

## Resumen

La presente tesis “Vías de inmovilización de biomoléculas sobre SU-8 y otras superficies poliméricas para su utilización en biosensado óptico sin marcaje” tiene como objetivo el diseño, desarrollo y evaluación de diferentes métodos de anclaje de biorreceptores en distintos materiales, en formato de micromatriz, con aplicación en biosensado.

En la actualidad sigue siendo un área de creciente interés desarrollar nuevos sistemas de análisis para la detección de analitos, más sensibles y selectivos, con tiempos de análisis reducidos, miniaturizables y automatizables. Estos desarrollos pueden aplicarse en dispositivos biosensores que encuentran su aplicación en campos tan diversos como diagnóstico clínico, medicina forense y medio ambiente.

Con el objetivo de desarrollar biosensores con prestaciones mejoradas se estudiaron estrategias de inmovilización de sondas sobre el soporte de ensayo basadas en el empleo de hidrogeles.

En una primera fase, los desarrollos se realizaron usando tecnología de micromatrices de fluorescencia, que permite utilizar una menor cantidad de muestra y analizar múltiples analitos y muestras a la vez, reduciendo el tiempo de análisis y el coste

Posteriormente, los desarrollos ya optimizados se emplearon para la puesta a punto de un biosensor óptico sin marcaje de tipo BICELL (*Biophotonic Sensing Cells*) en colaboración con la UPM (Universidad Politécnica de Madrid), que se aplicaron a sistemas modelo y a problemas reales. Asimismo, y en colaboración con el Centro de Tecnología Nanofotónica de la UPV, se implementó la estrategia de inmovilización a través del uso de hidrogeles, en biosensores ópticos sin marcaje constituidos por guías de ondas corrugadas. En este caso, además de la inmovilización a través de hidrogeles, se estudió un método de inmovilización covalente de fragmentos de anticuerpos que permitió su fijación orientada y muy próxima a la superficie del sensor.

La tesis se estructura en seis capítulos. En el Capítulo 1 se da una visión general del concepto de biosensado, atendiendo a las distintas clasificaciones y los diferentes aspectos que hay que considerar en su diseño.

En el Capítulo 2 se plantean los objetivos generales y particulares de la tesis.

El Capítulo 3 plantea la aplicación de dos hidrogeles fotoinducidos derivados de fosforicolina y dextrano para mejorar la inmovilización de biomoléculas en formato micromatriz, sobre superficies planas y usando el formato de micromatriz de fluorescencia para realizar ensayos de detección con proteínas y oligonucleótidos. La polimerización del gel y el anclaje de las sondas se lleva a cabo simultáneamente mediante la utilización de reacciones fotoinducidas empleando la química *click* de acoplamiento tiol-eno.

En el Capítulo 4 se implementa el método desarrollado en micromatriz con uno de los hidrogeles en dos tipos de biosensores interferométricos sin marcaje fabricados en SU-8. Con ambos sensores se detecta CRP en suero con muy buena sensibilidad (, LOD de 21 pg/mL). Por otro lado, esta estrategia se ensaya también en sensores nanofotónicos basados en guías de ondas corrugadas con resultados prometedores. En este capítulo también se pone a punto y se evalúa en tiempo real la inmovilización de fragmentos de anticuerpo sobre la superficie del sensor nanofotónico, mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno inducida por luz UV. La monitorización en tiempo real permite demostrar el papel indispensable de la luz en el proceso de inmovilización. Utilizando esta aproximación se ensaya la detección sin marcaje de tres biomarcadores cardíacos de interés (CRP, cTnI/T y Mioglobina).

El quinto capítulo se dedica a la descripción detallada de todos los procedimientos experimentales que se llevan a cabo en los Capítulos 3 y 4.

Finalmente, el Capítulo 6 recoge las conclusiones alcanzadas a partir de los resultados obtenidos en el desarrollo de la tesis doctoral.

**Abstract**

This thesis "Biomolecule immobilization approaches on SU-8 and other polymer surfaces for label-free optical biosensing" aims to design, develop and evaluate different methods for anchoring bioreceptors in different materials, in a microarray format, with application in biosensing.

Currently, it is still an area of growing interest to develop new analysis systems for the detection of biomolecules, being more sensitive and selective, with reduced analysis time, miniaturizable and automatable. These developments can be applied in biosensing devices that find utility in fields as diverse as clinical diagnosis, forensic medicine and environmental monitoring.

To develop biosensors with improved performance, here strategies for immobilization of probes on the test support based on the use of hydrogels were studied.

In a first phase, the developments were carried out using microarray technology, which uses lower amount of sample and can analyze multiple targets and samples at the same time, reducing tests time and cost.

Subsequently, the optimized developments were used to develop, in collaboration with UPM (Polytechnic University of Madrid), a label-free optical biosensor based on BICELLS (Biophotonic Sensing Cells), which were applied to model systems and real samples. Likewise, and in collaboration with the Nanophotonic Technology Center at UPV, the hydrogel-based immobilization strategy was implemented in other label-free nanophotonic biosensors consisting of corrugated waveguides. In this case, in addition to immobilization through hydrogels, we studied a method of covalent immobilization of antibody fragments that allowed them to be oriented and very close to the sensor surface.

Thus the thesis is organized into six chapters. Chapter 1 gives an overview of the concept of biosensing, and takes into account the different classifications and different items that must be considered in its design.

Chapter 2 sets out the general and particular objectives of the thesis.

Chapter 3 discusses the application of two photoinduced hydrogels, derived from phosphoricoline and dextran, respectively, to improve the immobilization of biomolecules in microarray format, on planar surfaces and using the fluorescence

microarray format to perform detection assays with proteins and oligonucleotides. The polymerization of the gel and the anchoring of the probes are carried out using photoinduced reactions using the thiol-ene coupling click chemistry, and derivatives, performing both steps simultaneously.

In Chapter 4 the method developed with one of the hydrogels in microarray format is transferred to two types of SU-8 based interferometric label-free biosensors. Both biosensors detected CRP in blood serum with very good sensitivity (LOD de 21 pg/mL). Besides, this strategy is also tested on nanophotonic sensors based on corrugated waveguides with promising results. In this chapter, immobilization of antibody fragments on the surface of the nanophotonic sensor is also performed and assessed in real time by the UV light-induced thiol-ene coupling reaction. Real-time monitoring shows the essential role of light in the immobilization process. Using this approach, the label-free detection of three cardiac biomarkers of interest (CRP, cTnl / T and Myoglobin) is tested.

The fifth chapter is devoted to the detailed description of all the experimental procedures that are carried out in chapters 3 and 4.

Finally, Chapter 6 collects the conclusions reached from the results obtained in the development of the doctoral thesis.

**Resum**

La present tesi "Vies d'immobilització de biomolècules sobre SU-8 i altres superfícies polimèriques per a la seva utilització en biosensado òptic sense marcatge" té com a objectiu el disseny, desenvolupament i avaluació de diferents mètodes d'ancoratge de bioreceptors en diferents materials, en format de micromatriu, amb aplicació en biosensat.

En l'actualitat segueix sent una àrea de creixent interès desenvolupar nous sistemes d'anàlisi per a la detecció de biomolècules, que siguin més sensibles i selectius, amb temps d'anàlisi reduïts, miniaturitzables i automatitzables. Aquests desenvolupaments poden aplicar-se en dispositius biosensors que troben la seva utilitat en camps tan diversos com diagnòstic clínic, medicina forense i medi ambient.

Amb l'objectiu de desenvolupar biosensors amb prestacions millorades es van estudiar estratègies d'immobilització de sondes sobre el suport d'assaig basades en l'ús de hidrogels.

En una primera fase, els desenvolupaments es van realitzar usant tecnologia de micromatrius, que permet utilitzar una menor quantitat de mostra i analitzar múltiples dianes i mostres alhora, reduint el temps d'anàlisi i el cost.

Posteriorment, els desenvolupaments ja optimitzats es van emprar per a la posada a punt d'un biosensor òptic sense marcatge de tipus BICELL (*Biophotonic Sensing Cells*) en col·laboració amb la UPM (Universitat Politècnica de Madrid), que es van aplicar a sistemes model i als problemes reals. Així mateix, i en col·laboració amb el Centre de Tecnologia Nanofotònica de la UPV, es va implementar l'estratègia d'immobilització a través de l'ús de hidrogels, en biosensors òptics sense marcatge constituïts per guies d'ones corrugades. En aquest cas, a més de la immobilització mitjançant hidrogels es va estudiar un mètode d'immobilització covalent de fragments d'anticossos que va permetre la seva unió orientada i molt propera a la superfície del sensor.

Així donç, la tesi s'estructura en sis capítols. En el capítol 1 es dóna una visió general del concepte de biosensat, atenent les diferents classificacions i els diferents aspectes que cal considerar en el seu disseny.

En el capítol 2 es plantegen els objectius generals i particulars de la tesi.

El Capítol 3 planteja l'aplicació de dos hidrogels fotoinduïts derivats de fosforicolina i dextrà respectivament per millorar la immobilització de biomolècules en format micromatriu, sobre superfícies planes i usant el format de micromatriu de fluorescència per a realitzar assajos de detecció amb proteïnes i oligonucleòtids. La polimerització del gel i l'ancoratge de les sondes es porta a terme simultàniament mitjançant la utilització de reaccions fotoinducides emprant la química *click* d'acoblament tiol-eno, i derivades.

En el capítol 4 s'implementa el mètode desenvolupat en micromatriu amb un dels hidrogels en dos tipus de biosensors interferomètrics sense marcatge basats en SU-8. Amb tots dos sensors es detecta CRP en sèrum sanguini amb molt bona sensibilitat (LOD de 21 pg/mL). D'altra banda, aquesta estratègia s'assaja també en sensors nanofotònics basats en guies d'ones corrugades amb resultats prometedors. En aquest capítol també es posa a punt i s'avalua en temps real la immobilització de fragments d'anticòs sobre la superfície del sensor nanofotònic, mitjançant la reacció d'acoblament tiol-eno induïda per llum UV. El monitoratge en temps real permet demostrar el paper indispensable de la llum en el procés d'immobilització. Utilitzant aquesta aproximació s'assaja la detecció sense marcatge de tres biomarcadors cardíacs d'interès (CRP, cTnI / T i Mioglobina).

El cinquè capítol es dedica a la descripció detallada de tots els procediments experimentals que es duen a terme en els capítols 3 i 4.

Finalment, el Capítol 6 recull les conclusions assolides a partir dels resultats obtinguts en el desenvolupament de la tesi doctoral.