

BIOGRATINGS: NANOESTRUCTURAS DE BIOMOLÉCULAS PARA ANÁLISIS QUÍMICO MEDIANTE DIFRACCIÓN DE LUZ

Miquel Avella-Oliver^{1,2}, Augusto Juste-Dolz¹, Estrella Fernandez¹, Ángel Maquieira^{1,2}

¹ Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Universitat Politècnica de València, Universitat de València.

² Departamento de Química, Universitat Politècnica de València, 46022 Valencia, España.

Introducción

La química analítica es una ciencia dinámica que integra multitud de disciplinas. Desde hace algún tiempo, parte del progreso de la química analítica es fruto de la convergencia entre diferentes campos. Entre otros, el uso de biomacromoléculas con fines analíticos proporciona una selectividad excelente, y la implementación de nanomateriales permite utilizar fenómenos fotónicos de transducción que favorecen el desarrollo de biosensores.^{1,2} En los últimos años parte de las actividades de nuestro grupo de investigación se enmarcan en este contexto.³⁻⁶

En particular, esta comunicación se centra en una estrategia especialmente interesante que hemos denominado con el término biogratings. Llamamos biograting a una capa de biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, etc.) inmovilizadas sobre una superficie sólida y estructurada según un patrón periódico diseñado para difractar la luz incidente. En otras palabras, son nanoestructuras difractivas de biomoléculas sobre sustratos sólidos. La Figura 1 muestra una configuración típica de biograting constituido por un patrón de líneas de proteínas inmovilizadas (*strips*) y líneas vacías (*gaps*) dispuestas de forma periódica.

El interés analítico de estas nanoestructuras reside en que son capaces de aprovechar la difracción de la luz para transformar interacciones biorreceptor-analito en señales ópticas fácilmente medibles. Entre otras capacidades que se discutirán a continuación, cabe destacar el poder realizar ensayos de biorreconocimiento sin marcaje y a tiempo real, para el análisis directo de muestras complejas. Esta comunicación expone las características de los biogratings y los aspectos clave en su desarrollo: fabricación, estrategias de transducción posibles, y su aplicación en biosensado.

Fabricación

El primer aspecto clave en el diseño y desarrollo de biogratings es su fabricación. Así, la detección

óptica con biogratings, requiere emplear láseres continuos emitiendo a longitudes de onda en el visible y el infrarrojo cercano. Estas fuentes láser deben ser robustas, de modo que se consigan altas prestaciones analíticas, al tiempo que se favorece su implementación en dispositivos compactos. Sin embargo, los periodos de los biogratings que son capaces de difractar estas longitudes de onda se encuentran entre 400 nm y 10 µm. Así pues, el primer reto pasa por fabricar redes periódicas de biomacromoléculas, cuyos periodos se encuentran en esta escala micro/nano.

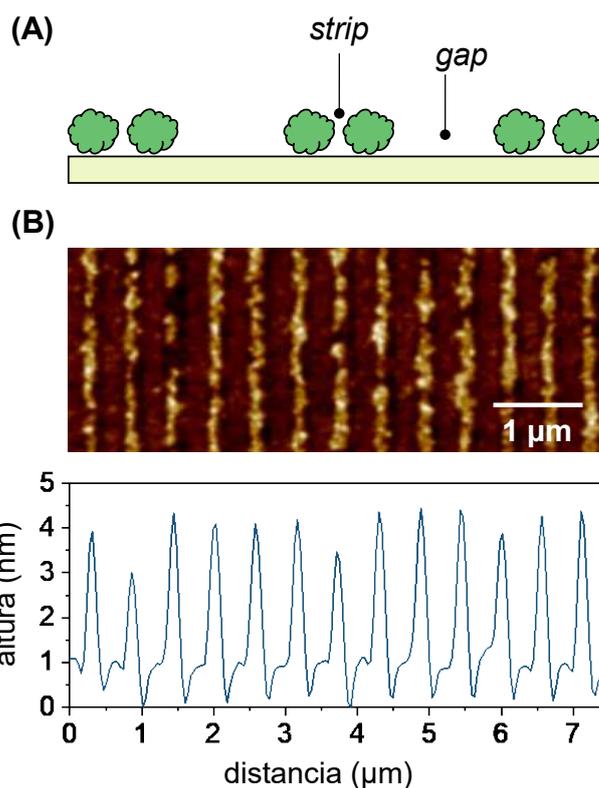


Figura 1. (A) Esquema general de un biograting. (B) Imagen de AFM de un biograting de albúmina de suero bovino (arriba) fabricado sobre vidrio y su perfil de alturas correspondiente (abajo).

Una técnica adecuada para fabricar biogratings con estas dimensiones es la estampación por microcontacto (*microcontact printing*, µCP). De

forma análoga a la estampación de tinta sobre papel empleando cuños, μ CP se basa en la creación de patrones mediante estampación con sellos estructurados. Como se muestra en la Figura 2A, el primer paso es obtener un molde con el patrón que se pretende estampar, que suele ser un chip de silicio nanoestructurado por litografía. A continuación, se dispensa polidimetilsiloxano (PDMS) sobre la nanoestructura del molde y se polimeriza térmicamente. Tras la polimerización, se separa el sello de PDMS y se incuba una disolución con la biomolécula que se desea inmovilizar, de forma que ésta quede adsorbida sobre la superficie estructurada del sello. Finalmente, se estampa el sello de PDMS sobre una

superficie sólida dónde la biomolécula se transfiere tan solo en las zonas de contacto, y tras retirar el sello se obtiene la biocapa con el patrón deseado.⁷

Nuestras investigaciones demuestran que μ CP permite fabricar biogratings con periodos entre 500 nm y 15 μ m, definidos por patrones homogéneos, en superficies de hasta 25 mm².^{8,9} Asimismo, esta estrategia permite estructurar biocapas sobre superficies de distintos materiales y con distintas morfologías.^{8,10} La Figura 1B muestra un ejemplo de biograting de albúmina de suero bovino fabricado sobre vidrio plano, constituido por líneas de unos 250 nm de ancho y 4 nm de altura.

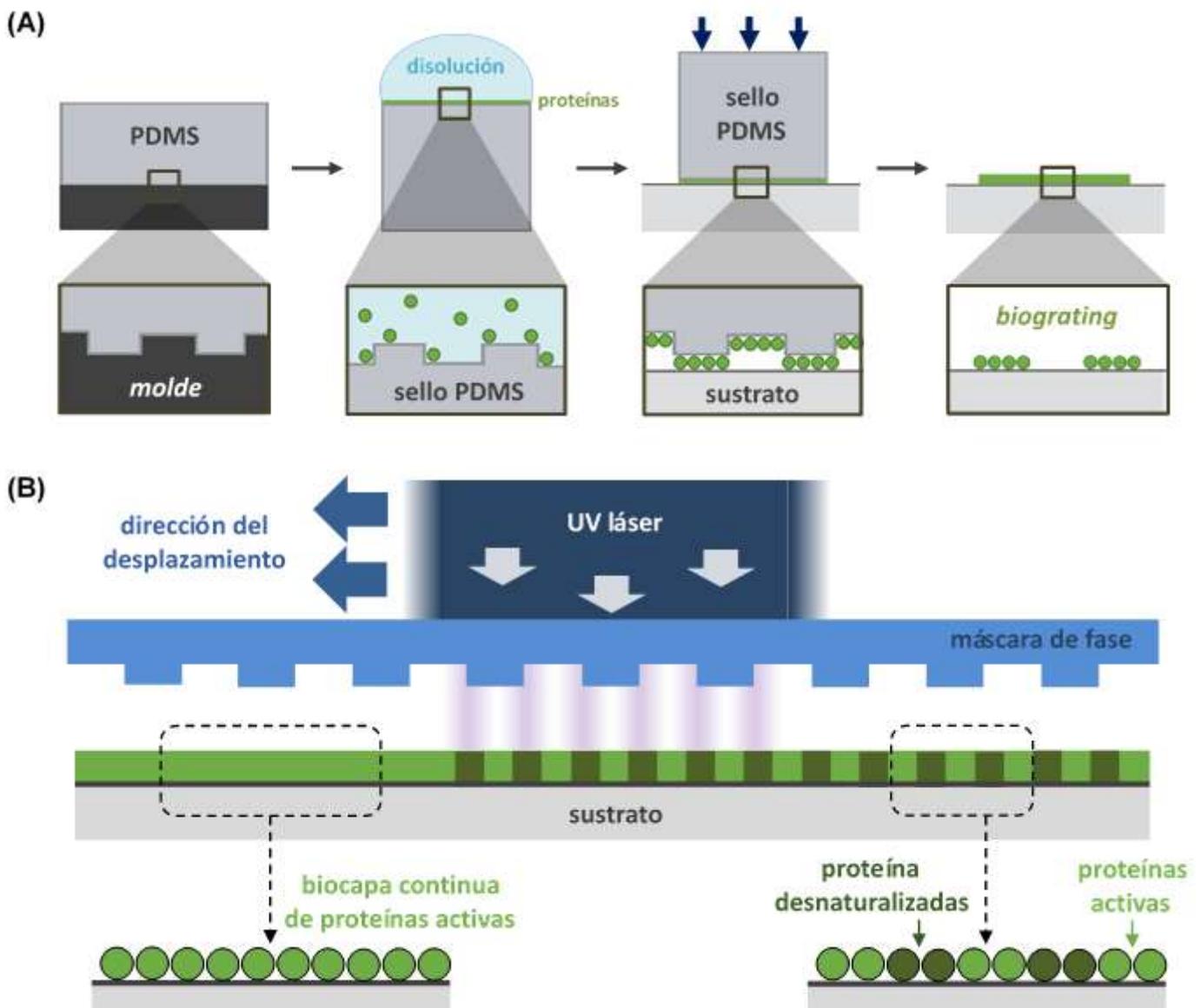


Figura 2. Representación del proceso de fabricación de biogratings mediante (A) estampación por microcontacto y (B) fotodesnaturalización periódica mediante láser UV y máscaras de fase.

En cuanto a limitaciones, se observa que las proteínas estructuradas por μ CP son susceptibles de perder su funcionalidad.¹⁰ Los cambios conformacionales experimentados por las biomoléculas a lo largo del proceso de μ CP pueden ocasionar una desnaturalización irreversible. Los resultados muestran que los paratopos de los anticuerpos son especialmente proclives a experimentar este efecto indeseado. Una solución a esta limitación consiste en fabricar primero el biograting con proteínas de relleno, y luego inmovilizar los anticuerpos en los *gaps* a través de incubación directa.¹⁰

Mediante μ CP, se fabrican biogratings en los que las proteínas se inmovilizan por adsorción pasiva o fisisorción. Esta es una estrategia simple y versátil, pero algunas proteínas inmovilizadas por fisisorción tienden a desorberse de la superficie. En estos casos, μ CP se puede combinar con distintas químicas para anclar covalentemente las proteínas a la superficie. En un estudio reciente, hemos comparado y puesto a punto la creación de patrones de proteínas mediante μ CP combinada con anclaje covalente (acoplamiento de iminas y reacción tiol-eno).¹¹ Esta combinación resuelve los problemas de desorción y permite obtener biogratings con prestaciones analíticas equivalentes a las de la inmovilización por fisisorción.

Alternativamente a μ CP, hemos desarrollado una nueva técnica para nanoestructurar biocapas, útil también para fabricar biogratings. Esta estrategia se basa en la desnaturalización local y periódica de capas de proteínas mediante irradiación UV.¹² Para ello, se preparan primero capas continuas de proteínas sobre un sustrato sólido. A continuación, se irradian con un láser UV a través de una máscara de fase que genera un patrón de interferencias constructivas y destructivas (Figura 2B). Los grupos aromáticos de los aminoácidos de las cadenas laterales de las proteínas de la biocapa, absorben la radiación UV, y esta excitación es capaz de romper los puentes disulfuro de su estructura, dando lugar a una desnaturalización irreversible.^{13,14} Los resultados de este estudio demuestran la viabilidad de este método a través de biogratings constituidos por *strips* de proteína activa (capaz de ser reconocida por anticuerpos) y *gaps* de proteína desnaturalizada. Además, se pueden nanoestructurar áreas grandes de biocapas de forma rápida (unos 20 mm² en 2 min), homogénea, reproducible, y escalable.¹²

Transducción

Nuestro interés en crear biogratings reside en que son capaces de aprovechar la difracción de la luz para transformar eventos de biorreconocimiento en señales analíticas medibles. Es decir, su utilidad como transductores difractivos para biosensado óptico.

Una de las maneras en la que se manifiesta la difracción, es cuando un haz láser incide sobre una red periódica de elementos que interacciona con la luz. Si el periodo de la red y la longitud de onda de la luz cumplen con las condiciones de Bragg,¹⁵ el haz incidente se divide en varios haces secundarios llamados órdenes de difracción, que emergen de la red en ángulos diferentes al de incidencia (Figura 3A). Cuanto mayor es la perturbación óptica que introducen los elementos que constituyen la red, mayor es la cantidad de energía que se distribuye en los órdenes difractados. La relación entre la intensidad total del haz láser y la intensidad de los órdenes difractados se conoce como eficiencia de difracción.

Así pues, diseñamos los biogratings para que sean capaces de difractar haces láser incidentes. El índice de refracción de los *strips* de biomoléculas inmovilizadas (entre 1,35 y 1,6) es diferente al de los *gaps* (1 en aire y 1,33 en agua).¹⁶ Cuanto mayor sea la diferencia de índice de refracción entre *strips* y *gaps*, mayor es su eficiencia de difracción.^{9-11,17} En una configuración típica, los *strips* de proteínas inmovilizadas tienen una altura media de entre 1 y 10 nm, y los órdenes difractados presentan eficiencias de difracción del orden de 10⁻⁵ %. Cuando las proteínas inmovilizadas se unen a sus analitos, la cantidad de materia que constituye los *strips* aumenta, lo que amplifica la diferencia de índice de refracción entre *strips* y *gaps*, e incrementa la eficiencia de difracción (Figura 3A). Este fenómeno permite cuantificar eventos de biorreconocimiento a través de la intensidad de los órdenes difractados.

Un aspecto remarcable de este modo de transducción es que permite detectar la biointeracción analito-sonda sin marcaje (*label-free*). Es decir, los eventos de biorreconocimiento generan por sí mismos señales medibles, sin necesidad de utilizar biomoléculas conjugadas a marcadores (fluoróforos, nanopartículas, enzimas, etc.). Entre otras ventajas, la detección sin marcaje simplifica el procedimiento analítico y mejora la fiabilidad de los resultados.¹⁸ Por otro lado, cabe resaltar que el registro de la señal analítica de biogratings puede llevarse a cabo con montajes

ópticos simples y compactos, que pueden utilizar punteros láser y fotodetectores comerciales. En esta línea, cabe destacar el desarrollo de un sistema de biosensado basado en discos compactos como soportes para biogratings y lectores de disco como escáneres para registrar automáticamente su respuesta analítica.¹⁷

Tras incubar las muestras, la intensidad de los órdenes difractados de un biograting se puede medir por transmisión (Figura 3A), por reflexión, o por reflexión total interna.⁹ El montaje óptico para las dos primeras

estos nanomateriales se propaga por la superficie e interactúa con el biograting, generando un pico en el espectro de reflexión cuya intensidad depende de la magnitud del ensayo de biorreconocimiento. En un primer estudio hemos demostrado el concepto de este sistema que utiliza biogratings proteicos fabricados sobre fibras ópticas micrométricas.⁸ Esta estrategia introduce perspectivas prometedoras hacia el desarrollo de biosensores difractivos miniaturizados para el análisis simultáneo de multitud de analitos en un volumen reducido de muestra.

Ensayos de biorreconocimiento

En nuestros trabajos con biogratings recurrimos al sistema modelo de inmunoensayo basado en albúmina de suero bovino (BSA) junto con anticuerpos específicos antiBSA.^{8,9,12,17} Este es un sistema representativo en biosensado, útil para estudios de demostración de concepto, así como para comparar los resultados obtenidos con otros trabajos del estado del arte. Para implementar este ensayo, primero se fabrican biogratings de BSA, sobre los que se incuban muestras que contienen anticuerpos antiBSA en disolución. Al unirse los anticuerpos a la BSA inmovilizada se incrementa la cantidad de materia que constituye el biograting y ello aumenta la eficiencia de difracción. Con este ensayo se obtienen curvas dosis-respuesta bien correlacionadas, como la que se muestra en la Figura 4A. En función de la configuración estudiada, se han obtenido experimentalmente límites de detección entre 30 y 100 ng·mL⁻¹, y límites de cuantificación entre 70 y 400 ng·mL⁻¹ de anticuerpo, sin marcaje.

Hemos estudiado también la implementación en biogratings de inmunoensayos basados en el reconocimiento entre anticuerpos.¹⁰ En particular, nos centramos en anticuerpos policlonales de conejo e IgGs anticonejo producidas en cabra. Los resultados muestran que, a diferencia de la BSA, los anticuerpos tienden a desnaturalizarse, debiendo tenerse en cuenta en su estructuración como biogratings. Como un paso más hacia el análisis de biomarcadores, el estudio también desarrolla biogratings para la detección de inmunoglobulinas E humanas, cuya sensibilidad alcanza los niveles de IgE asociadas a respuestas alérgicas altas.¹⁰

En otro desarrollo, hemos fabricado biogratings de alérgenos presentes en leche de vaca y los hemos utilizado para determinar la concentración de anticuerpos específicos anti-alérgeno.⁸ En particular, el desarrollo se enfoca a caseína, BSA, y

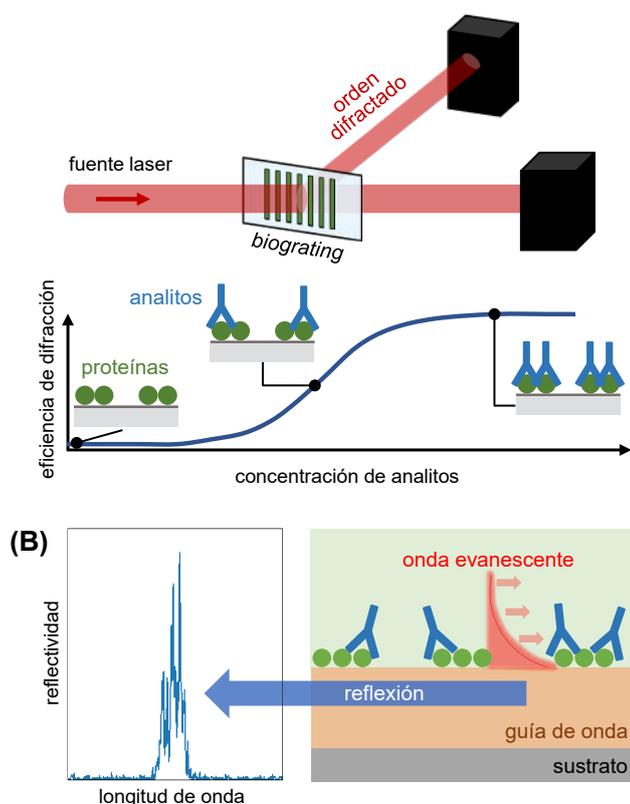


Figura 3. Esquema general de la transducción bioanalítica (A) a través de los órdenes difractados de un biograting fabricado sobre un sustrato plano, y (B) a través del pico de reflexión generado por biogratings sobre guías de onda.

es más simple, mientras que las medidas por reflexión total interna permiten monitorizar los ensayos de biorreconocimiento a tiempo real, lo que supone una ventaja importante en algunos escenarios.⁹

Una vía alternativa de registrar la respuesta óptica de biogratings es mediante lo que hemos denominado “bio Bragg gratings”.⁸ Como se muestra en la Figura 3B, esta técnica consiste en utilizar biogratings fabricados sobre la superficie de guías de onda. Parte de la radiación guiada por

β -lactoglobulina, y alcanza límites de detección en el intervalo de 30-45 ng·mL⁻¹ de IgGs específicas.

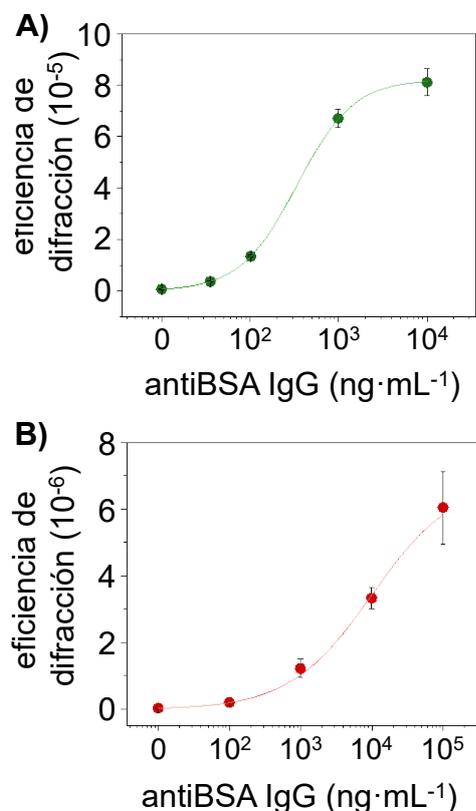


Figura 4. (A) Ejemplo de curva dosis-respuesta obtenida al incubar diferentes concentraciones de antiBSA sobre biogratings de BSA, en tampón. (B) Curva dosis-respuesta para el sistema modelo BSA/antiBSA en suero humano puro.

Por otro lado, hemos demostrado la aplicabilidad de los biogratings en inmunoensayos competitivos para la determinación de moléculas orgánicas de masa molecular reducida.⁹ Estas moléculas son demasiado pequeñas como para generar cambios ópticos medibles cuando se unen a los biorreceptores que conforman el biograting. Para su determinación, recurrimos a fabricar biogratings de conjugado proteína-hapteno. Es decir, biogratings de proteínas unidas a una molécula estructuralmente similar al analito de interés. En este trabajo nos centramos en la determinación de atrazina, una molécula pequeña (215,68 g·mol⁻¹) utilizada como herbicida. Para ello, fabricamos biogratings de conjugado BSA-2a e incubamos sobre ellos un antisuero antiatrazina, para que las IgGs específicas se unan a los haptenos 2a inmovilizados. Al incubar las muestras, los anticuerpos se desprenden del biograting para unirse a las moléculas de analito en disolución, generando así una caída en la eficiencia de difracción. Como resultado, la concentración de atrazina puede cuantificarse a partir de la disminución de intensidad de los órdenes difractados. Esta investigación estudia el análisis en

zumo de manzana, y reporta un límite de detección de 1.1 ng·mL⁻¹ de atrazina⁹.

Uno de los aspectos más interesantes de los biogratings es su capacidad de minimizar los efectos indeseados de la adsorción inespecífica en el análisis de muestras complejas. Estas muestras suelen contener concentraciones bajas de analito y concentraciones altas de multitud de interferentes que tienden a adsorberse inespecíficamente sobre la superficie de sensado. En la mayoría de sistemas sin marcaje, esta acumulación de materia en el transductor genera señales que no pueden ser diferenciadas de las que provienen del ensayo.¹⁹

A diferencia de las reacciones de biorreconocimiento, la adsorción inespecífica sobre superficies es un proceso que sigue una distribución aleatoria. Si los biogratings se diseñan convenientemente, se puede conseguir que la adsorción inespecífica tenga lugar de forma uniforme en los *strips* y en los *gaps*. Con ello, la adsorción inespecífica de interferentes sobre biogratings no modifica la diferencia de índice de refracción entre *strips* y *gaps*, por lo que no afecta a la eficiencia de difracción, y la señal óptica registrada se debe únicamente a la acumulación de materia en los *strips* fruto de la unión específica de los analitos a los bioreceptores inmovilizados.^{12,19,20} Nuestros resultados han revelado que es posible determinar directamente IgGs específicas de suero humano, sin marcaje y sin tratamiento previo de muestra, y obtener curvas dosis-respuesta bien correlacionadas con un límite de detección de 36 ng·mL⁻¹.¹²

Conclusiones

Los biogratings son nanoestructuras difractivas de macromoléculas con gran potencial como transductores ópticos para análisis químico. Además de permitir la detección sin marcaje y en tiempo real, una de las características más interesantes de los biogratings es su capacidad de resolver problemas de adsorción inespecífica en el análisis de muestras complejas, siendo una herramienta analítica muy prometedora. Nuestros estudios revelan que estas nanoestructuras son fáciles de fabricar, escalables, y efectivas en diferentes configuraciones y protocolos de ensayo, alcanzando límites de detección del orden de decenas de ng·mL⁻¹. Los biogratings abren oportunidades de investigación interesantes en la interfase entre la química, biología, óptica y nanotecnología, que introducen nuevas soluciones analíticas. Nuestros siguientes pasos en esta línea se centran en estudiar las posibilidades de estos biosensores difractivos en otras aplicaciones y escenarios, en expandir su rendimiento analítico, y en materializar su implementación en dispositivos biosensores. Además, la integración de biogratings en guías de onda ofrece posibilidades prometedoras para desarrollar sistemas miniaturizados para la determinación simultánea de múltiples analitos en muestras complejas.

Agradecimientos

Esta publicación es parte del proyecto de I+D+i PID2019-110713RB-I00 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y “FEDER Una manera de hacer Europa”, y del proyecto PROMETEO/2020/094 financiado por la Generalitat Valenciana. Financiado con Ayuda a Primeros Proyectos de Investigación (PAID-06-22), Vicerrectorado de Investigación de la Universitat Politècnica de València (UPV).

Referencias

- (1) Ghorbani, F.; Abbaszadeh, H.; Mehdizadeh, A.; Ebrahimi-Warkiani, M.; Rashidi, M.-R.; Yousefi, M. Biosensors and Nanobiosensors for Rapid Detection of Autoimmune Diseases: A Review. *Microchim. Acta* **2019**, *186* (12), 838.
- (2) Sharifi, M.; Hosseinali, S. H.; Hossein Alizadeh, R.; Hasan, A.; Attar, F.; Salihi, A.; Shekha, M. S.; Amen, K. M.; Aziz, F. M.; Saboury, A. A.; Akhtari, K.; Taghizadeh, A.; Hooshmand, N.; El-Sayed, M. A.; Falahati, M. Plasmonic and Chiroplasmonic Nanobiosensors Based on Gold Nanoparticles. *Talanta* **2020**, *212*, 120782.
- (3) 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.
- (4) Sancho-Fornes, G.; Avella-Oliver, M.; Carrascosa, J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Interferometric Multilayered Nanomaterials for Imaging Unlabeled Biorecognition Events. *Sensors Actuators, B Chem.* **2021**, *331*, 129289.
- (5) 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. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, *252*, 657–662.
- (6) Lucío, M. I.; Montoto, A. H.; Fernández, E.; Alamri, S.; Kunze, T.; Bañuls, M.-J.; Maquieira, Á. Label-Free Detection of C-Reactive Protein Using Bioresponsive Hydrogel-Based Surface Relief Diffraction Gratings. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *193* (2), 113561.
- (7) Lamping, S.; Buten, C.; Ravoo, B. J. Functionalization and Patterning of Self-Assembled Monolayers and Polymer Brushes Using Microcontact Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52* (5), 1336–1346.
- (8) Juste-Dolz, A.; Delgado-Pinar, M.; Avella-Oliver, M.; Fernández, E.; Pastor, D.; Andrés, M. V.; Maquieira, Á. BIO Bragg Gratings on Microfibers for Label-Free Biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *176*, 112916.
- (9) Avella-Oliver, M.; Ferrando, V.; Monsoriu, J. A.; Puchades, R.; Maquieira, A. A Label-Free Diffraction-Based Sensing Displacement Immunosensor to Quantify Low Molecular Weight Organic Compounds. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1033*, 173–179.
- (10) Juste-Dolz, A.; Avella-Oliver, M.; Puchades, R.; Maquieira, A. Indirect Microcontact Printing to Create Functional Patterns of Physisorbed Antibodies. *Sensors (Switzerland)* **2018**, *18* (9).
- (11) Juste-Dolz, A.; Fernández, E.; Puchades, R.; Avella-Oliver, M.; Maquieira, Á. Patterned Biolayers of Protein Antigens for Label-Free Biosensing in Cow Milk Allergy. *Biosensors* **2023**, *13* (2), 214.
- (12) Juste-Dolz, A.; Delgado-Pinar, M.; Avella-Oliver, M.; Fernández, E.; Cruz, J. L.; Andrés, M. V.; Maquieira, Á. Denaturing for Nanoarchitectonics: Local and Periodic UV-Laser Photodeactivation of Protein Biolayers to Create Functional Patterns for Biosensing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14* (36), 41640–41648.
- (13) Correia, M.; Snabe, T.; Thiagarajan, V.; Petersen, S. B.; Campos, S. R. R.; Baptista, A. M.; Neves-Petersen, M. T. Correction: Photonic Activation of Plasminogen Induced by Low Dose UVB. *PLoS One* **2015**, *10* (12), e0144794.
- (14) Heinz, W. F.; Hoh, M.; Hoh, J. H. Laser Inactivation Protein Patterning of Cell Culture Microenvironments. *Lab Chip* **2011**, *11* (19), 3336.
- (15) Neipp, C. Thin and Thick Diffraction Gratings: Thin Matrix Decomposition Method. *Optik (Stuttg.)* **2004**, *115* (9), 385–392.
- (16) Vörös, J. The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers. *Biophys. J.* **2004**, *87* (1), 553–561.
- (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* (17), 9002–9008.
- (18) Kussrow, A.; Enders, C. S.; Bornhop, D. J. Interferometric Methods for Label-Free Molecular Interaction Studies. *Analytical Chemistry*. January 17, 2012, pp 779–792.
- (19) Frutiger, A.; Tanno, A.; Hwu, S.; Tiefenauer, R. F.; Vörös, J.; Nakatsuka, N. Nonspecific Binding—Fundamental Concepts and Consequences for Biosensing Applications. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (13), 8095–8160.
- (20) 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* (11), 1089–1095.