in drug screening through precise measurement of structure–activity ratios with minimal quantities of reagents and time. Besides, its low cost ( $\approx 0.5$  \$/disk), widespread use, and scan speed make the proposed methodology a powerful versatile tool for conducting drug discovery processes, which influences both the work's strategic direction and drives the design of compounds for further synthesis.

### **Experimental section**

**Reagents.** All the buffers (printing carbonate buffer (CB): 0.015 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 0.035 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6; phosphate saline buffer (10 mM PBS buffer, pH 7.5),

---

## Cap. 1: Cribado de fármacos inhibidores de la actividad enzimática

---

prepared from 10- fold concentrated PBS: 80 mM sodium phosphate dibasic, 15 mM potassium phosphate monobasic, 1.369 M sodium chloride and 27 mM potassium chloride, pH 7.5; PBS-T: 10 mM PBS containing 0.05% (v/v) Tween 20 (PBS-T), pH 7.5; citrate buffer (CitB): 25 mM monohydrate citric acid and 62 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5.5; ConA activation buffer (CAB): 100 mM Trizma base, 80 mM glycine, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, and 3 mM MnCl<sub>2</sub>, were prepared with purified water (18.2 MΩ × cm) and filtered through 0.22 μm-pore sized disks (Dassel, Germany) before use.

ConA from *Canavalia ensiformis* type IV, HRP from *Amoracia rusticana* type VI-A, TMB liquid substrate, calcium chloride anhydrous powder 99.99%; manganese(II) chloride anhydrous beads 99.99%; and the enzyme inhibitors (uracil ≥99.0%, 2-thiouracil ≥99.0%, 6-n-propyl-2-thiouracil, 6-nphenyl-2-thiouracil ≥95%, 4-thiouracil 97%, 5-carboxy-2-thiouracil, 2-mercaptobenzimidazole 98%, thiourea ≥99%, imidazole ≥99%, 1-methylimidazole ≥99%, 2-methylimidazole 99%, and 2-methylthio-2-imidazoline hydriodide 99%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The Blu-ray disks (BDs 25 Gbyte) were from MediaRange GmbH (Bad Soden, Germany).

**Experimental Procedure.** ConA stock solution was prepared in activation buffer (CAB) at 4 g/L and kept at -20 °C until use. Con A coating solution (40 mg/L in CB) was spotted (25 nL/spot) on the BDs with the noncontact printing device AD 1500 BioDot Inc. (Irvine, CA, USA) in a microarray format on the Blu-ray surface. To ensure reproducible volume delivery and microprinting quality, dispensing channel pressure, working temperature, and relative humidity were set at steady-state values. Furthermore, the robotic device tip was profusely washed with commercial Bio-Terge AS40 solution (from BioDot Inc.; Irvine, CA, USA) and purified water to ensure optimal printing to avoid crosscontamination. The spots were 250 μm in diameter.

The coated BDs were incubated at 37 °C for 2 h to ensure the physical immobilization (passive adsorption) of the ConA on the surface of the Blu-ray disk.<sup>29</sup> Then, the disk surface was rinsed with PBS-T and distilled water. After that, 1.0 mL of HRP solution (20 mg/L in PBS-T) was dispensed onto the disk and homogeneously distributed using a transparent PC dummy surface. After 30 min incubation, the disk was washed as before. The protein-to-protein binding was characterized by contact angle measurements using the tensile drop method (Figure S1).

The reference activity of the enzyme was measured using a blank solution (1:4 solution (v/v) of dimethyl sulfoxide (DMSO)/PBS without target compound (TgC)). Finally, the enzymatic activity was measured using TMB as a substrate. The optical density of the generated colored precipitate was correlated to the enzymatic activity. To perform the inhibition assay, the TgCs were prepared in a 1:4 solution (v/v) of DMSO/PBS within a concentration range between 0.64 and 20 mM (no influence of DMSO at 25% (v/v) on HRP activity was detected). For that, 40 µL of TgCs were dispensed on each array and allowed to react for 20 min at 37 °C. The disk was then washed with deionized water and dried by centrifugation. Finally, 1.0 mL of TMB solution was homogeneously distributed all over the disk surface using the dummy surface. The disk was incubated for 1–20 min at room temperature. Finally, the disk was rinsed with deionized water and dried by gentle shaking.

**Disk Drive Imaging.** The operational principle of microarray disk reading and image analysis has been previously reported based on the quantification of the different reflectivities shown between sensing objects (in this case, the TMB blue solid product generated on ConA/HRP recognition events) located on the disk surface, and the disk surface itself.<sup>30</sup> A standard BD-player, which operated with a laser beam  $\lambda = 405$  nm, was used as the detector (LG Electronics; Englewoods, NJ, USA). A photosensor (EE-SY125), which included a  $\lambda = 950$  nm infrared LED

(Omron, Scahumburg, IL, USA), was integrated into the device to trigger data acquisition. A photodiode converted back-reflected light into an analogy electrical signal that was collected and amplified by a custom-built data acquisition board. The analogy signal correlated to the optical density of the reaction product, that is, analyte concentration. The BD drive's spatial resolution and scanning speed were monitored by the Nero Disc Speed V4 software from Nero Inc. (Glendale, CA, USA). In order to control data acquisition (sampling rate, detector gain, etc.), custom software (BioDisc) was used, which allowed the image to be exported to a grey scale code to a compressed tiff or bitmap format for data analysis.

### Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the European Region Development Fund under award reference: CTQ2016-75749-R.

### References

1. Hughes, J.P.; Rees, S.S.; Kalindjian, S.B.; Philpott, K.L. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *162*, 1239–1249.
2. Stout, S.J.; Horvath, C.R.; Vickers, C.; Zhang, J.-H.; Wang, Y.K.; Kenney, K.L.; Kaushik, V.; Hubbard, B.; Ho, P.-I.; Roddy, T.P. Mass spectrometric techniques for label-free high-throughput screening in drug discovery. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8207–8213.
3. Smith, A. Sreening for drugs discovery: The leading question. *Nature* **2002**, *418*, 453–459.
4. Lombardino, J.G.; Lowe, J.A. The role of the medicinal chemist in drug discovery — then and now. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 853–862.

5. Thrithamarassery Gangadharan, N.; Venkatachalam, A.B.; Sugathan, S. High-Throughput and In Silico Screening in Drug Discovery. In *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology*; Springer: Singapore (Singapore), 2017, pp. 247–273; ISBN 978-981-10-3571-5.
6. Miller, O.J.; Harrak, A.E.; Mangeat, T.; Baret, J.-C.; Frenz, L.; Debs, B.E.; Mayot, E.; Samuels, M.L.; Rooney, E.K.; Dieu, P.; et al. High-resolution dose-response screening using droplet-based microfluidics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 378–383.
7. Lu, C.; Li, A.P. *Enzyme inhibition in drug discovery and development : the good and the bad*; Wiley: New Jersey (USA), 2010, pp. 868; ISBN 9780470538951.
8. Ekins, S.; Ring, B.J.; Grace, J.; McRobie-Belle, D.J.; Wrighton, S.A. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44*, 313–324.
9. Kenakin, T.P. Enzymes as drug targets. In *Pharmacology in Drug Discovery and Development*; Elsevier: London (United Kingdom), 2017, pp. 131–156; ISBN 9780128037522.
10. Khnouf, R.; Olivero, D.; Jin, S.; Coleman, M.A.; Fan, Z.H. Cell-free expression of soluble and membrane proteins in an array device for drug screening. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7021–7026.
11. Copeland, R.A.; Harpel, M.R.; Tummino, P.J. Targeting enzyme inhibitors in drug discovery. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11*, 967–978.
12. Supuran, C.T. Advances in structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opin. Drug Discov.* **2017**, *12*, 61–88.

13. Chae, M.-S.; Yoo, Y.K.; Kim, J.; Kim, T.G.; Hwang, K.S. Graphene-based enzyme-modified field-effect transistor biosensor for monitoring drug effects in Alzheimer's disease treatment. *Sens. Actuators B* **2018**, *272*, 448–458.
14. Kong, W.; Wu, D.; Hu, N.; Li, N.; Dai, C.; Chen, X.; Suo, Y.; Li, G.; Wu, Y. Robust hybrid enzyme nanoreactor mediated plasmonic sensing strategy for ultrasensitive screening of anti-diabetic drug. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *99*, 653–659.
15. Wang, X.; Zhang, Y.; Yang, Y.; Wu, X.; Fan, H.; Qiao, Y. Identification of berberine as a direct thrombin inhibitor from traditional Chinese medicine through structural, functional and binding studies. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44040.
16. Akins, N.S.; Nielson, T.C.; Le, H. V. Inhibition of glycolysis and glutaminolysis: an emerging drug discovery approach to combat cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* **2018**, *18*, 494–504.
17. Rath, C.M.; Benton, B.M.; de Vicente, J.; Drumm, J.E.; Geng, M.; Li, C.; Moreau, R.J.; Shen, X.; Skepper, C.K.; Steffek, M.; et al. Optimization of CoaD inhibitors against gram-negative organisms through targeted metabolomics. *ACS Infect. Dis.* **2018**, *4*, 391–402.
18. Eu, V.T.; Lowe, C.R. Holographic enzyme inhibition assays for drug discovery. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7579–7589.
19. Marsh-Armstrong, B.; Fajnzylber, J.M.; Korntner, S.; Plaman, B.A.; Bishop, A.C. The allosteric site on SHP2's protein tyrosine phosphatase domain is targetable with druglike small molecules. *ACS Omega* **2018**, *3*, 15763–15770.
20. Shahzad-ul-Hussan, S.; Saeed, M.; Batool, F.; Mansoor, H.J.; Saleem, H.N.

- Inhibition of dengue virus protease by eugenin, isobiflorin, and biflorin isolated from the flower buds of *syzygium aromaticum* (cloves). *ACS Omega* **2019**, *4*, 1525–1533.
21. Lu, H.; Tonge, P.J. Inhibitors of FabI, an enzyme drug target in the bacterial fatty acid biosynthesis pathway. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 11–20.
  22. Morais, S.; Tortajada-Genaro, L.; Maquieira, Á. Array-on-a-disk? How Blu-ray technology can be applied to molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2014**, *14*, 773–775.
  23. Arnandis-Chover, T.; Morais, S.; González-Martínez, M.Á.; Puchades, R.; Maquieira, Á. High density microarrays on Blu-ray discs for massive screening. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *51*, 109–114.
  24. Arrabito, G.; Pignataro, B. Inkjet printing methodologies for drug screening. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3104–3107.
  25. Saleemuddin, M. Bioaffinity based immobilization of enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1999**, *64*, 203–226.
  26. Pandey, B.; Tan, Y.H.; Fujikawa, K.; Demchenko, A. V; Stine, K.J. Comparative study of the binding of concanavalin a to self-assembled monolayers containing a thiolated  $\alpha$ -mannoside on flat gold and on nanoporous gold. *J. Carbohydr. Chem.* **2012**, *31*, 466–503.
  27. Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Disc-based microarrays: principles and analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 4523–4534.
  28. Avella-Oliver, M.; Gimenez-Romero, D.; Morais, S.; González-Martínez, M.Á.; Bueno, P.R.; Puchades, R.; Maquieira, Á. INSEL: an in silico method for optimizing and exploring biorecognition assays. *Chem. Commun.* **2013**,



49, 10868–10870.

29. Rusmini, F.; Zhong, Z.; Feijen, J. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1775–1789.
30. Badran, A.A.; Morais, S.; Maquieira, Á. Simultaneous determination of four food allergens using compact disc immunoassaying technology. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 2261–2268.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

# Enzyme Inhibition Microassays on Blu-ray Disks for Drug Discovery

Gabriel Sancho-Fornes, Ernest Peris, David Giménez-Romero, Sergi Morais,  
and Ángel Maquieira

### Screening criteria

As depicted in Figure 2C, the uracil (TgC1) was the only compound without a thioketone group in position 2, showing carboxylic oxygen instead. This would differentiate its chemistry from the 2-thiouracil (TgC2), its closest structural companion in the uracil family. As for the presence of substituents, the 6-propyl-2-thiouracil (TgC3), the 6-phenyl-2-thiouracil (TgC4) and the 5-carboxy-2-thiouracil (TgC5) compounds may provide information on spatial hindrance related to residue positions and dimensions. Besides, TgC5 would also retrieve knowledge on the influence of a charged carboxylic acid in the interaction with the HRP active site. Finally, the 4-thiouracil (TgC6) compound was tested in order to ascertain that the inhibition activity was not just related to the presence of a sulfur atom but to its relative position within the molecular structure. As for the imidazoles family, the absence of sulfur or oxygen in position 2 would help with interpretation of the relative importance of the secondary amine groups to the heteroatom. In case compound (TgC7) inhibited the HRP activity, the test with 1-methylimidazole (TgC8) would suggest the necessity of amine hydrogens in the interaction with the enzyme. Regarding 2-methylimidazole (TgC9) the existence of a methyl substituent in position 2 could allow finding out spatial accommodation restrictions of the compounds to the enzyme cavity. The 2-mercaptobenzimidazole (TgC10) and the 2-methylthio-2-imidazoline (TgC11) compounds were chosen to evaluate the

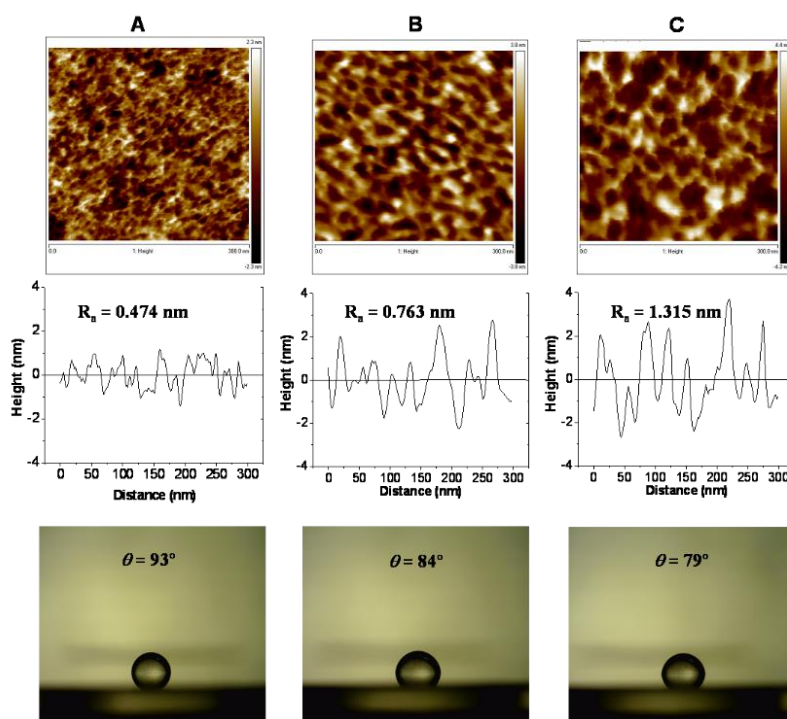
behavior of chemically distinct sulfur atoms (thioketone and thioether) in HRP inhibition. Also, TgC10 seemed interesting as both benzyl and thioimidazole rings were fused in a more rigid structure compared to TgC4, which could retrieve data on the flexibility requirements of the target compounds (TgC) to bind HRP. Finally, the thiourea (TgC12) was studied as it possessed the essential heteroatom arrangement and small dimensions that would reduce the HRP activity.

Nonlinear regression was employed to fit different models to the experimental data. These models always depended on two independent variables (time and inhibitor concentration). Thus, and according to criteria found on information theory, we propose the data fitting by a basic model of competitive inhibition. Table S1 shows the properties and diagnostics of the selected model.

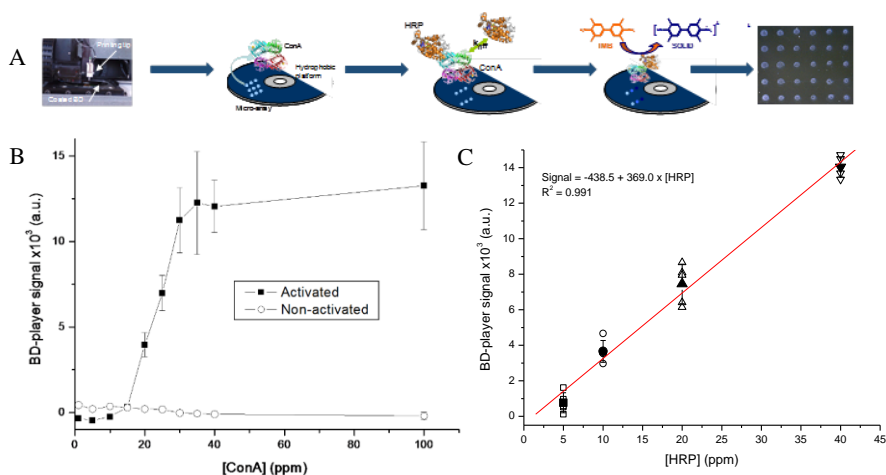
### **HTS experimental section**

In the microarray assay, sample solutions were deposited (3  $\mu\text{L}$  each) on a transparent polycarbonate dummy disk (PC) at the desired positions using a template. Both the PC and BD were accurately drilled on their outer rims to achieve 1.2 mm-diameter holes ensuring that each TgC solution would match the corresponding microarray. Besides a plastic spindle of disks, which incorporated a 1 mm-diameter metal protrusion on its outer rim was used as a mechanical guide to allow the loaded PC and BD disks to come into contact. Briefly, the microarrayed BD was inserted upwardly through its 1.2 mm-hole into the spindle, and the sample-loaded disk was flipped to accomplish a sandwich-type disposition. Note that the hydrophobic nature of the BD surface and a 1 mm-thick divider piece placed between the PC and the BD disks avoid undesired sample drops mixtures and cross-contaminations. The reaction was performed for 20 minutes at 37 °C. The disk was removed from the spindle, and was washed with deionized water and dried. Enzymatic signal amplification was displayed using TMB as a substrate for the

generation of a stable precipitate (Figure S1). For this purpose, 1.0 mL of TMB solution were uniformly distributed all over the disk surface using a PC plate. The disk was incubated for 1-20 minutes at room temperature. Finally, the disk was rinsed with deionized water and dried by gentle shaking. The data analysis was performed as previously described (T. Arnanadis-Chover et al. Biosens. Bioelectron. 2014, 51, 109-114). The results were directly loaded into an application function to create a 9 x 32 matrix with the obtained experimental data ( $CK_{eq}$  and  $k_{off}$ ) in order to represent a 3D graphic hypersurface.



**Figure S1.** Roughness (top images and diagrams; measured with a Veeco Multimode AFM) and hydrophobicity (lowest images; measured with a DinoLite 4M413MZT Optic microscope) characterization of (A) a bare BD surface (B) after ConA coating and (C) HRP bio-immobilization.



**Figure S2.** (A) Scheme of the development of a bio-capture event by contacting the surface anchored HRP enzyme with the TMB substrate on disk hydrophobic surface. (B) BD-player signal corresponding to the ConA/HRP system developed with TMB as a function of activated (●) and non-activated (○) ConA concentration. Lastly, it shows (C) the signal evolution of a ConA/HRP system after developing with TMB as a function of the HRP concentration.



**Figure S3.** Image of the Blu-ray disk used in the high throughput screening microassay (367 arrays of 2 x 2 spots).

**Table S1.** Properties and diagnostics of the proposed model of competitive inhibition.

<b>Compound</b>	<b>AIC</b>	<b>BIC</b>	<b>R-squared</b>	<b>Adjusted R-Squared</b>
TgC1	635.6	640.4	0.988	0.987
TgC2	633.0	637.8	0.979	0.978
TgC3	640.5	645.3	0.984	0.983
TgC4	440.1	443.6	0.972	0.969
TgC5	451.1	454.6	0.961	0.957
TgC6	630.5	635.2	0.987	0.986
TgC7	672.2	677.0	0.963	0.960
TgC8	673.8	678.5	0.961	0.958
TgC9	675.7	680.4	0.953	0.950
TgC10	666.4	671.2	0.960	0.955
TgC11	662.1	666.8	0.970	0.968
TgC12	627.5	632.2	0.816	0.805

Abbreviations “AIC” for Akaike information criterion and “BIC” for Bayesian information criterion.

## Cap. 1: Cribado de fármacos inhibidores de la actividad enzimática

**Table S2.**  $CK_{eq}$  and  $k_{off}$  parameters represent the values obtained from the HRP activity (Data shown in Figure 1).

Compound	$CK_{eq}$						$k_{off} \pm sd$
	0.64 mM	1.25 mM	2.5 mM	5 mM	10 mM	20 mM	( $\text{min}^{-1}$ )
TgC1	0.06	0.05	0.02	0.03	0.04	0.07	0
TgC2	0.21	0.30	0.48	0.87	4.03	7.15	0.054±0.018
TgC3	0.30	0.21	0.94	0.31	0.23	0.36	0.084±0.008
TgC4	1.39	1.84	4.60	ns	ns	ns	0.52±0.09
TgC5	0.15	0.09	0.14	0.10	ns	ns	0
TgC6	0.16	0.17	0.33	0.27	0.50	0.50	0.076±0.018
TgC7	0.08	0.12	0.06	0.11	0.14	0.18	0
TgC8	0.10	0.12	0.11	0.13	0.13	0.13	0
TgC9	0.12	0.19	0.17	0.18	0.24	0.24	0
TgC10	0.43	0.54	0.61	0.65	0.71	0.69	0.08±0.03
TgC11	0.18	0.13	0.13	0.15	0.15	0.09	0
TgC12	11.32	20.63	25.01	34.45	47.68	-	0.018±0.011

“ns” stand for not soluble (i.e. restricted TgC solubility in the PBS-DMSO buffer).

Mean values calculated from six replicates

### **Conclusiones**

En este estudio se ha desarrollado una prueba de concepto para abordar las etapas iniciales en el desarrollo de fármacos, desde la metodología, el formato y la plataforma de ensayo, hasta el tratamiento de datos. Para ello, se inmoviliza la enzima diana y se realiza un cribado de diferentes candidatos, 12 en este caso, para seleccionarlos según su capacidad farmacológica, determinando e identificando aquellos compuestos con mayor potencial. Además, para analizar la gran cantidad de datos generados se ha diseñado una metodología basada en la creación de hipersuperficies a partir de los parámetros obtenidos del estudio.

Todo ello se ha llevado a cabo utilizando un disco Blu-ray como plataforma de ensayo y un lector de discos para la obtención de los resultados. Además, los ensayos se realizan sin emplear marcadores, ya que en la concepción de la estrategia de trabajo se estableció el uso de un sustrato enzimático que genera un producto detectable por el sistema de interrogación.

La capacidad de trabajo alcanzada ha sido muy elevada. Además, los buenos resultados obtenidos, la versatilidad y la fiabilidad del sistema de detección, junto a los bajos costes, tanto de los equipos como de los consumibles, hacen que esta tecnología pueda aplicarse al cribado de alto rendimiento de fármacos como estudio preliminar, o en laboratorios con pocos recursos técnicos o económicos.

Este trabajo introduce con éxito la tecnología de disco compacto en el campo del desarrollo de fármacos, permite el estudio de centenares de analitos en un solo disco y la obtención de información relacionada con su actividad farmacológica de una forma rápida e intuitiva, a partir de la metodología de análisis de resultados desarrollada *ad-hoc*.



## Capítulo 2

### Análisis en dominio de frecuencias en biosensado óptico





### **Introducción**

El ruido (*background*) en los biosensores ópticos puede ser debido a diferentes factores, como la inestabilidad de la fuente de alimentación e iluminación, el registro de la señal óptica, el tratamiento de señal o incluso irregularidades del sustrato donde se realiza el sensado. Una estrategia habitual para la reducción de este ruido es el filtrado digital. Sin embargo, no se ha conseguido una reducción eficiente del mismo y su uso requiere llevar a cabo estudios previos para establecer los parámetros del filtrado.

Cuando el registro espacio-temporal es analizado en dominio de frecuencias, la aportación a la señal del ruido aparece, habitualmente, en frecuencias altas. El patrón de los ensayos realizados puede ser diseñado para que tengan una periodicidad determinada cuya señal en dominio de frecuencias tenga la frecuencia deseada. De este modo, se pueden modular los ensayos para que su señal tenga una frecuencia distinta al ruido del sistema, eliminando la contribución no deseada del mismo.

En este capítulo se trata el diseño e implementación de una metodología basada en el análisis en dominio de frecuencias que reduzca el ruido en los biosensores ópticos y, por consiguiente, mejore sus prestaciones. En el trabajo titulado “*Enhancing the sensitivity in optical biosensing by striped arrays and frequency-domain analysis*” se realizan los ensayos con un patrón periódico en forma de franjas, similar a un “paso de cebra” micrométrico. Estas franjas tienen unas dimensiones que propician que al ser escaneadas se genere una señal sinusoidal. Esta señal, al ser analizada en dominio de frecuencias, se concentra en un único pico a la frecuencia deseada, separada del ruido del sistema. La metodología puede aplicarse a cualquier biosensor óptico basado en la generación de imágenes. En nuestro caso, se ha puesto a punto en DVD, escaneando los discos siguiendo una

espiral, lo que genera una imagen idónea para realizar el análisis en dominio de frecuencias de las señales obtenidas en un inmunoensayo.

El trabajo se ha abordado en las siguientes etapas:

- Simulación de varios tipos de señal periódica y su correspondiente espectro en dominio de frecuencias.
- Diseño y optimización de un patrón periódico de franjas (disposición, número, dimensiones, etc.) y selección de los materiales para su fabricación.
- Estudio del efecto de los errores sistemáticos y aleatorios en la señal obtenida mediante el análisis en dominio de frecuencias.
- Determinación y comparación de los parámetros analíticos para un inmunoensayo en formato *microarray*, *microarray* filtrado y el análisis en dominio de frecuencias.
- Aplicación de esta metodología a ensayos reales.



Contents lists available at [ScienceDirect](http://ScienceDirect)

Sensors and Actuators B: Chemical

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/snb](http://www.elsevier.com/locate/snb)



## Enhancing the sensitivity in optical biosensing by striped arrays and frequency-domain analysis

Gabriel Sancho-Fornes,<sup>a</sup> Miquel Avella-Oliver,<sup>a</sup> Javier Carrascosa,<sup>a</sup> Sergi Morais,<sup>a,b</sup> Rosa Puchades,<sup>a,b</sup> and Ángel Maquieira<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Universitat Politècnica de València, Universitat de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain.

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain.

Reprinted from **Sensors & Actuators: B. Chemical**, 2019, 281, 432-438.

Copyright © 2013, with permission from Elsevier

### Abstract

An approach to enhance the sensitivity of optical biosensors is developed. It is based on patterning strips of biochemical probes and signal processing (frequency-domain analysis, FDA) to the resulting analytical data after a biorecognition assay. This paper introduces FDA, demonstrates for the first time its potential in real bioanalytical systems, describes its critical parameters, and discusses how to optimize them to efficiently exploit this approach for optical biosensing. The results show that FDA enables for the selective identification and removal of the undesired

noise contributions from the analytical signal arising from a biorecognition event of interest, thus increasing signal-to-noise ratios and, therefore, enhancing the sensitivity of the analysis. In this study, we proof the concept with a model immunoassay system for IgGs detection (BSA/anti-BSA) that achieves a sensitivity enhancement of up to 3 orders of magnitude, and then FDA is also demonstrated in a sandwich immunoassay to quantify casein that reaches a limit of detection of 4 ng/mL (174 pM). Beyond these particular assays, this work also addresses to stablish the basis of this approach and to provide keys to stimulate future developments that expand the potential of FDA to other biorecognition assays, transduction systems, and applications.

**Keywords:** Optical biosensor, frequency-domain analysis, sensitivity enhancement, immunoassay, casein.

### 1. Introduction

Biosensors are booming due to their advantages and performances,<sup>1-3</sup> as well as their capability to comply the ASSURED (affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid and robust, equipment free, and deliverable to end users) criteria outlined by the World Health Organization.<sup>4</sup> As in any measurement science, analyzing biorecognition events is also susceptible to signal contributions from external physicochemical sources (noise) which dramatically decreases the sensitivity and reliability of the analysis.<sup>5</sup> Therefore, in addition to optimize the biochemical parameters of the assay,<sup>6,7</sup> effective approaches to identify and discriminate the analytical signals of interest are crucial to reach maximal performances in biosensing.<sup>8</sup>

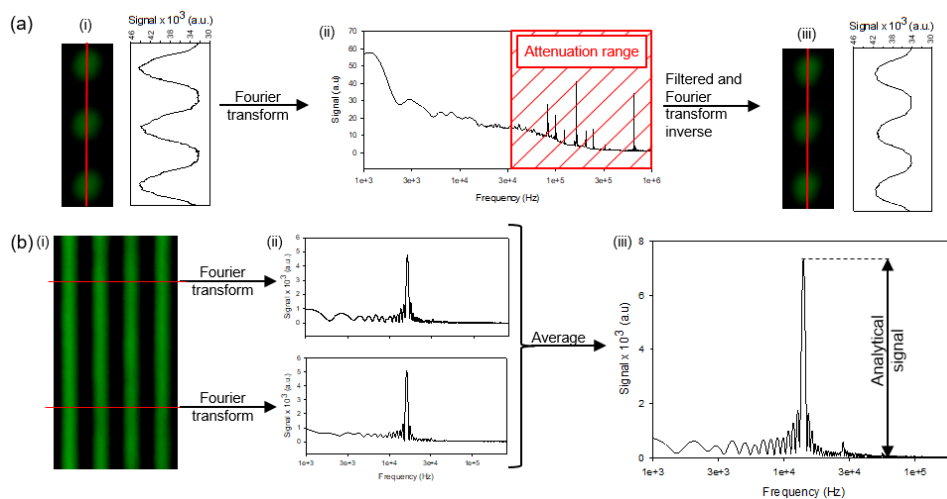
Digital filtering (DF) is a widely employed strategy to address this issue in bioanalytical systems,<sup>8,9</sup> especially its implementation based on the Fourier transform.<sup>10-12</sup> As schematized in Fig. 1a, Fourier transform filters convert the image

scanned after the biointeraction into its corresponding frequency counterpart. Then, frequency signals within a selected spectral range (ideally containing the major noise contributions) are attenuated, and the filtered data is finally transformed back to an image. Though offering good solutions for many analytical applications, these DF strategies keep considerable undesired noise contributions in the resulting data. Moreover, the proper use of DF in chemical analysis typically requires specific studies to identify the threshold filtering conditions above which desired physicochemical information is not removed together with the noise.<sup>9</sup>

Herein, we present frequency-domain analysis (FDA) as a tool to enhance sensitivity in biorecognition assays by effectively identifying the analytical signals coming from the biointeractions of interest and discriminating them from every noise contribution. As schematized in Fig. 1b, FDA relies on patterning (on solid substrates) biorecognition assays as straight and equidistant strips, which generate periodic signals when they are scanned. These periodic signals become unified in a single frequency peak when they are converted into their frequency counterpart using the Fourier transform, whereas undesired contributions are spread along the spectrum. Therefore, by using the intensity of the resulting peak as analytical magnitude, noise can be efficiently discriminated in order to analyze biointeractions in a more sensitive fashion. Schaefer and Chau explored this strategy to discriminate voltage fluctuations in an ink-based optical system.<sup>13</sup> Hereinafter, we introduce for the first time FDA for biochemical analysis, describe and discuss the key parameters for its implementation, and experimentally demonstrate the performance improvement provided by this methodology.

Although not directly addressed in this study, it is worth mentioning that the capability of FDA to selectively discriminate the signals coming from the biointeraction of interest, could also be useful to minimize artifacts coming from nonspecific binding in prospective developments.<sup>14</sup> Since the adsorption of

nonspecific binding agents tends to present a random (not periodic) distribution along the assay surface, it should display a negligible contribution in the resulting frequency spectrum. Therefore, similarly to the concept behind focal molography and diffraction-based sensing,<sup>15–18</sup> this phenomenon could also be potentially exploited by FDA to solve nonspecific binding problems typically observed in the analysis of complex biological matrixes.



**Figure 1.** Scheme of the signal processing approaches studied in this work. (a) Fourier digital filtering: (i) scanned raw microarray image and its cross section, (ii) the corresponding frequency spectrum obtained by Fourier transform, which is filtered to attenuate high-frequency contributions, and (iii) the resulting filtered microarray image and its cross section. (b) FDA approach: (i) scanned image of the patterned assay strips, (ii) two exemplary frequency spectra of single data rows, and (iii) the resulting frequency spectrum generated by averaging the one of every data row.

On the other hand, FDA is also potentially compatible with any bioanalytical approach based on imaging or scanning biorecognition assays on solid substrates.



As a proof of concept, in this paper we implement it in colorimetric biorecognition assays patterned on standard compact disks (as analytical platforms) analyzed by a disk drive tailored to scan the assay response. This is an inexpensive and high-throughput sensing strategy,<sup>19,20</sup> herein selected to provide insights into the point-of-care potential of FDA.

As biorecognition assays, in this paper we first address a model immunoassay based on bovine serum albumin to quantify specific IgGs, a well-known system typically used in bioanalysis and herein selected to enhance the representativeness of this study.<sup>21</sup> Then, FDA is also applied to a sandwich immunoassay to determine casein. Casein is a family of related phosphoproteins that represents about 80% of the protein content in milk, whose predominant proteins have a molecular weight of approximately 23 KDa. It is estimated that 0.6–2.5% of children and 1% of adults have some form of allergy towards dairy products,<sup>22</sup> which supports the importance of the quantification and standardization of this target protein. Moreover, both non-processed and digitally filtered (Fourier filter) microarrays are used along the study as reference approaches typically used in the field, in order to compare performances and demonstrate the potential of the new approach herein presented.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Carbonate buffer (50mM sodium carbonate, pH 9.6), PBS-T (8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.4), and washing solutions were filtered through a 0.22 μm pore size membranes before use. Bovine serum albumin (BSA), anti-BSA polyclonal antibodies produced in rabbit, gold labeled antirabbit polyclonal antibodies produced in goat (GAR-Au), casein, and silver enhancer solutions were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Anti-casein and HRP-conjugated anti-casein monoclonal mouse antibodies were

kindly provided by Ingenasa S.A. (Madrid, Spain). Tetramethylbenzidine (TMB) substrate was from SDT GmbH (Baesweiler, Germany). Bulk DVD-R disks were purchased from MPO Ibérica (Madrid, Spain). DVD drive (LG HL-DT-ST DVD-RAM GSAH42 N) was from LG Electronics Inc. (Englewood Cliffs, NJ, USA). Silicone-Free adhesive plastic film was purchased from Ultron Systems, Inc (Moorpark, CA, USA). Matt black PVC adhesive sheets were supplied by Aironfix – Eon Paper S.L (Manresa, Spain). Bungard CCD drilling machine was from Bungard (Karo, Germany).

### **2.2. Incubation masks**

To perform the striped patterning of biorecognition assays required for FDA, we developed custom adhesive incubation masks containing striped chambers, to be attached on the assay substrate (Figs. 2a and S1). For that, PVC adhesive sheets and silicone-free adhesive plastic films were cut into 12 x 12 cm squares, and they were attached to the non-adhesive part of silicone-free film. The PVC part of this two-layer structure was used to confer firmness to the mask, whereas the silicone-free adhesive plastic was selected since it does not leave residues on the substrate material after its removal. Note that in this case, mask residues on the substrate would have same pattern as the striped assay, thus altering the result of the analysis. The masks were patterned with 10 sets of 15 strips each using the drilling machine with a 500  $\mu\text{m}$  diameter tungsten carbide drill (feed speed of 800  $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$  and rotational rate of 30,000 rpm). The configuration of the masks was designed to generate a set of parallel strips in the resulting scanned image, considering that the employed disk drive scans the platform by following a spiral track at constant linear velocity.

### **2.3. BSA immunoassay**

First, a model immunoassay based on BSA as probes and IgGs as targets was used in this study. For the microarray approach, BSA solutions (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in carbonate buffer) were arrayed (40 nL/spot) on the polycarbonate surface of DVDs using a noncontact printer (AD 1500 Bio-Dot, Inc, Irvine, CA, USA) under controlled temperature and relative humidity (25 °C and 95%, respectively). On the other hand, to pattern the assays as strips, 1 mL of BSA (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in carbonate buffer) was dispensed onto the disk and distributed using a dummy polycarbonate plate (12 cm diameter, 0.6mm thick). To attach the proteins on the polycarbonate surface by physical immobilization (passive adsorption),<sup>23</sup> in both cases BSA solutions were incubated for 3 h at room temperature, and then the disk was washed with PBS-T, rinsed with deionized water, and dried by centrifugation. Afterwards, in the strips patterning protocol, incubation masks were placed onto the disk and a slight pressure was applied in order to attach them.

To perform the selective IgG biorecognition, anti-BSA solutions in PBS-T (40  $\mu\text{L}/\text{array}$  in microarrays and 300  $\mu\text{L}/\text{strip}$  set in FDA) were incubated (20 min, room temperature) in concentrations ranging from 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 31.6  $\text{pg}/\text{mL}$  by serial dilutions of 1/100.5, including 0  $\text{ng}/\text{mL}$ . After this incubation, the assay platforms were rinsed with PBS-T, deionized water, and dried by centrifugation. Then, 1 mL of GAR-Au (1/200 dilution in PBS-T) was dispensed onto the disk, distributed using a dummy polycarbonate plate, incubated for 20 min at room temperature, and washed and dried again. Finally, 1 mL of silver enhancer solution was dispensed onto the disk and distributed as before. After 5 min at room temperature, the disk was washed with deionized water and dried by centrifugation. As a result, insoluble silver precipitates whose surface concentration depends on the magnitude of the biointeraction, are obtained on the assay surface. Real images of exemplary platforms after both microarray and striped assays are shown in Fig. S2.

### **2.4. Casein immunoassay**

An immunoassay based on antibodies as probes and casein as target was also studied in this work. To pattern microarrays for this immunoassay, monoclonal anti-casein antibody solutions (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in carbonate buffer) were arrayed (40 nL/spot) on the polycarbonate surface of DVDs using the noncontact printer under controlled temperature and relative humidity (25  $^{\circ}\text{C}$  and 95%, respectively). To pattern as strips, 1 mL of monoclonal anti-casein antibody solution (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in carbonate buffer) was dispensed onto the disk and distributed using a dummy polycarbonate plate. In both cases, the disks were incubated overnight at 4  $^{\circ}\text{C}$ , and then rinsed with PBS-T and deionized water, and dried by centrifugation.

Afterwards, casein solutions (40  $\mu\text{L}/\text{array}$  for microarrays and 300  $\mu\text{L}/\text{strip}$  set for FDA) ranging from 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 100  $\text{pg}/\text{mL}$  in PBST and blanks, were incubated for 20 min at room temperature in both cases. Then, the disks were washed, rinsed, and dried as before. Next, 1 mL of HRP-conjugated anti-casein antibodies (1/20000 dilution in PBS-T) was dispensed onto the disk and distributed using a dummy polycarbonate plate, incubated for 20 min at room temperature, and washed and dried again. Finally, 1 mL of TMB substrate solution was dispensed onto the disk and distributed as before. After 8 min at room temperature, the disk was washed with deionized water and dried by centrifugation. In this case, insoluble dark blue immunoreaction products are generated on the assay surface, whose magnitude is proportional to the concentration of casein.

### **2.5. Disk drive imaging**

The DVD drive used in this study as analytical scanner was controlled by custom software (BioDisk) running on a personal computer. As described elsewhere,<sup>19</sup> the reading process relies on a focused laser beam that scans the disk following a spiral trajectory at linear velocity, which adsorbs and scatters light when it hits the immunoreaction products. This interaction causes variations in the intensity of the reflected laser beam, and these light attenuations correlate with the analyte

concentration. Finally, the drive converts these analog signals into binary, and they are sent to the computer and arranged as images.

### **2.6. Microarray data processing**

As commented before, in this study we assessed FDA by comparing its performance with both raw and digitally filtered (DF) microarrays as reference methods. Raw microarray images were directly generated by the disk drive imaging system, as described above. On the other hand, to obtain the DF microarrays, raw images were processed with a custom Matlab function (MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) to apply the Fast Fourier transform and process their frequency spectra, as schematized in Fig. 1a. Different threshold filtering values were assessed, which removed nearly half of the noise and kept close to constant assay signals (Table S1), thus improving the sensitivity of the system. From these results, 100 KHz was selected as a threshold filtering value to attenuate the high-frequency noise in DF microarrays.

GenePix software (Axon Inst, Union City, CA, USA) was used to quantify signals of both raw and DF microarrays. Analytical signals of each array were calculated by averaging the intensity of all the replicated microarray spots and subtracting their background. Noise values were experimentally obtained as the standard deviation of 10 blank replicates (0 ng/mL of target), and signal-to-noise ratios (SNR) were calculated by dividing the signal of each assay between its noise.

### **2.7. FDA data processing**

Scanning the biorecognition assays patterned as strips on the assay surface leads to images constituted by sets of parallel lines, as observed in Fig. 1b(i) and 2. To process these images, they were first cropped into 15mm width and 4mm height rectangles with Photoshop CS4 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). Next, a

custom Matlab algorithm was used to apply the Fast Fourier transform to the scanned images, in order to obtain the frequency spectrum of every data row (Fig. 1b(ii)) and to average all of them in a single one, from which using the height of the resulting peak as analytical signal (Fig. 1b(iii)). In the FDA approach, experimental noise values were calculated as the standard deviation of the peak intensity of ten blank replicates.

The employed Matlab algorithm also transforms the magnitude in the horizontal axis of the resulting frequency spectra, from frequency to period (distance). This transformation enables to visualize the resulting FDA peak centered in the period value in which the striped biorecognition assays are patterned. In this system, the correlation of frequency and period is described by the equation below:

$$Period = \frac{\text{sampling rate} \times \text{resolution}}{\text{frequency}} \quad (1)$$

where sampling rate is the number of measurements per time unit took by the scanning system, and resolution is the length of the assay substrate scanned by each one of these measurements. The sampling rate and the resolution of the disk drive scanner employed in this study are 2000 KHz and 6.98  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , respectively. As a result, with the incubation mask herein developed, FDA signals were mainly concentrated at 13,918 Hz in frequency, which corresponds to 1mm in period.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. FDA parameters

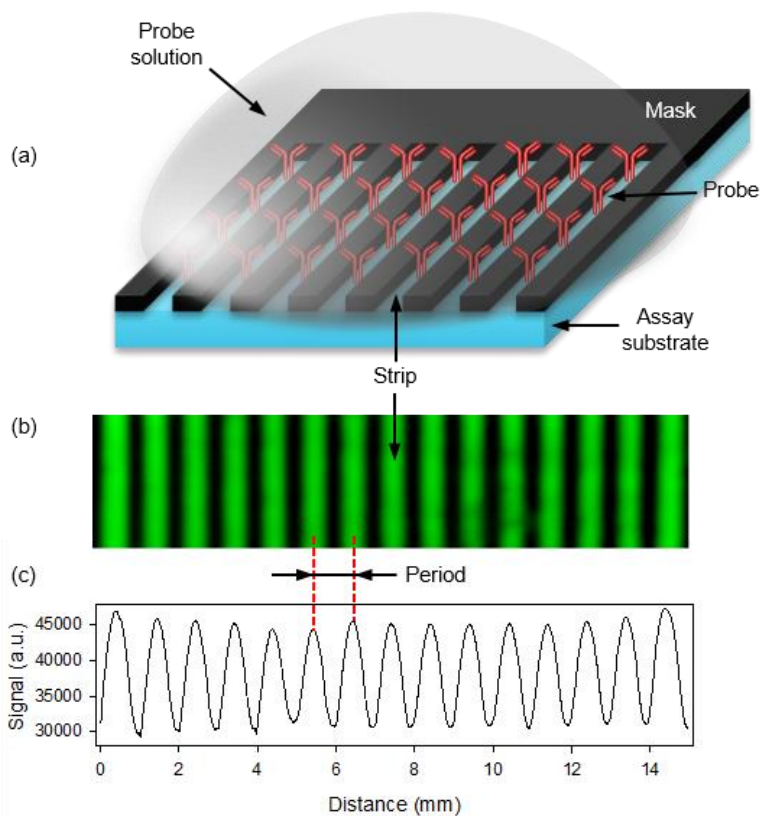
In this section we describe the main parameters that affect FDA and discuss how to deal with them in order to fully exploit the analytical performance of this approach. First, the width of the assay strips and the separation between them were investigated. These two parameters (together with the features of the analytical scanner) determine the resulting profile of the patterned assays in the scanned

---

image, which strongly affects the FDA response. As shown Fig. S3, sinusoid profiles concentrate the signal in a single (fundamental) peak, whereas other profiles (such as squared and triangular) distribute the signal also in additional harmonic peaks.

To achieve a sinusoid profile, the width of the strips and the separation between them have to be the same, namely, the duty cycle must be 50%. On the other hand, as inferred from simulations considering the optical resolution of the scanning system employed in this study (Fig. S4 and Eq. S1), the desired sinusoid profile can be obtained by patterning 500  $\mu\text{m}$  width assays strips within 1mm periods.

Different methods were investigated to experimentally create these striped patterns of proteins on the polycarbonate surface of the assay substrates, such as non-contact printing and soft lithography.<sup>24,25</sup> Among them, the best results were obtained by creating masks with striped holes, and then attaching them on the assay surface in order to incubate biochemicals in a patterned fashion (Fig. 2a). These masks were initially made of PDMS and PVC adhesive sheet, but they left residues on the assay surface after their removal, and these residues became patterned in the gaps between the assay strips. Since gaps and strips have the same period, the signal contributions coming from both parts were unified in the frequency peak, which increases the resulting noise and reduces the performance of FDA. To avoid this handicap, silicone-free adhesive plastic film was selected to create the incubation masks (Fig. S1). This material does not leave residues on the assay substrate after its removal, and it enables a clean patterning process that results in well-defined assay strips with the desired sinusoid profile in the scanned image (Fig. 2b and c).



**Figure 2.** Striped patterning of biorecognition assays. (a) Schematic representation of the patterning of biological probes using the adhesive incubation mask with striped chambers herein developed. (b) Scanned image experimentally obtained from a patterned BSA immunoassay and (c) its corresponding sinusoidal-shaped averaged profile.

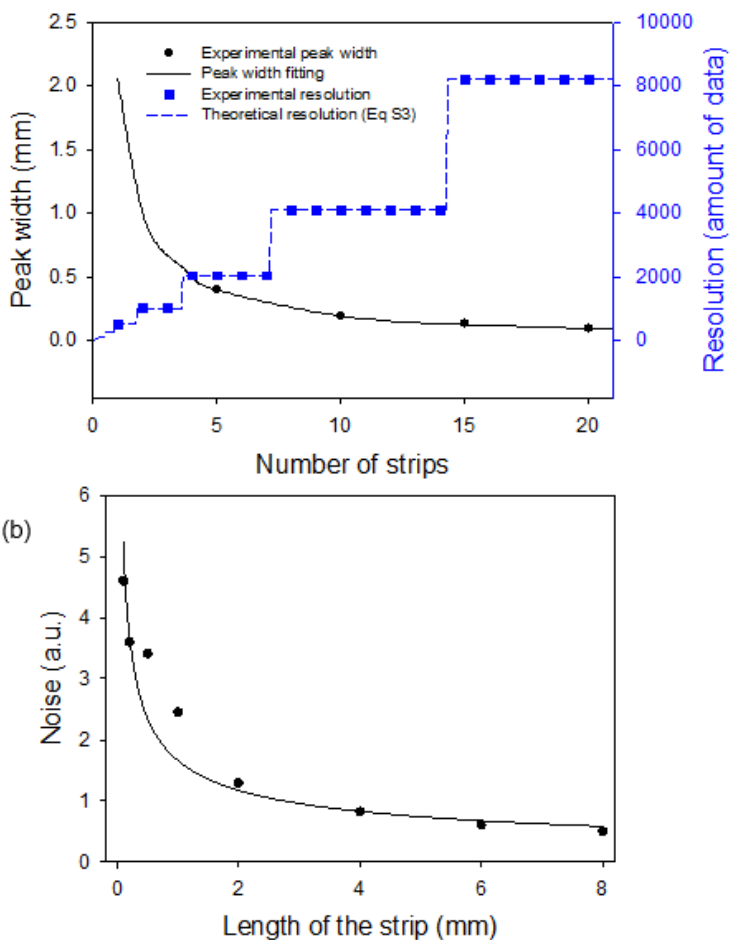
The number of strips is another important parameter in the FDA response. As theoretically (Fig. S5) and experimentally (Fig. 3a) observed, frequency peaks become narrower when the number of strips increase. Moreover, the resolution of the frequency spectrum improves together with this number (Fig. 3a). The stepwise shape of this curve is due to the Fast Fourier transform used to obtain the frequency



spectra, which allows to calculate the discrete Fourier transform quickly and with minimal computational requirements. This method rounds up the number of processed data to the next power of 2, and each step in Fig. 3a corresponds to one of those values in the number of pixels in each row of the scanned image. The number of strips becomes especially important in the design of prospective multiplexed FDA systems based on assay strips patterned according to different periods (to sense different targets), thus generating distinct frequency peaks for each analyte in a single FDA assay.

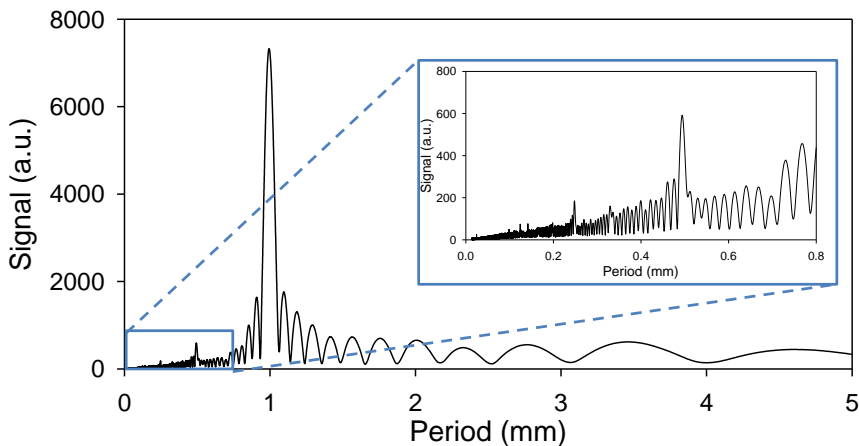
Therefore, since higher spectral resolutions and narrower peaks favor FDA analysis (especially for multiplexed FDA), the potential sensitivity to be achieved scales up together with the number of strips, and consequently with the area employed by the assay. On the other hand, a greater number of strips require higher volumes of bioreagents and samples. In high-resolution bioanalytical scanning systems, this issue can be easily addressed by decreasing the size of the strips. A set of 15 strips was chosen in this study, since it is a smaller number that involves great resolution and narrow peaks.

The length of the strips was also investigated. The importance of this parameter lies in the fact that the frequency peaks also comprise small contributions of random noise. Since FDA averages frequency spectra from every row of data (Fig. 1b), the longer the strips are the larger number of scanned rows, and consequently, the noise (the standard deviation) decreases with the square root of the length, according to the Bienaymé formula.<sup>26</sup> The results in Fig. 3b show that the noise remains rather constant after 4mm of strip length, so this value was selected for the subsequent experiments.



**Figure 3.** Number of strips and their length. (a) Experimental curve of number of strips versus both peak width and resolution in the frequency spectrum. Data fitted to Equation S2 ( $R^2 = 0.999$ ) for peak width and compared to Equation S3 for theoretical resolution. (b) Experimental results of the effect of the strips length on the resulting noise in the FDA analysis. Data fitted to Bienaymé formula ( $R^2 = 0.872$ ).

As presented in Fig. 4, the expected FDA result was successfully obtained with the optimized assay patterning conditions. Despite the sinusoidal shape of the scanned assay strips, very weak harmonic peaks are also observed in the spectra, which may be generated by minor profile irregularities in the resulting experimental strips. However, the intensity of these harmonics is negligible compared to the one of the fundamental peak. It must be noted that we used distance magnitudes instead of frequencies for the horizontal axis of the resulting FDA spectra. For optical setups that scan the assay substrate at constant velocity, both variables have an inverse and linear correlation (Eq. (1)). However, using distances provides intuitive and practical FDA readouts, in which the fundamental peak appears centered in the distance value that corresponds to the period of the patterned strips (1mm in this case), as observed in Fig. 4.



**Figure 4.** Exemplary experimental frequency spectrum for a patterned BSA immunoassay, representing period values in the horizontal axis. See Fig. 2b and c for the scanned image counterpart of this spectrum. Inset graph zooms in the short period range, to show the harmonic peaks.

We also investigated the effect, on the FDA performance, of random and systematic errors in the assays patterning. For that, we modelled different modifications of the strips and assessed their repercussion in the resulting frequency peak. As an example of a random error, we considered the absence of strips randomly distributed along the strips set. It represents an extreme case for a random patterning error that diminish the averaged intensity of particular strips within a set. For instance, in the present work, this error could come from imperfections when filling the chambers with the probe solution. As shown Fig. S6, these random errors affect the resulting FDA response, and the intensity of the resulting frequency peak decreases linearly with the number of missing strips. Also, it is worth to note that the position of the removed strips presents a negligible repercussion in the resulting peak intensity (RSD < 0.1% in all cases).

On the other hand, as a systematic patterning error, we considered a systematic deviation of the strip widths along the whole set of strips. For example, this error could come from experimental deviations in the method employed to create the striped pattern. In this particular development, it could be generated by inaccuracies in the diameter of the drill used to pierce the incubation masks. As shown in Fig. S7, this systematic modification of the strips width modifies the intensity of the frequency peak according to a Gaussian trend. Although this intensity becomes suppressed in both extremes of the curve, it is worth to highlight that it only decreases less than 2% when the width varies up to a 10% ( $\pm 50 \mu\text{m}$  in this work) around the central width value selected to obtain the desired sinusoid profile.

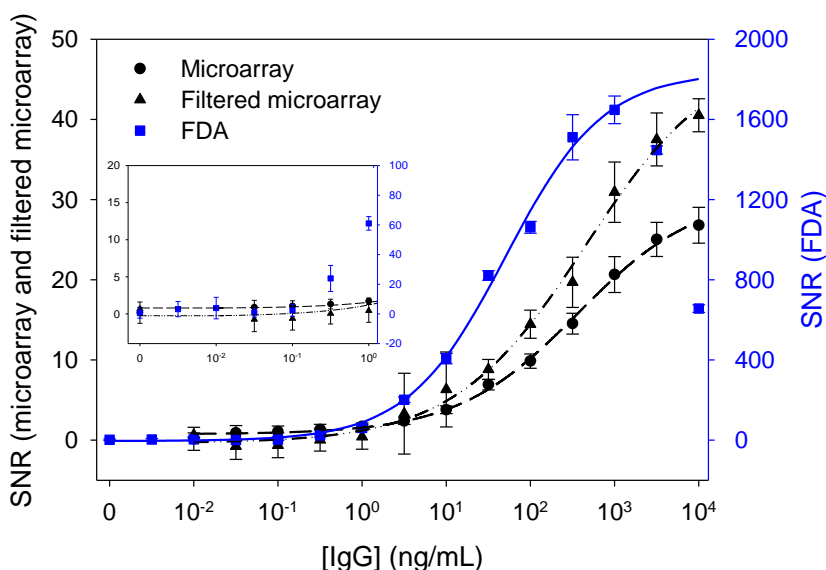
### **3.2. Model immunoassay system**

In order to experimentally assess the performance of FDA in real assays, this strategy was compared with raw (non-filtered) and digitally filtered (DF) microarrays. Raw microarrays were obtained directly from the imaging system, their DF counterparts were processed with a low pass Fourier filter using optimized

---

cut-off values to remove high-frequency noise (Table S1), and FDA was performed as described in the previous section.

For this comparison, we used a model immunoassay system based on immobilizing BSA on the assay surface and quantifying selective IgGs in solution. A wide range of IgG concentrations were analyzed by all the approaches in the same conditions. Sensitivity was evaluated by means of SNRs, and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were considered as the experimental IgG concentration associated with SNR=3 and SNR=10, respectively.



**Figure 5.** Dose-response curves for the FDA assessment with a model immunoassay system. Note the two different SNR scales in this graph. Experimental data fitted to four-parameter logistic equation ( $R^2_{\text{raw}}=0.998$ ,  $R^2_{\text{DF}}=0.995$ , and  $R^2_{\text{FDA}}=0.997$ ).<sup>27</sup> The two points within the hook effect area observed at high IgG concentrations in the striped dose-response curve were omitted in the fitting process.<sup>28</sup> Inset plot focuses on the LOD and LOQ zones. In this experiment, 15 replicated spots were analyzed for raw and DF microarray, and sets of 15 strips were used for FDA.

**Table 1.** Analytical parameters for the FDA assessment with the model immunoassay system.

	noise (a.u.)	max. SNR <sup>a</sup>	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Raw microarray	218	30	95	6
DF microarray	114	49	42	4
FDA	4	1840	0.08	0.03

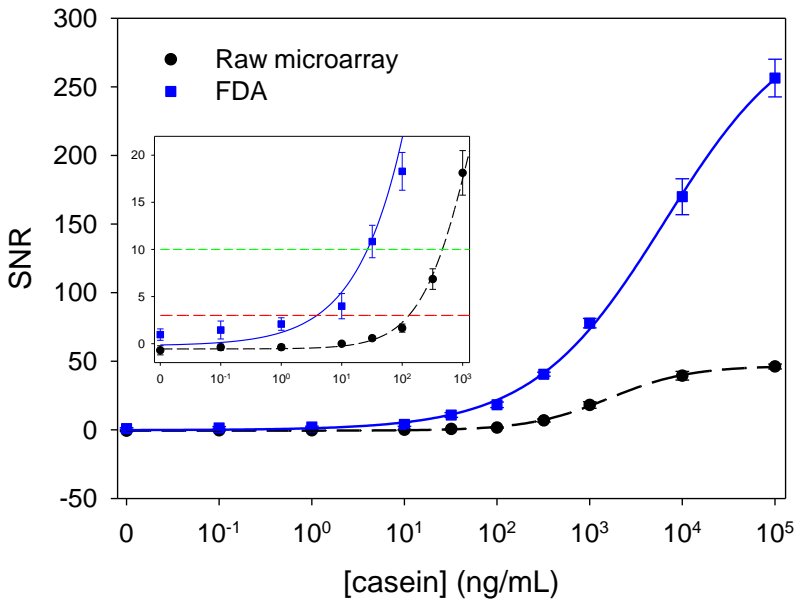
<sup>a</sup> SNR value at the steady state of the logistic fitting.

As observed in Fig. 5, well-correlated dose-response curves were obtained in all the cases. More interestingly, raw microarrays display the lowest SNR values, DF microarrays slightly increase SNRs, and FDA approach exhibits a dramatic improvement that has an impact on the LOD and LOQ. Table 1 summarizes the analytical parameters obtained from these experimental dose-response curves. It can be observed that DF leads only to a two-fold noise reduction compared to raw microarray. However, FDA achieves a close-to-zero noise and reaches a sensitivity enhancement of about 2–3 orders of magnitude for this model immunoassay system, which enables the detection of 30 pg/mL (200 fM) of IgG.

### 3.3. Casein immunoassay

After proving the concept of FDA with a model system, this section aims to demonstrate the potential of this strategy in other immunoassays, and to provide insights into real applications to analyze food allergens. For that, we applied FDA to a sandwich immunoassay to quantify casein. Instead of using gold-labelled secondary antibodies together with silver signal enhancement as in the previous section, the signal development was here based on HRP-labelled primary antibodies followed by TMB precipitation.

In this study, the performance of FDA for this casein immunoassay was assessed and compared to raw microarrays. DF microarrays were omitted in this assessment, since this strategy displayed a poor improvement in the previous section. As before, sensitivity was evaluated by means of SNRs, and LOD and LOQ were considered as the target concentration corresponding to SNR=3 and SNR=10, respectively.



**Figure 6.** Dose-response curves for the FDA assessment with a sandwich immunoassay for casein analysis. Experimental data fitted to four-parameter logistic equation ( $R^2=0.999$  in both fits). Inset plot zooms in the LOD and LOQ concentration ranges, where the upper and lower horizontal dashed lines mark the SNR thresholds for LOQ and LOD, respectively. In this experiment, averaged values and standard deviations were calculated from 3 replicated microarray dots and three sets of 15 FDA strips.

**Table 2.** Analytical parameters for the FDA assessment with the sandwich immunoassay for casein analysis.

	noise (a.u.)	max. SNR <sup>a</sup>	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Raw microarray	177	47	462	129
FDA	6	303	27	4

<sup>a</sup> SNR value at the steady state of the logistic fitting

As observed in Fig. 6, both dose-response curves display the expected sigmoidal response, and the characteristics (binding affinities and signal developing strategy) of this casein immunoassay lead to lower signals than the previous BSA immunoassay. The graph shows that, also in lower signal conditions, FDA generates significant SNR enhancements in the dose-response curve. As summarized in Table 2, FDA reduces the noise and improves LOD about two orders of magnitude compared to the raw microarray assay format, reaching a sensitivity of 4 ng/mL (174 pM) of casein.

## 4. Conclusion

FDA is a practical approach to reduce noise and improve sensitivity in optical biosensing. As experimentally demonstrated in this study in two different systems, the sensitivity of biorecognition assays patterned as strips on solid substrates boosts up to 2–3 orders of magnitude by just applying a simple signal processing algorithm, compared to reference microarray systems. FDA must potentially provide higher sensitivity enhancements in bioanalytical systems comprising greater contributions of unwanted signals, such as in simple and low-cost biosensing setups. Therefore, this approach entails important strengths to reduce the resources required to develop biosensors without sacrificing their analytical performance, which suggests simpler and cheaper systems for point-of-care analysis. Besides, the capability of FDA to



reject unwanted signals introduces appealing perspectives to develop new bioanalytical systems that provide solutions to the problems associated with nonspecific binding in the analysis of complex matrixes. Also, the multiplexing potential of FDA could be enhanced by patterning (in different periods) multiple biorecognition assays on the same substrate area, and then discriminating their FDA peaks in the frequency spectrum. Moreover, our results point towards prospective FDA advances to develop highly sensitive assays exploiting different optical events (fluorescence, light interference, SPR, etc.) applied to determine a wide range of targets (proteins, DNA, cells, small molecules, etc.).

### Acknowledgment

This research was supported by FEDER and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ2016-75749-R).

### References

1. Huang, R.; He, N.; Li, Z. Recent progresses in DNA nanostructure-based biosensors for detection of tumor markers. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *109*, 27–34.
2. Tereshchenko, A.; Bechelany, M.; Viter, R.; Khranovskyy, V.; Smyntyna, V.; Starodub, N.; Yakimova, R. Optical biosensors based on ZnO nanostructures: Advantages and perspectives. A review. *Sens. Actuators B* **2016**, *229*, 664–677.
3. Justino, C.I.L.; Duarte, A.C.; Rocha-Santos, T.A.P. Critical overview on the application of sensors and biosensors for clinical analysis. *Trends Anal. Chem.* **2016**, *85*, 36–60.
4. Kettler, H.; White, K.; Hawkes, S. Mapping the landscape of diagnostics for

- sexually transmitted infections: Key findings and recommendations. *Unicef/Undp/World Bank/Who* **2004**, 1–44.
- Galievsky, V.A.; Stasheuski, A.S.; Krylov, S.N. Improvement of LOD in fluorescence detection with spectrally nonuniform background by optimization of emission filtering. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 11122–11128.
  - Avella-Oliver, M.; Gimenez-Romero, D.; Morais, S.; González-Martínez, M.Á.; Bueno, P.R.; Puchades, R.; Maquieira, Á. INSEL: an in silico method for optimizing and exploring biorecognition assays. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10868–10870.
  - Kim, W.-J.; Cho, H.Y.; Kim, B.K.; Huh, C.; Chung, K.H.; Ahn, C.-G.; Kim, Y.J.; Kim, A. Highly sensitive detection of cardiac troponin I in human serum using gold nanoparticle-based enhanced sandwich immunoassay. *Sens. Actuators B* **2015**, *221*, 537–543.
  - Wentzell, P.D.; Brown, C.D. Signal processing in analytical chemistry. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; John Wiley, 2006, pp. 9764–9800; ISBN 9780470027318.
  - Avella-Oliver, M.; Morais, S.; Carrascosa, J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Total analysis systems with thermochromic etching discs technology. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 12037–12046.
  - Barclay, V.J.; Bonner, R.F.; Hamilton, I.P. Application of wavelet transforms to experimental spectra: Smoothing, denoising, and data set compression. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 78–90.
  - Jean-Luc Starck; Candes, E.J.J.; Donoho, D.L.L.; Starck, J.L.; Candes, E.J.J.; Donoho, D.L.L. The curvelet transform for image denoising. *IEEE Trans Image Process* **2002**, *11*, 670–684.
-

12. Tan, Y.; Chu, A.; Lu, M.; Cunningham, B.T. Distributed feedback laser biosensor noise reduction. *IEEE Sens. J.* **2013**, *13*, 1972–1978.
13. Schaefer, S.; Chau, K.J. Improving the signal visibility of optical-disk-drive sensors by analyte patterning and frequency-domain analysis. *Meas. Sci. Technol.* **2011**, *22*, 045302.
14. Masson, J.-F.; Battaglia, T.M.; Cramer, J.; Beaudoin, S.; Sierks, M.; Booksh, K.S. Reduction of nonspecific protein binding on surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 1951–1959.
15. Fattinger, C. Focal molography: Coherent microscopic detection of biomolecular interaction. *Phys. Rev. X* **2014**, *4*, 31024.
16. Gatterdam, V.; Frutiger, A.; Stengele, K.-P.; Heindl, D.; Lübbers, T.; Vörös, J.; Fattinger, C. Focal molography is a new method for the in situ analysis of molecular interactions in biological samples. *Nat. Nanotechnol.* **2017**, *12*, 1089–1095.
17. Avella-Oliver, M.; Carrascosa, J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Diffractive protein gratings as optically active transducers for high-throughput label-free immunosensing. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 9002–9008.
18. Avella-Oliver, M.; Ferrando, V.; Monsoriu, J.A.; Puchades, R.; Maquieira, Á. A label-free diffraction-based sensing displacement immunosensor to quantify low molecular weight organic compounds. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1033*, 173–179.
19. Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Disc-based microarrays: principles and analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 4523–4534.
20. Avella-Oliver, M.; Puchades, R.; Wachsmann-Hogiu, S.; Maquieira, Á.

- Label-free SERS analysis of proteins and exosomes with large-scale substrates from recordable compact disks. *Sens. Actuators B* **2017**, *252*, 657–662.
21. Kooser, A.; Manygoats, K.; Eastman, M.P.; Porter, T.L. Investigation of the antigen antibody reaction between anti-bovine serum albumin (a-BSA) and bovine serum albumin (BSA) using piezoresistive microcantilever based sensors. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19*, 503–508.
  22. Ashley, J.; Piekarska, M.; Segers, C.; Trinh, L.; Rodgers, T.; Willey, R.; Tothill, I.E. An SPR based sensor for allergens detection. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *88*, 109–113.
  23. Rusmini, F.; Zhong, Z.; Feijen, J. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1775–1789.
  24. Ru, C.; Luo, J.; Xie, S.; Sun, Y. A review of non-contact micro- and nano-printing technologies. *J. Micromech. Microeng.* **2014**, *24*, 053001.
  25. Voskuhl, J.; Brinkmann, J.; Jonkheijm, P. Advances in contact printing technologies of carbohydrate, peptide and protein arrays. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *18*, 1–7.
  26. Griesheimer, D.P.; Sandhu, V.S. Analysis of inconsistent source sampling in monte carlo weight-window variance reduction methods. *Nucl. Eng. Technol.* **2017**, *49*, 1172–1180.
  27. Goudar, C.T.; Joeris, K.; Konstantinov, K.B.; Piret, J.M. Logistic equations effectively model mammalian cell batch and fed-batch kinetics by logically constraining the fit. *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 1109–1118.
  28. Schiettecatte, J.; Anckaert, E.; Smits, J. Interferences in immunoassays. In
-

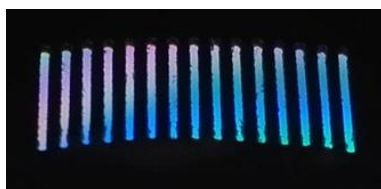
*Advances in Immunoassay Technology*; InTech, 2012, pp. 45–62; ISBN  
ISBN: 978-953-51-0440-7.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### Enhancing the sensitivity in optical biosensing by striped arrays and frequency-domain analysis

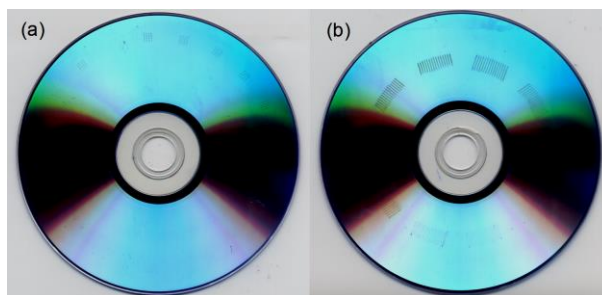
Gabriel Sancho-Fornes, Miquel Avella-Oliver, Javier Carrascosa,  
Sergi Morais, Rosa Puchades, and Ángel Maquieira

#### Incubation mask



**Figure S1.** Top view of a real incubation mask attached to an assay platform. Black areas correspond to the PVC sheet. The blueish background within the striped chambers comes from the underlying DVD disk used as assay substrate.

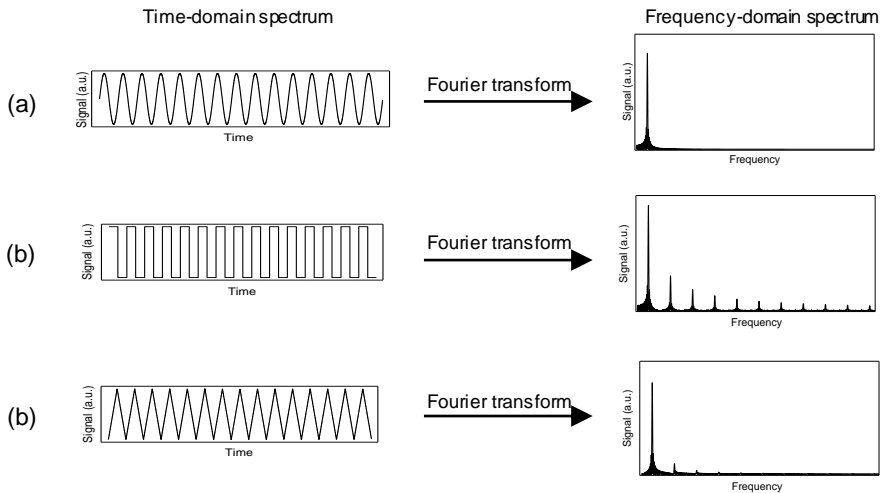
#### Real images of the assays



**Figure S2.** Real images of the DVDs after the assays in (a) microarray format and (b) striped pattern. Darker areas in the sides were generated by optical reflections.

### Profiles of the time-domain images

The spectra generated in time-domain can display different profiles like sinusoid, squared, triangular, etc. According to these profiles, when the Fourier transform is applied to obtain the frequency spectrum, the analytical signal can be concentrated in one or several frequencies. Sinusoid profiles concentrate the signal in the fundamental peak, however squared and triangular profiles distribute it in several peaks (harmonic peaks), as shown in Figure S3.



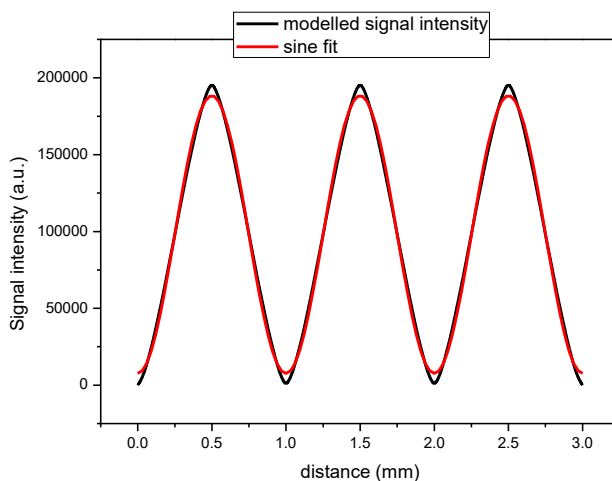
**Figure S3.** Simulation results on the influence of (a) sinusoid, (b) squared, and (c) triangular time-domain profiles on the distribution of the FDA signals along the frequency spectrum.

## Scanning features vs time-domain profile

The laser beam of the optical scanner employed in this work has a circular shape (500  $\mu\text{m}$  diameter) when hits the assay surface, and the laser attenuation (signal) is proportional to the area of the beam inside the strip at each position of the scanning process. The profile of the laser attenuations when the system scans along the cross section of the striped biorecognition assays is described by the following equation:

$$S \approx A = \frac{1}{2}r^2 \left( 2\cos^{-1}\left(1 - \frac{x}{r}\right) - \sin\left(2\cos^{-1}\left(1 - \frac{x}{r}\right)\right) \right) \quad (\text{S1})$$

where S is the signal, A is the area of the laser beam overlapped with the assay strip, r is the radius of the laser beam (250  $\mu\text{m}$ ), and x is the penetration length of the laser over the assay strip.



**Figure S4.** Modelled cross-section profile of the signal intensity obtained with 500  $\mu\text{m}$  width assay strips, and its corresponding curve fitted to a sinusoid function. Modelled data was obtained by applying equation S1 and extending it along the scanning direction. The strong correlation of the sine fitting ( $R^2 = 0.9965$ ) points out that the profile obtained with this system is mainly sinusoid.

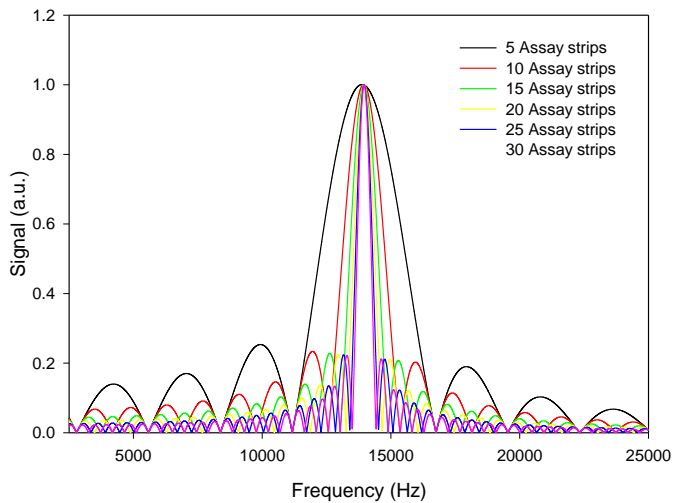


## Number of strips

The width of the peak obtained in the frequency spectrum is related to the number of assay strips in the time-domain image. As shown in Figure S5, the peak width decreases with the number of strips. This fact was experimentally proved (Figure 3a) and the results were fitted to the following exponential decay equation:

$$W = 2.0611 \cdot n^{-1.024} \quad (S2)$$

where  $W$  is the width of the peak and  $n$  is the number of assay strips scanned.



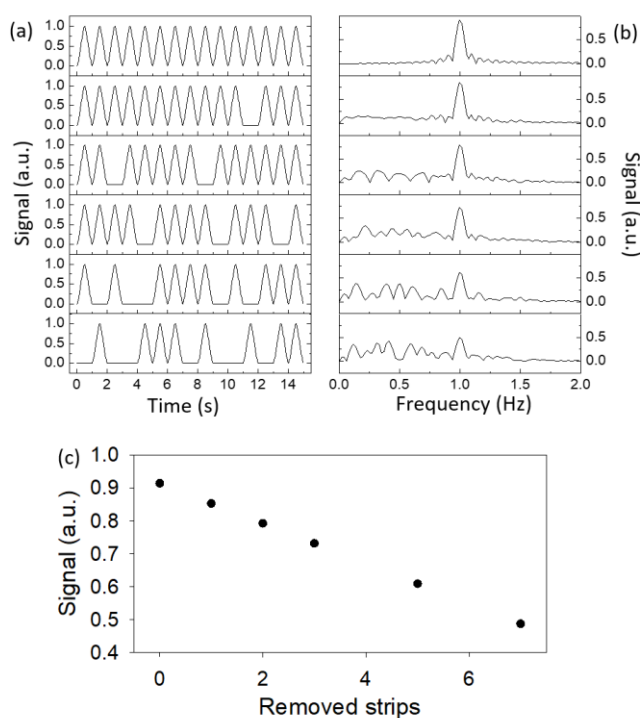
**Figure S5.** Simulated frequency-domain spectra obtained in a range of number of assay strips. It can be observed that FDA peaks becomes narrower when the number of assay strips increase.

Moreover, the resolution of the frequency spectra (i.e. the total amount of values comprised in the whole spectrum) increases with the number of strips according to the following equation:

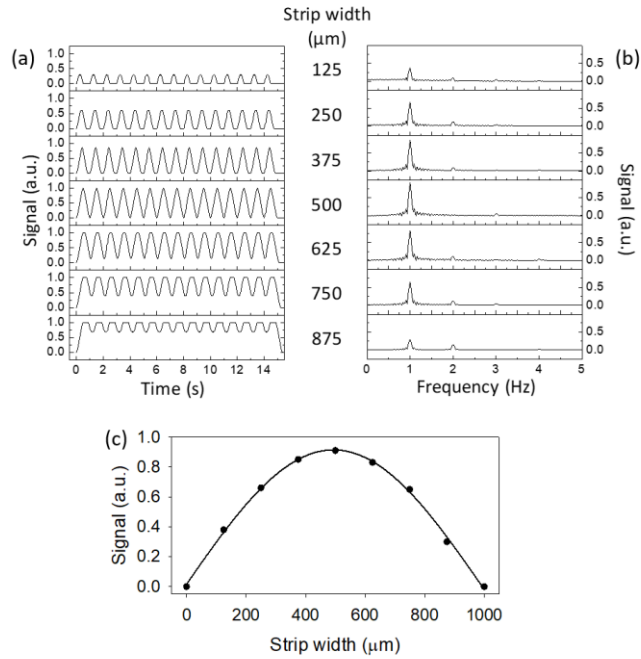
$$R = 2^{\left(\text{roundup}\left(\frac{\log P}{\log 2}\right)+1\right)} \quad (\text{S3})$$

where R is the number of data obtained in the frequency spectrum (resolution), and P is the size in pixels of the assay strips in the scanned image (143.266 pixels/strip in this system).

### Random and systematic errors



**Figure S6.** Study of the effect of the random omission of assay strips on the FDA response. (a) Registered time-domain spectra for a different number of removed strips, and (b) their corresponding frequency-domain counterpart. (c) Analytical signal obtained by FDA in function of the number of removed strips. Data fitted to a linear equation ( $R^2 = 1$ ).



**Figure S7.** Study of the effect of a systematic variation of the strip width on the FDA response. (a) Registered time-domain spectra with different widths, and (b) their corresponding frequency-domain counterpart. (c) Analytical signal obtained by FDA in function of the strip width. Data fitted to a Gaussian equation (4 parameters,  $R^2 = 0.998$ ).

## Data analysis

**Table S1.** Assessment of the filtering conditions for DF microarrays, and comparison with raw microarray. Results obtained from experimental dose-response curves using the model BSA immunoassay.

	Raw microarray	DF microarray				
threshold frequency (KHz)	-	100	15	10	1	0.010
noise (a.u.)	218	114	114	114	111	110
max.signal (a.u.) <sup>a</sup>	5835	4621	4620	4624	4371	4314
max. SNR <sup>a</sup>	27	41	41	41	40	40
R <sup>2</sup> <sup>b</sup>	0.998	0.995	0.995	0.995	0.994	0.994

<sup>a</sup>Highest signals and SNRs values obtained in the experimental dose-response curves ([IgG] = 10 nm mL<sup>-1</sup>).

<sup>b</sup>Regression coefficients obtained in the fitting (logistic 4 parameters) of the experimental dose-response curves under different DF conditions. As observed, the DF process did not affect the sigmoidal trend, and well-correlated dose-response curves were obtained in all the cases.

### **Conclusiones**

En este capítulo se describe la puesta a punto de una metodología (FDA) que mejora las prestaciones analíticas de los biosensores ópticos. Realizando los ensayos con una periodicidad determinada y analizándolos en conjunto en el dominio de frecuencias, se ha conseguido separar con éxito la mayoría de contribuciones del ruido del sistema de la señal analítica generada en el ensayo. Esto ha permitido obtener mejoras de entre 2 y 3 órdenes de magnitud en los límites de detección de los ensayos realizados sobre un DVD interrogándolo con un lector de discos estándar. Además, esta estrategia de análisis permite suprimir la contribución a la señal analítica de la unión no específica de los reactivos sobre la superficie.

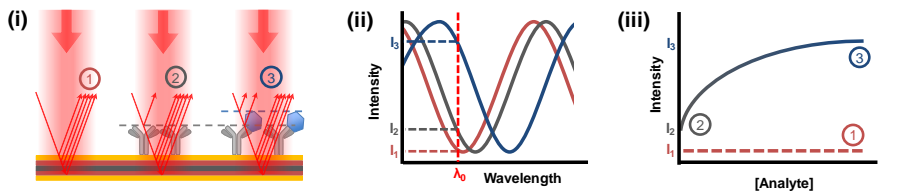
Como contrapunto, FDA no mejora apenas las prestaciones de los ensayos competitivos y de desplazamiento. Esto es debido a que los blancos tienen una elevada señal que va disminuyendo a medida que la cantidad de analito aumenta y, por tanto, la contribución del ruido generado por el sistema es despreciable en comparación a la imprecisión de las medidas.

En este trabajo, inicialmente se pretendía que la reducción del ruido del sistema permitiera detectar las interacciones moleculares sin necesidad de marcaje. Sin embargo, la señal tuvo que ser amplificada para su detección, ya que la interacción de las biomoléculas con la radiación no es suficiente para que se vea afectada. Pese a ello, esta metodología no se limita solo a biosensores ópticos que utilicen marcadores, sino que podría ser aplicada para mejorar las prestaciones analíticas de cualquier biosensor, con formato sin y con marcaje, que escanee los sustratos y como resultado genere una imagen.



# Capítulo 3

## Biosensado interferométrico sin marcaje







### **Introducción**

En este capítulo se aborda el desarrollo de sustratos interferométricos formados por capas de diferentes materiales y grosores, y su aplicabilidad a la detección de biointeracciones sin marcaje. Estos sustratos aprovechan el desfase entre las ondas de luz visible reflejadas en cada capa, para generar un patrón interferométrico que varía con el reconocimiento selectivo sonda-diana.

Basándose en este principio físico se han desarrollado diferentes configuraciones interferométricas como Mach-Zehnder, Young, *dual polarization interferometry* (DPI), etc. Estos sistemas no solo han permitido obtener el grosor de las capas adsorbidas en el sustrato y el índice de refracción de estas, sino que además se pueden estudiar y monitorizar los cambios conformacionales de las moléculas involucradas. Sin embargo, en general, la instrumentación es de tamaño considerable, coste elevado y su funcionamiento es complejo, requiriendo ser manejado por personal especializado. Todo ello hace que estos sistemas no se hayan incluido entre los sistemas *point-of-care*. En este trabajo se propone el desarrollo de un sistema de detección con elementos del lector de discos para simplificar el instrumento analítico, haciéndolo tecnológicamente más compacto, competitivo, ligero y portátil.

En capítulos anteriores la tecnología de disco compacto se ha utilizado sin apenas modificación, utilizando un disco como plataforma de ensayo y el lector como instrumento de interrogación. En el trabajo se desarrollan dos sustratos interferométricos utilizando los materiales que forman los DVD-RW, ya que tienen grandes diferencias de índice de refracción y por consiguiente generan un mayor desfase entre los haces reflejados. Los dos sustratos desarrollados presentan respuesta opuesta a interacciones moleculares sobre su superficie, uno aumenta la intensidad del haz reflejado y el otro la disminuye.

El sistema de interrogación utiliza los componentes de los lectores de DVD, convenientemente dispuestos y manejados, para obtener la información generada en el chip fotónico.

El trabajo se ha abordado en las siguientes etapas:

- Simulación de la respuesta analítica de diferentes estructuras interferométricas, variando los materiales, disposición y grosores de las capas nanométricas responsables de la respuesta interferométrica.
- Fabricación y caracterización de las estructuras que mejores resultados mostraron en las simulaciones.
- Desarrollo del sistema de detección de la respuesta interferométrica generada en los chips de ensayo.
- Puesta a punto de los inmunoensayos, en formato directo y competitivo, para la cuantificación sin marcaje de inmunoglobulina y sulfasalazina, respectivamente.
- Registro de las variaciones interferométricas generadas por los inmunoensayos anteriores utilizando el sistema de detección.
- Estudio de las variaciones interferométricas registradas en los diferentes inmunoensayos estudiados, mediante el análisis de imágenes RGB y sus tres canales individuales (rojo, verde y azul), como una aproximación hacia la simplificación del sistema de detección.

## **Interferometric multilayered nanomaterials for imaging unlabeled biorecognition events**

Gabriel Sancho-Fornes<sup>a</sup>, Miquel Avella-Oliver<sup>a</sup>, Javier Carrascosa<sup>a</sup>, Rosa Puchades<sup>a,b</sup>, Ángel Maquieira<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Universitat Politècnica de València, Universitat de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain.

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n 46022, Valencia, Spain.

**Analytical Chemistry, Submitted 10/05/2019**

Copyright © 2011 American Chemical Society

### **Abstract**

The development of interferometric nanomaterials to carry out multiplexed label-free biorecognition assays in simple and effective optical setups, is presented. Multilayered films of metals (gold and Ag-In-Sb-Te alloy) and dielectric (zinc sulphide) were deposited on a polymeric material in order to generate the interferometric phenomenon. The thickness of the films was tailored to sense biorecognition events by both destructive and constructive interferometry. Herein, we also develop a scanner that exploits standard DVD laser technology, imaging the interferometric response of immunoassays carried out on the surface of the nanostructures. The bioanalytical performances of the approach are established for

unlabeled direct immunoassay for BSA and competitive immunoassay for sulfasalazine, reaching a detection limit of  $0.46 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $11 \text{ ng mL}^{-1}$ , respectively. Furthermore, this study yields several one-shot interferometric approaches that provide insights into simpler and faster strategies for label-free biosensing.

**Keywords:** Interferometry, nanomaterial, imaging, label-free, biosensing

### 1. Introduction

There is a demand for new materials for simpler and faster analytical systems.<sup>1</sup> Among many other scenarios, this shift projects a great impact in clinical diagnosis, where point-of-care systems strongly support fast decision-making in emergency medicine and early treatment of acute diseases.<sup>2</sup> Biosensing advances play a key role in this issue,<sup>3</sup> especially when they point towards the ASSURED criteria (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free, and Deliverable to end users) outlined by the World Health Organization.<sup>4</sup> Therefore, a central aspect to support the potential impact of biosensing out of specialized labs relies on the accuracy, simplicity, cost effectiveness, and portability of the bioanalytical developments.

Interferometry is an optical phenomenon that relies on exploiting the interference properties of light to sense biomolecular interactions<sup>5,6</sup>. The interferometric approaches for biosensing are typically based on materials tailored to guide light through different paths and measure the interference introduced by the resulting thickness of a biorecognition assay performed on one of the paths. Some paradigmatic examples are Mach-Zehnder,<sup>7</sup> Young,<sup>8</sup> and dual polarization interferometry.<sup>9</sup>

An interesting alternative are the nanostructures for common-path interferometry,<sup>10</sup> such as arrayed imaging reflectometry,<sup>11</sup> reflectometric interference spectroscopy,<sup>3</sup> and interferometric reflectance imaging sensing.<sup>12</sup> Instead of splitting the light into reference and assay paths, these materials induce an interference of a single beam with itself, to be typically measured by reflectance. As a result, these approaches tend to be simpler and present a higher scalability and multiplexing capabilities.

Herein we address the development of common-path interferometric nanomaterials to analyze multiplexed biorecognition assays in a simple and effective reflectance-based measurement system. The hypothesis behind this idea relies on multilayered nanometric films designed to generate a phase difference in the reflected beams, and tailored to be specially sensitive to additional phase differences introduced by nanometric layers of biological matter on their surface. This strategy aims to quantify biorecognition assays as simple intensity changes in the reflected light, generated by the interferences associated to the evolution of the biolayer thickness along the assay (Fig. 1A).

In this work, we investigate common-path interferometric nanomaterials based on nanometric metal (gold and Ag-In-Sb-Te alloy) and dielectric (zinc sulphide) films, as optically-active layers to modulate the interference of an incident beam for biosensing purposes. Important insights into this address were provided by Gopinath et al.<sup>13,14</sup> by sensing the intensity cross sections related to immunochemical and genic assays developed on compact disks.

Herein we design and fabricate two different multilayered interferometric nanomaterials to analyze biointeractions by both destructive and constructive interferences, and develop a custom imaging system to quantify multiplexed biorecognition assays on them. The study assesses the optical behavior of the nanomaterials, and it evaluates their applicability in immunoassay. The work also

focuses on the design and development of a new low cost compact interferometer prototype.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Carbonate buffer (50 mM sodium carbonate, pH 9.6), PBS-T (8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05 % (v/v) Tween-20, pH 7.4), and washing solutions were prepared with purified water (Milli-Q, Millipore Iberica, Madrid, Spain) and filtered through 0.22 μm polyethersulfone membranes (Merck, Darmstadt, Germany). Bovine serum albumin (BSA), anti-BSA polyclonal IgGs produced in rabbit, sulfasalazine, and ovalbumin (OVA) were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Protein-hapten conjugates (OVA-S8) and rabbit polyclonal antiserum for sulfasalazine were produced as described elsewhere.<sup>17</sup> The sputtering targets of zinc sulphide (ZnS) and Ag-In-Sb-Te alloy were from Able Target Limited (Nanjing, China).

### 2.2. Nanomaterials

The interferometric materials were constituted by stacked nanometric films of gold, zinc sulfide, and an Ag-In-Sb-Te alloy on polycarbonate chips. The thickness of each film was optimized through theoretical calculations performed with the Reflectance Calculator (Filmetrics inc., San Diego, CA, USA),<sup>16</sup> considering a refractive index of 1.47 for proteins. To fabricate the nanomaterials, flat polycarbonate plates (600 μm of thickness) were cut into squared chips (1.5 x 1.2 cm) using a drilling machine (CCD, Bungard, Karo, Germany). The chips were then coated with all the layers, one by one, using an ultra-high vacuum magnetron sputterer (ATC series, AJA International Inc., North Scituate, MA, USA). The thickness and refractive index of the deposited films were determined along the fabrication process by X-Ray reflectivity/diffractometry (X'pert Pro, PANalytical,

Almelo, The Netherlands) and spectroscopic ellipsometry (GES5, Semilab, Budapest, Hungary), respectively.

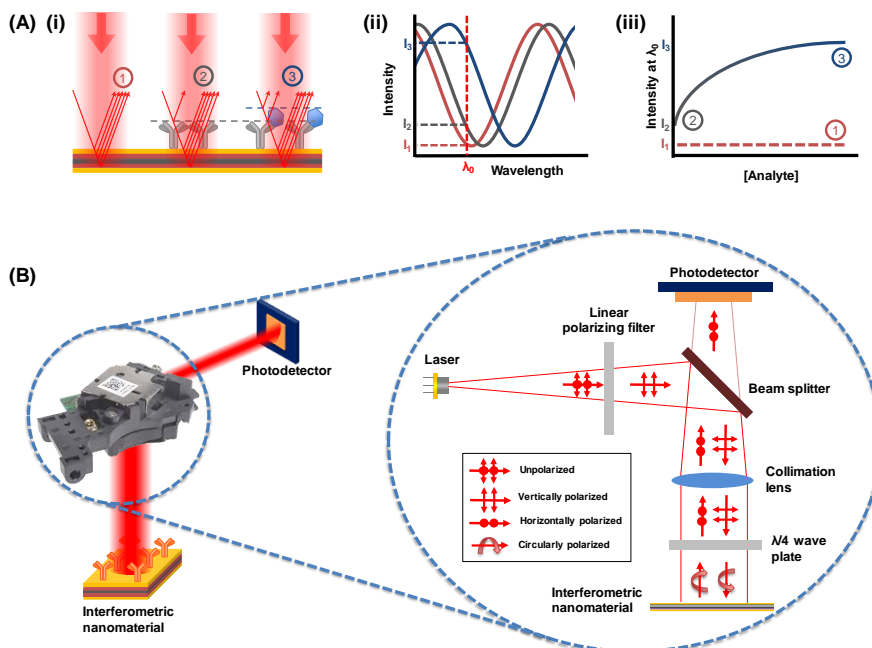
The resulting multilayered structures were characterized by focused ion beam coupled to field-emission scanning electronic microscopy (FIB-FESEM). For that, the nanomaterials were coated by platinum to improve the quality of the scans, micrometric trenches were dug on them using a focused beam of Ga<sup>+</sup>, and the thickness profiles were scanned by FESEM (54° tilt).

### 2.3. Optical setups

A custom laser-scanning optical setup was developed to perform the interferometric measurements. It relies on the laser units of standard DVD drives as monochromatic (650 nm) irradiation sources to interrogate the interferometric response of the nanomaterials along biorecognition assays (Fig. S1A). For that, a DVD laser unit (LPC-819R, LG Electronics Inc., Englewoods Cliffs, USA) was set to orthogonally irradiate the nanomaterial and a planar silicon photodiode (SLC-61N2, Silonex Inc., Montreal, Canada) was positioned to collect the intensity of the reflected beam (Fig. 1B). A data acquisition board (DAQ USB-2527, Measurement Computing, Norton, MA, USA) was connected to the optical setup and to a personal computer, to monitor the signal from the photodiode and to stabilize the laser intensity.<sup>17</sup>

To scan the interferometric response along the nanomaterials, a custom automatized positioning stage was used to hold and sequentially move them under the laser unit. This stage is based on two sled motors from standard DVD drives (one for each direction) controlled by an Arduino Uno microcontroller (Arduino, Turin, Italy). The reflected intensities acquired before the assay were subtracted to the ones after, as an experimental flattening strategy. Finally, the data were arranged as XYZ matrixes and represented as images (using Origin Pro 8, OriginLab

Corporation, Northampton, USA) that display the interferometric response of the microarrayed biorecognition assays on the surface of the nanomaterials, and the reflected intensities were quantified by Origin.



**Fig. 1.** (A) Illustration of (i) the interferometric sensing principle and (ii) the spectral response along the different stages of an immunoassay, (iii) the corresponding dose-response curve. (B) Scheme of the optical setup used in this work. The laser unit comprises a beam splitter that directs a linearly polarized beam towards the nanomaterial through a  $\lambda/4$  wave plate that changes the polarization into circular. Then, the laser is reflected back by the nanomaterial and the circular polarization of the beam becomes inverted. Finally, the  $\lambda/4$  wave plate induces a linear polarization that is perpendicular to the first one, and the polarizing beam splitter transmits the reflected beam towards the photodiode.



Another imaging system was also developed in this study to easily obtain one-shot interferometric scans. It is a simple setup constituted by a lateral diffuse irradiation from a regular white LED bulb, and a handheld digital microscope (Dino-Lite AM413MZT, AnMo Electronics Corp., New Taipei City, Taiwan) set on the nanomaterial (Fig. S1B). The resulting microarray images were flattened using a polynomial subtraction (using Gwyddion software), and denoised with a low-pass Fourier filter as described elsewhere.<sup>18</sup> Finally, the RGB channels of these images were obtained by Photoshop (Adobe, San Jose, CA, USA), and the reflected intensities of the microarrayed immunoassays were quantified in the red channel using the software Genepix (Axon Instruments, Union City, CA, USA).

### **2.4. Biorecognition assays**

Two biorecognition assays were investigated by means of microarrays printed on the surface of the nanomaterials. For the model immunoassay based on BSA as probe and anti-BSA IgGs as target, BSA solutions (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in carbonate buffer) were arrayed (40 nL/spot) on the surface of the material using a noncontact printer (AD 1500, Bio-Dot Inc., Irvine, CA, USA) under controlled temperature (25°C) and relative humidity (95%). These BSA droplets were kept over 30 min in these conditions to ensure a slow drying and minimize coffee ring issues, and then they were incubated overnight at 4 °C to immobilize these protein probes by physisorption. Afterwards, the nanomaterials were washed with PBS-T, rinsed with deionized water, and dried by air stream. To perform the selective IgG biorecognition, anti-BSA solutions in PBS-T (1  $\mu\text{L}/\text{spot}$ ) were incubated (20 min, room temperature) in concentrations ranging from 1 mg/mL to 10 ng/mL by serial dilutions of  $1/10^{0.5}$ , including 0 ng/mL. Finally, the nanomaterials were rinsed and dried as before.

For the immunoassay to determine sulfasalazine, OVA-S8 solutions (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in carbonate buffer) were arrayed and incubated on the surface of the nanomaterials,

and rinsed and dried as described above. Then, to perform the dose-response curves in this competitive assay, constant concentrations of anti-sulfasalazine antibodies in PBS-T (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were mixed with different concentrations of sulfasalazine ranging from 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 3.2  $\text{ng}/\text{mL}$  by serial dilution of  $1/10^{0.5}$  (including 0  $\text{ng}/\text{mL}$ ). Right after mixing, these solutions were dispensed onto the microarrays (1  $\mu\text{L}$  per spot) and incubated for 20 min at room temperature. Finally, the surfaces were rinsed with PBS-T and deionized water, and dried under air stream.

### **2.5. Data processing**

After both immunoassays, the microarrays on the nanomaterials were analyzed with the measurement setups described above. The analytical signals were considered as the variations in the intensity of the reflected laser both after and before the assays. Experimental noise values were calculated as the standard deviation from ten blank measurements (without target), signal-to-noise ratios (SNR) were obtained by dividing the analytical signals between this noise, and the limits of detection and quantification were inferred as the experimental concentration corresponding to  $\text{SNR} = 3$  and  $\text{SNR} = 10$ , respectively. To calculate the SNRs, the sign of the analytical signal in those configurations where the intensity of the reflected signal decreases when the analyte concentration increases (BSA immunoassay on destructive materials and sulfasalazine assay on constructive materials) was changed.

## **3. Results and discussion**

### **3.1. Interferometric nanomaterials**

This study addresses the development of interferometric multilayered nanomaterials to quantify microarrayed biorecognition assays by simple imaging setups. For that, the multilayered structures must be tailored to generate a suitable interferometric response by which nanometric changes in the thickness of biological

layers (generated by binding events) on the material display great changes to be scanned by reflectance (Fig. 1A). This section tackles the design of these structures through theoretical simulations, their fabrication, and the characterization of the resulting multilayers.

The top layer of the nanomaterials consists of a thin (5 nm) coating of gold on which to perform the biorecognition assays. This metal was selected for its good features to be sputtered and to immobilize biomolecules.<sup>19</sup> Moreover, this thin layer of gold is highly transparent and allows almost 90 % of the incident light to transmit through the underlying structure. Below this initial coating, the nanomaterial comprises a film of Ag-In-Sb-Te alloy sandwiched between two layers of ZnS. Given the high refractive index contrast of these materials ( $RI_{\text{Ag-In-Sb-Te}} = 4.0$  and  $RI_{\text{ZnS}} = 2.3$ , Table S1), this three-layered structure generates great multilayer reflections, which are the main responsible for the interferometric properties of the nanomaterial. This particular sandwiched structure was also selected because it is employed as data recording material in standard rewritable compact disks,<sup>20</sup> so the ASSURED potential of the resulting interferometric biosensors is strongly supported by the already existing technologies to fabricate this multilayer in an inexpensive and large-scale fashion. Successively, the nanomaterial comprises a 50 nm gold film to act as a mirror and reflect the light back to the multilayer, thus enhancing the interferometric response and favoring its measurement by reflectance. Finally, polycarbonate flat plates were employed as substrates to build this multilayered material. This polymer is easy to handle, presents a good adhesion for sputtered gold, and the bioanalytical developments on polycarbonate involve appealing lab-on-a-disk perspectives.<sup>21</sup>

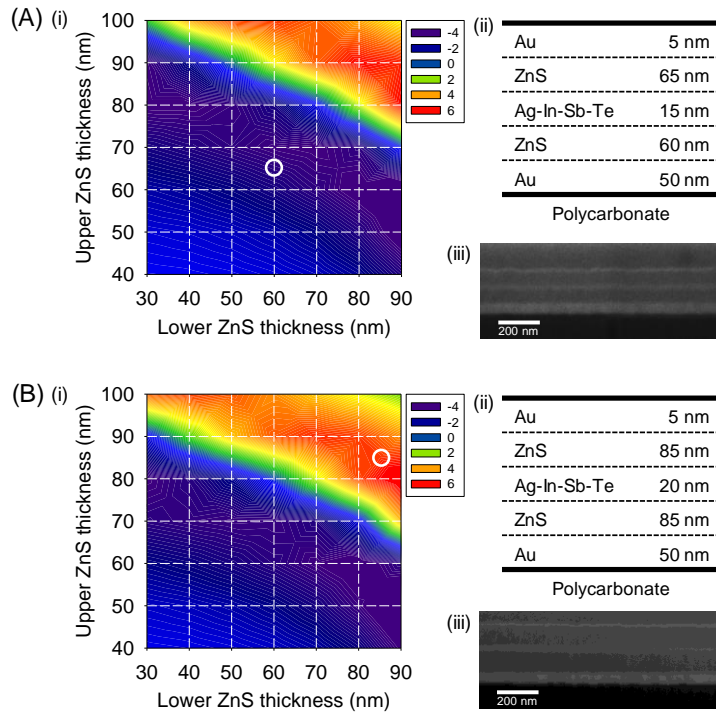
We explored the optical behavior of these materials to transduce biorecognition events by exploiting the optical constructive and destructive interferences. For that, we first assessed the interferometric response of different multilayer configurations

in biorecognition conditions by calculating the reflectance variation of a red (650 nm) beam for a change in the thickness of a biorecognition assay on the material from 0 to 20 nm. In short, these calculations are based on the complex-matrix form of the Fresnel equations and provide the reflected intensity at a given wavelength considering the thickness and refractive index of each layer.<sup>22</sup> The calculations consist of a bi-parametrical screening of the thicknesses of both ZnS films (upper and lower) for a range of thicknesses of Ag-In-Sb-Te alloy (one plot for each alloy thickness). Negative values in these graphs indicate destructive interferences introduced by the assay, positive values mean constructive interferences, and larger absolute values indicate in both cases greater signal changes and potentially higher bioanalytical sensitivity.

As shown in Fig. 2A and Fig. S2, the interferometric response along the variation of the thickness of both ZnS films displays a common trend defined by three main areas. The first one is a rather insensitive area at low thicknesses values. Then, when the thicknesses increase, the biological layer introduces a long valley of destructive interference that reaches an intensity reduction in the reflected light of up to a 4 %. Next, further thickness increases in both ZnS layers display a steep ridge of constructive interference of up to a positive 6%. On the other hand, when comparing all the plots, it can be observed that these three main areas progressively move towards thinner values of ZnS when the thickness of Ag-In-Sb-Te alloy increases.

As observed, similar interferometric responses are displayed by different thickness profiles. From the simulated results, we selected the configurations schematized in the Fig. 2B to create the destructive and constructive interferometric nanomaterials. These structures involve a deep destructive valley and a high constructive ridge (respectively), they keep a balanced distribution of thicknesses along the different layers, and comprise two different configurations to be experimentally investigated. The reflected intensity of these two structures along a

range of thicknesses of biological layer was also simulated, and the results show a good correlation with a linear trend in both cases (Fig. S3).



**Fig. 2.** Design and characterization of the multilayered nanomaterials. (i) Bi-parametric simulated assessment of the interferometric response displayed by a change in the thickness of the biological layer on the material from 0 to 20 nm, screening different thicknesses of both ZnS films for Ag-In-Sb-Te thicknesses of (A) 15 nm and (B) 20 nm. Color legends indicate the changes in the reflected intensity in percentage (considering the intensity of the incident beam as 100%). See Fig. S2 for the plots at additional alloy thicknesses. (ii) Scheme of the multilayered structure of the selected (A) destructive and (B) constructive interferometric nanomaterials. (iii) FIB-FESEM images of the (A) destructive and (B) constructive multilayers. From bottom to top, the first black layer is the

polycarbonate substrate, the whitish film on it corresponds to gold, and the following greyish-whitish-greyish layers correspond to the Ag-In-Sb-Te alloy sandwiched between ZnS. The upper whitish film is the 5 nm gold coating, and the top greyish layer is a platinum coating deposited to improve the quality of the scans.

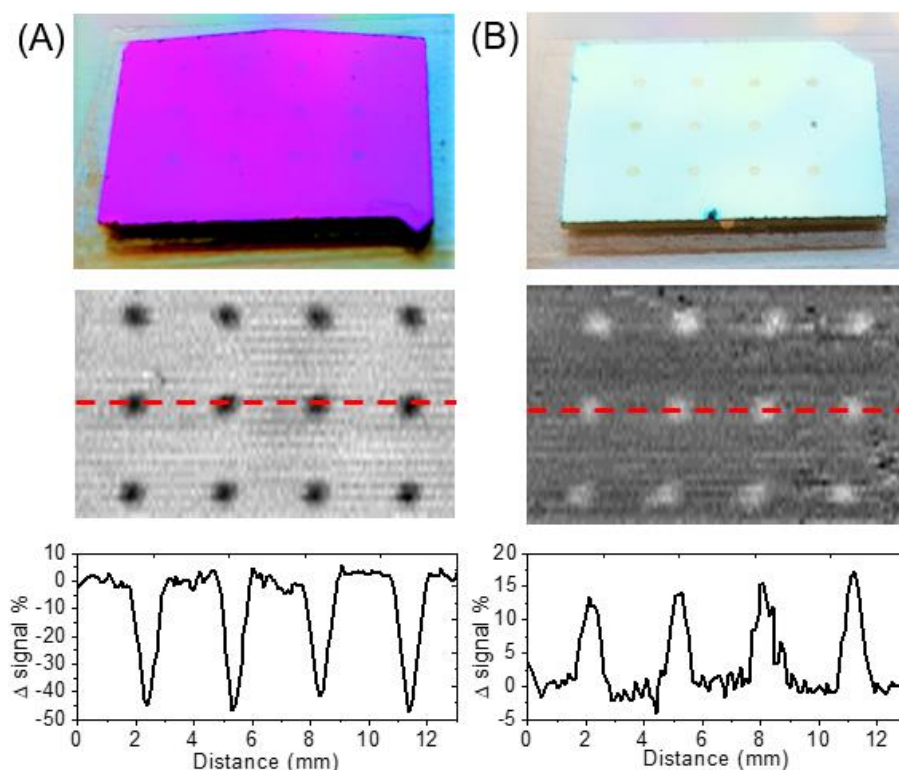
The selected configurations were fabricated by depositing one by one all the films by sputtering, and the resulting nanomaterials present a good adhesion between layers. Also, the structural differences between both multilayers generate different spectral interferences that provide distinct colors to the resulting nanomaterials. When observed perpendicularly, the destructive multilayer displays a purplish spectrum whereas the constructive one shows a yellowish color (Fig. S4).

To characterize the fabricated materials, micrometric ditches were created on them by FIB and the thicknesses profiles were analyzed by FESEM. As shown in Fig. 2C, both multilayered structures are observed in the microscopy images and all the films are homogeneously distributed along of the substrate, as expected.

### **3.2. Measurement system**

This section presents the development of a laser-scanning measurement system to analyze the interferometric response of microarrayed biorecognition assays on the nanomaterials. In addition to ensure that the required bioanalytical parameters are met in the resulting assays, this detection setup also aims to provide insights into simplicity, low cost, and portability of the system in order to support the applicability of the resulting biosensor. Along these lines, herein we conceive a monochromatic (650 nm) imaging interferometric system that fully exploits the laser units of standard DVD drives. These are inexpensive (about 12 €), robust, and compact (4 x 3 x 1.5 cm) devices that integrate all the elements to measure the reflectance interferences generated by the nanomaterials (Fig. 1B). These laser units also comprise a small photodiode that monitors the laser intensity, used besides to

successfully keep a constant laser intensity along the measurements by implementing an automatic laser power control algorithm (Fig. S5).



**Fig. 3.** Photographs (top), resulting interferometric images (middle), and their corresponding intensity cross section profiles along the dashed red lines (bottom) for the (A) destructive and (B) constructive interferometric nanomaterials. The microarrays consist of immobilized OVA-S8 dots after interacting with a constant concentration (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of specific IgGs. Normalized signals in the cross section profiles, where 0 % corresponds to the reflected intensity without biological layer.

To scan the microarrayed assays, the nanomaterials were placed on a custom positioning system that automatically moves them under the perpendicular irradiation of the laser unit (Fig. S1A). Then, considering the motion of this

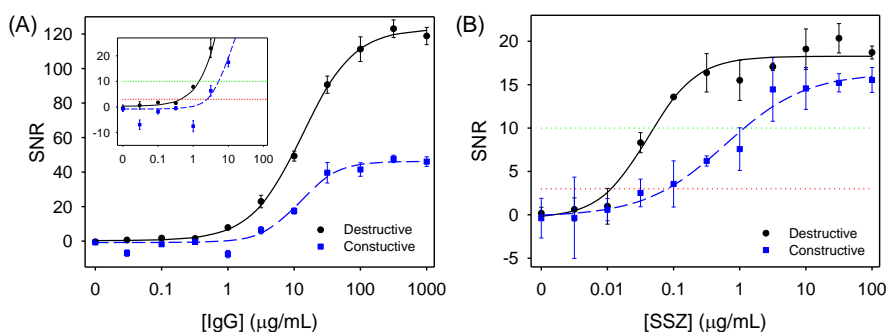
positioning system, the intensities acquired along the scanning process were rearranged to build an image. As shown in Fig. 3, this imaging strategy enables to obtain the bi-dimensional interferometric profiles of microarrays on the nanomaterials. These results constitute the first proof in this work towards empirical biosensing, and they also demonstrate that both multilayers experimentally present the destructive and constructive profiles for which they were designed.

### 3.3. Immunosensing

In order to assess the bioanalytical performance of the approach in experimental biorecognition conditions, immunoassays were performed on the surface of the destructive and constructive nanomaterials. For that, BSA probes were immobilized as microarrays, and their interferometric response after interacting with their targets was quantified using the laser-based imaging system described above. Firstly, an immunoassay based on BSA probes to quantify selective antiBSA-IgG as targets in solution, was carried out. This immunological system is commonly used for proof-of-concept purposes,<sup>23</sup> whereas BSA also has an important role in many biological functions.<sup>17</sup> For example, this protein is responsible for most of the allergic reactions to cow milk and beef, and it is also involved in the autoimmune response leading to diabetes mellitus.<sup>24</sup>

As shown in Fig. 4A, well-correlated dose-response curves were obtained for the BSA/antiBSA model immunoassay measured by both constructive and destructive interferences in label-free conditions. The constructive nanomaterial displayed lower SNR values, and it achieved detection and quantification limits of 3.12 and 5.77  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of IgG, respectively. On the other hand, the destructive multilayer presented greater signal variations and a lower noise ( $\text{noise}_{\text{destruc.}} = 0.08$  a.u. and  $\text{noise}_{\text{construc.}} = 0.16$  a.u.). As a result, the sensitivity with this multilayer becomes about one order of magnitude higher and reaches detection and quantification limits of 0.46 and 1.49  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of unlabeled IgG, respectively.





**Fig. 4.** Experimental dose-response curves for the destructive and constructive multilayered nanomaterials measured with the laser-based imaging setup. (A) Results for the BSA/anti-BSA immunoassay. Data fitted to a four-parameter logistic equation ( $R^2_{destruc.} = 0.998$  and  $R^2_{construc.} = 0.983$ ). Inset plot zooms in the detection and quantification limits (bottom and top dotted lines, respectively). (B) Dose-response curves for competitive sulfasalazine immunoassay. Experimental data fitted to four-parameter logistic equation ( $R^2_{destruc.} = 0.974$  and  $R^2_{construc.} = 0.979$ ). Bottom and top dotted lines mark the SNR thresholds for the detection and quantification limits, respectively. (A and B) Averaged values and standard deviation were calculated from 3 replicates.

Consequently, the application of this interferometric approach for immunosensing low-molecular weight organic compounds, was investigated. In particular, we focused on the label-free quantification of sulfasalazine, a sulfonamide (398,4 g/mol) commonly used as a drug.<sup>25</sup> As in most optical nanomaterials for label-free bioanalysis, the interferometric transduction herein proposed ultimately relies on refractive index variations. To maximize the biointeraction signals, a competitive immunoassay was arranged.

For this, protein-sulfasalazine (OVA-S8) conjugates were microarrayed on the surface of both nanomaterials. As observed in Fig. 4B, both dose-response curves

showed the expected sigmoidal response. Lower SNR values were obtained in this assay, compared to BSA/anti-BSA, since blank measurements display higher signals in this competitive, which results in proportionally higher noise values.

The constructive nanomaterial showed detection and quantification limits of 81 and 1170 ng mL<sup>-1</sup> of unlabeled sulfasalazine, respectively. Whereas the destructive one displayed a more sensitive curve and reached detection and quantification limits of 11 and 50 ng mL<sup>-1</sup>, respectively. Along these lines, it is worth to highlight that this sensitivity is in the range of those reported with electrochemical techniques using much more complex protocols and expensive instrumentation.<sup>26,27</sup> Also, this limit of quantification is lower than the 3 μg mL<sup>-1</sup> of sulfasalazine found in serum samples after the recommended treatment dose of 2 g per day.<sup>28</sup>

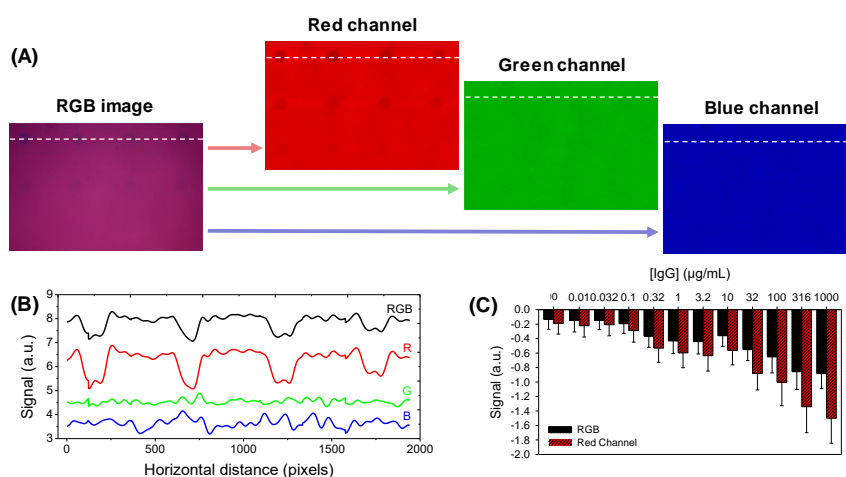
The interferometric behavior of these materials can also be potentially exploited to improve the reliability in bioanalysis. Most physical artifact sources in optical biosensing (dust, precipitates, substrate damage, etc.) absorb or scatter the incident light, thus generating unwanted signal decreases that affect negatively on the bioanalytical measurement. According to the design of these nanostructures, light intensities lower than the one of the raw substrate acquired with constructive multilayers cannot be originated by the biointeraction and must come from experimental artifacts. Analogously, unwanted physical contributions that increased the intensity measured in the row material, can be identified as artifacts when performing the assay on destructive multilayers. Therefore, combining both nanomaterials for the same analysis is an appealing strategy to identify false positives and negatives.

### **3.4. One-shot interferometric biosensing**

These results demonstrate the potential of standard DVD laser units to perform interferometric measurements, whereas the materials and structure of these

---

multilayers are also similar to the ones of the recording layer comprised in standard rewritable compact disks.<sup>29</sup> Therefore, given the potential of compact disks and drives for labelled<sup>21,30</sup> and label-free biosensing,<sup>31–33</sup> this development suggests interesting perspectives towards prospective lab-on-a-disk systems. On the other hand, these DVD laser units can also be exploited to perform one-shot interferometric imaging of microarrays on the materials. For that, the diameter of the beam must be expanded and the photodiode must be replaced by a monochromatic camera. Preliminary results have been obtained in this direction (Fig. S6), which suggests even simpler and faster measurements.



**Fig. 5.** Results of the color-based one-shot imaging system. (A) RGB image of a microarrayed immunoassay on a destructive, and its corresponding red, green, and blue channels. (B) Intensity cross section profiles of the dashed white lines in the images above. A vertical offset was introduced in the curves to avoid them to overlap and to simplify their visualization. (C) Dose-response curve of the immunoassay quantified from both the RGB image and the red channel ( $R_{RGB}^2 = 0.939$  and  $R_{Red}^2 = 0.965$ , four-parameter logistic fitting).

On the other hand, RGB images of a destructive multilayer with microarrayed immunoreagent spots to quantify selective IgG targets were taken with a microscope camera (Fig. S1B). As shown in Fig. 5A, the green and blue channels do not contain any analytical information, whereas the microarray observed in the RGB image is only comprised in the red channel, as expected for this interferometric nanostructure tuned for 650 nm. Also, the red channel is the only one whose intensity cross section presents the expected destructive profile along the microarrayed immunoassay (Fig. 5B). A signal proportional to the IgG concentration was also displayed by this approach (Fig. 5C), and although the correlation obtained is lower than the previous one with the laser-scanner, this color-based one-shot approach provides a promising simple and fast interferometric system for label-free quantitative biosensing.

## 4. Conclusions

This investigation demonstrates that these optical materials constituted by superposed nanometric films of Ag-In-Sb-Te, ZnS, and Au on polycarbonate allow label-free immunoassays to be quantified by interferometric imaging using simple reflection-based optical setups. By modifying the thicknesses profile of the multilayered structures, they can tune to transduce biorecognition events as both destructive and constructive interferences. The experimental results obtained in a model immunoassay and in a competitive immunoassay for low molecular weight organic compounds, demonstrate the bioanalytical performance of the approach and opens the door for its implementation in other applications and biorecognition assays. Although the destructive multilayer presents a higher sensitivity, combining both structures introduces interesting options to improve the reliability in bioanalysis. In addition, the developed DVD-based laser scanning system becomes a compact and inexpensive device with which the interferometric response of microarrayed assays on the nanomaterials can be successfully quantified by imaging. Furthermore, this detection system together with the structural and

compositional features shared by this multilayers and standard rewritable disks, suggest prospective lab-on-a-disk advances. All this, along with the color-based one-shot approaches explored in this work, provide appealing insights into the application and dissemination of optical nanomaterials for label-free biosensing out of specialized environments.

### Acknowledgment

This research was supported by FEDER and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ2013-45875-R and CTQ2016-75749-R). The authors thank Ángel López Muñoz for the construction of the motorized XY stage.

### References

1. Larsson, A.; Greig-Pylypczuk, R.; Huisman, A. The state of point-of-care testing: A european perspective. *Ups. J. Med. Sci.* **2015**, *120*, 1–10.
2. St John, A.; Price, C.P. Existing and emerging technologies for point-of-care testing. *Clin. Biochem. Rev.* **2014**, *35*, 155–167.
3. Rau, S.; Gauglitz, G. Reflectometric interference spectroscopy (RIfS) as a new tool to measure in the complex matrix milk at low analyte concentration. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 529–536.
4. Kettler, H.; White, K.; Hawkes, S. Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections: Key findings and recommendations. *Unicef/Undp/World Bank/Who* **2004**, 1–44.
5. Fechner, P.; Bleher, O.; Ewald, M.; Freudenberger, K.; Furin, D.; Hilbig, U.; Kolarov, F.; Krieg, K.; Leidner, L.; Markovic, G.; et al. Size does matter! Label-free detection of small molecule-protein interaction. *Anal Bioanal Chem* **2014**, *406*, 4033–4051.

6. Ince, R.; Narayanaswamy, R. Analysis of the performance of interferometry, surface plasmon resonance and luminescence as biosensors and chemosensors. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *569*, 1–20.
7. Kussrow, A.; Enders, C.S.; Bornhop, D.J. Interferometric methods for label-free molecular interaction studies. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 779–792.
8. González-Guerrero, A.B.; Maldonado, J.; Herranz, S.; Lechuga, L.M. Trends in photonic lab-on-chip interferometric biosensors for point-of-care diagnostics. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 8380–8394.
9. Liu, Q.; Shin, Y.; Kee, J.S.; Kim, K.W.; Mohamed Rafei, S.R.; Perera, A.P.; Tu, X.; Lo, G.-Q.; Ricci, E.; Colombel, M.; et al. Mach–Zehnder interferometer (MZI) point-of-care system for rapid multiplexed detection of microRNAs in human urine specimens. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *71*, 365–372.
10. Mulder, H.K.P.; Blum, C.; Subramaniam, V.; Kanger, J.S. Size-selective analyte detection with a Young interferometer sensor using multiple wavelengths. *Opt. Express* **2016**, *24*, 8594.
11. Escorihuela, J.; González-Martínez, M.Á.; López-Paz, J.L.; Puchades, R.; Maquieira, Á.; Gimenez-Romero, D. Dual-polarization interferometry: a novel technique to light up the nanomolecular world. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 265–294.
12. Kozma, P.; Kehl, F.; Ehrentreich-Förster, E.; Stamm, C.; Bier, F.F. Integrated planar optical waveguide interferometer biosensors: A comparative review. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *58*, 287–307.
13. Mace, C.R.; Striemer, C.C.; Miller, B.L. Theoretical and experimental analysis of arrayed imaging reflectometry as a sensitive proteomics

- technique. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5578–5583.
14. Daaboul, G.G.; Vedula, R.S.; Ahn, S.; Lopez, C.A.; Reddington, A.; Ozkumur, E.; Ünlü, M.S. LED-based Interferometric Reflectance Imaging Sensor for quantitative dynamic monitoring of biomolecular interactions. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2221–2227.
  15. Gopinath, S.C.B.; Awazu, K.; Fons, P.; Tominaga, J.; Kumar, P.K.R. A sensitive multilayered structure suitable for biosensing on the BioDVD platform. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4963–4970.
  16. Gopinath, S.C.B.; Awazu, K.; Tominaga, J.; Kumar, P.K.R. Monitoring biomolecular interactions on a digital versatile disk: A BioDVD platform technology. *ACS Nano* **2008**, *2*, 1885–1895.
  17. Pastor-Navarro, N.; Gallego-Iglesias, E.; Maquieira, Á.; Puchades, R. Immunochemical method for sulfasalazine determination in human plasma. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583*, 377–383.
  18. <https://www.filmetrics.com/> (accessed on May 30, 2018).
  19. Avella-Oliver, M.; Carrascosa, J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Diffractive protein gratings as optically active transducers for high-throughput label-free immunosensing. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 9002–9008.
  20. Avella-Oliver, M.; Morais, S.; Carrascosa, J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Total analysis systems with thermochromic etching discs technology. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 12037–12046.
  21. Ozboyaci, M.; Kokh, D.B.; Wade, R.C. Three steps to gold: mechanism of protein adsorption revealed by Brownian and molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 10191–10200.
-

22. Tashiro, H.; Harigaya, M.; Kageyama, Y.; Ito, K.; Shinotsuka, M.; Tani, K.; Watada, A.; Yiwata, N.; Nakata, Y.; Emura, S. Structural analysis of Ag–In–Sb–Te phase-change material. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2002**, *41*, 3758–3759.
23. Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Disc-based microarrays: principles and analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 4523–4534.
24. Troparevsky, M.C.; Sabau, A.S.; Lupini, A.R.; Zhang, Z. Transfer-matrix formalism for the calculation of optical response in multilayer systems: from coherent to incoherent interference. *Opt. Express* **2010**, *18*, 24715–24721.
25. Yin, X.B.; Qi, B.; Sun, X.; Yang, X.; Wang, E. 4-(Dimethylamino)butyric acid labeling for electrochemiluminescence detection of biological substances by increasing sensitivity with gold nanoparticle amplification. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3525–3530.
26. Kooser, A.; Manygoats, K.; Eastman, M.P.; Porter, T.L. Investigation of the antigen antibody reaction between anti-bovine serum albumin (a-BSA) and bovine serum albumin (BSA) using piezoresistive microcantilever based sensors. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19*, 503–508.
27. Amaral, J.K.; Sutaria, R.; Schoen, R.T. Treatment of chronic chikungunya arthritis with methotrexate: a systematic review. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. **2018**, *70*, 1501–1508.
28. Sadeghi, S.; Motaharian, A.; Moghaddam, A.Z. Electroanalytical determination of sulfasalazine in pharmaceutical and biological samples using molecularly imprinted polymer modified carbon paste electrode. *Sens. Actuators B* **2012**, *168*, 336–344.
29. Sadeghi, S.; Garmroodi, A. Sensitive detection of sulfasalazine at screen printed carbon electrode modified with functionalized multiwalled carbon

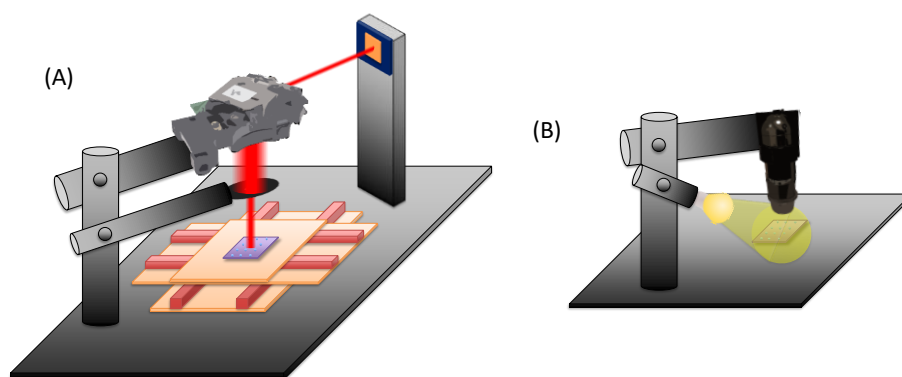


- nanotubes. *J. Electroanal. Chem.* **2014**, *727*, 171–178.
30. Nigović, B.; Jurić, S.; Mitrović, I. Bismuth nanoparticles-carbon nanotubes modified sensor for sulfasalazine analysis. *Talanta* **2017**, *164*, 201–208.
31. Kolobov, A. V.; Fons, P.; Frenkel, A.I.; Ankudinov, A.L.; Tominaga, J.; Uruga, T. Understanding the phase-change mechanism of rewritable optical media. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 703–708.
32. Sancho-Fornes, G.; Avella-Oliver, M.; Carrascosa, J.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Enhancing the sensitivity in optical biosensing by striped arrays and frequency-domain analysis. *Sens. Actuators B* **2019**, *281*, 432–438.
33. Avella-Oliver, M.; Puchades, R.; Wachsmann-Hogiu, S.; Maquieira, A. Label-free SERS analysis of proteins and exosomes with large-scale substrates from recordable compact disks. *Sens. Actuators B* **2017**, *252*, 657–662.
34. Sancho-Fornes, G.; Avella-Oliver, M.; Carrascosa, J.; Fernandez, E.; Brun, E.M.; Maquieira, Á. Disk-based one-dimensional photonic crystal slabs for label-free immunosensing. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *126*, 315–323.
35. López-Muñoz, G.A.; Estevez, M.-C.C.; Peláez-Gutierrez, E.C.; Homs-Corbera, A.; García-Hernandez, M.C.; Imbaud, J.I.; Lechuga, L.M. A label-free nanostructured plasmonic biosensor based on Blu-ray discs with integrated microfluidics for sensitive biodetection. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *96*, 260–267.

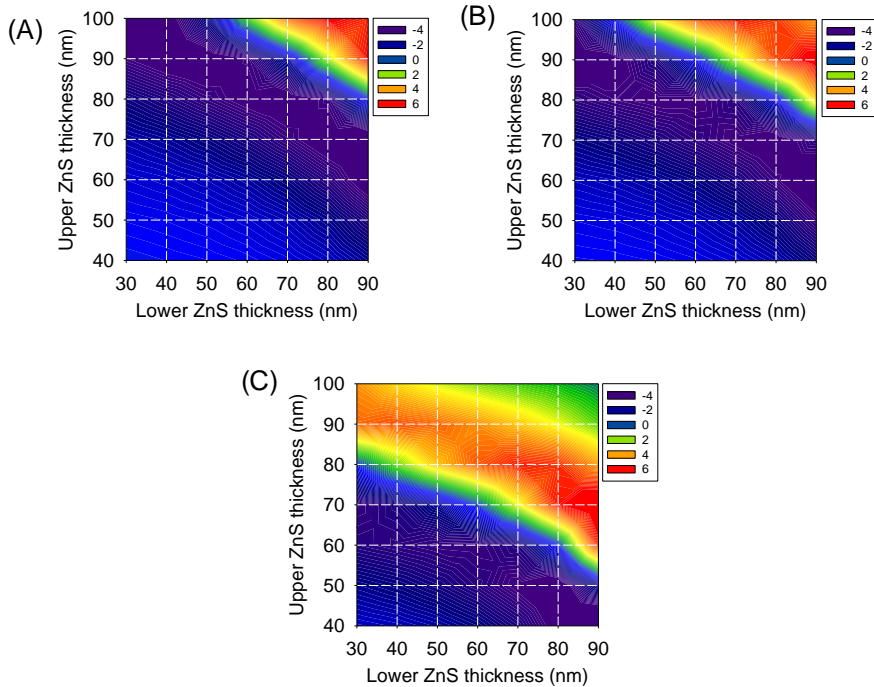
## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### Interferometric multilayered nanomaterials for imaging unlabeled biorecognition events

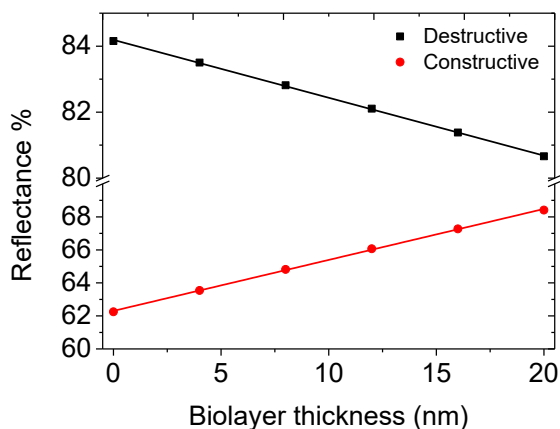
Gabriel Sancho-Fornes, Miquel Avella-Oliver, Javier Carrascosa, Rosa Puchades, and Ángel Maquieira



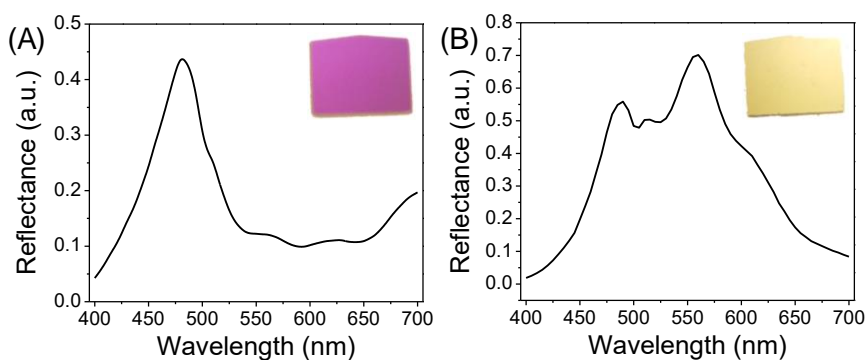
**Fig. S1.** Optical setups used in this work. (A) Scheme of the laser-scanning optical setup. The focusing system integrated in the standard DVD laser unit was removed to keep a collimated beam (*Anal. Chem.* 2017, 89, 9002) and a diaphragm was used to reduce its diameter to 400  $\mu\text{m}$ . A 5x5 mm photodiode, with a spectral range of detection from 400 to 1100 nm and a sensitivity of 0.55 A/W, was employed to collect the intensity of the reflected beam. The developed DVD-based positioning stage was set to scan the chips at 1 mm s<sup>-1</sup> with an acquisition time of 0.05 s, which leads to a measurement each 50  $\mu\text{m}$ . The size of the resulting device is about 17x17x13 cm and its price is over 38 € (~10 € per laser unit, ~8 €/photodiode, and ~20 €/sled motor). (B) Scheme of the color-based one-shot interferometric imaging system.



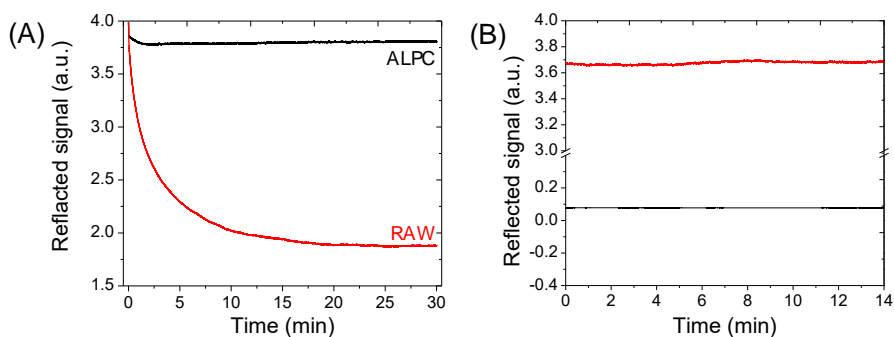
**Fig. S2.** Bi-parametric simulated assessment of the interferometric response displayed by a change in the bilayer thickness on the materials from 0 to 20 nm, with the incident beam of 650 nm, and screening different thicknesses of both ZnS films for Ag-In-Sb-Te thicknesses of (A) 5 nm, (B) 10 nm, and (C) 30 nm.



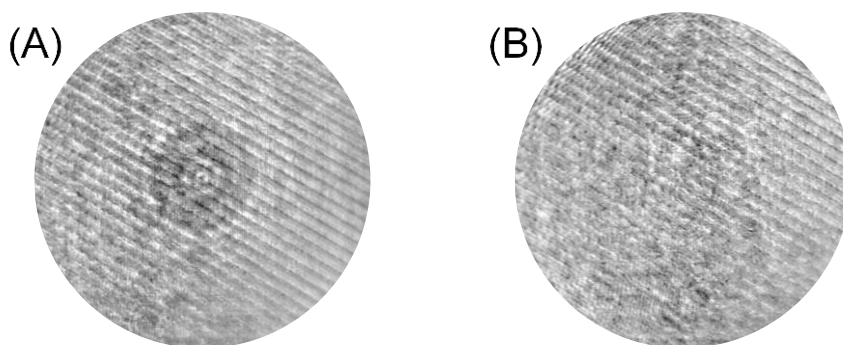
**Fig. S3.** Calculated optical response of both interferometric materials at a wavelength of 650 nm for a range of biolayer thicknesses. A linear fit is given for both destructive ( $R^2=0.9996$ ) and constructive ( $R^2=0.9993$ ) configurations, which display a sensitivity of 0.18 and 0.31 %Reflectance  $\text{nm}^{-1}$ , respectively.



**Fig. S4.** Reflectance spectra of the selected (A) destructive and (B) constructive interferometric nanomaterial, measured with a photometer (662 photometer, Metrohm, Herisau, Switzerland). Inset images are photographs of the resulting chips.



**Fig. S5.** Experimental results of the stability of the DVD laser unit. (A) Light intensity along time with (ALPC) and without (RAW) using the automatic laser power control algorithm. (B) Light intensity stability along time for the DVD laser unit with ALPC (top graph) and a standard benchtop laser source (bottom graph). The benchtop system was a fiber coupled laser source (S1FC635, Thorlabs Inc., New Jersey, USA), and both were measured with the same photodiode. Although the intensity of the second one displayed a slightly lower relative standard deviation along time (0.31% and 0.16%, respectively), this strategy ensures good stability for the aimed bioanalytical measurements in this work.



**Fig. S6.** Images of microarray dots measured with the one-shot laser-based scanning system, for the BSA immunoassay after interacting with (A) 100 and (B) 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of selective IgG. The images were acquired with the optical setup described in Fig. S1A, where the diaphragm was removed, the positioning stage was not used, and the photodiode was replaced by a monochromatic CMOS camera (Edmund eo-1312 m, York, UK). The resulting images were digitally processed with a bandpass Fourier filter.

**Table 1.** Experimental refractive indexes, determined by ellipsometry, of the materials composing the multilayer. The real part of the refractive index is denoted as “RI”, and the imaginary part as “k”.

Material	RI	k
Au	$0.18 \pm 0.04$	$3.63 \pm 0.04$
ZnS	$2.296 \pm 0.011$	$0.002 \pm 0.002$
Ag-In-Sb-Te Alloy	$3.99 \pm 0.03$	$2.48 \pm 0.02$

### Conclusiones

En este capítulo se expone el trabajo realizado en torno al diseño y desarrollo de un biosensor interferométrico *label-free*. Se ha demostrado que los materiales que componen los DVD-RW, depositados siguiendo diferentes patrones y grosores, generan una estructura multicapa que modifica significativamente la intensidad del haz reflejado al variar el índice de refracción sobre su superficie.

Variando las configuraciones se han fabricado dos sustratos cuya respuesta a variaciones en el índice de refracción sobre su superficie es opuesta, es decir, uno de ellos aumenta la intensidad del haz reflejado, mientras que el otro la disminuye. Esto es debido a que en el primer sustrato la capa biológica genera una interacción interferométrica constructiva, mientras que en el segundo es destructiva. Ambas estructuras fueron empleadas para la cuantificación de IgG en un inmunoensayo directo y para la cuantificación de sulfasalazina (un fármaco de baja masa molecular) en un inmunoensayo competitivo. Pese a que ambos sustratos fueron aptos para el biosensado, el de respuesta destructiva mostró una mayor sensibilidad, mientras que el constructivo puede ser útil para reducir los falsos positivos obtenidos con el destructivo.

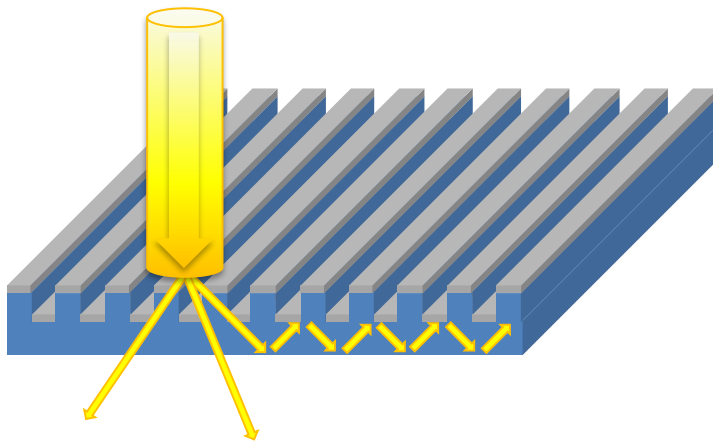
Por otro lado, también se ha desarrollado un sistema de interrogación basado en el sistema de posicionamiento y lectura de los discos DVD. Este sistema se ha empleado con éxito en la interrogación de los sustratos interferométricos, registrando las variaciones en la intensidad reflejada debidas a los ensayos. También se ha comprobado que estos sustratos pueden ser interrogados con cámaras y microscopios, ya que los ensayos generan una señal detectable a simple vista. Ello simplifica y reduce el tiempo de la etapa de adquisición de datos y puede suponer una ventaja adicional de este tipo de sustratos.





## Capítulo 4

### Cristales fotónicos para biosensado *label-free*





## Introducción

En este capítulo se aborda el desarrollo de un biosensor basado en cristales fotónicos 1D, aprovechando la estructura interna de los discos compactos. Un cristal fotónico puede ser definido como un material estructurado, en el cual el índice de refracción varía periódicamente en una, dos o tres direcciones ortogonales. Al interactuar la radiación con estas estructuras, se detecta una elevada eficiencia de reflexión y una baja eficiencia de transmisión en ciertas longitudes de onda. La clave para su empleo como sustratos sensores reside en su elevada sensibilidad a los cambios en el índice de refracción localizado en su superficie. Así, una interacción sonda/diana sobre la superficie de un cristal fotónico causa un cambio en el índice de refracción efectivo, el cual genera una variación en la longitud de onda donde aparece el pico máximo resonante, proporcional a la concentración del analito.

Los cristales fotónicos han sido ampliamente usados como sensores químicos y bioquímicos. Esto es debido a que las propiedades electromagnéticas de estos materiales son más configurables que las metálicas, son altamente sensibles a cambios de índice de refracción en superficie y pueden ser desarrollados a partir de un gran número de materiales y configuraciones, lo que les hace muy atractivos.

Sin embargo, los cristales fotónicos aún no juegan un papel importante en la industria debido a la dificultad de fabricación. Un cristal fotónico diseñado para aplicaciones en la región visible requiere un tamaño de la estructura que lo compone de 300 nm a 1  $\mu\text{m}$ . Los avances en nanofabricación han permitido llegar, no sin esfuerzo, a fabricar en esta escala. Sin embargo, requiere el empleo de técnicas muy especializadas.

La estructura interna de los discos consiste en una espiral cuya dimensión depende de la naturaleza del disco, pero todas ellas se encuentran próximas a las requeridas para aplicaciones en la región visible del espectro. La combinación de

estas estructuras con un recubrimiento de material dieléctrico con índice de refracción elevado, da lugar a un material capaz de interactuar con la luz.

En la bibliografía se encuentran trabajos que utilizan las estructuras internas de los discos para el desarrollo de biosensores *label-free*, basados en difracción, resonancia de Fano y espectroscopia Raman mejorada de superficie. En este trabajo se estudian por primera vez las propiedades físico-químicas de las estructuras internas de los discos de CD, DVD y Blu-ray recubiertos por varios grosores de una capa de óxido de titanio. Con el fin de producir cristales fotónicos aplicables al biosensado, se escoge la combinación cuya resonancia de modo guiado (GMR) genera el valle más pronunciado y definido, y se caracterizan sus propiedades ópticas. Todo ello apoyado con simulaciones para predecir y confirmar lo observado experimentalmente.

Los valles generados en el espectro de transmisión por el GMR son sensibles a variaciones en el índice de refracción ocurridos sobre la superficie del cristal. Siguiendo el desplazamiento de los valles en el espectro de transmisión se cuantifican las concentraciones de los analitos diana.

El trabajo se ha abordado en las siguientes etapas:

- Simulación teórica y caracterización experimental del comportamiento fotónico de las estructuras internas de los discos compactos recubiertas con una capa de diferentes espesores de óxido de titanio.
- Desarrollo de un sistema de detección en mesa óptica, empleando una fuente de luz blanca y un espectrofotómetro como detector.
- Selección del cristal fotónico con mejores prestaciones y estudio experimental de sus propiedades fotónicas, apoyadas con simulaciones.

- Diseño, fabricación y caracterización física del tipo de cristal fotónico seleccionado.
- Estudio de la respuesta refractométrica con disoluciones de diferente índice de refracción.
- Puesta a punto del modo de inmovilización covalente de bioreceptores sobre la superficie del disco.
- Evaluación de la sensibilidad y selectividad del ensayo.
- Puesta a punto de un inmunoensayo directo para la cuantificación sin marcaje de anticuerpos, proteína C-reactiva y deshidrogenasa láctica.





Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bios](http://www.elsevier.com/locate/bios)



## Disk-based one-dimensional photonic crystal slabs for label-free immunosensing

Gabriel Sancho-Fornes,<sup>a</sup> Miquel Avella-Oliver,<sup>a</sup> Javier Carrascosa,<sup>a</sup> Estrella Fernandez,<sup>a</sup> Eva M. Brun,<sup>a</sup> Ángel Maquieira<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Universitat Politècnica de València, Universitat de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain.

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain.

Reprinted from **Biosensors and Bioelectronics**, 2019, 126, 315-323.

Copyright © 2013, with permission from Elsevier

### Abstract

One-dimensional photonic crystal slabs are periodic optical nanostructures that produce guided-mode resonance. They couple part of the incident light into the waveguide generating bandgaps in the transmittance spectrum, whose position is sensitive to refractive index variations on their surface. In this study, we present one-dimensional photonic crystal slab biosensors based on the internal nanogrooved structure of Blu-ray disks for label-free immunosensing. We demonstrated that this polycarbonate structure coated with a critical thickness of TiO<sub>2</sub> generates guided-

mode resonance. Its optical behavior was established comparing it with other compact disk structures. The results were theoretically calculated and experimentally demonstrated, all them being in agreement. The bioanalytical performance of these photonic crystals was experimentally demonstrated in a model assay to quantify IgGs as well as in two immunoassays to determine the biomarkers C-reactive protein and lactate dehydrogenase (detection limits of 0.1, 87, and 13 nM, respectively). The results are promising towards the development of new low-cost, portable, and label-free optical biosensors that join these photonic crystals with dedicated bioanalytical scanners based on compact disk drives.

**Keywords:** Photonic crystal, guided-mode resonance, diffraction, blu-ray, immunosensing, label-free.

### 1. Introduction

There is an increasing social demand of point-of-care analytical systems,<sup>1-3</sup> which highlights the need of scientific advances that supports the development of biosensors towards the ASSURED criteria outlined by the World Health Organization.<sup>4</sup> The design of biosensors capable of analyzing unlabeled biointeractions provide appealing solutions in this direction, mainly in terms of simplicity and reliability.<sup>5-8</sup> On the other hand, the impact of these systems on the point-of-care scenario is strongly restricted by the low scalability, high complexity, and costs of the materials and nanofabrication methods on which the state-of-the-art label-free biosensing approaches are based.<sup>9,10</sup>

Photonic crystals (PCs) are a popular class of optical biosensing materials that enable label-free analysis format.<sup>11</sup> They are nanostructured systems constituted by alternated materials with different refractive indexes that extend along one, two, or three directions in a periodic fashion.<sup>12</sup> PCs interact with light generating higher (bands) and lower (bandgaps) intensity regions in the reflected and transmitted

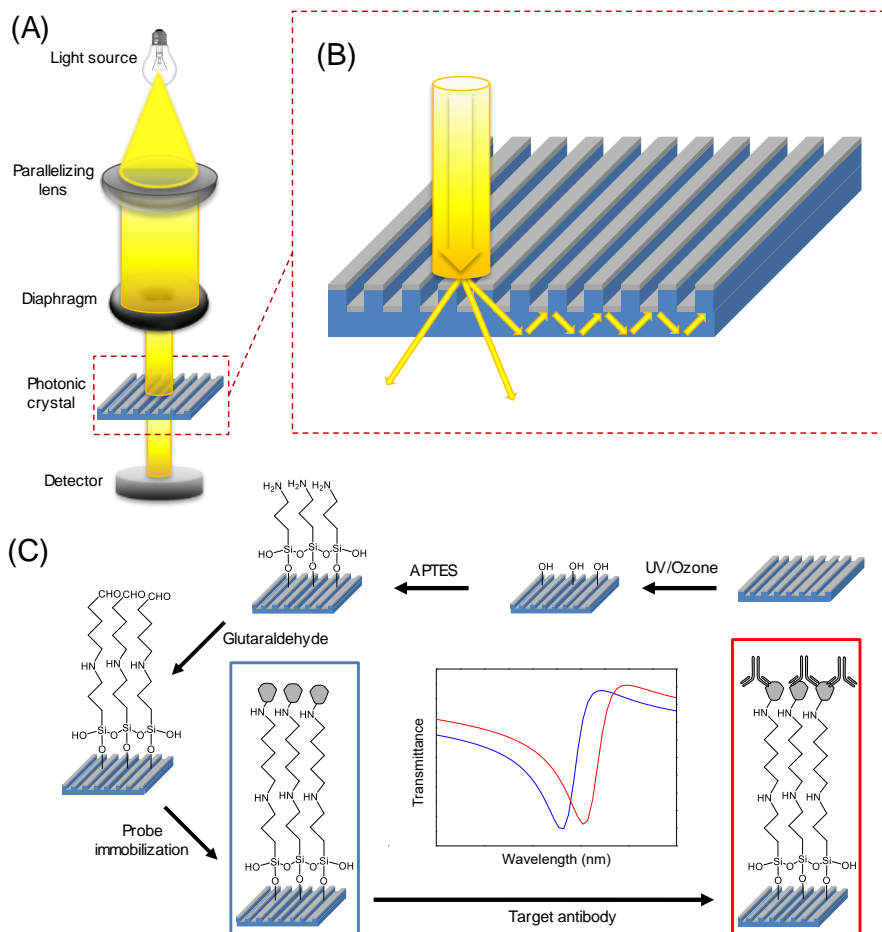


spectra.<sup>13,14</sup> These materials are typically used as refractometric biosensors to sense unlabeled biointeractions, where they are tailored to modify their light filtering properties upon refractive index variations (on or into the material) and used as substrates for heterogeneous biorecognition assays. This strategy has been employed for several biosensing purposes, such as analyzing binding affinities<sup>15</sup> and quantifying biointeractions in fields as chemical analysis, drug screening, biomedical detection, environmental monitoring, and food safety.<sup>16-19</sup>

Linear photonic crystal slabs exploit guided-mode resonance (GMR) for light filtering and present interesting features for biosensing.<sup>12,20-22</sup> These systems are constituted by one-dimensional surface relief gratings, coated with a thin film of a high refractive index material, such as TiO<sub>2</sub> or Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, acting as a waveguide. They use light coupling mediated by diffractive gratings into a guided mode which propagates through the deposited TiO<sub>2</sub> but it slowly leaks out from the TiO<sub>2</sub> layer. The leaked wave interferes with the applied wave to produce a filter response and generate sharp bandgaps in the transmission spectra.<sup>23</sup> Changes in the refractive index on these materials cause wavelength shifts in the filtered light. This phenomenon can be exploited to sense biorecognition assays on the surface of these photonic crystals.<sup>24</sup> Promising advances have been reached in this direction for the development of immunoassays and DNA hybridization analysis<sup>25,26</sup> on GMR structures obtained by standard nanofabrication techniques, typically nanolithography and e-beam.<sup>27,28</sup>

Exploiting the resources of the consumer electronics is a smart way to address the development of biosensors.<sup>29,30</sup> Among the different mass-produced technologies, compact disk systems entail a particular high potential for this purpose, as demonstrated in many approaches for sensing labelled biorecognition assays.<sup>31,32</sup> As well as -shown in a few recent studies- for label-free biosensing by

means of surface-enhanced Raman scattering,<sup>33</sup> Fano resonance,<sup>34</sup> and diffraction-based sensing.<sup>35</sup>



**Fig. 1.** (A) Scheme of the optical setup used in this work and the biosensing principle of linear photonic crystal slabs. (B) Illustration of the optical behavior of the linear photonic crystal slab. Some diffracted order by the grating is coupled into a guided mode and is guided through the waveguide. (C) Representation of the covalent probe immobilization and the target detection resulting in a wavelength shift of a resonance gap in the transmitted light.

Herein we introduce a simple and cost-effective PC slab (1-D) based on the internal structure of the disks (see Fig. S1 and Table S1) coated with a high refractive index dielectric material ( $\text{TiO}_2$ ) as a new platform for label-free biosensing. The detection system consisted of a white light source and a fiber-coupled spectrometer that collects the transmitted light. The internal structure of the compact disks performs as diffraction grating, diffracting an external wave, and coupling it into a guided mode that propagates through the deposited  $\text{TiO}_2$ , as illustrated in Fig. 1B. The  $\text{TiO}_2$  layer shows an excellent adherence to the polycarbonate substrate and also provides a suitable surface where to attach probes in a covalent way through the organosilane chemistry. First, this study reports the fabrication of these photonic crystals, explores their response with the most widespread compact disk technologies (CD, DVD, and Blu-ray) and different  $\text{TiO}_2$  thicknesses, and determines the optimal configuration considering experimental results and simulations. Then, we characterize the structural and optical features of these nanomaterials, develop a suitable detection system, and experimentally prove the concept using a model immunoassay system to determine immunoglobulins. Finally, we employed these substrates to quantify disease biomarkers such as C-reactive protein and lactate dehydrogenase.

## 2. Experimental section

### 2.1. Materials

Phosphate buffered saline (PBS, 8mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137mM NaCl, 2.7mM KCl, pH 7.4) and PBS-T (PBS with 0.05% v/v Tween 20, pH 7.4) were prepared with purified water (Milli-Q, Millipore Iberica, Madrid, Spain) and filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  pore size membranes (Fisher Scientific, Madrid, Spain) before use. Glutaraldehyde solution (25 wt% in  $\text{H}_2\text{O}$ ), (3-Aminopropyl)triethoxysilane (99%), bovine serum albumin (BSA), lactate dehydrogenase from rabbit muscle (LDH), C-reactive protein (CRP), mouse anti-CRP, rabbit anti-BSA, goat IgG,

rabbit IgG and goat anti-rabbit were purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Rabbit anti-LDH was obtained by rabbit immunization. Mouse IgG was kindly provided by Igenasa S.A. (Madrid, Spain). Sucrose was provided by Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Standard recordable compact disks (CDs, DVDs, and Blu-rays) were from MPO Ibérica (Madrid, Spain).

### **2.2. Guided-mode resonance simulations**

The response of the photonic crystals was simulated using the opensource EMUstack package.<sup>36–38</sup> EMUstack implements a generalized scattering matrix method for calculating light propagation through multi-layered stacks of dispersive, lossy and nanostructured optical media. The structure of the simulated guided-mode resonance grating was established according to the geometrical parameters of the internal structure of the compact disks, described in the bibliography (see Table S1). The calculated transmittance spectra were obtained by the set of transmission efficiency for each wavelength. During the simulation, the light source with a wavelength range of 400–800 nm was set as unpolarized, TM polarized or TE polarized; and the incident angle varied from 0° to 10°. The bioanalytical behavior of the guided-mode resonance grating was studied as a function of the thickness of the TiO<sub>2</sub> layer, the thickness of the theoretical bilayer and the variation of surrounding media refractive index.

### **2.3. Fabrication**

Raw polycarbonate plates containing the internal CD structure were obtained by peeling off all the other layers from a circular cut created in the outer edge of the disk, as described elsewhere.<sup>39</sup> An analog strategy was employed to remove the protective polymeric layer (Durabis®) on the grooved relief of recordable Blu-ray disks. The internal DVD structure was obtained by disassembling both polycarbonate plates that compose these disks and keeping the one that contains the

nanostructure.<sup>33</sup> The remaining metallic layer on the disks was then removed by immersing them in a hydrochloric acid solution (1M HCl) for 60 min at room temperature (RT). After that, they were rinsed with purified water and immersed in an ethanol bath for 1 min at RT in triplicate. Finally, they were rinsed with purified water and dried under air stream. In addition to these substrates, flat polycarbonate plates were also obtained from the bottom side of CD disks and used in this study as unstructured controls.

The CD, DVD and BD structured polycarbonate substrates and their unstructured counterpart were cut into squared chips of  $1.5 \times 1.2$  cm using a drilling machine (Bungard CCD, Karo, Germany). The chips were then coated with several thicknesses of titanium dioxide at CIC nanoGUNE (Donostia, Gipuzkoa, Spain) using a UHV magnetron sputtering (ATC series, AJA International Inc., North Scituate, USA).

### **2.4. Characterization**

The thickness of the deposited TiO<sub>2</sub> layers was characterized by XRay reflectivity/diffractometry using X'pert Pro (PANalytical, Almelo, The Netherlands), and surface topographies were analyzed by atomic force microscopy (AFM) measurements by noncontact mode in air with a Multimode 8 microscope (Bruker, Billerica, USA). AFM averaged cross section profiles were obtained by averaging height values along the nanogroove direction.

### **2.5. Measurement setup**

As described in Fig. 1A, the optical measurements were performed with a simple setup mainly constituted by a white light source (380–780 nm, ~ 15 W, Ace, Schott, Elmsford, USA) that hits the biosensing material and a fiber-coupled spectrometer that collects the transmitted light. A collimated light beam of 3mm diameter was

obtained by incorporating a plano-convex spherical lens (effective focal length of 150 mm) and an iris diaphragm. A custom 3D-printed holder was used for a reproducible alignment of the photonic crystals in the optical setup. Measurements were performed by averaging 50 scans (integration time of 1 s).

To characterize the photonic behavior of the materials, a linear setup configuration with a broad range visible spectrometer (AvaSpec-2048-USB2-RM, Avantes, Apeldoorn, The Netherlands) was used, together with a dedicated sample holder to screen the light incidence angles (Fig. S2A). A rotatable linear polarizer was placed between the diaphragm and the photonic crystal to assess the effect of the light polarization. Moreover, a custom PDMS flow cell (Fig. S3) was incorporated and connected to a peristaltic pump (Minipuls 2, Gilson, Middleton, USA) with a flow of 330  $\mu\text{L}/\text{min}$  to inject solutions of different refractive index and to study their effects on the photonic crystal response. Each solution was injected for 10 min to make sure that the flow cell was completely full filled with the new dilution.

For the bioanalytical measurements, a mirror was included in the setup to analyze the photonic crystals in a horizontal position (Fig. S2B), thus enabling direct incubation of bioreagents in the system. Furthermore, a high resolution spectrophotometer (AvaSpec-2048TECUSB2, Avantes, Apeldoorn, The Netherlands) with a wavelength range of 535–752 nm, was employed.

Measurements were performed by averaging 50 scans (integration time of 1 s). The resulting transmittance spectra were smoothed using a Savitzky-Golay filter (50 points window, second order). The position of the gaps was defined as the wavelength with minimal intensity, and it was determined using the Origin Pro 8 software (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

## 2.6. Probe immobilization

The biochemical probes (BSA and IgGs) for the immunoassays studied in this work were covalently attached to the TiO<sub>2</sub> surface of the developed photonic crystals, as schematized in Fig. 1C. As described elsewhere,<sup>40,41</sup> the materials were first washed by immersion in EtOH for 5 min and then irradiated in a UV ozone cleaning system (UVOH 150 LAB, FHR, Ottendorf, Germany) for 10 min. After that, they were immersed in a 2% solution of (3-Aminopropyl) triethoxysilane in EtOH, incubated at RT for 30 min, rinsed with EtOH, and dried in air stream. Subsequently, the chips were baked at 95 °C for 30 min, washed with PBS, and dried as before. Immediately after, the chips were immersed in a 2.5% (v/v) of glutaraldehyde in PBS, incubated at RT for 30 min, rinsed with deionized water, and dried by air stream. Lastly, the functionalized materials were immersed into probe solutions (100 µg mL<sup>-1</sup> in PBS) for 30 min at RT, rinsed with PBS-T and deionized water, and dried as before.

## 2.7. Immunoassay

Biorecognition assays were performed by incubating target (rabbit anti-BSA IgG, CRP, or LDH) solutions in PBS-T on the probe-attached PC surfaces. Circular water repellent incubation areas (4mm diameter) were delimited using a Mini PAP pen (Thermo Scientific, Madrid, Spain) and 40 µL of target solutions were dispensed and incubated at RT for 30 min, rinsed with PBS-T and deionized water, and dried in air stream. Dose-response curves were obtained by sequentially applying this protocol to solutions containing increasing target concentrations.

Wavelength shifts ( $\Delta\lambda$ ) of the bandgaps in the transmission spectra were selected as analytical signal.  $\Delta\lambda$  values were calculated as the difference between the wavelength of a given bandgap before (immobilized probe) and after (incubated target) the assay. Averaged values and their standard deviations were obtained from

six measurements of each sample. Noise was experimentally calculated as the standard deviation of ten blank replicates, signal-to-noise ratios were obtained by dividing  $\Delta\lambda$  by noise, and the limits of quantification and detection were inferred as the target concentrations whose SNR corresponds to 10 and 3, respectively.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Guided-mode resonance performance

The bioanalytical capabilities of new photonic crystal slabs, based on different nanogrooved polycarbonate structures from standard recordable compact disks coated with  $\text{TiO}_2$ , were investigated. For this purpose, nanostructured patterns from CD, DVD, BD, and their unstructured counterpart, were coated with several  $\text{TiO}_2$  thicknesses (0, 20, 40, 60, 80, and 100 nm). In all cases accurate coating values were obtained, as shown in Fig. S4. In this section, their GMR response is assessed by means of their simulated and experimental light filtering behavior and their simulated dose-response biorecognition curves.

First, it was observed that unstructured and CD substrates do not present photonic bands at any  $\text{TiO}_2$  thickness (Fig. S5). As expected for the unstructured control, the absence of coupling grating disables the GMR activity. Regarding CD-based materials, the results indicate that coupling conditions are not met at these  $\text{TiO}_2$  thicknesses in the visible range. This is also the case for thinner coatings on DVD (0–40 nm) and Blu-ray (0–20 nm) polycarbonate nanogrooved gratings, since they also display a flat transmission spectrum (Fig. S5 and Fig. 2).

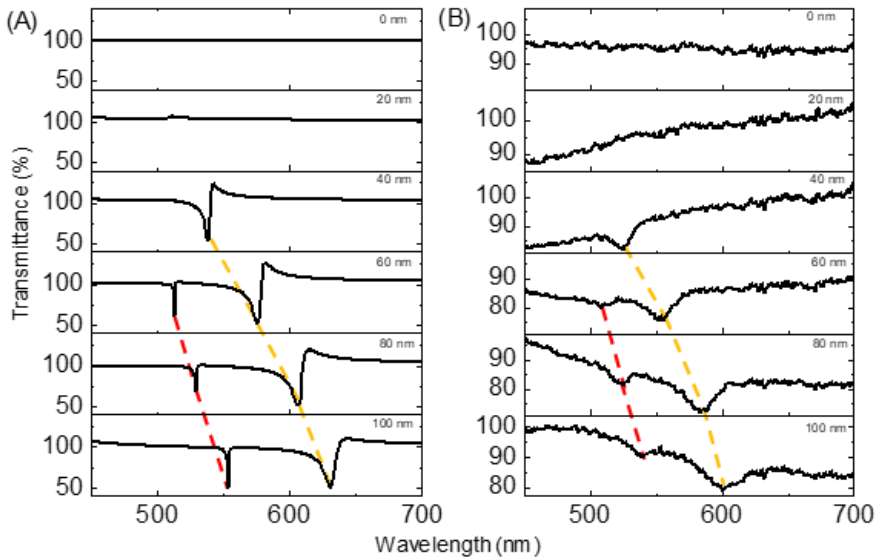
More interestingly, the simulated and experimental results also show that the projected disk-based photonic crystal slabs are obtained by coating DVD and Blu-ray nanogrooved structures with thicker  $\text{TiO}_2$  layers. DVD patterns coated with 60–100 nm (Fig. S5) and Blu-ray substrates coated by 40–100 nm (Fig. 2) present bandgaps in their experimental transmission spectra. These experimental



observations are also in agreement with their calculated counterpart, where the systematic variations in the bandgaps position must come from experimental discrepancies. Moreover, these guided-mode resonances display a tunable behavior, and they move towards longer wavelengths when the coating thickness increases.

As observed in Fig. 2 and Fig. S5, the bandgaps measured by DVD-based substrates are wider and shallower than the ones presented by the developed Blu-ray photonic crystals. Since the projected transduction phenomena relies on bandgaps shifts, the proper determination of the bandgaps position (central wavelength) plays a key role in the performance of the resulting biosensor, and this determination is strongly hindered by wide and shallow bandgaps. Therefore, Blu-ray systems were selected, since their GMR activity display well-defined features in the transmission spectra.

The dose-response biorecognition curves developed onto the Blu-ray coated with TiO<sub>2</sub> were simulated. In the bibliography the refractive index of adsorbed protein layers is usually preset and its assumed value varies between 1.35 and 1.6 in ellipsometry and surface plasmon resonance calculations.<sup>42</sup> Assuming a refractive index of 1.47<sup>43</sup> and a bilayer of 20 nm onto the surface, the analytical response of Blu-ray structures coated with different TiO<sub>2</sub> layer was calculated (Fig. S6). As the GMR-active Blu-ray gratings show similar analytical response, the criterion to choose a substrate was the definition (minimal width and maximal depth) of their experimental bandgaps, as explained above. In this sense, photonic crystals constituted by Blu-ray gratings coated with 80 nm of TiO<sub>2</sub> were selected in this study.



**Fig. 2.** (A) Simulated and (B) experimental transmission spectra of the GMR-active materials based on Blu-ray nanogrooved patterns coated with  $\text{TiO}_2$ , where dashed lines indicate the trend of the wavelength shift.

### 3.2. Topographic characterization

Once these Blu-ray photonic crystals were chosen, their structural features were characterized. Blu-ray disks have a spiral-shaped internal grooved structure that towards the edges of the disks is well approximated by lineal gratings. This structure works perfectly as digital data storage, but its physical fabrication is not totally flawless. Fig. S7 shows the surface topography of this structure before and after being coated with the  $\text{TiO}_2$  layer by AFM. As can be appreciated, the grating is slightly irregular, presenting zones where the bottom of the groove is wider than others and vice versa. Moreover, the grating has a nearly rectangular profile, but the wall of the grating is not perfectly vertical. These facts affect the GMR activity, and can produce irrelevant differences between the experimental and calculated transmission spectra, like peak width and position.

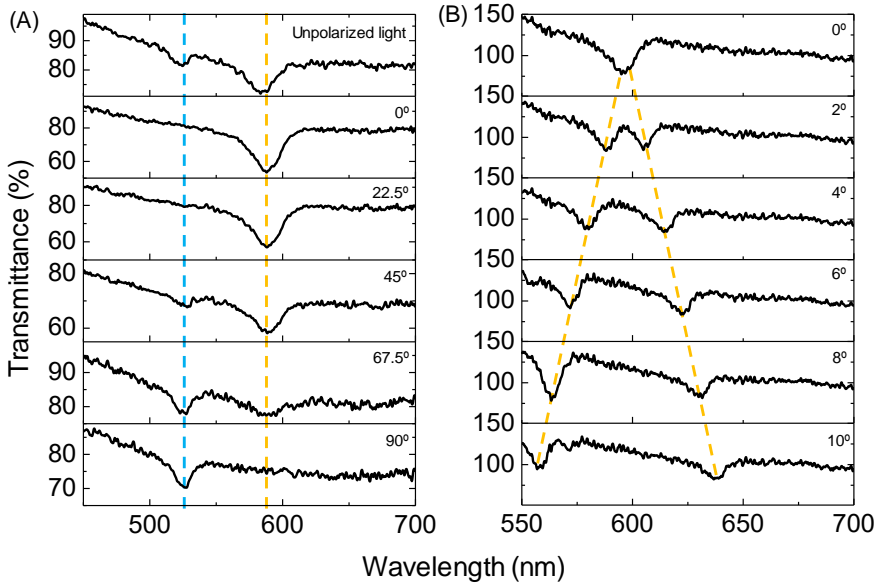
On the other hand, the TiO<sub>2</sub> coating did not modify the profile of the grating but it can be appreciated that the TiO<sub>2</sub> layer had a granulated topography. As can be observed in Fig. S8, the unstructured substrate shown a slightly rough wavy surface (RMS of  $0.24 \pm 0.03$  nm), however when it was coated with a TiO<sub>2</sub> layer, the ripples of the surface were filled and it became much rougher (RMS of  $0.69 \pm 0.06$  nm). Therefore, the TiO<sub>2</sub> coating kept the period, depth and shape of the nanogrooved structure constant but it increased its roughness.

### 3.3. Photonic response

As shown above, the selected photonic crystal interacts with incident light to provide defined bandgaps in the transmission spectrum. The relative configuration of the incident light versus the features of the nanostructured pattern plays a key role in the GMR response. This section explores this issue in order to understand it and fully exploit the biosensing capabilities of these photonic crystal slabs. First, we studied the effect of the relative orientation between the light polarization and the grooved nanostructure. As shown in Fig. 2, the developed materials generate two different transmission bandgaps upon unpolarized light irradiation, in concordance with the GMR activity of these type of materials.<sup>44</sup>

We have experimentally observed that the relative intensity of these bandgaps can be modulated by means of polarization of the incident light. As shown in Fig. 3A, linearly polarized light oriented in the nanogroove direction (0°) only generates the longer wavelength gap. The intensity of this gap gradually decreases when the polarization angle increases, whereas the shorter wavelength gap displays the opposite trend. Irradiating light perpendicularly polarized to the nanogroove (90°) uniquely displays the gap centered at 525 nm. Considering the simulations (Fig. S9A), the 525 nm and the 590 nm gaps come from the coupling of the diffracted transverse magnetic (TM) and transverse electric (TE) polarization, respectively.

From these results along with those in Section 3.1, perpendicular polarization was selected to filter out TM bands, thus isolating TE gaps to be used for biosensing.



**Fig. 3.** Experimental transmittance spectra upon (A) different linear polarization orientations where the  $0^\circ$  angle means that the polarized light is orientated perpendicular to the nanogroove direction and (B) a range of light incidence angles along the perpendicular nanogroove direction. The width of this splitting increases together with the incidence angle, whereas the averaged wavelength of both gaps remains constant. The blue and yellow dashed lines help to follow the GMR positions of the TM and TE modes, respectively.

We also studied the effect of the light incidence angle on the GMR response of these photonic crystal slabs. As experimentally observed (Fig. S10B), modifying this parameter along the parallel direction of the nanogroove does not display any influence on the transmission spectra. This is in agreement with the calculated data as can be observed in Fig. S10A. However, non-orthogonal light incidence angles

along the perpendicular direction of the nanogrooves split the gaps into two different bands. As shown in Fig. 3B, the width of this splitting increases together with the incidence angle, whereas the averaged wavelength of both gaps remains constant. This characteristic, which is proper of this type of substrates, is in agreement with the simulated transmittance spectra and is also displayed by the TE gaps (Fig. S9B).<sup>45</sup>

On the one hand, this splitting represents a straightforward and versatile strategy namely to tune the photonic response of these materials to the desired wavelength range employed in a biosensing setup. On the other hand, we also exploited this phenomenon to improve the quality of the bioanalytical results obtained with these photonic crystals. As observed in Fig. 3B, tiny angle modifications generate significant splits, and this great sensitivity on the irradiation angle constitutes an important potential imprecision source for experimental measurements based on the  $\Delta\lambda$  of a single peak. As an alternative, we employed a custom holder tilted  $5^\circ$  in the perpendicular direction of the nanogrooves, and used the averaged wavelength of both gaps as the analytical signal. Given the symmetry of the gaps splitting, this strategy provides measurements more insensitive to the incidence angle, thus enabling more robust bioanalytical measurements.

Regarding inter-chip precision, we have experimentally determined a standard deviation of the bandgap position of 0.2 nm (considering 6 different chips). This non-negligible value must come from heterogeneities on the TiO<sub>2</sub> coatings in different chips, and it may hinder the bioanalytical determinations. To minimize this issue with the proof-of-concept detection system arranged in this development, the custom sample holder was also used to fix the position of the chip along the different stages of the subsequent experimental immunoassays.

### 3.4. Immunosensing

Once characterized the photonic crystals and established a detection procedure, we explore the performance of these materials in experimental bioanalytical systems. For that, the first approximation was to characterize their refractometric response by measuring the bandgap shifts generated by bulk solutions on their surface. Sucrose solutions with refractive indexes from 1.33 to 1.38 were placed on the photonic crystal and its GMR response was analyzed. As observed in Fig. 4A, these measurements displayed a well-correlated ( $R^2=0.9813$ ) linear dependence between the refractive index and the bandgap  $\Delta\lambda$ . An experimental refractometric sensitivity of  $28 \pm 2$  nm RIU<sup>-1</sup> was obtained from the slope of the fitting, which is in the range of the state-of-the-art photonic crystal slabs developments.<sup>21,24,28</sup> These results are in agreement with the simulated data, which bandgap positions and theoretical sensitivity ( $29.2 \pm 0.4$  nm RIU<sup>-1</sup>) are very similar.

To demonstrate the bioanalytical performance of these photonic crystal slabs, herein we first employed a model immunoassay based on BSA as probes and anti-BSA IgGs as targets. This is a representative, well-known, and practical immunoassay typically used as a model system for proof-of-concept purposes.<sup>46</sup> Also, given the key role of albumins in multitude of biological functions,<sup>35</sup> the results with this system may provide insights into prospective applications. On the other hand, BSA is one of the main allergens present in cow's milk and beef.<sup>47</sup> Furthermore, BSA may be responsible for the autoimmune response leading to diabetes mellitus in people genetically susceptible to this disease.<sup>48</sup>

According to our simulations (Fig. S11), the system is more sensitive to biorecognition events when they are in air rather than in aqueous solutions. A theoretical biolayer of 10 nm thickness generates double and almost triple the wavelength shift if the media is air instead of water, for the TM and TE respectively. This happens because the refractive index of the biological molecules is more

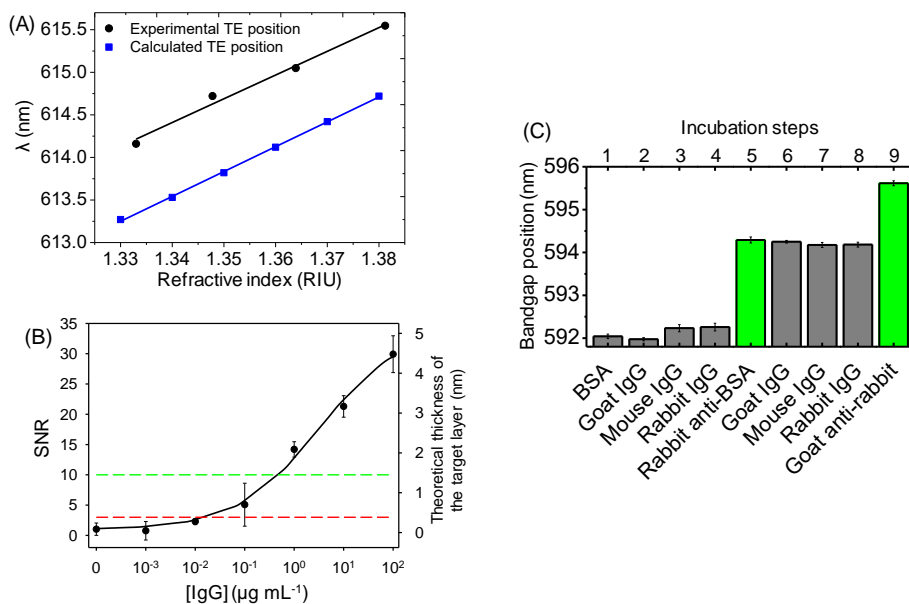
---

similar to water than air and therefore, there are more refractive index changes when the biological event is measured dry. Thus, the assays were performed by sequential incubations into the detection setup and analyzed by endpoint measurements after IgG incubations.

As shown Fig. 4B, a well-correlated dose-response sigmoidal curve ( $R^2=0.993$ ) was obtained in this label-free assay for IgGs determination. A quantification limit of  $465 \text{ ng mL}^{-1}$  (3.1 nM) and a detection limit of  $16 \text{ ng mL}^{-1}$  (100 pM) of IgG are inferred from this curve, which is in the sensitivity range of other similar materials fabricated by nanoimprinting lithography,<sup>12,49</sup> as well as in other new label-free optical biosensing developments.<sup>50-52</sup> In particular, it improves about one order of magnitude the detection limit achieved in another recent development with this same immunological system using diffractive protein gratings.<sup>35</sup>

The right axis in Fig. 4B indicates the estimated thicknesses of the biological layer on the photonic crystal along the biorecognition curve. For that, the calculated thickness (Fig. S12) corresponding to each experimental wavelength shift was determined and plotted in the graph. Since antibodies can bind their targets in several orientations, this approach must be understood as an averaged thickness.<sup>53,54</sup> As shown in Fig. 4B, the wavelength shift of the highest target concentration in the curve displays an estimated biolayer thickness of about 4 nm. This can be attributed to an ideal scenario where an homogeneous layer of antibodies lie on the surface in flat-on orientation, or an arrangement of different orientations and uncoated areas with an averaged thickness of 4 nm.

To evaluate the selectivity of this biosensor, the response of the system upon consecutive incubations of high concentrations ( $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) of specific and non-specific IgGs was studied. As observed in Fig. 4C, after immobilizing probe BSA on the photonic crystal (step 1), the subsequent incubations of non-specific IgGs (steps 2, 3, and 4) generated minor wavelength shifts from the bandgap position.



**Fig. 4.** (A) Calculated (blue square) and experimental (black dot) refractometric response in bulk solutions on the photonic crystal. A linear fit is given for both: calculated ( $R^2=0.9993$ ) and experimental ( $R^2=0.9813$ ) with a sensitivity of  $29.2 \pm 0.4$  and  $28 \pm 2$  nm RIU $^{-1}$ , respectively. (B) Dose-response curve using the Blu-ray coated with 80 nm of TiO $_2$  for IgG analysis. Experimental data fitted to four-parameter logistic equation and correlated with the theoretical thickness of the target layer. The green and red dashed lines mark the SNR thresholds for quantification and detection limits, respectively. (C) Photonic crystal biosensor selectivity assay. The bandgap position corresponds to the GMR wavelength after each consecutive incubation of several target antibodies, where averaged values and standard deviations were calculated from 6 replicated measurements.

This fact indicates that these incubations involve rather small increases of the biolayer thickness, which points out a minor interaction of these bioreagents. Then, rabbit anti-BSA specifically interacted with the immobilized probe as expected (step 5), and this biorecognition event generated a substantial displacement of the

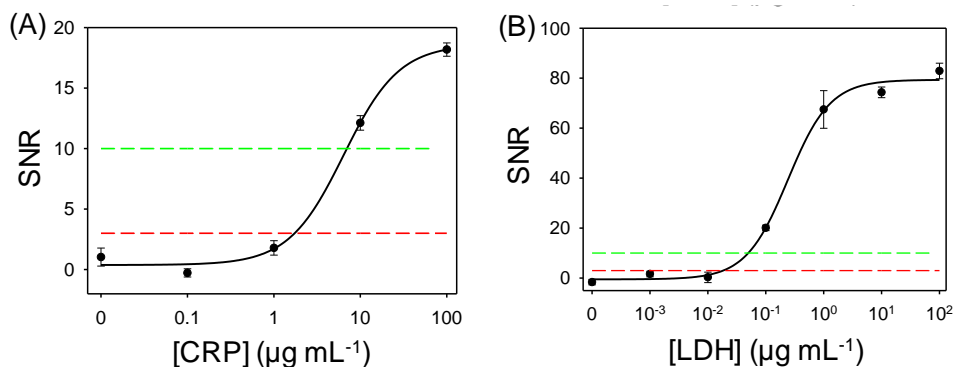


bandgap. After that, nonspecific IgGs were also consecutively incubated as before (steps 6, 7, and 8), leading to negligible responses in all the cases. These results point out the selectivity of the proposed approach, as well as a minor non-specific binding obtained in this assay conditions, even without using specific blocking or backfilling stages.

On the other hand, Fig. 4C also shows that the incubation of goat anti-rabbit after the assay (step 9) generates an important bandgap displacement (about 1.5 nm), which indicates the specific recognition of the bound rabbit anti-BSA by this secondary antibody. This approach is frequently employed as a signal amplification strategy to increase the sensitivity in biorecognition assays. For example, similar signal enhancements to the one obtained in this study (about 1.5-fold) have also been reported using secondary antibodies in other label-free developments based on ring and disk resonators, and Bragg gratings.<sup>55</sup> In addition to suggest a potential strategy to increase sensitivity, these results also prove the performance of the system in more complex schemes involving sequential biorecognition events.

To provide insights into the performance of the developed biosensing materials beyond the model BSA/anti-BSA system, the response of these materials in two different immunoassays to the biomarkers CRP and LDH, was also studied. In both cases, specific antibody probes were immobilized on the photonic crystals to recognize these target proteins. Regarding CRP, a well correlated wavelength shift along target concentrations was obtained in the corresponding dose-response curve ( $R^2=0.996$ ), as observed in Fig. 5A. From this curve, a quantification limit of  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$  (304 nM) and a detection limit of  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  (87 nM) are inferred for this immunoassay. These sensitivities are much lower than the ones obtained in the other systems addressed in this study, which points out the lower binding affinities of the probes used in this immunoassay. However, despite these low SNR values, this sensitivity is in the concentration range of CRP in healthy human plasma (between

3 and 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), which increases dramatically under cardiovascular diseases, inflammations, and infections.<sup>56,57</sup>



**Fig. 5.** Dose-response curves using the Blu-ray coated with 80 nm of  $\text{TiO}_2$  for (A) CRP and (B) LDH immunoassays. Experimental data fitted to four-parameter logistic equation. The green and red dashed lines mark the SNR thresholds for quantification and detection limits, respectively.

On the other hand, LDH is an enzyme present in human tissues. Its concentration in blood is low for healthy humans, whereas high levels of LDH indicates tissue damage processes. Monitoring its concentration is for example commonly used during the treatment of brain and bladder cancers,<sup>58,59</sup> and it is also useful for physicians and coaches to design appropriate trainings.<sup>60</sup> As observed in the Fig. 5B, this immunoassay displays a well-correlated dose-response curve ( $R^2=0.996$ ), reaching a quantification limit of 50  $\text{ng mL}^{-1}$  (36 nM) and a detection limit of 18  $\text{ng mL}^{-1}$  (13 nM). The concentration of LDH is typically determined from its enzymatic activity<sup>61</sup> and quantified as international units per liter ( $\text{U L}^{-1}$ ). Considering the activity of the LDH used ( $709 \text{ U mg}^{-1}$ ), the reported quantification and detection limits in this study become 35.6  $\text{U L}^{-1}$  and 12.8  $\text{U L}^{-1}$ , respectively. This sensitivity

is in the lineal range provided by commercial assay kits for LDH ( $1\text{--}100\text{ U L}^{-1}$ ),<sup>a,b</sup> whereas the developed approach enables a direct analysis without the needed of enzymatic reactions.

### 4. Conclusions

In this study, we have developed simple and large-scale photonic crystal slabs for label-free biosensing, based on the grooved structure of recordable compact disks coated with TiO<sub>2</sub>. Both experimental and simulated results have demonstrated the GMR activity of these materials, which can be easily tuned by modifying the TiO<sub>2</sub> thickness and the angle of the incidence light. Blu-ray nanogrooves coated by 80 nm of TiO<sub>2</sub> display well-defined bandgaps, whose displacement reports a refractometric sensitivity of  $28\text{ nm RIU}^{-1}$ . More importantly, these bandgap shifts enable to transduce unlabeled biorecognition events in a selective fashion, as demonstrated in an immunochemical model assay to quantify IgGs as well as to determine the biomarkers C-reactive protein and lactate dehydrogenase (detection limits of 0.1, 87, and 13 nM, respectively). As a limitation, more homogenous depositions of TiO<sub>2</sub> layers would reduce the inter-chip precision and favor the impact of these materials in practical applications. Besides, it is worth to highlight that the tunability, simplicity, low cost, and scalability of these photonic crystals provides them with appealing features for prospective studies towards label-free point-of-care developments. Along these lines, regular disk drives could potentially be adapted to become simple and robust analyzers for these disk-based photonic crystals. Finally, this study also suggests future investigations to explore the potential of these nanomaterials to transduce binding events coming from biorecognition assays of different natures.

---

<sup>a</sup> ab102526 from Abcam.

<sup>b</sup> Mak066 from Merck.

### Acknowledgment

This research was supported by FEDER grants and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness projects (CTQ2013-45875-R and CTQ2016-75749-R).

### References

1. St John, A.; Price, C.P. Existing and emerging technologies for Point-of-Care Testing. *Clin. Biochem Rev.* **2014**, *35*, 155–167.
2. Li, Z.; Li, F.; Xing, Y.; Liu, Z.; You, M.; Li, Y.; Wen, T.; Qu, Z.; Ling Li, X.; Xu, F. Pen-on-paper strategy for point-of-care testing: Rapid prototyping of fully written microfluidic biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *98*, 478–485.
3. Ranjan, R.; Esimbekova, E.N.; Kratasyuk, V.A. Rapid biosensing tools for cancer biomarkers. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 918–930.
4. Kettler, H.; White, K.; Hawkes, S. Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections: Key findings and recommendations. *Unicef/Undp/World Bank/Who* **2004**, 1–44.
5. Fathi, F.; Rahbarghazi, R.; Rashidi, M.R. Label-free biosensors in the field of stem cell biology. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *101*, 188–198.
6. Citartan, M.; Gopinath, S.C.B.; Tominaga, J.; Tang, T.-H.; Deng, W.; Joo, S.W.; Park, Q.H.; Ihee, H.; Kim, B. Label-free methods of reporting biomolecular interactions by optical biosensors. *Analyst* **2013**, *138*, 3576–3592.
7. Carrascosa, L.G.; Huertas, C.S.; Lechuga, L.M. Prospects of optical

- biosensors for emerging label-free RNA analysis. *Trends Anal. Chem.* **2016**, *80*, 177–189.
8. Zanchetta, G.; Lanfranco, R.; Giavazzi, F.; Bellini, T.; Buscaglia, M. Emerging applications of label-free optical biosensors. *Nanophotonics* **2017**, *6*, 627–645.
  9. Nikov, R.G.; Dikovska, A.O.; Nedyalkov, N.N.; Avdeev, G. V.; Atanasov, P.A. Au nanostructure fabrication by pulsed laser deposition in open air: Influence of the deposition geometry. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2017**, *8*, 2438–2445.
  10. Yamada, Y.; Ito, K.; Miura, A.; Iizuka, H.; Wakayama, H. Simple and scalable preparation of master mold for nanoimprint lithography. *Nanotechnology* **2017**, *28*, 205303.
  11. Zhang, J.; Yang, J.; Lu, H.; Wu, W.; Huang, J.; Chang, S. Subwavelength TE/TM grating coupler based on silicon-on-insulator. *Infrared Phys. Technol.* **2015**, *71*, 542–546.
  12. Inan, H.; Poyraz, M.; Inci, F.; Lifson, M.A.; Baday, M.; Cunningham, B.T.; Demerci, U. Photonic crystals: emerging biosensors and their promise for point-of-care applications. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *366*, 366–388.
  13. Joannopoulos, J.J.D.; Johnson, S.; Winn, J.N.J.; Meade, R.R.D. *Photonic crystals: molding the flow of light*; Time: New Jersey (USA), 2008, pp. 286; ISBN 9780691124568.
  14. Fenzl, C.; Hirsch, T.; Wolfbeis, O.S. Photonic crystals for chemical sensing and biosensing. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 3318–3335.
  15. Zlatanovic, S.; Mirkarimi, L.W.; Sigalas, M.M.; Bynum, M.A.; Chow, E.;

- Robotti, K.M.; Burr, G.W.; Esener, S.; Grot, A. Photonic crystal microcavity sensor for ultracompact monitoring of reaction kinetics and protein concentration. *Sens. Actuators B* **2009**, *141*, 13–19.
16. Konopsky, V.N.; Alieva, E. V Photonic crystal surface waves for optical biosensors. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4729–4735.
17. Michael, I.; Kim, T.-H.; Sunkara, V.; Cho, Y.-K. Challenges and opportunities of centrifugal microfluidics for extreme Point-of-Care Testing. *Micromachines* **2016**, *7*, 32.
18. Lin, Y.-C.; Hsieh, W.-H.; Chau, L.-K.; Chang, G.-E. Intensity-detection-based guided-mode-resonance optofluidic biosensing system for rapid, low-cost, label-free detection. *Sensors Actuators B* **2017**, *250*, 659–666.
19. Yan, H.; Yang, C.-J.; Tang, N.; Zou, Y.; Chakravarty, S.; Roth, A.; Chen, R.T. Specific detection of antibiotics by silicon-on-chip photonic crystal biosensor arrays. *IEEE Sens. J.* **2017**, *17*, 5915–5919.
20. Threm, D.; Nazirizadeh, Y.; Gerken, M. Photonic crystal biosensors towards on-chip integration. *J. Biophotonics* **2012**, *5*, 601–616.
21. Hermansson, P.G.; Sørensen, K.T.; Vannahme, C.; Smith, C.L.C.; Klein, J.J.; Russev, M.-M.; Grützner, G.; Kristensen, A. All-polymer photonic crystal slab sensor. *Opt. Express* **2015**, *23*, 16529–16539.
22. Karrock, T.; Paulsen, M.; Gerken, M. Flexible photonic crystal membranes with nanoparticle high refractive index nanoparticle layers. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2017**, *8*, 203–209.
23. Lin, H.A.; Huang, C.S. Linear variable filter based on a gradient grating period Guided-Mode Resonance filter. *IEEE Photonics Technol. Lett.* **2016**,

- 28, 1042–1045.
24. Nazirizadeh, Y.; Bog, U.; Sekula, S.; Mappes, T.; Lemmer, U.; Gerken, M. Low-cost label-free biosensors using photonic crystals embedded between crossed polarizers. *Opt. Express* **2010**, *18*, 19120–19128.
  25. Wang, Y.; Ali, M.A.; Chow, E.K.C.; Dong, L.; Lu, M. An optofluidic metasurface for lateral flow-through detection of breast cancer biomarker. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *107*, 224–229.
  26. Su, H.; Cheng, X.R.; Endo, T.; Kerman, K. Photonic crystals on copolymer film for label-free detection of DNA hybridization. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *103*, 158–162.
  27. Shafiee, H.; Lidstone, E.A.; Jahangir, M.; Inci, F.; Hanhauser, E.; Henrich, T.J.; Kuritzkes, D.R.; Cunningham, B.T.; Demirci, U. Nanostructured optical photonic crystal biosensor for HIV viral load measurement. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–7.
  28. Sørensen, K.T.; Ingvorsen, C.B.; Nielsen, L.H.; Kristensen, A. Effects of water-absorption and thermal drift on a polymeric photonic crystal slab sensor. *Opt. Express* **2018**, *26*, 5416–5422.
  29. Vashist, S.K.; Lippa, P.B.; Yeo, L.Y.; Ozcan, A.; Luong, J.H.T. Emerging technologies for next-generation point-of-care testing. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 692–705.
  30. Avella-Oliver, M.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Towards photochromic and thermochromic biosensing. *Trends Anal. Chem.* **2016**, *79*, 37–45.
  31. Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Disc-based microarrays: principles

- and analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 4523–4534.
32. Yu, H.Z.; Li, Y.; Ou, L.M.L. Reading disc-based bioassays with standard computer drives. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 258–268.
33. Avella-Oliver, M.; Puchades, R.; Wachsmann-Hogiu, S.; Maquieira, Á. Label-free SERS analysis of proteins and exosomes with large-scale substrates from recordable compact disks. *Sens. Actuators B* **2017**, *252*, 657–662.
34. López-Muñoz, G.A.; Estevez, M.-C.C.; Peláez-Gutierrez, E.C.; Homs-Corbera, A.; García-Hernandez, M.C.; Imbaud, J.I.; Lechuga, L.M. A label-free nanostructured plasmonic biosensor based on Blu-ray discs with integrated microfluidics for sensitive biodetection. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *96*, 260–267.
35. Avella-Oliver, M.; Carrascosa, J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Diffractive protein gratings as optically active transducers for high-throughput label-free immunosensing. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 9002–9008.
36. <http://www.physics.usyd.edu.au/> (accessed on Oct 23, 2018).
37. Dossou, K.B.; Botten, L.C.; Asatryan, A.A.; Sturmberg, B.C.P.; Byrne, M.A.; Poulton, C.G.; McPhedran, R.C.; de Sterke, C.M. Modal formulation for diffraction by absorbing photonic crystal slabs. *J. Opt. Soc. Am. A* **2012**, *29*, 817–831.
38. Sturmberg, B.C.P.; Dossou, K.B.; Lawrence, F.J.; Poulton, C.G.; McPhedran, R.C.; Martijn De Sterke, C.; Botten, L.C. EMUstack: An open source route to insightful electromagnetic computation via the Bloch mode scattering matrix method. *Comput. Phys. Commun.* **2016**, *202*, 276–286.



39. Avella-Oliver, M.; Morais, S.; Carrascosa, J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Total analysis systems with thermochromic etching discs technology. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 12037–12046.
40. Gunda, N.S.K.; Singh, M.; Norman, L.; Kaur, K.; Mitra, S.K. Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *305*, 522–530.
41. Lou, X.; Zhu, A.; Luo, Q.; Zhang, Y.; Long, F.; Klibanov, M.A.; Long, F. Effects of organic solvents on immunosensing assays for small molecules based on an optofluidic immunosensing platform. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 5731–5740.
42. Vörös, J. The density and refractive index of adsorbing protein layers. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 553–561.
43. Skivesen, N.; Têtu, A.; Kristensen, M.; Kjems, J.; Frandsen, L.H.; Borel, P.I. Photonic-crystal waveguide biosensor. *Opt. Express* **2007**, *15*, 3169–3176.
44. Moghaddas, S.A.J.; Shahabadi, M.; Mohammad-Taheri, M. Guided mode resonance sensor with enhanced surface sensitivity using coupled cross-stacked gratings. *IEEE Sens. J.* **2014**, *14*, 1216–1222.
45. Wang, S.S.; Magnusson, R. Theory and applications of guided-mode resonance filters. *Appl. Opt.* **1993**, *32*, 2606.
46. Yin, X.B.; Qi, B.; Sun, X.; Yang, X.; Wang, E. 4-(Dimethylamino)butyric acid labeling for electrochemiluminescence detection of biological substances by increasing sensitivity with gold nanoparticle amplification. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3525–3530.

47. de Silva, R.; Dasanayake, W.M.D.K.; Wickramasinha, G.D.; Karunatilake, C.; Weerasinghe, N.; Gunasekera, P.; Malavige, G.N. Sensitization to bovine serum albumin as a possible cause of allergic reactions to vaccines. *Vaccine* **2017**, *35*, 1494–1500.
48. Kooser, A.; Manyoats, K.; Eastman, M.P.; Porter, T.L. Investigation of the antigen antibody reaction between anti-bovine serum albumin (a-BSA) and bovine serum albumin (BSA) using piezoresistive microcantilever based sensors. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19*, 503–508.
49. Jahns, S.; Bräu, M.; Meyer, B.-O.; Karrock, T.; Gutekunst, S.B.; Blohm, L.; Selhuber-Unkel, C.; Buhmann, R.; Nazirizadeh, Y.; Gerken, M. Handheld imaging photonic crystal biosensor for multiplexed, label-free protein detection. *Biomed. Opt. Express* **2015**, *6*, 3724–3736.
50. Shi, Y.; Zhang, Q.; Zhai, T.-T.; Zhou, Y.; Yang, D.-R.; Wang, F.-B.; Xia, X.-H. Localized surface plasmon resonance enhanced label-free photoelectrochemical immunoassay by Au-MoS<sub>2</sub> nanohybrid. *Electrochim. Acta* **2018**, *271*, 361–369.
51. Chen, W.T.; Li, S.S.; Chu, J.P.; Feng, K.C.; Chen, J.K. Fabrication of ordered metallic glass nanotube arrays for label-free biosensing with diffractive reflectance. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *102*, 129–135.
52. Hao, D.; Hu, C.; Grant, J.; Glidle, A.; Cumming, D.R.S. Hybrid localized surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance sensor for label free biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *100*, 23–27.
53. Tan, Y.H.; Liu, M.; Nolting, B.; Go, J.G.; Gervay-Hague, J.; Liu, G.Y. A nanoengineering approach for investigation and regulation of protein immobilization. *ACS Nano* **2008**, *2*, 2374–2384.

54. Trilling, A.K.; Beekwilder, J.; Zuilhof, H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. *Analyst* **2013**, *138*, 1619–1627.
55. Schmidt, S.; Flueckiger, J.; Wu, W.; Grist, S.M.; Talebi Fard, S.; Donzella, V.; Khumwan, P.; Thompson, E.R.; Wang, Q.; Kulik, P.; et al. Improving the performance of silicon photonic rings, disks, and Bragg gratings for use in label-free biosensing. In Proceedings of the Biosensing and Nanomedicine VII; International Society for Optics and Photonics, **2014**; Vol. 9166, p. 91660M.
56. Uddin, R.; Donolato, M.; Hwu, E.-T.; Hansen, M.F.; Boisen, A. Combined detection of C-reactive protein and PBMC quantification from whole blood in an integrated lab-on-a-disc microfluidic platform. *Sens. Actuators B* **2018**, *272*, 634–642.
57. Kowalczyk, A.; Sęk, J.P.; Kasprzak, A.; Poplawska, M.; Grudzinski, I.P.; Nowicka, A.M. Occlusion phenomenon of redox probe by protein as a way of voltammetric detection of non-electroactive C-reactive protein. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *117*, 232–239.
58. Cacho-Díaz, B.; Lorenzana-Mendoza, N.A.; Reyes-Soto, G.; Hernández-Estrada, A.; Monroy-Sosa, A.; Guraieb-Chahin, P.; Cantu-de-León, D. Lactate dehydrogenase as a prognostic marker in neoplastic meningitis. *J. Clin. Neurosci.* **2018**, *51*, 39–42.
59. Chuang, C.-H.; Wu, T.-F.; Chen, C.-H.; Chang, K.-C.; Ju, J.-W.; Huang, Y.-W.; Van Nhan, V. Lab on a chip for multiplexed immunoassays to detect bladder cancer using multifunctional dielectrophoretic manipulations. *Lab. Chip* **2015**, *15*, 3056–3064.
60. Brancaccio, P.; Maffulli, N.; Buonauro, R.; Limongelli, F.M. Serum enzyme

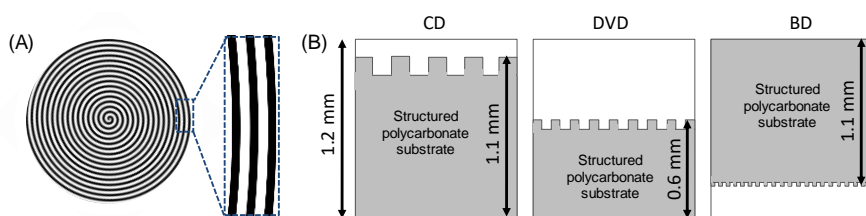
monitoring in sports medicine. *Clin. Sports Med.* **2008**, 27, 1–18.

61. Kaja, S.; Payne, A.J.; Naumchuk, Y.; Koulen, P. Quantification of lactate dehydrogenase for cell viability testing using cell lines and primary cultured astrocytes. *Curr. Protoc. Toxicol.* **2017**, 72, 2.26.1-2.26.10.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

**Disk-based one-dimensional photonic crystal slabs  
for label-free immunosensing**

Gabriel Sancho-Fornes, Miquel Avella-Oliver, Javier Carrascosa,  
Estrella Fernandez, Eva M. Brun, Ángel Maquieira



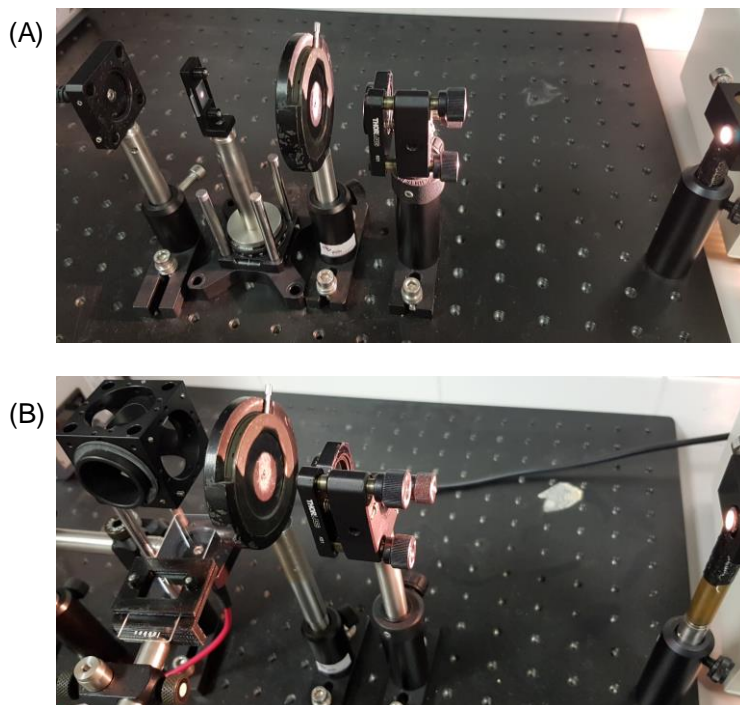
**Fig. S1.** Illustration of the main structuration of the different compact disks. (A) Top view of the spiral-shaped internal grooved structure. (B) Cross sections of the CD, DVD, and Blu-ray disks multilayered structure, where the polycarbonate is highlighted in grey and the rest of layers are in white.

**Table S1.** Properties and diagnostics of the proposed model of competitive inhibition.

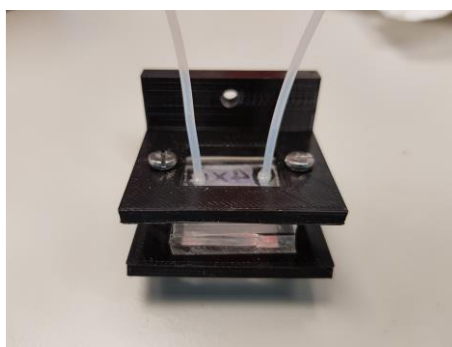
	Period (nm)	Width <sup>a</sup> (nm)	Duty cycle	Groove depth (nm)
CD	1600	881 <sup>b</sup>	55:45	203 <sup>b</sup>
DVD	740	393 <sup>b</sup>	53:47	175 <sup>b</sup>
BD	320	160	50:50	20

<sup>a</sup> Top of the ridge width

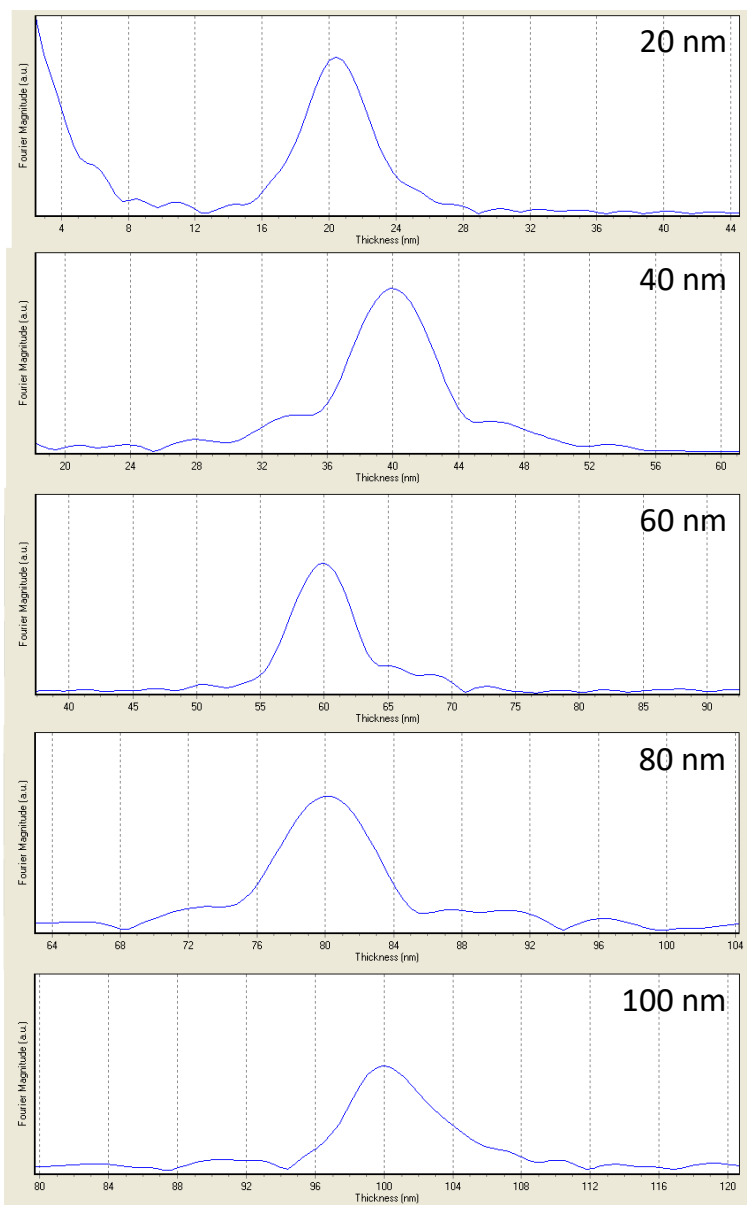
<sup>b</sup> Experimental data obtained from Ref. 33. The other data obtained from Kaplan, B.; Guner, H.; Senlik, O.; Gurel, K.; Bayindir, M.; Dana, A. Tuning optical discs for plasmonic applications. *Plasmonics* **2009**, *4*, 237–243.



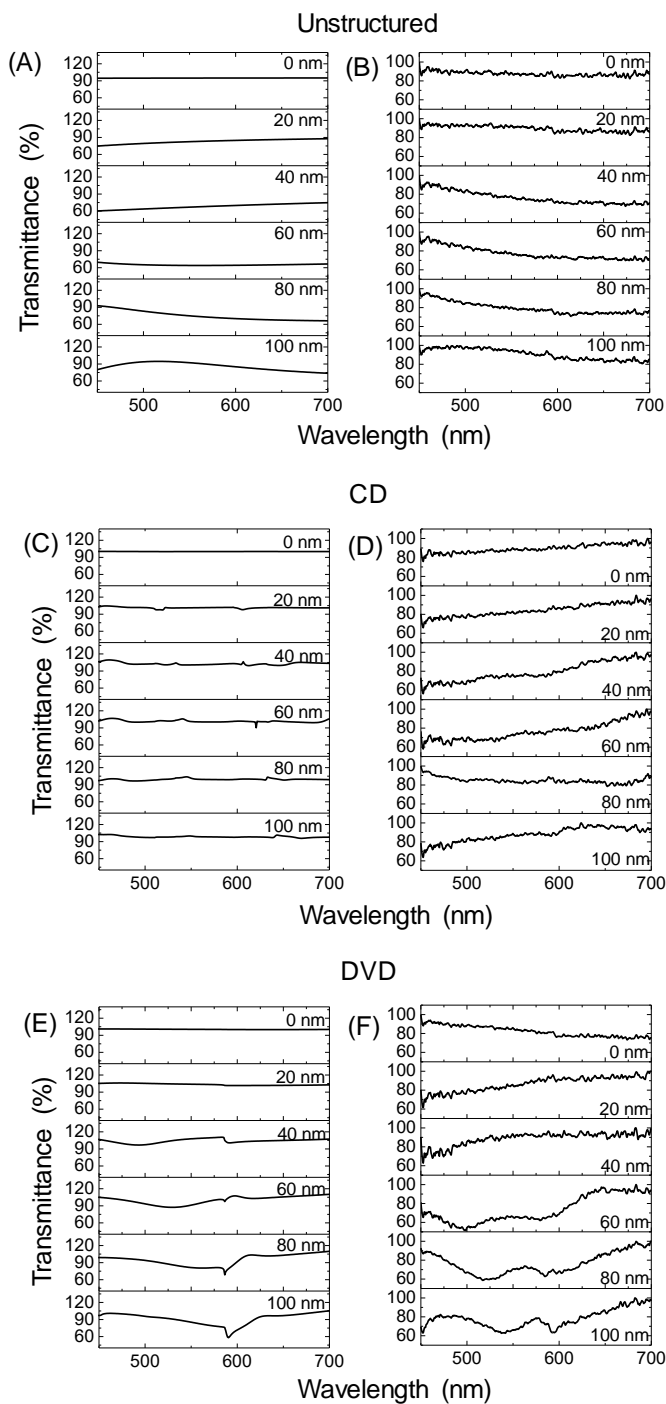
**Fig. S2.** Pictures of the 2 setups used in this work. (A) The horizontal setup used to characterize photonically all substrates fabricated and (B) the vertical setup used for biosensing.



**Fig. S3.** Picture of the flow cell used in the characterization of the PC-BD for refractive index changes in bulk.

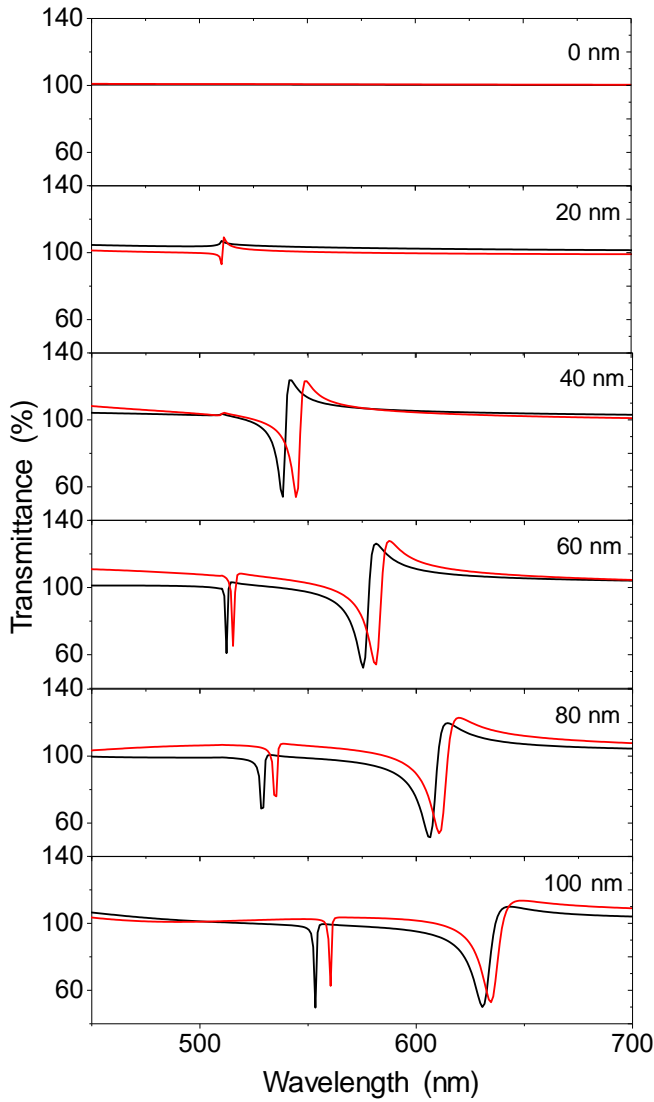


**Fig. S4.** X-ray reflectivity/diffractometry of TiO<sub>2</sub> layers of several thicknesses deposited onto the substrates.

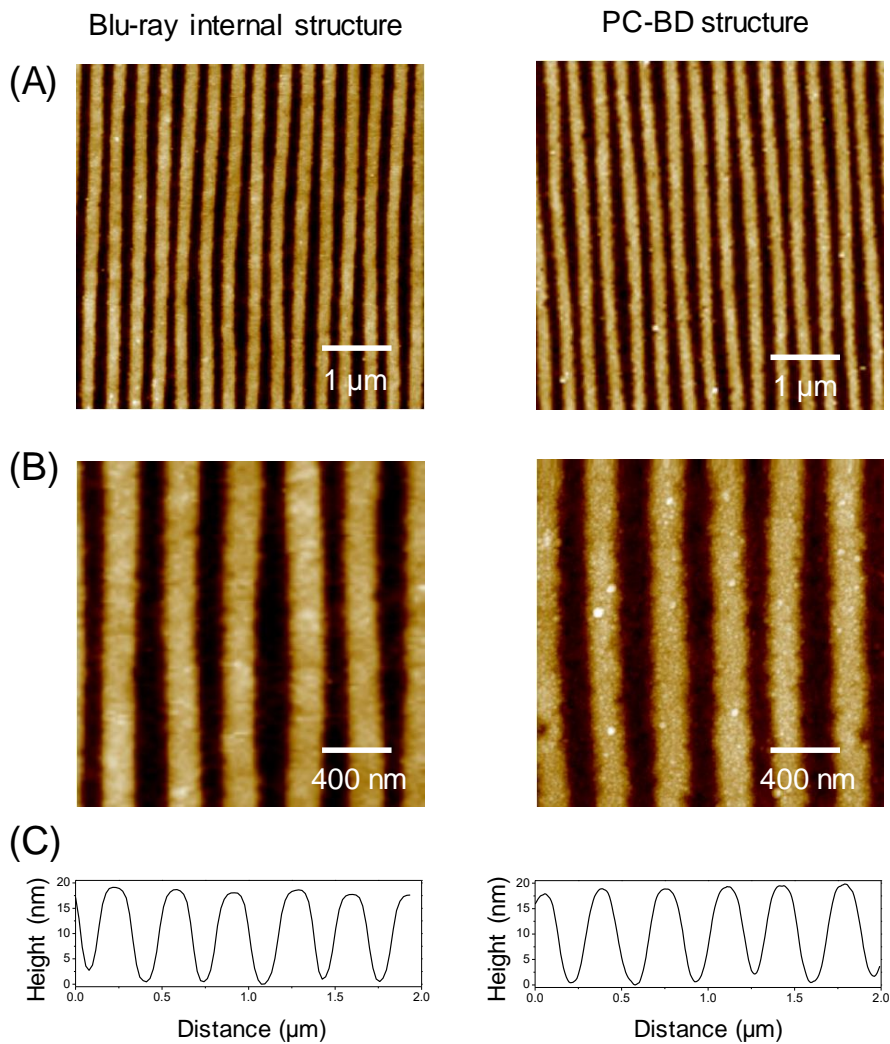


**Fig. S5.** Simulated (left) and experimental (right) transmission spectra of visible light filtered through unstructured (A and B), CD (C and D) and DVD (E and F) polycarbonate coated with different  $\text{TiO}_2$  thicknesses.

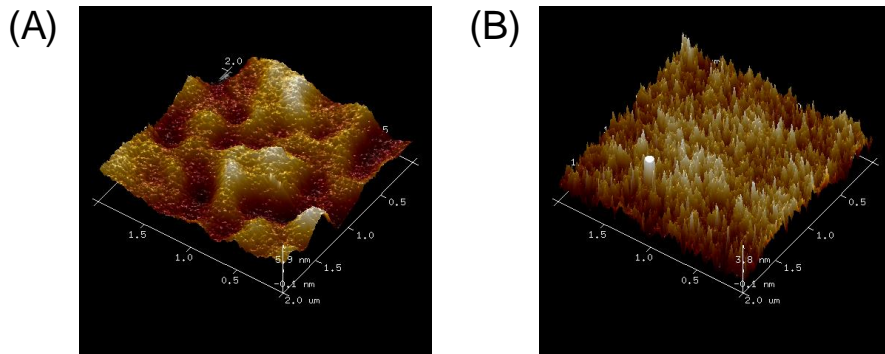




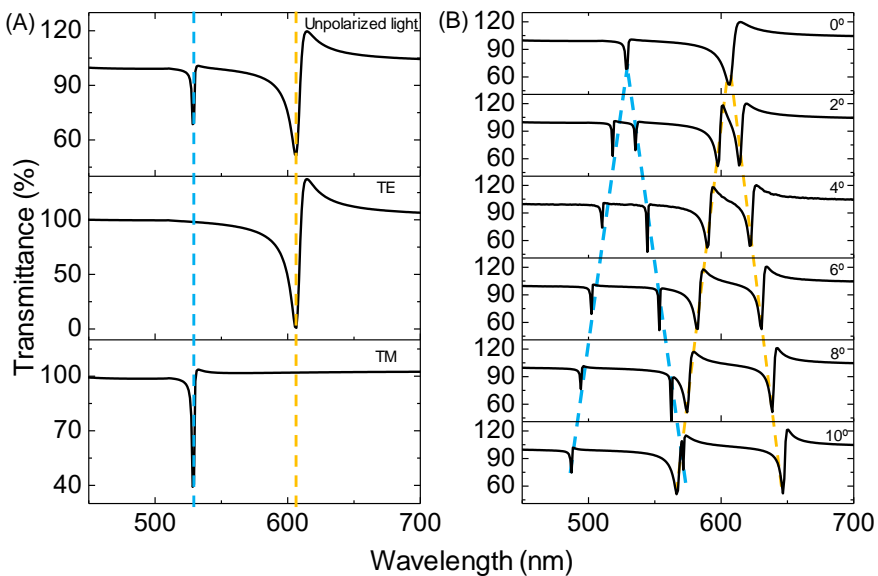
**Fig. S6.** Changes in the calculated transmittance spectra for Blu-ray coated with several TiO<sub>2</sub> thicknesses (black) due to a biolayer of 20 nm (red).



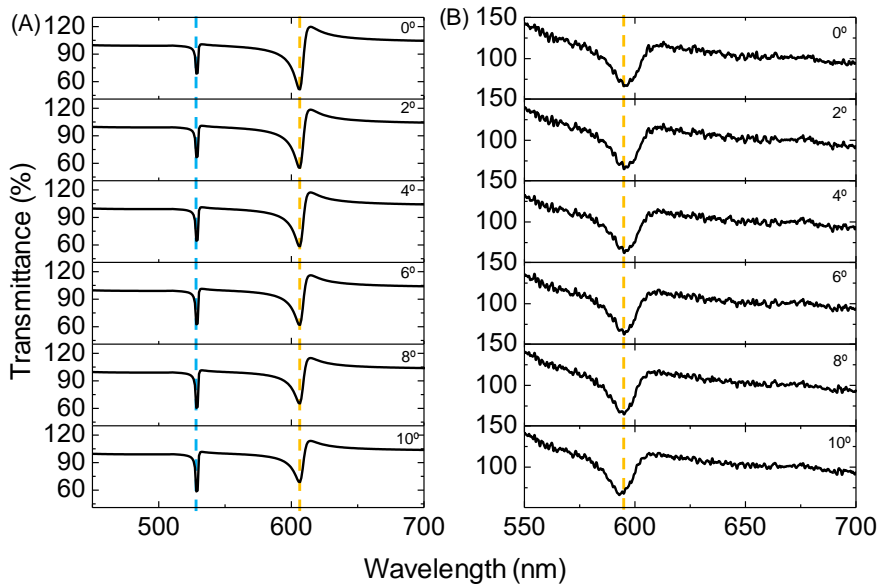
**Fig. S7.** AFM scans of the coated and non-coated by a layer of 80 nm of TiO<sub>2</sub> (PC-BD) Blu-ray structure. (A) 5x5 μm images, (B) their enlarged view (2x2 μm), and (C) their corresponding averaged cross section profiles.



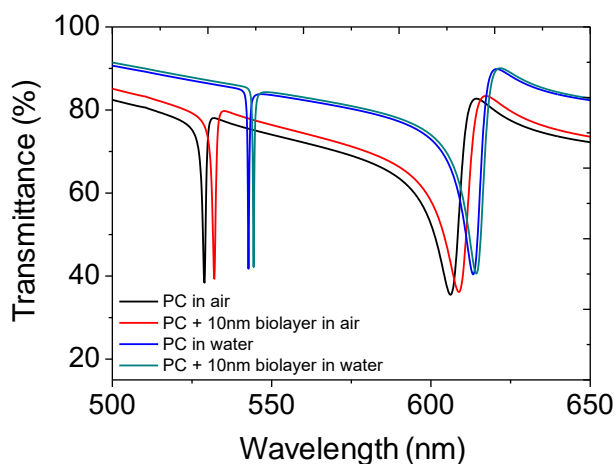
**Fig. S8.** 3D AFM images of a non-structured polycarbonate substrate, (A) raw material and (B) coated with a layer of 80 nm of  $\text{TiO}_2$ .



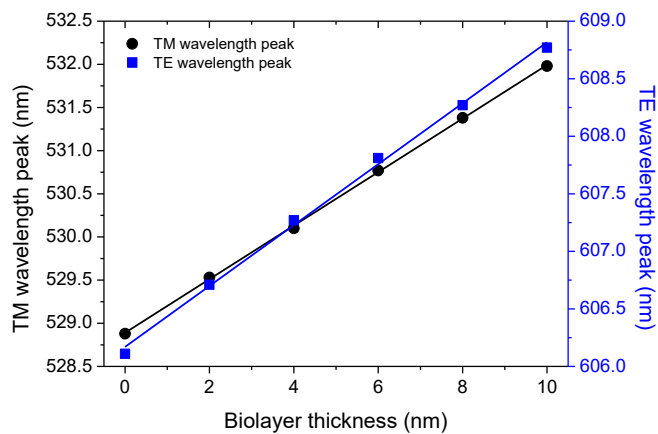
**Fig. S9.** Calculated transmittance spectra of the PC-BD (A) using the transverse electric (TE) and transverse magnetic (TM) modes and (B) varying the light incidence angles along the perpendicular nanogroove direction. The blue and yellow dashed lines help to follow the GMR positions of the TM and TE modes, respectively.



**Fig. S10.** (A) Calculated and (B) experimental transmittance spectra of the PC-BD obtained varying the light incidence angles along the parallel nanogroove direction. The blue and yellow dashed lines help to follow the GMR positions of the TM and TE modes, respectively.



**Fig. S11.** Calculated transmittance spectra of the PC-BD with and without biolayer when the surrounding is air and water. The wavelength shifts, due to the biolayer in water, are 1.6 and 0.95 where in air they are 3.09 and 2.66 nm, for the TM and TE, respectively.



**Fig. S12.** Calculated response of the PC-BD to the biological layer formed onto its surface. A linear fit is given for both GMRs TM ( $R^2=0.9997$ ) and TE ( $R^2=0.9973$ ) with a sensitivity of  $0.310\pm 0.003$  and  $0.265\pm 0.006$  nm (wavelength)/ nm (biolayer thickness), respectively.

### Conclusiones

A lo largo de este capítulo se ha demostrado que la estructura interna de un disco Blu-ray recubierta por una capa de  $\text{TiO}_2$  interacciona con ciertas longitudes de ondas del espectro visible impidiendo su transmisión, generándose valles en el espectro de transmisión. Además, se ha conseguido que la radiación que interacciona con el cristal fotónico sea dependiente del índice de refracción del material sobre su superficie, lo que lo convierte en un material idóneo para el biosensado sin marcaje.

De este modo, y aprovechando que una mayor concentración de analito se traduce en un aumento del grosor de la capa biológica sobre el sustrato, se han estudiado muestras de diferente naturaleza haciendo un seguimiento del desplazamiento del valle en el espectro de transmisión. Se han cuantificado IgG, CRP y LDH mediante inmunoensayos directos, sin necesidad de marcadores, alcanzándose límites de detección de 0.1, 87, y 13 nM, respectivamente.

Los cristales fotónicos desarrollados presentan una buena respuesta a variaciones de índice de refracción y son sintonizables a la longitud de onda deseada en el espectro visible. Su fabricación puede ser realizada a gran escala gracias a la disponibilidad, calidad y bajo precio de los discos Blu-ray, y a que el recubrimiento se realiza con una sola capa de un material que queda bien adherido y acabado. Además, no necesita equipos de interrogación costosos y complejos, ya que pueden ser leídos con una fuente de luz blanca y un espectrofotómetro UV/VIS. Asimismo, el sistema de interrogación se podría simplificar todavía más empleando un lector de discos compactos, registrando las variaciones de intensidad a la longitud de onda determinada por el láser que incorpora el mismo lector, lo que acercaría aún más esta tecnología al concepto *point-of-care*.

## **4. Discusión general de los resultados**





La innovación en nuevas metodologías y sistemas de detección que no necesiten marcaje es una buena estrategia para desarrollar biosensores compactos y portátiles, de coste competitivo y puedan ser utilizados allá donde se requiera (*point-of-need*). En este sentido, la tecnología de disco compacto y cada uno de sus componentes han mostrado tener un enorme potencial. Las investigaciones realizadas en el desarrollo de esta tesis van dirigidas a explotar los elementos que componen la tecnología de disco compacto para el desarrollo de nuevas estrategias y materiales para el biosensado sin marcaje.

En este contexto, el primer capítulo de esta tesis se centra en el estudio de la actividad farmacéutica de una colección de moléculas modelo. Este trabajo se dirige a desarrollar las etapas iniciales en el proceso de descubrimiento y cribado de fármacos, en este caso, de compuestos con capacidad para inhibir la actividad enzimática de la HRP. En este trabajo se han establecido las bases para el uso del lector de discos como detector y el disco Blu-ray como plataforma de ensayo como una técnica de análisis de alto rendimiento de bajo coste y fácil de operar.

Se ha desarrollado una estrategia general para inmovilizar glicoproteínas y otros bioreceptores glicosilados, con la orientación deseada, a través de la Concanavalina A y el azúcar de la enzima escogida. Esta estrategia se ha empleado para inmovilizar la HRP sobre la superficie de un disco Blu-ray que consiste en una película de 0.1 mm, cuya elevada hidrofobicidad concentra la muestra en áreas pequeñas, obteniendo una mayor concentración superficial de diana y permitiendo trabajar en formato *microarray* de alta densidad para el cribado de fármacos. Así, la capacidad de trabajo aumenta enormemente, además de reducir significativamente el consumo de reactivos y de muestra.

Como prueba de concepto, se ha realizado un estudio de la capacidad farmacológica de una colección de moléculas de la familia de las ureas sobre la actividad enzimática de la HRP, mediante un ensayo de inhibición competitiva. Se

## Discusión general de los resultados

---

han calculado las constantes termodinámicas y cinéticas de los complejos formados por estas moléculas con la diana. Dada la gran cantidad de datos que se obtienen de los ensayos se ha desarrollado un sistema de análisis de resultados basado en hipersuperficies que identifica los compuestos más prometedores.

De esta biblioteca, el 2-tiouracilo, el 6-propil-2-tiouracilo, el 6-fenilo-2tiouracilo, el 4-tiouracilo, el 2-mercaptobenzimidazol y la tiourea han mostrado capacidad inhibitoria de la glicoenzima. De los resultados obtenidos se puede concluir que el grupo funcional responsable del potencial farmacológico de estos compuestos es el grupo tiourea y el resto de grupos funcionales en la molécula modulan su efecto. También, ha quedado demostrada la elevada capacidad de trabajo del sistema desarrollado con la realización simultanea de más de 1400 ensayos en un solo disco.

Es interesante resaltar que todos los ensayos fueron realizados sin emplear marcadores para generar una señal medible. Para ello, se ha empleado con éxito un sustrato de la enzima diana que genera un producto cuantificable por el sistema de medida empleado. Esto es una ventaja, ya que esta metodología puede aplicarse a una gran familia de enzimas, sin desarrollar un protocolo de ensayo para cada caso particular.

La sensibilidad es uno de las características principales de cualquier biosensor. Los biosensores ópticos destacan por su buena sensibilidad, aunque esta podría incrementarse reduciendo el ruido de fondo. En este contexto, se ha desarrollado la metodología FDA que recurre a inmovilizar la sonda sobre la superficie del disco formando franjas, similar a un paso de cebrá micrométrico, con una periodicidad en el espacio que al ser escaneada genera una única señal en el espectro de frecuencias.

Se ha realizado un estudio de las dimensiones óptimas para la reducción del ruido del sistema de detección, que en esta investigación se ha aplicado a discos DVD

como plataforma de ensayo. Por las características del sistema, se ha determinado que el ciclo de trabajo debe ser de 50%, con un grosor de franja y separación entre ellas de 0.5 mm, una longitud de 4 mm, y un número óptimo de franjas por ensayo de 15. Con esta configuración se ha realizado un inmunoensayo para la detección de inmunoglobulinas, comparando los resultados con los obtenidos mediante *microarray*, con y sin tratamiento de señal. Mientras que el tratamiento de señal apenas mejoró medio orden de magnitud el límite de detección, FDA lo mejoró en casi 3 órdenes de magnitud, llegando a detectar 30 pg/mL (200 fM) de IgG. Esta metodología también se aplicó con éxito a la cuantificación de caseína, mediante un ensayo tipo sándwich, consiguiendo detectar 4 ng/mL (174 pM).

Inicialmente se pretendía llegar a detectar y cuantificar las interacciones biomoleculares sin necesidad de utilizar marcadores. Sin embargo, en la práctica se observó que los ensayos por sí mismos no eran capaces de modificar el haz láser lo suficiente y, por tanto, aunque se redujera mucho el ruido el lector de discos no era capaz de detectarlo. No obstante, FDA podría aplicarse a biosensores operando en formato *label-free* que genere una imagen o un mapa de señal, postulándose como una interesantísima estrategia para mejorar la sensibilidad.

Por otro lado, FDA se centra en reducir el ruido, identificando la señal generada por el ensayo y separándola del resto de señales. Es decir, la imprecisión de la señal generada por el ensayo permanece intacta con esta estrategia. Por este motivo, FDA funciona con formatos de ensayo en los que los blancos no generan señal y, por lo tanto, el ruido de los blancos provenga del sistema de detección. Sin embargo, en formatos de ensayo competitivos, los blancos generan la máxima señal del ensayo y su imprecisión es muy superior a la del sistema. Se puede concluir que, en estos formatos, FDA reduce una parte despreciable del ruido del ensayo y apenas mejora la sensibilidad del sistema.

## Discusión general de los resultados

---

Desde otro punto de vista, los elementos que componen los lectores de los discos compactos son de un enorme interés para el desarrollo de biosensores *label-free*. Aprovechando la ubicuidad de estos dispositivos y la enorme cantidad de discos y lectores que se fabrican, los costes para desarrollar biosensores ópticos son muy bajos, mejorando su competitividad.

En este marco, se ha desarrollado con éxito un biosensor utilizando el cabezal de un lector de discos, ya que este posee tanto la fuente de luz láser, como todos los elementos ópticos necesarios para registrar la intensidad del láser reflejado. Además, se ha implementado un sistema electrónico de control que mantiene constante la potencia del láser frente a las variaciones debidas a fenómenos térmicos. En estas condiciones, el sistema de detección ha mostrado prestaciones comparables a aquellos sistemas con componentes más sofisticados. Adicionalmente, se ha fabricado un sistema de posicionamiento XY utilizando los motores y ejes de un lector de DVD que ha permitido escanear el chip completo con 12 zonas de ensayo en menos de 20 minutos.

Para este sistema de detección se han desarrollado dos sustratos que generan una variación en la intensidad del haz láser reflejado al producir una interacción molecular sobre su superficie. Se han utilizado los propios materiales de los DVD-RW, que junto al oro, depositados en capas nanométricas, han permitido fabricar sustratos interferométricos que responden de manera opuesta a las variaciones de índice de refracción sobre su superficie. Se ha demostrado que, variando el grosor de ciertas capas, la señal interferométrica debida a la interacción sonda-diana cambia de destructiva a constructiva, pasando de reducir a aumentar la intensidad del haz reflejado.

Ambos sustratos se han empleado en la cuantificación de inmunoglobulinas mediante un inmunoensayo directo. Los resultados obtenidos confirman que la variación en la intensidad reflejada es proporcional a la concentración del analito

---

presente en la muestra. Se observa que el sustrato destructivo presenta una mayor sensibilidad que el constructivo, con un límite de detección de 0.46  $\mu\text{g/mL}$  frente a los 3.12  $\mu\text{g/mL}$  de este último. También se ha demostrado que este biosensor es capaz de detectar moléculas de baja masa molecular. Para ello, se ha utilizado un formato de ensayo competitivo observando que la variación en la intensidad es inversamente proporcional a la concentración del analito, como es de esperar en este tipo de ensayo. En este caso, el sustrato interferométrico destructivo también mostró mejor sensibilidad, llegando a detectar 11  $\text{ng/mL}$  de sulfasalazina. Pese a la menor sensibilidad de los sustratos interferométricos constructivos, su interés reside en la fiabilidad de los resultados obtenidos, ya que habitualmente los fenómenos físicos reducen la intensidad del haz reflejado, por lo que el aumento de la señal obtenido es debido al ensayo y no a artificios.

Una de las características más interesantes de estos sustratos es que las señales generadas por el reconocimiento molecular son visibles a simple vista. Como prueba de concepto, se ha capturado con un microscopio la imagen de un chip que contiene una matriz con ensayos. Los resultados obtenidos son prometedores, ya que se observa que la información analítica de la imagen RGB pertenece al canal rojo, como cabía esperar, ya que fueron diseñados para responder a esas longitudes de onda, y sigue siendo proporcional a la concentración del analito. Este hecho permite diseñar sistemas alternativos basados en capturas de imagen con cámaras y microscopios que permitan la detección sin marcaje.

Siguiendo con el desarrollo de biosensores aprovechando las ventajas de la tecnología de disco compacto, se han desarrollado cristales fotónicos 1-D. Se ha demostrado que la estructura interna de los Blu-ray recubiertos por una capa nanométrica de óxido de titanio es capaz de interactuar con ciertas longitudes de onda del espectro visible. Como consecuencia de esta interacción, se genera un valle en el espectro de transmisión. Sin embargo, los CDs no mostraron actividad fotónica

## Discusión general de los resultados

---

y los DVDs, pese a que alteraban el espectro de transmisión, no generaron una señal que permitiera su cuantificación.

Para la estructura de discos Blu-ray, se observa que las longitudes de ondas que interaccionan con el cristal fotónico dependen del grosor de la capa de óxido de titanio, siendo de longitud de onda mayor a medida que aumenta el grosor de la capa de óxido. Esta es la principal propiedad que hace que estos cristales fotónicos sean sintonizables a la longitud de onda deseada en el espectro visible. Sin embargo, hay que tener en cuenta que a medida que el grosor aumenta el desplazamiento cada vez es menor, lo que indica que sería menos sensible como biosensor.

Un disco de Blu-ray recubierto con una película de 80 nm de  $\text{TiO}_2$  ha mostrado dos valles definidos, lo que indica que interacciona de modo eficiente con luz de esas longitudes de onda. Utilizando luz polarizada se ha identificado que el valle posicionado en las longitudes de onda mayores ( $\lambda = 590$  nm) es debido al TE, mientras que el otro ( $\lambda = 525$  nm) es debido al TM. Además, se ha observado que variando el ángulo de incidencia transversalmente respecto al track, los valles se desdoblán en dos, mientras que longitudinalmente no se manifiesta efecto alguno. Esta propiedad también se puede aprovechar para la sintonización de estos materiales a la longitud de onda deseada.

Sin embargo, el hecho de que pequeñas variaciones en el ángulo de incidencia origine un desdoblamiento genera una imprecisión muy elevada a la hora de posicionar el valle. Para evitar este inconveniente, y en vista de que el desdoblamiento es simétrico, los ensayos se midieron con un ángulo incidente fijo de  $5^\circ$  de modo que se obtenga un desdoblamiento definido del valle, consiguiendo un posicionamiento más preciso. Se ha demostrado que la posición promedio de los valores mínimos de estos valles desdoblados coincide con la posición del valor mínimo del valle sin desdoblar, por lo que esta estrategia ha permitido mejorar la precisión de los resultados.

Para caracterizar la respuesta de estos materiales se emplearon disoluciones patrón de índice de refracción conocido y creciente. Los resultados experimentales obtenidos mostraron una sensibilidad de 28 nm/RIU, valor que está de acuerdo con la sensibilidad teórica obtenida *in silico* y con el estado del arte de otros cristales fotónicos 1D.

Una vez demostrado que el cristal fotónico responde a variaciones en el índice de refracción superficial se procedió a estudiar su aplicación analítica mediante la cuantificación de inmunoglobulinas. Trabajando con un inmunoensayo directo sin marcaje se obtuvo un límite de detección de 16 ng/mL (100 pM). También se evaluó la selectividad del biosensor con muestras afines y no afines a la diana, generando señal únicamente aquellas muestras que tenían afinidad. Además, la cuantificación de muestras de CRP y LDH realizada con estos cristales, alcanzó un límite de detección de 2 µg/mL y 18 ng/mL, respectivamente.

El bajo coste en la fabricación, las buenas prestaciones analíticas mostradas y la facilidad de sintonización a la longitud deseada, sitúan estos sustratos como una plataforma prometedora para el biosensado sin marcaje. Sin embargo, se debería mejorar más en la reproducibilidad entre lotes y en el posicionamiento del sustrato con el fin de controlar con mayor precisión el ángulo de incidencia. Por ello, se plantea el desarrollo de un biosensor completo, utilizando estos materiales como sustratos donde realizar los ensayos y un lector de discos modificado como detector. En este caso, el cristal fotónico se sintonizaría a la longitud de onda del láser del lector y se medirían las variaciones en la intensidad del láser transmitido debidas al biosensado.

A modo de resumen, en la Tabla 6 se recogen las principales características de los biosensores desarrollados a lo largo de esta tesis. Debido a la naturaleza del biosensor desarrollado en el primer capítulo, no hay valores de límite de detección. En la Tabla 7 se clasifican cada uno de los biosensores desarrollados según el

## Discusión general de los resultados

criterio ASSURED, que indican las propiedades que todo dispositivo *point-of-care* debería cumplir.

**Tabla 6.** Principales características de los biosensores desarrollados en esta tesis.

Biosensores	Label-free	Límite de detección (ng/mL)					V <sub>muestra</sub> (μL)	t <sub>ensayo</sub> (min)
		IgG	Caseína	SSZ	CRP	LDH		
Blu-ray	Sí	-	-	-	-	-	3-40	45
Array	No	6	462	-	-	-	40	45
Array filtrado	No	4	-	-	-	-	40	45
FDA	No	0.03	27	-	-	-	300	45
Interferómetro constructivo	Sí	3120	-	81	-	-	1	20
Interferómetro destructivo	Sí	460	-	11	-	-	1	20
Cristal Fotónico	Sí	16	-	-	2000	18	40	210

De los resultados expuestos a lo largo de los capítulos de la tesis y resumidos en las Tablas 6 y 7, se extrae que, los estudios de inhibición enzimática son compatibles con la tecnología de disco compacto, presentándose la metodología desarrollada como una alternativa atractiva y útil para el cribado de compuestos de interés farmacológico y el manejo de grandes volúmenes de información resultantes de efectuar estos ensayos masivos.



**Tabla 7.** Propiedades de los biosensores desarrollados que conforman el criterio ASSURED.

<b>Criterios ASSURED</b>	<b>Blu-ray / Cribado de fármacos</b>	<b>FDA</b>	<b>Sustratos interferométricos</b>	<b>Cristales fotónicos</b>
Coste	Muy bajo	Muy bajo	Bajo	Medio
Sensibilidad	n.e.	Muy alta	Media	Media
Selectividad	Muy alta	n.e.	n.e.	Alta
Sencillez	Media	Baja	Alta	Baja
Rapidez	Alta	Alta	Muy alta	Media
Robustez	Muy alta	Alta	Media	Baja
Portabilidad	Media	Baja	Muy alta	Alta
Disponibilidad	Muy alta	Muy alta	Muy alta	Alta

n.e. = no estudiado

Por otro lado, FDA ha permitido mejorar las prestaciones del biosensor basado en DVD y se postula como una metodología práctica y aplicable en la mejora de la sensibilidad de biosensores ópticos, tanto con marcaje como sin él.

También se ha demostrado que es posible desarrollar biosensores ópticos *label-free* utilizando los principios físicos de los cristales fotónicos y los sustratos interferométricos. Los cristales fotónicos destacan por su capacidad de sintonización a la longitud de onda deseada y su buena sensibilidad, mientras que el biosensor basado en interferometría sobresale por su reducido tamaño y portabilidad, sencillez operativa y coste reducido, alcanzando buenas sensibilidades.



## **5. Conclusiones**



Las investigaciones realizadas en esta tesis se han centrado en el estudio de sistemas y metodologías para el biosensado sin marcaje. En este sentido, la tecnología de disco compacto, gracias a sus características, ubicuidad y uso popularizado, se ha postulado como una tecnología clave. Con este objetivo, se han explorado varios fenómenos físico-químicos, se han evaluado las propiedades de cada uno de ellos y se han puesto a punto biosensores y metodologías útiles en diferentes campos, especialmente el sanitario.

A continuación, se resumen las principales conclusiones de esta tesis según los objetivos marcados al inicio de la misma.

- Se ha puesto a punto una metodología sobre disco compacto dirigida al descubrimiento y desarrollo de fármacos. Se ha logrado seguir el efecto inhibitorio de una colección de compuestos sin necesidad de utilizar marcadores. Además, se han establecido las bases para el cribado de sustancias candidatas y el tratamiento efectivo del gran volumen de resultados obtenidos. En comparación con los actuales sistemas empleados en las primeras etapas del descubrimiento de fármacos, este aporta mayor versatilidad a coste reducido, manteniendo buenas prestaciones y elevada capacidad de trabajo.
- Se ha desarrollado una metodología (FDA) que mejora la sensibilidad de los sensores ópticos que trabajan con captura de imágenes. Se ha demostrado que se puede identificar la señal analítica obtenida en el ensayo y separarla de gran parte del ruido de fondo que genera el sistema y los agentes externos. Incluso la aportación a la señal analítica de las adsorciones inespecíficas es despreciable cuando se trabaja con FDA. Aunque requiere mayores volúmenes de reactivos y superficie de ensayo, lo que no suele ser un impedimento, la metodología FDA podría utilizarse en biosensores *label-free* mejorando su sensibilidad.

## Conclusiones

---

- Se han fabricado dos sustratos con propiedades interferométricas superponiendo capas de metales y dieléctricos de espesor nanométrico. Controlando estos espesores se han configurado chips con respuesta interferométrica, constructiva y destructiva. Los resultados experimentales se corresponden con lo predicho por las simulaciones *in silico*. El sistema de interrogación se ha desarrollado utilizando el cabezal óptico y el mecanismo de seguimiento de un lector de discos DVD. El método de ensayo, lector y software se han integrado en un biosensor óptico *label-free*, compacto y portátil, habiendo demostrado que el chip desarrollado es un material óptico muy competitivo, tecnológicamente sencillo de fabricar que, además, permite alcanzar unas prestaciones analíticas muy significativas. Ello ha permitido cuantificar analitos de alta y baja masa molecular. Además, las señales generadas son visibles a simple vista, lo que ha permitido establecer las bases para el desarrollo de un nuevo método de detección basado en la captura de imágenes, muy prometedor, especialmente por su sencillez y prestaciones, que, al no requerir un lector instrumental, facilita y simplifica la obtención de los resultados.
- Se ha desarrollado un cristal fotónico 1D recubriendo la estructura del track de un Blu-ray con una capa nanométrica de óxido de titanio. Ello ha permitido desarrollar un sustrato de ensayo que responde en el espectro visible, pudiendo adecuarse a diferentes tipos de fuentes y detectores. También, se ha puesto a punto una metodología basada en el desdoblamiento de los GMRs para obtener resultados más precisos que mejoran las prestaciones analíticas de estos materiales. Además, se han sentado las bases para el desarrollo de un sistema de detección basado en un lector de discos, en el cual, el cristal fotónico responde selectivamente

a la longitud de onda del láser, registrándose las variaciones en la intensidad del haz transmitido producidas por la reacción bioanalítica.

Los componentes de los lectores y los discos compactos tienen capacidades y propiedades muy interesantes para su incorporación en biosensado. En esta tesis se ha demostrado que, sobre esta base, ha sido posible desarrollar biosensores que operan en formato *label-free* utilizando diferentes propiedades fotónicas. Los resultados muestran que estas metodologías y biosensores son de aplicación general, teniendo una gran versatilidad al adaptarse a diferentes entornos y necesidades analíticas. Además, las soluciones aportadas, tanto en lo que se refiere a materiales y sistemas lectores, como a metodologías, son sencillas, robustas y económicamente abordables, ajustándose en su conjunto a los sistemas *point-of-care* aplicables tanto en el laboratorio como fuera de él.