

Grupo de Biosensores. Centro Nacional de Microelectrónica (CSIC)

## Biosensores: la alianza entre la vida y la microelectrónica

**Análisis directos e inmediatos sobre pequeñas muestras son las principales ventajas que ofrecen los biosensores desarrollados por este grupo de investigadores**

Las técnicas de análisis de laboratorio más habituales, ya sean de contaminantes químicos o sustancias biológicas, son generalmente tediosas e indirectas. Contar con dispositivos de alta sensibilidad, portátiles y de medición directa supondría un ahorro de tiempo y costes. Hacia este objetivo se dirige el trabajo del grupo de Biosensores del Instituto de Microelectrónica de Madrid, liderado por Laura M. Lechuga. Combinando componentes ópticos y microelectrónicos con materiales biológicos (proteínas o ADN), desarrollan tres modelos de biosensores, macro, micro y nano, basados en la tecnología de silicio. En ellos la *vida* y la microelectrónica se alían para servir de base a unos dispositivos con múltiples aplicaciones, ya que cambiando la parte biológica pueden medir desde contaminantes ambientales hasta variaciones genéticas o contaminaciones en alimentos.



Laura Lechuga Gómez en uno de los laboratorios del IMM

Patricia Serrano Antolín

Cuando se imagina un biosensor casi todo el mundo piensa en un aparato de medición de sustancias biológicas, si embargo los dispositivos que fabrica el grupo del Instituto de Microelectrónica de Madrid (IMM) situado en el Parque Tecnológico de Madrid (Tres Cantos) "no son exactamente eso", aclara la doctora Lechuga. La definición más correcta sería un dispositivo compuesto por dos elementos fundamentales: el sensor, en este caso microelectrónico, y el receptor biológico, por ejemplo una proteína o una cadena de ADN. Esos dos componentes, más otros de funcionamiento y conversión de señal forman el biosensor, que puede medir todo tipo de sustancias, no sólo biológicas.

De hecho, los compuestos con los que experimentan este grupo del IMM, perteneciente al Centro Nacional de Microelectrónica del CSIC son principalmente contaminantes orgánicos de aguas de origen agrícola e industrial, como el DDT o los clorófenoles. "A través de la parte biológica podemos hacer biosensores específicos, totalmente selectivos para medir contaminantes", explica Lechuga Gómez, química de formación. Así, la investigación con los prototipos de escala macro y micro se ha centrado en el control medioambiental, mientras que el nanométrico se dirige a la aplicación en genómica.

Estos dispositivos siguen un planteamiento tecnológico similar al biosensor más clásico y difundido comercialmente, el usado por los diabéticos para medir la concentración de glucosa en sangre. En éste se integra una enzima, que actúa como receptor biológico, situada sobre un electrodo. La enzima permanece en estado seco, hidrofílica, hasta que entra en contacto con la gota de sangre del paciente, que la regenera y activa dando lugar a una reacción química y en consecuencia a un movimiento de electrones. El electrodo registra esos cambios y los traduce en la información que aparecerá en la pantalla en tan sólo unos 30 segundos. "Nuestros biosensores siguen el mismo planteamiento, pero en vez de

Con el componente biológico adecuado se pueden diseñar biosensores para todo tipo de sustancias

analizar glucosa, analizamos otros compuestos, y en vez de utilizar enzimas, usamos proteínas o ADN”.

Otras aplicaciones de este tipo de tecnología son las usadas en alimentación para el análisis de alimentos susceptibles de contener sustancias nocivas como la bacteria de la salmonella, por ejemplo. Incluso, comenta la investigadora, en Japón se usa uno para analizar si el pescado está fresco o no. También hay muchos grupos de investigación trabajando en la creación de biosensores para la detección rápida de agentes contaminantes en caso de guerra química y bacteriológica. Y otra área muy importante de aplicación es la de los análisis clínicos para analizar de forma rápida y directa, por ejemplo, infecciones como hepatitis o virus del sida.

Y es que el uso de biosensores puede extenderse a muchísimos campos, ya que si se tiene el receptor biológico adecuado esta tecnología se puede aplicar a medir prácticamente cualquier sustancia. “Ese es el punto clave”, según Lechuga Gómez, que subraya que el trabajo del grupo multidisciplinar (químicos, físicos, ambientólogos, biólogos moleculares e ingenieros) que dirige desde 1997 es desarrollar tecnología y probar que funcione bien. “Ante todo somos tecnólogos, las aplicaciones dependen más de los grupos con los que colaboremos”.

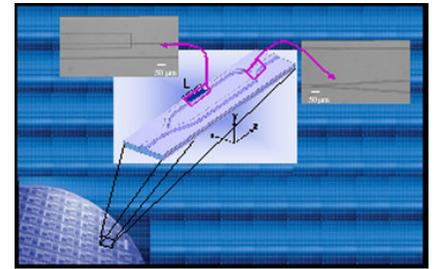
### **Control medioambiental**

En el terreno de la detección de contaminantes ambientales, el grupo de Biosensores prueba sus prototipos en varias de las 12 sustancias consideradas prioritarias por la Unión Europea. Así, utilizan proteínas diseñadas específicamente para reaccionar en contacto con contaminantes (una proteína diferente para cada uno), principalmente DDT, carbaril y nonilfenol.

Son sustancias químicas de origen agrícola o industrial, persistentes y altamente nocivas para el medio ambiente y la salud humana. Según Lechuga, “los ingerimos constantemente en muchos alimentos”. Cuando entran en nuestro organismo, no son interpretados como agentes patógenos sino como hormonas propias, por lo que provocan lo que se ha dado en llamar una disrupción endocrina. El cuerpo piensa que tiene una elevada concentración de hormonas ante la cual activa los sistemas de respuesta, y parece ser que esta descompensación puede tener relación con el aumento de algunas enfermedades como el cáncer de mama o el de próstata, por ejemplo. Por ello, “son considerados analitos prioritarios”.

Lo que sucede con estos compuestos químicos es que son moléculas muy pequeñas que además se hallan en muy bajas concentraciones, casi de partes por billón. “Analizar eso en el laboratorio puede llevar horas o días y hay que utilizar técnicas muy sofisticadas y costosas”. Los biosensores basados en la tecnología del silicio con proteínas como receptores son, por el contrario, de medición directa y alta sensibilidad, aunque de momento también costosos.

El biosensor tipo macro se compone por una placa de oro de 45 nm de espesor sobre la que se ancla el receptor biológico. “El proceso de anclaje de la proteína es uno de los más problemáticos en la fabricación de este tipo de biosensores”, explica la investigadora, “porque supone conectar un mundo biológico con un material inerte”. El método consiste a grandes rasgos, en provocar modificaciones químicas en la superficie del oro que den lugar a un enlace covalente entre los



**Biosensor óptico fabricado con tecnología microelectrónica de silicio y empleado para la medida de parámetros clínicos y contaminación medioambiental**

**El anclaje del receptor biológico sobre la superficie inerte es una de los pasos más complejos del proceso de fabricación**

átomos de su superficie y una parte específica de la proteína. “No puede anclarse de cualquier manera, la proteína debe conservar su estructura y conformación”, siendo necesario que queden libres las zonas de la misma que desempeñan la función receptora. Para ello, conectan a la placa de oro unas microcubetas con distintas disoluciones que hacen pasar sobre el sensor en un determinado orden, pH y concentración provocando las reacciones que darán como resultado el anclaje de la proteína a la superficie aurífera.

Todos los pasos se monitorizan para comprobar que se están produciendo las reacciones químicas buscadas, y una vez que se comprueba que la proteína está bien anclada, se conecta a un sistema de flujo automatizado que mantiene a la proteína constantemente en contacto con un buffer salino. “Mantener la parte viva, que no se degrade y que permanezca estable es otra de las mayores dificultades”, comenta Lechuga. La proteína (y también el ADN) ha de estar en disolución constante, “en su medio natural”, es decir en un buffer con un pH y una temperatura adecuados. Y es por esto, por lo que estos dispositivos sirven para la medición de contaminantes en aguas, porque las muestras a analizar han de ser líquidas para poder inyectarlas en el flujo.

La placa de oro, de con la proteína anclada y el sistema de flujo constante, se excita mediante un láser un efecto óptico que se llama resonancia de plasmón superficial. Cuando la luz incide sobre la placa de oro produce un movimiento de electrones, que se ve alterado por las reacciones bioquímicas o biomoleculares en la superficie de la misma, provocando un cambio en la luz reflejada que serán registradas por un fotodetector. La señal del fotodetector es procesada electrónicamente y conectada a su vez a un ordenador con un software, elaborado por el propio equipo, que traduce los cambios en los niveles de concentración del contaminante. Así se consigue “la ventaja de tener una medición y un análisis directo a partir de muestras muy pequeñas”.

El buen funcionamiento de este biosensor suscitó hace unos meses la creación de una spin-off, Sensia S.L., que comercializa el biosensor de resonancia de plasmón superficial para aplicación general. Es decir, se vende la tecnología base sin proteína ni ADN, así según lo que quiera medir el usuario habrá de usar el receptor biológico específico. “Nosotros le explicaremos como usarlo y le proporcionaremos consejo sobre el protocolo de inmovilización más adecuado”.

### **Diseño propio**

El biosensor de escala micro funciona con un mecanismo similar pero sustituye el oro por una oblea de silicio, sobre la que se diseñan los microcircuitos ópticos. El equipo del IMM ha diseñado un interferómetro (un circuito) compuesto por varias capas de óxidos de silicio y nitruros. El interferómetro es el dispositivo por el que transcurrirán los fotones que viajarán desde el emisor de la luz al fotodetector, pasando por el receptor biológico, que también está situado en una disolución constante. La luz entra por una única vía que en un determinado punto del interferómetro se divide en dos ramas, sobre una de las cuales se ha anclado la proteína. Las dos ramas vuelven a unirse y con ello la luz, que no será igual a la que ha entrado porque en uno de los caminos por los que se ha bifurcado ha sufrido modificaciones debido al contacto con la proteína. Del análisis de esa interferencia se extrae la señal y se averigua la concentración que existía en la muestra.

A pesar de que los interferómetros se usan mucho en telecomunicaciones su diseño era incompatible con la aplicación en biosensores, por lo que este equipo ha tenido que redefinirlo entero. “Es un diseño completamente nuevo, que requiere mucho tiempo porque hay que hacer modelizaciones de muchos parámetros”. Además, también han tenido que abordar ellos mismos la parte de la modificación química para el anclaje de proteínas “porque nadie lo hacía” y la del sistema de flujo. Ahora, bromea la investigadora, “somos unos expertos”.

Las partes del proceso que no realiza el grupo de Lechuga son el diseño de las proteínas específicas para cada contaminante, que lo llevan a cabo dos grupos de investigación en inmunoquímica (uno en Valencia y otro en Barcelona), y el desarrollo de la electrónica para la adquisición y procesado de la señal, que hacen en colaboración con un grupo de ingeniería de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. “Tenemos muchas colaboraciones porque si no es imposible hacerlo todo”.

Los biosensores micro portan placas de silicio con 30 interferómetros, ya que cada uno mide sólo 4 nanómetros de altura y “es imposible manejarlos en el laboratorio de uno a uno”. A cada interferómetro se le conecta una fibra óptica de entrada de luz y de salida. Ésta última se enlaza a un fotodetector que transmite la información a la electrónica y de ahí al software. El siguiente paso de su investigación con este prototipo, más sensible que el de plasmón superficial, es conseguir hacerlo de forma más integrada, es decir reunir todos los componentes en un chip portátil, al estilo del biosensor de glucosa pero de tamaño más reducido. Además, persiguen también convertirlo en un multibiosensor, en el que cada interferómetro esté conectado a una cubeta independiente, con lo que se podrían introducir 30 proteínas diferentes, específicas para distintos contaminantes. “Sería un biochip completo con el que se podrían analizar 30 sustancias al mismo tiempo”.

### **Análisis genético**

Desde hace dos años, el grupo ha empezado a investigar con otro tipo de receptores biológicos, las cadenas de ADN. En esta línea, gracias a la colaboración con el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC, en un proyecto europeo sobre el gen BRCA1 (indicativo de la propensión al cáncer de mama), han creado un prototipo de biosensor nanométrico muy sensible para muestras muy pequeñas, a diferencia de las técnicas empleadas en la actualidad para el análisis genético.

“Es el más sofisticado y sensible de los tres modelos que fabricamos”, según Lechuga, que explica que lo que emplean en este biosensor como sensor sobre el que anclar el ADN es una pieza similar a la palanca de lectura del microscopio de fuerzas atómicas (*cantilever*). Es una estructura de 200 micras de largo, 20 micras de ancho y como 300 nanómetros de espesor sobre la que fijan una cadena simple de ADN (oligonucleótido) mediante un proceso de reacciones químicas que sigue un planteamiento semejante al de los otros prototipos.

La detección se produce cuando se hace pasar a través de la palanca con la cadena de ADN la muestra de ADN de un paciente que se quiera analizar. La cadena de ADN dividida se unirá a su complementaria provocando que el *cantilever* se doble

“como un trampolín en una piscina, pero en este caso la curvatura no se produce por el peso, que es ínfimo, sino por un fenómeno de tensión superficial. “Hay algo diferente en la superficie de arriba de la palanca con respecto a la parte de abajo”. La luz que se ha proyectado sobre esa palanca sufrirá modificaciones en su reflexión dependiendo del grado del doblamiento, y es eso lo que se mide. “Según cuanto cambie sabemos qué concentración de moléculas de ADN tenemos”. Como en los anteriores biosensores, este se conecta a la parte de adquisición de la señal y ésta al ordenador con el software que interpreta la señal.

De esta manera, si la muestra del paciente presenta alguna alteración genética, la cadena simple de ADN usada como receptor se une más o menos, y eso hará que la palanca se doble más o menos. El *cantilever* tiene sensibilidad suficiente como para percibir este fenómeno que sucede a escala nanométrica y curvarse también pocos nanómetros.

La investigadora remarca que con este tipo de biosensor no se necesita un marcador, “es tan sensible que lo registra directamente”, y el no usar marcador significa además que las mediciones son en tiempo real, en el momento en que suceden las reacciones de reconocimiento lo estás viendo en pantalla. Las técnicas de análisis genético usadas hoy en día, como los biochips de ADN, necesitan siempre de la introducción de un marcador, ya sea fluorescente, radioactivo o de otro tipo, que una vez que ha entrado en contacto con la muestra hay que analizar. Sin embargo, con esta tecnología, directamente se observa la interacción de ADN que está situado sobre un dispositivo capaz de leer esa interacción.

La próxima etapa de la investigación es optimizar el biosensor para convertirlo en un biochip de análisis directo de ADN de alta sensibilidad, en el que se integrarían del orden de 20 *cantilevers*, cada uno con una secuencia de ADN distinta. Este tipo de tecnología, así como la del biosensor micro, es completamente innovadora, “no hay nada hecho”, subraya Laura Lechuga; la técnica de los biosensores de plasmón superficial es muy estándar, pero “los otros dos desarrollos son exclusivamente nuestros” y según las comparativas que realizan con otras técnicas de laboratorio “funcionan muy bien”.

#### **FICHA TÉCNICA**

Grupo de Biosensores

**Centro:** Instituto de Microelectrónica de Madrid. Centro Nacional de Microelectrónica. CSIC

**Coordinador:** Laura María Lechuga Gómez

**Dirección:** C/ Isaac Newton, 8. Parque Tecnológico de Madrid  
28760 Tres Cantos. Madrid

**Teléfono:** 91 806 07 00

**Fax:** 91 806 07 01

**Email:** [laura@imm.cnm.csic.es](mailto:laura@imm.cnm.csic.es)

**Página web del grupo:** <http://www.imm.cnm.csic.es/biosensores/home.html>

**Líneas de investigación:** Diseño y modelización teórica de las estructuras biosensoras, tecnología de fabricación, inmovilización a escala nanométrica de biomoléculas y su caracterización por AFM, montaje experimental de medida, electrónica de control, sistema de adquisición y tratamiento de datos; Diseño y fabricación de sistemas de flujo, macro y micromecanizados; Desarrollo de sistemas de modulación de señal óptica, integración de componentes; Microsensor óptico integrado basado en Interferómetros Mach-Zehnder con tecnología de Silicio; Desarrollo de un sensor de Resonancia de Plasmón Superficial de Doble Canal; Biosensor un nanosensor basado en micropalancas de Silicio como base para desarrollar micro/nano biochip de ADN.