

## La otra música de los discos compactos. Biosensores ópticos derivados de tecnologías de electrónica de consumo.

A. Maquieira, R. Puchades, L.A. Tortajada, M.J. Bañuls y S. Morais

IDM. Departamento de Química. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n 46022, Valencia.

**1. Introducción.** Actualmente hay una demanda importante de herramientas analíticas para asistencia clínica o para obtener información *in situ*, con altas prestaciones analíticas.

En este sentido, una cuestión importante a concretar es qué tecnologías y metodologías pueden integrarse en una herramienta analítica que pueda atender a las demandas planteadas; debiendo considerarse además la escalabilidad de la técnica, su ubicuidad, versatilidad, robustez y portabilidad.

Los dispositivos electro-ópticos derivados de la electrónica de consumo como lectores de discos compactos, teléfonos móviles, pantallas táctiles, cámaras fotográficas, escáneres de documentos, principalmente, poseen una tecnología muy avanzada con desarrollos y mejoras constantes que los mantiene permanentemente actualizados. Por ello, son candidatos interesantes para el desarrollo de sistemas analizadores tipo BioMEM (sistemas bio-electromecánicos) o biosensores. Resultan baratos, fiables, de pequeño tamaño, prácticamente sin mantenimiento y con muy bajo consumo energético. Por otro lado, están ampliamente distribuidos entre la población de todo el mundo (ubicuidad) y gozan de gran aceptación.

Una de las tecnologías más consolidadas y prometedoras es la de disco compacto (CDs). De acuerdo a la información de los fabricantes, actualmente el número de lectores de CDs, DVDs y Blu-ray supera los 600 millones de unidades, los discos ópticos en circulación son más de 200 billones y contra lo que parezca, se mantiene año tras año el número de reproductores y las ventas de discos, debido al tirón de la tecnología Blu-ray.

Desde un punto de vista económico, el precio de un DVD es de aproximadamente 0,2€ y los lectores (dotados de tres láseres de lectura 405 nm, 650 nm y 780 nm) tienen un precio medio inferior a 100€, lo que les hace extraordinariamente competitivos frente a cualquier detector de laboratorio con el que se compare, incluyendo los de bajo costo. Además, los discos son fabricados con muy alta calidad en lo que respecta a materiales y tolerancias.

La tecnología de CDs presenta una ventaja importante frente a sus competidoras y es que cuenta con una

plataforma de trabajo, los discos, de la que carecen las otras y que además es un soporte de gran formato y puede leerse dinámicamente. Todo ello le proporciona un gran potencial analítico.

La idea de llevar a cabo análisis químicos en plataformas circulares de plástico es antigua, habiéndose desarrollado equipos comerciales. También se han desarrollado soportes poliméricos ([www.gyros.com](http://www.gyros.com)) con forma y tamaño similar a CDs y que se han utilizado como plataformas centrífugas con estructuras microfluídicas para desarrollar diferentes operaciones analíticas (filtrado, mezcla, extracción, etc.). Sin embargo, para la detección de resultados no se emplea tecnología de CDs, perdiendo una gran ventaja.

Nuestro grupo viene trabajando en estos desarrollos desde hace más de 10 años con el objetivo de explotar el principio de funcionamiento y elementos de la tecnología de discos de audio-video para llevar a cabo los ensayos en su superficie y leer los resultados mediante un reproductor comercial, introduciendo mínimas modificaciones en el hardware y software de lectura.

Esta combinación de ventajas de diseño, características técnicas y capacidades operativas hace que la tecnología de disco pueda convertirse en una herramienta con gran potencial analítico, como se puso de manifiesto en un trabajo pionero (*Anal. Chim. Acta*, 2000, 411, 1).

**2. Bases de las tecnologías de disco compacto.** Un CD, es un disco óptico de almacenamiento de datos en formato digital. El reproductor de discos, diseñado para aplicaciones de audio, video y datos, es un dispositivo que lee o graba información.

Las bases de la tecnología de discos compactos se establecieron a partir de los años 40' (siglo XX), pero su desarrollo requirió avances prácticos en electrónica digital y en láser, además, de métodos de modulación digital de señales y tecnologías para procesar grandes volúmenes de datos.

Un CD es básicamente un disco de policarbonato con *pits* y *lands* moldeados en su superficie, cubiertos por una película reflectante metálica (aluminio, oro, etc.) protegida con una laca de PMMA. El disco estándar tiene 12,065

centímetros de diámetro, 1,2 mm de espesor y un agujero central de 15 mm, Sin embargo hay muchas variantes en cuanto a tamaño y presentación.

Los datos se almacenan en una espiral (pista) de alrededor de 2 mil millones de registros. La longitud total de la pista de un CD es de casi 4,5 kilómetros. El lector de los discos actualmente monta tres láseres que emiten a 780 nm, 650 nm o 405 nm, dependiendo de que sea un CD, DVD o Blu-ray. La resolución es muy elevada ya que el diámetro del haz de lectura es de 3,2; 1,48 o 0,64 micras, respectivamente.

Una ventaja que presentan los lectores de CDs es que disponen de un sistema de corrección de errores que impide abortar la lectura del disco aun cuando en su superficie haya arañazos, polvo, etc. Además, el mecanismo de autofocus del lector permite leer discos alabeados. Todo ello, en el fondo, es lo que permite leer discos en los que los resultados analíticos se detectan como “defectos”.

**3. Estrategias desarrolladas para utilizar CDs como plataforma analítica.** Desarrollar una herramienta analítica a partir de tecnología de disco compacto requiere resolver muchos retos a nivel individual para, posteriormente, integrarlos en un único sistema y metodología. Por un lado, deben desarrollarse los ensayos analíticos en disco, posteriormente hay que conseguir que el lector lea la “música” química y finalmente hay que dotarse de un software de lectura y tratamiento de resultados. A continuación discutiremos genéricamente todos estos aspectos.

De acuerdo con nuestro objetivo de utilizar discos compactos estándar y lectores no modificados como herramientas de análisis, los ensayos heterogéneos en formato de microarrays de alta densidad son los más apropiados, dada la gran superficie activa de los discos, la posibilidad de inmovilizar una enorme colección de sondas, desarrollar ensayos múltiples o analizar varias muestras en paralelo.

Para configurar un formato de ensayo heterogéneo en disco se debe considerar la composición de su superficie, sonda a inmovilizar, modo de microimpresión y tampones, disoluciones de lavado, marcadores para revelado y secuencia de etapas y tiempos de trabajo.

La inmovilización en disco normalmente se efectúa sobre la superficie de policarbonato. En el caso de proteínas se puede optar por inmovilización por adsorción o bien covalente, siendo la primera la vía más empleada y en principio recomendable porque no requiere modificar el

sustrato, es sencilla y efectiva. Sin embargo, cuando se quiere controlar el proceso u orientar la proteína, el anclaje covalente es recomendado, con el inconveniente de que hay que funcionalizar el PC y utilizar reacciones de anclaje que pueden desnaturalizar la proteína. Una alternativa interesante es biotinar la proteína e inmovilizarla en estreptavidina, previamente anclada por adsorción.

En el caso de oligonucleótidos hay que utilizar vías indirectas (estreptavidina- oligos biotinilados) o anclaje covalente sobre la superficie del disco previamente funcionalizada. Ha todo ello hay que añadir detalles importantes como densidad de sondas o la adición de un espaciador que mejore la interacción sonda/ diana, entre otros.

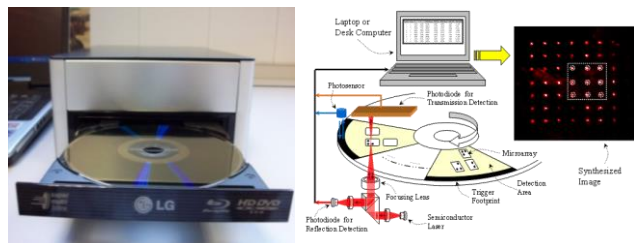
**3.1. Estrategias de revelado de biointeracciones.** Poner de manifiesto la extensión de un ensayo heterogéneo mediante lectores de CDs estándar, implica medir con el lector de discos la atenuación del haz reflejado o transmitido. En ambos casos es necesario recurrir al empleo de marcadores que indirectamente nos informen de la extensión de la biointeracción.

Los trazadores más usados se componen de un marcador unido a una proteína o a un oligonucleótido que reconoce el producto de la biointeracciones, como anticuerpos u oligos marcados con partículas: oro, platino, grafito, látex, etc., enzimas que producen un precipitado a partir de un sustrato (TMB, NBT, etc.) soluble o colorantes que catalizan reacciones de fotopolimerización. Todos los productos resultantes deben absorber, dispersar o reflejar el haz láser ( $\lambda$  (nm) 405; 650; 780) del reproductor de discos. Cualquiera de los tres modos de revelado da buenos resultados, siendo el formato de ensayo y el tipo de biointeracción utilizada quien determina el revelador a emplear.

**3.2. Lectura de los discos una vez desarrollado el ensayo analítico.** Para la lectura de los resultados de los ensayos, se emplea un lector comercial con algunas modificaciones del hardware que permiten generar una señal analítica útil.

El reproductor sigue la pista de datos (track) y cuando el láser barre un punto (tamaño medio 400  $\mu$ m) donde ha habido reconocimiento, se produce una variación de la intensidad del haz reflejado al fotodiodo transductor que este convierte en una señal analógica (ancho de banda 10 MHz), posteriormente amplificada por una tarjeta electrónica de adquisición de datos (velocidad de muestreo hasta 2 MHz).

La unidad de lectura de los discos es controlada por un software que se ejecuta en un ordenador que opera en entorno Windows. La conexión PC/lector se efectúa mediante una interfaz de bus serie USB2.0 universal.



Lector de discos y esquema del mismo.

El software utilizado (Biodisk) es de desarrollo propio y está escrito en Visual C ++, controlando la unidad de disco y la tarjeta de adquisición de datos (frecuencia de muestreo, ganancia del detector, resolución espacial y velocidad de exploración). Para explorar completamente la superficie del disco, el software simula el proceso de escritura o lectura de un archivo de 600 MB, 3,8 GB o 22GB, según se trate de CDs, de DVDs o de Blu-ray. La exploración comienza a partir de la pista interior del disco, siguiendo la espiral continua hacia el exterior. Los datos recogidos de cada zona de detección se representan en forma de matriz y se almacenan en archivos de formato binario independientes, sin comprimir, y los muestra en una imagen gráfica. El software permite la exportación de la imagen en un código de escala de grises a un formato TIF comprimido o mapa de bits para la cuantificación adicional. Las curvas de calibración obtenidas se analizan matemáticamente.

**4. Aplicaciones.** A continuación se presentan muy resumidamente algunas aplicaciones prácticas representativas, basadas en inmunoensayo y en ensayos de hibridación de oligonucleótidos, todas ellas en formato heterogéneo de microarrays de alta densidad.

#### 4.1a. Microinmunoensayo en disco estándar tipo CD para determinar clorpirifos en aguas.

El ensayo consiste en imprimir una matriz por muestra de un conjugado proteína-hapteno de clorpirifos y efectuar a continuación un ensayo competitivo sobre el mismo disco conteniendo un total de ocho arrays -2560 puntos / disco-. Esta densidad de trabajo equivale a 25 placas ELISA de 96 pocillos. Además, se compararon las prestaciones de discos de baja y de alta reflectividad, leídos por reflexión y por transmisión, respectivamente.

En la siguiente dirección se puede ver un video demostrativo.[http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/ac900359d/suppl\\_file/ac900359d\\_si\\_002.avi](http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/ac900359d/suppl_file/ac900359d_si_002.avi)

Los resultados muestran que se pueden cuantificar residuos de clorpirifos a nivel de ppbs, en agua, utilizando ambos tipos de discos, con prestaciones similares, y analizar simultáneamente ocho muestras diferentes en un tiempo total de 40 minutos, sin más tratamiento de muestra que el ajuste de fuerza iónica y pH. Leyendo en modo reflexión se alcanzó un límite de detección de 0,39 ppbs (IC50 2,51 ppbs). Las variaciones intra-discos fueron (CV) del 8%.

En términos de consumo de reactivos el formato en disco es muy económico ya que comparado con lo que requiere el mismo ensayo en microplaca ELISA, solo se gasta un 2% de conjugado de tapizado, 0,05% del anticuerpo específico y 2,64% de anticuerpo secundario de revelado.

**4.1b Micro-inmunoensayo múltiple en DVD.** En esta aplicación se determinaron simultáneamente cinco residuos pertenecientes a diferentes familias químicas: tres fitosanitarios (atrazina, metolaclo y clorpirifos) y dos antibióticos (sulfatiazol y tetraciclina).

Para ello, se anclaron por adsorción micromatrices de los conjugados proteína-hapteno de cada uno de los analitos. Además, se añadió un patrón interno (biotina) para calibración y controles positivos y negativos para conocer la actividad de los inmunoreactivos. Trabajando con formato de inmunoensayo indirecto se consiguió revelar todos los ensayos con un único reactivo (anticuerpo secundario marcado con una enzima o partícula). Otra opción más ventajosa es marcar los anticuerpos primarios. Con ello se simplifica y acorta el ensayo. En cualquier caso, la duración del ensayo oscila entre 30 y 60 minutos.

La comparación de resultados y prestaciones con las metodologías de referencia (GC-MS para fitosanitarios y HPLC-MS para antibióticos) fue muy satisfactoria (*Anal. Chem.* 2009, 81 (14), 5646). Demostrando las ventajas que presenta la tecnología analítica de CDs, especialmente para *screening*, al determinar simultáneamente dos familias de analitos en lugar de recurrir a dos métodos de preparación de muestra y cuantificación diferentes.

**4.2 Detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Identificación de patógenos.** La tecnología de CDs se puede aplicar también para la identificación y cuantificación de genes, especies, enfermedades, farmacogenética y en general a todo aquello que pueda

analizarse mediante ensayos de hibridación de hebras de ácidos nucleicos (ADN, ARN, etc.) complementarias.

El diseño y manejo de este tipo de ensayos utilizando tecnología de CDs es, en cierto modo, análoga a la expuesta para inmunoensayo. Básicamente, se inmovilizan las sondas de captura sobre la superficie del disco en formato de micromatriz de alta densidad, se hace reaccionar con la diana problema (generalmente productos de PCR) y se revela con un anticuerpo anti-marca. La PCR permite amplificar el ADN problema y, simultáneamente marcar los amplicones. Al final, el lector de discos detectará aquellos puntos de la matriz en donde haya habido hibridación. La extensión de la misma servirá para cuantificar las muestras.

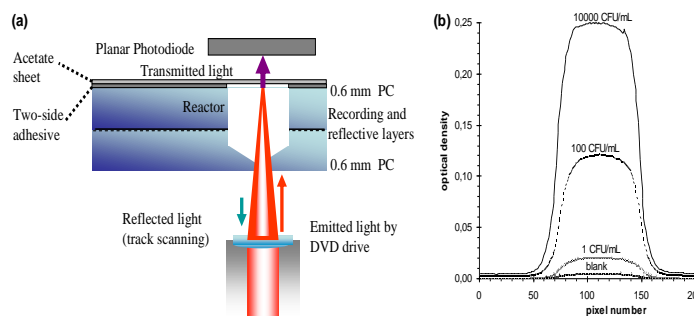
Una problemática particular de los ensayos basados en hibridación de ácidos nucleicos, es que hay que elegir muy bien las sondas de captura y ajustar exactamente las condiciones de trabajo (densidad superficial de sondas, temperaturas, tiempos, fuerza iónica, composición de los tampones o astringencia del medio).

Para el caso concreto de detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), se inmovilizaron sondas biotiniladas de oligonucleótidos diferenciadas en una sola base. En las condiciones óptimas de ensayo (T 40 ° C, incubación durante 1 h y 25% de formamida en la disolución de hibridación) fue posible distinguir entre SNPs a concentraciones de 2,5 nM.

Esta metodología ha sido aplicada por nosotros para aplicaciones en farmacogenética discriminando hasta treinta genes diferentes en muestras de humanos.

En el caso de identificación de diferentes especies (tóxicas e inocuas) de bacterias: *Salmonella* y *Campylobacter*, los ensayos se efectúan del mismo modo, utilizando en este caso sondas dirigidas a reconocer productos de PCR. Los resultados han permitido discriminar ambos microorganismos y otras especies de bacterias inocuas presentes en las muestras, con una sensibilidad de 1CFU / mL. Estos resultados muestran la versatilidad y utilidad de la tecnología analítica de CDs en el campo de la genómica.

**5. Futuras investigaciones.** De cara al futuro, trabajamos en varias líneas con las que dotar a la tecnología de CDs de nuevas funcionalidades y mejorar sus prestaciones. Así, estamos trabajando en la modificación de materiales para obtener "smart surfaces" de modo que podamos modular la "mojabilidad" de las superficies para reducir las adsorciones inespecíficas y aumentar la sensibilidad y selectividad de los ensayos. Esto es especialmente interesante para aplicaciones ómicas.



Esquema de detección. y registros obtenidos para diferentes concentraciones de *Salmonella Typhimurium*

Otras posibilidades para mejorar y ampliar las aplicaciones analíticas de la tecnología analítica de CDs es el desarrollo de ensayos sin marcaje (label-free). Esta propuesta es especialmente interesante para análisis masivo de proteínas, ya que se detecta directamente la biointeracción, evitando su marcaje y revelado, lo que es una gran ventaja. Para ello se pretende incorporar la interferometría en CDs y alcanzar sensibilidades suficientes para trabajar en formato label-free.

Respecto a aplicaciones, nuestro objetivo es centrarnos en el desarrollo de protocolos que permitan la determinación multianálisis de especies presentes en la misma muestra a muy diferentes niveles. Esto es demandado en el ámbito sanitario, especialmente para biomarcadores, alérgenos y microorganismos patógenos.

La tecnología analítica de CDs es idónea para alcanzar estos objetivos permitiendo efectuar, en un mismo ensayo y muestra, la determinación de residuos de fármacos, aniones e identificar microorganismos (*Anal. Chem.*, 2014, 86, 12037). Además, se adapta bien a trabajar fuera del laboratorio y pueden incorporarse en el disco elementos de tratamiento de muestra (fluídica) y automatización. Todo ello se debe a la madurez y calidad de esta tecnología, siendo una herramienta excepcional para alcanzar nuevos logros con costes muy competitivos.

**Agradecimientos.** Se agradece la financiación recibida para la ejecución de los proyectos FEDER MINECO CTQ2002013 CTQ2013-45875-R y GVA PROMETEO / 2014/040.