

Introducció als biosensors òptics integrats

Sílvia Soria,* Anisha Thayil K. N.† i Gonçal Badenes‡

Introducció

El camp dels biosensors, sensors químics i bioquímics s'ha convertit en un camp de gran interès a causa principalment de la necessitat de fer diagnòstics mèdics acurats i de manera ràpida, així com, aquests darrers anys, a causa de l'alarma social creada per l'ús d'anabolitzants en granges d'animals destinats al consum humà i del dopatge d'atletes d'alta competició. El mercat dels biosensors creix any rere any molt significativament, de 113,5 milions de dòlars el 1997 a 197,6 milions de dòlars el 2004. Aquest augment és degut als molts exemples de sensors bioquímics que s'han desenvolupat en els darrers quaranta anys, malgrat que molt pocs han estat un èxit comercial.

Els biosensors són capaços de fer un monitoratge continu i d'informar en temps real sobre els canvis de les espècies químiques, biològiques o microorganismes a estudiar. Així doncs, tenen un ampli rang d'aplicacions: diagnòstic mèdic, desenvolupament de fàrmacs, monitoratge mediambiental (aire, aigua i sòl), control de qualitat alimentari, genòmica, i proteòmica, entre d'altres. El sensor ideal hauria de tenir la sensibilitat adequada (en alguns casos a escala unimolecular) i tenir un rang dinàmic ampli, una elevada afinitat per les espècies d'interès i estar lliure d'interferències. També s'hauria d'afegir la possibilitat de poder mesurar multicomponents, tenir una resposta ràpida i reversible i ser estables a llarg termini. A més a més, hauria de ser robust, barat, senzill, miniaturitzat i amb possibilitats d'autocalibratge.

El mètode de transducció físic pot ser electroquímico, mecànic, tèrmic o òptic. Els transductors electroquímics poden ser dispositius amperomètrics, potenciomètrics o conductimètrics. Els amperomètrics mesuren el corrent elèctric per a un potencial constant, normalment utilitzen elèctrodes coberts d'enzims que catalitzen una reacció química redox, amb la qual cosa s'obté així un cor-

rent mesurable. Els potenciomètrics mesuren els canvis de potencial per a corrent constant (normalment zero). El potencial mesurat és una relació logarítmica de l'activitat de l'ió la presència del qual es vol detectar. Els conductimètrics mesuren els canvis en la conductivitat de la solució que s'estudia, quan una reacció enzimàtica genera un canvi net en les concentracions d'algunes espècies ionitzades. Tot i que la transducció conductimètrica promet molt per a determinats analits, com ara la urea, s'ha de tenir molta cura amb la reproductibilitat en matrius biològiques complexes, ja que hi pot haver variacions internes del pH, de la composició iònica i de la capacitat del tampó. Independentment del tipus de transducció electroquímica, els canvis en l'ambient de la mostra que es vol estudiar són essencialment hostils a aquests dispositius.

Els sensors mecànics utilitzen cristalls piezoelèctrics (per exemple el quars) que es caracteritzen pel fet d'oscillar a una freqüència particular quan se'ls aplica un camp elèctric. La freqüència de la massa en la superfície de l'oscil·lador decreix quan s'augmenta la massa en la seva superfície. Sovint s'anomenen *microbalances de cristall de quars* (QCM de l'anglès *quartz crystal microbalance*). El major desavantatge de les QCM és la seva no-especificitat inherent, deguda a l'absorció anòmala que fa la capa sensora.

Els calorimètrics mesuren els canvis de temperatura que es donen en les reaccions d'afinitat, que són exotèrmiques. S'utilitzen més per a l'anàlisi d'afinitats d'enllaç que com a biosensors.

Finalment, els *biosensors òptics*, en els quals ens centrarem en aquest article, són aquells que utilitzen tècniques òptiques per detectar i identificar espècies químiques, biològiques o microorganismes. Entre els nombrosos avantatges que ofereixen podríem mencionar: la possibilitat de mesurar a distància amb selectivitat i especificitat elevades, l'ús d'esquemes de reconeixement biològic únics, mesures ràpides i en temps real, detecció de més d'un component simultàniament, disseny compacte, invasivitat mínima en mesures *in vivo*, i el fet d'estar lliures d'interferències electromagnètiques.

Els dos elements més importants en un biosensor són *a)* l'element biològic de reconeixement que serveix per detectar l'analit (les espècies químiques o biològiques) i *b)* el mecanisme de transducció que, un cop fet el reconeixement, converteix la resposta física i química en un

***Sílvia Soria** (l'Hospitalet, 1970) és doctora en Física per la Universitat de Barcelona (1999) i actualment és investigadora del programa Ramón y Cajal de l'Institut de Ciències Fotòniques (ICFO).

†**Anisha Thayil K.N.** (Índia, 1978) és llicenciada en Física per la Cochin University of Science and Technology (2001) i actualment és becària de l'àrea nanofotònica a l'Institut de Ciències Fotòniques (ICFO).

‡**Gonçal Badenes** (Sabadell, 1965) és doctor en Física per la Universitat Autònoma de Barcelona (1993) i actualment és professor i cap de grup de l'àrea de nanofotònica a l'ICFO.

senyal òptic. Un aspecte molt important en un biosensor és la immobilització de l'element biològic de reconeixement per augmentar-ne la concentració local en la zona sensoria. A grans trets, un sistema biosensor funciona de la manera següent: primer una unitat de mostreig posa en contacte l'analit amb l'element de reconeixement, que pot ser un enzim, un anticòs o fins i tot cèl·lules com ara el llevat o bacteris. Aquest element de reconeixement s'enllaça o reacciona de manera específica amb l'analit. El sensor s'estimula òpticament. Finalment, el procés de transducció induïx un canvi de fase, d'amplitud, de polarització o de freqüència de la llum incident en resposta al canvi físic o químic produït pel procés de reconeixement biològic. Els biosensors òptics també poden utilitzar estimulació elèctrica i una transducció òptica (per exemple, els sensors electroluminiscents) o una estimulació òptica i una transducció elèctrica (per exemple, un sensor fotovoltaic).

Els biosensors òptics poden treballar en *detecció directa*, en què es mesuren les propietats espectrals de l'analit, o en *detecció indirecta*, en què s'utilitza un reagent auxiliar. Aquest reagent auxiliar canvia una propietat òptica, per exemple, la dispersió elàstica o inelàstica, el camí òptic, l'absorció, la luminescència (ja sigui la intensitat o el temps de vida), o la polarització.

Aquests últims anys s'han desenvolupat una gran varietat de biosensors òptics, entre els quals trobem fibres òptiques, fibres fotòniques, microcavitats, ressonàncies de plasmons superficials (SPR), interferòmetres i guies d'ones planes. Aquests transductors ofereixen un ampli rang d'aplicacions amb gran sensibilitat.

També es poden distingir els sensors segons siguin extrínsecs o intrínsecs. Els sensors extrínsecs permeten que la llum surti fora del transductor mentre que els sensors intrínsecs modulen la llum en resposta a l'analit mentre és dins del transductor. En els intrínsecs, el transductor és una part integral del sensor (ja sigui refractomètric o espectroscòpic) mentre que en els extrínsecs és una unió entre la llum i el sistema de reconeixement. En principi els sensors intrínsecs són més estables i més flexibles.

Així doncs, els components principals d'un biosensor òptic són: *a)* una font de llum, *b)* un medi transmissor òptic (guia d'ona, plasmons, etc.), *c)* un element de reconeixement immobilitzat (enzims, anticossos, microbis), *d)* marcadors òptics com ara elements fluorescents (en el cas de *detecció indirecta*) i *e)* un sistema de detecció òptic.

En aquest article descriurem els principis bàsics dels biosensors òptics i definirem els diferents tipus d'anticossos utilitzats en un biosensor immunològic. Després descriurem alguns tipus de biosensors òptics, tots a nivell de laboratori. Ens basarem sobretot en biosensors l'element transductor dels quals sigui una guia d'ona plana o variacions d'aquestes per a la detecció de components

immunològics. Finalment, donarem alguns exemples de línies futures en aquest camp de recerca i desenvolupament.

Principis bàsics dels biosensors òptics

Els dos principis més importants en un biosensor òptic són el reconeixement biològic i la transducció òptica. Els elements per al reconeixement biològic són materials biològics com ara els enzims, els anticossos, les cèl·lules i els microorganismes que reconeixen selectivament un analit. Sovint estan immobilitzats per tal d'augmentar la seva concentració local a prop del transductor. En aquest article ens centrarem en els anticossos, ja que els biosensors basats en reaccions immunològiques són els més utilitzats en la detecció i quantificació de biomolècules en diagnòstic clínic, d'aliments i mediambiental. És una tècnica que es va establir ara fa cinquanta anys i que aprofita l'elevada afinitat entre els anticossos i els seus antígens corresponents per detectar-ne la presència en la solució que s'analitza. Els antígens que es volen detectar poden ser virus, bacteris o parts d'ells, toxines o qualsevol altra molècula orgànica o inorgànica que és antigènica, és a dir, que crea una resposta immunològica i que per tant, es pot reconèixer amb un anticòs.

Aquesta tècnica permet desenvolupar una reacció immunològica contra qualsevol tipus de molècula blanc, fins i tot si es troba en concentracions molt baixes i en matrius biològiques complexes com ara la sang, el sèrum i altres fluids biològics, menjar, begudes o aigües residuals.

Els anticossos i la interacció immunològica

Els anticossos són proteïnes sintetitzades per les cèl·lules del plasma, per exemple limfòcits B madurs, en animals en resposta a la presència d'una substància aliena, anomenada *antigen*. Hi ha cinc classes diferents d'immunoglobulines (G, A, M, D i E) i es diferencien en les regions constants de les cadenes pesants. La immunoglobulina G (IgG), també coneguda com a γ -globulina, té una massa de 150 kDa i és el principal anticòs en el sèrum.

L'estructura d'un anticòs, generalment representat com l'estructura d'una IgG, té dues cadenes pesants i dues de lleugeres, cada una d'elles conté diferents dominis, unides a través d'enllaços disulfídics. Cada cadena, ja sigui lleugera o pesant, es compon d'una regió variable i una de constant. Cada regió variable inclou tres segments hipervariables que varien d'un anticòs a un altre. L'especificitat d'un anticòs per un antigen ve donada per les regions variables de les cadenes pesants i lleugeres (figura 1)

L'anticòs té una afinitat i una especificitat molt elevada pel seu antigen gràcies a la seva complementarietat molecular. Aquesta compatibilitat conformacional es pot representar com un pany (l'anticòs) i una clau (l'antigen). Aquesta associació física produeix una res-

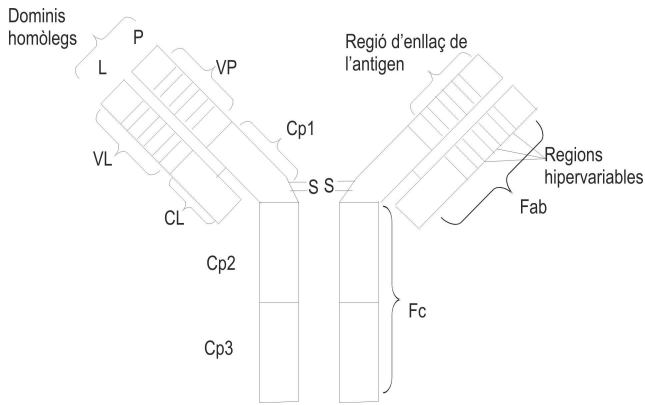


Figura 1: Estructura simplificada d'un anticòs, representada com una IgG. P: cadena pesant, L: cadena lleugera, V: part variable, C: part constant, F: fragment, Ab: anticòs

posta òptica que pot ser intrínseca, per exemple un canvi de les propietats òptiques de l'anticòs o de l'antigen, o extrínseca, unint un marcador fluorescent ja sigui a l'anticòs o a l'antigen.

Principis òptics bàsics

La transducció òptica creada per l'element de reconeixement en presència d'un analit és molt variada. Les més utilitzades per als biosensors són les que mesuren: *canvis de fase* deguts al canvi de la part real de l'índex de refracció; *canvis d'amplitud* deguts a l'absorció, reflexió o altres mecanismes de pèrdua en la transmissió i *canvis de freqüència*:

- fluorescència amb un fotó on el senyal òptic generat és degut a un desplaçament de Stokes en la freqüència d'excitació,
- Raman, que també és un desplaçament de Stokes però degut a una excitació vibracional, i
- desplaçament de freqüència degut a una interacció no lineal com ara la generació de segon harmònic i la fluorescència a dos fotons. Mentre els canvis de fase i d'amplitud són sempre mètodes directes, els canvis de freqüència poden ser directes, quan es generen elements fluorescents com a resultat de l'enllaç entre l'analit i l'element de reconeixement, i indirectes, quan es conjuga un marcador fluorescent a l'analit o a l'element de reconeixement. Aquests diferents mètodes estan resumits a la figura 2.

Mètode directe: canvis de fase

Les guies d'ones planes presenten superfícies d'interacció molt grans on es poden immobilitzar els elements de reconeixement. Un dels avantatges de les guies d'ones planes és que es poden immobilitzar múltiples elements de reconeixement en la seva superfície, cosa que permet permetent la detecció de multianalits en un sol dispositiu sensor. Les guies d'ona són transparents, estan fetes

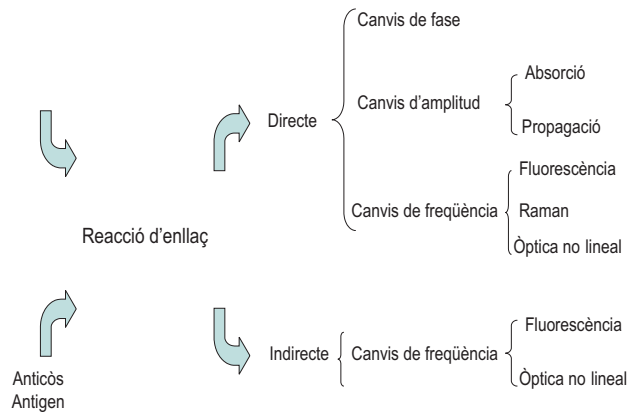


Figura 2: Transducció òptica utilitzada en els biosensors immunològics. És també vàlida en altres biosensors

amb materials dielèctrics o polimèrics amb gruixos que poden oscil·lar entre els 100 nm i les 10 micres. El gruix de les capes formades pels bioreceptors immobilitzats oscil·la entre 4 i 600 nm.

Si la llum que es propaga dins d'una guia d'ona d'índex de refracció n_1 incideix amb un angle θ relatiu a la superfície de la guia d'ona i és més gran que l'angle de reflexió crítica (definit per la llei de Snell), la llum es troba en condició de reflexió total interna i, per tant, està confinada dins de la guia d'ona (figura 3). Això no implica que fora de la guia d'ona no hi hagi un camp electromagnètic; de fet, el camp de l'ona guiada es propaga en l'interior i penetra en forma d'ona evanescent una petita distància Δz en el medi que es troba a la superfície de la guia d'ona. Aquesta ona evanescent decau de manera exponencial i és proporcional a $\exp(-z/\Delta z)$. Les propietats físiques i característiques de la guia d'ona i del medi que l'envolta (capa d'elements de reconeixement, solució amb l'analit, etc.) defineixen la longitud de penetració del camp evanescent els valors típics del qual es troben entre 50 i 500 nm. Per a un biosensor de guia d'ona concret, només una determinada longitud d'ona i uns determinats modes estan permesos, i per a cada mode hi ha un sol angle θ . Cada un d'aquests modes té una part del total de la intensitat emmagatzemada en el camp evanescent.

Una guia d'ona es caracteritza per la seva constant de propagació (o índex de refracció efectiu) β que determina la longitud de penetració del camp evanescent; β depèn de la polarització, del número de mode m , de la longitud d'ona de la llum incident λ i de les característiques de la capa que fa de guia: del seu gruix d i del seu índex de refracció n_1 i dels índexs de refracció del substrat n_3 i del medi biològic n_2 . Així doncs, si tenim l'anticòs apropiat immobilitzat a la superfície de la guia d'ona, quan el seu antigen entri en contacte amb l'anticòs tindrà lloc la reacció immunològica desitjada que

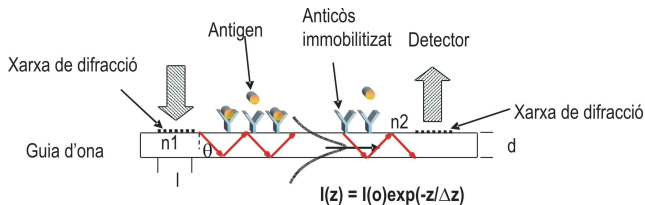


Figura 3: Biosensor basat en una guia d'ona plana. La llum incident es propaga dins de la guia d'ona amb índex de refracció n_1 amb un angle d'acoblament θ . $I(z)$: intensitat del camp evanescent, n_2 : índex de refracció del medi biològic, d : gruix de la guia d'ona, l : longitud de la xarxa de difracció que acobla la llum incident a la guia d'ona. Quan es produeix la reacció immunològica n_2 canvia, i condiciona les propietats de la propagació de llum dins de la guia

induirà un canvi en l'índex de refracció n_2 . Aquest canvi induirà al seu torn un canvi en la constant de propagació β que serà detectat pel camp evanescent. Aquest és l'efecte sensor bàsic o primari en què es basen tots els sensors de camp evanescent.

La condició que s'ha de complir per tal que hi hagi un mode guiat és que $\beta > n_2, n_3$. La longitud de penetració Δz depèn de la constant de penetració de la manera següent:

$$\Delta z \equiv \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\beta^2 - n_2^2},$$

on $\beta = kn_1 \cos \theta$, i k és el vector d'ona $2\pi/\lambda$.

Els sensors que utilitzen aquesta transducció òptica tenen com a principal característica una sensibilitat superficial inherent. Els canvis en el volum de la solució amb els analits difícilment afectaran el rendiment del sensor. Una ona evanescent permet la detecció directa de les propietats físiques, on la sensibilitat del sensor ve determinada per les dimensions moleculars i la diferència de l'índex de refracció entre l'antigen i l'anticòs.

Un dels aspectes més crítics en els biosensors basats en guies d'ona plana i en general en detecció del camp evanescent és l'acoblament de la llum dins de la guia d'ona. Entre els molts tipus d'acoblament descrits en la bibliografia trobem els prismes, *endface* i xarxes de difracció. Les configuracions amb xarxes de difracció poden ser de dos tipus: una amb una xarxa a un extrem de la guia per acoblar la llum a dins i una altra a l'altre extrem per desacoblar la llum cap a fora (esquema utilitzat per la companyia suïssa Zeptosens AG) amb sensibilitats al voltant d'1 nM; i la segona tindria la xarxa de difracció estesa a una de les superfícies de la guia d'ona i serviria per acoblar i desacoblar la llum simultàniament (esquema utilitzat per la companyia hongaresa Microvacuum Ltd). En aquest cas la condició d'acoblament en la guia d'ona es modifica de la manera següent:

$$n_2 k \sin \phi + mK = \beta,$$

on $K = 2\pi/\Lambda$, Λ és el període de la xarxa de difracció i ϕ l'angle incident que forma l'ona plana amb la superfície de la xarxa de difracció. La sensibilitat d'aquest biosensor té un rang molt ampli, d'1 mM a 1 nM.

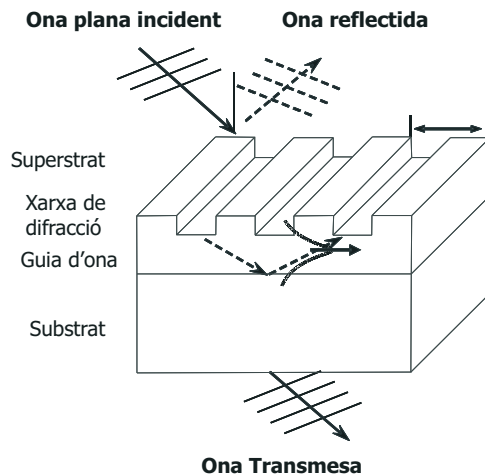


Figura 4: Esbós d'una GWS. La xarxa de difracció acobla part de l'ona incident dins de la guia d'ona i presenta alhora una reflexió anòmala. Quan una reacció immunològica té lloc a la superfície de la GWS, la longitud d'ona ressonant es desplaça cap al vermell

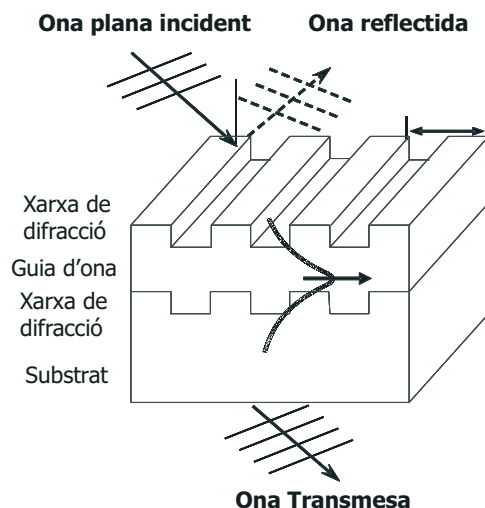


Figura 5: Esbós d'una DGWS. Les xarxes de difracció sumen les seves ressonàncies, de manera que cada xarxa contribueix al fenomen ressonant de manera independent. Quan una reacció immunològica té lloc a la superfície de la GWS, la longitud d'ona ressonant es desplaça cap al vermell

Les xarxes de difracció poden ser dissenyades de manera que presentin un fenomen que s'anomena *reflexió anòmala*. El terme *anòmal* es refereix a la variació ràpida dels camps òptics externament observables respecte a paràmetres físics com ara la longitud d'ona o l'angle d'incidència de l'ona incident. La reflexió anòmala va ser estudiada i descoberta per primer cop el 1902 per

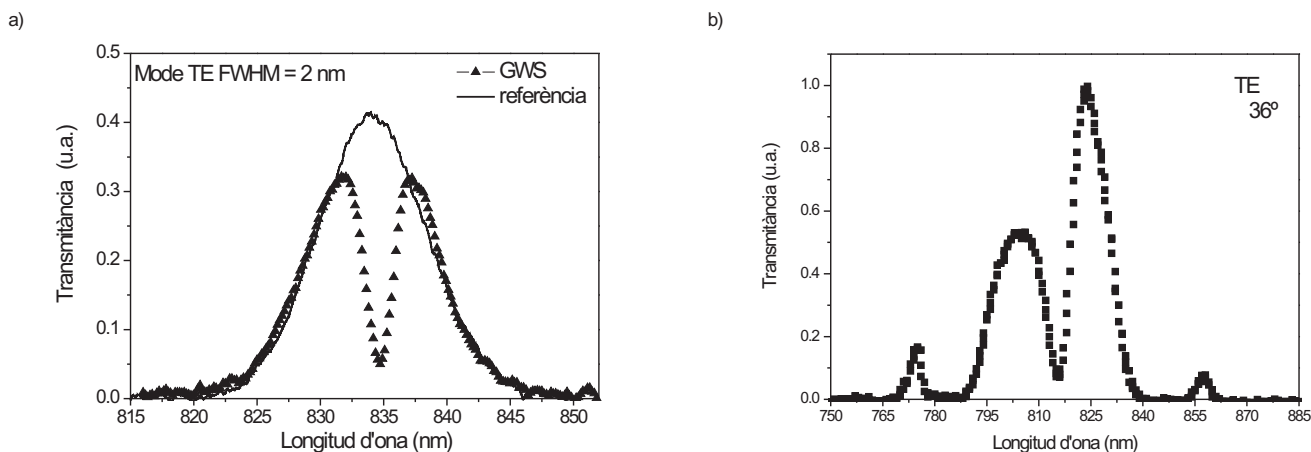


Figura 6: Corbes de ressonància d'una GWS i una DGWS. a) Triangles: corba de ressonància de la GWS, línia: impuls del làser incident (Ti:Safir, 150 fs, 76 MHz, $\Delta \lambda = 8$ nm), a incidència normal; b) corba de ressonància de la DGWS a un angle d'incidència de 36°

R. W. Wood i després per Lord Rayleigh el 1907. Aquesta anomalia és deguda al fet que un dels ordres espectrals apareix (o desapareix) a l'angle límit (*grazing angle*) i es propaga al llarg de la superfície. També hi ha, però, l'anomalia ressonant. Aquest fenomen de ressonància es caracteritza per reflectir gairebé al 100% la llum incident en la xarxa de difracció. Aquesta ressonància depèn dels factors geomètrics de la xarxa (període i profunditat) i de la modulació de l'índex de refracció n_1 . Així doncs, per a una xarxa donada tindrem que una determinada longitud d'ona incident a un determinat angle i amb una determinada polarització, es reflectirà totalment, mentre que per a altres combinacions la xarxa serà totalment transparent. La superfície de la xarxa es pot recobrir amb anticossos immobilitzats i, quan entrin en contacte amb l'antigen en solució, hi haurà un canvi en l'índex de refracció n_2 i en conseqüència la longitud d'ona ressonant es desplaçarà cap al vermell. Aquest biosensor està comercialitzat per la companyia americana SRU Biosystems i s'anomena també *biosensor colorimètric ressonant*.

Per tal d'augmentar-ne la sensibilitat, es poden combinar ambdues geometries, és a dir, un biosensor que contingui una guia d'ona i una xarxa de difracció ressonant. Aquests biosensors es coneixen amb el nom de GWS (de l'anglès *grating waveguide structure*) quan tenen una sola xarxa de difracció a sobre de la guia d'ona i DGWS (de l'anglès *double grating waveguide structure*) quan tenen dues xarxes de difracció, una a sobre i l'altre a sota de la guia d'ona. Aquests dispositius es mostren a les figures 4 i 5.

A la figura 6a es mostren les ressonàncies de la GWS per al mode TE (la polarització del camp elèctric és paral·lela a les línies de la xarxa de difracció)

en incidència normal. Aquesta GWS és ressonant per a $\lambda_{\text{res}} = 834$ nm amb una amplada de banda FWHM d'1,6 nm. A la figura 6b es mostren les ressonàncies de la DGWS per al mode TE amb un angle d'incidència de 36° . La longitud de ressonància és $\lambda_{\text{res}} = 815$ nm amb una amplada de banda FWHM de 4 nm.

A la figura 7 es mostren els resultats experimentals d'un enllaç biotina-estreptavidina utilitzant com a biosensor una GWS polimèrica. Sovint abans de donar pas a mesures amb sistemes biològics més complicats, s'utilitzen sistemes model que tinguin una elevada afinitat entre ells. Un d'aquests sistemes model és la biotina (vitamina H) i l'estreptavidina (variant de l'avidina, proteïna present a la clara d'ou). La ressonància de la GWS empitjora a causa del gruix de les capes biològiques que es formen en l'enllaç i de la precipitació de les sals contingudes en els dissolvents; tot i així es pot apreciar clarament el desplaçament de la longitud d'ona ressonant quan s'afegeix una capa d'estreptavidina a la capa de biotina immobilitzada a la superfície de la GWS.

Aquests tipus de biosensors poden estar fets de materials diferents, dielèctrics o polimèrics, com ara vidre de silici, poliestirè, Ta_2O_5 , poliamida, etc. Depenent del material utilitzat, s'haurà de triar una determinada reacció química per tal d'immobilitzar els anticossos en la superfície del sensor. Tal com ja hem mencionat al principi de l'apartat, el principal avantatge d'utilitzar biosensors basats en guies d'ona plana és la possibilitat de fer multicanals que permetin la detecció múltiple d'anàlits.

Mètode indirecte. Canvis de freqüència

Els biosensors que utilitzen tècniques d'immunofluorescència detecten *in situ* anticossos o antigens enllaçats a un marcador fluorescent. Els límits de detecció per

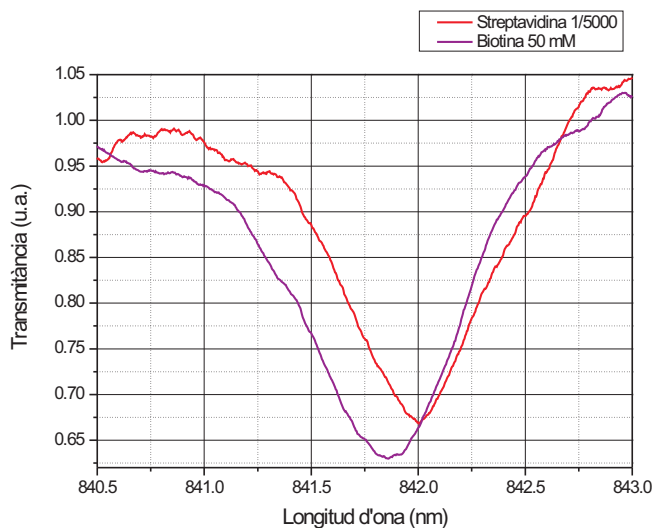


Figura 7: Corbes de ressonància d'una GWS. La corba de color lila és la corba de ressonància de la GWS amb una capa de biotina immobilitzada a la superfície. La corba vermella és la corba desplaçada un cop s'ha enllaçat l'estreptavidina a la biotina de forma covalent

aquests mètodes tendeixen a ser alts com a conseqüència de la fluorescència de fons, proximitat entre l'excitació i l'emissió i autofluorescència dels materials biològics. Els problemes de la fluorescència de fons es poden resoldre utilitzant biosensors que limitin el camp d'acció a la superfície. L'ona evanescent generada per les guies d'ona s'utilitza com a font d'excitació de les molècules fluorescents que estan a prop de la seva superfície. En aquest cas, la sensibilitat és més elevada, el límit de detecció baixa i augmenta així la raó senyal-soroll. Aquests biosensors, però, no seran insensibles a enllaços inespecífics si una molècula no específica que està marcada s'apropa a la superfície.

En els biosensors immunofluorescents hi ha tres configuracions estàndard: sandvitx, competitiva i indirecta (figura 8). En la configuració sandvitx mostrada a la figura 8, l'anticòs Ab està immobilitzat a la superfície i s'enllaça a l'antigen present a la mostra que s'ha d'analitzar. Un segon anticòs marcat amb un fluorocrom s'enllaça a l'altre extrem de l'antigen, la fluorescència que es mesura en aquest cas és proporcional a la quantitat d'antigen present a la mostra. En la configuració competitiva, l'anticòs marcat competeix amb un anticòs no marcat per enllaçar-se amb l'antigen immobilitzat a la superfície. En aquesta configuració, el senyal fluorescent mesurat és indirectament proporcional a la quantitat d'anticòs present a la mostra analitzada. En configuració indirecta, l'anticòs enllaçat a l'antigen es detecta a través de l'enllaç d'un anticòs secundari mar-

cat, així doncs, el senyal és proporcional a la quantitat d'analít, ja sigui l'antigen o l'anticòs, present a la mostra.

Un problema addicional a la reproductibilitat i a la manca de robustesa en biosensors basats en guies d'ona és la interferència encreuada deguda a efectes òptics de camp proper. En canvi en les GWS i DGWS, pràcticament no hi ha interferència encreuada. En ambdós casos la llum s'acobla i es desacobla sense propagar-se grans distàncies. Aquesta característica també fa que ambdós dispositius siguin més robustos, atenuacions o artefactes com ara ratllades són menys crítiques ja que l'acoblament que té lloc és pràcticament local.

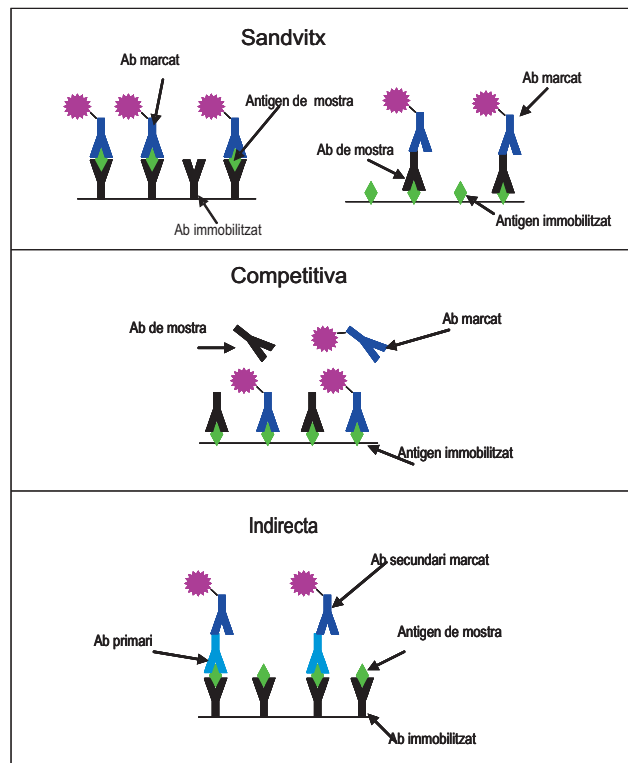


Figura 8: Configuracions estàndard dels biosensors immunofluorescents

A causa de l'estructura química de moltes biomolècules (anells benzènics deslocalitzats, enllaços $\pi - \pi^*$, rigidesa en els enllaços, etc.) aquestes presenten fluorescència endògena o autofluorescència, la qual no s'excita amb fonts de llum que estiguin per sobre dels 500 nm i no emet mai per sobre dels 600 nm. Aquesta autofluorescència emet en la mateixa finestra espectral que la majoria dels marcadors utilitzats, de manera que augmenta el soroll de les mesures. La raó senyal-soroll es pot millorar si utilitzem tècniques no lineals, com ara la fluorescència a dos fotons. La fluorescència amb dos fotons es basa en l'absorció simultània de dos fotons de major longitud d'ona i depèn quadràticament de la in-

tensitat incident, cosa que permet l'ús de la finestra terapèutica de 700 a 1.000 nm (infraroig proper: NIR, de l'anglès *near infrared*). En aquesta finestra el material biològic és pràcticament transparent, hi ha menys dispersió i es poden estudiar medis no transparents (sang, sèrum, etc.) ja que el senyal es genera a una profunditat equivalent a la longitud de penetració. A més a més, la llum d'excitació i l'emissió estan molt separades. Un altre avantatge és que els danys causats per l'exposició són inferiors als de la fluorescència amb un fotó.

En canvi, la fluorescència amb dos fotons només es pot generar si hi ha un elevat flux de fotons (10^{31} fotons/s cm^2). Per obtenir aquest flux, s'hauria de focalitzar al límit de difracció la llum provinent d'un làser d'impulsos en el règim dels femtosegons. Per tal d'evitar de focalitzar la llum provinent del làser, s'utilitzen dispositius basats en GWS i DGWS, que augmenten el camp a la superfície en dos ordres de magnitud.

A la figura 9 es pot veure l'espectre d'emissió d'una gota de tetrametilrodamina (TMR) dipositada a la superfície d'una GWS polimèrica. Aquesta mesura s'ha fet de la manera següent: per a una polarització fixa (en aquest cas TE, que es defineix com la polarització paral·lela als canals de la xarxa de difracció) se sintonitza la longitud d'ona a partir de la longitud d'ona ressonant; i per a una longitud d'ona fixa (la ressonant $\lambda_{\text{res}} = 844$ nm) es canvia la polarització, de manera que passa de l'estat ressonant al no ressonant. En la configuració ressonant s'observa el senyal màxim de fluorescència amb dos fotons. En canvi, quan estem fora de ressonància, no s'observa cap senyal.

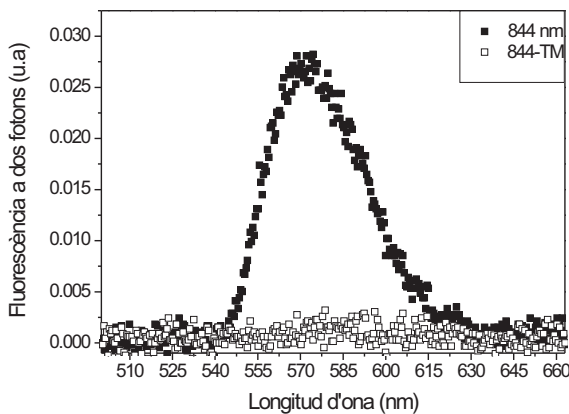


Figura 9: Espectre d'emissió per a diferent longituds d'ona d'excitació. Aquesta GWS és ressonant per a $\lambda_{\text{res}} = 844$ nm amb una amplada de banda FWHM d'1,6 nm. Quadrats plens $\lambda_{\text{res}} = 844$ nm, quadrats buits $\lambda = 844$ nm fora de ressonància, polarització TM

La GWS utilitzada està dissenyada per a incidència normal i això permet que es pugui implementar fàcilment en instruments ja comercialitzats com ara microscopis i fluorímetres. L'augment del camp mesurat en aquest cas era de dos ordres de magnitud. Si, en lloc d'una sola xarxa de difracció ressonant, utilitzem la DGWS tindrem que l'amplada de ressonància és més ajustable, gairebé el doble, l'alineament pot ser menys acurat i l'amplificació del camp és major de dos ordres de magnitud (figura 10). Malauradament, les DGWS comercials no estan dissenyades per a incidències normals per a longituds d'ona del NIR. Les mesures de la figura 10 s'han fet amb un angle d'incidència de 36° .

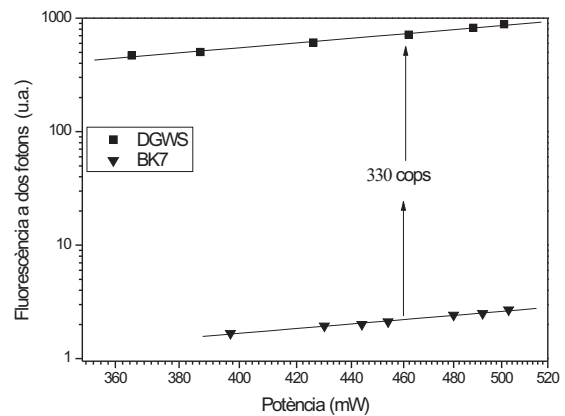


Figura 10: Augment del camp mesurat amb una DGWS a la longitud de ressonància $\lambda_{\text{res}} = 815$ nm incident a 36° en comparació amb una gota dipositada en un portaobjectes. Per tal d'observar la fluorescència en la referència, s'ha hagut de focalitzar amb un objectiu de microscopi ($10\times$, $NA = 0,25$). El gràfic log-log del senyal de fluorescència respecte de la potència del làser és una recta de pendent dos, tal com s'espera en un fenomen quadràtic

Per tal de comparar les dues intensitats, hem utilitzat la fórmula següent:

$$TPF = k \frac{\phi_2}{2} n_2 \sigma_2 l I_0^2, \quad (1)$$

on ϕ_2 és l'eficiència quàntica, n_2 és la densitat de fluorocroms, σ_2 la secció eficaç, I_0 la intensitat incident, l el camí òptic i k una constant adimensional que depèn del *set-up* òptic (detecció, il·luminació, etc.). Utilitzant (1) i suposant que ϕ_2 , σ_2 i l són iguals en ambdós sistemes, obtenim la següent expressió que en permetrà normalitzar el senyal obtingut amb la DGWS en funció de l'obtingut amb el vidre:

$$TPF_{DGWS} = \frac{k_{DGWS} n_{2DGWS} I_{0DGWS}^2}{k_G n_{2G} I_{0G}^2} TPF_G. \quad (2)$$

En ambdós casos, l'àrea de la gota de TMR mesurada és pràcticament igual, el que fa que n_2 sigui igual i obtenim un factor d'amplificació de 330.

Abans de provar els nostres sistemes amb un assaig immunològic real, els hem provat amb el sistema model biotina-estreptavidina. En aquest cas, l'estreptavidina té afegit un marcador fluorescent, la tetrametilrodamina. En la figura 11 es mostra una imatge amb un microscopi de fluorescència amb dos fotons d'una GWS funcionalitzada de manera que les bandes clares es corresponen a les crestes de la xarxa de difracció on s'ha immobilitzat la biotina-estreptavidina marcada, les bandes fosques corresponen a les valls de la xarxa on no hi ha material immobilitzat.

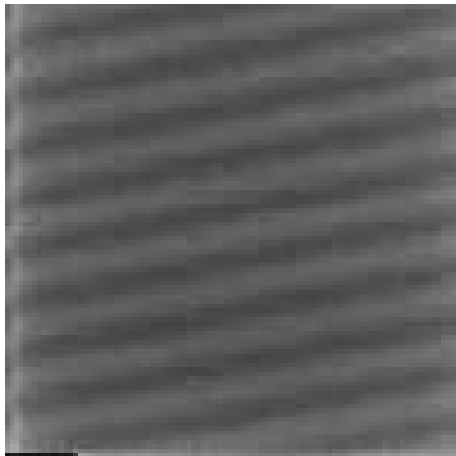


Figura 11: Imatge de microscopi no lineal (fluorescència a dos fotons) d'una GWS amb una capa de biotina immobilitzada a la superfície, la biotina reacciona amb l'estreptavidina marcada formant un enllaç covalent. El període de la GWS és d'uns 550 nm

En ambdós tipus de biosensors (GWS i DGWS) hem aconseguit detectar concentracions d'uns 100 pM sense la necessitat de focalitzar el feix del làser. Aquest límit està dos ordres de magnitud per sota dels límits de fluorescència amb dos fotons que es poden trobar en la bibliografia. El límit més baix de detecció fins al dia d'avui en fluorescència amb un fotó és de 3 fM i el té un biosensor immunològic basat en una guia d'ona plana molt prima.

Conclusions i línies futures

La tecnologia utilitzada en els immunosensors ha evolucionat significativament des dels primers dispositius que van aparèixer en el mercat al final dels vuitanta. La

detecció directa té el gran avantatge de reduir significativament la preparació de les mostres i permet l'observació en temps real de les reaccions immunològiques, però hi ha moltes interferències quan s'examinen mostres clíniques molt complexes com ara sang, sèrum, orina, etc. Els sistemes indirectes s'aprofiten de la bioquímica estàndard i de la simplicitat i baix cost de l'instrumental existent. En el cas dels mètodes no lineals, hem demostrat que l'ús de GWS i DGWS ressonants permeten disminuir el límit de detecció a 100 pM, dos ordres de magnitud per sota dels valors que es troben en la bibliografia, però encara resulten molt cars a causa de l'elevat cost dels làsers d'impulsos del femtosegon.

Tot i que en la bibliografia es descriuen molts immunosensors per a diagnosi clínica, n'hi ha pocs que s'hagin comercialitzat. Algunes de les limitacions en el desenvolupament d'un biosensor són força importants, com ara mostres complexes, fenòmens de superfície, estabilitat restringida i sobretot l'alt cost per mesura. Microfabricació i nanoestructures s'utilitzen en molts biosensors que s'estan desenvolupant avui en dia, com ara les GWS i DGWS, malgrat que tenen un cost elevat i això limita poder obtenir biosensors d'un sol ús. Per això el desenvolupament de GWS i DGWS polimèriques, que són molt fàcils de fabricar, és molt important. Els polímers són fàcils de dipositar, són més barats que els materials dielèctrics i més fàcils d'estructurar, a més a més, les GWS són molt robustes. Esperem que, millorant les tècniques de fabricació ja existents podrem disminuir encara més el límit de detecció.

Les nanoestructures i els sistemes basats en nanopartícules metàl·liques són una línia futura molt interessant per al camp dels biosensors. El làser genera un camp local enorme quan incideix en les nanoestructures metàl·liques ja que excita les oscil·lacions col·lectives dels electrons lliures (plasmons). Per exemple, s'ha calculat que la distribució del camp elèctric local en una punta d'or pot augmentar la intensitat en un factor 1.000. Altres estudis teòrics prediuen augments majors dels processos òptics a prop de capes metàl·liques semicontínues i en agregats de nanopartícules metàl·liques amb geometria fractal (dimensió no entera) distribuïda a l'atzar. Els agregats metàl·lics fractals no tenen simetria translacional i per això donen lloc a plasmons altament localitzats. Més important encara, la interacció entre les partícules dels agregats fractals produeixen camps locals gegants en *hotspots* de mida inferior a la longitud d'ona que els excita. Els factors d'augment (mitjanats espacialment) van dels 1.000 als 20.000 i poden arribar a pics d'augment de 160.000. Un problema per resoldre és que els augments del camp no són homogenis espacialment. Tot i això, amb les noves tècniques de litografia es pot controlar la posició i la distribució espacial d'aquests *hotspots*.

L'ús de tècniques no lineals resol molts dels proble-

mes esmentats, es poden fer mesures en matrius biològiques complexes, medis no transparents, però aquests biosensors no lineals es troben en una fase molt inicial i encara resulten massa cars perquè es puguin comercialitzar. Un altre problema és l'elevat flux de fotons necessari; això obliga a focalitzar el feix en el límit de difracció cosa que fa augmentar els danys en materials biològics. Aquests danys, però, es redueixen quan s'utilitzen ressonadors, que permeten l'ús d'un feix làser no focalitzat i no amplificat.

Una altra característica d'aquests fenòmens no lineals combinats amb els ressonadors és que es pot observar fluorescència encara que estiguem fora de l'amplada de banda de la resonància perquè els impulsos d'un làser de femtosegon tenen una amplada espectral d'uns 8–10 nm; per tant, el sistema veurà una component ressonant que és suficient per excitar la fluorescència no lineal a causa de l'amplificació del camp, sempre que ens trobem en l'interval $\lambda_{\text{res}} \pm \Delta\lambda/2$ nm.

Un dels objectius principals per als propers anys en

el desenvolupament de biosensors és l'ús de nous muntatges microfluidics dins dels dispositius sensors, una major automatització, el desenvolupament de noves molècules per al bioreconeixement que presentin major selectivitat i sensibilitat, la detecció de multianalits i la miniaturització dels sensors per fer mesures *in vivo*. En conseqüència, també s'haurà de treballar en la biocompatibilitat. La implementació de sistemes de control coherent i modificació dels impulsos del làser incident permetria reduir la seva amplada espectral i així augmentar la raó senyal-soroll.

En aquests moments el major usuari dels immunosensors és el camp de la diagnòsi clínica per a humans. L'aplicació en l'àmbit veterinari és una àrea en expansió on els immunosensors poden tenir un paper molt important però dependrà del cost per test, la fiabilitat i la capacitat multisensora dels dispositius. Nosaltres creiem que la combinació de les GWS i DGWS amb tècniques no lineals seran noves opcions molt viables per a ambdós camps.

Bibliografia

- LUKOSZ, W., Integrated optical chemical and direct biochemical sensors, *Sensors and Actuators B*, **29**, 37–50 (1995).
- EGGINS, B., *Biosensors. An introduction*, cap. 5, 87–120, John Wiley and Sons (1996).
- CUNNINGHAM, B., LI, P., LIN, B. i PEPPER, J., Colorimetric Resonant Reflection as a Direct Biochemical Assay Technique, *Sens. Actuators B*, **81**, 316 (2002).
- DUVENECK, G. L., BOPP, M. A., EHRAT, M., BALET, L. P., HAIML, M., KELLER, U., MAROWSKY, G. i SORIA, S., Two-photon fluorescence excitation of macroscopic areas on planar waveguides, *Biosensors Bioelectron.*, **18**, 503 (2003).
- ROSENBLATT, D., SHARON, A. i FRIESEM, A. A., Resonant grating waveguide structures, *IEEE J. Quantum Electronics*, **33**, 2038 (1997).
- SORIA, S., KATCHALSKI, T., TEITELBAUM, E., FRIESEM, A. A. i MAROWSKY, G., Enhanced Two Photon Fluorescence Excitation by Resonant Grating Waveguide Structures, *Opt. Lett.*, **29**, 1989–1991 (2004).
- KATCHALSKI, T., SORIA, S., TEITELBAUM, E., FRIESEM, A. A. i MAROWSKY, G., Two Photon Fluorescence Sensors based on Resonant Grating Waveguide Structures, *Sensors and Actuators B*, **107**, 121–124 (2005).
- SORIA, S., THAYIL K. N., BADENES, G., BADER, M. A., SELLE, A. i MAROWSKY, G., Resonant Double Grating Waveguide Structures as Enhancement Platforms for Two Photon Fluorescence Spectroscopy, *App. Phys. Lett.*, (2005 accepted).
- SANCHEZ, E. J., NOVOTNY, L. i XIE, X. S., *Phys. Rev. Lett.*, **82**, 4014–4017 (1999).