



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIERÍA
INDUSTRIAL VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA



Estudio experimental de biosensores fotónicos basados en substratos porosos bajo diversas condiciones.

AUTOR: Marta Tébar Saiz

TUTOR: Alejandro Martínez Abietar

COTUTORES: Jaime García Rúperez
Paula Martínez Pérez

Curso Académico: 2020-21



Agradecimientos

A las personas que me han ayudado
y apoyado siempre,
mis padres.

Resumen

Los biosensores están formados por biorreceptores y un transductor, y se utilizan para la detección de diferentes analitos. Además, se pueden clasificar según el tipo de sus componentes, en concreto, en el presente Trabajo Final de Grado, se utilizan los biosensores ópticos basados en Fabry-Pérot. Estos utilizan la interacción de determinados materiales con la luz, de esta manera, detectan pequeñas variaciones de forma versátil, sencilla y rápida. En este campo de biosensores ópticos se han desarrollado los materiales porosos, que poseen un gran ratio superficie-volumen en el cual interaccionan las sustancias, proporcionando sensibilidades mayores.

En este contexto, se efectuaron distintos sensados realizados mediante substratos porosos, tales como el silicio poroso y las nanofibras poliméricas. Además, se varió el método empleado en las medidas, pudiendo ser estático o dinámico, con la finalidad de poder comparar los resultados obtenidos y optimizar los distintos protocolos.

En primer lugar, se desarrolló la biofuncionalización mediante la proteína OBP3 y la biodetección del farnesol, sin llegar a obtener buenos resultados, ni de manera estática ni dinámica. Por otra parte, se realizó la biodetección de la proteína BSA, llegando a la conclusión de que el método dinámico es el más adecuado para ello, obteniendo detecciones de hasta 1 ppm BSA.

Palabras clave: Sensores fotónicos; Silicio poroso; Nanofibras poliméricas; Bioensayo; Fluídica; Incubación

Resum

Els biosensors estan formats per bioreceptors i un transductor, i s'utilitzen per a la detecció de diferents analits. A més, es poden classificar segons el tipus dels seus components, en concret, en el present Treball Final de Grau, s'utilitzen els biosensors òptics basats en Fabry-Pérot. Aquests utilitzen la interacció de determinats materials amb la llum, d'aquesta manera, detecten petites variacions de forma versàtil, senzilla i ràpida. En aquest camp de biosensors òptics s'han desenvolupat els materials porosos, que posseeixen un gran ràtio superfície-volum en el qual interaccionen les substàncies, proporcionant sensibilitats grans.

En aquest context, es van efectuar diferents sensats realitzats mitjançant substrats porosos, com ara el silici porós i les nanofibres polimèriques. A més, es va variar el mètode emprat en les mesures, podent ser estàtic o dinàmic, amb la finalitat de poder comparar els resultats obtinguts i optimitzar els diferents protocols.

En primer lloc, es va desenvolupar la biofuncionalització mitjançant la proteïna OBP3 i la biodetecció de l'farnesol, sense arribar a obtindre bons resultats, ni de manera estàtica ni dinàmica. D'altra banda, es va realitzar la biodetecció de la proteïna BSA, arribant a la conclusió que el mètode dinàmic és el més adequat per a això, obtenint deteccions de fins a 1 ppm BSA.

Paraules clau: Sensors fotònics; Silici porós; Nanofibres polimèriques; bioassaig; fluídica; incubació

Abstract

Biosensors are made up of bioreceptors and a transducer, and are used for the detection of different analytes. In addition, they can be classified according to the type of their components, specifically, in this Final Degree Project, optical biosensors based on Fabry-Pérot are used. These use the interaction of certain materials with light, in this way, they detect small variations in a versatile, simple and fast way. In this field of optical biosensors, porous materials have been developed, which have a large surface-volume ratio in which substances interact, providing higher sensitivities.

In this context, different senses were carried out using porous substrates, such as porous silicon and polymeric nanofibers. In addition, the method used in the measurements was varied, being able to be static or dynamic, in order to be able to compare the results obtained and optimize the different protocols.

First, biofunctionalization was developed using the OBP3 protein and farnesol biosensing, without obtaining good results, either statically or dynamically. On the other hand, the biodetection of the BSA protein was carried out, reaching the conclusion that the dynamic method is the most suitable for this, obtaining detections of up to 1 ppm BSA.

Keywords: Photonic sensors; Porous silicon; Polymeric nanofibers; Bioassay; Fluidic; Incubation

Índice general

Agradecimientos	i
Resumen	ii
Índice general	v
Memoria	x
1 Introducción	1
1.1 Objetivos	2
1.2 Estructura	2
1.3 Contexto del Trabajo Final de Grado	3
2 Los biosensores	4
2.1 Antecedentes de la tecnología	4
2.2 Definición de biosensor y componentes	5
2.3 Parámetros básicos	6
2.4 Clasificación de los biosensores	7
2.4.1 Biosensor óptico con marcaje	8
2.4.2 Biosensor óptico sin marcaje	8
2.4.2.1 Biosensor basado en la resonancia de plasmón de superficie	9
2.4.2.2 Biosensor de fibra óptica	9
2.4.2.3 Biosensor basado en anillo resonador	9
2.4.2.4 Biosensor basado en el interferómetro de Mach-Zehnder . .	9
3 Biosensor óptico basado en Fabry-Pérot	10
3.1 Silicio poroso como transductor	11
3.2 Nanofibras poliméricas como transductor	12
4 Materiales y métodos	14
4.1 Fabricación de SiP y capas de NFs	14
4.2 Plataformas ópticas de medida	14
4.2.1 Goniómetro	14
4.2.2 Plataforma de medida vertical	15
4.3 Celdas para la exposición del transductor a las disoluciones	16
4.3.1 Celda microfluídica	16
4.3.2 Celda de incubación estática	16
4.4 Método de sensado	16
4.4.1 Sensado dinámico	16
4.4.2 Sensado estático	17

4.5	Procesado de datos	18
5	Sensado de la <i>Odorant Binding Protein</i> (OBP)	20
5.1	Descripción general	20
5.2	Dinámico	21
5.2.1	Protocolo utilizado	21
5.2.2	Resultados y análisis	22
5.3	Estático	25
5.3.1	Protocolo utilizado	25
5.3.2	Resultados y análisis	26
6	Sensado de la <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	29
6.1	Descripción general	29
6.2	Estático	30
6.2.1	Silicio poroso	30
6.2.1.1	Protocolo utilizado	30
6.2.1.2	Resultados y análisis	30
6.2.1.3	Nueva cubeta y pruebas realizadas	35
6.2.2	Nanofibras poliméricas	38
6.2.2.1	Protocolo utilizado	38
6.2.2.2	Resultados y análisis	39
6.3	Dinámico	42
6.3.1	Nanofibras poliméricas	42
6.3.1.1	Protocolo utilizado	42
6.3.1.2	Resultados y análisis	43
7	Conclusiones	49
7.1	Líneas futuras	50
	Presupuesto	51
8	Introducción del presupuesto	52
9	Documentos del presupuesto	54
9.1	Cuadro de precios de mano de obra	54
9.2	Cuadro de precios de materiales	55
9.3	Cuadro de precios de maquinaria	55
9.4	Cuadro de precios unitarios	56
9.5	Cuadro de precios descompuestos	57
9.6	Cuadro de mediciones	60
9.7	Presupuesto de ejecución por contrata	60
	Bibliografía	61

Índice de figuras

2.1	Número de trabajos publicados de detección de patógenos desde 1985 empleando diferentes técnicas de biodetección. (Lazcka, Campo y Muñoz 2007)	5
3.1	Representación del espectro de reflectividad de una cavidad Fabry-Pérot hecha de SiP (Martín Sánchez 2019)	10
3.2	Imagen de la estructura de SiP realizada con microscopio óptico de barrido, tanto sobre la superficie (a), como en una sección (b) (Martín-Sánchez, Salvador Ponce-Alcántara y García-Rupérez 2019)	12
3.3	Imagen de la estructura de NFs realizada con microscopio óptico de barrido, tanto a una escala de $1\mu\text{m}$ (a), como de 100 nm (b) (Salvador Ponce-Alcántara y col. 2019)	13
4.1	Goniómetro empleado en las medidas ópticas (izquierda) y celda microfluídica (derecha) (Martínez-Pérez y col. 2020).	15
4.2	Imagen del <i>setup</i> de medida vertical durante una medida de incubación en estático, en el cual se visualiza la fibra perpendicular y la cubeta de 1 ml con cristal.	15
4.3	Esquema básico del método de sensado dinámico utilizado	17
4.4	Esquema básico del método de sensado estático utilizado	17
4.5	Ejemplo de los espectros de reflectividad sobre los que se estudiará el desplazamiento, en este caso se produce debido al 10% IPA (alcohol isopropílico)	18
4.6	Ejemplo del espectro de espesor óptico efectivo (EOT) sobre el cual se estudiará el desplazamiento del pico	19
5.1	Gráfica de las afinidades que posee la OBP3 con diferentes sustancias químicas y como varía al reemplazar el aminoácido Asn90Leu (Pelosi, Zhu y Knoll 2018)	20
5.2	Gráfica de la calibración de una muestra de SiP utilizando diferentes concentraciones de etanol (1%, 2% y 5%) en agua desionizada (DIW, de su denominación en inglés)	22
5.3	Gráfica del control negativo en una muestra de SiP con $400\ \mu\text{M}$ Farnesol en 1% etanol	22
5.4	Gráfica de la forma característica generada en tres sensados con tres muestras distintas de SiP por el tampón 50mM Tris en agua desionizada (DIW, por sus siglas en inglés)	23
5.5	Gráfica de la adsorción de $0.029\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ proteína OBP3 en 50 mM Tris en otra muestra de SiP diferente	24
5.6	Gráfica de la detección de farnesol con concentraciones crecientes de $10\ \mu\text{M}$, $50\ \mu\text{M}$, $100\ \mu\text{M}$ y $200\ \mu\text{M}$; en 1% etanol	24
5.7	Imagen de la cubeta de 4.95 ml utilizada en el sensado estático con las medidas correspondientes a cada lado	26
5.8	Gráfica de la calibración de una muestra de SiP mediante 5% etanol en agua desionizada (DIW, por su denominación en inglés)	26
5.9	Gráfica de la incubación de SiP con una disolución $0.029\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ OBP3 para su biofuncionalización	27

5.10	Gráfica de la incubación de SiP con farnesol en concentraciones crecientes de 10 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM y 400 μM para su detección	28
6.1	Gráfica de la calibración de una muestra de SiP mediante 5% etanol en agua desionizada (DIW, por su denominación en inglés), tanto en desplazamiento espectral de uno de los lóbulos (A), como en espesor óptico efectivo (EOT, por su denominación en inglés) (B)	31
6.2	Gráfica de la adsorción en una muestra de SiP de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteína AG sobre 1X PBS, tanto en desplazamiento espectral de uno de los lóbulos (A), como en espesor óptico efectivo (EOT, por su denominación en inglés) (B)	32
6.3	Gráfica de la adsorción de 2.5 mg/ml caseína sobre una muestra de SiP, tanto en desplazamiento espectral de uno de los lóbulos (A), como en espesor óptico efectivo (EOT, por su denominación en inglés) (B)	32
6.4	Gráfica de la incubación de una muestra de SiP con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anticuerpo αBSA sobre tampón 1X PBS, tanto en desplazamiento espectral de uno de los lóbulos (A), como en espesor óptico efectivo (EOT, por su denominación en inglés) (B), así como en la intensidad del pico EOT (C)	33
6.5	Gráfica de la detección de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteína BSA, tanto en desplazamiento espectral de uno de los lóbulos (A), como en espesor óptico efectivo (EOT, por su denominación en inglés) (B), así como en la intensidad del pico EOT (C)	34
6.6	Fotografías de la nueva cubeta con cristal en las que se muestran sus dimensiones	35
6.7	Gráficas de la incubación de dos muestras diferentes de SiP en 5% etanol sobre agua desionizada (DIW, por su denominación en inglés) en la nueva cubeta, (A) con el cristal, y (B) sin el cristal	36
6.8	Gráfica de las capturas del espectro obtenidas dejando 1 ml agua desionizada (DIW, por su denominación en inglés) durante 30 minutos en la cubeta sin luz	37
6.9	Gráfica de las capturas del espectro obtenidas dejando 1 ml agua desionizada (DIW, por su denominación en inglés) durante 30 minutos en la cubeta con luz	37
6.10	Imagen de la solución propuesta para que la cubeta mantenga la temperatura estable en una medida de larga duración (A). Capturas del espectro de reflectividad de la incubación en una muestra de SiP de 1 ml de agua desionizada (DIW, por sus siglas en inglés) durante 20 minutos (B)	38
6.11	Gráfica de la calibración de una muestra de NFs incubando 5% etanol sobre agua desionizada (DIW, por su denominación en inglés)	39
6.12	Gráfica de la incubación en una muestra de NFs de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteína AG sobre el tampón 1X PBS	40
6.13	Gráfica de la incubación en una muestra de NFs de 2.5 mg/ml caseína sobre el tampón 1X PBS	41
6.14	Gráfica de la incubación en una muestra de NFs de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anticuerpo (αBSA) sobre el tampón 1X PBS	41
6.15	Gráfica de la incubación en una muestra de NFs de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteína BSA sobre el tampón 1X PBS	42
6.16	Gráfica de la calibración de una muestra de NFs a partir de agua desionizada y del tampón 0.1 M MES mediante sensado dinámico	43
6.17	Gráfica resultante del paso de fluir 50 ppm proteína AG por la muestra de NFs, así como su lavado con los tampones 0.1 M MES y 1X PBS	44
6.18	Gráfica de los resultados de fluir 2.5 mg/ml caseína por una muestra de NFs, y su posterior lavado con el tampón 1X PBS	45
6.19	Gráfica obtenida después de fluir sobre una muestra de NFs el anticuerpo 50 ppm αBSA , también se observa su lavado con el tampón 1X PBS	45
6.20	Gráfica obtenida como resultado de fluir concentraciones crecientes de BSA (1 ppm, 5 ppm y 10 ppm) sobre la muestra de NFs biofuncionalizada	46
6.21	Gráfica obtenida como resultado de ir fluyendo concentraciones crecientes de BSA (1 ppm, 5 ppm y 10 ppm) sobre la muestra, alternando con el tampón 1X PBS	47
6.22	Gráfica que representa el ajuste lineal del desplazamiento acumulado frente a la concentración de BSA sobre la muestra de NFs anterior	47

Índice de tablas

2.1	Posible clasificación de los diferentes tipos de biosensores según la bibliografía científica (Kaur, Bhosale y Shrivastav 2018; Alhadrami 2018)	7
9.1	Cuadro de precios de la mano de obra utilizada para la realización del trabajo	54
9.2	Cuadro de precios de los materiales utilizados para la realización del trabajo	55
9.3	Cuadro de precios de la maquinaria utilizada para la realización del trabajo	55
9.4	Cuadro de precios unitarios	56
9.5	Hoja de precios descompuestos 1	57
9.6	Hoja de precios descompuestos 2	58
9.7	Hoja de precios descompuestos 3	59
9.8	Cuadro de mediciones	60
9.9	Hoja resumen del PEC con IVA	60

MEMORIA

Capítulo 1

Introducción

Las técnicas de detección y análisis de sustancias típicamente empleadas eran muy costosas, tanto en tiempo como en dinero. Como alternativa, evitando estos costes, surgieron los biosensores.

Estos poseen diferentes campos de aplicación, en la industria química, para la detección de sustancias; en la industria alimentaria, para verificar la seguridad de los alimentos; para controlar la contaminación ambiental, etc. Sin olvidar uno de los campos en los que más se está desarrollando: la medicina, donde se utiliza para investigar diferentes enfermedades, hacer diagnósticos y, monitorizar enfermedades crónicas, como, por ejemplo, la diabetes mediante la medida de los niveles de glucosa en sangre (Kaur, Bhosale y Shrivastav 2018).

Un biosensor se compone principalmente de biorreceptores y un transductor. Los biorreceptores realizan un reconocimiento específico de los diferentes analitos, generando una respuesta. Por su parte, el transductor es capaz de captar y transmitir esa respuesta en forma de señal (Thévenot y col. 2001).

Además, se pueden clasificar según los distintos biorreceptores o transductores que utilicen (Kaur, Bhosale y Shrivastav 2018; Alhadrami 2018). En este trabajo, se realizan medidas a partir de un biosensor con transducción óptica, detectando cambios en las propiedades de la luz generados por los reconocimientos específicos que se produzcan.

Se persigue la utilización de estructuras porosas con los biosensores ópticos, tales como el silicio poroso (SiP) y las nanofibras poliméricas (NFs). Estas se han utilizado para la biodetección de moléculas odorantes, como es el farnesol, y de la albúmina de suero bovino (BSA, por su denominación en inglés).

Para llevar a cabo esa biodetección, es necesario exponer a los biorreceptores el analito, de manera que se produzca el reconocimiento. En este trabajo, se estudia como afecta utilizar un sistema fluidoico o estático en dicho reconocimiento específico.

1.1 Objetivos

Para llevar a cabo el trabajo previamente presentado se han planteado varios objetivos:

- Objetivo 1: Uso de diferentes estructuras porosas como transductor en experimentos de biosensado. Se trabajará con silicio poroso (SiP) y nanofibras poliméricas (NFs).
- Objetivo 2: Biofuncionalización de las superficies de los transductores empleando la proteína OBP3 (proteína de unión a odorante, por su denominación en inglés) y el anticuerpos anti-BSA, capaces de reconocer específicamente farnesol y BSA, respectivamente. Para ello, se habrá de optimizar volúmenes y concentraciones de las disoluciones en función del número de muestras, el tiempo de reacción y los resultados que se van obteniendo en los experimentos, los cuales permitirán proponer mejoras y detectar errores.
- Objetivo 3: Biodetección del farnesol y BSA, reconocidos por los biorreceptores mencionados en el Objetivo 2. En este caso también se deberán optimizar las disoluciones, así como el tiempo de reacción, proponiendo mejoras y detectando los errores que puedan suceder.
- Objetivo 4: Utilización de diferentes métodos para proporcionar el analito al transductor, de forma dinámica, fluyendo las disoluciones, y estática, incubándolas. De esta forma, se podrán ver las ventajas y desventajas en cada uno de ellos, así como determinar cuál es más adecuado en cada sensado realizado.
- Objetivo 5: Utilización del *software* del laboratorio: *Ocean Optics Software*. De esta manera, se visualiza en tiempo real la respuesta proporcionada por el biosensor, detectando problemas que se produzcan y obteniendo resultados inmediatos.
- Objetivo 6: Procesado de los resultados obtenidos a través de diferentes funciones de *MATLAB*. Se obtienen varias gráficas que deben ser interpretadas correctamente, posibilitando obtener conclusiones de los resultados obtenidos en los distintos sensados.

1.2 Estructura

El presente trabajo se compone, inicialmente, de una descripción general de los biosensores, mencionando sus antecedentes, componentes y su posible clasificación. Se centra la explicación en el biosensor óptico, y más en concreto el basado en Fabry-Pérot, que es el implicado en el trabajo, así como las estructuras porosas que se utilizan, el silicio poroso y las nanofibras poliméricas.

A continuación, se mencionan los materiales y métodos empleados para realizar los distintos sensados, detallando los *setup* ópticos usados, goniómetro y plataforma de medida vertical, y las celdas, tanto de microfluídica, como de incubación, así como los distintos procesados que serán utilizados para la obtención de resultados del presente trabajo.

Respecto a los sensados, se detalla el protocolo, los resultados y un análisis del bioensayo de la *Odorant Binding Protein* (OBP3), tanto con el método dinámico, como con el estático. Asimismo, se exponen de la misma manera los resultados obtenidos del sensado de la proteína *Bovine Serum Albumin* (BSA), también en método dinámico y estático. Además, se mencionan los problemas y soluciones que surgen con las cubetas empleadas en el método estático.

Por último, se realizan las conclusiones de los resultados del trabajo, y también se añade una valoración económica del mismo, mediante el presupuesto.

1.3 Contexto del Trabajo Final de Grado

Todos los sensados realizados para obtener los resultados que se exponen en el presente Trabajo Final de Grado han sido realizados en el *Nanophotonics Technology Center* (NTC) de la Universitat Politècnica de València (UPV), en el grupo de Biofotónica, que tiene gran experiencia con los biosensores fotónicos. Los laboratorios del centro tienen las instalaciones necesarias para la realización de procesos de biofuncionalización y biodetección, y han sido utilizados para la obtención de los resultados que se presentan en el documento.

Los biosensores

2.1 Antecedentes de la tecnología

Durante los últimos 30 años, ha ido aumentando la tendencia de detección de diferentes analitos, mayoritariamente en los ámbitos como la industria alimentaria, de control ambiental o el ámbito clínico. El objetivo en ese tiempo era encontrar un método más rápido de detección. Cabe destacar que, en esos años, los métodos más comunes según las publicaciones fueron, en orden, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el recuento de colonias, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), y, en cuarto lugar, los biosensores, entre ellos cabe destacar el tipo de transducción óptica y electroquímica (Lazcka, Campo y Muñoz 2007).

Desde 1985, ha aumentado exponencialmente la publicación de artículos científicos de diferentes técnicas de biodetección. Hacia el año 2005, hay un decaimiento del número de publicaciones del resto de métodos tradicionales, sin embargo, los biosensores comenzaron a estar en pleno auge y crecimiento, de hecho, crece un 8% de media cada año (véase Figura 2.1) (Jane y col. 2009). Esto se debe fundamentalmente a la obtención de resultados similares a los alcanzados con otras técnicas en tiempos mucho menores, aunque en ese momento aún tenía un gran margen de mejora, sobre todo con características como la especificidad (Lazcka, Campo y Muñoz 2007).

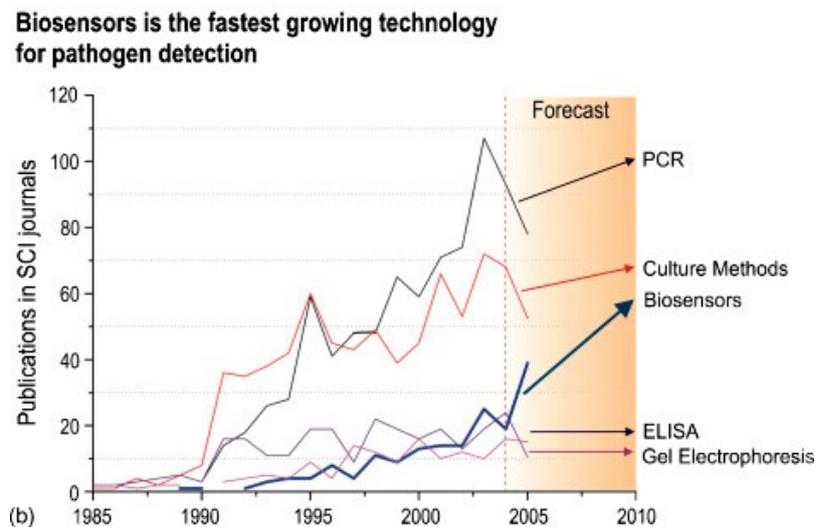


Figura 2.1: Número de trabajos publicados de detección de patógenos desde 1985 empleando diferentes técnicas de biodetección. (Lazcka, Campo y Muñoz 2007)

Otra característica que ha hecho a los biosensores crecer mucho más que el resto, es la capacidad de miniaturización, es decir, con el desarrollo de la tecnología a escala micro- y nano-, se ha conseguido un uso de volúmenes más pequeños, así como una producción masiva, con el objetivo de acortar mucho más el tiempo de espera y los costes. Además, se ha llegado a alcanzar un estudio de varios analitos en el mismo dispositivo (Lazcka, Campo y Muñoz 2007).

2.2 Definición de biosensor y componentes

Se puede decir que un biosensor es un dispositivo analítico que permite la detección de diferentes sustancias o analitos diana (por ejemplo urea, glucosa o diferentes pesticidas). La detección se produce a través de los biorreceptores, que llevan a cabo un reconocimiento molecular específico y de alta afinidad con el analito, que se llama biorreconocimiento. Dicha detección se efectúa de forma rápida y directa a partir del transductor, que transforma la interacción en una señal medible, que se amplifica y se procesa (Thévenot y col. 2001).

Por otra parte, cabe destacar que los transductores pueden ser de diferentes tipos, los cuales se tratarán en concreto en la sección 2.4, tales como los de carga eléctrica, potencial, corriente, actividad óptica, entre otros (Chakraborty y Hashmi 2017).

También, aparte de los componentes ya mencionados, se ha de tener en cuenta el circuito electrónico que se dedica a amplificar la señal, pasarla de analógica a digital y procesarla. Después de ello, los resultados pueden ser visualizados a través del ordenador, que combina diferentes *softwares* y *hardwares* para ofrecer una señal de salida y poder de esta forma examinarlos (Bhalla y col. 2016).

2.3 Parámetros básicos

Los parámetros que caracterizan el funcionamiento de un biosensor para su validación son:

- Sensibilidad: es el ratio entre la señal de salida y la propiedad medida (Guider y col. 2015). En el caso de medir el cambio del índice de refracción, se define como el cociente entre la variación de la longitud de onda (λ) y la variación del índice de refracción (n) (ver Ecuación 2.1). Las unidades serían nm/RIU, siendo RIU las unidades del índice de refracción, por sus siglas en inglés.

$$S = \frac{\Delta\lambda}{\Delta n} \quad (2.1)$$

- Límite de detección (LOD): mínima cantidad de analito que puede ser detectada por el biosensor (Bhalla y col. 2016).
- Límite de cuantificación (LOQ): mínima cantidad de analito que puede ser detectado de forma cuantitativa y no cualitativa (García Reyes 2013).
- Linealidad: rango de concentraciones en el que la respuesta del biosensor es directamente proporcional a la concentración. Todo esto permite tener un modelo capaz de predecir el comportamiento del biosensor, para obtenerlo, es necesario calibrar el instrumento a partir de las denominadas curvas patrón de calibración (Bhalla y col. 2016; García Reyes 2013).
- Exactitud: se entiende esta propiedad como el grado en el que el dispositivo es capaz de obtener un resultado experimental similar al valor teórico o de referencia, es decir, la desviación del resultado obtenido respecto a la medida verdadera (García Reyes 2013).
- Precisión: puede definirse esta propiedad como la capacidad de realizar sensados bajo las mismas condiciones y obtener en todos ellos resultados similares o iguales entre sí, es decir, la coherencia entre medidas o reproducibilidad entre diferentes ensayos (García Reyes 2013).
- Selectividad: es una de las características más relevantes de estos dispositivos, permite, en una muestra real de varios componentes, tener la capacidad de detectar el analito diana sin interferencia del resto (Bhalla y col. 2016).

Existen otras propiedades que también son relevantes a la hora de valorar un biosensor: el rango de trabajo o rango de valores entre los que es capaz de trabajar; el tiempo en el que es capaz de dar una respuesta, es importante la rapidez de estos dispositivos; el fondo de escala o valor máximo que se puede medir en el sensado... (Chakraborty y Hashmi 2017)

2.4 Clasificación de los biosensores

Los biosensores pueden ser clasificados en función del biorreceptor o el transductor que emplean, tal y como se resume en la Tabla 2.1 (Kaur, Bhosale y Shrivastav 2018).

Elemento de reconocimiento biológico		Transductor				
Catalítico	Afinidad	Electroquímico	Óptico	Piezoeléctrico	Mecánico	Térmico
Enzimas	Anticuerpos	Amperométricos	Onda evanescente	Másico (QCM)	Micropalanca	Termistor
Tejidos	DNA-aptámeros	Potenciométricos	Fibra óptica	Acústico (SAW)	Micro-electromecánicos (MEMS)	
Células enteras	Receptores	Conductimétricos	Resonancia del plasmón superficial (SPR)		Nano-electromecánicos (NEMS)	
	Oligonucleótidos	Transistor de efecto campo sensible a iones (ISFET)	Fluorescencia			

Tabla 2.1: Posible clasificación de los diferentes tipos de biosensores según la bibliografía científica (Kaur, Bhosale y Shrivastav 2018; Alhadrami 2018)

En primer lugar, según el reconocimiento biológico, los biosensores pueden ser catalíticos o biosensores enzimáticos. Estos están basados en la reacción catalítica que se produce en el complejo enzima-sustrato que provoca una señal alta detectable fácilmente, con una afinidad y sensibilidad elevadas (Kaur, Bhosale y Shrivastav 2018; Alhadrami 2018). El ejemplo más común es el biosensor de la glucosa.

Por otra parte, en esta categoría también se incluyen los biosensores de células enteras que utilizan células procariotas o eucariotas genéticamente modificadas, para realizar sensados de toxicidad o carcinogenicidad de forma bastante específica. En su mayoría, se basan en la luminiscencia producida en los propios seres vivos o bioluminiscencia (Alhadrami 2018).

Si se trata del reconocimiento por afinidad, están los inmunosensores. Estos utilizan el reconocimiento antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) para dar lugar a una señal captada por el transductor, siendo el antígeno un receptor del anticuerpo concreto, dando una señal de gran especificidad, estable y adaptable (Kaur, Bhosale y Shrivastav 2018).

En esa misma categoría se encuentran los biosensores de DNA-aptámeros, secuencias monocatenarias de DNA (ssDNA), y dotan a estos biosensores de una elevada estabilidad y especificidad (Chakraborty y Hashmi 2017; Alhadrami 2018).

Según el tipo de transductor existe otra clasificación. En ella, en primer lugar, se trata la transducción electroquímica, en la que existen biosensores como los amperométricos, cuyo funcionamiento se basa en la medida de la corriente que se produce en reacciones de oxidación o de reducción de la sustancia electroactiva correspondiente (Thévenot y col. 2001).

Los potenciométricos que miden la diferencia de potencial que se genera entre un electrodo que actúa como referencia y el electrodo indicador (Thévenot y col. 2001), el biosensor de transistor de efecto de campo sensible a iones (ISFET) (Chakraborty y Hashmi 2017) o, biosensores conductimétricos (Thévenot y col. 2001).

En los piezoeléctricos se encuentran las microbalanzas de cristales de cuarzo (QCM), cuya frecuencia de oscilación se modifica cuando cambia la masa depositada sobre su superficie durante los eventos de biosensado (Alassi, Benammar y Brett 2017) y el biosensor acústico, conocido como de superficie de onda acústica (SAW), donde, una onda acústica, que puede ser guiada o no, se propaga por la superficie del sustrato, y esta energía queda confinada de manera que, si se expone al analito, se producirá un cambio en masa que provocará una variación en la frecuencia, amplitud o fase de la onda (Rocha-Gaso y col. 2009).

Dentro de la transducción mecánica, se encuentra el biosensor Micro/Nano-electromecánico (MEMS/NEMS). A esa escala, estos materiales tienen buenas propiedades mecánicas y tribológicas que pueden usarse como cantiléver. Cuando una partícula se une a la superficie del dispositivo, cambia sus propiedades físicas que pueden ser detectadas, por ejemplo, la frecuencia (Bhushan 2007).

En la transducción térmica, se detecta el calor producido en distintas reacciones enzimáticas. Cabe destacar que tienen una menor sensibilidad que otros (Yakovleva, Bhand y Danielsson 2013).

Y, por último, se encuentran los biosensores ópticos que son un mecanismo, tanto de detección como de análisis, con una importante aplicación en el ámbito de investigación biomédica, entre otros. Esto se debe a que no le afecta las interferencias electromagnéticas, a la capacidad de realizar teledetección y, en muchas ocasiones, permitir la multiplexación en un mismo dispositivo, permitiendo realizar varias medidas diferentes simultáneamente, dotándolo de una efectividad mayor. Normalmente, se puede clasificar entre los biosensores ópticos con marcaje y sin marcaje (X. Fan y col. 2008).

2.4.1 Biosensor óptico con marcaje

Uno de los biosensores más conocidos de este tipo es el basado en fluorescencia. Como es sabido, la fluorescencia se produce en partículas que pasan de un estado excitado a uno fundamental, emitiendo luz. Esto ha de ser producido por una fuente de luz exterior, para que así se pueda realizar una emisión a una longitud de onda superior (Kaur, Bhosale y Shrivastav 2018).

Asimismo, se le conoce habitualmente como un método basado en etiquetas, ya que las moléculas diana u objetivo han de ser marcadas para poder detectarlas. Por ello, según la intensidad de la fluorescencia que se ha emitido, se puede conocer la fuerza de interacción que tienen entre sí. Como ventajas tenemos la gran sensibilidad, pero, sin embargo, son procesos tediosos por el etiquetado meticuloso a realizar, así como la dificultad de obtener resultados cuantitativos (X. Fan y col. 2008).

2.4.2 Biosensor óptico sin marcaje

En este caso, existen diferentes métodos para realizar la detección como pueden ser la variación del índice de refracción (IR) o la absorción óptica, entre otros. Cabe destacar que los biosensores utilizados para obtener los resultados del presente trabajo son sin marcaje.

Los biosensores ópticos sin etiquetas más habituales actualmente son los basados en resonancia superficial, los de onda evanescente, los interferómetros, los que utilizan guía de ondas o resonadores, y también los de fibra óptica (X. Fan y col. 2008; Kaur, Bhosale y Shrivastav 2018). Algunos de los más relevantes serán detallados a continuación.

2.4.2.1 *Biosensor basado en la resonancia de plasmón de superficie*

Este tipo de biosensores ópticos son de los más desarrollados con muchos campos de aplicación entre los cuales se destaca la biotecnología o la biomedicina. De forma simplificada, en estos dispositivos se excita la interfaz metal-dieléctrico que poseen, si esto se produce en un ángulo concreto, se produce un plasmón superficial. Si se genera una detección o reconocimiento del analito diana, se modifica el IR, y, por ello, las características de propagación de esa onda variarán, lo cual puede medirse a través del cambio de fase o de longitud de onda (Guo 2012).

2.4.2.2 *Biosensor de fibra óptica*

Este biosensor posee un mecanismo de transducción en el que utiliza la fibra óptica, y unas de sus ventajas son la gran selectividad y el pequeño límite de detección. Estos dispositivos consisten en una fibra cilíndrica que posee un recubrimiento, por ejemplo de sílice, y un núcleo, que suele doparse con germanio. Se realiza de esta manera para que el IR interno sea mayor que el externo y se produzca un fenómeno denominado reflexión total interna (TIR) y propague la luz.

Para hacer a esa luz interactuar con los analitos, se necesita un campo evanescente, que con el recubrimiento no existe, por tanto, se deben hacer zonas especializadas para detección que reduzcan o eliminen esa capa y permitan al campo evanescente interactuar con las sustancias que se desee. Existen diferentes formas de realizarlo, las más usadas suelen ser: dejar al descubierto el núcleo en una zona, estrechar el recubrimiento (como si fuera un cono), con forma de U o con la punta en forma de cono a través de la cual detectar (Leung, Shankar y Mutharasan 2007).

2.4.2.3 *Biosensor basado en anillo resonador*

Cabe mencionar que están compuestos por un anillo a través del cual se propaga la luz. Esta lo hace principalmente a través de modos de galería susurrante (WGM), los cuales realizan la detección del analito por el campo evanescente que se genera en la superficie del mismo. La cantidad de pérdidas del resonador se determina a través del factor de calidad (Q), que cuánto más pequeño es, indica una mayor cantidad de pérdidas. Hasta ahora, se han implementado de diferentes formas, entre ellas está la de anillo, disco microtoroide, microesferas... (X. Fan y col. 2008)

2.4.2.4 *Biosensor basado en el interferómetro de Mach-Zehnder*

El mecanismo de este sensor se basa en la entrada de una luz láser en la guía de onda monomodo, y que pasa a dividirse en dos, es decir, tiene forma de Y. Una de las ramas está cubierta por una capa de revestimiento y la otra posee una zona abierta donde interactúa con el analito mediante el campo evanescente. Esta interacción genera un desfase de la onda respecto de la de referencia, que puede detectarse mediante la interferencia de ambas cuando las ramas se vuelven a juntar (X. Fan y col. 2008).

Además del mencionado, existen otros biosensores que utilizan interferometría, tales como el interferómetro de Young, de retrodispersión, o el protagonista de este trabajo, ya que es **el utilizado en todas las medidas realizadas, el interferómetro de Fabry-Pérot**, como se verá de forma detallada a continuación en el Capítulo 3.

Biosensor óptico basado en Fabry-Pérot

Este biosensor óptico sin marcaje, en concreto, es el que se basan todas las medidas y pruebas de sensado del trabajo. Esto se debe a que las muestras están hechas de materiales tales como silicio poroso (SiP), nanofibras poliméricas (NFs) u otros elementos porosos, que, al ser iluminados, actúan como una cavidad de Fabry-Pérot. De forma genérica, puede considerarse que estas cavidades están formadas por una capa de un material determinado, como los ya mencionados, que arriba y abajo tienen una interfaz con otros medios donde se producen diferentes reflexiones. Este espectro de reflectividad producido posee un perfil con máximos y mínimos (véase Figura 3.1).

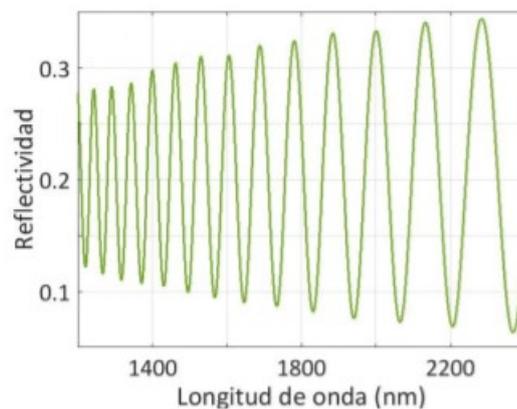


Figura 3.1: Representación del espectro de reflectividad de una cavidad Fabry-Pérot hecha de SiP (Martín Sánchez 2019)

La posición de los máximos, en longitud de onda, viene definida por la Ecuación 3.1, en la cual λ es la longitud de onda, m es un número entero, n_{eff} es el índice de refracción efectivo de la monocapa porosa y d su espesor (S. Ponce-Alcántara y col. 2018).

$$\lambda_m = 2 \cdot n_{eff} \cdot d / m \quad (3.1)$$

Además, lo que indica la Ecuación 3.1 es que si con un espesor fijo se produce un cambio de índice de refracción, varía la longitud de onda, es decir, se desplaza el espectro de reflectividad, que es lo que ocurre en las mediciones realizadas a lo largo del presente trabajo.

3.1 Silicio poroso como transductor

En los últimos años, una de las estructuras que más se está utilizando en los distintos biosensores, sobre todo en los fotónicos, es el silicio poroso (SiP). Una de las principales razones es porque la interacción con el analito sucede dentro de la propia estructura, ya que posee numerosos poros, proporcionando una gran sensibilidad (Caroselli y col. 2017).

Los campos en los que el SiP es aplicable son optoelectrónica o biomedicina, por ejemplo. En el primero, se destaca la capacidad de control de las propiedades ópticas. En el campo de la biomedicina, cabe mencionar la geometría del SiP, que se puede modificar según tus necesidades, y, unas de las características más importantes, la biocompatibilidad y biodegradabilidad. Por todo ello, se puede utilizar para la entrega de medicamentos, inmunoterapia para el cáncer o en biodetecciones (Martín-Sánchez, Salvador Ponce-Alcántara, Martínez-Pérez y col. 2019).

Asimismo, los poros dotan al SiP de una gran superficie de trabajo (gran ratio de superficie-volumen), muy útil para biorreconocimiento. Por último, la posibilidad de miniaturizar el SiP ayudará a reducir los costes de estos sensores (Caroselli y col. 2017; Martín-Sánchez, Salvador Ponce-Alcántara y García-Rupérez 2019).

Para los dispositivos ópticos es capaz de formar substratos desde monocapas y filtros de Fabry-Pérot, hasta multicapas y microcavidades, entre otras (Caroselli y col. 2017).

El SiP se forma a partir de un ataque o grabado electroquímico, en el que básicamente se produce una anodización, que consiste en una disolución de los cristales que forman el silicio, en una solución de ácido fluorhídrico (HF), y, de forma externa, un campo eléctrico controla la reacción, así como las cargas libres que existen (Martín-Sánchez, Salvador Ponce-Alcántara y García-Rupérez 2019; Martín-Sánchez, Angelova y García-Rupérez 2020).

Los poros que forman la estructura crecen de dos maneras distintas, o una combinación de ambas, según la reacción que se produzca: a partir de la misma disolución de silicio en el fluoruro, o a través de una oxidación de este y posterior dilución. Estas reacciones al comienzo de la fabricación son aleatorias, creando agujeros en la superficie, aunque después la punta de los poros se ve atraída por las cargas eléctricas y crecen verticalmente (Martín-Sánchez, Salvador Ponce-Alcántara y García-Rupérez 2019).

Estas reacciones dependen de factores como las sustancias químicas que se utilicen, así como de las condiciones eléctricas del procedimiento de fabricación. De esta manera, la porosidad se ve modificada por la corriente y por la concentración de HF: si aumentas la corriente, aumentas la cantidad de poros; sin embargo, si aumentas la concentración de HF, disminuye la porosidad (Martín-Sánchez, Salvador Ponce-Alcántara y García-Rupérez 2019). Se puede tomar estos factores como ajustables y adaptables para cada estructura de SiP.

Durante este procedimiento también existen otros parámetros graduables como el grosor que tendrá cada capa de SiP, según el tiempo del proceso de grabado y el diámetro de los poros que posea. Estos poros se pueden clasificar en microporos (menores de 5 nm) o macroporos (más de 1 μm); a menor tamaño, más sensible será la medida (Martín-Sánchez, Salvador Ponce-Alcántara y García-Rupérez 2019). También cabe destacar que es importante tener en cuenta el sensado que se realice, si se debe funcionalizar, usando anticuerpos y proteínas, debe poseer poros de mayor tamaño. En la Figura 3.2 puede verse la estructura porosa del SiP.

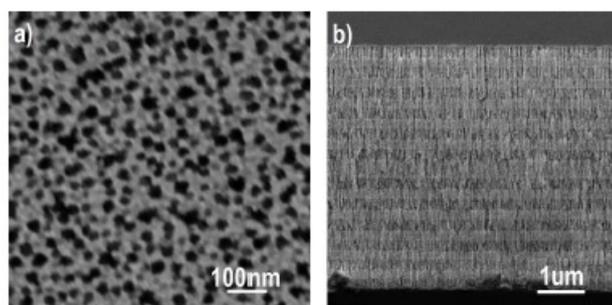


Figura 3.2: Imagen de la estructura de SiP realizada con microscopio óptico de barrido, tanto sobre la superficie (a), como en una sección (b) (Martín-Sánchez, Salvador Ponce-Alcántara y García-Rupérez 2019)

Además de todo lo mencionado, también está demostrado que fluir a través de este tipo de muestras de SiP reduce el tiempo de la detección y evita dificultades añadidas como la mezcla de disoluciones (Martín-Sánchez, Salvador Ponce-Alcántara y García-Rupérez 2019). Tal y como se realiza en este trabajo, estas muestras pueden adherirse a una celda de microfluidos para la detección.

En comparación con otros métodos de fabricación que utilizan litografía, la anodización es más rápida y menos costosa. Y si comparamos la sensibilidad de estas estructuras de SiP respecto de otras no porosas, se ha demostrado una gran superioridad de las porosas, alcanzando valores de hasta 1000 nm/RIU (Unidad del Índice de Refracción, por sus siglas en inglés) (Martín-Sánchez, Angelova y García-Rupérez 2020; Caroselli y col. 2017).

Asimismo, estas capas pueden oxidarse de forma inesperada, lo cual afecta a sus propiedades. En cambio, se puede realizar una oxidación a propósito, la cual actúa como capa protectora y preventiva del envejecimiento de la capa de SiP. En el ámbito biomédico, ayuda a mantener la estabilidad de la estructura y crea una superficie hidrofílica, facilitando la adherencia a múltiples grupos funcionales, como son las proteínas que se utilizan en el caso de este trabajo (Martín-Sánchez, Kovylyna y col. 2019).

3.2 Nanofibras poliméricas como transductor

Otra de las estructuras porosas más novedosas en biosensores fotónicos que se utilizan en el presente trabajo son las nanofibras poliméricas (NFs) (Salvador Ponce-Alcántara y col. 2019).

Estos materiales nanoestructurados están hechos a partir de fibras con diámetros que son del orden de nanómetros, con una estructura similar a una esponja, de la que se forman una serie de poros, y dotan a las NFs de una gran superficie de trabajo para sensados con una alta relación superficie volumen y sensibilidad (ver la Figura 3.3) (Martínez-Pérez y col. 2020).

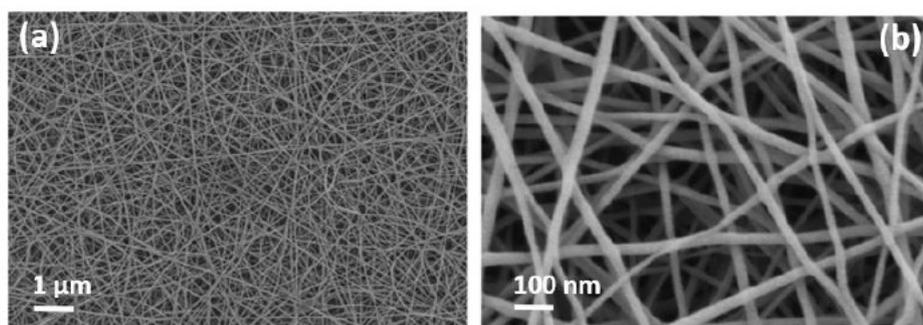


Figura 3.3: Imagen de la estructura de NFs realizada con microscopio óptico de barrido, tanto a una escala de $1\mu\text{m}$ (a), como de 100 nm (b) (Salvador Ponce-Alcántara y col. 2019)

Asimismo, la producción suele ser mediante electrohilado, un método eficiente, sencillo y económico, que puede llevar a una fabricación a gran escala, abaratando los costes de estos materiales (Martínez-Pérez y col. 2020). Es una técnica que actualmente está en crecimiento exponencial, y que es utilizada en diferentes ámbitos, como son microelectrónica, textiles inteligentes, o la biomedicina (S. Ponce-Alcántara y col. 2018).

El electrohilado se define como un proceso de creación de una fibra polimérica continua, partiendo de una solución polimérica (o con polímeros fundidos). Todo ello usa un fenómeno denominado electrohidrodinámico en el cual intervienen fuerzas electrostáticas que forman un chorro líquido con la solución que a lo largo del tiempo se solidifica, formando un compuesto a base de polímeros (Sanusi, Benelfellah y Ait Hocine 2020; Virji y Stefaniak 2014).

Además, este proceso permite adaptar los parámetros de la capa resultante de acuerdo a los requerimientos específicos. Uno de esos parámetros es el diámetro de la fibra, mediante el cual se busca un grosor determinado que, al ser depositado en una capa, posea una respuesta de Fabry-Pérot cuando se ilumine en el rango visible (Martínez-Pérez y col. 2020). Esto y todas las propiedades ya mencionadas, hace a las NFs ser muy relevantes en el campo de la detección óptica (Salvador Ponce-Alcántara y col. 2019).

Materiales y métodos

4.1 Fabricación de SiP y capas de NFs

Las muestras utilizadas para realizar los diferentes sensores del trabajo fueron de silicio poroso (SiP) y de nanofibras poliméricas (NFs).

Las muestras de SiP fueron fabricadas mediante un ataque electroquímico en el cual se utilizaron como electrolitos agua desionizada, ácido fluorhídrico y dimetilformamida (en proporción 1:1:4), y una corriente eléctrica de 24 mA durante 90 segundos. Posteriormente, se realizó un paso de oxidación térmica de la capa porosa a 800°C durante 15 minutos, con un flujo de oxígeno de 1 L/min.

Por su parte, las NFs fueron sintetizadas a partir de una solución de PA6 y sal de piridina (en un 5% y 6% respectivamente), con ácido acético y fórmico (en una mezcla de proporciones 2:1), que se electrohiló sobre silicio. El voltaje del proceso de deposición es de 60-75 kV durante 20 minutos. Posteriormente, se depositó sobre ellas una capa de oro de 3 nm para mejorar la respuesta óptica, aumentando la amplitud de las franjas Fabry-Pérot. Para estabilizarlas, se calentó a 190°C durante 3 h, de forma que evita que las muestras resultantes se hinchen en los pasos del sensor como biofuncionalizaciones y biodetecciones.

4.2 Plataformas ópticas de medida

4.2.1 Goniómetro

Para comenzar, los brazos de fibra óptica se sitúan a 15° del eje perpendicular debido al tamaño de las fibras ópticas y para evitar que disminuya la componente especular (Martínez-Pérez y col. 2020).

Uno de los brazos es el que, mediante el colimador y la lámpara halógena de tungsteno (en este caso, la HL-2000 de *Ocean Optics*), proporciona luz a la muestra en una zona precisa. El otro brazo es capaz de recoger la luz reflejada por la muestra, y se conecta al espectrómetro (en este caso se trata del *Flame T spectrometer* de *Ocean Optics*), que será capaz de ir grabando los resultados de la luz reflejada y proporcionar un espectro a tiempo real para poder visualizarlo simultáneamente al sensor (ver Figura 4.1).

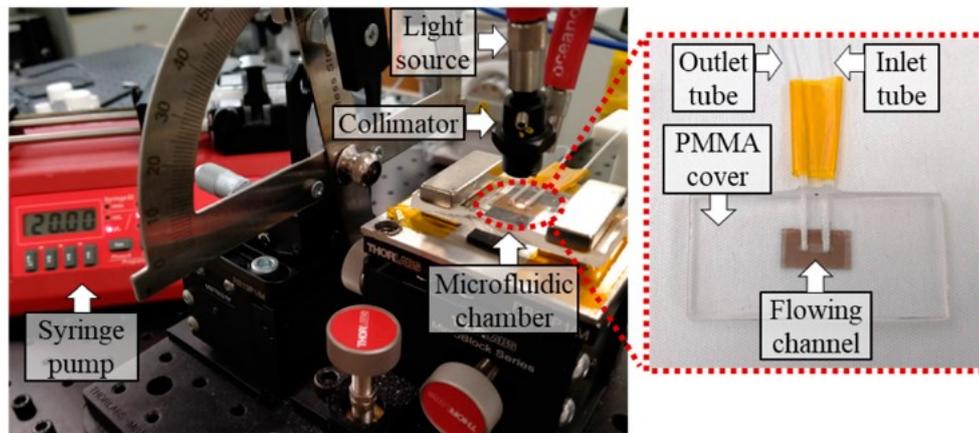


Figura 4.1: Goniómetro empleado en las medidas ópticas (izquierda) y celda microfluídica (derecha) (Martínez-Pérez y col. 2020).

4.2.2 Plataforma de medida vertical

En este caso, la ubicación de las partes es más sencilla, en este procedimiento solo hay una fibra que se sitúa de forma perpendicular a la muestra (ver Figura 4.2). Esta es la encargada de emitir la luz, por la lámpara de tungsteno (concretamente la HL-2000 de *Ocean Optics*), y de recoger la que es reflejada, hacia el espectrómetro (específicamente se trata del *Flame T spectrometer* de *Ocean Optics*), que grabará los resultados y mostrará un espectro a tiempo real durante el sensado.

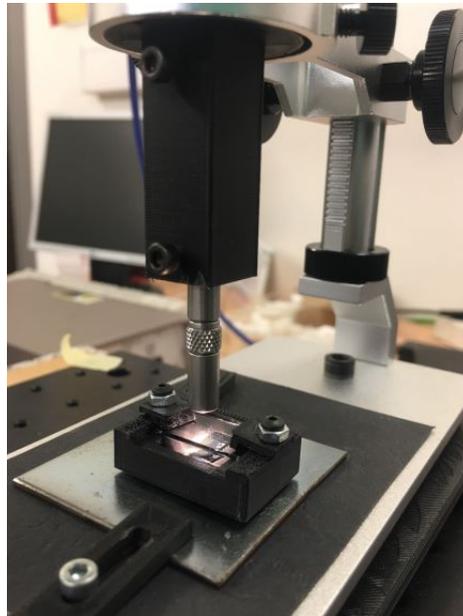


Figura 4.2: Imagen del *setup* de medida vertical durante una medida de incubación en estático, en el cual se visualiza la fibra perpendicular y la cubeta de 1 ml con cristal.

4.3 Celdas para la exposición del transductor a las disoluciones

4.3.1 Celda microfluídica

La celda microfluídica consiste en una cubierta de PMMA que, mediante un adhesivo doble cara, se pega a la muestra deseada poniendo la parte que mayor reflectividad posea justo en los dos agujeros que tiene, que se usan como canales para fluir las disoluciones. Estos canales a través de los cuales se fluye son denominados *flowing channel* en inglés (véase Figura 4.1).

De esos canales salen dos tubos, el de entrada hacia las disoluciones que se utilicen en el sensado, y el de salida hacia una jeringa que se sitúa en la bomba de extracción de volúmenes.

Para mayor estabilidad, se utilizan imanes que unen esa cámara a una placa que se puede atornillar a una base fija para poder focalizar la luz y evitar interferencias por movimientos involuntarios y posibles problemas que puedan suceder (ver Figura 4.1).

4.3.2 Celda de incubación estática

En la incubación, la celda a utilizar es una cubeta. Esta se sitúa justo debajo de la luz emitida, con la muestra adherida mediante una pegatina doble cara.

Estas cubetas son variables en volumen, por ejemplo, la de la Figura 4.2 es de 1 ml. Pueden utilizarse tanto de forma descubierta, como con un cristal (que es un portaobjetos) que evite oscilaciones y evaporaciones de las disoluciones, el cual va ajustado mediante unos tornillos y unos apliques del mismo material que la cubeta para mantenerlo fijo (ver Figura 4.2).

Estas cubetas poseen en la parte inferior un imán que la fija a la base, que es un metal atornillado también, para mantener la estabilidad en los sensados, evitando interferencias por movimientos involuntarios.

4.4 Método de sensado

4.4.1 Sensado dinámico

El sensado dinámico consiste en fluir las diferentes disoluciones empleadas para el proceso de biofuncionalización, así como la disolución en la que se ha de llevar a cabo la biodetección del analito sobre el transductor, el método se denomina *flowing experiment*. Para conseguirlo, se necesita una celda fluídica, una bomba en modo succión y un *setup* óptico, que, en este trabajo, fue el goniómetro (véase la Figura 4.3). El tubo de entrada se introduce en distintas disoluciones, y, gracias a la bomba y su movimiento de extracción, estas disoluciones circulan desde su lugar inicial, a través de la muestra, permitiendo que se realicen absorciones, hasta acabar, finalmente, en la jeringa. Mientras fluyen los volúmenes puedes visualizar en tiempo real como varía el espectro reflejado.

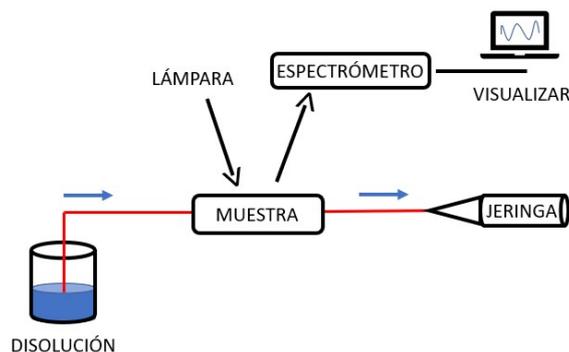


Figura 4.3: Esquema básico del método de sensado dinámico utilizado

4.4.2 Sensado estático

El sensado estático, denominado también incubación, es llamado así ya que no existe flujo de disoluciones a través de la muestra en este caso, se pipetea los volúmenes que se requieren dentro de la celda. Para llevarlo a cabo se necesita, además de la celda, un *setup* óptico, ya sea el vertical (el más común en este trabajo) o el goniómetro. La luz ilumina la celda que contiene la muestra, que es una cubeta. En el caso del *setup* vertical es capaz de emitir y colectar la luz al mismo tiempo sobre y desde la muestra, respectivamente (ver Figura 4.4). Mientras se incuban los volúmenes, puedes visualizar en tiempo real como varía el espectro reflejado.

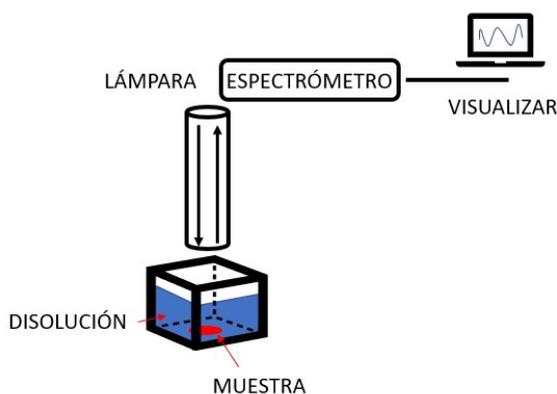


Figura 4.4: Esquema básico del método de sensado estático utilizado

Asimismo, se debe tener en cuenta que en el sensado estático el lavado de la muestra ha de ser realizado a mano, es decir, no puede ser grabado, ya que has de retirar la cubeta, a diferencia del sensado dinámico, que al fluir gracias a la bomba, el lavado puede realizarse y visualizarse también en el espectro. Posteriormente al lavado, se ha de recolocar la cubeta en el mismo punto que antes, para que la medida sea lo más exacta posible.

4.5 Procesado de datos

Para registrar el espectro del transductor se emplea el *Ocean Optics Software*. Este permite visualizar el espectro en tiempo real a la par que se realiza el experimento de sensado. Además, es capaz de almacenar una captura periódicamente, en este caso cada 4 segundos, para poder, posteriormente, procesar esos archivos (véase Figura 4.5).

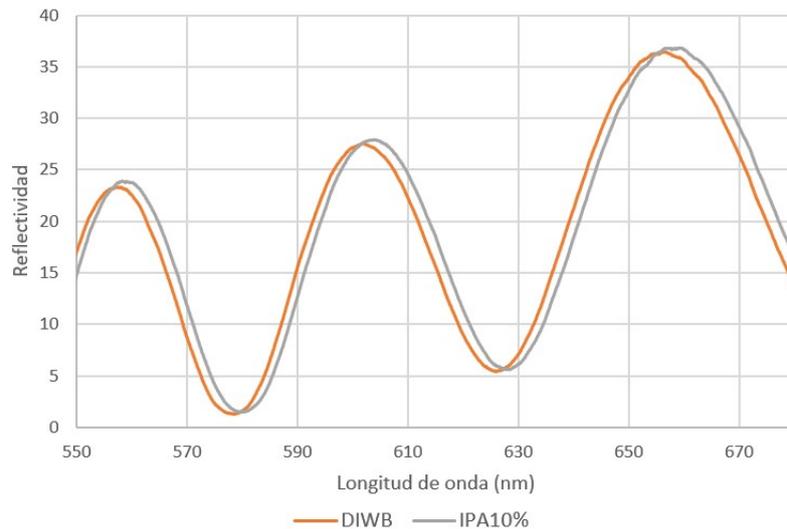


Figura 4.5: Ejemplo de los espectros de reflectividad sobre los que se estudiará el desplazamiento, en este caso se produce debido al 10% IPA (alcohol isopropílico)

Todo ello es útil para poder observar cambios durante el sensado. Los archivos obtenidos empleando *Ocean Optics* son procesados mediante *MatLab*, a partir de diferentes funciones que, en esencia, pretenden filtrar los datos brutos que se obtienen e ir siguiendo el pico que se seleccione de un espectro determinado para monitorizar su desplazamiento a lo largo del tiempo.

Para ello, se interpolan los datos primeramente, y se realiza la transformada rápida de Fourier (FFT) para reducir el ruido. A continuación, se realiza un ajuste Gaussiano sobre el pico cuyo desplazamiento espectral se pretende monitorizar y el programa busca automáticamente el punto máximo de este pico (Martínez-Pérez y col. 2020). Como todo esto se repite en cada uno de los espectros anteriores, se puede ir viendo el desplazamiento del pico indicado con el tiempo en diferentes gráficas.

Además, la posición de un pico en la FFT es igual al espesor óptico efectivo (EOT) de una capa porosa, por lo que también se procesa el desplazamiento del pico EOT y la intensidad que posee en los sensados realizados a lo largo del trabajo (véase Figura 4.6).

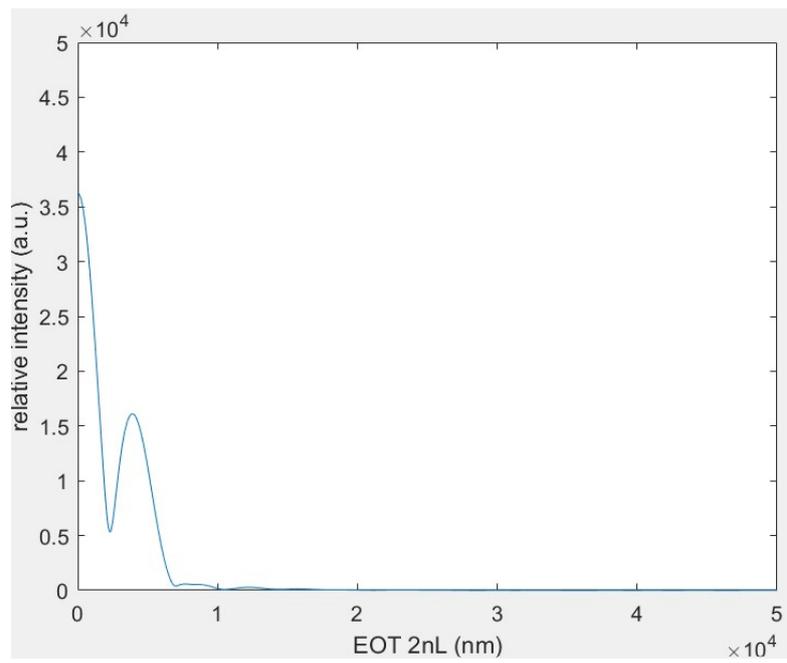


Figura 4.6: Ejemplo del espectro de espesor óptico efectivo (EOT) sobre el cual se estudiará el desplazamiento del pico

Sensado de la *Odorant Binding Protein* (OBP)

5.1 Descripción general

Las *Odorant Binding Protein* (OBP) son proteínas que existen en diferentes animales, como en los insectos, y que son capaces de transportar las moléculas odorantes a los receptores olfativos (J. Fan y col. 2011).

Las OBP son proteínas adecuadas para su uso en sensores y, además, es posible modificar su estructura para hacerlas más específicas a unas moléculas odorantes concretas, es decir, predecir su comportamiento. Esta modificación se realiza mediante mutagénesis dirigida al sitio y, en el caso de las proteínas OBP3, se reemplaza un solo aminoácido (Asn90Leu), de forma que se modifica las afinidades con diferentes moléculas odorantes (Pelosi, Zhu y Knoll 2018) (véase la Figura 5.1).

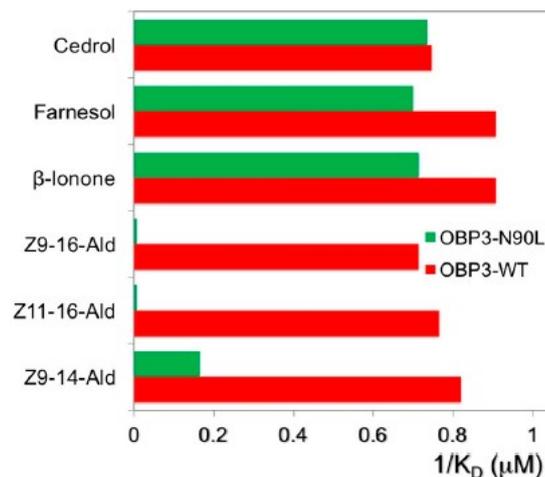


Figura 5.1: Gráfica de las afinidades que posee la OBP3 con diferentes sustancias químicas y como varía al reemplazar el aminoácido Asn90Leu (Pelosi, Zhu y Knoll 2018)

Es por todo ello por lo que en esta sección se desarrolla la biofuncionalización con la proteína OBP3, que proviene de una colaboración previa del NTC con una estudiante de la Universidad de Basilicata, así como la biodetección del farnesol, ya que es una de las sustancias con las que tiene mayor afinidad. El farnesol ($C_{15}H_{26}O$) es un alcohol proveniente de los aceites esenciales, cuyos campos de aplicación son la industria cosmética, para mejorar olores, la industria alimentaria, como aromatizante, y también tiene un gran potencial en su aplicación clínica por sus propiedades biológicas (usos como antibacterianos, antivirales, antiinflamatorios, etc). Por todo esto, supone de un gran interés poder llegar a sensarlo (Araújo Delmondes y col. 2019).

Para llevar a cabo la detección de farnesol, primero se ha realizado la biofuncionalización de la superficie de una muestra de SiP con una disolución de $0.029 \mu\text{g/ml}$ OBP3. A continuación, para la detección de farnesol se fluyeron diferentes concentraciones del mismo ($10 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ y $200 \mu\text{M}$). Previamente a fluir la proteína OBP3, se llevó a cabo un control negativo en el que se fluyó farnesol $400 \mu\text{M}$ para demostrar que sin la OBP3 no se detecta.

Todo ello se realizó tanto de forma dinámica, fluyendo las diferentes disoluciones, como de forma estática, incubando en una cubeta las sustancias.

5.2 Dinámico

5.2.1 Protocolo utilizado

En primer lugar, se realizó este sensado de forma dinámica, empleando la celda de microfluídica descrita en la subsección 4.3.1 (véase Figura 4.1).

En el paso de la calibración, se fluyeron concentraciones crecientes de etanol, 1%, 2% y 5%, para calcular la sensibilidad de la estructura de SiP. Cada una de ellas estuvo fluyendo 10 minutos.

A continuación, se realizó un control negativo, fluyendo agua desionizada, 1% etanol en agua desionizada y $400 \mu\text{M}$ farnesol en 1% etanol para comprobar que, en ausencia de OBP3, la detección no se produce, y que los posteriores desplazamientos generados por el farnesol una vez biofuncionalizada la superficie con OBP3 son causados por una detección del mismo y no por una perturbación de la medida. El farnesol se dejó fluyendo 15 minutos. Después, se realiza un lavado de la muestra también con etanol y agua.

Seguidamente, se biofuncionaliza la superficie del SiP, mediante la adsorción de la proteína. Para ello, se fluye agua desionizada, el tampón de 50 mM Tris, y la proteína OBP3 a una concentración de $0.029 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en 50 mM Tris durante 30 minutos. A continuación, se lava la muestra con el mismo tampón, así como con agua. En este paso, se esperaría un desplazamiento progresivo del espectro que indique la adsorción de la proteína.

Por último, para la detección del farnesol, se fluye 1% etanol, y las disoluciones de farnesol, en orden creciente de concentración, $10 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ y, finalmente, $200 \mu\text{M}$, cada una de ellas se fluyó 20 minutos. Después de ello, se lava la muestra con 1% etanol. En este caso, si el reconocimiento del farnesol por la OBP3 se ha realizado correctamente, debería verse un desplazamiento en el espectro, mayor cuanto mayor sea la concentración del farnesol.

5.2.2 Resultados y análisis

En la Figura 5.2, se muestra la calibración con una muestra de SiP. En este caso, se ven desplazamientos de 0.3 nm, con 1% y 2% de etanol, aunque no es una respuesta clara, y de 0.4 nm con el 5%, que respecto al agua desionizada suponen 0.7 nm de desplazamiento neto.

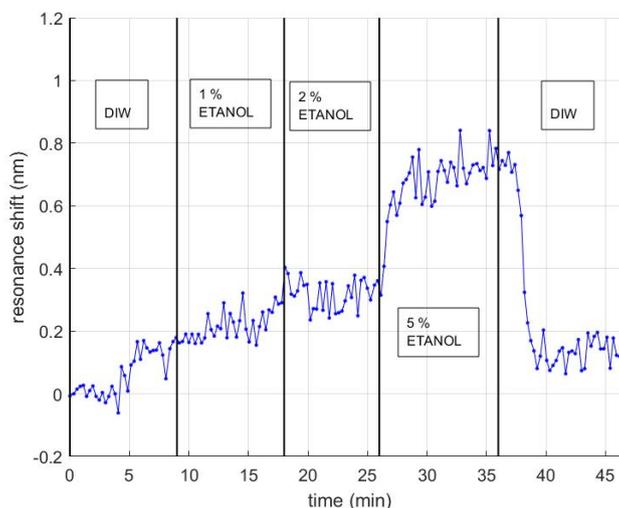


Figura 5.2: Gráfica de la calibración de una muestra de SiP utilizando diferentes concentraciones de etanol (1%, 2% y 5%) en agua desionizada (DIW, de su denominación en inglés)

A continuación, en la Figura 5.3 se muestra el resultado del paso del control negativo. Se observa un desplazamiento del espectro de 0.2 nm con el 1% etanol. Además, se puede observar que con el 400 μM farnesol no hay desplazamiento. El pico del minuto 21 se debe a la entrada de una burbuja de aire, generando una perturbación en la medida. Esto demuestra que, en ausencia de OBP3, una concentración alta de farnesol (400 μM) no puede ser detectada por SiP. También se puede ver que al realizar el lavado con agua desionizada el espectro vuelve a la posición inicial.

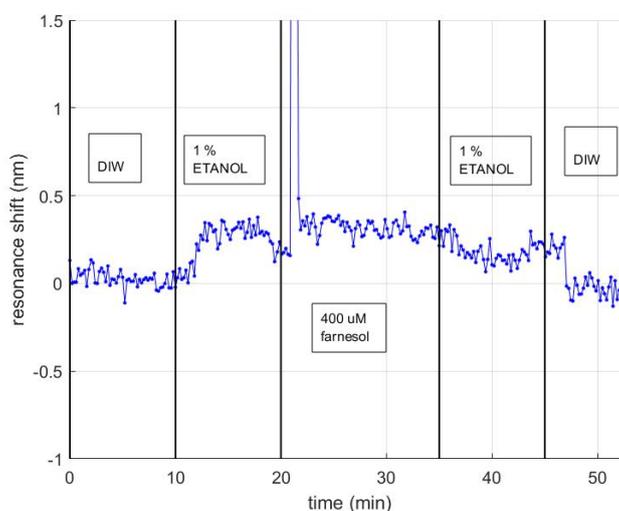


Figura 5.3: Gráfica del control negativo en una muestra de SiP con 400 μM Farnesol en 1% etanol

El siguiente paso en el protocolo es la biofuncionalización mediante la adsorción de la proteína OBP3 a la superficie del transductor. Inicialmente se fluye por la muestra agua desionizada y el tampón de 50 mM Tris.

En la Figura 5.4, al añadir el Tris se visualiza un pico en la gráfica, causado por un desplazamiento del espectro brusco hacia longitudes de onda más largas y un rápido retroceso posterior hacia longitudes de onda más cortas. Este comportamiento se ha repetido en varios de los sensores realizados, aunque la magnitud del desplazamiento espectral máximo es diferente en cada caso: 0.9 nm, 2.2 nm y 1.5 nm (véase la Figura 5.4).

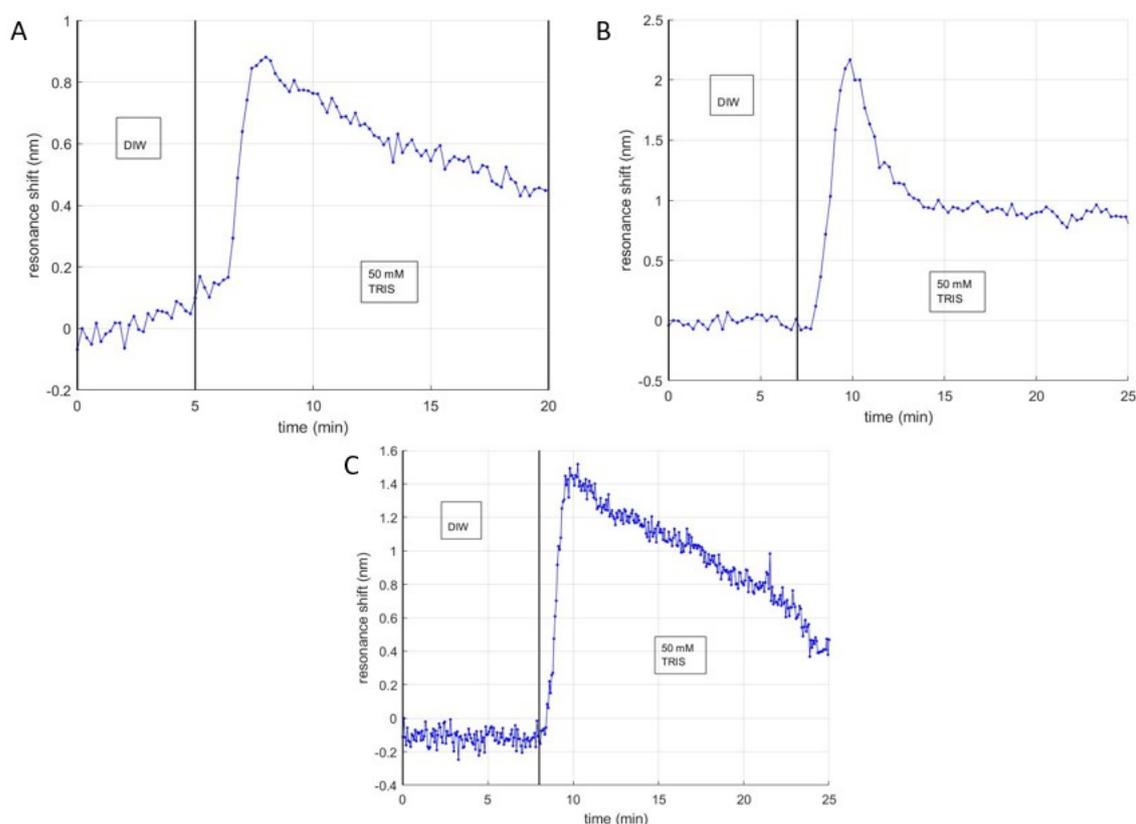


Figura 5.4: Gráfica de la forma característica generada en tres sensores con tres muestras distintas de SiP por el tampón 50mM Tris en agua desionizada (DIW, por sus siglas en inglés)

En la Figura 5.5 se presenta una biofuncionalización de la superficie de una muestra de SiP utilizando una disolución $0.029 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de la proteína OBP3 en 50 mM Tris. En ella, se observa un desplazamiento del espectro de 0.4 nm hacia longitudes de onda más largas de forma progresiva. A pesar de ello, el espectro vuelve a su posición inicial de nuevo al fluir el Tris, lo que indica que no se ha producido la adsorción de la proteína OBP3.

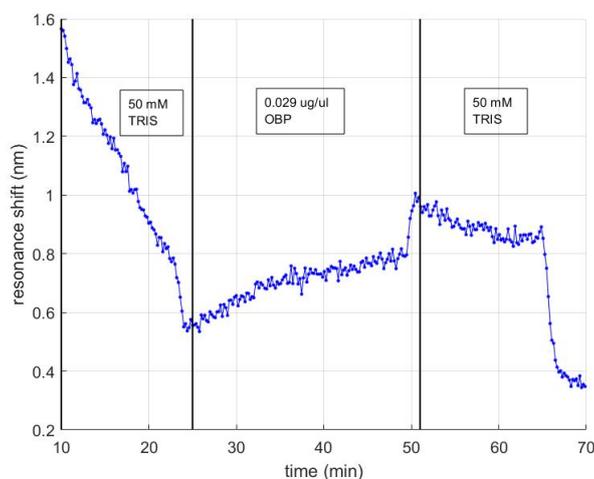


Figura 5.5: Gráfica de la adsorción de $0.029 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ proteína OBP3 en 50 mM Tris en otra muestra de SiP diferente

Con esto, se puede decir que la interacción entre la proteína OBP3 y las muestras de SiP es muy débil, ya que ha generado desplazamientos del espectro que, al volver a fluir el tampón, desaparecen, indicando que no se ha anclado la proteína al transductor. El resultado esperado era un crecimiento mayor de la gráfica en forma de curva ascendente que no volviera a la posición inicial en el lavado.

Cabe destacar que la proteína OBP3 utilizada todas las veces fue del mismo *stock*, por lo que, si esta tuviera algún defecto o degradación, se habría arrastrado a todas las medidas de sensado por igual.

Por último, se realizó la detección del farnesol, que es el último paso del protocolo. En la Figura 5.6, se observa el resultado de este paso al fluir disoluciones con concentraciones crecientes del mismo ($10 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ y $200 \mu\text{M}$). En ella, no se produjo ningún desplazamiento del espectro con ninguna de las disoluciones de farnesol empleadas. En el minuto 3, puede observarse la entrada de una burbuja de aire, que genera una perturbación en la medida.

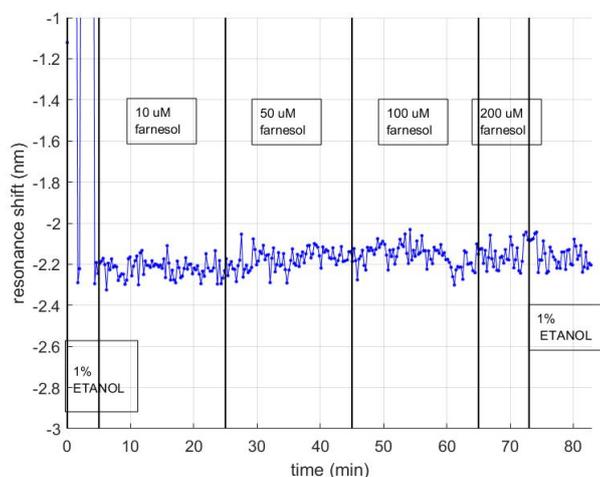


Figura 5.6: Gráfica de la detección de farnesol con concentraciones crecientes de $10 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ y $200 \mu\text{M}$; en 1% etanol

Estos resultados podrían deberse a la mala adsorción de la proteína OBP3 a la superficie del SiP. Es decir, si no se puede asegurar que la proteína esté correctamente anclada, no se producen desplazamientos en el espectro debidos a la disolución de farnesol.

Cabe destacar que el farnesol es un compuesto fotosensible, es decir, reacciona cuando está en contacto con la luz y, a pesar de haberse empleado cuidadosamente, tapando todas las disoluciones utilizadas para evitar este fenómeno, cuando estás midiendo, en el propio *setup* se emplea luz, lo que podría haber influido.

Finalmente, se decidió realizar el mismo sensado de esta proteína de forma distinta, a través de un sensado en estático, es decir, incubando en una cubeta la muestra con las distintas disoluciones, para ver si al emplear un método y un *setup* distinto, se conseguía obtener algún resultado mejor, tanto en la biofuncionalización de la muestra, como, en consecuencia, en la detección del farnesol.

5.3 Estático

5.3.1 Protocolo utilizado

En este caso, se realiza el sensado del farnesol en estático, es decir, incubando en una cubeta las distintas disoluciones. El protocolo de forma general es el mismo, aunque varía ligeramente, por ejemplo, en los lavados, que en este caso no pueden ser grabados se debe extraer la cubeta, vaciar la disolución y realizar a mano el lavado correspondiente, lo cual podría ser una desventaja respecto al sensado dinámico. Después de ello, se ha de tener en cuenta que la muestra debe colocarse en el mismo lugar exactamente que al inicio, lo cual es imposible y añade una variable más que podría suponer una desventaja respecto al sensado dinámico.

Además, en esta ocasión no se fluye la disolución ya mezclada, si no que se van pipeteando las sustancias que se mezclan directamente en la cubeta para conseguir las concentraciones que se requieren en cada caso, por lo que es una diferencia más respecto al sensado dinámico.

Otra de las diferencias más relevantes es la evaporación. En la cubeta se mantiene mucho tiempo al aire una disolución, que además es iluminada con un *spot* de luz más amplio, por lo que podría llegar a producirse evaporaciones que vayan variando la concentración de las disoluciones que tenías inicialmente en la cubeta. El cambio en el *spot* de luz se debe a que el sensado se realizó en el *setup* vertical para poder pipetear las disoluciones de forma más cómoda (se evita mojar la fibra óptica, por ejemplo).

Para realizar estas medidas, se ha utilizado una cubeta de 4.95 ml de volumen (véase la Figura 5.7). En primer lugar, se realizó una calibración con agua desionizada y etanol, en este caso al 5% durante 10 minutos, para observar cómo se comporta la muestra utilizada y su sensibilidad. Después de ello se lavó la muestra con agua.

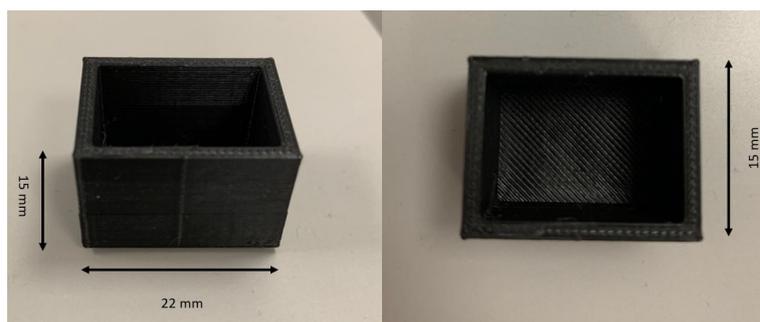


Figura 5.7: Imagen de la cubeta de 4.95 ml utilizada en el sensado estático con las medidas correspondientes a cada lado

Posteriormente, se añadió la disolución tampón de 50 mM Tris, para poder añadir después la proteína *stock* $0.109 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ OBP3, de esta forma se logró la misma concentración final usada en flujo, $0.029 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ incubando durante 30 minutos. De este modo, ambos sensados son equivalentes y puede ser comparable la adsorción de la proteína OBP3 en cada caso. Al terminar este paso, se produce también un lavado de la muestra con Tris.

Para terminar, se incubaba en una disolución de 1% etanol y se va añadiendo farnesol hasta lograr una concentración de $10 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ y, finalmente, $200 \mu\text{M}$, cada una de ellas durante 20 minutos. Es decir, las mismas de antes, para poder comparar qué proceso tiene mayor sensibilidad de ambos.

5.3.2 Resultados y análisis

En la Figura 5.8 se muestran los resultados del paso de la calibración. Se aprecia claramente un desplazamiento del espectro al añadir 5% etanol de 3 nm hacia longitudes de onda más largas. Con respecto al desplazamiento del espectro generado por el 5% etanol fluyendo, se observa que el obtenido gracias a la incubación es mayor (de aproximadamente 0.8 nm fluyendo, a 3 nm en incubación).

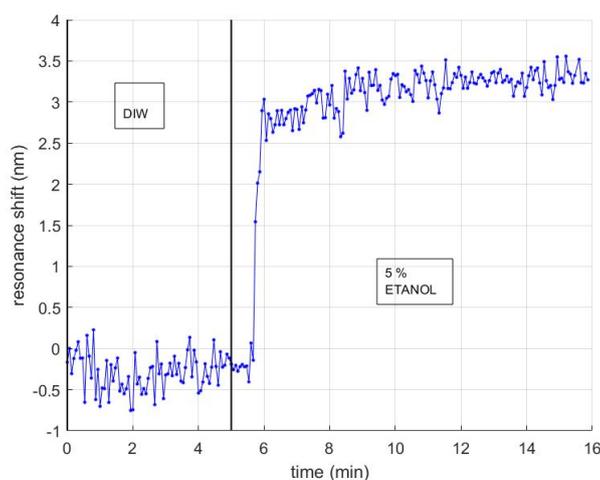


Figura 5.8: Gráfica de la calibración de una muestra de SiP mediante 5% etanol en agua desionizada (DIW, por su denominación en inglés)

La respuesta incubando es mucho más inmediata que el sensado dinámico. Al pipetear el etanol se cambia rápidamente el índice de refracción y se desplaza el espectro.

Asimismo, se calcula la sensibilidad del transductor a partir de los desplazamientos del espectro producidos en la calibración. En este caso, como sólo se dispone de dos puntos, se asume que la sensibilidad ha de ser lineal, y se utiliza la Ecuación 2.1 para calcular su valor a partir del desplazamiento del espectro y de la variación del índice de refracción entre el agua desionizada y el 5% etanol, como se observa a continuación:

$$S = \frac{\Delta\lambda}{\Delta n} = \frac{3.5}{1.3354 - 1.333} = 1458.33 \text{ nm/RIU} \quad (5.1)$$

El valor obtenido en este caso, comparado con los resultados publicados de muestras de SiP con similar fabricación, es mucho mejor, incluso excesiva, dobla el valor de la sensibilidad de la publicación (Martin-Sanchez, Angelova y Garcia-Ruperez 2020). Esto podría deberse a que en el método estático la disolución entra mejor en los poros frente a estar fluyéndola, también cabe destacar que al pipetear se puede producir un error, y aunque sean volúmenes pequeños, podría generarse un error notable en la variación del índice de refracción.

En la Figura 5.9 se muestran los resultados de la biofuncionalización con la proteína OBP3. Primero se observa el paso del tampón de 50 mM Tris, que no se llegó a estabilizar, aún estando en incubación 30 minutos. Después se puede ver un desplazamiento del espectro al añadir la proteína OBP3 de 0.5 nm, lo que indicaría que ésta se ha adsorbido. Como se puede ver, el desplazamiento del espectro es progresivo, tal y como se esperaría por la adsorción progresiva de la proteína. Cabe destacar que al fluir anteriormente el problema venía en el lavado con el tampón, ya que el espectro volvía a la línea base, y en este caso no se puede saber si se ha conseguido solventar, ya que en las medidas en incubación no se realiza el lavado *'in vivo'*.

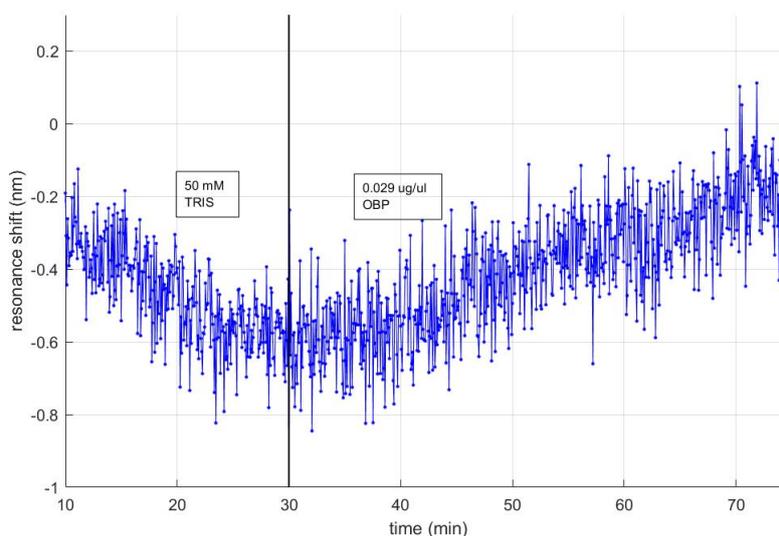


Figura 5.9: Gráfica de la incubación de SiP con una disolución 0.029 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ OBP3 para su biofuncionalización

A continuación, se procede a la detección de concentraciones crecientes de farnesol. En la Figura 5.10 se muestran los resultados, aunque no se logró visualizar ningún desplazamiento, a pesar de utilizar farnesol en altas concentraciones (hasta 400 μM farnesol). Posteriormente a ello, se realiza otro lavado de la cubeta.

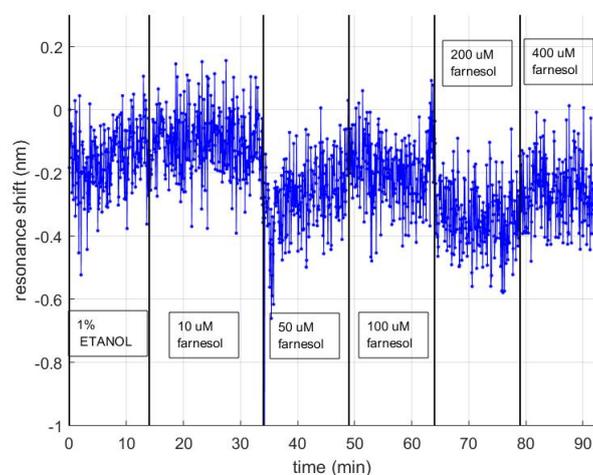


Figura 5.10: Gráfica de la incubación de SiP con farnesol en concentraciones crecientes de 10 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM y 400 μM para su detección

Por todo ello, se concluye que el sensado estático no mejora ni el proceso de biofuncionalización ni la detección del farnesol con respecto al sensado dinámico. De hecho, incluso se obtienen peores resultados que en el sensado dinámico, ya que al menos fluyendo se puede comprobar si la proteína OBP3 se queda anclada o no.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los malos resultados podrían deberse a la desnaturalización o degradación del *stock* de la proteína OBP3, que no entra por el tamaño del poro y que de haber interacción no es lo suficientemente fuerte. También es importante destacar que el farnesol es fotosensible y quizá pretender medirlo con un *setup* que necesita luz para sensar, podría no beneficiar al proceso, a pesar de ser cubierto y almacenado sin luz hasta el momento en el que se pipetea en la cubeta.

Sensado de la *Bovine Serum Albumin* (BSA)

6.1 Descripción general

La albúmina de suero bovino (BSA por su denominación en inglés) es una proteína que deriva de animales como las vacas. Suelen ser utilizadas en el ámbito biomédico como suplementos proteicos en los cultivos celulares (Aronson 2016). Además, como es una proteína pequeña y estable, puede ser utilizada como proteína modelo en el desarrollo de bioensayos.

En este sensado, se ha utilizado la proteína BSA como analito en el proceso, y anticuerpos anti-BSA (α BSA) como receptores de la proteína. Como ya está demostrada la validez de este método usando NFs y el método dinámico, es decir, fluyendo disoluciones (Martínez-Pérez y col. 2020), se trató de encontrar un método alternativo de medida como es el estático o incubación. Además, se probó a trasladar tanto el protocolo estático como dinámico a muestras de SiP.

El protocolo general consiste primero en la calibración. Después, se recubre la superficie del transductor con proteína AG como molécula intermediaria, capaz de unir posteriormente el anticuerpo. Tras la adsorción de la proteína es necesario bloquear los espacios que quedan entre moléculas para evitar la adsorción inespecífica a la superficie del transductor, tanto del anticuerpo α BSA como de la proteína BSA, para ello, se utiliza caseína. Finalmente, se unen los anticuerpos, α BSA, y posteriormente, se llevó a cabo el paso de biosensado de la proteína BSA.

Cabe destacar que, en este proceso, los lavados se realizan usando el tampón fosfato salino (1X PBS, por su denominación en inglés), también usado para la preparación de las disoluciones de biomoléculas.

6.2 Estático

6.2.1 Silicio poroso

6.2.1.1 Protocolo utilizado

En este caso, se realiza el sensado en estático, incubando las disoluciones dentro de la cubeta mostrada en la Figura 5.7. Se pega la muestra de silicio poroso (SiP) al fondo de la cubeta, para evitar movimientos que provoquen perturbaciones en la medida, y se van añadiendo las respectivas disoluciones de cada paso.

En primer lugar, se realiza una calibración. Para ello, se comienza incubando el SiP en agua desionizada, y, posteriormente, se pipetea etanol para crear una disolución al 5%, que se deja incubando durante 10 minutos. Este paso es necesario para determinar la sensibilidad de la muestra y observar que al aumentar el índice de refracción, se produce un desplazamiento del espectro hacia longitudes de onda más largas. Finalmente se realiza un lavado, esta vez con agua desionizada, que no puede ser grabado, como sucede en todas las medidas en estático.

Después de ello, se añade la proteína AG sobre el tampón de 1X PBS para alcanzar una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se deja incubando durante media hora. Esta proteína, como se ha mencionado, actúa como intermediaria entre la superficie del transductor y el anticuerpo. Finalmente, se realiza un lavado usando el mismo tampón 1x PBS.

El siguiente paso será bloquear los espacios entre moléculas de la proteína AG para que el anticuerpo no se adhiera de forma inespecífica, y para ello, se añade caseína también sobre el tampón de 1X PBS para lograr una concentración de 2.5 mg/ml, que se incuba durante 30 minutos. En esta ocasión también se realiza un lavado con el tampón 1X PBS al terminar.

Una vez bloqueada la superficie del transductor, se procede a añadir el anticuerpo (αBSA), en una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante media hora. Este paso también se realiza sobre un tampón de 1X PBS, con el que posteriormente se lava la muestra. Ahora, ya se tiene el anticuerpo unido a la muestra, y solo faltaría añadir la proteína BSA, que es el analito diana, para observar su detección.

Esta se añade sobre un tampón 1X PBS, y se deja incubando durante media hora para que se vaya uniendo poco a poco a la muestra, variando así el índice de refracción efectivo del transductor y produciendo desplazamientos del espectro, que podrán ser visualizados en las gráficas del procesado. En esta ocasión, se utiliza una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que es la misma que ha podido ser detectada con el sensado dinámico (Martínez-Pérez y col. 2020), para comparar la sensibilidad de ambos métodos.

6.2.1.2 Resultados y análisis

En la Figura 6.1 se muestran los resultados de la calibración. En el procesado de la longitud de onda (véase Figura 6.1.A), puede observarse un comportamiento no esperado, ya que el desplazamiento debería ser hacia longitudes de onda más largas, sin embargo, lo que se observa es al contrario, hacia longitudes de onda más cortas, se desplaza 1 nm, aproximadamente. En la Figura 6.1.B, se ve la representación del EOT, en la cual al añadir el 5% etanol se produce un desplazamiento de unos 2 nm.

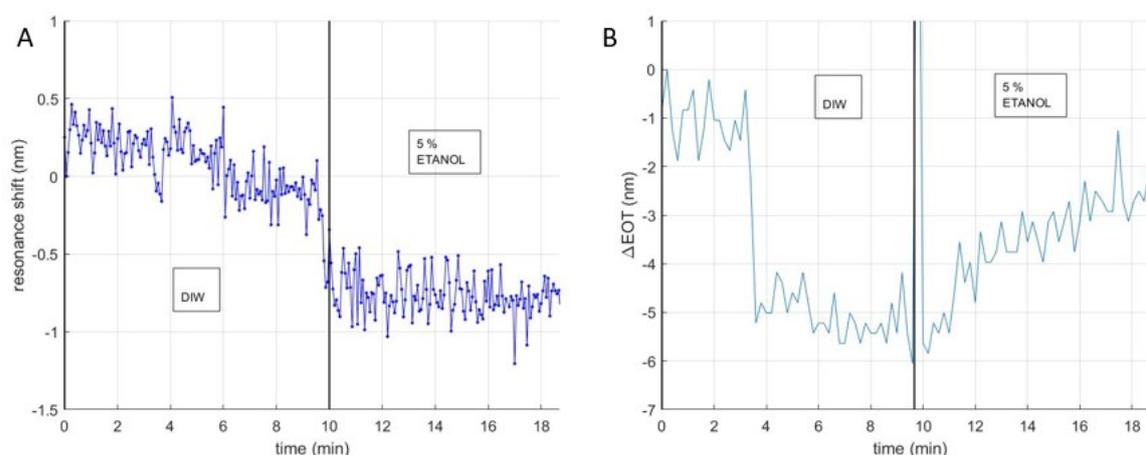


Figura 6.1: Gráfica de la calibración de una muestra de SiP mediante 5% etanol en agua desionizada (DIW, por su denominación en inglés), tanto en desplazamiento espectral de uno de los lóbulos (A), como en espesor óptico efectivo (EOT, por su denominación en inglés) (B)

El pico tan notorio del minuto 10 se produce porque, al usar una cubeta tan alta, se ha de pipetear desde arriba y es fácil generar estas perturbaciones en la medida, suponiendo todo ello una desventaja.

Además, sobre el minuto 4, se observa un desplazamiento hacia longitudes de onda más cortas de 4 nm, el cual podría deberse a la entrada del agua desionizada en la muestra de SiP o a una burbuja, puesto que en el otro tipo de procesado no se observa un cambio tan abrupto. Después de este paso, se realiza un lavado con agua desionizada.

En la Figura 6.2 se resumen los resultados del primer paso para comenzar a biofuncionalizar la muestra: la incubación con la proteína AG. En este caso, tanto en la Figura 6.2.A como en la Figura 6.2.B se observa la misma forma del sensograma, lo que es positivo. Al añadir la proteína AG se ve un pico acentuado por el pipeteo sobre la cubeta, y más tarde se estabiliza la gráfica, con un desplazamiento neto del espectro de unos 2 nm, indicando que la proteína se ha adherido correctamente a la superficie del transductor. En este paso sí se ha obtenido el resultado esperado. Si lo comparamos con los resultados publicados usando NFs en sensado dinámico (Martínez-Pérez y col. 2020), se observa que tiene la misma morfología y un desplazamiento neto del espectro similar en torno a los 2 nm. A continuación, se realizó un lavado de la muestra utilizando el tampón 1X PBS.

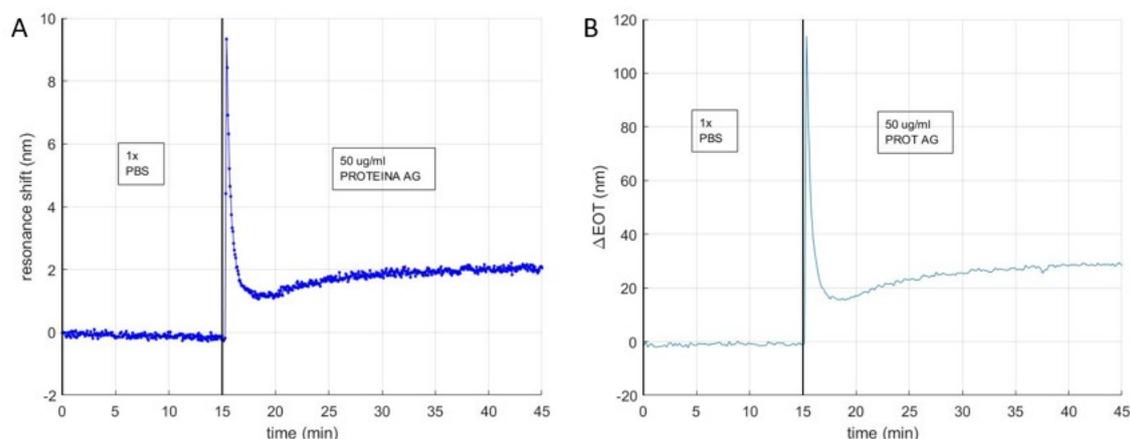


Figura 6.2: Gráfica de la adsorción en una muestra de SiP de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteína AG sobre 1X PBS, tanto en desplazamiento espectral de uno de los lóbulos (A), como en espesor óptico efectivo (EOT, por su denominación en inglés) (B)

En la Figura 6.3 se muestra el resultado del bloqueo con caseína de la superficie del transductor. En este caso, también tienen la misma forma ambas gráficas, Figura 6.3.A y Figura 6.3.B. Como se observa en la Figura 6.3.A, existe un desplazamiento del espectro de 1 nm que va creciendo y estabilizándose con el tiempo, hasta llegar casi a los 5 nm de desplazamiento neto. Asimismo, en la Figura 6.3.B, que representa el EOT, también existe un desplazamiento neto de 50 nm. Estos resultados también coinciden con los esperados, que debido a la gran concentración de caseína que se utiliza (2.5 mg/ml), el resultado lleva a un gran desplazamiento del espectro. Comparándolo con los resultados publicados de NFs en sensado dinámico (Martínez-Pérez y col. 2020), la dinámica de la gráfica obtenida es similar, además, el desplazamiento hacia longitudes de onda más largas también es similar, en torno a los 5 nm.

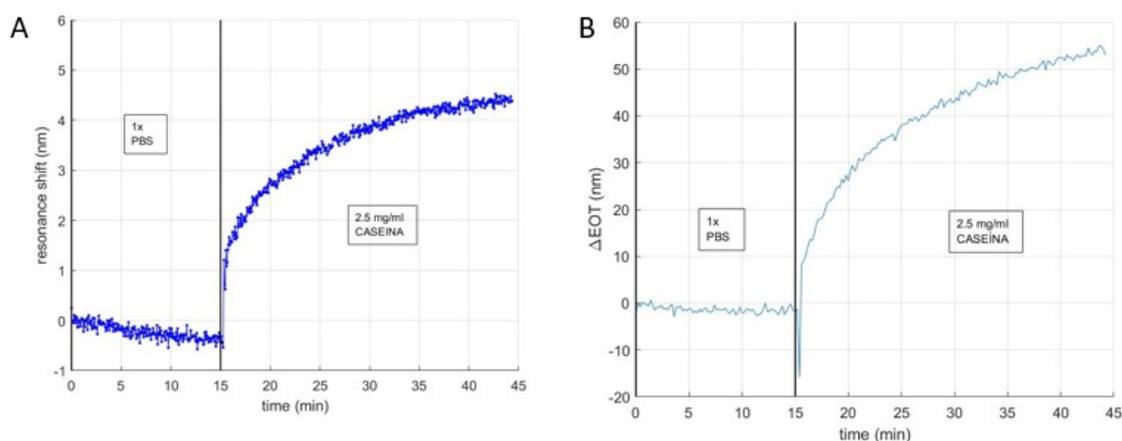


Figura 6.3: Gráfica de la adsorción de 2.5 mg/ml caseína sobre una muestra de SiP, tanto en desplazamiento espectral de uno de los lóbulos (A), como en espesor óptico efectivo (EOT, por su denominación en inglés) (B)

Después de ello, se lava la muestra con el mismo tampón 1X PBS y se procede a añadir el anticuerpo anti-BSA, que se unirá a la proteína AG. En la Figura 6.4 se muestran los resultados de este paso.

Tanto en la Figura 6.4.A, como en la Figura 6.4.B, no parece apreciarse ningún desplazamiento que lleve a pensar que se ha adherido el anticuerpo, simplemente existe un desplazamiento hacia longitudes de onda más cortas progresivo. Esto podría ser indicativo de que el anticuerpo no se ha unido a la proteína intermediaria anterior, o de que este, con unos 10 nm de diámetro, no ha podido entrar al poro, que suele estar entre 20-25 nm de diámetro, y se debe tener en cuenta que se ha incubado proteína AG previamente. En la Figura 6.4.C, que representa la amplitud del pico EOT, se ve un aumento de la intensidad del pico de unos 100 a.u. justo al añadir el anticuerpo, pero luego vuelve a decaer y no consigue estabilizarse. Ese descenso alrededor del minuto 15 puede indicar un anclaje del α BSA. Sin embargo, se reduce el pico EOT con el tiempo, lo que podría deberse a que el anticuerpo no puede entrar al poro porque ya está saturado de otras proteínas, y se habría anclado únicamente a la superficie del SiP. Posteriormente a todo ello, se lava la muestra de nuevo con el tampón 1X PBS.

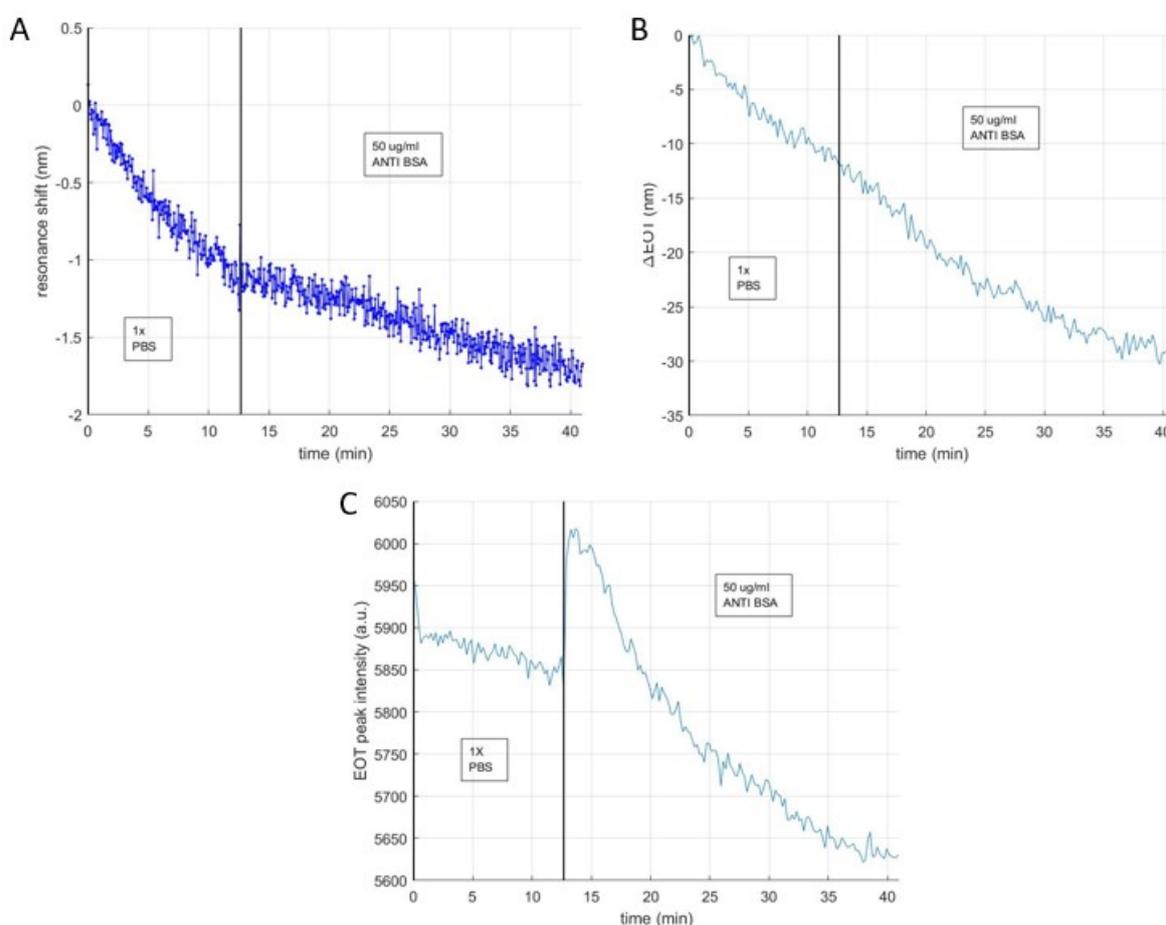


Figura 6.4: Gráfica de la incubación de una muestra de SiP con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anticuerpo α BSA sobre tampón 1X PBS, tanto en desplazamiento espectral de uno de los lóbulos (A), como en espesor óptico efectivo (EOT, por su denominación en inglés) (B), así como en la intensidad del pico EOT (C)

En la Figura 6.5 se observa el último paso del protocolo, la detección de la proteína BSA. En la Figura 6.5.A puede observarse un desplazamiento de 0.4 nm del espectro hacia longitudes de onda más cortas manteniendo la misma tendencia que con el tampón 1X PBS, esto puede ser debido a un tema mecánico, y cabe destacar que esta no es la respuesta esperada, que conlleva que esto no pueda ser considerado detección. En cambio, en la Figura 6.5.B del desplazamiento del pico EOT, se observa un desplazamiento del espectro de 8 nm hacia longitudes de onda más largas, que también sigue la misma tendencia que el tampón 1X PBS. En la Figura 6.5.C, que representa la amplitud del pico EOT, al añadir la proteína se observa un pequeño decaimiento de la amplitud, desde 8500 a 8300 a.u. Podría decirse que la disminución de la amplitud del pico EOT se debe a un reconocimiento superficial de la proteína, a pesar de que no haya entrado al poro.

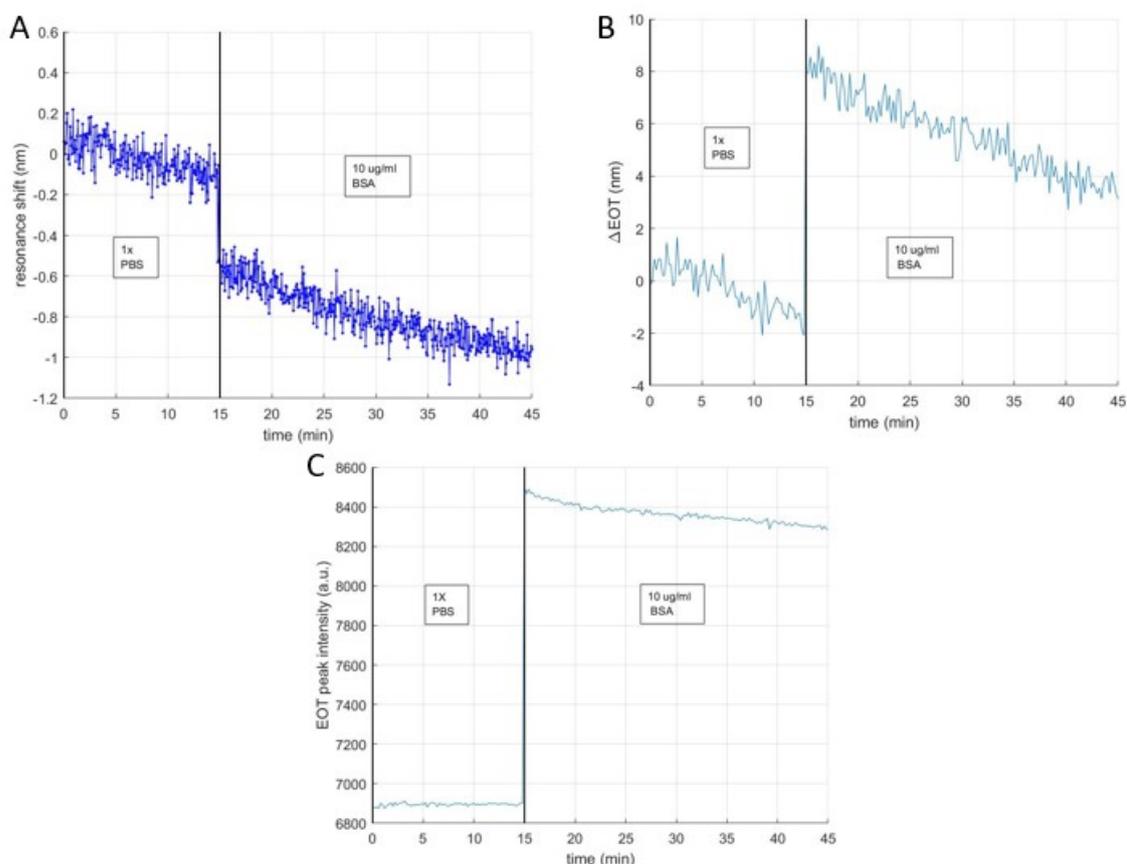


Figura 6.5: Gráfica de la detección de 10 µg/ml proteína BSA, tanto en desplazamiento espectral de uno de los lóbulos (A), como en espesor óptico efectivo (EOT, por su denominación en inglés) (B), así como en la intensidad del pico EOT (C)

Por lo tanto, el sensado de la proteína BSA únicamente podría haberse obtenido de forma superficial, no dentro de los poros como se esperaba. Esto podría deberse al uso de SiP en lugar de NFs, por ello después se intentó realizar con muestras de nanofibras, como se describe en la subsección 6.2.2.

Por otra parte, podría ser debido al uso de un *spot* de luz más ancho sobre la muestra, ya que es menos focalizado, y podría probarse la incubación en el goniómetro. Cuando esto se intentó, se observó que para visualizar bien el espectro, había que acercarse demasiado a la cubeta, y que todo ello impedía extraer cómodamente y de forma segura la cubeta para realizar los distintos lavados, es decir, evitando mojar la fibra y cambiar la configuración del goniómetro, por lo que se descartó este método de sensado.

Otra posible causa de esta falta de resultados respecto a la proteína BSA podría ser el uso de una cubeta tan grande, ya que a la hora de pipetear como se ha visto se producen grandes picos en las gráficas finales, que suponen un problema a la hora de analizar resultados. Además, con esta cubeta se necesitan usar grandes volúmenes de las disoluciones que podrían optimizarse a partir del uso de una nueva cubeta con menor capacidad.

Aparte de esto, también es necesario tener en cuenta las posibles evaporaciones que se producen y que pueden derivar en un aumento de las concentraciones respecto al protocolo inicial. Por todos estos motivos, se diseñó una nueva cubeta descrita a continuación, en la subsección 6.2.1.3.

Si después de probar todas estas modificaciones y variantes ya mencionadas, no se consigue detectar la proteína BSA como en el método dinámico publicado (Martínez-Pérez y col. 2020), es decir, fluyendo disoluciones, se podrá determinar que el método estático o de incubación no es adecuado para este sensado en concreto.

6.2.1.3 Nueva cubeta y pruebas realizadas

En la Figura 6.6 puede visualizarse la nueva cubeta, que posee varios cambios con respecto a la anterior. En primer lugar, tiene una menor capacidad, aproximadamente 1 ml, obligando a utilizar menor volumen de las disoluciones en el sensado, de forma que se optimiza el gasto de ellas. Por otra parte, el cambio más notable es la existencia de un cristal al borde de la cubeta, un portaobjetos, para prevenir las posibles evaporaciones y para evitar las oscilaciones de las disoluciones de la cubeta cuando se pipetea.

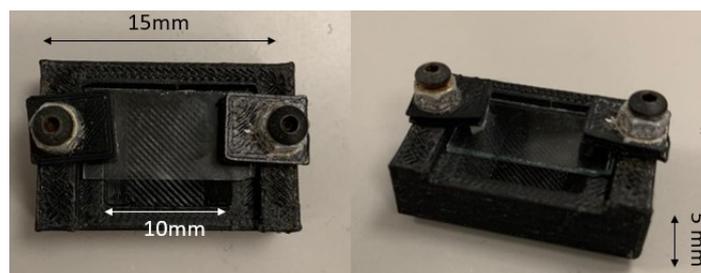


Figura 6.6: Fotografías de la nueva cubeta con cristal en las que se muestran sus dimensiones

Esta nueva cubeta posee un hueco destinado a pipetear las disoluciones, para permitir que la expansión de las mismas sea más progresiva y se eliminen los picos que se producían en el sensado a la hora de pipetear.

Además, el uso del cristal podría llegar a evitar o, al menos, disminuir los efectos de la evaporación, ya que esta es capaz de modificar las concentraciones de las disoluciones que se tenían inicialmente.

Para comprobar su funcionamiento, se realizó una calibración de una muestra de SiP. En la Figura 6.7 se observan los resultados obtenidos de incubar 5% etanol sobre agua desionizada. La Figura 6.7.A es el resultado obtenido con el uso del cristal, en el cual se produce un desplazamiento de más de 1 nm del espectro hacia longitudes de onda más largas, sin embargo, este desplazamiento no llega a estabilizarse. La Figura 6.7.B es el resultado del mismo proceso, pero sin el cristal. En este caso, se observa un desplazamiento del espectro de 0.4 nm, que sí llega a estabilizarse. Por lo tanto, podría decirse que aunque no consiga estabilizarse, utilizar el cristal provoca una respuesta mayor, lo cual podría ser útil de cara al sensado.

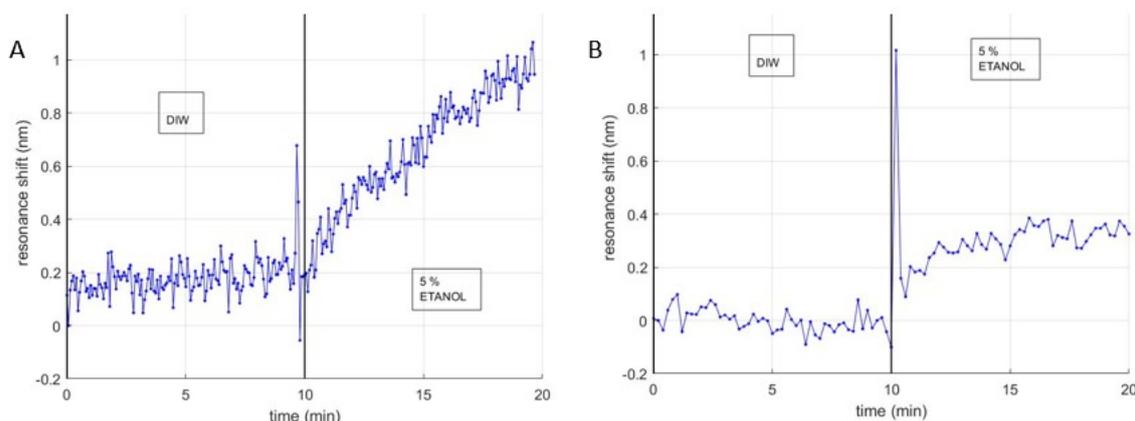


Figura 6.7: Gráficas de la incubación de dos muestras diferentes de SiP en 5% etanol sobre agua desionizada (DIW, por su denominación en inglés) en la nueva cubeta, (A) con el cristal, y (B) sin el cristal

Cabe destacar que, posteriormente a dichas pruebas, se sucedieron una serie de evaporaciones de agua desionizada cuando se estaban realizando las primeras medidas de la jornada, llegando a evaporarse hasta $950 \mu\text{l}$ en 7 minutos. Esto se podría atribuirse a la temperatura inicial que alcanza la cubeta, que evapora el agua hasta que consigue bajar y estabilizar su propia temperatura.

A todo ello se añade otra variable, la luz, que aporta energía y aumenta la temperatura. Para comprobar cuánto es capaz de afectar a la evaporación, se realizaron dos pruebas tomando capturas del espectro visualizado cada 5 minutos, dejando agua desionizada en la cubeta sin luz, por una parte, y con luz, por otra.

En la Figura 6.8 pueden observarse los resultados de las capturas del espectro obtenidas cuando se incubaba agua desionizada durante 30 minutos sin tener la muestra iluminada. En ella, se observa que el espectro no varía, es decir, no se está produciendo evaporación.

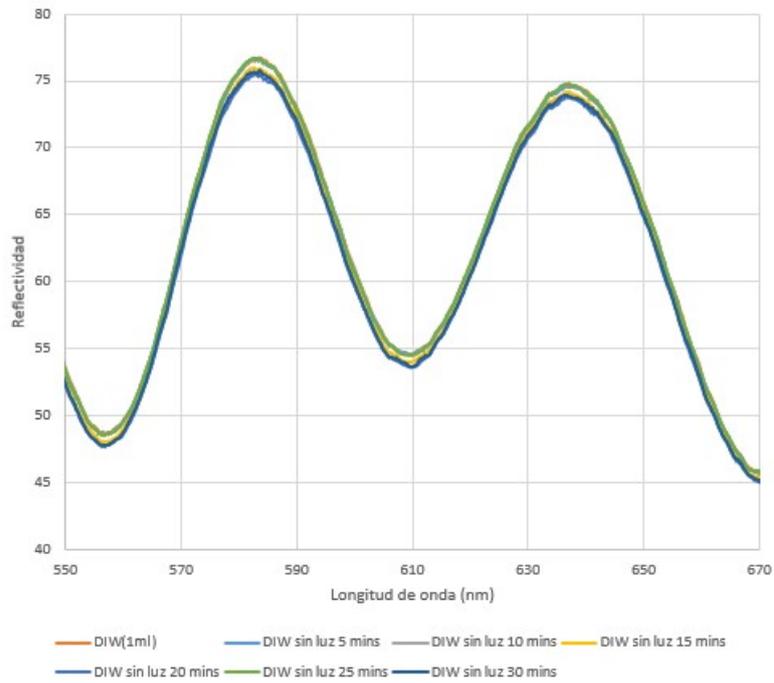


Figura 6.8: Gráfica de las capturas del espectro obtenidas dejando 1 ml agua desionizada (DIW, por su denominación en inglés) durante 30 minutos en la cubeta sin luz

En la Figura 6.9 se observa la evolución del espectro cuando la muestra está iluminada. En esta ocasión, se ve un cambio notorio a lo largo del tiempo (30 minutos), que disminuye la amplitud del espectro al inicio, y después se aumenta, conforme se va evaporando el agua desionizada.

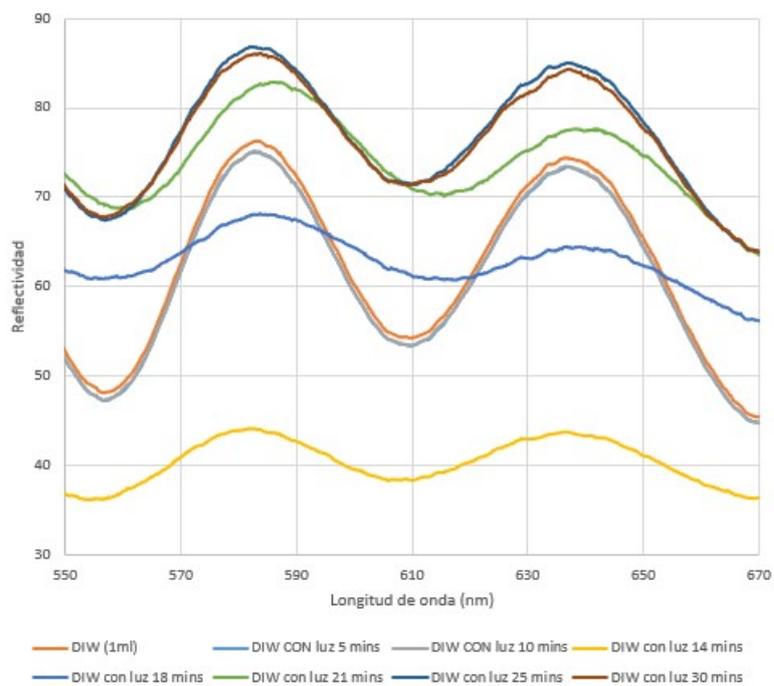


Figura 6.9: Gráfica de las capturas del espectro obtenidas dejando 1 ml agua desionizada (DIW, por su denominación en inglés) durante 30 minutos en la cubeta con luz

Por lo tanto, se podría decir que la luz es uno de los factores que favorece la evaporación de las disoluciones de la cubeta, y, aunque es necesaria para realizar las medidas, se ha de buscar una manera de mantener la temperatura de la cubeta baja, para que no evapore las disoluciones.

En la imagen de la Figura 6.10, se presenta una solución que pretende estabilizar la temperatura de la cubeta cuando se realizan medidas de larga duración. En ella, se observa el uso de una caja más grande que contenga a la cubeta en su interior. Esta, puede ser rellena de agua, de forma que estará en contacto con la cubeta y por conductividad térmica, se puede mantener la temperatura de la cubeta de forma externa y permanente, lo cual podría evitar la evaporación. En el gráfico de la Figura 6.10 se observa la estabilidad a lo largo del tiempo, 20 minutos, de 1 ml de agua desionizada, iluminando constantemente la muestra, sin producirse ninguna evaporación en este caso.

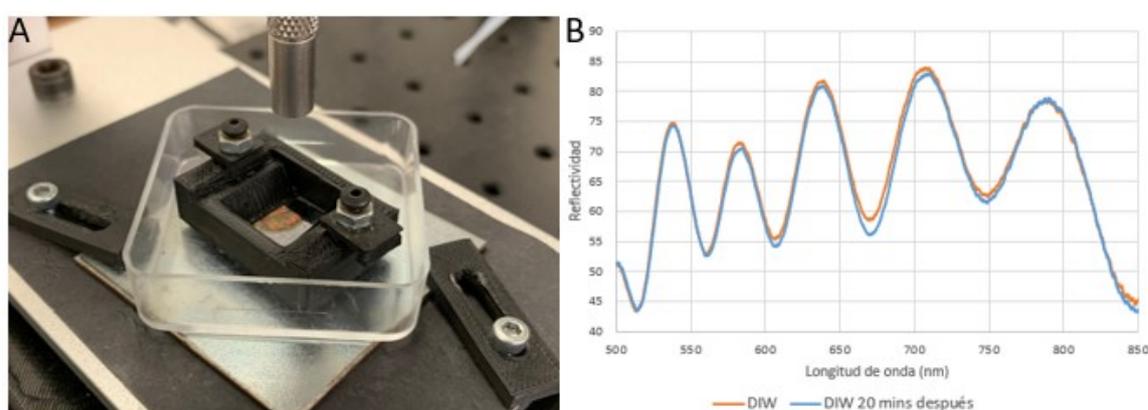


Figura 6.10: Imagen de la solución propuesta para que la cubeta mantenga la temperatura estable en una medida de larga duración (A). Capturas del espectro de reflectividad de la incubación en una muestra de SiP de 1 ml de agua desionizada (DIW, por sus siglas en inglés) durante 20 minutos (B)

Por todo esto, podría decirse que la nueva cubeta sí disminuye la aparición de los picos que se producían al pipetear las disoluciones en la cubeta anterior. Además, también se ha propuesto una manera de solucionar las posibles evaporaciones mediante contacto continuo de la cubeta con agua.

6.2.2 Nanofibras poliméricas

6.2.2.1 Protocolo utilizado

Este sensado es similar al realizado en la subsección 6.2.1, únicamente presenta dos grandes diferencias: el material que forma el transductor utilizado, y la cubeta en la que esta se adhiere para realizar la medida. La muestra en este caso está hecha de nanofibras poliméricas (NFs), que han de biofuncionalizarse, tal y como pasó con el silicio poroso (SiP) anteriormente, para poder detectar la proteína BSA.

Respecto a la cubeta, en la Figura 6.6 puede observarse la que fue utilizada. Cabe destacar que se utilizó el cristal para evitar los picos indeseados, aunque podría provocar que la medida no estabilice.

El protocolo posee las mismas partes que en la subsección 6.2.1.1, donde se encuentra la descripción completa del mismo.

Cabe destacar que este sensado es el mismo que el publicado con NFs (Martínez-Pérez y col. 2020), la única diferencia es el *setup* de medida, que en este caso es estático y en vertical, con un *spot* de luz más amplio. Esto podrá indicar si esta medida puede realizarse a través de los dos métodos o si solo proporciona buenos resultados fluyendo las disoluciones.

6.2.2.2 Resultados y análisis

En la Figura 6.11 se observan los resultados obtenidos de la calibración. En esta, puede verse un desplazamiento del espectro de unos 0.6 nm hacia longitudes de onda más largas. Posteriormente, se realiza un lavado con agua.

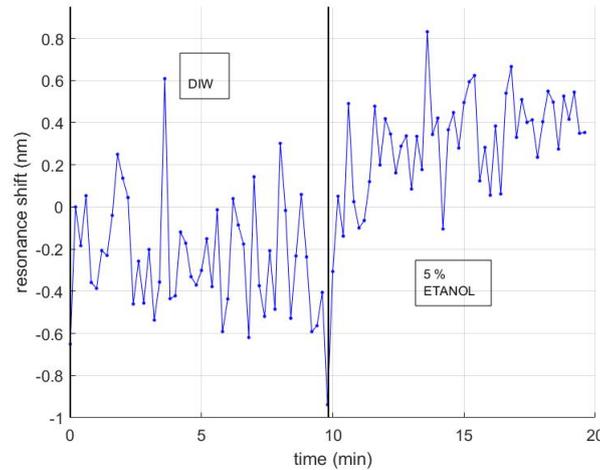


Figura 6.11: Gráfica de la calibración de una muestra de NFs incubando 5% etanol sobre agua desionizada (DIW, por su denominación en inglés)

Asimismo, se calcula la sensibilidad del transductor utilizado a partir de los desplazamientos del espectro producidos en el paso de la calibración. En este caso sólo se dispone de dos puntos, por lo que se asume que la sensibilidad ha de ser lineal, y se utiliza la Ecuación 2.1 para calcular su valor a partir del desplazamiento del espectro y de la variación del índice de refracción entre el agua desionizada y el 5% etanol, como se puede ver a continuación:

$$S = \frac{\Delta\lambda}{\Delta n} = \frac{0.6}{1.3354 - 1.333} = 250 \text{ nm/RIU} \quad (6.1)$$

Esta sensibilidad es mucho menor a la calculada anteriormente de una muestra de SiP también en incubación (1458.33 nm/RIU).

En la Figura 6.12 se visualizan los resultados de la adsorción de la proteína AG, que actúa de intermediaria para poder adherir posteriormente los anticuerpos. En ella, puede observarse un desplazamiento del espectro de unos 0.5 nm hacia longitudes de onda más largas. Posteriormente, se realizó un lavado con el tampón 1X PBS. Además, cabe destacar que la morfología de la gráfica que se genera al pipetear la proteína AG sobre el transductor es muy diferente a la morfología que se había generado al incubar la proteína AG anteriormente con la muestra de SiP. Asimismo, el desplazamiento neto del espectro que se había generado en la incubación con muestras de SiP fue mucho mayor al que se ha obtenido con las NFs (2 nm con SiP, y 0.5 nm con NFs), por lo que no se podría afirmar que la proteína AG esté correctamente adherida al transductor.

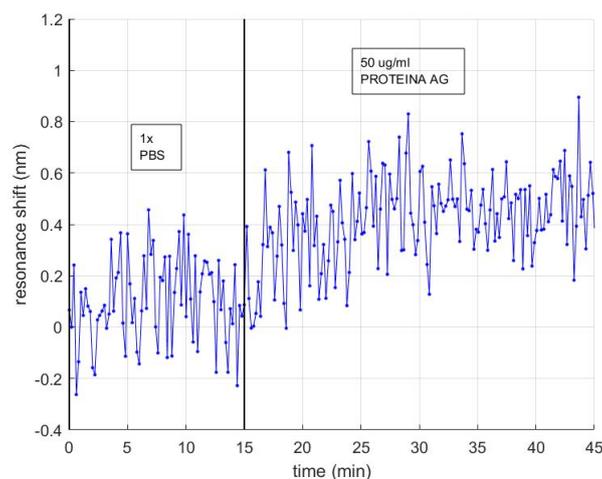


Figura 6.12: Gráfica de la incubación en una muestra de NFs de 50 µg/ml proteína AG sobre el tampón 1X PBS

A continuación, en la Figura 6.13 se observa el resultado de bloquear la superficie del transductor, para que el anticuerpo no se adhiriera de forma inespecífica. En ella se observa un desplazamiento del espectro hacia longitudes de onda más largas que sucede progresivamente, y que tiene morfología curva que finalmente estabiliza, alcanzando un desplazamiento neto del espectro de unos 4 nm. Después de ello, se realiza el lavado de la muestra con el tampón 1X PBS.

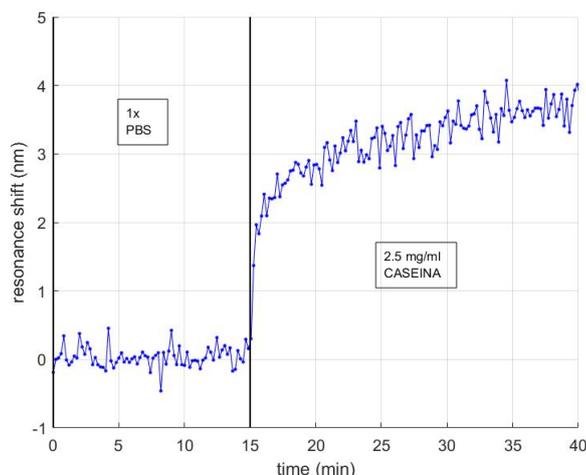


Figura 6.13: Gráfica de la incubación en una muestra de NFs de 2.5 mg/ml caseína sobre el tampón 1X PBS

La morfología de la gráfica obtenida después de incubar la caseína es similar a la obtenida previamente en el sensado utilizando muestras de SiP, además, el desplazamiento del espectro también estuvo en torno a 4 nm, lo cual podría indicar un buen resultado.

En la Figura 6.14 se observa el resultado de la incubación del anticuerpo α BSA. En ella, se observa una estabilidad sin ningún desplazamiento del espectro, solo varía alrededor del minuto 30, donde se produce un desplazamiento de 1 nm en el espectro hacia longitudes de onda más largas, que no se produce al añadir el anticuerpo, si no 15 minutos después. Estos resultados pueden estar generados por el escaso efecto obtenido en el paso de la proteína AG, que era la que debía unirse al anticuerpo, por lo que se intuye que se obtendrá un mal resultado en la biodetección de la proteína BSA. Cabe destacar que puede haber dificultades en que los reactivos se mezclen con el tampón que se tiene entre la muestra y el cristal, y puede generar respuestas más lentas e incluso peores en algunos casos. Después de ello, se realiza un lavado con el tampón 1X PBS.

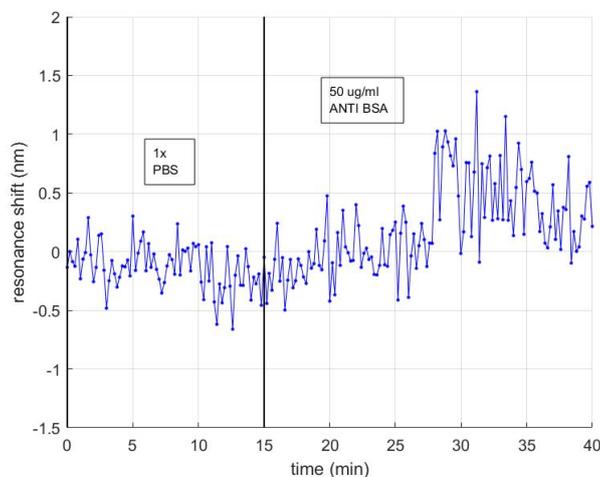


Figura 6.14: Gráfica de la incubación en una muestra de NFs de 50 μ g/ml anticuerpo (α BSA) sobre el tampón 1X PBS

En la Figura 6.15 se observan los resultados de la incubación de la proteína BSA. Como se puede observar, no se produce ningún desplazamiento del espectro, se mantiene estable. Esto podría ser debido al paso anterior, en el que no se pudo determinar que se anclaran los anticuerpos. Sin anticuerpos, la proteína BSA no puede ser detectada.

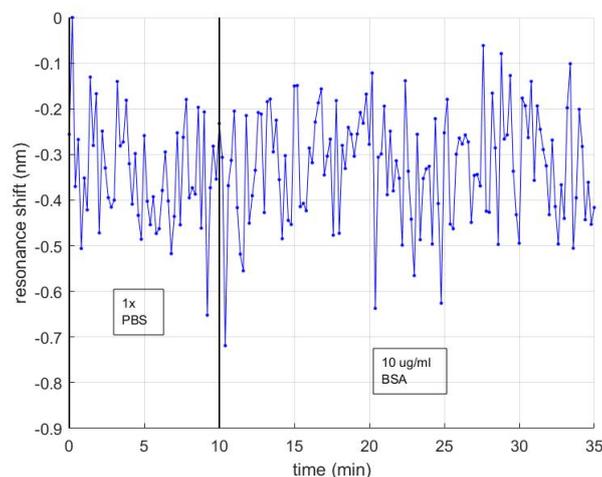


Figura 6.15: Gráfica de la incubación en una muestra de NFs de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteína BSA sobre el tampón 1X PBS

En el sensado anterior a partir de una muestra de SiP no se pudieron observar desplazamientos del espectro con el anticuerpo ni con la proteína BSA, lo cual podría deberse al transductor o al método de medida. Por ello, se realizó este sensado, que utilizó una muestra de NFs, ya que existen resultados publicados con este mismo transductor (Martínez-Pérez y col. 2020), y tampoco se pudo visualizar un desplazamiento del espectro con el anticuerpo ni con la proteína BSA, lo que podría estar causado por el método de medida, que es la única diferencia respecto a la publicación. En consecuencia, se decidió realizar posteriormente, como se expone en la subsección 6.3.1, un sensado dinámico utilizando NFs.

6.3 Dinámico

6.3.1 Nanofibras poliméricas

6.3.1.1 Protocolo utilizado

A continuación, se realiza un sensado de la proteína BSA mediante fluídica, para ver si los resultados anteriores, que no son los esperados, vienen dados por el método de medida de la incubación. Para esto, se han utilizado muestras de nanofibras poliméricas (NFs) no biofuncionalizadas, ya que esta se va realizando a lo largo del protocolo.

Se va a seguir un protocolo similar a los anteriores, con la diferencia de que en este caso sí es posible visualizar los resultados de los lavados, ya que la medida es continua y dinámica. También es similar al utilizado en las publicaciones existentes, que demuestran que es posible detectar la proteína BSA a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Martínez-Pérez y col. 2020).

En primer lugar, se han de dejar las muestras con agua desionizada fluyendo durante aproximadamente una hora para estabilizarlas. Después, se realiza la calibración con agua desionizada y con el tampón MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, que comúnmente se denomina MES), en una concentración de 0.1 M durante media hora.

Posteriormente, se ha de fluir la proteína AG, que actúa de intermediaria entre la muestra de NFs y el anticuerpo. Esta se encuentra a una concentración de 50 ppm, se deja fluyendo durante 30 minutos, y después se lava con el tampón 0.1 M MES.

Posteriormente, se procede a bloquear los espacios en los que no queremos que exista detección mediante la caseína. Esta se fluye a continuación del tampón 1X PBS, a una concentración de 2.5 mg/ml durante unos 30 minutos. Después, se realiza un lavado con el tampón 1X PBS.

El siguiente paso en el protocolo es el del anticuerpo anti-BSA. Este se fluye después del tampón 1X PBS en una concentración de 50 ppm durante 30 minutos. Después de ello, se realiza un lavado con el tampón 1X PBS.

Por último, se realiza la detección de la proteína BSA, en la cual después de fluir el tampón 1X PBS, se añaden disoluciones de BSA en diferentes concentraciones, de 1 ppm, 5 ppm y 10 ppm, fluyéndolas durante 15 minutos cada una, para ver cuándo es capaz el sensor de comenzar a detectarlas. Idealmente, sería una gráfica ascendente conforme aumenta la concentración. Finalmente, se realiza un lavado con el tampón 1X PBS.

6.3.1.2 Resultados y análisis

En la Figura 6.16 se muestran los resultados obtenidos de la calibración. En ella, se aprecia un desplazamiento del espectro hacia longitudes de onda más largas, aproximadamente de 0.3 nm, al llegar a la muestra el tampón 0.1 M MES.

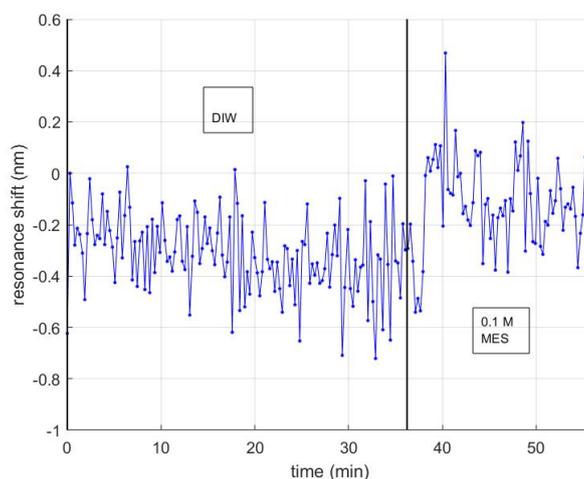


Figura 6.16: Gráfica de la calibración de una muestra de NFs a partir de agua desionizada y del tampón 0.1 M MES mediante sensado dinámico

En la Figura 6.17 se observan los resultados obtenidos después de haber fluido la proteína AG. En ella, se puede ver un pico de desplazamiento del espectro que alcanza unos 4 nm, y que va estabilizándose con el tiempo en un desplazamiento neto del espectro de 1.5 nm. La morfología que posee la gráfica es similar a la que se obtuvo en los resultados publicados (Martínez-Pérez y col. 2020). Por otra parte, el desplazamiento neto del espectro en el caso de la publicación fue de 2.5 nm, y en este sensado de 1.5 nm. Por esto, se puede afirmar que la proteína AG está correctamente adherida al transductor. Posteriormente, en el lavado con 0.1 M MES no se observa desplazamiento, lo cual es determinante, porque indica que la proteína esta vez sí se ha anclado, no se elimina cuando se vuelve a fluir el tampón. En cambio, al añadir el 1X PBS se produce un desplazamiento del espectro de 1 nm.

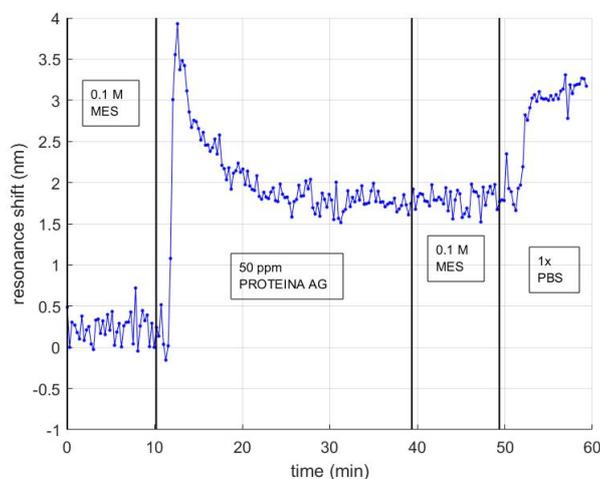


Figura 6.17: Gráfica resultante del paso de fluir 50 ppm proteína AG por la muestra de NFs, así como su lavado con los tampones 0.1 M MES y 1X PBS

En la Figura 6.18 se observan los resultados obtenidos al fluir la caseína. En ella, puede verse un desplazamiento del espectro hacia longitudes de onda más largas cuando la caseína alcanza la muestra, de forma progresiva formando una curva, hasta que se estabiliza, y alcanza los 5 nm de desplazamiento. Posteriormente, se produce el lavado con el tampón 1X PBS, y se produce un desplazamiento del espectro hacia longitudes de onda más cortas de 0.8 nm. En este caso, la morfología de la curva generada coincide con la de sensados anteriores y con la bibliografía, con la que también coincide en el desplazamiento neto del espectro de 5 nm (Martínez-Pérez y col. 2020).

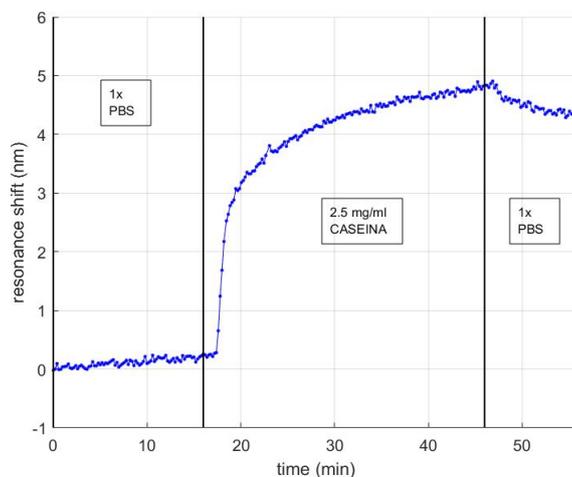


Figura 6.18: Gráfica de los resultados de fluir 2.5 mg/ml caseína por una muestra de NFs, y su posterior lavado con el tampón 1X PBS

En la Figura 6.19 se observan los resultados de fluir el anticuerpo por la muestra. En ella, también se observa un desplazamiento del espectro hacia longitudes de onda más largas cuando el anticuerpo llega a la muestra, llegando a alcanzar un desplazamiento neto de 1 nm que se ha generado progresivamente, indicando un anclaje del anticuerpo al transductor. Posteriormente, se realiza el lavado con el tampón 1X PBS, en el cual se produce un ligero desplazamiento del espectro de 0.1 nm hacia longitudes de onda más cortas lo cual es mínimo e indica que se ha quedado bien anclado el anticuerpo. En este caso, la morfología también coincide con la expuesta en la bibliografía, además, el desplazamiento del espectro ha sido algo mayor que el publicado (1 nm frente a 0.8 nm) (Martínez-Pérez y col. 2020).

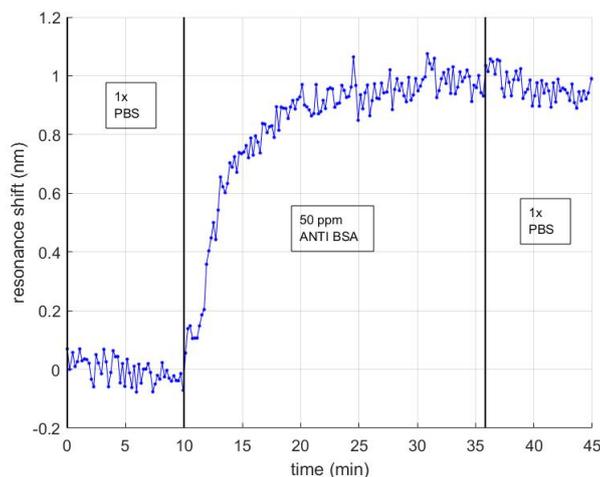


Figura 6.19: Gráfica obtenida después de fluir sobre una muestra de NFs el anticuerpo 50 ppm α BSA, también se observa su lavado con el tampón 1X PBS

Por último, se realiza la detección de la proteína y en la Figura 6.20 pueden observarse los resultados obtenidos. En ella, se observa inicialmente con la concentración de 1 ppm BSA un desplazamiento del espectro de 0.1 nm, después, con 5 ppm, se alcanza otro desplazamiento de 0.1 nm, y lo mismo sucede con 10 ppm. El desplazamiento neto que se observa finalmente es de 0.3 nm. En este caso, el resultado obtenido no es muy lógico ya que se esperaría un desplazamiento mayor a mayor concentración, además de que al final, con el tampón, no se estabiliza el espectro.

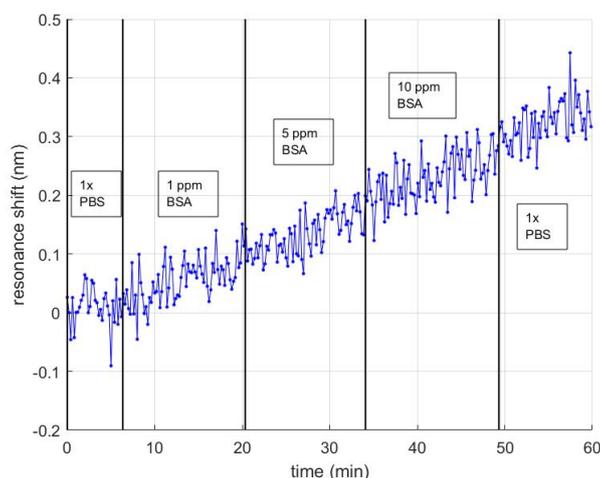


Figura 6.20: Gráfica obtenida como resultado de fluir concentraciones crecientes de BSA (1 ppm, 5 ppm y 10 ppm) sobre la muestra de NFs biofuncionalizada

Por todo ello, se realizó otro sensado con otra muestra de NFs diferente, biofuncionalizándola de la misma manera que la anterior, obteniendo exactamente los mismos resultados que los ya expuestos, con la única diferencia de intercalar en el paso de la detección entre las distintas concentraciones de la proteína BSA al tampón 1X PBS, fluyéndolo durante 10 minutos en cada ocasión.

En la Figura 6.21 se puede observar el resultado de esta detección de la proteína BSA. En esta, es más evidente que solo se producen desplazamientos del espectro cuando se fluye BSA, que el desplazamiento es algo mayor al subir la concentración, y que estabiliza cuando llega el tampón 1X PBS. En la concentración de 1 ppm, el desplazamiento del espectro es de 0.1 nm, con 5 ppm, se desplaza unos 0.12 nm, y, con 10 ppm, otros 0.12 nm. En total, el desplazamiento neto del espectro provocado por la proteína BSA sería de unos 0.34 nm, algo superior al del sensado anterior. Además, cabe destacar que con los diferentes lavados realizados mediante el tampón 1X PBS no se observa ningún desplazamiento.

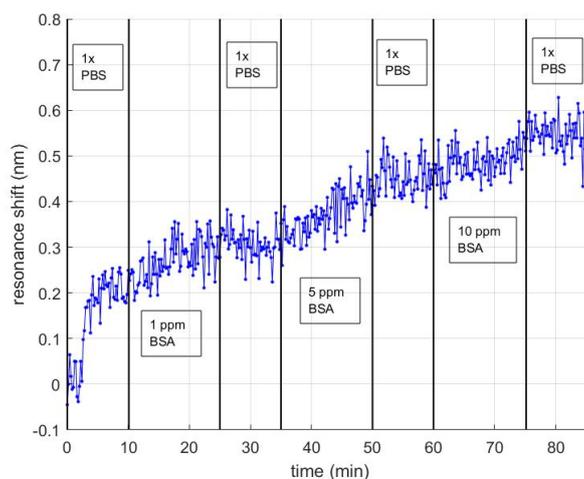


Figura 6.21: Gráfica obtenida como resultado de ir fluyendo concentraciones crecientes de BSA (1 ppm, 5 ppm y 10 ppm) sobre la muestra, alternando con el tampón 1X PBS

En la Figura 6.22 puede observarse una representación del ajuste lineal de los desplazamientos acumulados del espectro con las diferentes concentraciones de BSA que se han fluido anteriormente. En ella, se observa una distribución de los puntos prácticamente lineal ($R^2 = 0.9959$), que indica que al aumentar la concentración de la proteína, aumentará el desplazamiento del espectro según la ecuación de la recta de la Figura.

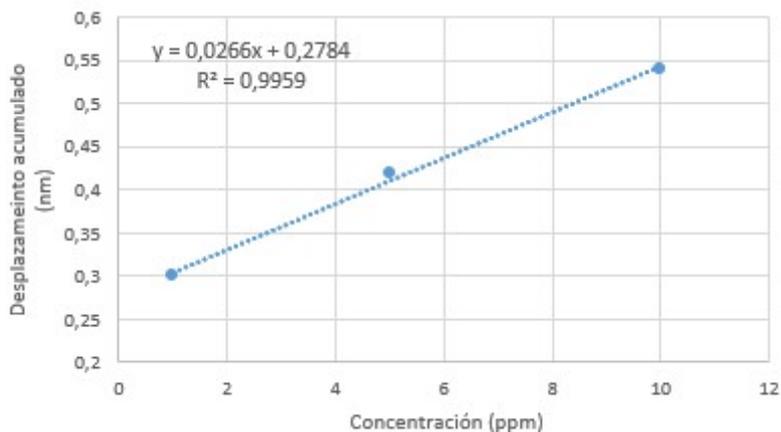


Figura 6.22: Gráfica que representa el ajuste lineal del desplazamiento acumulado frente a la concentración de BSA sobre la muestra de NFs anterior

Por ello, se ha logrado una detección de la proteína BSA a concentraciones de 1 ppm, 5 ppm y 10 ppm, porque las tres han producido un desplazamiento del espectro. Cabe destacar que en el sensado de la bibliografía se consiguió detectar 10 ppm BSA, por tanto en los sensados de este trabajo se alcanzó una sensibilidad mayor en la detección.

La reflexión después de estos resultados obtenidos es que a pesar de haber obtenido buenas conclusiones en algunos de los pasos realizados mediante incubación (adsorción de la proteína AG y la caseína), la diferencia con respecto al método dinámico es evidente. Mediante este, se han visualizado todos los pasos de forma clara, obteniendo evoluciones similares a las de la bibliografía, así como desplazamientos del espectro semejantes, y se han obtenido detecciones de una concentración muy baja, incluso alcanzando 1 ppm BSA. Por lo que, con ello, se puede decir que el método dinámico es el más adecuado para realizar el sensado de la proteína BSA.

Conclusiones

En primer lugar, el biosensor óptico utilizado a lo largo del trabajo, basado en Fabry-Pérot con estructuras porosas, tales como SiP y NFs, ha demostrado ser un dispositivo capaz de realizar detecciones de alta sensibilidad, las cuales vienen dadas por un desplazamiento del espectro. Además, posee unas características muy favorables, como la capacidad de realizar medidas en tiempo real, observando las variaciones que van surgiendo de forma simultánea a la realización del sensado. También cabe destacar que es un biosensor sin etiquetas o *label-free*, facilitando el proceso.

Al utilizar este biosensor para biofuncionalizar el transductor con la *Odorant Binding Protein* (OBP), y, de esta manera, sensar el farnesol, se puede concluir que los resultados no son muy favorables. Inicialmente, el sensado dinámico permitió ver desplazamientos del espectro generados por la proteína OBP3, pero que con los lavados volvía a desplazarse el espectro a su zona inicial, por lo que no se pudo asegurar la adsorción de la proteína OBP3. Esto se reflejó en las nulas detecciones que finalmente se obtuvieron del farnesol.

Después, se quiso probar con método diferente, la incubación. Sin embargo, los resultados no mejoraron respecto al anterior. Esto indicaba que el problema no era el método, ya sea fluyendo o en estático. La posible justificación en este caso es que la proteína OBP3 no estuviera en óptimas condiciones, podría haberse degradado o desnaturalizado, lo que indica que la adsorción no llegaba a realizarse correctamente, y, en consecuencia, tampoco se logró sensar el farnesol.

Asimismo, todo esto se acentúa, ya que el farnesol es un compuesto fotosensible, y ha de ser almacenado en oscuridad para evitar que reaccione. Si esto no fue realizado correctamente, dificulta que pueda ser detectado, y se agrava al utilizarlo en este biosensor en concreto, que usa luz para realizar los sensados.

A continuación, se quiso probar el método estático de este biosensor de nuevo, a través del sensado de la *Bovine Serum Albumin* (BSA). Esta proteína ya había sido sensada en muestras de nanofibras poliméricas (NFs) siguiendo el método dinámico, por lo que se quiso aportar un nuevo método para ello, así como utilizar muestras de SiP, presentando nuevas opciones para el mismo sensado.

En el sensado con SiP, se podría concluir que algunos de los pasos de la funcionalización de la muestra suceden de forma correcta, como la adsorción de la proteína AG y el bloqueo de los espacios entre sus moléculas mediante caseína. Sin embargo, al llegar a los anticuerpos, las gráficas podrían indicar que se ancla únicamente en la superficie externa del biosensor, sin entrar a los poros como se pretendía. Esto podría deberse a que estos tienen un diámetro menor que los de las NFs.

Por ello, se quiso seguir intentando el método estático con las NFs. A pesar de ello, no se mejoraron los resultados, siguió sin adherirse en anticuerpo y sin poder realizarse la detección.

Finalmente, se realizó en dinámico, para comprobar que este método es el adecuado en este sensado. Como se observó, el resultado fue óptimo, es decir, el esperado en cada uno de los pasos, incluso se obtuvieron detecciones de concentraciones menores a las publicadas. Por todo ello, se pudo concluir que el método óptimo para realizar el sensado de la proteína BSA es el dinámico.

Respecto a la cubeta, la reflexión es que la más grande de las utilizadas generaba unos picos en el espectro cuando se pipeteaba, y eso se mejoró con la nueva, más pequeña y que posee un hueco para poder introducir la punta de la pipeta y añadir las disoluciones lentamente, evitando esos picos que se producían anteriormente. Además, como es más pequeña, se produce un gasto menor de los reactivos implicados en los sensados, ya que hace falta menos volumen para cubrir la muestra.

Sin embargo, aún están por determinar las consecuencias de la evaporación, si esta afecta más o menos a las medidas que se realicen, sin olvidar las consecuencias de utilizar el portaobjetos en la cubeta, ya que tiene un índice de refracción distinto que puede perturbar las medidas.

7.1 Líneas futuras

Por todo ello, se podrían realizar pruebas en un futuro de la nueva cubeta con las propuestas realizadas en este trabajo. Así, se podrá comprobar si deja de producirse la evaporación y si mantiene la temperatura estable. Asimismo, en un futuro también podría investigarse si influye el uso del portaobjetos en las medidas, realizando, por ejemplo, pruebas con resultados conocidos, tanto con el cristal como sin él.

El método de incubación ha de seguir optimizándose para poder ser más fiable. En un futuro podrían realizarse más pruebas, ya que es un método más sencillo que el continuo, que no necesita de más instrumentos que la propia cubeta. Además, podría proponerse algún método para realizar los distintos lavados de la muestra sin necesidad de extraer la cubeta. De esta manera, se lograría una medida más fiable y se podría comprobar si los analitos se han anclado o no al transductor.

El método dinámico se ha determinado como óptimo para realizar las medidas. Sin embargo, también podrían realizarse mejoras de este, como un cambio automático del tubo de una disolución a otra, para evitar la entrada de aire que genere perturbaciones en las medidas, por ejemplo.

PRESUPUESTO

Introducción del presupuesto

Este capítulo se expone para poder aportar una valoración económica del presente Trabajo Final de Grado, y para poder realizar cálculos, se han tenido en cuenta una serie de factores que se explican a continuación.

En primer lugar, la mano de obra comprende a una ingeniera biomédica junior, como autora, a un ingeniero sénior, como tutor, y a otro ingeniero sénior, como cotutor. Los salarios brutos aproximados anuales son, respectivamente, 20000€, 40000€ y 32000€. Si se tiene en cuenta el coste anual de seguridad social que asume la empresa, que es un 31.55%, el salario de la mano de obra asciende a 26310€, 52620€ y 42096€, respectivamente. Para el cálculo del salario por hora, se toma como referencia una jornada laboral de 8 horas, y 1736 horas anuales de trabajo, teniendo en cuenta festivos y fines de semana. Con todo ello, el salario por hora es, respectivamente, 15.15€/hora, 30.31€/ y 24.25€/hora (se ha aproximado a 15€/hora, 30€/hora y 24€/hora).

Respecto al *hardware*, el PC utilizado tiene un precio de 800€; y como *software* la licencia indefinida de MATLAB son 2000€, la de Microsoft Office son 299€ y la de *Ocean View 2.0* son 243€. También se ha de tener en cuenta el uso de *Overleaf*, costando 9€/mes. Para el cálculo del precio, se tiene en cuenta que han sido usados durante 6 meses, aproximadamente, y se toma como vida útil de los materiales 5 años (60 meses), y que por ello el factor de amortización es 0.10 (6/60). Respecto a las muestras, las obleas de las que proceden son de 8 pulgadas, y cuestan unos 45€. De cada oblea podemos obtener unas 100 muestras cuadradas de 15 x 15 mm, por ello, cada trozo de oblea de silicio costaría 0.45€. El precio de cada trozo de silicio o de nanofibras empleado para realizar las muestras se estima en unos 0.50€. El resto de materiales utilizados son los del laboratorio, ya sea la jeringa, imanes de neodimio, goniómetro, guantes, y muchos otros, y que se calcula su precio por unidad utilizada.

Por otra parte, está la maquinaria del laboratorio, en este caso, el Flame T Spectrometer, cuyo precio es 3412€, la HL-2000-LL Light Source para el goniómetro, 797€, la HL-2000-HP Light Source para la medida vertical, 890€, y la bomba de jeringa para la extracción de disoluciones, 1200€. Para calcular el coste, se toma como vida útil 5 años, a partir del cual se obtiene el precio por hora (0.08€, 0.02€, 0.02€ y 0.03€, respectivamente), y el precio final será calculado con las horas de uso en cada caso.

Finalmente, para obtener los cálculos finales del presupuesto, se añade el 13% por gastos generales y un 6% por el beneficio industrial, sin olvidar el impuesto sobre el valor añadido (IVA) del 21%, que se utiliza en el cálculo del presupuesto total de ejecución por contrata (PEC). Todos los cálculos de este apartado están realizados con el *software* de realización de presupuestos denominado Arquímedes.

Documentos del presupuesto

9.1 Cuadro de precios de mano de obra

Cuadro de mano de obra Página 1

Num.	Código	Denominación de la...	Precio	Horas	Total
1	MO.TUTOR	Mano de obra del Tutor	30,00	10,000 h	300,00
2	MO.COTUTOR	Mano de obra del Cotutor	24,00	15,000 h	360,00
3	MO.IBJ	Mano del obra del Ingeniero Biomédico Junior	15,00	325,000 h	4.875,00
				Total mano de obra:	5.535,00

Tabla 9.1: Cuadro de precios de la mano de obra utilizada para la realización del trabajo

9.2 Cuadro de precios de materiales

Cuadro de materiales				Página 1	
Num.	Código	Denominación del ...	Precio	Cantidad	Total
1	MAT.PIP	Pipetas de diferentes capacidades (100 ul, 10 ul, 1 ul)	370,00	1,000 u	370,00
2	MAT.MatLab	Licencia MATLAB 2020b	200,00	1,000 u	200,00
3	MAT.PORTAT...	HP Pavilion x360 Convertible-14dh0x xx	80,00	1,000 u	80,00
4	MAT.OVER	Licencia Overleaf 4 meses	54,00	1,000 u	54,00
5	MAT.GON	Goniómetro para el set up óptico	30,00	1,000 u	30,00
6	MAT.OCEAN	Licencia del software OceanView 2.0	24,30	1,000 u	24,30
7	MAT.OFFICE	Microsoft 365	23,00	1,000 u	23,00
8	MAT.GU	Pack de guantes de latex	13,00	1,000 u	13,00
9	MAT.JER	Jeringa para la bomba de extracción	10,00	1,000 u	10,00
10	MAT.PINZA	Pinzas para manejar las muestras	2,00	1,000 u	2,00
11	MAT.PSI	Muestras de silicio poroso	0,50	10,000 u	5,00
12	MAT.NF	Muestras de nanofibras poliméricas	0,50	6,000 u	3,00
13	MAT.IMAN	Imanes de neodimio	0,50	3,000 u	1,50
14	MAT.OBLEA	Obleas para la realización de muestras	0,45	16,000 u	7,20
15	MAT.DIS	Disoluciones utilizadas en un sensado aprox.	0,14	16,000 u	2,24
16	MAT.EPEN	Tubos eppendorf de 2 ml	0,03	80,000 u	2,40
17	MAT.PUNTAP...	Puntas de pipeta para añadir disoluciones (100 ul, 10 ul, 1 ul)	0,01	100,000 u	1,00
				Total materiales:	828,64

Tabla 9.2: Cuadro de precios de los materiales utilizados para la realización del trabajo

9.3 Cuadro de precios de maquinaria

Cuadro de maquinaria				Página 1	
Num.	Código	Denominación de l...	Precio	Cantidad	Total
1	MAQ.ESP	Flame T Spectrometer (Ocean Optics)	0,08	80,000 h	6,40
2	MAQ.BOM	Bomba de jeringa para extraer disoluciones	0,03	80,000 h	2,40
3	MAQ.LAMP	HL-2000- LL Light Source	0,02	80,000 h	1,60
4	MAQ.LAMP2	HL-2000-HP Light Source	0,02	80,000 h	1,60
				Total maquinaria:	12,00

Tabla 9.3: Cuadro de precios de la maquinaria utilizada para la realización del trabajo

9.4 Cuadro de precios unitarios

Nº	Designación	Importe	
		En cifra (Euros)	En letra (Euros)
1.1	1 Trabajos previos u Primeras medidas de aprendizaje	71,76	SETENTA Y UN EUROS CON SETENTA Y SEIS CÉNTIMOS
2.1	2 Reuniones de seguimiento u Seguimiento de los resultados obtenidos	71,76	SETENTA Y UN EUROS CON SETENTA Y SEIS CÉNTIMOS
3.1	3 Sensados realizados u Experimentos realizados para obtener resultados	1.725,71	MIL SETECIENTOS VEINTICINCO EUROS CON SETENTA Y UN CÉNTIMOS
4.1	4 Procesado e interpretación de los resultados u Obtención de resultados	1.332,55	MIL TRESCIENTOS TREINTA Y DOS EUROS CON CINCUENTA Y CINCO CÉNTIMOS
5.1	5 Redacción y defensa u Redacción del Trabajo Final de Grado	1.872,00	MIL OCHOCIENTOS SETENTA Y DOS EUROS
5.2	u Revisión y corrección de la memoria	873,60	OCHOCIENTOS SETENTA Y TRES EUROS CON SESENTA CÉNTIMOS
5.3	u Preparación y práctica de la defensa	468,00	CUATROCIENTOS SESENTA Y OCHO EUROS

Tabla 9.4: Cuadro de precios unitarios

9.5 Cuadro de precios descompuestos

Nº	Código	Ud	Descripción		Total
1 Trabajos previos					
1.1.1.1		u	Primeras medidas de aprendizaje		
	MO.TUTOR	1,000 h	Mano de obra del Tutor	30,00	30,00
	MO.COTUTOR	1,000 h	Mano de obra del Cotutor	24,00	24,00
	MO.IBJ	1,000 h	Mano del obra del Ingeniero Biomédico Junior	15,00	15,00
		4,000 %	Costes indirectos	69,00	2,76
			Precio total por u		71,76
Nº	Código	Ud	Descripción		Total
2 Reuniones de seguimiento					
2.1.2.1		u	Seguimiento de los resultados obtenidos		
	MO.TUTOR	1,000 h	Mano de obra del Tutor	30,00	30,00
	MO.COTUTOR	1,000 h	Mano de obra del Cotutor	24,00	24,00
	MO.IBJ	1,000 h	Mano del obra del Ingeniero Biomédico Junior	15,00	15,00
		4,000 %	Costes indirectos	69,00	2,76
			Precio total por u		71,76

Tabla 9.5: Hoja de precios descompuestos 1

Nº	Código	Ud	Descripción		Total
3 Sensados realizados					
3.1 3.1		u	Experimentos realizados para obtener resultados		
	MO.IBJ	80,000 h	Mano del obra del Ingeniero Biomédico Junior	15,00	1.200,00
	MAT.GON	1,000 u	Goniómetro para el set up óptico	30,00	30,00
	MAT.IMAN	3,000 u	Imanes de neodimio	0,50	1,50
	MAT.JER	1,000 u	Jeringa para la bomba de extracción	10,00	10,00
	MAT.DIS	16,000 u	Disoluciones utilizadas en un sensado aprox.	0,14	2,24
	MAT.PIP	1,000 u	Pipetas de diferentes capacidades (100 ul, 10 ul, 1 ul)	370,00	370,00
	MAT.PUNTAPIP	100,000 u	Puntas de pipeta para añadir disoluciones (100 ul, 10 ul, 1 ul)	0,01	1,00
	MAT.GU	1,000 u	Pack de guantes de latex	13,00	13,00
	MAT.EPEN	80,000 u	Tubos eppendorf de 2 ml	0,03	2,40
	MAT.PINZA	1,000 u	Pinzas para manejar las muestras	2,00	2,00
	MAQ.LAMP	80,000 h	HL-2000- LL Light Source	0,02	1,60
	MAQ.ESP	80,000 h	Flame T Spectrometer (Ocean Optics)	0,08	6,40
	MAT.PSI	10,000 u	Muestras de silicio poroso	0,50	5,00
	MAT.NF	6,000 u	Muestras de nanofibras poliméricas	0,50	3,00
	MAQ.BOM	80,000 h	Bomba de jeringa para extraer disoluciones	0,03	2,40
	MAQ.LAMP2	80,000 h	HL-2000-HP Light Source	0,02	1,60
	MAT.OBLEA	16,000 u	Obleas para la realización de muestras	0,45	7,20
		4,000 %	Costes indirectos	1.659,34	66,37
			Precio total por u		1.725,71

Tabla 9.6: Hoja de precios descompuestos 2

Nº	Código	Ud	Descripción		Total
4 Procesado e interpretación de los resu...					
4.1.4.1		u	Obtención de resultados		
	MO.IBJ	60,000 h	Mano del obra del Ingeniero Biomédico Junior	15,00	900,00
	MAT.MatLab	1,000 u	Licencia MATLAB R2020b	200,00	200,00
	MAT.PORTATIL	1,000 u	HP Pavilion x360 Convertible-14dh0x xx	80,00	80,00
	MAT.OFFICE	1,000 u	Microsoft 365	23,00	23,00
	MAT.OVER	1,000 u	Licencia Overleaf	54,00	54,00
	MAT.OCEAN	1,000 u	Licencia del software OceanView 2.0	24,30	24,30
		4,000 %	Costes indirectos	1.281,30	51,25
			Precio total por u		1.332,55
Nº	Código	Ud	Descripción		Total
5 Redacción y defensa					
5.1.5.1		u	Redacción del Trabajo Final de Grado		
	MO.IBJ	120,000 h	Mano del obra del Ingeniero Biomédico Junior	15,00	1.800,00
		4,000 %	Costes indirectos	1.800,00	72,00
			Precio total por u		1.872,00
5.2.5.2		u	Revisión y corrección de la memoria		
	MO.TUTOR	5,000 h	Mano de obra del Tutor	30,00	150,00
	MO.COTUTOR	10,000 h	Mano de obra del Cotutor	24,00	240,00
	MO.IBJ	30,000 h	Mano del obra del Ingeniero Biomédico Junior	15,00	450,00
		4,000 %	Costes indirectos	840,00	33,60
			Precio total por u		873,60
5.3.5.3		u	Preparación y práctica de la defensa		
	MO.IBJ	30,000 h	Mano del obra del Ingeniero Biomédico Junior	15,00	450,00
		4,000 %	Costes indirectos	450,00	18,00
			Precio total por u		468,00

Tabla 9.7: Hoja de precios descompuestos 3

9.6 Cuadro de mediciones

1 Trabajos previos			
Nº	Ud	Descripción	Medición
1.1	U	Primeras medidas de aprendizaje	
Total u :			1,00
2 Reuniones de seguimiento			
Nº	Ud	Descripción	Medición
2.1	U	Seguimiento de los resultados obtenidos	
Total u :			4,00
3 Sensados realizados			
Nº	Ud	Descripción	Medición
3.1	U	Experimentos realizados para obtener resultados	
Total u :			1,00
4 Procesado e interpretación de los resultados			
Nº	Ud	Descripción	Medición
4.1	U	Obtención de resultados	
Total u :			1,00
5 Redacción y defensa			
Nº	Ud	Descripción	Medición
5.1	U	Redacción del Trabajo Final de Grado	
Total u :			1,00
5.2	U	Revisión y corrección de la memoria	
Total u :			1,00
5.3	U	Preparación y práctica de la defensa	
Total u :			1,00

Tabla 9.8: Cuadro de mediciones

9.7 Presupuesto de ejecución por contrata

Proyecto: Presupuesto del Trabajo Final de Grado

Capítulo	Importe
1 Trabajos previos	71,76
2 Reuniones de seguimiento	287,04
3 Sensados realizados	1.725,71
4 Procesado e interpretación de los resultados	1.332,55
5 Redacción y defensa	3.213,60
Presupuesto de ejecución material	6.630,66
15% de gastos generales	994,60
6% de beneficio industrial	397,84
Suma	8.023,10
21% IVA	1.684,85
Presupuesto de ejecución por contrata	9.707,95

Tabla 9.9: Hoja resumen del PEC con IVA

Bibliografía

- Alassi, Abdulrahman, Mohieddine Benammar y Dan Brett (2017). “Quartz Crystal Microbalance Electronic Interfacing Systems: A Review”. En: *Sensors* 17.12. ISSN: 1424-8220. DOI: 10.3390/s17122799 (vid. pág. 8).
- Alhadrami, Hani A. (2018). “Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective”. En: *Biotechnology and Applied Biochemistry* 65.3, págs. 497-508. ISSN: 14708744. DOI: 10.1002/bab.1621 (vid. págs. 1, 7).
- Araújo Delmondes, Gyllyandeson y col. (2019). “Toxicological and pharmacologic effects of farnesol (C₁₅H₂₆O): A descriptive systematic review”. En: *Food and Chemical Toxicology* 129, págs. 169-200. ISSN: 0278-6915. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.037> (vid. pág. 21).
- Aronson, J.K. (2016). “Bovine serum albumin”. En: *Meyler’s Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition)*. Sixteenth Edition. Oxford: Elsevier, pág. 1045. ISBN: 978-0-444-53716-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.00401-7> (vid. pág. 29).
- Bhalla, Nikhil y col. (2016). “Introduction to biosensors”. En: *Essays in Biochemistry* 60.1, págs. 1-8. ISSN: 00711365. DOI: 10.1042/EBC20150001 (vid. págs. 5, 6).
- Bhushan, Bharat (2007). “Nanotribology and nanomechanics of MEMS/NEMS and BioMEMS/BioNEMS materials and devices”. En: *Microelectronic Engineering* 84.3. Nanoscale imaging and metrology of devices and innovative materials, págs. 387-412. ISSN: 0167-9317. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mee.2006.10.059> (vid. pág. 8).
- Caroselli, Raffaele y col. (2017). “Real-time and in-flow sensing using a high sensitivity porous silicon microcavity-based sensor”. En: *Sensors (Switzerland)* 17.12. ISSN: 14248220. DOI: 10.3390/s17122813 (vid. págs. 11, 12).
- Chakraborty, Monisha y M Saleem J Hashmi (2017). “An Overview of Biosensors and Devices”. En: *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, págs. 1-24. DOI: 10.1016/b978-0-12-803581-8.10316-9 (vid. págs. 5-7).

- Fan, J. y col. (2011). "An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception". En: *Genetics and Molecular Research* 10.4, págs. 3056-3069. ISSN: 16765680. DOI: 10.4238/2011.December.8.2 (vid. pág. 20).
- Fan, Xudong y col. (2008). "Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review". En: *Analytica Chimica Acta* 620.1-2, págs. 8-26. ISSN: 00032670. DOI: 10.1016/j.aca.2008.05.022 (vid. págs. 8, 9).
- García Reyes, Luis Enrique (2013). "Conceptos básicos para validación de metodologías analíticas". En: *Journal of Chemical Information and Modeling* 53.9, págs. 1689-1699. ISSN: 1098-6596. arXiv: arXiv:1011.1669v3 (vid. pág. 6).
- Guider, Romain y col. (2015). "Sensitivity and Limit of Detection of biosensors based on ring resonators". En: *Sensing and Bio-Sensing Research* 6, págs. 99-102. ISSN: 2214-1804. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2015.08.002> (vid. pág. 6).
- Guo, Xiaowei (2012). "Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review". En: *Journal of Biophotonics* 5.7, págs. 483-501. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbio.201200015>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbio.201200015> (vid. pág. 9).
- Jane, Andrew y col. (2009). "Porous silicon biosensors on the advance". En: *Trends in Biotechnology* 27.4, págs. 230-239. ISSN: 01677799. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.12.004 (vid. pág. 4).
- Kaur, Hardeep, Aakash Bhosale y Suraj Shrivastav (2018). "Biosensors: Classification, Fundamental Characterization and New Trends: A Review". En: *International Journal of Health Sciences Research (www.ijhsr.org)* 8.6, págs. 315-333 (vid. págs. 1, 7, 8).
- Lazcka, Olivier, F. Javier Del Campo y F. Xavier Muñoz (2007). "Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors". En: *Biosensors and Bioelectronics* 22.7, págs. 1205-1217. ISSN: 09565663. DOI: 10.1016/j.bios.2006.06.036 (vid. págs. 4, 5).
- Leung, Angela, P. Mohana Shankar y Raj Mutharasan (2007). "A review of fiber-optic biosensors". En: *Sensors and Actuators, B: Chemical* 125.2, págs. 688-703. ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/j.snb.2007.03.010 (vid. pág. 9).
- Martín Sánchez, David (2019). "Desarrollo de biosensores fotónicos basados en membranas de silicio poroso". Tesis doct. (vid. pág. 10).
- Martin-Sanchez, David, Todora Angelova y Jaime Garcia-Ruperez (2020). "Simultaneous Refractive Index Sensing Using an Array of Suspended Porous Silicon Membranes". En: *IEEE Sensors Journal* 20.15, págs. 8497-8504. ISSN: 15581748. DOI: 10.1109/JSEN.2020.2983218 (vid. págs. 11, 12, 27).
- Martín-Sánchez, David, Miroslavna Kovylyna y col. (2019). "Thermo-Optic Coefficient of Porous Silicon in the Infrared Region and Oxidation Process at Low Temperatures". En: *Journal of The Electrochemical Society* 166.6, B355-B359. ISSN: 0013-4651. DOI: 10.1149/2.0341906jes (vid. pág. 12).

- Martín-Sánchez, David, Salvador Ponce-Alcántara y Jaime García-Rupérez (2019). “Sensitivity Comparison of a Self-Standing Porous Silicon Membrane under Flow-Through and Flow-Over Conditions”. En: *IEEE Sensors Journal* 19.9, págs. 3276-3281. ISSN: 1530437X. DOI: 10.1109/JSEN.2019.2893885 (vid. págs. 11, 12).
- Martín-Sánchez, David, Salvador Ponce-Alcántara, Paula Martínez-Pérez y col. (2019). “Macropore Formation and Pore Morphology Characterization of Heavily Doped p-Type Porous Silicon”. En: *Journal of The Electrochemical Society* 166.2, B9-B12. ISSN: 0013-4651. DOI: 10.1149/2.0051902jes (vid. pág. 11).
- Martínez-Pérez, Paula y col. (2020). “Label-free optical biosensing using low-cost electrospun polymeric nanofibers”. En: *Chemosensors* 8.4, págs. 1-11. ISSN: 22279040. DOI: 10.3390/chemosensors8040119 (vid. págs. 12-15, 18, 29-32, 35, 39, 42, 44, 45).
- Pelosi, Paolo, Jiao Zhu y Wolfgang Knoll (2018). “Odorant-binding proteins as sensing elements for odour monitoring”. En: *Sensors (Switzerland)* 18.10. ISSN: 14248220. DOI: 10.3390/s18103248 (vid. pág. 20).
- Ponce-Alcántara, S. y col. (2018). “Optical sensors based on polymeric nanofibers layers created by electrospinning”. En: *Optical Materials Express* 8.10, pág. 3163. ISSN: 2159-3930. DOI: 10.1364/ome.8.003163 (vid. págs. 10, 13).
- Ponce-Alcántara, Salvador y col. (2019). “Stabilization of polymeric nanofibers layers for use as real-time and in-flow photonic sensors”. En: *Sensors (Switzerland)* 19.18. ISSN: 14248220. DOI: 10.3390/s19183847 (vid. págs. 12, 13).
- Rocha-Gaso, María-Isabel y col. (2009). “Surface Generated Acoustic Wave Biosensors for the Detection of Pathogens: A Review”. En: *Sensors* 9.7, págs. 5740-5769. ISSN: 1424-8220. DOI: 10.3390/s90705740 (vid. pág. 8).
- Sanusi, Olawale Monsur, Abdelkibir Benelfellah y Nourredine Aït Hocine (2020). “Clays and carbon nanotubes as hybrid nanofillers in thermoplastic-based nanocomposites – A review”. En: *Applied Clay Science* 185, pág. 105408. ISSN: 0169-1317. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105408> (vid. pág. 13).
- Thévenot, Daniel R. y col. (2001). “Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification”. En: *Biosensors and Bioelectronics* 16.1-2, págs. 121-131. ISSN: 09565663. DOI: 10.1016/S0956-5663(01)00115-4 (vid. págs. 1, 5, 7).
- Virji, M.A. y A.B. Stefaniak (2014). “8.06 - A Review of Engineered Nanomaterial Manufacturing Processes and Associated Exposures”. En: *Comprehensive Materials Processing*. Ed. por Saleem Hashmi y col. Oxford: Elsevier, págs. 103-125. ISBN: 978-0-08-096533-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-096532-1.00811-6> (vid. pág. 13).
- Yakovleva, Maria, Sunil Bhand y Bengt Danielsson (2013). “The enzyme thermistor—A realistic biosensor concept. A critical review”. En: *Analytica Chimica Acta* 766, págs. 1-12. ISSN: 0003-2670. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.004> (vid. pág. 8).