



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Instituto Interuniversitario de
Investigación de Reconocimiento
Molecular y Desarrollo Tecnológico

Augusto Juste Dolz

Bi GRATINGS: diffractive transducers for biosensing in photonic platforms

PhD. Supervisors

Miquel Avella Oliver

Ángel Maquieira Catalá

Valencia, January 2023

RESUMEN

El desarrollo científico y tecnológico de las últimas décadas ha dado lugar a sistemas sensores capaces de obtener, procesar y transmitir información sobre multitud de aspectos físicos y químicos, y utilizarla para mejorar aspectos clave de multitud de áreas de nuestra sociedad. Los sensores químicos son dispositivos compactos y miniaturizados capaces de ofrecer soluciones alternativas a las técnicas de análisis instrumental convencionales. En especial, los biosensores han adquirido gran relevancia por los avances que han supuesto para sectores estratégicos como el diagnóstico clínico, la industria alimentaria y el medio ambiente.

Los biosensores ópticos se basan en interacciones entre la luz y la materia para transducir eventos de bioreconocimiento y presentan prestaciones importantes como la estabilidad, inmunidad a estímulos externos y versatilidad en el desarrollo de aproximaciones sin marcaje (label-free). Este último aspecto suele aprovechar fenómenos nanoscópicos y su desarrollo se encuentra muy ligado al progreso de la nanociencia y nanotecnología.

Un aspecto clave en el biosensado sin marcaje consiste en descubrir y desarrollar nuevas estrategias de transducción. En este sentido, aunque se encuentren aun en una etapa temprana de desarrollo, los biosensores difractivos presentan un gran potencial en términos de simplicidad, miniaturización, y capacidad para minimizar señales no deseadas fruto de interacciones no específicas, entre otros aspectos.

Esta tesis persigue innovar en biosensado difractivo y ampliar su ámbito de aplicación, abordándolo a través de la conceptualización, el diseño y la implementación de estructuras difractivas compuestas por biomoléculas, que hemos denominado biogratings. Los biogratings son redes de bioreceptores fabricadas sobre un soporte sólido que están diseñadas de acuerdo con una estructura de tipo grating de difracción. De este modo, la estructuración periódica de biomoléculas genera una modulación topográfica y de índice de refracción que permite difractar un haz láser incidente. El reconocimiento de analitos específicos por parte de las biomoléculas que componen el biograting produce una acumulación de la materia que lo conforma, lo cual genera un incremento en la variación de índice de refracción y el grosor de la red, y se traduce en

un aumento de su eficiencia de difracción. De este modo, la eficiencia de difracción de los biogratings permite cuantificar biointeracciones sin marcaje.

Esta tesis comprende cinco publicaciones científicas distribuidas a lo largo de tres capítulos. El primer capítulo se centra en la impresión por microcontacto como técnica de fabricación de biogratings. Esta técnica utiliza moldes elastoméricos para transferir estructuras moleculares a los sustratos sólidos de interés y gracias principalmente a su simplicidad y bajo coste se ha convertido en una estrategia muy potente para fabricar biogratings. Sin embargo, las biomoléculas estructuradas mediante impresión por microcontacto pueden sufrir cambios conformacionales y modificar su actividad biológica. La primera parte del capítulo profundiza en el estudio de este fenómeno e introduce una estrategia alternativa para evitar este problema, la cual recibe el nombre de impresión por microcontacto indirecta. Esta alternativa consiste en fabricar estructuras de un agente de relleno mediante impresión por microcontacto estándar y después inmovilizar por fisorción los bioreceptores de interés en los huecos de la estructura estampada. El trabajo desarrolla una estrategia general utilizando albúmina de suero bovino como agente de relleno para fabricar biogratings de anticuerpos y demuestra su funcionalidad a través de un inmunoensayo para detectar anticuerpos específicos mediante medidas difractivas.

Además de llevar a cabo la transferencia de bioreceptores por fisorción, la impresión por microcontacto permite también incorporar reacciones químicas para obtener inmovilizaciones más estables. La segunda parte del primer capítulo aborda la fabricación de biogratings de proteínas a través de fisorción y las reacciones tiol-eno e iminas, y compara los principales aspectos de las estructuras resultantes (homogeneidad, grosor, funcionalidad, etc.) mediante inmunoensayos para la detección de anticuerpos. En el trabajo, la viabilidad de estas estructuras como transductores para la detección de inmunoglobulinas G, se demuestra también en la fabricación y aplicación de biogratings de proteínas que participan en alergias a la leche de vaca.

Además de los problemas relacionados con la actividad de los bioreceptores, la impresión por microcontacto presenta otras limitaciones como la baja reproducibilidad y homogeneidad de las estructuras, concentraciones elevadas de biomoléculas y largos tiempos de fabricación. En el segundo capítulo se presenta un nuevo método de

fabricación de biogratings que se basa en la desnaturalización periódica y selectiva de proteínas mediante irradiación ultravioleta que supone una alternativa potente a la estampación por microcontacto. Consiste en generar un patrón de interferencia sobre una biocapa continua de modo que las proteínas expuestas a las interferencias constructivas se desactivan y las expuestas a las destructivas mantienen su actividad. Esta metodología permite fabricar grandes áreas de biogratings (alrededor de 18 mm²) con una elevada homogeneidad y en menos de dos minutos. Además, los biogratings resultantes son capaces de llevar a cabo la transducción de eventos de bioreconocimiento de la misma manera que los fabricados mediante impresión por microcontacto pudiendo ser utilizados incluso para el análisis directo de muestras biológicas complejas.

Por último, la implementación de fenómenos difractivos en guías de onda para biosensado constituye un aspecto clave para desarrollar dispositivos miniaturizados y compactos que permita integrar todas las funcionalidades ópticas, electrónicas y fluídicas en una única plataforma. El tercer capítulo de esta tesis estudia por primera vez la incorporación de biogratings sobre guías de onda, que hemos denominado como bio Bragg gratings (BBGs). Estas estructuras introducen nuevos mecanismos de transducción en biosensado sin marcaje y expanden el ámbito de aplicación de los biogratings. La primera parte del capítulo se centra en la implementación de BBGs en fibras ópticas y reporta un estudio teórico y experimental que demuestra por primera vez este mecanismo de transducción. Este estudio prueba el concepto con un inmunoensayo modelo y muestras de suero, demuestra las principales características bioanalíticas y ópticas, y establece las bases para transferir los BBGs a otros tipos de plataformas fotónicas basadas en guías de onda. Siguiendo esta línea, la segunda parte del capítulo se centra en la implementación de los BBGs en plataformas fotónicas integradas compuestas por guías de onda de tipo rib con la finalidad de obtener dispositivos miniaturizados más robustos y con un mayor grado de integración.