

Ángela Ruiz Tórtola

Director: Dr. Jaime García Rupérez
Enero 2021, Valencia (ESPAÑA)

Tesis Doctoral

Desarrollo de biosensores nanofotónicos de alta sensibilidad para la detección de biomarcadores microRNA en aplicaciones de diagnóstico médico



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Universitat Politècnica de València
Departamento de comunicaciones

TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de biosensores nanofotónicos de
alta sensibilidad para la detección de
biomarcadores microRNA en aplicaciones
de diagnóstico médico**

Ángela Ruiz Tórtola

Director: Dr. Jaime García Rupérez

Enero 2021, Valencia (España)

Desarrollo de biosensores nanofotónicos de alta sensibilidad para la detección de biomarcadores
microRNA en aplicaciones de diagnóstico médico

Copyright © 2021 Ángela Ruiz Tórtola

anruitor@ntc.upv.es

Tesis Doctoral, Valencia Nanophotonics Technology Center

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Diseño de portada © 2021 Jose Pedro Iniesta Tórtola

A la persona más hermosa, adorable, fuerte y valiente que ha pasado por mi vida.

Te quiero, abuela.

Agradecimientos

No tenía intención de escribir estas palabras, no creía que fuera posible hacerlo sin emocionarme, las personas que me conocéis lo sabéis bien. Estas palabras van dirigidas precisamente a vosotros, a los que habéis estado tan cerca de mí que me habéis concedido la oportunidad de agradecer personalmente vuestro apoyo. Hoy me he dado cuenta que si no las escribía era simplemente por miedo a no ser capaz de transmitir todo el agradecimiento que siento hacia vosotros.

Quiero dar las gracias a mi director de Tesis, el doctor Jaime García, por brindarme la oportunidad de trabajar en un proyecto tan bonito y tan esperanzador en el mundo que nos rodea. También gracias a mis compañeros de la línea de Biofotónica y del Instituto de Señal y Medida en Química, especialmente a Dani, quien ha sido mi mentor en un campo totalmente desconocido para mí en mis inicios, la bioquímica. No me quiero olvidar del grupo de nanofabricación con el que ha sido un auténtico placer trabajar. Gracias Amadeu, la experiencia que te avala ha contribuido muy favorablemente al desarrollo de esta Tesis Doctoral, siempre con tu amabilidad y predisposición a ayudarme; y gracias Josete por tu amistad y sabios consejos.

Queridos compañeros del NTC, habéis sido mi familia durante años, juntos hemos vivido grandes momentos y tenemos miles de anécdotas que perdurarán por siempre en nuestro recuerdo. Ha habido mucha ciencia en nuestras conversaciones pero también nos hemos divertido mucho; solo hace falta recordar nuestras partidas de pádel, aunque solo sirvieran de excusa para las cervezas que proseguían. Os pido disculpas por haberos cambiado el nombre a todos y cada uno de vosotros y por haberos contagiado mi peculiar forma de hablar; seguro que os reís cuando leáis esto. Moki, ni la distancia ni el tiempo ha roto el “Moki Moki Team”, seguimos formando un gran equipo. Tú y Jad (mi mori) sois las personas que más habéis confiado en mí, siempre me habéis transmitido toda la fuerza y motivación necesaria para creer en mi trabajo, mil gracias por no abandonarme nunca. Anita, Quique, Sergio y Fede, no tengo palabras para agradecer lo mucho que me habéis apoyado, vuestra amistad es, sin duda, lo mejor que me llevo del NTC. Tere, eres una mujer increíble y llena de cariño, gracias por cuidarme tanto. Javi, Fran, Alvarito, Marghe, Andrés, Bockelt, Julito, Pau, Alfredi, Cristina,... me resulta imposible nombraros a todos y todas pero os puedo asegurar que nunca os voy a olvidar.

Noelia, las dos sabemos lo duro que ha resultado este largo recorrido y las dos sabemos que sin ti nunca lo hubiera conseguido. Has sido mi refugio, me has comprendido sin

juzgarme, me has ayudado a ser mejor persona y me has enseñado que rendirse nunca es una opción. A tu lado he aprendido a convertir las adversidades en oportunidades. Gracias a ti soy una persona nueva, mucho más fuerte y capaz de valorar todo lo bueno que tiene a su alrededor.

A mis amigos, a los de toda la vida, Omayra, Marina, Cristina, Irene, Raquel, Alfonso y Marinete, gracias por estar siempre a mi lado, como suele decirse, “en las buenas y en las malas”. Dori, “no hay nadie como tú para hacerme reír”, eres de las amigas que nunca falla y simplemente te adoro. Inma, eres indudablemente la persona que más merece un agradecimiento, tu bondad no conoce límites amiga, tu apoyo incondicional asombraría a cualquiera y te has convertido en uno de los pilares fundamentales de mi vida. Sin duda, me has transmitido el verdadero significado de la amistad y no sabes lo afortunada que me siento de poder contar contigo.

Me he dejado para el final las personas más importantes en mi vida, aquellas que lo son todo para mí, mi familia, particularmente mi mapachito, mi madre y mi hermana. Sé que a veces no os lo he puesto fácil pero sois las personas que más me habéis apoyado siempre y lo continuáis haciendo, sobre todo tú, mama. Eres la persona más inteligente y sensata que conozco y la mejor madre y amiga que podría tener. Mi hermana dice que esta Tesis es más tuya que mía y no se equivoca. Mi padre, mi mapachito, es un ejemplo de disciplina y constancia en el trabajo y, a la vez, la persona más cercana, cariñosa y divertida de la familia; con él sigo jugando como si fuera una niña pequeña. Para vosotros solo tengo palabras de agradecimiento y ojalá algún día sepáis lo orgullosa que me siento de vosotros y de los valores que me habéis transmitido, sobre todo el de la humildad. Gracias también a ti, Jose, más que un primo, para mí eres un hermano y mi mejor confidente. No me puedo olvidar de mi tío Paco después de tantas conversaciones a altas horas de la madrugada cuando la ansiedad se apoderaba de mí. Gracias a todos por haber hecho tanto por mí, os quiero muchísimo. Por último, gracias abu por procesarme tanto cariño a lo largo de tu vida y quererme tanto. Me acuerdo mucho de ti.

Índice

Resumen.....	I
Resum.....	III
Summary.....	V
Lista de acrónimos.....	VII
Capítulo 1 Biosensores fotónicos integrados en silicio.....	1
1.1. Motivación	1
1.2. Biosensores: definición, propiedades, tipología y requerimientos	4
1.3. Biosensores fotónicos de campo evanescente	9
1.3.1. Estructuras de <i>band gap</i> fotónico.....	11
1.4. Fotónica de silicio.....	14
1.5. Objetivos y metodología de la Tesis Doctoral.....	16
1.6. Marco de la Tesis Doctoral.....	19
1.7. Estructura de la Tesis Doctoral.....	20
Capítulo 2 Diseño, fabricación y caracterización experimental de sensores de <i>band gap</i> fotónico.....	23
2.1. Criterios de diseño	23
2.2. Configuraciones de estructuras de <i>band gap</i> fotónico estudiadas	24
2.3. Optimización paramétrica del diseño	25
2.3.1. Cálculo del diagrama de bandas	26
2.3.2. Representación de la respuesta espectral	28
2.3.3. Resultados.....	30
2.3.3.1. <i>Corrugated waveguide</i> (corr3D)	30
2.3.3.2. <i>Inverse corrugated waveguide</i> (corr3Dinv)	32
2.3.3.3. <i>1D slot waveguide</i> (corr3Dslot)	33
2.3.3.4. <i>1D holes waveguide</i> (1Dsquareholes3D)	35
2.3.3.5. <i>1D corrugated and holes waveguide</i> (corr+squareholes3D)	36
2.3.4. Conclusiones	37
2.4. Fabricación y caracterización experimental.....	38
2.4.1. Metodología.....	38
2.4.2. Diseño de los chips fotónicos.....	39
2.4.3. Proceso de fabricación.....	41
2.4.4. Caracterización física	42
2.4.5. Caracterización espectral.....	45
2.4.5.1. Montaje experimental	45
2.4.5.2. Resultados.....	47
2.4.6. Conclusiones	54

Capítulo 3 Detección de oligonucleótidos usando sensores de <i>band gap</i> fotónico biofuncionalizados con <i>molecular beacons</i>	57
3.1. Concepto del sensor.....	57
3.1.1. Configuración óptima de las estructuras de <i>band gap</i> fotónico	57
3.1.2. Sondas <i>molecular beacon</i>	59
3.2. Diseño del chip fotónico	60
3.2.1. Diseño de MMIs	62
3.2.1.1. Interferencia multimodal.....	62
3.2.1.2. Optimización paramétrica	62
3.2.1.3. Caracterización experimental de la respuesta espectral.....	64
3.2.2. Dimensionado del chip fotónico	65
3.3. Proceso de biofuncionalización.....	65
3.3.1. Secuencias de oligonucleótidos	65
3.3.2. Funcionalización <i>Thiol-ene Coupling</i>	66
3.4. Montaje experimental	68
3.4.1. Plataforma de interrogación opto-fluídica	68
3.4.2. Celda microfluídica.....	70
3.5. Resultados experimentales en el bioreconocimiento de oligonucleótidos.....	71
3.5.1. Caracterización espectral de los sensores de <i>band gap</i> fotónico.....	71
3.5.2. Seguimiento espectral del <i>band gap</i> fotónico	73
3.5.3. Análisis de los resultados	74
3.5.4. Test de fluorescencia	75
3.6. Conclusiones	76
Capítulo 4 Influencia del cambio conformacional de sondas MB sobre sensores de onda evanescente	77
4.1. Materiales y métodos	77
4.1.1. Estructuras de <i>band gap</i> fotónico y MBs.....	77
4.1.2. Proceso de biofuncionalización	78
4.1.2.1. Secuencias de oligonucleótidos.....	78
4.1.2.2. Biofuncionalización y marcaje de biotina-estreptavidina en los MBs	79
4.1.3. Montaje experimental	79
4.2. Resultados experimentales del estudio	81
4.2.1. Caracterización espectral de los sensores de <i>band gap</i> fotónico.....	81
4.2.2. Seguimiento espectral del <i>band gap</i> fotónico	81
4.2.3. Calibración de la sensibilidad del índice de refracción y normalización de medidas.....	83
4.2.4. Análisis de los resultados	85
4.3. Conclusiones	86
Capítulo 5 Detección de biomarcadores de cáncer miRNA y regeneración en línea	89
5.1. Optimización del diseño y fabricación del chip fotónico	90
5.1.1. Problemática	90
5.1.2. Rediseño del chip fotónico.....	91
5.2. Detección de biomarcadores de cáncer miRNA.....	94
5.2.1. Proceso de biofuncionalización	94
5.2.1.1. Secuencias de oligonucleótidos.....	94
5.2.1.2. Funcionalización LAMI	95
5.2.2. Resultados experimentales.....	97
5.2.2.1. Caracterización espectral de los sensores de <i>band gap</i> fotónico.....	98
5.2.2.2. Seguimiento espectral del <i>band gap</i> fotónico.....	99

5.2.2.3. Calibración de la sensibilidad del índice de refracción y normalización de medidas.....	100
5.2.2.4. Test de fluorescencia	102
5.2.2.5. Análisis de los resultados.....	103
5.3. Regeneración en línea en la detección de biomarcadores de cáncer miRNA	103
5.3.1. Materiales y métodos	104
5.3.2. Resultados experimentales.....	104
5.3.2.1. Ensayo de regeneración con formamida	104
5.3.2.2. Análisis de los resultados.....	105
5.4. Conclusiones	106
Capítulo 6 Conclusiones y Líneas Futuras	109
6.1. Conclusiones	109
6.2. Líneas Futuras	112
Contribuciones Originales	115
Referencias	117
Lista de Figuras	129
Lista de Tablas	135
Anexo A Simulación	137

Resumen

El interés en desarrollar biosensores de alta sensibilidad para identificar y cuantificar una amplia gama de moléculas ha aumentado notablemente durante las últimas décadas en numerosos campos de aplicación. Entre ellos probablemente el más demandado sea el diagnóstico médico, el cual ha sido impulsado por el descubrimiento de nuevos biomarcadores de enfermedades, tales como los miRNAs. No obstante, la mayoría de las técnicas existentes para realizar la detección requieren el uso de marcadores debido a la falta de sensibilidad para detectar analitos en bajas concentraciones. Las estructuras ópticas basadas en campo evanescente, donde la luz es usada para transformar interacciones bioquímicas en variaciones de las señales ópticas, constituyen una interesante alternativa para el desarrollo de este tipo de biosensores sin la necesidad de utilizar marcadores (*label-free*). Concretamente las estructuras fotónicas integradas en tecnología *Silicon On Insulator* exhiben alta sensibilidad, bajo límite de detección y alto nivel de multiplexación en aplicaciones de detección, especialmente cuando se utilizan materiales y procesos basados en silicio y compatibles con CMOS.

En esta Tesis Doctoral se muestra el desarrollo de un biosensor fotónico integrado *label-free* para la detección de oligonucleótidos, y más concretamente biomarcadores de cáncer miRNAs. Este biosensor está basado en la combinación de estructuras de *band gap* fotónico y la inmovilización de sondas de tipo *molecular beacon* sobre su superficie. La combinación de sendos elementos de transducción y bioreconocimiento ha proporcionado una elevada sensibilidad en la detección de oligonucleótidos manteniendo un *footprint* por debajo de $100 \mu\text{m}^2$. El uso de este biosensor fotónico ha permitido también estudiar experimentalmente una novedosa técnica de amplificación de detección. Esta técnica explota el cambio conformacional sufrido por la sonda *molecular beacon* tras la hibridación con su oligonucleótido complementario, permitiendo alejar una partícula/molécula de la superficie del sensor, lo cual podría ser utilizado para amplificar la respuesta de detección del sensor.

Finalmente se propone una estrategia de regeneración en línea de los biosensores nanofotónicos desarrollados mediante una estrategia química basada en el uso de formamida. Esta estrategia no solo permite ahorrar tiempo sino que también reduce la variación entre las medidas obtenidas en experimentos diferentes, siendo especialmente útil cuando se testean niveles similares de analito.

Resum

L'interés en desenvolupar biosensors d'alta sensibilitat per a identificar i quantificar una àmplia gamma de molècules ha augmentat notablement durant les últimes dècades en nombrosos camps d'aplicació. Entre ells probablement el més demandat siga el diagnòstic mèdic, el qual ha sigut impulsat pel descobriment de nous biomarcadors de malalties, com ara els miRNAs. No obstant això, la majoria de les tècniques existents per a realitzar la detecció requereixen l'ús de marcadors a causa de la falta de sensibilitat per a detectar anàlits en baixes concentracions. Les estructures òptiques basades en camp evanescent, on la llum és usada per a transformar interaccions bioquímiques en variacions dels senyals òptics, constitueixen una interessant alternativa per al desenvolupament d'aquesta tipus de biosensors sense la necessitat d'utilitzar marcadors (label-free). Concretament les estructures fotòniques integrades en tecnologia Silicon On Insulator exhibeixen alta sensibilitat, baix límit de detecció i alt nivell de multiplexació en aplicacions de detecció, especialment quan s'utilitzen materials i processos basats en silici i compatibles amb CMOS.

En aquesta Tesi Doctoral es mostra el desenvolupament d'un biosensor fotònic integrat label-free per a la detecció d'oligonucleòtids, i més concretament biomarcadors de càncer miRNAs. Aquest biosensor està basat en la combinació d'estructures de band gap fotònic i la immobilització de sondes de tipus molecular beacon sobre la seua superfície. La combinació d'ambdós elements de transducció i bioreconeixement ha proporcionat una elevada sensibilitat en la detecció d'oligonucleòtids mantenint un footprint per davall de 100 μm^2 . L'ús d'aquest biosensor fotònic ha permès també estudiar experimentalment una nova tècnica d'amplificació de detecció. Aquesta tècnica explota el canvi conformacional patit per la sonda molecular beacon després de la hibridació amb el seu oligonucleòtid complementari, permetent allunyar una partícula/molècula de la superfície del sensor, la qual cosa podria ser utilitzada per amplificar la resposta de detecció del sensor.

Finalment es proposa una estratègia de regeneració en línia dels biosensors nanofotònics desenvolupats mitjançant una estratègia química basada en l'ús de formamida. Aquesta estratègia no sols permet estalviar temps sinó que també redueix la variació entre les mesures obtingudes en experiments diferents, sent especialment útil quan es testen nivells similars d'anàlit.

Summary

The interest in developing highly sensitive biosensors to identify and quantify a wide range of molecules has remarkably been increasing during the last decades in numerous application fields. Among them, medical diagnosis is probably the most demanded, which has been driven by the discovery of new biomarkers of diseases, such as miRNAs. However, most of the existing techniques to perform the detection require the use of labels due to the lack of sensitivity to detect analytes at low concentrations. Evanescent-wave optical structures, where light is used to transduce biochemical interactions into variations of the optical signals, are an interesting alternative for the development of this type of biosensors allowing a label-free detection. Specifically, the planar integrated photonic structures based on Silicon On Insulator technology exhibit an extremely high sensitivity, a low detection limit and a high level of multiplexing in detection applications, especially when using materials and processes based on silicon and being CMOS compatible.

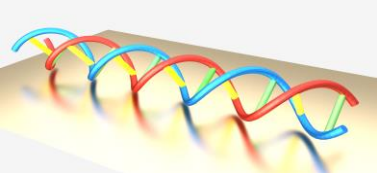
This PhD Thesis is focused on the development of label-free integrated photonic biosensors for the detection of oligonucleotides, and more specifically miRNA cancer biomarkers. This biosensor is based on the combination of photonic band gap structures and the immobilization of molecular beacon probes on its surface. The combination of both transduction and biorecognition elements has provided a very high sensitivity towards the detection of target oligonucleotides while keeping a sensor footprint below $100 \mu\text{m}^2$. The use of this photonic biosensor also allowed the experimental study of a novel detection amplification technique. This technique exploits the conformational change suffered by the molecular beacon probe after hybridization with its complementary oligonucleotide, allowing the displacement of a particle/molecule away from the sensor surface, what might be used for amplifying the sensor's detection response.

Finally, an online regeneration strategy for nanophotonic biosensors developed through a chemical strategy based on the use of formamide is proposed. This strategy not only saves time but also reduces the variation between measurements obtained in different experiments, being especially useful when testing similar levels of analyte.

Lista de acrónimos

AAU	Aalborg University
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFM	Atomic Force Microscope
ARN	Ácido Ribonucleico
BSA	Bovine Serum Albumin
CCD	Charge-Coupled Device
CFM	Confocal Fluorescence Microscopy
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
CST	CST Microwave Studio
DPI	Dual Polarization Interferometry
EBL	E-Beam Lithography
EVG	EV Group
FDTD	Finite-Difference Time-Domain
GC	Grating Coupler
GPIB	General Purpose Interface Bus
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICP	Inductively Coupled Plasma
IDM	Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico
IR	Infrarrojo
IVD	In Vitro Diagnostics
IVO	Instituto Valenciano de Oncología
LAMI	Light Assisted Molecular Immobilization
LOC	Lab-on-a-chip
LOD	Limit of detection
MB	Molecular Beacon
MFCS	Microfluidic ChipShop GmbH
MIBK	Metil-Isobutil-Cetona
microTEC	Gesellschaft für Mikrotechnologie mbH

MMI	Multi-Mode Interference
MPB	MIT Photonic Bands
NBQ	Defensa Nuclear, Biológica y Química
NIL	Nanoimprint Lithography
NTC	Nanophotonics Technology Center
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBG	Photonic Band Gap
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDMS	Polidimetilsiloxano
PMMA	Polimetilmetacrilato
PNA	Peptide Nucleic Acid
POC	Point-of-care
PWE	Plane Wave Expansion
RIU	Refractive Index Unit
SEM	Scanning Electron Microscope
SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy
SNOM	Scanning Near-field Optical Microscopy
SOI	Silicon On Insulator
SSC	Saline-Sodium Citrate
SYM	Señal y Medida en Química
TEC	Thiol-Ene Coupling
UEA	University of East Anglia
UPV	Universitat Politècnica de Valencia
USB	Universal Serial Bus
UV	Ultravioleta
WCA	Water Contact Angle



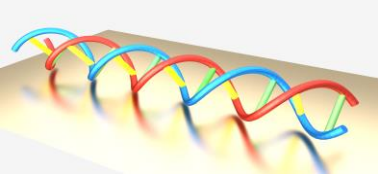
Capítulo 1 Biosensores fotónicos integrados en silicio

1.1. Motivación

Desde los años 80 ha ido creciendo el interés por desarrollar dispositivos de detección más eficientes y robustos en diferentes campos de aplicación como el diagnóstico médico, el control ambiental, el descubrimiento de fármacos, la defensa Nuclear, Biológica y Química (NBQ) o el control alimentario. Un biosensor es un dispositivo que se utiliza para determinar la presencia de un analito objetivo y consta de un transductor, una capa funcional para receptores, un sistema de suministro de fluidos y un sistema de lectura de datos. El objetivo principal es integrar estos biosensores en dispositivos *Lab-on-a-chip* (LOC) más complejos, en los que es posible implementar varias funcionalidades en un solo chip y realizar varios análisis simultáneamente.

En este contexto, la comunidad científica ha reconocido la importancia de la nanotecnología en el mercado actual. Ésta proporciona mejores rendimientos y funcionalidades que otras tecnologías, lo que le confiere gran interés principalmente en el campo del diagnóstico clínico [MOR-96, MAT-87], pero también en otros sectores como el medioambiental, el farmacéutico, el agroalimentario o la detección NBQ [BAR-02, BAC-08, COO-02, KRE-01, GRS-10]. Concretamente, la tecnología nanofotónica es una de las principales candidatas para la creación de los elementos de transducción de biosensores de alto rendimiento debido a las numerosas ventajas que ofrece. Entre ellas, las dos más relevantes son su alta sensibilidad, debido a la gran interacción del campo con el analito a detectar, y su reducido tamaño. Gracias a estas características es posible integrar numerosos sensores en un área extremadamente pequeña y detectar múltiples analitos en bajas concentraciones. Otras ventajas que ofrecen los biosensores nanofotónicos son robustez, menor tiempo de análisis requerido, detección sin necesidad de marcaje (*label-free*), requerimiento de volúmenes de muestra muy reducidos e inmunidad a interferencias electromagnéticas. Además, la fotónica de silicio ofrece compatibilidad con la tecnología *Complementary Metal Oxide Semiconductor* (CMOS) y flexibilidad de fabricación con tecnologías de producción en masa, por ejemplo *nanoimprint lithography* (NIL), posibilitando un elevado volumen de producción a un reducido coste [FAN-08, EST-12, LUC-12].

Probablemente, el diagnóstico médico sea el área principal en la que se espera que los biosensores y los dispositivos LOC cambien considerablemente el *modus operandi* actual de análisis. El principal objetivo dentro de este campo es el desarrollo de los denominados dispositivos *point-of-care* (POC), utilizados para proporcionar *in situ* información fiable y precoz sobre el estado de salud del paciente, la cual permita determinar el tratamiento más adecuado. Por tanto, los dispositivos LOC suponen un cambio de paradigma en la atención médica, prestando especial interés en el diagnóstico preventivo frente al tratamiento curativo. El uso de este tipo de dispositivos POC se ha beneficiado enormemente de los avances actuales logrados en el campo del descubrimiento de nuevos biomarcadores de



enfermedades. Estos biomarcadores, que pueden encontrarse en muestras humanas (es decir, sangre, suero, plasma, orina, etc.), permiten un diagnóstico precoz y mínimamente invasivo de una gama cada vez mayor de enfermedades. Por ejemplo, en la actualidad existe una enorme preocupación por el cáncer, cuyo diagnóstico suele basarse en técnicas invasivas (por ejemplo, biopsia, colonoscopia, etc.), que deben ser realizadas por personal cualificado, requieren la hospitalización del paciente y la mayoría de las veces solo permiten el diagnóstico de cáncer cuando la enfermedad se encuentra en una etapa avanzada.

En este marco de las enfermedades oncológicas, Globocan revela una estimación a nivel mundial para el año 2020 de 19,3 millones de nuevos casos de cáncer y 10 millones de muertes a causa de esta enfermedad [GCO]. La Figura 1.1 muestra los casos estimados de incidencia y muerte sobre la población mundial de ambos sexos hasta los 74 años de edad, distinguiendo entre diferentes tipos de cáncer. Según estadísticas de *International Agency for Research on Cancer* (IARC) la carga mundial de cáncer sufrirá un aumento del 47% en 2040, a pesar de los avances terapéuticos actuales. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) afirma que la mayoría de los tipos de cáncer tienen altas tasas de curación cuando se detectan precozmente y se tratan de acuerdo a las mejores prácticas [WHO]. Por tanto, el desarrollo de herramientas fiables de detección masiva, cuya integración en dispositivos POC permita el diagnóstico precoz de cáncer, es un factor clave para reducir la tasa de mortalidad.

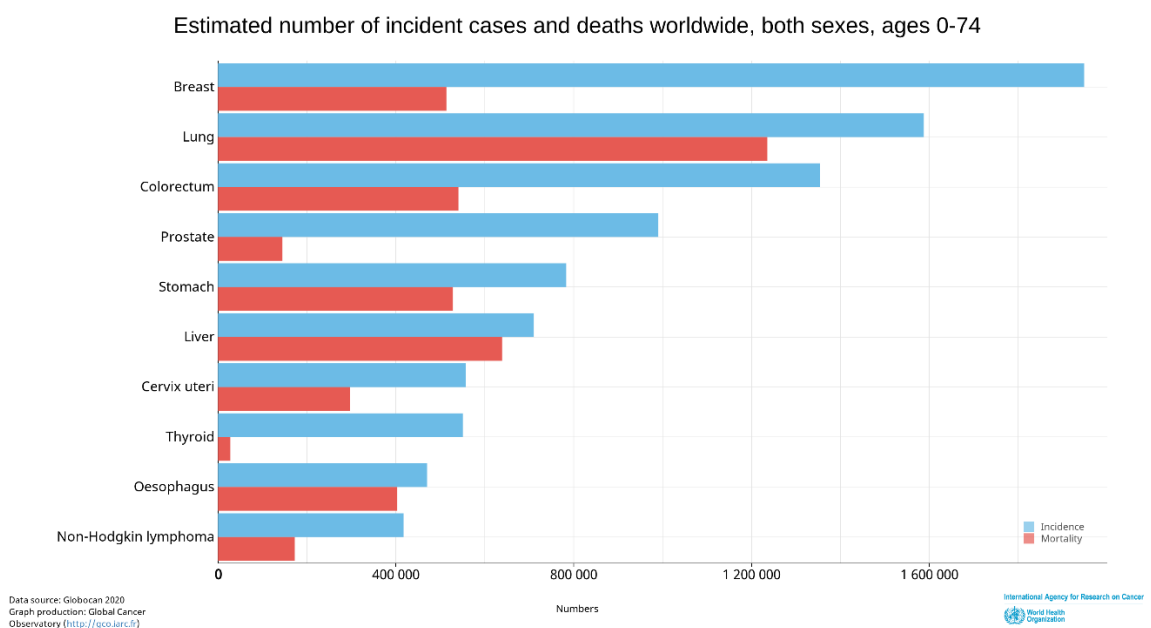
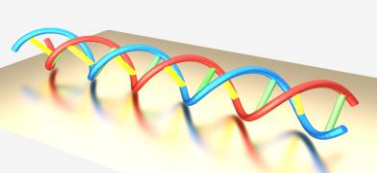


Figura 1.1. Estimación de la incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial, expresada en número de casos anuales en 2020. Fuente: GLOBOCAN 2020.

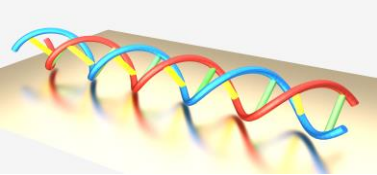
La identificación de biomarcadores fiables que puedan ser medidos de forma rutinaria en muestras de fácil acceso como suero o plasma constituye uno de los principales desafíos en la investigación del cáncer. Actualmente, debido a la estabilidad que presentan los microRNAs (miRNAs) en el torrente sanguíneo, se están explorando por su potencial como biomarcadores de cáncer y otras enfermedades. Los miRNAs son cadenas de ácidos nucleídos más cortas que los oligonucleótidos, cuyo uso como indicadores relacionados con diferentes funciones biológicas ha suscitado un gran interés durante los últimos años. Los oligonucleótidos juegan



un papel importante en la capacidad de regular la expresión de otros genes [HE-04, GUT-15, DEB-07], en la proliferación y diferenciación celular [MAU-13, LIM-05, DUN-06, LIN-09], en la apoptosis [CHA-05] y en el desarrollo neural [FIN-09], entre otras funciones. Concretamente, los miRNAs son una clase de pequeños ARNs no codificantes (~22 nucleótidos) cuya desregulación se ha correlacionado con alrededor de 400 enfermedades humanas [LI-14], más allá de cáncer [GOOD-15, JUD-09, LOD-09, CASA-12]: Alzheimer [WAN-19, SWA-19], Parkinson [FYF-20, GOH-19], diabetes [SAB-09, WAL-08, MUH-08], osteoporosis [MAN-18, BOT-19], enfermedades cardiovasculares [KAU-20, SIA-20], enfermedades neurodegenerativas [LIU-17, PER-07, LEE-06]. Por tanto, la detección de biomarcadores miRNA permitirá el diagnóstico precoz de al menos 400 enfermedades mediante técnicas mínimamente invasivas, siendo ya un campo emergente de investigación.

Desde el descubrimiento de la pérdida de los biomarcadores miRNA-15a y miRNA-16-1 en la leucemia linfocítica crónica de células B [CAL-02], varios estudios han reportado cambios en la expresión de miRNAs en distintos tipos de cáncer [JAN-12, LEE-09]. Volinia et al. realizó un análisis miRNome a gran escala e identificó gran parte de miRNAs sobreexpresados en tumores sólidos [VOL-06], de entre los cuales miRNA-21, miRNA-191 y miRNA-17-5p aparecían significativamente sobreexpresados en todos los tipos de tumores considerados. Además, se validaron firmas fenotípicas de miRNAs para cada tumor. Desde entonces, el perfil de expresión de miRNAs ha permitido distinguir entre tejidos sanos y tejidos tumorales e incluso clasificar éstos por grados [LEE-09, IQB-15, THA-16, BUN-12]. En 2008 se descubrió que los miRNAs también estaban presentes en la sangre, siendo detectados en plasma, plaquetas, eritrocitos y células nucleadas [MIT-08]. Mitchell et al. mostró que los niveles de miRNA-141 en suero discriminaban significativamente entre pacientes con cáncer de próstata y pacientes sanos. Asimismo fue demostrado que los miRNAs en plasma son extraordinariamente estables incluso en condiciones tan duras como ebullición, pH bajo o alto, larga duración de almacenamiento a temperatura ambiente y múltiples ciclos de congelación-descongelación [CHE-08]. Otros estudios demostraron la regulación positiva de miRNA-21, miRNA-141, miRNA-200, miRNA-200c, miRNA-200b, miRNA-203, miRNA-205 y miRNA-214 en exosomas cancerosos circulantes [LOD-09]. En consecuencia, los miRNAs se convirtieron en potenciales candidatos a biomarcadores sanguíneos de cáncer. Posteriormente, también se encontraron miRNAs en suero, saliva y orina, los cuales habían sido previamente identificados en células y tejidos [CASA-12]. Hasta ahora, se han encontrado patrones distintivos de miRNAs circulantes para diferentes tipos de cáncer: mama [ZHA-15], próstata [WAN-14], pulmón [NAD-15] y colon [HOF-13]. Sin embargo, la baja concentración en la que se hallan los miRNAs en sangre (en el rango pM o incluso fM) constituye la mayor dificultad para su detección, requiriendo el uso de técnicas de análisis capaces de proporcionar extremada sensibilidad [WAN-12].

Hoy en día, las técnicas más utilizadas en la detección de oligonucleótidos son *northern blot* y reacción de polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) [VAR-08, BEN-10]. A pesar de que el ensayo *northern* ha permitido la identificación de nuevos miRNAs [LAG-02], éste proporciona una baja sensibilidad, es extremadamente laborioso y requiere gran cantidad de muestra y elevado tiempo de análisis [STR-09]. Por contra, qPCR puede detectar bajas concentraciones de oligonucleótidos con una sensibilidad relativamente alta, pero requiere que la muestra sea altamente purificada, lo que puede introducir una gran variabilidad y conducir a análisis inexactos [GRA-16]. Además, uno de los requisitos más importantes de estos métodos para aumentar tanto la sensibilidad como selectividad es la inclusión de marcadores, haciendo la detección más lenta, cara y menos fiable [SEY-05, HEM-06]. Teniendo en cuenta las limitaciones ofrecidas por las técnicas de análisis convencionales, el desarrollo de dispositivos biosensores de alto rendimiento emerge como alternativa en la detección de miRNAs y, por tanto, en el diagnóstico médico.



En cuanto al desarrollo comercial de dispositivos de diagnóstico *in vitro* (IVD, *in vitro diagnostics*), en la actualidad existen muchas empresas con presencia en el mercado de IVD (Abbott, Alere, Siemens, Becton Dickinson, Biomerieux, Roche, etc.), pero solo algunas de ellas focalizan su atención en dispositivos POC y ninguna de ellas en la detección de biomarcadores miRNAs. El dispositivo i-STAT de Abbott probablemente sea el ejemplo más notable entre los dispositivos IVD POC. Este dispositivo, cuyo principio de funcionamiento está basado en una ELISA electroquímica, proporciona un resultado en menos de 10 minutos utilizando solo 2-3 gotas de sangre. i-STAT detecta diferentes marcadores y parámetros (por ejemplo, compuestos químicos, electrolitos, marcadores de proteínas y péptidos) usando diferentes tipos de cartuchos para cada tipo de análisis. Sin embargo, los cartuchos para los análisis más relevantes (por ejemplo, para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares utilizando biomarcadores cTnI, CK-MB o BNP) solo detectan un único biomarcador, proporcionando un nivel de multiplexación muy reducido. Actualmente el dispositivo i-STAT tiene un precio de venta entre 8.000 y 10.000 euros. El precio de los cartuchos varía en función del análisis (por ejemplo, el precio de un cartucho para la detección de cTnI es de 20 euros). Otro dispositivo comercial interesante es el sistema cobas h 232 de Roche, también focalizado en la detección de biomarcadores de enfermedades cardiovasculares y que también requiere el uso de diferentes cartuchos para la detección de cada biomarcador.

Con respecto a la disponibilidad comercial de dispositivos de detección basados en la tecnología nanofotónica, la única plataforma existente es *Maverick Detection System* de Genalyte. Sin embargo, su rendimiento está limitado por su propio principio de funcionamiento, basado en la lectura espectral de la respuesta óptica proporcionada por anillos resonantes. Esto requiere el uso de fuentes sintonizables, las cuales son instrumentos caros y voluminosos.

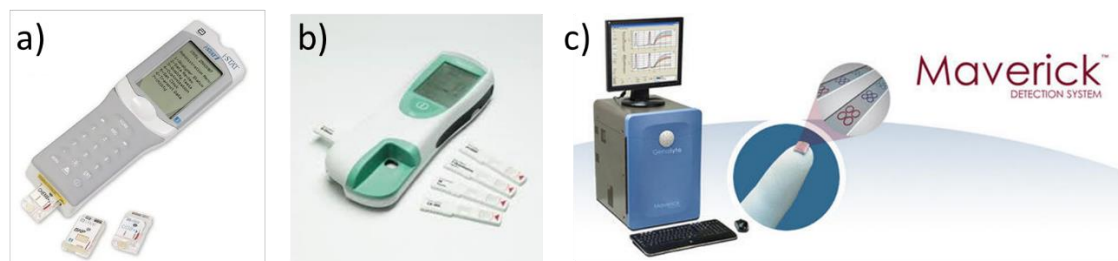
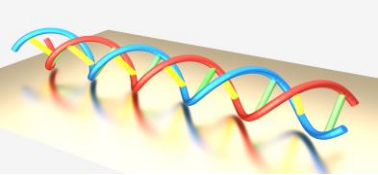


Figura 1.2. Dispositivos POC: a) i-STAT de Abbott; b) cobas h 232 de Roche; c) Maverick Detection System de Genalyte.

1.2. Biosensores: definición, propiedades, tipología y requerimientos

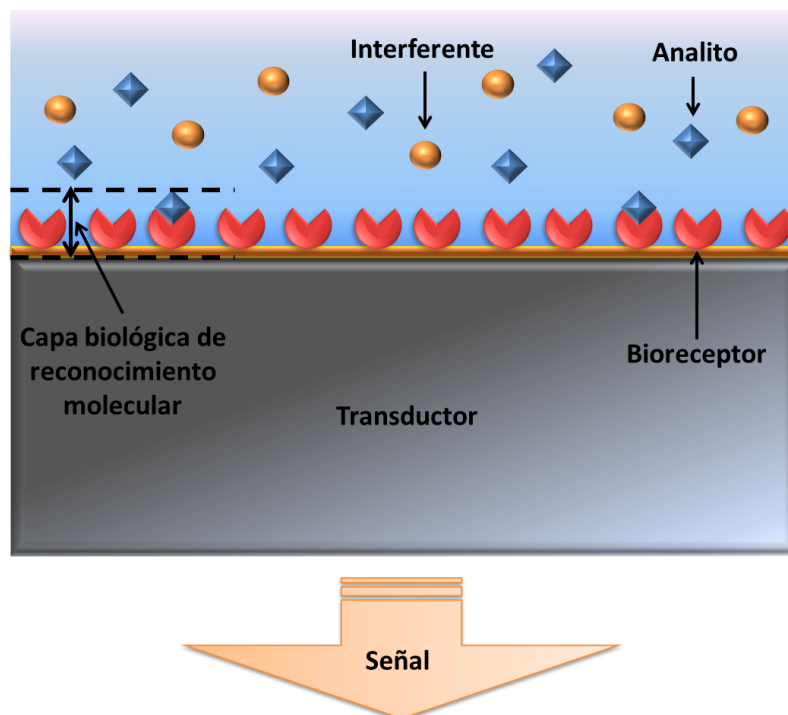
La naturaleza ha desarrollado un amplio conjunto de biomoléculas y estructuras biomoleculares que muestran una gran selectividad en el reconocimiento de alguna propiedad particular, lo que permite su unión con una determinada molécula de entre un conjunto o una mezcla de ellas. Esta capacidad de reconocimiento y unión específica, inherente a muchos tipos de biomoléculas, tales como anticuerpos, proteínas de diversa naturaleza o ADN, entre otros, ofrece una oportunidad para explotar sus características exclusivas y desarrollar dispositivos que permitan la detección de sustancias por las que éstas presentan una capacidad de interacción específica.

Un biosensor es un dispositivo compacto de análisis formado por:



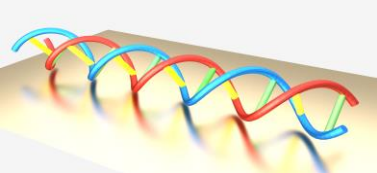
1. Un **elemento de reconocimiento biológico** (ácido nucleico, enzima, anticuerpo, tejido, célula...) preparado para detectar específicamente una sustancia (analito) gracias a la especificidad de las interacciones biomoleculares. También denominado bioreceptor.
2. Un **sistema de transducción** al que está asociado el bioreceptor y que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito.

El principio de detección de un biosensor está representado en la Figura 1.3. Éste se basa en la interacción específica entre el compuesto de interés y el elemento de reconocimiento biológico. Como resultado de esta unión se produce la variación de parámetros físico-químicos que son detectados por el transductor, originando una señal cuantificable que indica la presencia del analito sometido a estudio, la cual es proporcional a su concentración en la muestra. El **límite de detección (LOD, limit of detection)** es la cantidad mínima de información de detección que puede ser detectada por el sensor, calculado considerando la relación entre el ruido de la medición y la sensibilidad del sensor, y el **rango dinámico** es el intervalo comprendido entre el valor más alto y el valor más bajo de la señal de salida del sensor relacionada con el evento detección. El límite inferior del rango dinámico estará determinado por el límite de detección del sensor y el cambio más pequeño que se puede observar en la señal de salida viene determinado por la **resolución**. Para calcular este parámetro, el ruido del sistema debe caracterizarse en una condición de estado estable sin ninguna variación de detección.



REPRODUCCIÓN DE LOS DATOS

Figura 1.3. Representación esquemática del principio de funcionamiento de un biosensor. La muestra a analizar se pone en contacto con el dispositivo, siendo posible detectar solamente el analito para el que está diseñado el receptor. Cuando tiene lugar la reacción de reconocimiento biológico se producen una serie de cambios físico-químicos detectados por el transductor, que produce una señal cuantificable, directamente proporcional a la concentración del analito.



Los dos constituyentes del biosensor, bioreceptor y transductor, forman una unidad funcional, cuya selectividad viene dada por la parte biológicamente activa, de manera que el dispositivo interactúe exclusivamente con el compuesto de interés y no con otros de propiedades similares [LOW-89]. Además de proporcionar **alta selectividad** y **alta sensibilidad**, según su implementación, algunos biosensores ofrecen la posibilidad de medir, cuantificar y analizar en **tiempo real** un proceso de interacción entre biomoléculas de **forma directa**. Esto quiere decir que, a diferencia de las técnicas de análisis convencionales, no es necesario el uso de algún marcador molecular (colorimétrico, quimio-luminescente, quimio-fluorescente o radioactivo) para realizar el análisis. Estas características confieren a los biosensores la posibilidad de, además de realizar un análisis cualitativo y cuantitativo, evaluar la cinética de la interacción (constante de afinidad, asociación, disociación...) y, por tanto, elucidar los mecanismos fundamentales de dicha interacción. Entre los requerimientos de los biosensores, existen otras muchas características como son su **alta fiabilidad** (los sistemas de transducción deben permanecer inalterados por la muestra a medir) y su **alta estabilidad**, necesaria para obtener medidas precisas y de alta sensibilidad.

Aunque existe gran variedad de biosensores, cabe destacar las ventajas más importantes que ofrecen algunos de ellos como la **facilidad de manejo**, la **portabilidad** y la **miniaturización**, lo que posibilita su utilización *in-situ* y a pie de campo. Gracias a los desarrollos en microelectrónica y nanotecnología (incluyendo las avanzadas técnicas de micromecanizado y nanofabricación), se han logrado reducir las dimensiones de estos dispositivos. De esta forma, pueden integrarse varios de ellos en un dispositivo LOC capaz de realizar la **detección multi-analito** utilizando **reducidos volúmenes de muestra** (del orden de microlitros o nanolitros).

Por otro lado, uno de los mayores atractivos de los biosensores es la posibilidad de ser fabricados con **bajo coste**. Esta última característica es difícil de conseguir, pues el elemento transductor y los bioreceptores que constituyen el biosensor suelen encarecer el dispositivo. Aun así, con los avances de la ingeniería genética (que permite la creación de nuevas biomoléculas o de las ya existentes a gran escala) y la nanotecnología e ingeniería de materiales (que permite la fabricación de nanoestructuras de nuevos materiales de bajo coste y con las propiedades deseadas) se busca fabricar biosensores de alta sensibilidad y selectividad e introducirlos en el mercado posibilitando estar al alcance del mayor número de beneficiarios. También es valorable que los biosensores tengan un **tiempo de vida largo** y/o puedan ser **reutilizados**, sobre todo cuando están integrados en una línea de producción de una industria. De cara a ahorrar tiempo, materiales y reactivos, es importante que los biosensores no requieran el **pretratamiento de la muestra** y que permitan **tiempos de análisis cortos**.

La Tabla 1.1 resume las ventajas generales más importantes de los biosensores frente a las técnicas de análisis convencionales.

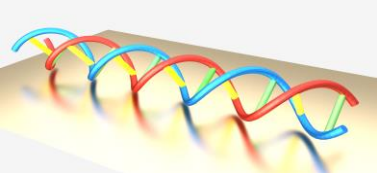


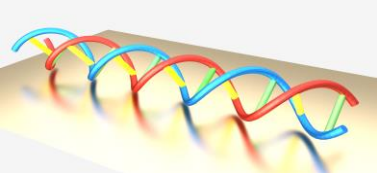
Tabla 1.1. Comparativa de las características generales de los biosensores y las técnicas convencionales.

TÉCNICAS CONVENCIONALES	BIOSENSORES
Largo tiempo de análisis	Posibilidad de análisis en tiempo real
Manejo por parte de personal especializado	Fáciles de usar
Técnicas caras	Técnicas baratas
Técnicas de laboratorio	Portátiles, miniaturizables y automatizables
Generalmente detección monoanalito	Posibilidad de detección multianalito
Necesidad de marcador	Posibilidad de detección sin marcador
Pequeño volumen de muestra	Muy reducido volumen de muestra
Pre-tratamiento de la muestra	Mínimo pre-tratamiento de la muestra
Sensibles, precisos y fiables	Sensibles, precisos y fiables

La introducción en el mercado de los dispositivos biosensores POC de glucosa [MAT-87] supuso la prueba más concluyente de la utilidad de la tecnología biosensora en el diagnóstico clínico. Sin embargo, tal y como se expuso en el punto 1.1., la biotecnología ha permitido extender el uso de biosensores a otros sectores. Para hacerse una idea de la cantidad e importancia de las aplicaciones biosensoras, basta con decir que se estima que en 2027 el mercado de biosensores excederá los 36 billones de dólares [GVR-20].

Los biosensores pueden ser clasificados en base a numerosos criterios. Una primera clasificación permite diferenciar a los biosensores en función de la naturaleza del **elemento de reconocimiento biológico**. Éste condiciona el tipo de reacción que puede tener lugar entre el receptor y el analito, distinguiendo entre:

- **Biosensores catalíticos.** La reacción de reconocimiento molecular produce una modificación química del analito, que posibilita la detección [KWO-00]. Las biomoléculas receptoras (biocatalizadores) suelen ser microorganismos, secciones de tejidos o enzimas.
- **Biosensores de afinidad.** La interacción del analito con el bioreceptor se basa en la afinidad entre ellos y no genera una transformación catalítica sino una reacción de equilibrio en la que se forma un complejo analito-receptor [ROG-11]. Como la reacción de reconocimiento no genera productos detectables, es necesario utilizar técnicas de transducción asociadas al proceso de interacción en sí, tales como cambios de masa, modificación de propiedades ópticas, eléctricas o magnéticas. Entre los receptores de bioafinidad cabe destacar los anticuerpos, lecitinas, ADN, aptámeros y ácidos peptidonucleicos (PNAs, *peptide nucleic acids*). La gran especificidad y afinidad de este tipo de interacciones confiere a este tipo de sensores una especial selectividad y sensibilidad. Como contrapartida, este tipo de sensores requiere minimizar las uniones inespecíficas y, en ocasiones, proporcionar cierta reversibilidad a la reacción de afinidad mediante el empleo de agentes de regeneración. Éstos no deben alterar la capacidad de reconocimiento del receptor y, por tanto, permitir la realización de múltiples análisis.

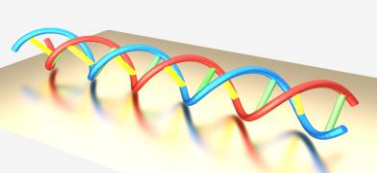


Los biosensores desarrollados en este trabajo son de afinidad. Concretamente son biosensores de ADN/ARN, donde la inmovilización de una hebra de ADN en el área sensora permite la detección de su complementaria mediante el proceso de hibridación [ERI-03]. La utilización de este tipo de biosensores todavía no está muy extendida y su éxito dependerá en gran medida de la capacidad para llevar a cabo la detección múltiple de cientos de secuencias con un mismo biosensor y de conseguir dispositivos lo suficientemente sensibles que no requieran procesos de amplificación mediante PCR [WAN-00].

Los biosensores también se pueden clasificar según el sistema de transductor empleado y, por tanto, el principio físico subyacente en el fenómeno de la transducción. Este último se encuentra íntimamente ligado al sistema detector que es el que permite monitorizar los cambios que el transductor registra como consecuencia del proceso de reconocimiento molecular. La eficacia en el procesado de la señal del biosensor viene determinada por el propio transductor.

- **Biosensores electroquímicos.** El transductor mide el cambio electroquímico que se produce en el medio como consecuencia de la reacción de reconocimiento molecular, el cual es proporcional a la cantidad de analito a determinar [DOR-08, RON-10]. Entre ellos se distinguen varios tipos: amperométricos, potenciométricos, impedimétricos y conductimétricos.
- **Biosensores mecano-acústicos.** Los transductores acústicos detectan cambios de masa a través de una microbalanza formada por un cristal piezoeléctrico [FER-09]. Un caso particular de estos transductores son los micro/nanomecánicos, los cuales emplean micropalanca similares a las empleadas en microscopía de fuerzas atómicas (AFM, *Atomic Force Microscope*) [ARL-11]. En éstos, además de detectar cambios de masa a través de la variación de su frecuencia de resonancia (directamente proporcional a la cantidad de analito a determinar), se pueden detectar los cambios de tensión superficial que tienen lugar en la superficie de la micropalanca como consecuencia de los fenómenos de reconocimiento molecular.
- **Biosensores magnéticos.** Este tipo de biosensores emplea micro o nanopartículas magnéticas cubiertas de un elemento de reconocimiento molecular que es el encargado de reaccionar con el analito. A continuación, otro elemento (matriz, gel...) se encarga de atrapar únicamente aquellas partículas magnéticas en cuya superficie se haya producido la reacción de reconocimiento molecular. Finalmente, mediante algún tipo de técnica o sensor magnético, se detecta el número de partículas magnéticas con analito en su superficie, siendo la señal magnética proporcional al número de éstas [LLA-10, MAR-08].
- **Biosensores ópticos.** El transductor óptico detecta la reacción de reconocimiento a través de cambios producidos en las características de la luz, ya sea a través de la longitud de onda, intensidad (cambios en la absorción o dispersión) o velocidad (cambios en el índice de refracción). Existen dos tipos de biosensores ópticos en función del modo en que la luz es guiada dentro del área sensora y según su forma de interactuar con el complejo analito-receptor: bio-optrodos o basados en guías de onda [ARN-90] y los basados en campo evanescente [FAN-08]. De estos últimos se hablará detalladamente en el punto 1.3., ya que los biosensores desarrollados en este trabajo son de este tipo.

Los biosensores electroquímicos son los sensores más desarrollados, ya que son fáciles de fabricar y usar, rápidos, fiables y, generalmente, de bajo coste. Sin embargo presentan dos importantes inconvenientes: poseen una baja selectividad y requieren el uso de un electrodo de referencia para mantener constante el potencial durante el transcurso de la medida



durante un largo periodo de tiempo. Por contra, los biosensores ópticos presentan indudables ventajas con respecto a los electroquímicos: no requieren de un electrodo de referencia, inmunidad ante interferencias eléctricas, operatividad en ambientes agresivos para los eléctricos, posibilidad de medida a diferentes longitudes de onda, mayor sensibilidad, versatilidad y estabilidad mecánica, menor tamaño y peso más reducido.

1.3. Biosensores fotónicos de campo evanescente

Dentro de los biosensores ópticos, los basados en fotónica integrada de campo evanescente probablemente susciten un mayor interés debido a sus destacadas características de alta sensibilidad, versatilidad y detección *label-free* y en tiempo real.

En la mayoría de biosensores fotónicos, el mecanismo de detección se basa en un cambio de índice de refracción como consecuencia de la variación de los parámetros físicos o químicos en la superficie de la estructura fotónica, originada típicamente por la reacción de reconocimiento molecular. Si el cambio de índice se produce en la parte imaginaria del índice de refracción (constante de absorción), se trata de un biosensor de absorción, el cual requiere una referencia que permita eliminar posibles variaciones de intensidad debidas a las fuentes de luz. Sin embargo, mucho más empleados y sensibles son los biosensores que detectan cambios en la parte real del índice de refracción del medio exterior y que generan una variación en la velocidad de propagación de la luz guiada, es decir, en su índice de refracción efectivo.

Aunque la luz en una guía de ondas óptica se propaga confinada prácticamente en el núcleo de la misma, una parte de ella, conocida como onda evanescente, se extiende a los medios adyacentes y decae exponencialmente con la distancia al núcleo. Esta distancia, llamada de penetración, suele ser de unos cientos de nanómetros (de 0,1 a 1 μm) y delimita el área sobre la superficie del sensor en la que se detecta el cambio que se produce en el medio externo cuando la reacción de reconocimiento molecular tiene lugar. Por esta razón, la interferencia de otras sustancias presentes en la muestra a analizar es mínima. **Cuando la onda evanescente interacciona con la capa biológica de reconocimiento molecular se obtiene una medida cuantitativa del cambio en la propagación de la luz o índice de refracción efectivo, cuya magnitud depende de la concentración del analito y de la constante de afinidad de la interacción analito-receptor.** El principio de detección de campo evanescente es representado esquemáticamente en la Figura 1.4.

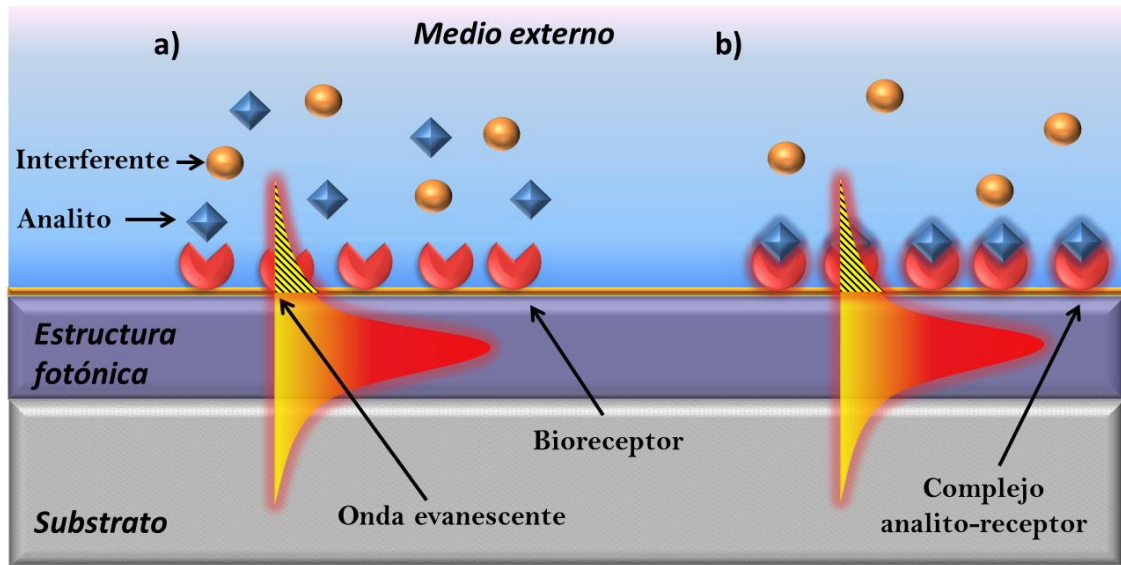
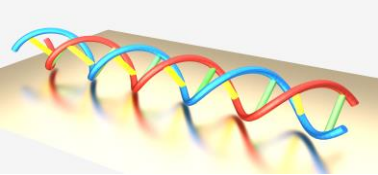


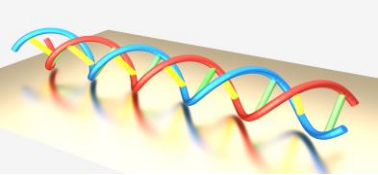
Figura 1.4. Ilustración esquemática del principio de detección de campo evanescente: la onda evanescente se propaga a lo largo de la superficie de la estructura fotónica e interactúa con la capa biológica de reconocimiento molecular a) bioreceptores y b) complejo analito-receptor.

Cabría pensar que cuanto mayor sea la onda evanescente en la superficie de la estructura fotónica mayor será la interacción del campo con el analito a detectar. Sin embargo, una cantidad excesiva de campo evanescente provocaría una degradación significativa en el comportamiento del modo guiado a lo largo del núcleo de la estructura fotónica, debilitando considerablemente la señal. Por tanto, **a la hora de diseñar un sensor de alto rendimiento basado en campo evanescente es necesario establecer un compromiso entre la fracción de energía que se propaga confinada a lo largo del núcleo de la guía de ondas y la fracción que se propaga sobre la superficie de la estructura fotónica (onda evanescente)**. De manera que los parámetros de diseño juegan un papel crucial en la determinación del rendimiento de un biosensor de campo evanescente.

Entre las configuraciones más comunes de las estructuras fotónicas empleadas para convertir el cambio del índice de refracción efectivo en una señal cuantificable, como una variación en intensidad o frecuencia, cabe considerar los anillos resonantes [QAV-10, RAM-08, QAV-11, HU-14, SCH-12], los interferómetros Mach Zehnder [SEP-06, QIN-16] y los cristales fotónicos [HU-14, TOC-10]. Estas configuraciones están representadas en la Figura 1.5.



Figura 1.5. Representación de las configuraciones típicas de estructuras fotónicas integradas: a) anillo resonante; b) interferómetro Mach-Zehnder; c) cristal fotónico.



De cara a optimizar la interacción entre la onda evanescente y el analito y, por tanto, optimizar la respuesta de detección ofrecida por la estructura fotónica, la biofuncionalización de su superficie constituye un paso crucial. Como se ha comentado previamente, el campo evanescente se caracteriza por su disminución exponencial a medida que se aleja del núcleo de la guía de ondas, de manera que **la interacción onda evanescente-analito será mayor cuanto más próxima a la superficie del sensor se produzca**. En definitiva, **la sensibilidad ofrecida por la estructura fotónica vendrá condicionada por la proximidad a la superficie en la que se detecte el analito**. Sin embargo, la funcionalización del sensor añade una capa biológica de reconocimiento molecular sobre su superficie, de manera que el analito estará más lejos de ésta y su interacción con la onda evanescente será más débil, como se puede apreciar en la Figura 1.6. De hecho, si la capa biológica no es lo suficientemente delgada será imposible que la interacción onda evanescente-analito tenga lugar y, por tanto, sea posible cuantificar una mínima respuesta de detección.

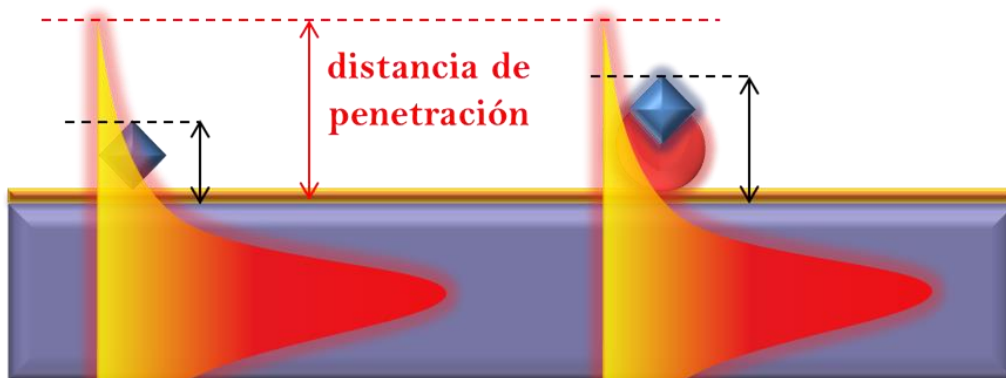
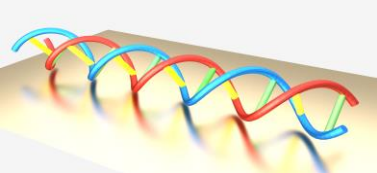


Figura 1.6. Ilustración de la interacción entre el analito y la onda evanescente (izquierda) sin la inmovilización sobre la superficie de los bioreceptores y (derecha) en presencia de éstos. Una capa biológica gruesa conduce a una interacción más débil.

1.3.1. Estructuras de *band gap* fotónico

Los cristales fotónicos son estructuras dieléctricas periódicas con una característica fundamental: esta periodicidad impide la propagación de la luz a través de la estructura en un rango de longitudes de onda determinado. Ese rango espectral se denomina **banda prohibida fotónica (PBG, photonic band gap)**. Dependiendo del número de dimensiones en las que la estructura tenga periodicidad se podrá hablar de cristales fotónicos unidimensionales (1D), bidimensionales (2D) o tridimensionales (3D) [BOG-05]. A pesar de que el control total de la luz solo se puede conseguir haciendo uso de cristales fotónicos 3D, las propiedades más interesantes de los cristales fotónicos son las que derivan de la periodicidad de la estructura en la dirección de propagación de la luz. Esta periodicidad provoca la curvatura de las bandas guiadas, que es la responsable de las bajas velocidades de grupo (v_g) y de las altas dispersiones cromáticas. Por tanto, en ocasiones, en lugar de usar estructuras periódicas 2D o 3D, cuya implementación física es muy compleja, basta con usar estructuras periódicas 1D sobre sustratos planares, las cuales son mucho más sencillas de fabricar. Un ejemplo típico de este tipo de estructuras consiste en la introducción de una modulación periódica en el índice de refracción de la estructura fotónica exclusivamente en la dirección de propagación de la luz [NUN-10, DUT-13, WANG-14, WANG-19, LUA-19]. Esta configuración representa una prometedora y eficaz alternativa a los cristales fotónicos 2D y 3D para fines de detección, no



solo por cuestiones de fabricación sino también de tamaño. Éste es extremadamente reducido, típicamente en el rango de varias decenas de μm^2 , lo que permite integrar numerosas estructuras en un área muy reducida, posibilitando la detección multi-analito.

Una de las características más relevantes de las estructuras de *band gap* fotónico como sensores es que su configuración periódica posibilita la detección de concentraciones de analito muy bajas debido a una mayor interacción del campo electromagnético con éste, proporcionando mayores valores de sensibilidad. El fenómeno de onda lenta es el responsable de esta mejora en la interacción luz-materia [POV-05, GAR-08].

Hay varias formas de ralentizar la velocidad de propagación de la luz, la cual viene determinada por su velocidad de grupo. La velocidad de la onda está directamente relacionada con el índice de refracción del medio por el que viaja la luz, siendo éste un medio homogéneo. Por tanto, utilizando materiales de alto índice de refracción, es posible reducir la velocidad de grupo en un factor dado por las propiedades ópticas del material. Sin embargo, el índice de refracción de los materiales disponibles para guiado óptico no es muy alto a frecuencias ópticas, lo que limita significativamente la reducción de la velocidad de grupo que se puede obtener de esta manera. No obstante, un cambio rápido en el índice de refracción provoca un nivel extremadamente bajo de la velocidad de la luz, como ocurre en el caso de los cristales fotónicos. Estas estructuras tienen la propiedad de exhibir una reducción extrema de la velocidad de grupo para aquellas frecuencias ubicadas cerca de los bordes de las bandas guiadas.

La aparición del fenómeno de onda lenta tiene dos principales consecuencias directas que son potencialmente interesantes para propósitos de biodetección: el incremento del tiempo de propagación a lo largo de la guía de ondas y la compresión de la onda óptica. Estos dos efectos aparecen representados conceptualmente en la Figura 1.7, considerando una estructura periódica 1D. Según la primera consecuencia, una reducción en la velocidad de propagación de la luz se traduce en un aumento en el tiempo que ésta interactúa con el analito. La segunda consecuencia se refiere al incremento del campo óptico que se produce debido a la compresión de las ondas que se propagan cuando la luz es ralentizada. **Al combinar ambos efectos, el tiempo de interacción luz-materia más largo y el incremento de la intensidad de la onda, cabe esperar un aumento significativo de la sensibilidad del sensor debido a la mayor interacción del campo óptico con las sustancias/analitos objetivo.**

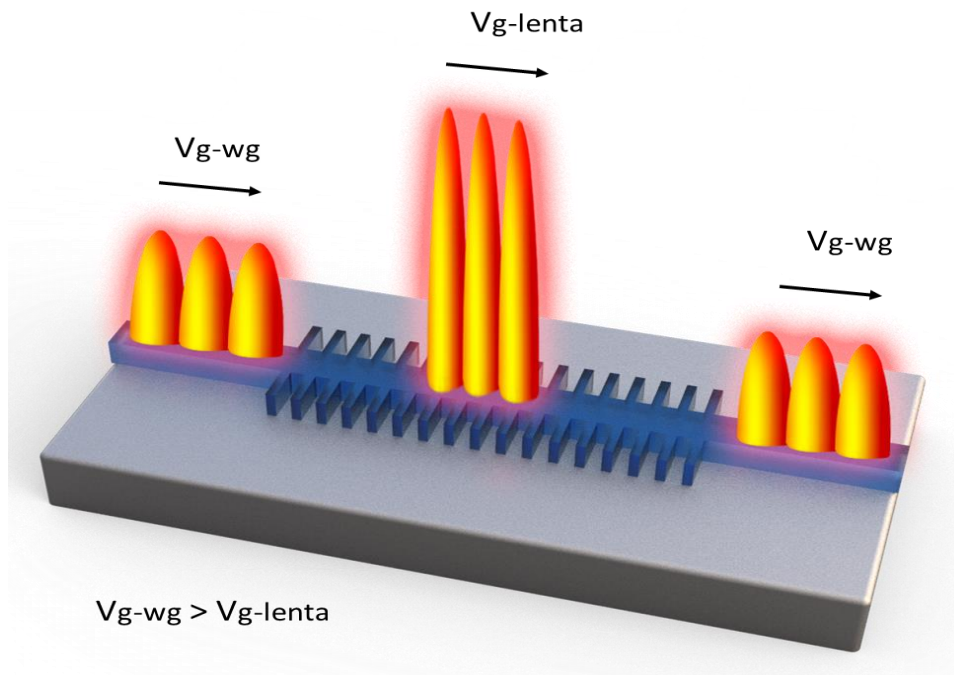


Figura 1.7. Representación del concepto del fenómeno de onda lenta en una estructura periódica 1D. La velocidad de la onda se reduce y su amplitud aumenta, mejorando la interacción luz-materia.

En el campo de la biodetección, la posibilidad de obtener bajos valores de velocidad de grupo es uno de los aspectos más atractivos de las estructuras que poseen periodicidad en la dirección de propagación de la luz. Sin embargo, **la mayor interacción entre la energía electromagnética del modo guiado y la propia estructura aumenta tanto la eficiencia de la detección biomolecular como la eficiencia de los efectos negativos que se producen en la propia estructura**, tales como calentamiento, absorción del material, imperfecciones en el proceso de fabricación, etc. **Uno de los efectos negativos de más relevancia en el desarrollo de estructuras de onda lenta es el aumento de pérdidas de propagación por rugosidad, ya que este defecto provoca la radiación de energía hacia el medio exterior.** Por tanto, para disminuir las pérdidas de propagación en las estructuras de *band gap* fotónico, se requiere una fabricación de gran precisión que permita minimizar las imperfecciones generadas en las guías de onda. Una de las formas de conseguir una mayor precisión en la fabricación es utilizando diseños lo más sencillos posibles, en los que las limitaciones del proceso de fabricación disponible no sean tan problemáticas [GARC-08].

El principio de transducción de las estructuras de *band gap* fotónico se describe esquemáticamente en la Figura 1.8, considerando una estructura periódica 1D y particularizando en la detección de miRNAs. La respuesta de detección depende de las variaciones de índice de refracción originadas en la superficie de la estructura de *band gap* fotónico. De manera que, **el bioconocimiento del miRNA mediante la hibridación con su hebra complementaria, previamente inmovilizada sobre la superficie del sensor, origina un cambio en el índice de refracción y, en consecuencia, el PBG es desplazado espectralmente.** Este desplazamiento, típico de los eventos de detección [MOR-95, SRI-08, ERI-03], está representado en la Figura 1.8.b) y su cuantificación es proporcional a la concentración del miRNA objetivo detectado.

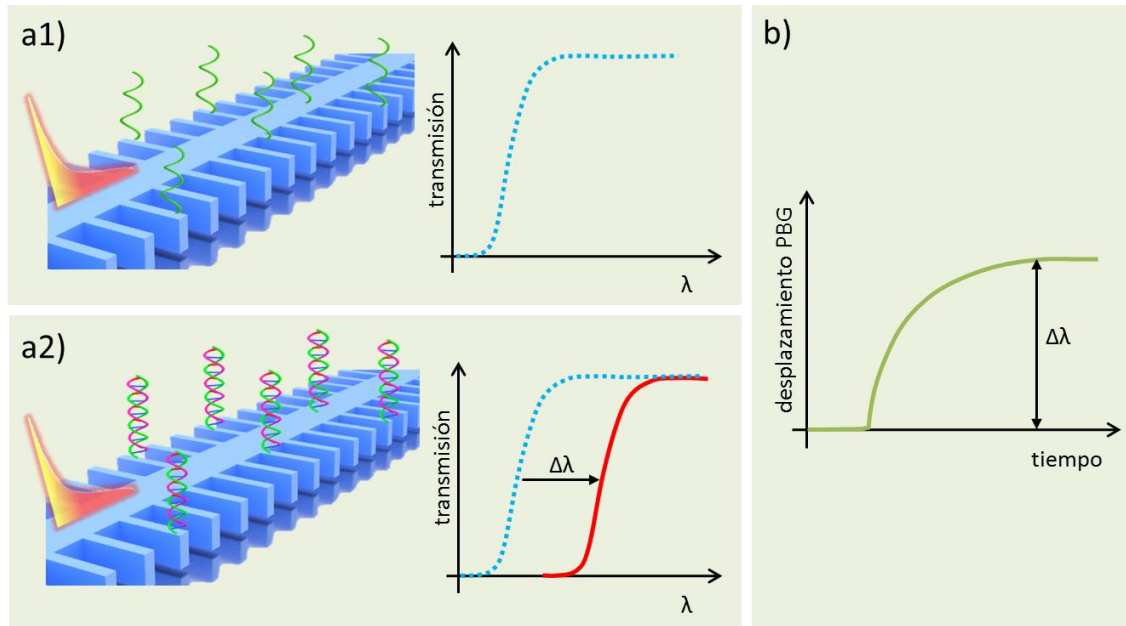


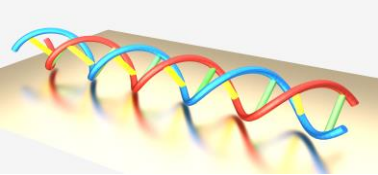
Figura 1.8. Descripción esquemática del principio de transducción de estructuras de *band gap* fotónico 1D en la detección de miRNAs: a1) Espectro de transmisión antes de la interacción biomolecular; a2) Espectro de transmisión después de la interacción biomolecular, la cual origina un desplazamiento espectral del PBG; c) Desplazamiento experimentalado por el PBG tras la detección de miRNAs.

1.4. Fotónica de silicio

El incesante interés por sustituir componentes voluminosos por dispositivos integrados ha impulsado la tecnología nanofotónica, convirtiéndola en la alternativa óptica a los dispositivos microelectrónicos actuales. Mientras que las bandas conductoras se utilizan para guiar los electrones en dispositivos electrónicos, los materiales semiconductores se utilizan principalmente para crear estructuras ópticas y formar circuitos fotónicos. El silicio (y sus derivados) es el material más utilizado para la fabricación de estructuras fotónicas integradas debido a su compatibilidad con los procesos de fabricación CMOS de la industria microelectrónica. Este hecho ha llevado a la creación de la plataforma de tecnología fotónica de silicio. Desde que surgió la tecnología de semiconductores en los años 50, el silicio se ha empleado como material principal para desarrollar pequeñas estructuras funcionales microelectrónicas. El enorme progreso en la fabricación de herramientas en el ámbito de la tecnología de semiconductores durante estos años ha posibilitado fabricar estructuras nanométricas utilizando equipos litográficos, los cuales han demostrado ser herramientas perfectamente útiles para la creación de estructuras nanofotónicas.

Aunque la mayor parte del trabajo realizado con la tecnología de fotónica de silicio ha ido dirigido al desarrollo de dispositivos en aplicaciones donde el cuello de botella electrónico es un problema (por ejemplo, comunicaciones, interconexiones o procesado de la señal), esta tecnología está demostrando ser muy útil también para propósitos de biodetección. **Los dispositivos biosensores fotónicos integrados en silicio han demostrado ofrecer muchas ventajas en comparación con otras tecnologías de detección, como alta sensibilidad, bajo límite de detección, detección *label-free* o alto nivel de multiplexación.**

La implementación más común de la fotónica de silicio es la tecnología SOI (*Silicon On Insulator*) y es la que se ha empleado para el desarrollo de las estructuras de detección



utilizadas en esta Tesis Doctoral. Como muestra la Figura 1.9, una oblea SOI consiste en una capa delgada de silicio (de espesor entre 200 y 250 nm) depositada sobre una capa de óxido de silicio (SiO_2) de espesor en torno a 1-3 μm ; estas dos capas se crean sobre un sustrato de silicio de espesor mucho mayor (alrededor de 700 μm) que proporciona estabilidad mecánica. Debido al alto contraste de índices de refracción (a una longitud de onda de 1550 nm) entre el revestimiento inferior de SiO_2 ($\sim 1,45$), la capa superior de silicio ($\sim 3,45$) y el revestimiento superior de aire (1), la luz está muy confinada en la dirección vertical dentro de la capa superior de silicio, la cual se utiliza para crear las estructuras fotónicas. El confinamiento horizontal se logra grabando dos zanjas de aire en el silicio, como muestra el recuadro de la Figura 1.9, definiendo así una guía de ondas óptica donde la luz estará completamente confinada (es decir, vertical y horizontalmente), como se puede apreciar en la Figura 1.10. Dependiendo de las dimensiones del núcleo de la guía de ondas, se excitarán uno o varios modos dentro de ella; en general, se buscan las dimensiones adecuadas para obtener una guía de ondas monomodo con el fin de evitar interferencias entre modos propagados (normalmente se utilizan anchos en el rango de 500 nm). Además, **en las guías monomodo aparece un campo evanescente mayor debido a que sus dimensiones son más pequeñas, siendo favorable para el desarrollo de biosensores fotónicos integrados**. Por otro lado, una reducción del tamaño del núcleo tiene como contrapartida un aumento en las pérdidas de propagación y radiación. Esta es la razón por la que las secciones multimodo y monomodo se suelen combinar para el desarrollo de circuitos fotónicos integrados (secciones multimodo para la distribución de la señal y secciones monomodo para la implementación de procesamiento óptico o funciones de detección).

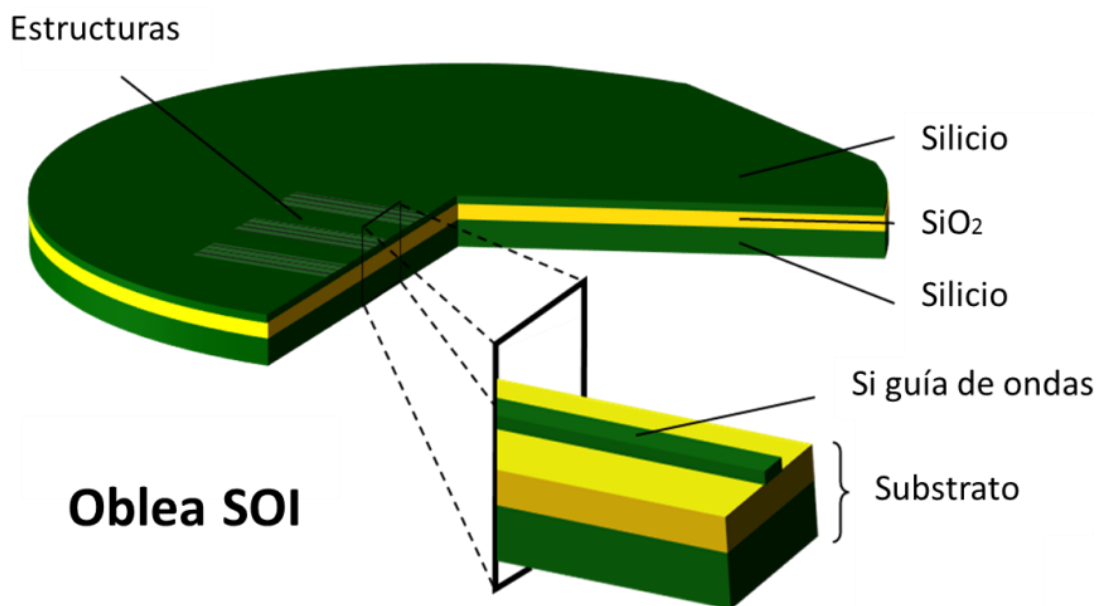


Figura 1.9. Distribución de las capas de una oblea SOI. El recuadro muestra esquemáticamente una guía de ondas SOI.

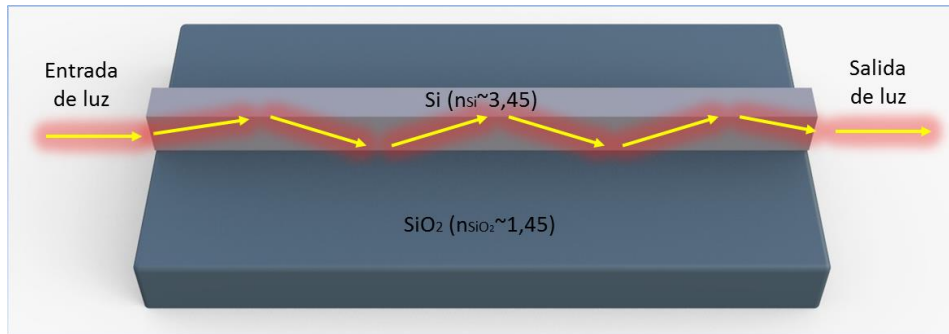


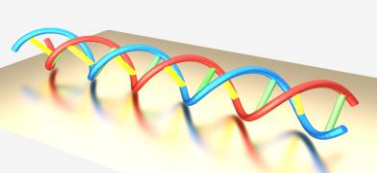
Figura 1.10. Representación esquemática del confinamiento de la luz en una guía de ondas SOI, debido al alto contraste de índices de refracción.

Otra consecuencia de la reducción de tamaño de las estructuras fotónicas SOI es el alto nivel de integración de estructuras y componentes en un solo chip. Por tanto, los dispositivos basados en tecnología nanofotónica permiten la inclusión de múltiples estructuras pasivas y activas en un único chip, abriendo así camino para realizar un completo procesamiento de la señal y sustituir en un futuro los voluminosos equipos eléctricos por dispositivos ópticos integrados. Para el caso de los dispositivos biosensores fotónicos, esta reducción de tamaño permite la integración de un gran número de estructuras de detección en un solo chip, ofreciendo así la posibilidad de proporcionar detección multiplexada para el cribado simultáneo de varios analitos objetivo en un solo análisis. Por ejemplo, asumiendo un tamaño de estructura de detección del orden de $100 \mu\text{m}^2$, se podrían integrar idealmente hasta 10.000 sensores en un chip de tan solo 1mm^2 de tamaño. Además, estas pequeñas dimensiones también supondrán una mejora de la sensibilidad de las estructuras de detección, ya que cuanto menor sea el *footprint*, menor cantidad de moléculas serán necesarias para llevar a cabo la detección.

Finalmente, la integración de una gran cantidad de sensores en un solo chip, combinada con el coste relativamente reducido y la facilidad de fabricación masiva de la tecnología CMOS, también permitiría una reducción significativa del coste por chip y por ensayo. La fabricación de chips de detección de bajo coste es ampliamente demandada en numerosas aplicaciones, como en el diagnóstico médico, donde el uso de chips desechables es prácticamente obligatorio para evitar problemas como la contaminación cruzada. Además, otros campos como el control ambiental también se beneficiarían del uso de chips desechables, como por ejemplo para la realización de campañas masivas de monitoreo de control de calidad ambiental del agua o el aire.

1.5. Objetivos y metodología de la Tesis Doctoral

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral consiste en proponer y validar dispositivos biosensores de alta sensibilidad para la detección de oligonucleótidos y, más concretamente, biomarcadores miRNA con aplicación en el diagnóstico precoz de cáncer. Para lograr este objetivo ha sido necesario el desempeño de otras tareas como el desarrollo de estructuras fotónicas de detección, la integración de éstas en un chip fotónico, la inclusión de una capa biológica de reconocimiento molecular sobre su superficie, la optimización de un sistema fluido experimental y la interrogación óptica mediante técnicas espectrales. Los objetivos específicos considerados para llevar a cabo estas tareas son los siguientes:



1. Desarrollo de transductores fotónicos de elevada sensibilidad

La investigación se inició con el estudio de las estructuras fotónicas de campo evanescente tradicionales y, más tarde, se focalizó en el estudio de las estructuras de *band gap* fotónico. Teniendo en cuenta las propiedades ópticas de este tipo de estructuras periódicas, entre ellas el fenómeno de onda lenta que origina una mayor interacción luz-materia, se propuso el diseño de cinco configuraciones de estructuras de detección de *band gap* fotónico 1D. Estas configuraciones están basadas principalmente en la incorporación periódica de elementos transversales y/o cavidades rectangulares sobre una guía de onda monomodo de silicio de anchura $w=460$ nm y de altura $h=220$ nm. Mediante una metodología basada en un bucle diseño-fabricación-caracterización experimental se determinaron los parámetros más importantes que influyen en el comportamiento óptico de estas estructuras de detección y se seleccionaron las configuraciones óptimas en base a los siguientes criterios:

- Localización del borde del PBG a una longitud de onda aproximadamente de 1550 nm en un entorno acuoso, siendo éste abrupto y claramente definido en el espectro de transmisión.
- Transmisión espectral plana en la banda de paso y una gran relación de extinción del PBG.
- Alta sensibilidad ante variaciones de índice de refracción.

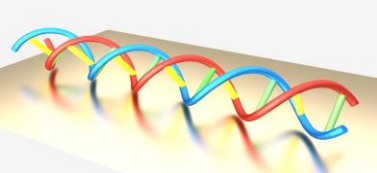
2. Integración de las estructuras de detección de *band gap* fotónico en un chip

Mediante el uso de herramientas de diseño de circuitos fotónicos integrados, varias estructuras de detección de *band gap* fotónico fueron incluidas en un chip atendiendo a los requerimientos de la plataforma de interrogación opto-fluídica utilizada. Para ello se consideró una distancia adecuada entre los accesos de entrada y salida del chip garantizando un espacio suficiente en el que colocar el canal microfluídico sobre las estructuras de *band gap* fotónico. Asimismo, para acoplar la luz simultáneamente en los accesos de entrada y recogerla en los accesos de salida también de manera simultánea, se dispusieron *grating couplers* (GCs) estratégicamente. Además, las estructuras de *band gap* fotónico fueron incluidas guardando una separación suficiente entre ellas que permitiera su biofuncionalización con distintas sondas y, por tanto, posibilitara la detección multi-analito.

El diseño del chip fotónico ha comprendido un constante proceso de optimización a lo largo del cual se han ido incluyendo nuevos elementos (por ejemplo acopladores de interferencia multimodal (MMIs, *Multi-Mode Interference*)) e introduciendo pequeñas modificaciones. Finalmente, gracias a un revestimiento superior de SiO_2 , se han obtenido chips fotónicos robustos y reutilizables.

3. Estudio de la biodisponibilidad de las sondas inmovilizadas sobre las estructuras de *band gap* fotónico

La biofuncionalización de los chips fotónicos se realizó con el fin de proporcionar la especificidad requerida a las estructuras de *band gap* fotónico. Ésta se consiguió uniendo los receptores biológicos adecuados a la superficie de las estructuras mediante un proceso de modificación química. La selectividad es crucial para determinar la presencia de los analitos. Por tanto, un protocolo fiable de modificación química de la superficie que favorezca la hibridación de las sondas es esencial y debe cumplir algunas restricciones como la biocompatibilidad con la superficie y la estabilidad a lo largo del tiempo.



En este trabajo se han utilizado exitosamente dos esquemas distintos de inmovilización asistida por luz ultravioleta (UV) para lograr una biofuncionalización espacialmente selectiva del chip fotónico, confiriéndole a éste versatilidad. Estos esquemas de inmovilización, *Thiol-ene coupling* (TEC) y *Light Assisted Molecular Immobilization* (LAMI), permiten que solo aquellas áreas expuestas a la luz UV se biofuncionalicen, lo que conduce a una selectividad espacial muy alta y a la posibilidad de lograr *spots* extremadamente pequeños.

4. Implementación de un sistema de suministro microfluídico

Optimizar el flujo de la muestra objetivo sobre las estructuras de detección es una manera eficiente de mejorar el límite de detección del dispositivo. Las moléculas fluidas que no interactúan con las estructuras de sensado no contribuyen a la detección y, por tanto, se desperdician.

En este trabajo se ha hecho uso de tres tipos diferentes de celdas microfluídicas, lo que ha permitido analizar distintos materiales, formas y dimensiones del canal microfluídico y abordar algunos problemas como la aparición de microburbujas o el ruido generado en la señal originado por la falta de hermeticidad en el ensamblaje del chip fotónico con la celda microfluídica. Además de tener en cuenta estas consideraciones, también se contempló la posibilidad de reutilizar las celdas microfluídicas, motivo por el que una de ellas fue descartada y no ha sido descrita en este trabajo. Tras un proceso experimental de optimización, se calculó que la máxima velocidad de flujo que garantizaba que éste fuera laminar es 25 $\mu\text{l}/\text{min}$.

5. Validación de la plataforma de detección de oligonucleótidos

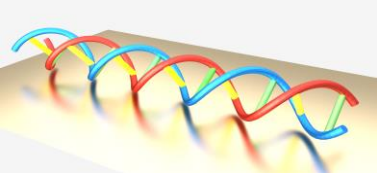
Una vez desarrollados los elementos anteriores se procedió a validar la plataforma que los comprende (transductor fotónico, capa de reconocimiento biomolecular y sistema de suministro microfluídico) haciendo uso de un sistema de lectura espectral. El objetivo consistió en detectar oligonucleótidos y, más concretamente biomarcadores de cáncer miRNA. La capacidad biosensora de las estructuras de *band gap* fotónico se demostró a través de varios experimentos en los que se detectó oligonucleótidos y biomarcadores de cáncer miRNAs con extremada sensibilidad.

6. Estudio experimental del cambio conformacional de sondas *molecular beacon* (MB)

Se ha estudiado experimentalmente cómo el cambio conformacional de las sondas MB tras su hibridación con su oligonucleótido complementario puede ser utilizado para desplazar una partícula/molécula unida a una de las terminaciones del propio MB. En este trabajo, la molécula empleada ha sido estreptavidina, de forma que se ha podido observar cómo cambia la interacción de ésta con la onda evanescente en función de esos cambios conformacionales. El objetivo es que este fenómeno pueda ser utilizado para amplificar la señal de detección óptica en situaciones en las que la concentración del analito objetivo sea muy reducida.

7. Desarrollo de un protocolo de regeneración en línea

Pese a que en las aplicaciones de diagnóstico médico se requieren chips desechables para evitar la contaminación cruzada y reducir el riesgo de resultados erróneos, la reutilización de los biosensores resulta de gran utilidad durante el proceso de optimización y desarrollo. Éste precisa de la realización de numerosos experimentos y disponer de stock



de chip fotónicos resulta una tarea complicada. Con el objetivo de reutilizar los chips y reducir tanto el tiempo experimental precisado como el coste que conlleva la utilización de materiales y reactivos, se desarrolló un protocolo de regeneración en línea. Éste ofrece la posibilidad de realizar reiterados experimentos de detección de oligonucleótidos sin necesidad de desensamblar el chip fotónico de la celda microfluídica, permitiendo a su vez reducir la variación entre las medidas obtenidas entre diferentes experimentos.

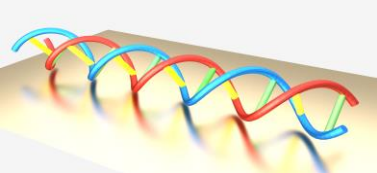
1.6. Marco de la Tesis Doctoral

El trabajo que ha dado lugar a esta Tesis Doctoral ha sido desarrollado en el seno del **Centro de Tecnología Nanofotónica de Valencia (NTC, *Nanophotonics Technology Center*)** de la Universitat Politècnica de Valencia (UPV), dentro de la línea de investigación de biofotónica. El NTC cuenta con instalaciones de última generación y personal altamente cualificado para la fabricación de circuitos fotónicos integrados en tecnología de silicio, convirtiéndolo en uno de los mejores centros de investigación en su campo. Además, el NTC también dispone de laboratorios ampliamente equipados para la demostración experimental de los dispositivos fotónicos propuestos en esta Tesis Doctoral.

El trabajo de esta Tesis Doctoral ha estado enmarcado en el desarrollo del proyecto europeo **SAPHELY (*Self-amplified photonic biosensing platform for microRNA-based early diagnosis of diseases*, H2020-ICT-644242)**, financiado por el programa Horizon 2020 de la Unión Europea [[SAP-15](#)]. El proyecto SAPHELY se centra en el desarrollo y la validación preclínica de un dispositivo de análisis POC mínimamente invasivo, basado en tecnología nanofotónica, para su aplicación en el diagnóstico precoz de enfermedades, con especial atención al cáncer. Su objetivo consiste en el diagnóstico de la enfermedad mediante la detección rápida (<5 minutos), ultrasensible (sub-pM) y *label-free* de biomarcadores miRNA utilizando un pequeño volumen de sangre (<100 μ L). El coste previsto de este dispositivo POC se estima en menos de 3000 euros, favoreciendo significativamente la implementación de programas de cribado masivo, con el consiguiente impacto en el manejo clínico. Esto supondría una reducción de los costes de los tratamientos y un aumento de las tasas de supervivencia. Por otro lado, la reducción del coste, tamaño y peso requerida para implementar un dispositivo POC portátil asequible se prevé lograrla mediante el uso de un novedoso método de interrogación de estructuras de *band gap* fotónico donde solo es necesario medir la potencia a la salida [[CAS-11](#), [CAS-12](#)]. Esta técnica, patentada por la UPV (P/2009/01748), evitará el uso de espectrómetros y láseres sintonizables costosos, voluminosos y pesados.

A continuación se mencionan las principales tareas desempeñadas por algunos de los *partners* del proyecto SAPHELY cuya realización ha sido vital para el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral:

- **Fundación de Investigación Clínica Instituto Valenciano de Oncología (IVO).** Determinación de biomarcadores de cáncer miRNA específicos, principalmente de los siguientes tipos de cáncer: mama, próstata, pulmón y colorectal.
- **University of East Anglia (UEA).** Desarrollo de las configuraciones óptimas de las sondas MB para la detección de los biomarcadores de cáncer miRNA seleccionados.
- **Señal y Medida en Química (SYM)** de la UPV; grupo del Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la UPV y la Universidad de Valencia. Desarrollo e implementación del proceso de biofuncionalización TEC sobre las estructuras de *band gap* fotónico.



- **Aalborg University (AAU)**. Desarrollo e implementación del proceso de biofuncionalización LAMI sobre las estructuras de *band gap* fotónico.
- **Microfluidic ChipShop GmbH (MFCS)**. Desarrollo de una celda microfluídica de polimetilmetacrilato (PMMA) con un canal elaborado con un adhesivo de doble cara. Esta celda fue descartada porque el pegamento dificultaba su reutilización.
- **microTEC Gesellschaft für Mikrotechnologie mbH (microTEC)**. Desarrollo de la celda microfluídica que será descrita en el punto [4.1.3](#).
- **EV Group (EVG)**. Adaptación de la fabricación de los chips fotónicos a la tecnología NIL.

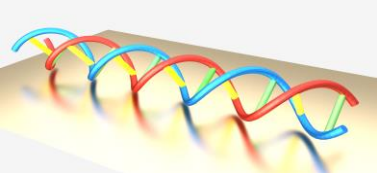
Asimismo, la participación y colaboración con otros proyectos relacionados con el desarrollo de biosensores fotónicos ha contribuido a la realización de este trabajo de Tesis Doctoral:

- **PHOCNOSIS** (*Advanced nanophotonic point-of-care analysis device for fast and early diagnosis of cardiovascular diseases*, H2020-PHC-634013) [[PHO-15](#)]. Proyecto financiado por el programa Horizon 2020 de la Unión Europea y cuyo principal objetivo es el desarrollo de un dispositivo POC extremadamente sensible, compacto y de bajo coste que combine tecnologías nanofotónicas y microfluídicas para un diagnóstico precoz y no invasivo de enfermedades cardiovasculares.
- **OPTONANOSENS** (*Detection of toxins and pathogenic agents using nanometric optical biosensors for CBN threats*, TEC2015-63838-C3-1-R). Proyecto financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y cuyo principal objetivo es el desarrollo de dispositivos de análisis basados en tecnología fotónica que permitan la rápida y eficaz identificación de una amenaza biológica en caso de ataque NBQ o pandemia biológica.

1.7. Estructura de la Tesis Doctoral

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral para la consecución de los objetivos indicados en el punto 1.5. se ha estructurado en esta memoria de la siguiente manera:

- En el capítulo 1 se ofrece una visión general del marco en el que se incluye el contenido de la Tesis Doctoral con especial énfasis en dar a conocer la necesidad del desarrollo de dispositivos biosensores fotónicos integrados para el diagnóstico médico mediante la detección de miRNAs. Para ello se define qué es un biosensor, se presentan las principales características de los biosensores y se particulariza en los biosensores ópticos integrados de campo evanescente basados en *band gap* fotónico utilizando la plataforma SOI. Además, en este capítulo se describe tanto la estructura de la Tesis Doctoral como sus objetivos.
- En capítulo 2 se proponen cinco configuraciones de estructuras de *band gap* fotónico, cuyos parámetros son optimizados hacia la consecución de configuraciones óptimas que proporcionen altas sensibilidades y que tanto la forma como la localización del PBG cumplan una serie de requisitos, establecidos en base a unos criterios de fabricación y caracterización experimental. Se adopta una metodología en bucle diseño-fabricación-caracterización experimental que permite alcanzar el objetivo 1 descrito en el punto 1.5.
- En el capítulo 3 se presenta un concepto de biosensor basado en la combinación de estructuras de *band gap* fotónico y sondas de ácidos nucleicos en configuración *stem-*



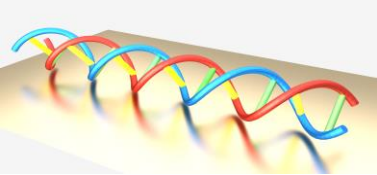
loop inmovilizadas sobre su superficie. Estas sondas han sido diseñadas y optimizadas específicamente para la detección de miRNAs y su efectiva capacidad de reconocimiento es demostrada a lo largo del capítulo con reproducibilidad y exhibiendo extremada sensibilidad. Para ello se ha diseñado un chip donde se han incluido varias estructuras de *band gap* fotónico y se ha desarrollado un sistema de suministro microfluídico. Por tanto, en este capítulo se aborda la consecución de los objetivos 2, 3, 4 y 5 descritos en el punto 1.5.

- En el capítulo 4 se realiza un estudio experimental para saber cómo el cambio conformacional de las sondas MB, originado por su hibridación con oligonucleótidos, influye en la interacción de la onda evanescente-complejo receptor-analito y, por consiguiente, en la respuesta de detección. El MB es marcado con estreptavidina y su cambio conformacional promoverá el desplazamiento de esta molécula desde la superficie de la estructura de *band gap* fotónico, provocando una variación cuantificable en la respuesta de detección. En este capítulo se aborda la consecución de los objetivos descritos en el punto 1.5.: 2, 3, 4 y 5, como parte del proceso de optimización del biosensor, y el objetivo 6 de manera particular.
- En el capítulo 5 se detalla la optimización llevada a cabo en el diseño y fabricación del chip fotónico, la cual es dirigida hacia la consecución de un chip robusto, como requerimiento propio de un biosensor. La eficacia de este proceso de optimización es analizada mediante la efectiva detección de biomarcadores de cáncer miRNA utilizando tanto la técnica de biofuncionalización LAMI como TEC. Finalmente se describe la deshibridación en línea de oligonucleótidos mediante un método de regeneración química en la que la formamida es el agente desnaturalizante de ADN/ARN, posibilitando la reutilización del chip fotónico. En este capítulo se aborda la consecución de los objetivos descritos en el punto 1.5.: 2, 3, 4 y 5, como parte del proceso de optimización del biosensor, y el objetivo 7 de manera particular.
- En el capítulo 6 se presentan tanto las conclusiones como las líneas futuras más importantes derivadas del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral.

Adicionalmente se incluye una serie de listados:

- Contribuciones originales a las que ha dado lugar este trabajo de Tesis Doctoral.
- Referencias bibliográficas consultadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.
- Figuras incluidas en esta memoria.
- Tablas incluidas en esta memoria.

Por último, el anexo A describe un análisis más detallado de los resultados de simulación obtenidos durante la fase de optimización de las estructuras de *band gap* fotónico. Con su inclusión se pretende completar el estudio realizado en el capítulo 2.



Capítulo 2 Diseño, fabricación y caracterización experimental de sensores de *band gap* fotónico

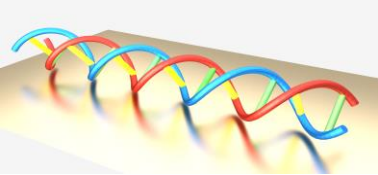
2.1. Criterios de diseño

El diseño y optimización de diferentes configuraciones de estructuras de detección de *band gap* fotónico se lleva a cabo en base a la consecución de los siguientes objetivos:

- Estructuras que proporcionen un borde de PBG a una longitud de onda aproximadamente de 1550 nm en un entorno acuoso cuyo índice de refracción es similar al del buffer que, a posteriori, será empleado durante los experimentos de detección de oligonucleótidos. Esa longitud de onda de 1550 nm queda dentro del rango donde opera el equipo de interrogación disponible en el laboratorio.
- Estructuras cuyo borde de PBG sea abrupto y esté claramente definido en su espectro de transmisión y que, a su vez, proporcionen una gran relación de extinción del PBG y una transmisión plana en su banda de paso. El hecho de obtener una banda de transmisión plana se requiere de cara a la interrogación óptica de las estructuras mediante la técnica de detección de bajo coste propuesta en el proyecto SAPHELY. En ella el desplazamiento del PBG se mide indirectamente excitando las estructuras de detección con una fuente de banda ancha y midiendo la potencia a su salida usando un fotodetector. Dicha potencia vendrá determinada por el solapamiento entre las respuestas de la fuente y del biosensor, proporcionando de manera continua y directa la respuesta de detección [[CAS-11](#), [CAS-12](#)].
- Estructuras que proporcionen alta sensibilidad con objeto de posibilitar la detección de bajas concentraciones de oligonucleótidos.

Para evitar las posibles consecuencias derivadas de las limitaciones propias del proceso de fabricación y/o desviaciones en las dimensiones de las estructuras de *band gap* fotónico fabricadas, se toman en cuenta una serie de restricciones/consideraciones:

- Para obtener el PBG deseado en la dirección de propagación de la luz, la configuración de estructuras 2D requiere fabricar varios periodos transversales de agujeros, conduciendo a tamaños transversales superiores a 10 μm . Por el contrario, las estructuras periódicas 1D tan solo requieren anchos transversales del orden de 1-2 μm . Por tanto, para reducir el tamaño y la complejidad de las estructuras de *band gap* fotónico, solo se toman bajo consideración estructuras periódicas 1D en la dirección de propagación de luz, lo que permitirá reducir el *footprint* casi un orden de magnitud.
- La fabricación de las estructuras de *band gap* fotónico se llevará a cabo mediante litografía de haz de electrones (EBL, *e-beam lithography*), resina negativa y escritura directa. Este proceso de fabricación no solo permite reducir los tiempos de exposición sino que consigue una menor rugosidad de las paredes laterales de las guías, la cual es la principal causa de las pérdidas de propagación en las mismas. Sin embargo, no es



óptima para la definición de elementos circulares o curvos. Por este motivo solo se considera la inclusión de elementos rectos en la configuración de las estructuras.

- Se establece un límite de 100 nm para la dimensión mínima a considerar en el diseño de las estructuras de *band gap* fotónico. Con esta medida se pretenden evitar problemas en el proceso litográfico por falta de resolución, tales como interrupción de la periodicidad y variación de la forma en la guía de onda.

Desde el punto de vista del diseñador, además de la implementación física de la estructura de *band gap* fotónico, también es necesario considerar el coste computacional requerido para simular las estructuras durante la fase de diseño. Como será descrito en el punto 2.3., se realizarán simulaciones basadas en métodos comúnmente usados para la simulación de estructuras ópticas: *Plane Wave Expansion* (PWE) y *Finite-Difference Time-Domain* (FDTD), cuyo coste computacional depende principalmente del tamaño de la región de simulación. Por tanto, estructuras periódicas 1D con un *footprint* más pequeño reducirán significativamente el tiempo de cálculo.

2.2. Configuraciones de estructuras de *band gap* fotónico estudiadas

Una vez establecidos los criterios de diseño de las estructuras de *band gap* fotónico, las configuraciones periódicas bajo estudio están representadas en la Figura 2.1.

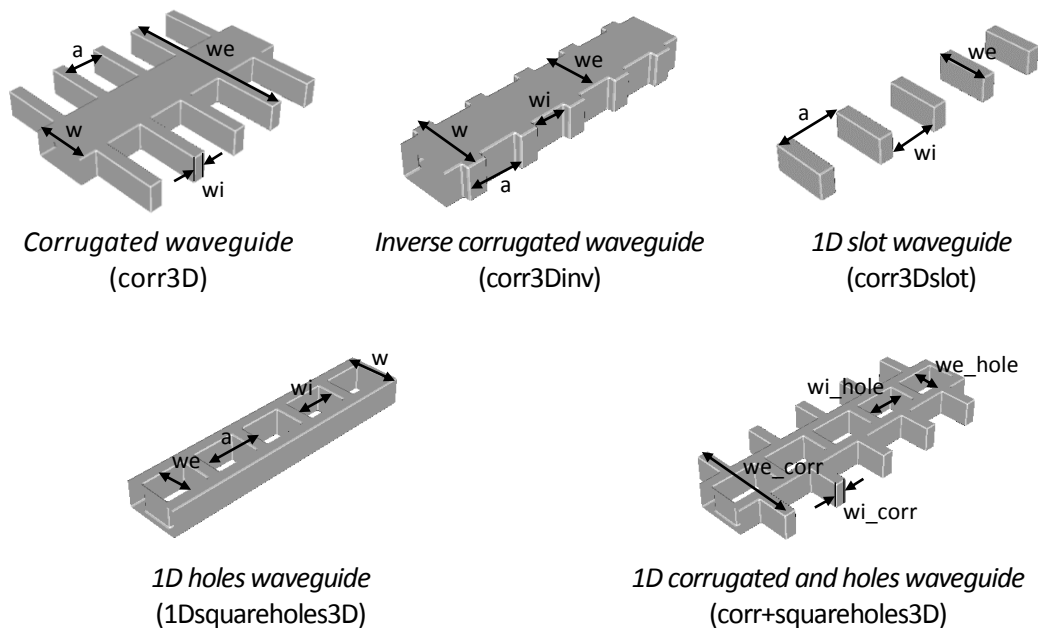
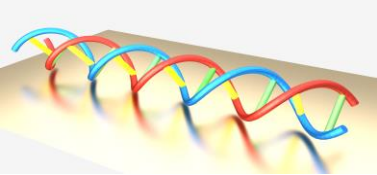


Figura 2.1. Estructuras de *band gap* fotónico estudiadas teóricamente. Para cada configuración se indica el nombre y el alias utilizado para su denominación.

Estas configuraciones están basadas principalmente en la incorporación periódica de elementos transversales y/o cavidades rectangulares sobre una guía de onda monomodo de silicio de anchura $w=460$ nm y de altura $h=220$ nm. Para todas ellas el periodo ha sido definido como a .



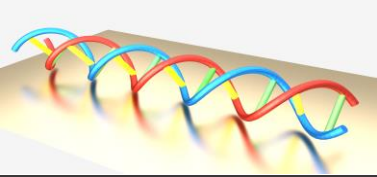
- **corr3D**: Estructura creada insertando periódicamente elementos transversales de corrugación en la dirección de propagación de la luz y, por tanto, a lo largo de la guía de onda monomodo. Los parámetros w_e y w_i denotan la longitud y anchura de cada corrugación respectivamente.
- **corr3Dinv**: Estructura creada disminuyendo periódicamente la anchura de la guía de onda monomodo desde w hasta w_e sobre un cierto ancho dado por w_i (tamaño en la dirección de propagación).
- **corr3Dslot**: Estructura creada insertando periódicamente *slots* de aire de tamaño w_i (tamaño en la dirección de propagación) en una guía de onda monomodo con anchura w_e (anchura transversal de los elementos dieléctricos).
- **1Dsquareholes3D**: Estructura creada insertando periódicamente cavidades rectangulares de tamaño w_i (tamaño en la dirección de propagación) y anchura w_e (anchura transversal de las cavidades) en una guía de onda monomodo.
- **corr+squareholes3D**: Esta estructura es una combinación de las anteriores configuraciones **corr3D** y **1Dsquareholes3D**. Los parámetros que describen los elementos transversales de corrugación y las cavidades rectangulares se identifican como w_{i_corr} , w_{e_corr} y w_{i_hole} , w_{e_hole} respectivamente. En esta configuración el centro de las corrugaciones coincide con el centro de las cavidades rectangulares.

Cabe considerar que las estructuras se crean en una capa de silicio con un espesor de 220 nm sobre un revestimiento inferior de SiO_2 , cuyo índice de refracción es más bajo. Esta configuración SOI es la que se utiliza habitualmente en el NTC.

2.3. Optimización paramétrica del diseño

El plan de diseño para determinar los parámetros óptimos de cada una de las estructuras de *band gap* fotónico comprende dos fases de simulación. En primer lugar, mediante simulaciones PWE, se determina la posición del/los PBG/s proporcionados por cada una de las estructuras. El dimensionado de cada una de ellas consiste en el escaneo de los parámetros a , w_i y w_e para las configuraciones **corr3D**, **corr3Dinv**, **corr3slot** y **1Dsquareholes3D** y en el escaneo de los parámetros a , w_{i_corr} , w_{e_corr} , w_{i_hole} y w_{e_hole} para las configuraciones **corr+squareholes3D**. Posteriormente, se llevan a cabo las simulaciones de FDTD para obtener la respuesta espectral en transmisión de aquellas configuraciones que tienen alguno de sus bordes del PBG ubicados alrededor de 1550 nm.

Dado que se empleará la tecnología SOI para la fabricación de las estructuras de *band gap* fotónico, los índices de refracción de los materiales son inicialmente definidos para ambas fases de simulación. Se considera un índice de refracción de $n_{\text{Si}}=3,477$ para el silicio y de $n_{\text{SiO}_2}=1,444$ para el revestimiento inferior de SiO_2 . Asimismo, inicialmente se considera la presencia de una disolución acuosa sobre la superficie de las estructuras, determinada por el índice de refracción $n_{\text{agua}}=1,333$, y más tarde un revestimiento superior de SiO_2 , cuyas simulaciones permiten determinar la sensibilidad proporcionada por cada configuración. El rango espectral bajo análisis es muy concreto, alrededor de 1550 nm, por lo que no se consideran posibles variaciones en el valor de los índices de refracción de los materiales ocasionados por su dispersión cromática.



2.3.1. Cálculo del diagrama de bandas

La primera etapa de diseño de los sensores es abordada mediante la realización de numerosas simulaciones dirigidas al cálculo de los diagramas de bandas de las estructuras de *band gap* fotónico.

Un diagrama de bandas, también llamado relación de dispersión, es una representación 2D o 3D de las frecuencias o energías de los modos permitidos en una estructura en función del vector de onda. Para el caso de una estructura periódica, el diagrama de bandas se repite con periodo $G_z=2\pi/a$ (siendo a el periodo). Por tanto, basta con representar los vectores de onda en la zona de Brillouin, cuya región espacial es $-G_z/2 < k < G_z/2$ ($-\pi/2 < k < \pi/2$). Dada la naturaleza 1D de las estructuras bajo estudio, dicha región es reducida simplemente a los vectores de onda en la dirección de propagación de la luz. Mediante la representación de los diagramas de bandas, es posible identificar los intervalos de frecuencias para los que no existe ningún modo de propagación independientemente de la dirección de incidencia, es decir, el rango de frecuencias en el que la luz no se propaga y es definido como PBG.

Los diagramas de bandas de las estructuras de *band gap* fotónico, se obtienen haciendo uso de un *software* de simulación gratuito llamado *MIT Photonic Bands* (MPB). Este simulador permite obtener los diagramas de bandas de estructuras periódicas, dadas por una distribución dieléctrica, calculando los estados propios existentes en el interior de estas estructuras con frecuencias definidas por las ecuaciones de Maxwell. Además, al determinar la posición del borde del PBG cuando el material de revestimiento superior varía, es posible calcular la sensibilidad ofrecida por la estructura de *band gap* fotónico, ya que, como se comentó en el punto [1.3.1](#), es sensible a las variaciones de índice de refracción.

Para ejecutar la simulación, es necesario describir la estructura en un *script*, en el que se incluyen una serie de instrucciones que definen la distribución dieléctrica para la celda básica, la constante de red para su réplica y los requisitos de simulación. El *software* proporcionará la frecuencia en función del vector de onda para cada modo permitido en la estructura.

En estas simulaciones, se toman bajo consideración exclusivamente los modos TE, ya que los PBGs sólo aparecen para esta polarización en estructuras periódicas con continuidad dieléctrica. Además, sólo son analizados los modos con simetría par en la dirección horizontal, debido a que son los únicos modos excitados en la estructura periódica procedentes de una guía de onda monomodo.

La simulación MPB también genera un archivo gráfico que contiene la información del perfil de la distribución dieléctrica creada en la celda unidad. Replicando esta celda unidad tantos periodos como sean deseados y convirtiendo la información gráfica procesada en un archivo .vtk, es posible visualizar la geometría de la estructura simulada mediante el programa MayaVi. Este *software* dispone de diversas opciones de visualización, lo que permite inspeccionar diferentes cortes en la estructura, como muestra la Figura 2.2, e incluso representarla en 3D.

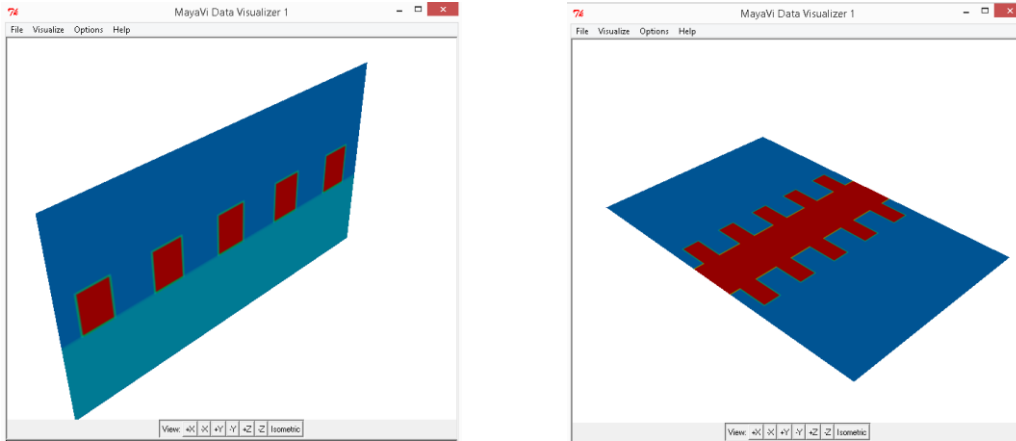
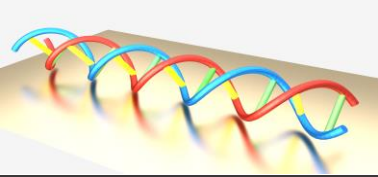


Figura 2.2. Ejemplos de visualización de diferentes planos de corte de una estructura de *band gap* fotónico usando MayaVi.

Finalizada la simulación, el diagrama de bandas es representado usando un *script* de Matlab. A partir de este gráfico, será posible determinar la posición del/los PBG/s exhibido/s por la estructura periódica. Por ejemplo, en el diagrama de bandas representado en la Figura 2.3, se pueden observar dos PBGs: uno entre la primera y la segunda banda guiada (PBG 1) y otro entre la segunda y la tercera banda guiada (PBG 2). Hay que tener en cuenta que este diagrama de bandas representa la longitud de onda de cada modo guiado en lugar de la frecuencia, por lo que el primer modo será aquel con una longitud de onda más alta y el orden de las bandas aumentará a medida que la longitud de onda disminuya. Asimismo, el gráfico representa el diagrama de bandas cuando se consideran diferentes materiales sobre la superficie de la estructura; el color rojo representa un entorno acuoso y el color azul un revestimiento superior de SiO_2 . Éste será el procedimiento a partir del que se obtendrán los valores de sensibilidad teórica ofrecida por cada una de las estructuras de *band gap* fotónico ante variaciones del índice de refracción en su superficie.

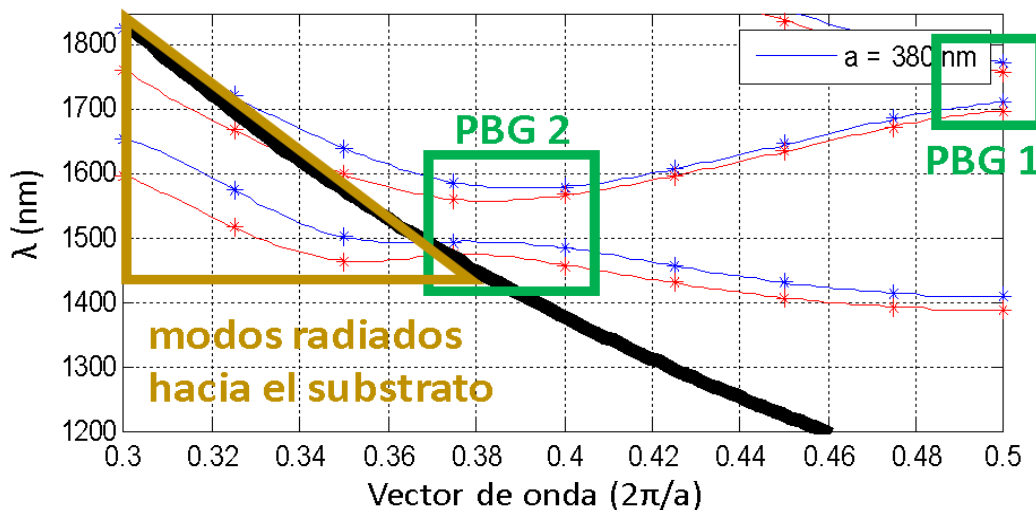
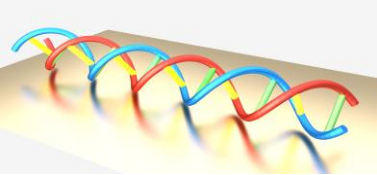


Figura 2.3. Ejemplo de un diagrama de bandas de una estructura de *band gap* fotónico (corr3D), considerando sobre su superficie agua (color rojo) y SiO_2 (color azul).



Para determinar la posición de los PBGs solo han de ser considerados aquellos modos que están por encima de la línea de luz del revestimiento inferior de SiO_2 , es decir, aquellos modos que están por encima de la línea negra gruesa representada en la Figura 2.3. Los modos por debajo de la línea negra no están confinados en la dirección vertical y se radiarán hacia el revestimiento inferior de SiO_2 , por lo que son descartados. No obstante, la siguiente fase de simulación estará focalizada en la comprobación de que efectivamente las bandas que definen el PBG se encuentran por encima de la línea de luz del revestimiento inferior de SiO_2 , garantizando el confinamiento vertical.

En cuanto al coste computacional se refiere, dependiendo del tamaño de la región de simulación y del tamaño de la cuadrícula utilizado para discretizar la celda unidad, la duración de la simulación varía. Para la configuración de simulación utilizada, el tiempo medio empleado en cada simulación es de 1 hora. Teniendo en cuenta el escaneo de todos los parámetros físicos llevado a cabo para cada una de las configuraciones estudiadas mediante un análisis masivo, el número de simulaciones asciende a aproximadamente 2000 a lo largo de 3 meses.

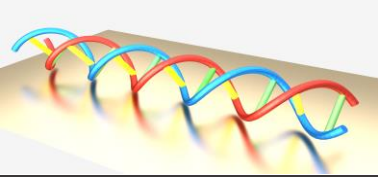
2.3.2. Representación de la respuesta espectral

Una vez seleccionada la configuración óptima para cada estructura de *band gap* fotónico estudiada, se obtiene su respuesta espectral en transmisión usando el *software* de simulación *CST Microwave Studio* (CST). Estas simulaciones permiten inspeccionar las propiedades del PBG, tales como su forma (si está claramente definido en el espectro y si es abrupto) y su relación de extinción. Además, posibilita conocer la posición del PBG en longitud de onda y los valores teóricos de sensibilidad ofrecidos por cada estructura.

CST es una herramienta computacional muy demandada para el diseño y optimización de estructuras fotónicas, ya que entre las ventajas que ofrece destaca su amplio rango frecuencial de operación. Tal y como se dijo al inicio de este capítulo, el método numérico utilizado por CST es FDTD, el cual es recurrentemente usado para el análisis electromagnético de este tipo de dispositivos. El método FDTD resuelve las ecuaciones de Maxwell en su forma integral. Por tanto, para poder resolverlas numéricamente, es necesario discretizar el dominio de cálculo, descrito por el problema en cuestión, creando mallas de tamaño adecuado con objeto de dividir el problema en celdas de mallado. Las ecuaciones de Maxwell se formulan para cada superficie de malla individualmente. En la definición de las relaciones entre tensiones y flujos, se resuelven integrales que se aproximan a los bordes y superficies de las celdas de mallado. Por este motivo, los coeficientes resultantes dependen tanto de los parámetros promediados del medio como de la resolución espacial del mallado.

Para las simulaciones se introduce un revestimiento inferior de SiO_2 cuyos valores de altura y anchura son 750 nm y 3000 nm respectivamente. Se considera que 750 nm de espesor es suficiente para que el truncado de la capa de SiO_2 no influya significativamente en la propagación del campo por el silicio de la estructura, permitiendo un considerable ahorro del coste computacional. El límite superior de la región de simulación está situado a 750 nm de la superficie de la estructura de *band gap* fotónico. Todas las condiciones de contorno se definen como *perfectly matched layer* y se especifica un plano de simetría eléctrico, en el centro de la guía a lo largo de la dirección de propagación de la luz, para reducir el tiempo computacional.

La Figura 2.4.a) muestra esquemáticamente una estructura de *band gap* fotónico (corr3D) simulada en CST. Asimismo, en la Figura 2.4.b) se puede observar la distribución del campo eléctrico (modo TE) a lo largo de la misma. Un corte en el plano de simetría permite



observar el confinamiento del modo TE en la guía y la propagación de la luz a lo largo de la misma, dando lugar a la onda evanescente.

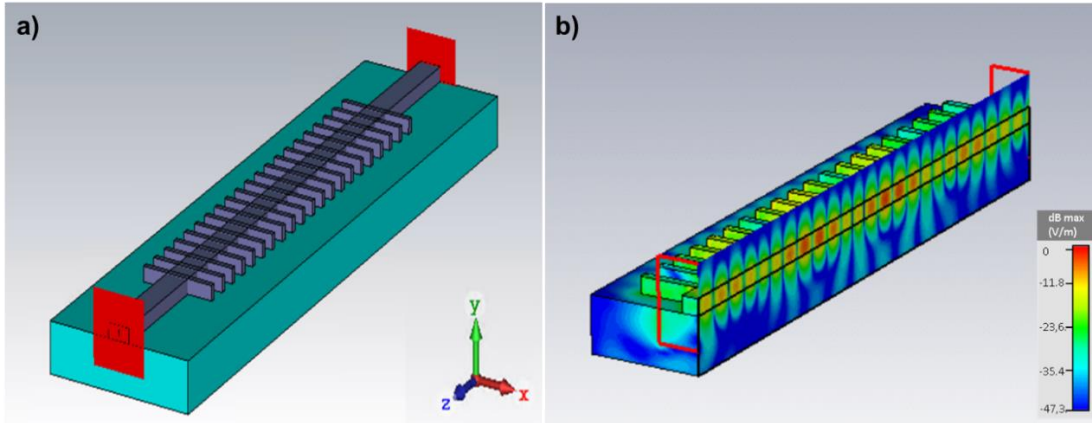


Figura 2.4. a) Ejemplo de una estructura de *band gap* fotónico (corr3D) simulada en CST. b) Propagación del modo TE a lo largo de la estructura.

En la Figura 2.5 se puede observar un ejemplo del espectro de transmisión proporcionado por una estructura de *band gap* fotónico (corr3D), considerando diferentes materiales sobre su superficie. El color rojo representa un entorno acuoso y el color azul un revestimiento superior de SiO_2 . En este gráfico aparecen los dos PBGs determinados previamente en el diagrama de bandas y mostrados en la Figura 2.3. En él se puede inspeccionar las características del PBG tales como la relación de extinción y la forma del borde del PBG.

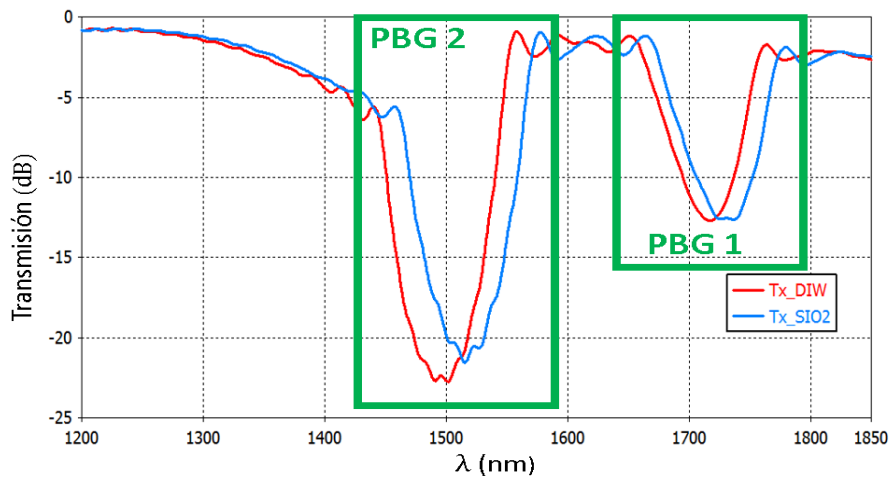
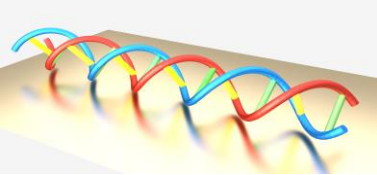


Figura 2.5. Ejemplo de un espectro de transmisión proporcionado por una estructura de *band gap* fotónico (corr3D) mediante simulaciones CST.

Tras numerosas simulaciones, se requiere establecer un compromiso entre la resolución espacial y el coste computacional de cada simulación. Pese a que el número de celdas difiere para la simulación de las diferentes configuraciones bajo estudio, el tiempo



empleado para cada una de ellas es tan elevado que incluso puede conllevar un par de días. Teniendo en cuenta esta limitación, las dimensiones de cada celda de simulación son fijadas en cubos de 10 nm de arista, permitiendo realizar cada simulación en un tiempo aproximado de 3 horas. Sin embargo, para el completo escaneo de los parámetros de las estructuras, considerando al menos dos entornos de simulación diferentes (agua y SiO₂), se ha requerido un tiempo aproximado de 6 meses.

2.3.3. Resultados

En este apartado se establece una comparativa entre los resultados obtenidos durante las dos fases de simulación, es decir, mediante las simulaciones en MPB y las simulaciones en CST. A partir de dicha comparación es posible determinar las configuraciones óptimas que, proporcionando elevados valores de sensibilidad, también presentan una buena transmisión, un PBG con gran relación de extinción y un borde de PBG abrupto y claramente definido en el espectro.

Para determinar los parámetros que definen las configuraciones óptimas de las estructuras de *band gap* fotónico, bajo el criterio de que su espectro de transmisión proporcione un borde de PBG alrededor de 1550 nm en un entorno acuoso, se realiza un escaneo de sus parámetros. La variación del periodo permite la sintonización del PBG y, por tanto, ubicar su borde en la longitud de onda deseada. Por el contrario, la longitud de las estructuras, comprendida por 50 periodos, no resulta determinante sobre la posición espectral del PBG ni sobre la sensibilidad ofrecida por las mismas. Sin embargo, a medida que se incrementa el número de periodos, mayor es la relación de extinción del PBG. En los siguientes puntos se indican los valores considerados para cada configuración de estructura de *band gap* fotónico estudiada. Dado que el objetivo principal de estas simulaciones es determinar el comportamiento espectral de las estructuras de *band gap* fotónico, no se han considerado las posibles pérdidas ocasionadas al introducir un revestimiento superior de agua. No obstante, dichas pérdidas no han resultado ser significativas de cara a cuantificar el desplazamiento del PBG en los experimentos realizados.

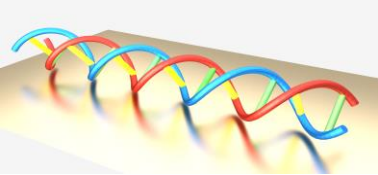
Debido a que el número de simulaciones realizadas es tremendamente elevado resulta imposible presentar todos los resultados obtenidos. Por tanto, las Tablas mostradas en los siguientes puntos recogen los resultados obtenidos en las simulaciones de las estructuras de *band gap* fotónico que proporcionan los mayores valores de sensibilidad. En ellas se indica la localización espectral del PBG (en agua y SiO₂), la sensibilidad (Sens.), la relación de extinción del PBG (R.E.) y las pérdidas de transmisión (Pérdidas Transm.). Todos estos resultados son detallados y representados gráficamente en el [Anexo A](#).

2.3.3.1. Corrugated waveguide (corr3D)

Escaneo de parámetros:

- **a** varía en el rango [250 450] nm.
- **w_i** varía en el rango [100 a-d] nm (considerando d=100 nm con objeto de establecer una distancia mínima entre dos elementos transversales consecutivos).
- **w_e**=1000, 1500, 2000, 2500 nm.

Tras el análisis de los diagramas de bandas, se puede constatar la presencia de dos PBGs:



- **PBG1:** localizado entre la primera y la segunda banda para vectores de onda en el límite de la zona de Brillouin.
- **PBG2:** localizado entre la segunda y la tercera banda para vectores de onda dentro de la zona de Brillouin.

Tabla 2.1. Resultados obtenidos en las simulaciones de las estructuras de *band gap* fotónico (corr3D) que proporcionan mayores valores de sensibilidad.

		Diagrama de Bandas			Espectro transmisión				
		Borde PBG	PBG (nm) H ₂ O SiO ₂	Sens. (nm/RIU*)	PBG (nm) H ₂ O SiO ₂	Sens. (nm/RIU)	R.E. PBG (dB)	Borde PBG	Pérdidas Transm. (dB)
a	310	PBG 1 Superior	1544,9	85,6	1563 1575,5	112,6	~4	Abrupto	~0,5
wi	100		1554,4						
we	1000								
a	320	PBG 1 Inferior	1546,7	71,2	1491,1 1504,4	119,8	~5	Poco abrupto	~0,5
wi	100		1554,6						
we	1000								
a	380	PBG 2 Superior	1558,3	173,9	1558,6 1578,1	175,7	~22	Abrupto	~1
wi	120		1577,6						
we	1500								
a	400	PBG 2 Inferior	1548,3	205,4	1512,4 1534,1	195,5	~18	Muy abrupto	~5
wi	100		1571,1						
we	2000								

*Refractive Index Units

Como se puede observar, los mayores valores de sensibilidad son obtenidos para los bordes del PBG 2, concretamente para su borde inferior, cuya sensibilidad es **205,4 nm/RIU** según el diagrama de bandas. Éste y la representación del espectro de transmisión proporcionados por esta estructura de *band gap* fotónico son mostrados en la Figura 2.6.

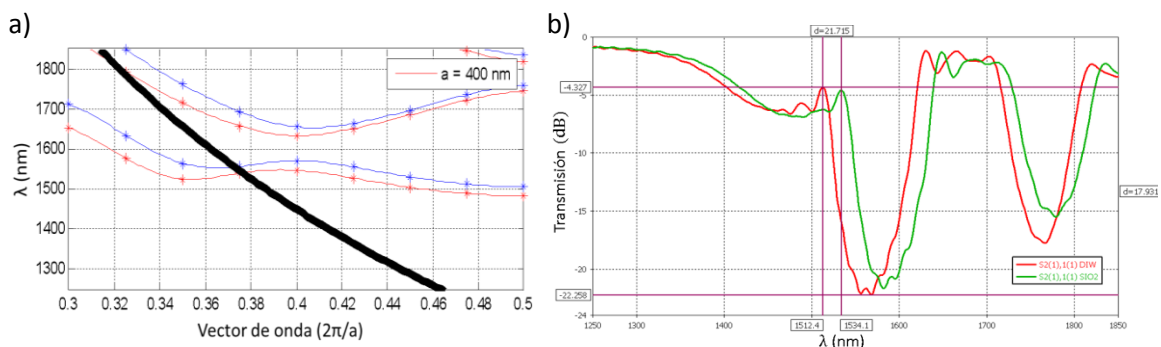
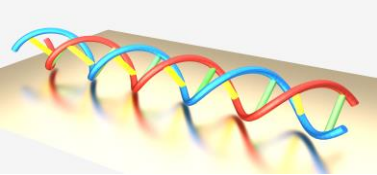


Figura 2.6. a) Diagrama de bandas; b) Espectro de transmisión; proporcionados por una de las configuraciones óptimas de la estructura corr3D ($a=400$ nm, $w_i=100$ nm y $w_e=2000$ nm).

El PBG es muy profundo y su borde bastante abrupto. Sin embargo, la banda no presenta una buena transmisión, ya que sufre una pérdida aproximada de 5 dB. Dado que se trata del borde inferior del PBG, estas pérdidas pueden ser debidas a que el modo no esté confinado en la dirección vertical y en consecuencia sea radiado hacia el revestimiento inferior



de SiO₂. Por tanto, entre las configuraciones óptimas de la estructura corr3D mostradas en la Tabla 2.1, también se considera la configuración cuyo borde superior del PBG 2 está ubicado aproximadamente a 1550 nm en un entorno acuoso. Su diagrama de bandas y espectro de transmisión, a partir del cual se calcula una sensibilidad de **175,7 nm/RIU**, aparecen representados en la Figura 2.7.

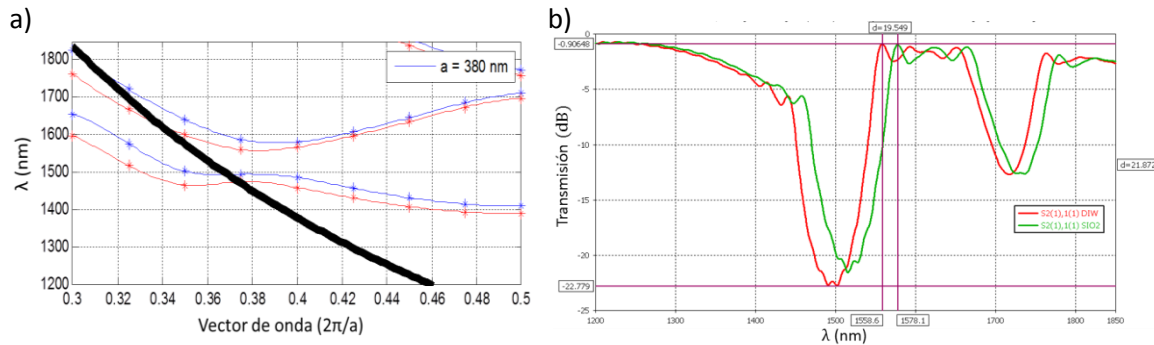


Figura 2.7. a) Diagrama de bandas; b) Espectro de transmisión; proporcionados por una de las configuraciones óptimas de la estructura corr3D ($a=380$ nm, $w_i=120$ nm y $w_e=1500$ nm).

El PBG es muy profundo (~ 22 dB), su borde bastante abrupto y las pérdidas de transmisión son despreciables. Además, los resultados obtenidos a través de ambas simulaciones (PWE y FDTD) son muy similares.

En ambos espectros de transmisión (Figura 2.6.b) y Figura 2.7.b)) se puede apreciar un rizado moderado en el borde la banda de transmisión debido a las reflexiones producidas en los interfaces entre la guía de acceso y la guía de la estructura periódica. Este efecto se produce cuando el acoplo entre ambas guías no es perfecto, lo cual ocasiona que la estructura de *band gap* fotónico se comporte como una cavidad Fabry-Perot, en la que se generan infinitos pulsos que se combinan para formar el pulso de salida total [GARC-08]. En las Figuras 2.6.b) y 2.7.b) se pueden observar dos consecuencias a medida que nos acercamos al borde de la banda guiada. La primera es el incremento de la amplitud del rizado debido a la peor eficiencia de acoplo entre las guías y la segunda es la variación de la frecuencia del rizado Fabry-Perot. Dado que la velocidad de grupo es menor a medida que nos acercamos al borde de la banda, la longitud óptica efectiva de la cavidad aumenta conduciendo a un incremento proporcional en la frecuencia de rizado.

2.3.3.2. Inverse corrugated waveguide (corr3Dinv)

Escaneo de parámetros:

- **a** varía en el rango [300 500] nm.
- **w_i** varía en el rango [100 a-d] nm (considerando $d=100$ nm con objeto de establecer una anchura mínima del elemento transversal).
- **w_e**=100, 250, 400 nm.

Tras el análisis de los diagramas de bandas, se puede constatar la presencia de un único PBG localizado entre la primera y la segunda banda para vectores de onda en el límite de la zona de Brillouin.

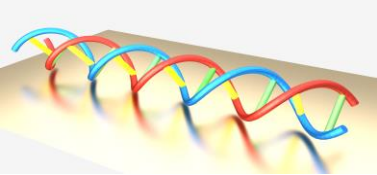


Tabla 2.2. Resultados obtenidos en las simulaciones de las estructuras de *band gap* fotónico (corr3Dinv) que proporcionan mayores valores de sensibilidad.

		Diagrama de Bandas			Espectro transmisión				
		Borde PBG	PBG (nm) H ₂ O SiO ₂	Sens. (nm/RIU)	PBG (nm) H ₂ O SiO ₂	Sens. (nm/RIU)	R.E. PBG (dB)	Borde PBG	Pérdidas Transm. (dB)
a	500	Superior	1560,2 1625,1	584,7	1567 1632,5	590,1	~35	Abrupto	~8
wi	350								
we	100								
a	500	Inferior	1559,8 1603,6	394,6	1527,5 1566,6	352,3	~28	Muy abrupto	~4
wi	230								
we	100								
a	470	Inferior	1555,5 1596	364,9	1519,9 1555,7	322,5	~14	Muy abrupto	~2
wi	350								
we	250								

Como se puede observar, el mayor valor de sensibilidad es obtenido para el borde superior del PBG: **590,1 nm/RIU** según el espectro de transmisión. El diagrama de bandas y la representación del espectro de transmisión proporcionados por esta estructura de *band gap* fotónico son mostrados en la Figura 2.8.

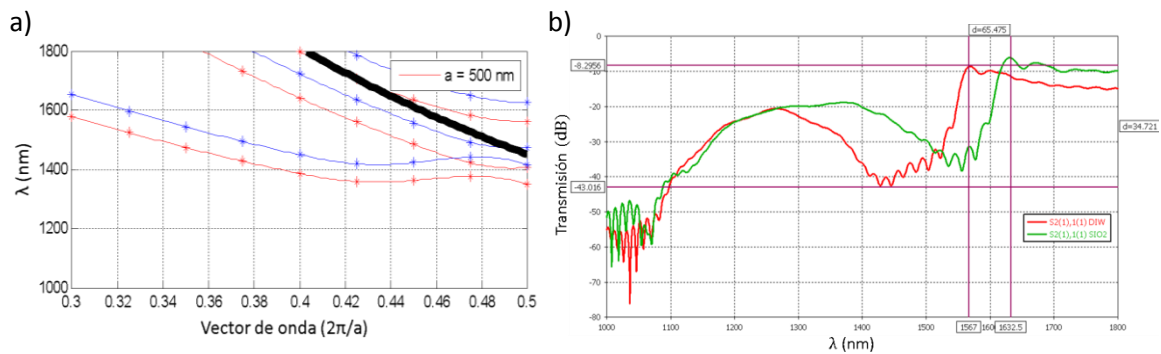


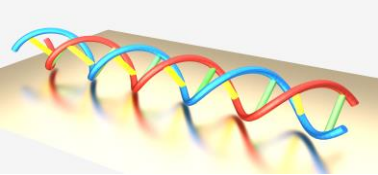
Figura 2.8. a) Diagrama de bandas; b) Espectro de transmisión; proporcionados por la configuración óptima de la estructura corr3Dinv ($a=500$ nm, $w_i=350$ nm y $w_e=100$ nm).

El PBG es muy profundo y su borde es muy abrupto. Sin embargo, a pesar de que el rizado en el borde de la banda es despreciable, ésta no presenta una buena transmisión ya que sufre pérdidas en torno a 8 dB. No obstante, ambas simulaciones (MPB y CST) proporcionan resultados similares.

2.3.3.3. 1D slot waveguide (corr3Dslot)

Escaneo de parámetros:

- **a** varía en el rango [350 500] nm.
- **wi** varía en el rango [100 a-d] nm (considerando $d=100$ nm con objeto de establecer una anchura mínima del elemento transversal).



- $w_e=250, 400, 450, 700, 1000$ nm.

Tras el análisis de los diagramas de bandas, se puede constatar la presencia de un único PBG localizado entre la primera y la segunda banda para vectores de onda en el límite de la zona de Brillouin.

Tabla 2.3. Resultados obtenidos en las simulaciones de las estructuras de *band gap* fotónico (corr3Dslot) que proporcionan mayores valores de sensibilidad.

		Diagrama de Bandas			Espectro transmisión				
		Borde PBG	PBG (nm) H ₂ O SiO ₂	Sens. (nm/RIU)	PBG (nm) H ₂ O SiO ₂	Sens. (nm/RIU)	R.E. PBG (dB)	Borde PBG	Pérdidas Transm. (dB)
a	500	Superior	1556,5	578,4	1561,9	544,1	~30	Muy abrupto	~10
w_i	340		1620,7		1622,3				
w_e	450								
a	500	Inferior	1559	357,7	1528,2	321,6	~32	Muy abrupto	~4
w_i	200		1598,7		1563,9				
w_e	400								
a	480	Inferior	1591,8	304,5	1563	276,6	~38	Muy abrupto	~6
w_i	200		1625,6		1593,7				
w_e	700								

Como se puede observar, el mayor valor de sensibilidad es obtenido para el borde superior del PBG: **578,4 nm/RIU** según el diagrama de bandas. Éste y la representación del espectro de transmisión proporcionados por esta estructura de *band gap* fotónico son mostrados en la Figura 2.9.

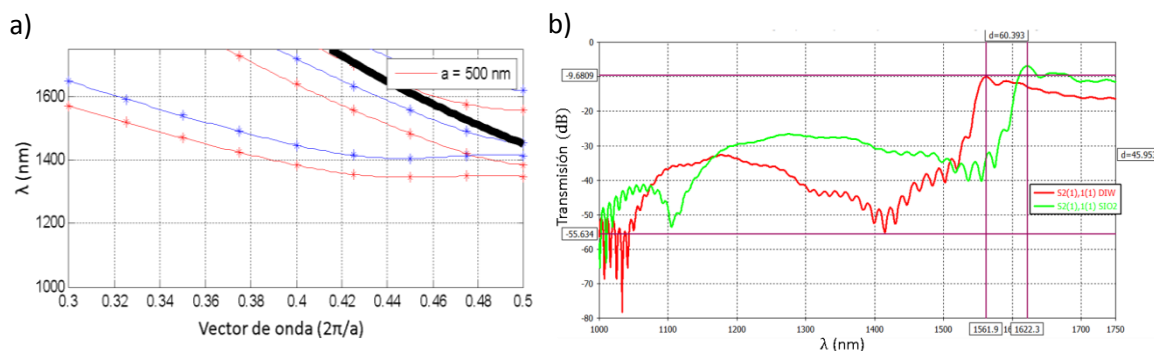
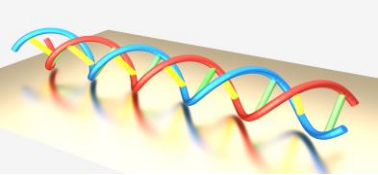


Figura 2.9. a) Diagrama de bandas; b) Espectro de transmisión; proporcionados por la configuración óptima de la estructura corr3Dslot ($a=500$ nm, $w_i=340$ nm y $w_e=450$ nm).

El rizado en el borde de la banda es moderado, el PBG es muy profundo y su borde es considerablemente abrupto. Sin embargo, la banda de transmisión no es muy buena debido a las pérdidas que sufre (~10 dB). No obstante, los resultados obtenidos con ambas simulaciones (MPB y CST) presentan una gran similitud.



2.3.3.4. 1D holes waveguide (1Dsquareholes3D)

Escaneo de parámetros:

- **a** varía en el rango [300 500] nm.
- **wi** varía en el rango [100 a-d] nm (considerando d=100 nm con objeto de establecer una separación mínima entre dos cavidades rectangulares consecutivas).
- **we**=250, 450, 700, 1000 nm.

Tras el análisis de los diagramas de bandas, se puede constatar la presencia de un único PBG localizado entre la primera y la segunda banda para vectores de onda en el límite de la zona de Brillouin.

Tabla 2.4. Resultados obtenidos en las simulaciones de las estructuras de *band gap* fotónico (1Dsquareholes3D) que proporcionan mayores valores de sensibilidad.

		Diagrama de Bandas			Espectro transmisión				
		Borde PBG	PBG (nm) H ₂ O SiO ₂	Sens. (nm/RIU)	PBG (nm) H ₂ O SiO ₂	Sens. (nm/RIU)	R.E. PBG (dB)	Borde PBG	Pérdidas Transm. (dB)
a	420	Superior	1539,1 1566,2	244,1	1567 1632,5	248,6	~34	Muy abrupto	~6
wi	300								
we	250								
a	500	Inferior	1546,7 1595,3	437,8	1527,5 1566,6	403,6	~34	Muy abrupto	~15
wi	230								
we	250								
a	450	Inferior	1541,2 1572,9	285,6	1519,9 1555,7	272,1	~40	Muy abrupto	~4
wi	150								
we	250								

Como se puede observar, el mayor valor de sensibilidad es obtenido para el borde inferior del PBG: **437,8 nm/RIU** según el diagrama de bandas. Éste y la representación del espectro de transmisión proporcionados por esta estructura de *band gap* fotónico son mostrados en la Figura 2.10.

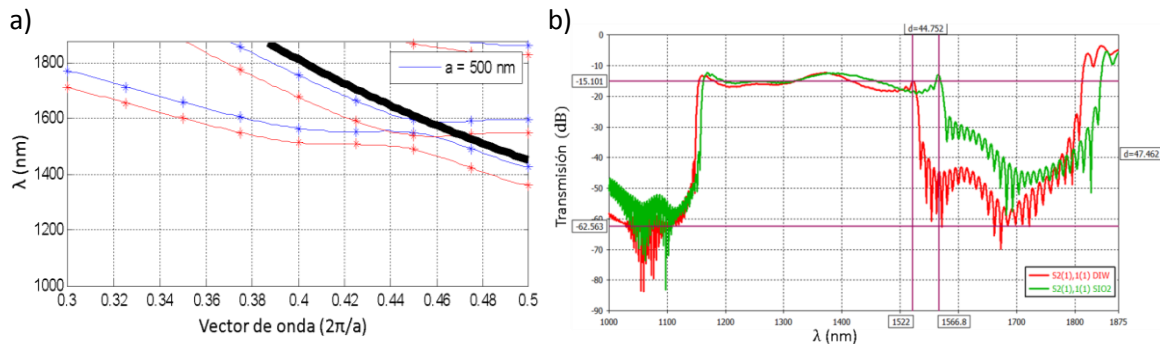
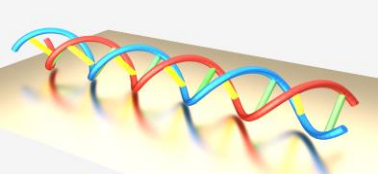


Figura 2.10. a) Diagrama de bandas; b) Espectro de transmisión; proporcionados por la configuración óptima de la estructura 1Dsquareholes3D (a=500 nm, wi=230 nm y we=250 nm).



El rizado del borde de la banda es moderado, el PBG es muy profundo y su borde es muy abrupto. Sin embargo, la banda de transmisión sufre considerables pérdidas en torno a 15 dB.

2.3.3.5. 1D corrugated and holes waveguide (corr+squareholes3D)

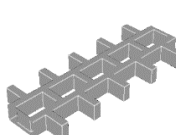
Escaneo de parámetros:

- a=350, 400, 450, 500 nm.
- wi_corr=100, 150, 200, 250 nm.
- we_corr=1000, 1500, 2000 nm.
- wi_hole=a-100, a-150, a-200, a-250 nm.
- we_hole varía en el rango [100 250] nm.

Tras el análisis de los diagramas de bandas, se puede constatar la presencia de dos PBGs:

- **PBG1:** localizado entre la primera y la segunda banda para vectores de onda en el límite de la zona de Brillouin.
- **PBG2:** localizado entre la segunda y la tercera banda para vectores de onda dentro de la zona de Brillouin.

Tabla 2.5. Resultados obtenidos en las simulaciones de las estructuras de *band gap* fotónico (corr+squareholes3D) que proporcionan mayores valores de sensibilidad.

		Diagrama de Bandas			Espectro transmisión				
		Borde PBG	PBG (nm) H ₂ O SiO ₂	Sens. (nm/RIU)	PBG (nm) H ₂ O SiO ₂	Sens. (nm/RIU)	R.E. PBG (dB)	Borde PBG	Pérdidas Transm. (dB)
a	400	PBG 1 Superior	1552,8 1577,9	226,1	1555 1586,5	283,8	~24	Poco abrupto	~3
wi_corr	200								
we_corr	1000								
wi_hole	300								
we_hole	250								
a	500	PBG 1 Inferior	1549,6 1613,4	574,8	1524,3 1573,9	464,9	~20	Abrupto	~12
wi_corr	100								
we_corr	1000								
wi_hole	390								
we_hole	250								
a	450	PBG 2 Superior	1551,5 1586,1	311,7	1549,1 1584,6	319,8	~55	Abrupto	~8
wi_corr	100								
we_corr	1500								
wi_hole	310								
we_hole	250								
a	400	PBG 2 Inferior	1550,7 1578,2	247,7	1528,2 1554,8	239,6	~35	Muy abrupto	~4
wi_corr	200								
we_corr	2000								
wi_hole	100								
we_hole	110								
a	400	PBG 2 Inferior	1548,81 581,8	297,3	1538,81 568,9	271,2	~40	Muy abrupto	~10
wi_corr	250								
we_corr	2000								
wi_hole	150								
we_hole	100								

Como se puede observar, el mayor valor de sensibilidad es obtenido para el borde inferior del PBG 1: **574,8 nm/RIU** según el diagrama de bandas. Éste y la representación del espectro de transmisión proporcionados por esta estructura de *band gap* fotónico son mostrados en la Figura 2.11.

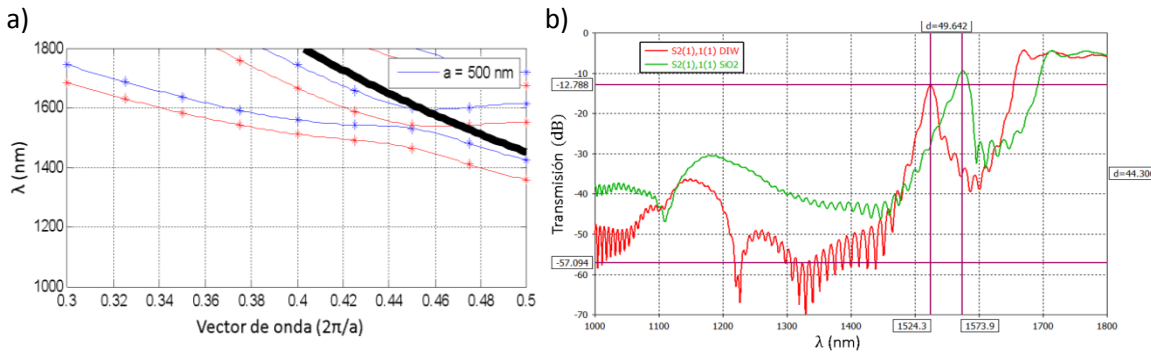


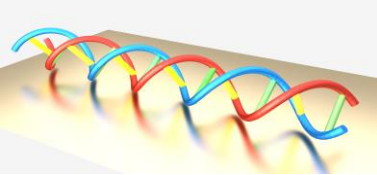
Figura 2.11. a) Diagrama de bandas; b) Espectro de transmisión; proporcionados por la configuración óptima de la estructura corr+squareholes3D (a=500 nm, wi_corr=100 nm, we_corr=1000 nm, wi_hole=390 nm we_hole=250 nm).

El PBG es profundo y su borde es moderadamente abrupto. Sin embargo, la banda de transmisión es bastante estrecha y sufre pérdidas considerables de aproximadamente 12 dB.

Nótese que la posición del borde del PBG y los valores de sensibilidad calculados a partir de las simulaciones FDTD y PWE para una misma configuración no siempre guardan la similitud que cabría esperar idealmente. El coste computacional que requieren las simulaciones en CST es más elevado, lo cual supone un hándicap, especialmente en el análisis de estructuras cuyas dimensiones son mayores, ya que “obliga” a establecer un compromiso entre la precisión de simulación (determinada por el mallado) y el coste computacional. La diferencia observada entre los valores de sensibilidad calculados considerando ambos métodos también podría venir determinada por otros factores relacionados con las características de la propia simulación y la forma en la que se calcula la sensibilidad. Mientras que en MPB se toma el valor exacto donde se encuentra el borde las bandas que definen el PBG, en CST se toma como valor del borde del PBG el lóbulo ocasionado por el rizado Fabry-Perot, cuya posición no corresponde estrictamente al mencionado borde del PBG. Además, también hay que tener en cuenta que el diagrama de bandas se calcula a partir de un número determinado de k 's y que el resto de forma de la banda se obtiene por interpolación. Si el borde del PBG considerado está precisamente en esa zona de interpolación de la banda y no en una k de las calculadas realmente, la ubicación de dicho borde puede ser imprecisa.

2.3.4. Conclusiones

A partir de los resultados de simulación se obtienen valores de sensibilidad que oscilan desde ~ 70 nm/RIU (corr3D) hasta ~ 600 nm/RIU (corrinv3D y corr3Dslot), lo que supone una significativa mejora de sensibilidad en función de la configuración seleccionada. No obstante, cabe destacar que **el valor máximo de sensibilidad ofrecido por este tipo de estructuras de *band gap* fotónico es aproximadamente un orden de magnitud superior al obtenido usando otras estructuras de detección.** Tal es el caso de los típicos anillos resonantes, cuya



sensibilidad ofrecida se encuentra en torno a los $\sim 70\text{-}100$ nm/RIU [VOS-07]. Sin embargo, como se describió previamente, la configuración óptima no solo es aquella que proporciona mayores valores de sensibilidad sino la que presenta un PBG abrupto con gran relación de extinción en una óptima respuesta de transmisión. Además, es importante tener en cuenta que **aquellas configuraciones que presentan mayor sensibilidad también serán más sensibles a posibles desviaciones en la dimensión de sus parámetros durante el proceso de fabricación.** En base a esta serie de criterios, la configuración corr3D, pese a que no proporciona los mayores valores de sensibilidad, se considera una de las mejores candidatas para su fabricación debido a las escasas pérdidas que presenta su espectro de transmisión. No obstante, es necesario confirmar experimentalmente las propiedades del borde de los PBGs para cada una de las configuraciones estudiadas.

2.4. Fabricación y caracterización experimental

2.4.1. Metodología

Una vez que las estructuras de *band gap* fotónico son diseñadas y los parámetros más importantes que influyen en su comportamiento óptico son evaluados, se procede a su fabricación y caracterización experimental. La metodología adoptada para llevar a cabo esta fase del trabajo consiste fundamentalmente en un bucle diseño-fabricación-caracterización experimental para todas las estructuras bajo estudio, tal y como representa la Figura 2.12.

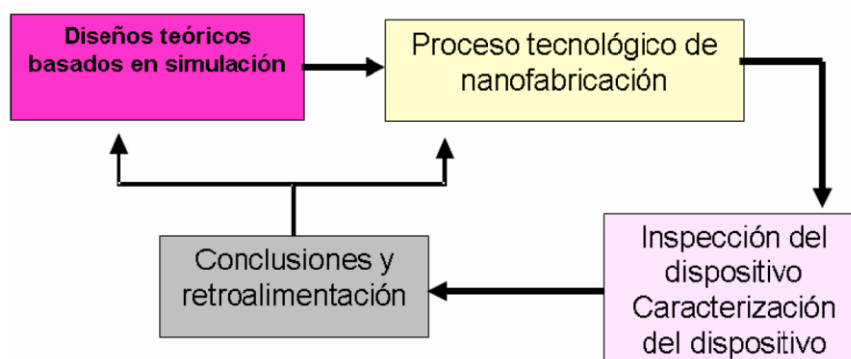


Figura 2.12. Esquema de la metodología empleada durante el proceso de fabricación de estructuras de *band gap* fotónico.

Tras la fabricación de las estructuras, éstas son inspeccionadas para detectar posibles imperfecciones fruto del proceso de nanofabricación, así como posibles desviaciones en la dimensiones de sus parámetros, las cuales son medidas mediante la técnica de barrido electrónico *Scanning Electron Microscope* (SEM). También se lleva a cabo una caracterización AFM para determinar la rugosidad lateral de las estructuras de *band gap* fotónico y se realiza un estudio de caracterización del campo evanescente. El siguiente paso consiste en la caracterización espectral de las estructuras haciendo uso de una plataforma de interrogación óptica. Finalmente, se contrastan los resultados experimentales con los obtenidos durante la fase de simulación, se rediseñan las estructuras y se redefine el protocolo de fabricación. Por tanto, la realimentación hacia cualquiera de los pasos anteriores es total.

2.4.2. Diseño de los chips fotónicos

Durante la primera etapa de desarrollo/optimización del proceso de fabricación de las estructuras de *band gap* fotónico, los diseños de los chips empleados son típicamente similares al archivo GDS mostrado en la Figura 2.13. Mediante el diseño paramétrico IPKISS¹ las estructuras estudiadas son representadas a lo largo de 50 periodos y, para estudiar cómo afecta la variación de cada una de sus dimensiones en el comportamiento/localización del PBG, sus parámetros son escaneados con ligeras variaciones en sus dimensiones. Además, para las estructuras diseñadas con elementos transversales, se introduce un *taper* como transición, entre la guía monomodo de acceso y la estructura periódica, para mejorar la eficiencia de acoplo y reducir así posibles reflexiones que den lugar al rizado Fabry-Perot. Este *taper* consiste simplemente en la introducción de 5 elementos transversales a la guía monomodo, cuya anchura es incrementada paulatinamente hasta alcanzar la anchura del primer elemento transversal de la propia estructura de *band gap* fotónico. En la fase de simulación este *taper* no se introdujo por comodidad de diseño, ya que la sensibilidad espectral de las estructuras viene determinada fundamentalmente por su configuración periódica, mientras que el *taper* únicamente afectará a los niveles de la señal transmitida y al rizado Fabry-Perot. También se introducen GCs, mediante los cuales la luz procedente del láser será acoplada verticalmente a la entrada y salida del chip fotónico.

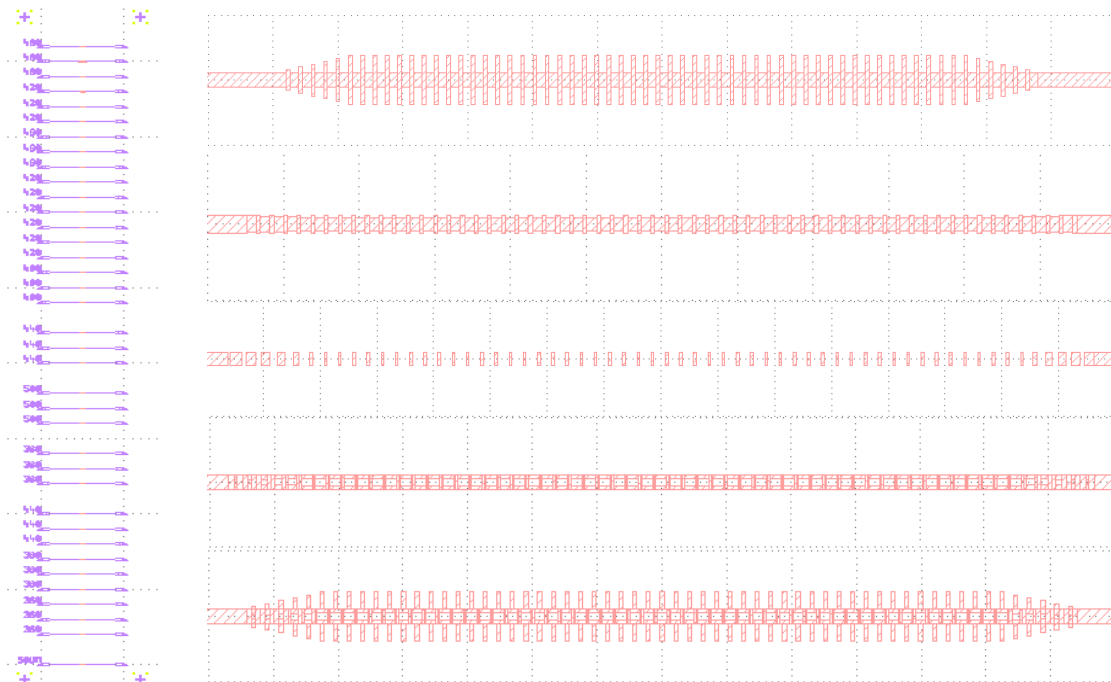
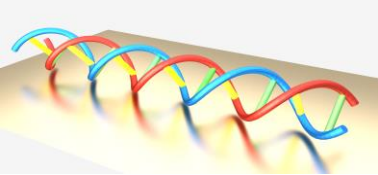


Figura 2.13. Izquierda: Ejemplo del típico diseño del chip fotónico empleado para caracterizar las estructuras de *band gap* fotónico. Derecha: Ejemplo de varias de las estructuras periódicas 1D incluidas en el diseño.

Un GC es una estructura basada en una modulación periódica del índice de refracción en la dirección de la guía de ondas. Cuando el haz de luz incide sobre el GC con un cierto

¹ Diseño de circuitos fotónicos integrados basado en un *script* que utiliza el lenguaje de programación Python. El marco IPKISS fue desarrollado originalmente por el Grupo de Investigación Fotónica y el laboratorio asociado de Imec, ambos de la Universidad de Gante.



ángulo de incidencia, se produce un intercambio de intensidad entre el modo procedente de la fibra óptica y el modo guiado en la guía de ondas (y viceversa). Los GCs se caracterizan por su selectividad en la polarización; debido a la elevada birrefringencia del alto contraste de índice de refracción, la denominada condición de Bragg es diferente para las polarizaciones TE y TM. Los GCs son ampliamente utilizados para el acoplamiento óptico en dispositivos fotónicos [VAN-07]. Su principio de funcionamiento aparece esquematizado en la Figura 2.14, obtenida de [TAI-06].

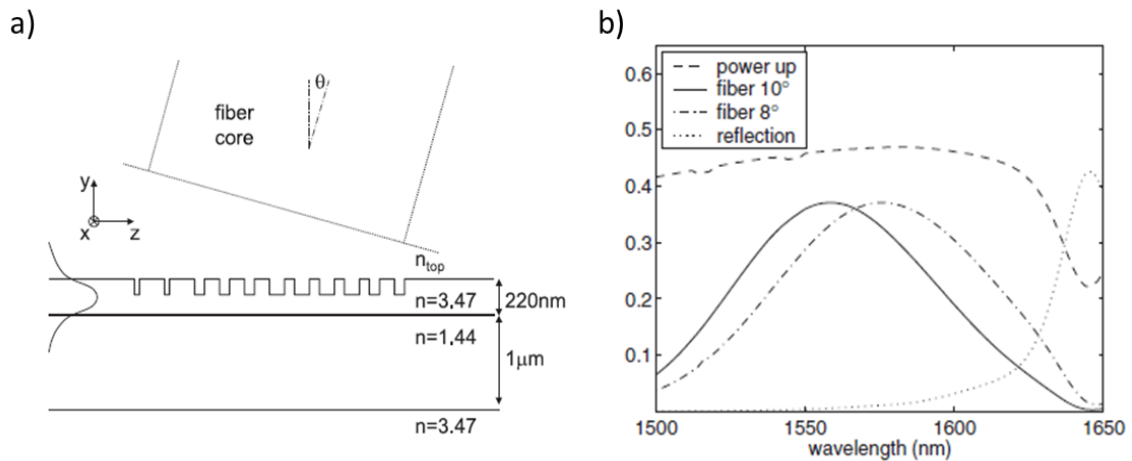
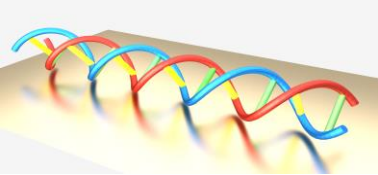


Figura 2.14. a) Representación esquemática del principio de funcionamiento de un GC; b) Respuesta óptica del GC. [TAI-06].

En el chip fotónico se incluyen los GCs típicamente usados en el NTC, cuyo diseño fue optimizado para la polarización TE. Éstos están compuestos de una capa superior de silicio (220 nm), una capa intermedia de SiO₂ (2 μm) y una capa inferior de silicio (700 μm). Los GCs presentan una profundidad de 70 nm, un periodo de 630 nm, un ciclo de trabajo del 50% y una anchura de 12 μm. Experimentalmente proporcionan una eficiencia de acoplo máxima del 31% alrededor de 1550 nm cuando el ángulo de incidencia respecto al eje vertical es de 10°.

Para reducir el tiempo requerido de fabricación mediante EBL, la distancia entre los accesos de entrada/salida del chip es de 5 mm. Esta corta distancia no permite caracterizar la respuesta espectral de las estructuras en un entorno acuoso, ya que la proximidad entre la fibra de entrada y de salida del montaje experimental impide cubrir las estructuras de agua. Sin embargo, estas caracterizaciones resultan de gran utilidad para medir las desviaciones de tamaño entre los parámetros nominales utilizados en el diseño GDS y las dimensiones reales de las estructuras fabricadas. Además, algunos chips son posteriormente cubiertos de SiO₂ con el objetivo de obtener también la respuesta espectral de estructuras de *band gap* fotónico, cuyo valor de índice de refracción es próximo al del agua. No obstante, estas caracterizaciones no solo permiten calcular valores preliminares de sensibilidad, sino que también posibilitan conocer la forma y posición del PBG en función tanto de la dosis de exposición empleada en la fabricación como de los parámetros de diseño.

Tras los primeros ciclos de fabricación-caracterización, se crea un nuevo diseño GDS donde se incluyen las estructuras de *band gap* fotónico, tal y como muestra la Figura 2.15. En esta ocasión la distancia entre los accesos de entrada y de salida del chip es 10 mm, distancia suficiente para depositar cualquier líquido sobre la superficie de las estructuras y caracterizar



su repuesta. No obstante, el objetivo de esta nueva fase de caracterización radica en la búsqueda de aquellas estructuras que proporcionen **un borde de PBG alrededor de 1550 nm en un entorno acuoso**.



Figura 2.15. Ejemplo de un diseño de un chip fotónico cuya distancia entre sus accesos de entrada y de salida es 10 mm.

2.4.3. Proceso de fabricación

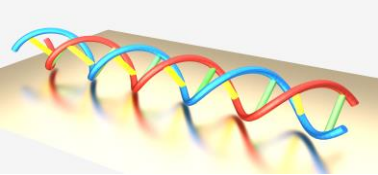
Las estructuras de *band gap* fotónico son fabricadas mediante un proceso tecnológico tomando como elemento base una oblea SOI. Ésta está compuesta por una capa superior de silicio cuyo espesor es de 220 nm (resistividad $\rho \sim 1-10 \Omega \text{ cm}^{-1}$, con un dopado leve de $\sim 10^{15} \text{ cm}^{-3}$), una capa intermedia de SiO_2 y una capa inferior de silicio, cuyos espesores son 2 μm y 700 μm respectivamente.

El primer paso consiste en depositar uniformemente una capa de resina negativa de silsesquioxano de hidrógeno (HSQ) de 100 nm sobre la oblea mediante un proceso de *spin coating*. La funcionalidad del *coater* consiste en buscar una relación entre el espesor de la resina con la que cubrir la oblea y la velocidad para cubrirla de la manera más uniforme posible (4000 rpm).

Una máscara, con el patrón de la estructura, se proyecta secuencialmente sobre esta película fotosensible a través de un haz de electrones muy focalizado y ubicado en un sistema de vacío. Se trata de un proceso de escritura directa ya que únicamente hay que proyectar la estructura y la parte no expuesta es eliminada durante el posterior relevado. Este tipo de litografía por haz de electrones (EBL) es una alternativa a la litografía *deep-UV*, ampliamente utilizada en la industria microelectrónica para la fabricación a gran escala de circuitos CMOS, ya que permite obtener mejores resoluciones.

El elemento encargado de la exposición es el cañón de electrones, el cual graba motivos sobre resinas especiales que cambian sus propiedades al recibir electrones. El dispositivo comercial usado para la litografía EBL es el Vistec EBP5000, cuya exposición es optimizada para conseguir las dimensiones requeridas en cada configuración. Para ello se emplea un voltaje de aceleración de 100 KeV y un tamaño de apertura de 200 μm .

Después, se revela la capa de resina usando hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) obteniéndose la máscara que permite transferir el diseño a la capa de silicio de la oblea a



través de un ataque inductivo de plasma (ICP, *Inductive Coupled Plasma*). Este proceso también es optimizado creando un plasma de gases fluorados que atacan el silicio tanto mediante procesos físicos (*sputtering*) como químicos (recombinación). Finalmente, se limpian los restos de resina que quedan sobre la oblea.

El segundo nivel de litografía consiste en grabar los GCs sobre las estructuras silicio. Se hace también con EBL pero esta vez utilizando una resina positiva de PMMA. Después de revelar con una mezcla de alcohol isopropílico (IPA) y metil-isobutil-cetona (MIBK), la parte expuesta de la resina se quita y deja abierta la zona en silicio que será atacada con el ICP hasta llegar a una profundidad de 70 nm.

El proceso de fabricación es optimizado tras muchos ensayos con diferentes resinas, recetas y dosis de exposición. Los pasos seguidos durante este proceso están representados en la Figura 2.16.

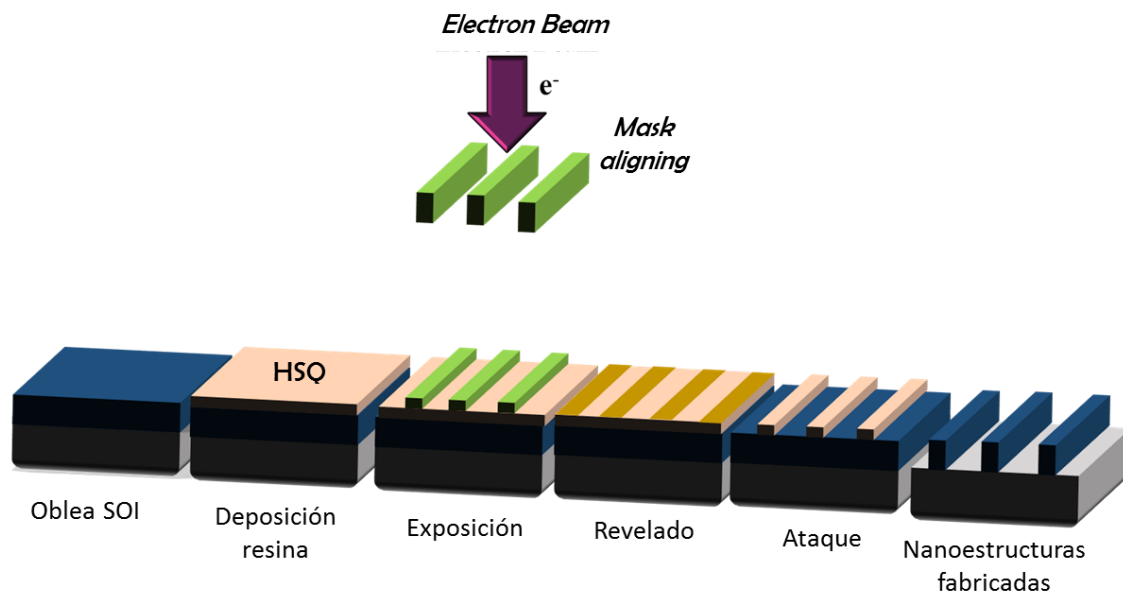


Figura 2.16. Representación esquemática del proceso de fabricación de nanoestructuras fotónicas.

2.4.4. Caracterización física

La técnica de barrido electrónico SEM permite inspeccionar las muestras expuestas. El método de funcionamiento está basado en el bombardeo de las muestras usando un haz de electrones. Cuando el haz incide sobre la muestra los electrones rebotados son recogidos por detectores para formar su imagen con alta resolución.

Una caracterización SEM preliminar de las estructuras de *band gap* fotónico fabricadas se muestra en la Figura 2.17. En esta fase de fabricación los parámetros de algunas configuraciones no están completamente optimizados y las cavidades rectangulares de reducido tamaño no están abiertas para la estructura corr+squareholes3D.

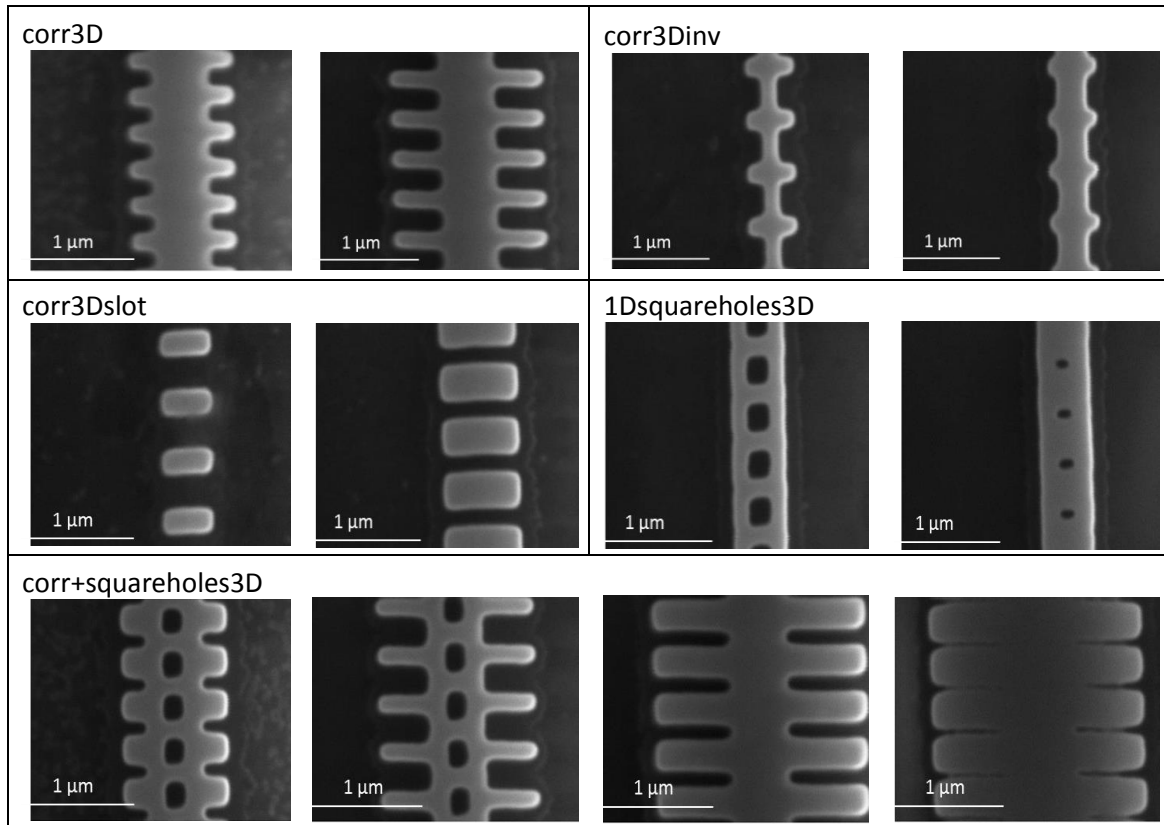
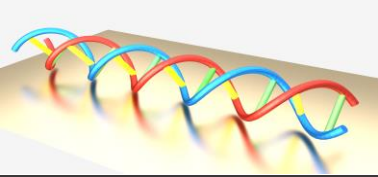


Figura 2.17. Imágenes SEM preliminares de algunas estructuras de *band gap* fotónico fabricadas.

Finalmente, la Figura 2.18 muestra algunas imágenes SEM de las estructuras de *band gap* fotónico optimizadas y el *taper* introducido, entre la guía de acceso/salida y una estructura corr3D.

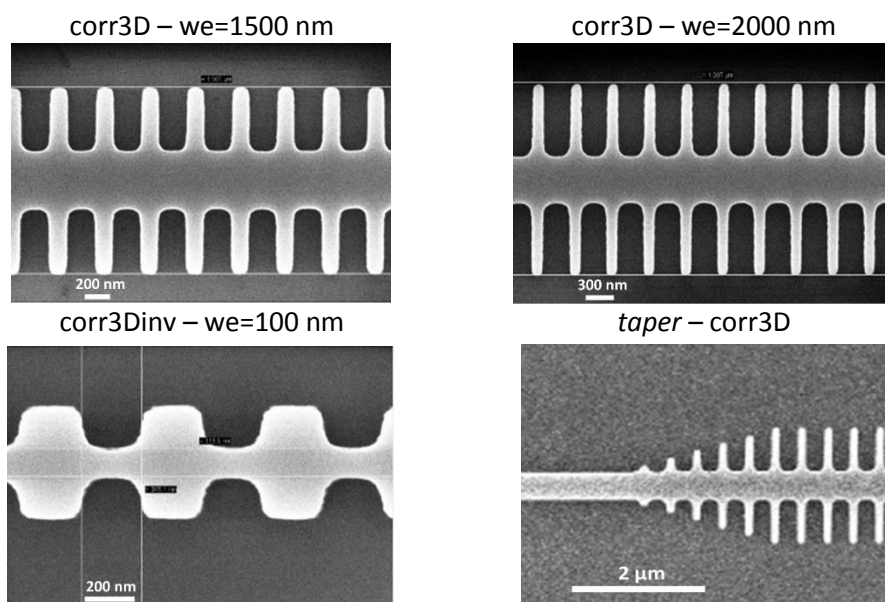


Figura 2.18. Imágenes SEM de algunas estructuras de *band gap* fotónico optimizadas y del *taper* introducido entre la guía de acceso/salida y la estructura corr3D.

El AFM es un instrumento mecano-óptico capaz de registrar continuamente la topografía de una muestra mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica. La caracterización física de las estructuras de *band gap* fotónico mediante esta técnica determina una rugosidad lateral de las guías de onda de 2 nm, tal y como muestra la Figura 2.19.

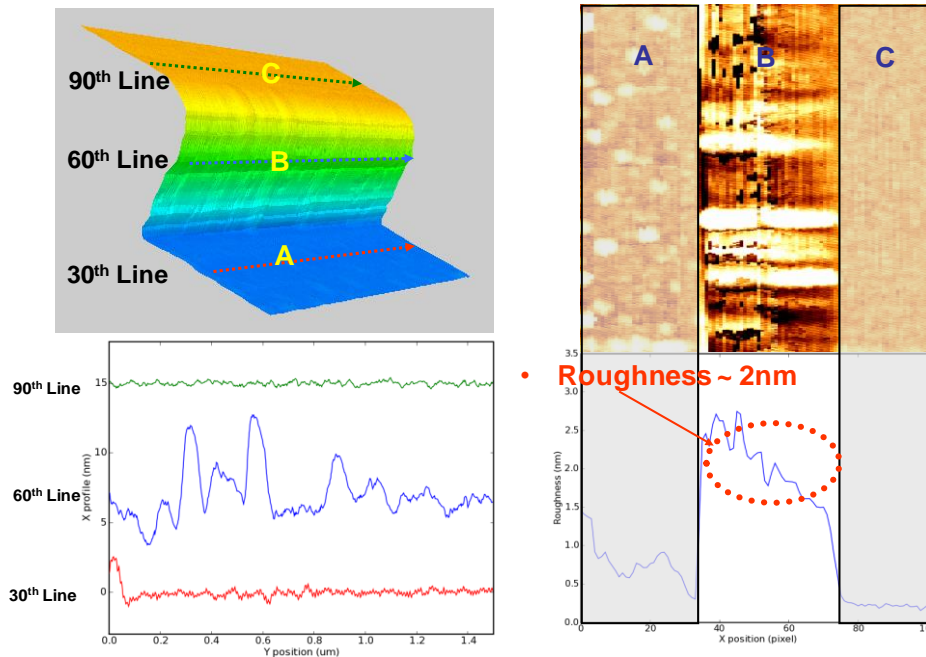


Figura 2.19. Resultados de la caracterización AFM, la cual determina una rugosidad lateral de las guías de onda de 2 nm.

Además, en un trabajo paralelo, nuestro grupo realizó un estudio del perfil de campo evanescente de la configuración corr3D ($a=380$ nm, $w_i=120$ nm, $w_e=1500$ nm), ya que su interacción con el analito (en este caso miRNAs) determinará el rendimiento del sensor [SAB-19]. Mediante microscopía óptica de barrido de campo cercano (SNOM, *Scanning Near-field Optical Microscopy*) se caracterizó el campo evanescente para determinar cómo la interacción luz-materia varía con la distancia a la superficie de la estructura de *band gap* fotónico. La Figura 2.20 muestra un **decremento exponencial de la intensidad del campo evanescente a medida que se aleja de la superficie de la estructura, disminuyendo significativamente para alturas superiores a 100 nm** (color morado). Esta caracterización también se llevó a cabo mediante simulaciones FDTD, en las que se obtuvieron resultados similares considerando tanto un revestimiento superior de aire (color azul) como un entorno acuoso. Finalmente, esta caracterización del campo evanescente confirma que **para alcanzar sensibilidades óptimas es necesario que la biodetección suceda lo más próxima posible a la superficie del sensor y, por tanto, que la capa biológica de reconocimiento molecular sea lo más delgada posible.**

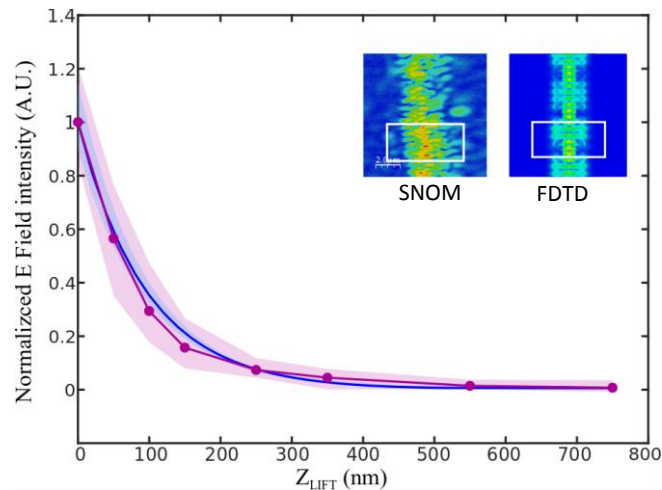
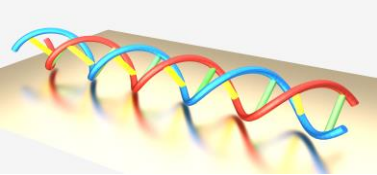


Figura 2.20. Intensidad normalizada del campo evanescente en función de la distancia a la superficie de la estructura de *band gap* fotónico obtenida mediante SNOM (color morado) y simulaciones FDTD (color azul). Las áreas sombreadas representan la desviación estándar a lo largo del área de la estructura resaltada en los recuadros [SAB-19].

2.4.5. Caracterización espectral

2.4.5.1. Montaje experimental

Para la caracterización óptica pasiva de las estructuras diseñadas se utiliza una plataforma de interrogación basada en el acoplo vertical de la luz mediante GCs de entrada/salida incluidos en el chip fotónico, tal y como muestra la Figura 2.21. Pese a que haciendo uso de esta configuración fibra a fibra sólo es posible obtener la respuesta espectral de una sola estructura fotónica en cada medida, la caracterización óptica es precisa, ya que permite conocer la potencia absoluta transmitida a lo largo de cada estructura.

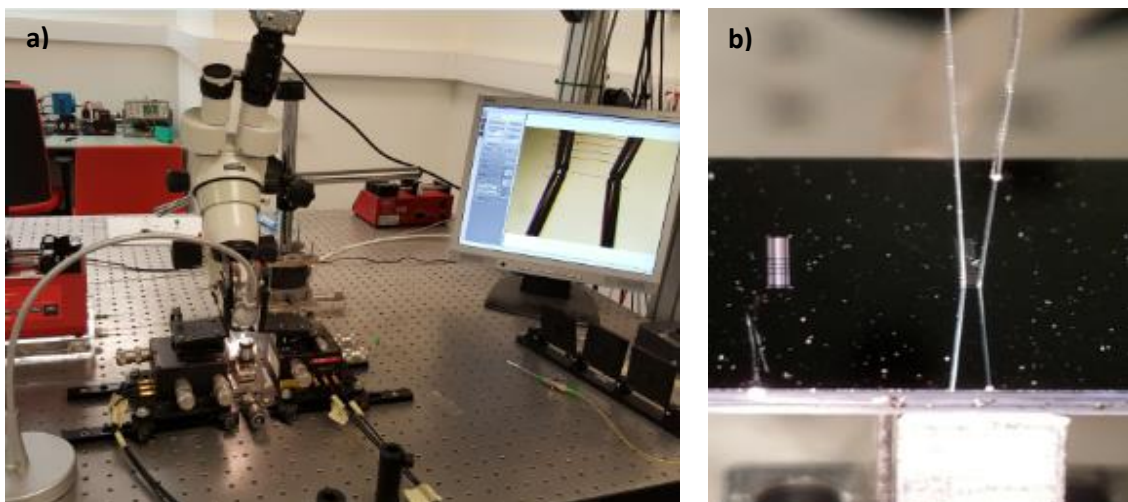
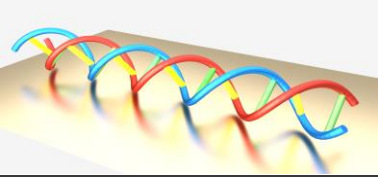


Figura 2.21. a) Imagen de la plataforma de interrogación fibra a fibra. En la pantalla de la derecha de la imagen, se aprecia una imagen de las dos fibras utilizadas para acoplar la luz a la entrada y salida de la estructura fotónica del chip. b) Detalle de las dos fibras utilizadas para medir las estructuras fotónicas en el chip.



En primer lugar, los GCs son alineados con las fibras de entrada y salida con un ángulo de incidencia de 10° respecto al eje vertical, tal y como muestra la Figura 2.22. El alineamiento se consigue mediante el empleo de unidades de traslación que permiten controlar tres ejes (x , y , z) con una precisión de hasta 20 nm. Haciendo uso de una lámpara halógena y una cámara digital conectada al microscopio, a la que se le han acoplado un conjunto de lentes de gran aumento, se controla visualmente el alineamiento. Para alinear la fibra y el GC se realizan dos ajustes: un primer ajuste grueso basado en la observación del acercamiento de la fibra sobre el GC y un segundo ajuste fino basado en la búsqueda de un máximo nivel de potencia proporcionado por el sensor de potencia.

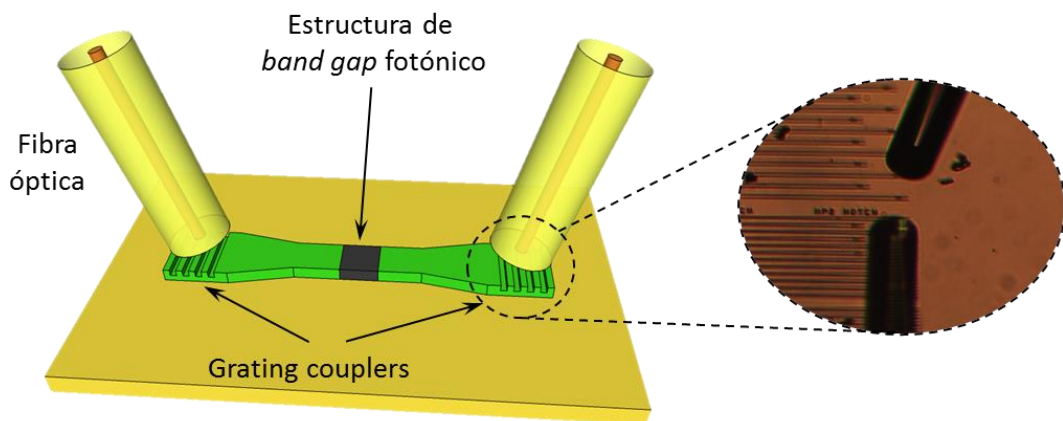


Figura 2.22. Representación esquemática del acoplo de la luz al chip fotónico mediante GCs y control visual del alineamiento.

En función del rango de medida deseado, como fuente de excitación se usan los láseres sintonizables Keysight 81940A y 81980A que abarcan el rango de longitudes de onda comprendidas entre 1475 y 1630 nm. Tras el láser es colocado un controlador de polarización, cuya funcionalidad consiste en controlar la polarización de luz que incide sobre el GC de entrada, ya que éste ha sido previamente diseñado única y exclusivamente para acoplar la polarización TE. La fibra de entrada inyecta la luz procedente del controlador de polarización sobre el GC a la entrada del chip fotónico y, una vez la luz atraviesa la estructura fotónica y llega al GC de salida, ésta es extraída por la fibra de salida. Ambas fibras son monomodo estándar del tipo SMF-28. Finalmente, la potencia a la salida de la fibra es medida en cada longitud de onda del espectro mediante un sensor de potencia Keysight 8163B. Tanto el láser como el sensor de potencia son conectados a un ordenador a través de un bus *General Purpose Interface Bus* (GPIB) y controlados remotamente mediante un *software* programado en Labview. Los elementos que componen el montaje se ilustran en el diagrama mostrado en la Figura 2.23.

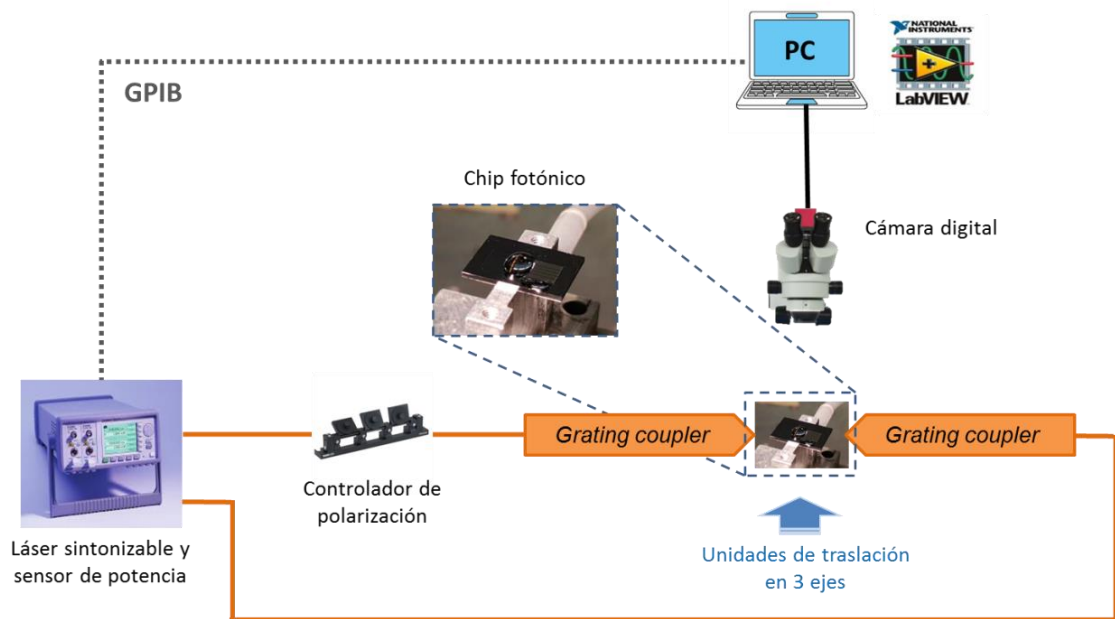


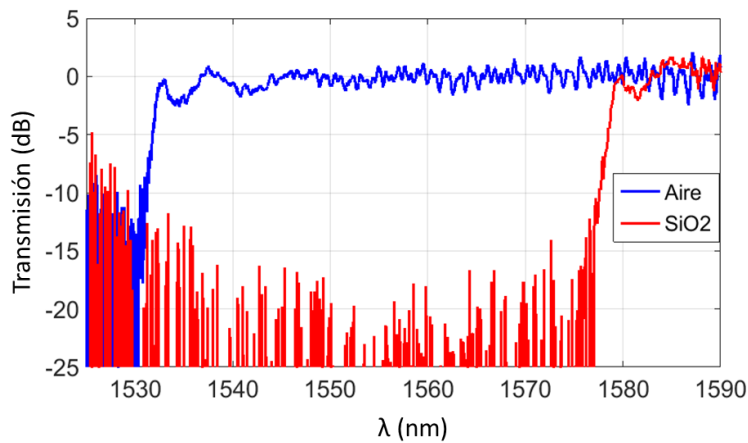
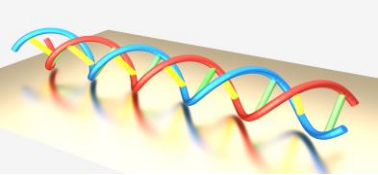
Figura 2.23. Diagrama esquemático de la interconexión de los elementos involucrados en la plataforma de interrogación basada en la caracterización fibra a fibra.

2.4.5.2. Resultados

A continuación se muestran los resultados más relevantes obtenidos durante la caracterización espectral de las configuraciones corr3D y corr3Dinv, cronológicamente fabricadas en el tiempo. El resto de configuraciones (corr3slot, 1Dsquareholes3D y corr+squareholes3D) fueron fabricadas y caracterizadas experimentalmente, pero no se obtuvo en ese momento ninguna configuración que proporcionara un borde de PBG localizado alrededor de 1550 nm en un medio acuoso durante las primeras fases de optimización, por lo que se decidió centrarse en las configuraciones corr3D y corr3Dinv de cara a continuar con el trabajo experimental de biosensado. Nótese que la respuesta espectral de cada estructura de *band gap* fotónico se representa normalizada respecto a la proporcionada por una guía de ondas de referencia. Además, para el cálculo de la sensibilidad, utilizando disoluciones de etanol en agua, se consideran los índices de refracción calculados específicamente para 1550 nm en base al estudio reportado en [KED-12]. Kedenburg et al. mostró que el valor del índice de refracción del agua utilizado previamente durante la fase de simulación ($n=1,333$) es considerado cuando la longitud de onda de trabajo está en el espectro visible (~ 700 nm). Por tanto, de aquí en adelante, se considera un índice de refracción de 1,315 para agua y 1,325 para una disolución del 10% de etanol en agua.

➤ Corrugated waveguide (corr3D)

La Figura 2.24 muestra un ejemplo del espectro de transmisión proporcionado por una estructura de *band gap* fotónico corr3D, antes y después de ser cubierta de SiO₂. **La posición del PBG experimenta un gran desplazamiento espectral, lo que se traduce en un valor de sensibilidad en torno a 107 nm/RIU.**



Parámetros nominales:

- $a=360\text{nm}$
- $w_i=120\text{ nm}$
- $w_e=2000\text{ nm}$

Resultados

experimentales:

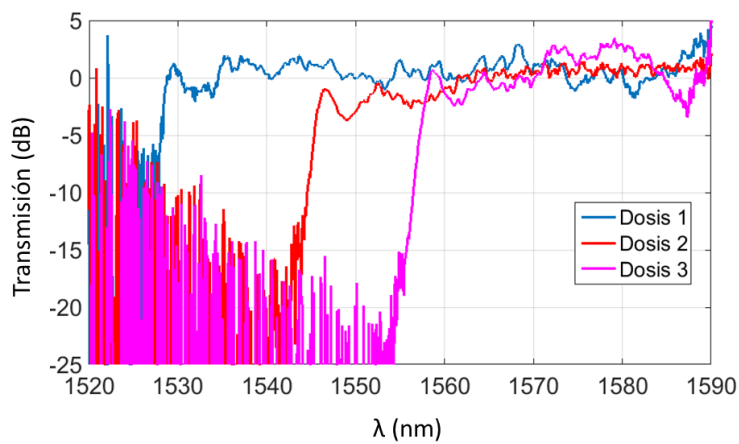
$\text{PBG}_\lambda(\text{aire})\sim 1533\text{ nm}$

$\text{PBG}_\lambda(\text{SiO}_2)\sim 1580\text{ nm}$

Sens $\sim 107\text{ nm}/\text{RIU}$

Figura 2.24. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de *band gap* fotónico (corr3D) antes y después de cubrir el chip fotónico con un revestimiento de SiO_2 .

La Figura 2.25 y la Figura 2.26 muestran los espectros de transmisión proporcionados por dos configuraciones expuestas con diferentes dosis y cubiertas de SiO_2 . **A medida que aumenta dicha dosis, el PBG aparece localizado a mayores longitudes de onda con un margen de 10-15 nm.**



Parámetros nominales:

- $a=360\text{ nm}$
- $w_i=100\text{ nm}$
- $w_e=2000\text{ nm}$

Resultados

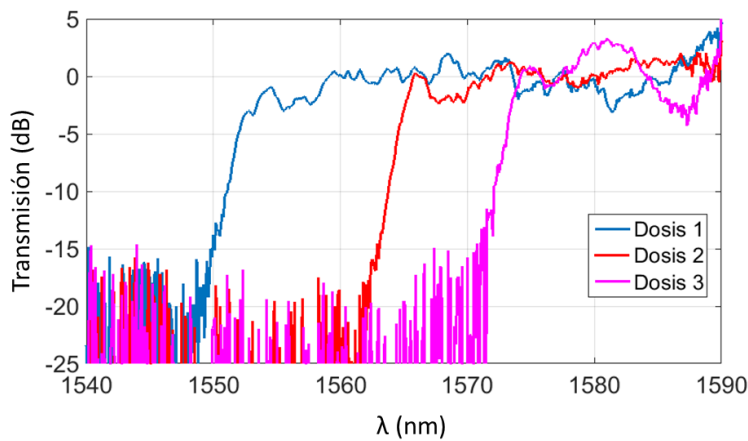
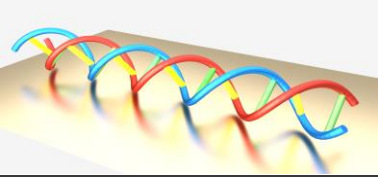
experimentales:

$\text{PBG}_\lambda(\text{D1})\sim 1530\text{ nm}$

$\text{PBG}_\lambda(\text{D2})\sim 1545\text{ nm}$

$\text{PBG}_\lambda(\text{D3})\sim 1558\text{ nm}$

Figura 2.25. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de *band gap* fotónico (corr3D) expuesta con diferentes dosis y cubierta de SiO_2 .



Parámetros nominales:

- $a=380$ nm
- $w_i=100$ nm
- $w_e=1500$ nm

Resultados

experimentales:

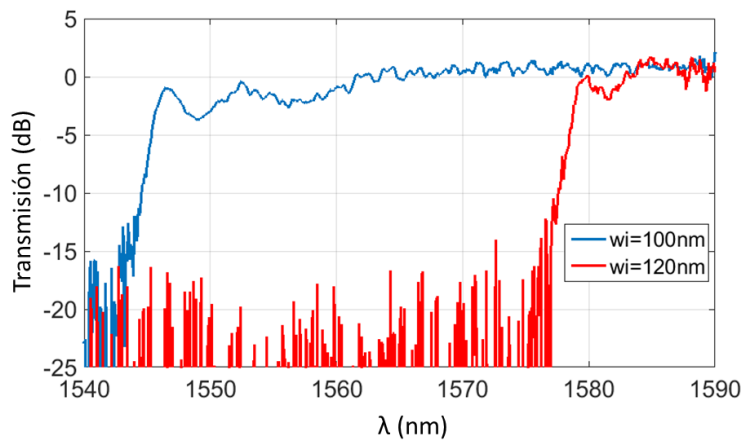
$PBG_\lambda(D1)\sim 1555$ nm

$PBG_\lambda(D2)\sim 1565$ nm

$PBG_\lambda(D3)\sim 1575$ nm

Figura 2.26. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de *band gap* fotónico (corr3D) expuesta con diferentes dosis y cubierta de SiO_2 .

Para estudiar cómo varía la localización del borde del PBG en función de uno de sus parámetros de diseño, los espectros de transmisión proporcionados por las dos configuraciones anteriores, también cubiertas de SiO_2 , se representan **variando 20 nm la dimensión w_i** en las Figuras 2.27 y 2.28. En estas gráficas se puede observar que **este ligero incremento/decremento en el valor de w_i se traduce en un respectivo incremento/decremento espectral de 25 a 35 nm en la posición del borde del PBG.**



Parámetros nominales:

- $a=360$ nm
- $w_e=2000$ nm

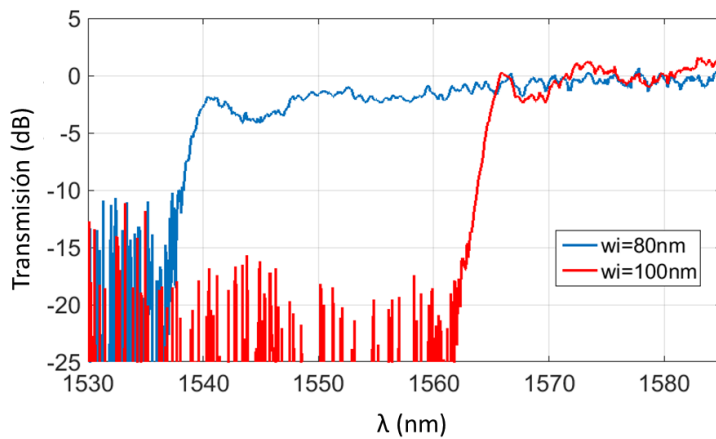
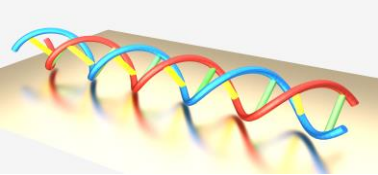
Resultados

experimentales:

$PBG_\lambda(w_i100)\sim 1547$ nm

$PBG_\lambda(w_i120)\sim 1580$ nm

Figura 2.27. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de *band gap* fotónico (corr3D) escaneando su parámetro w_i .



Parámetros nominales:

- a=380 nm
- we=1500 nm

Resultados

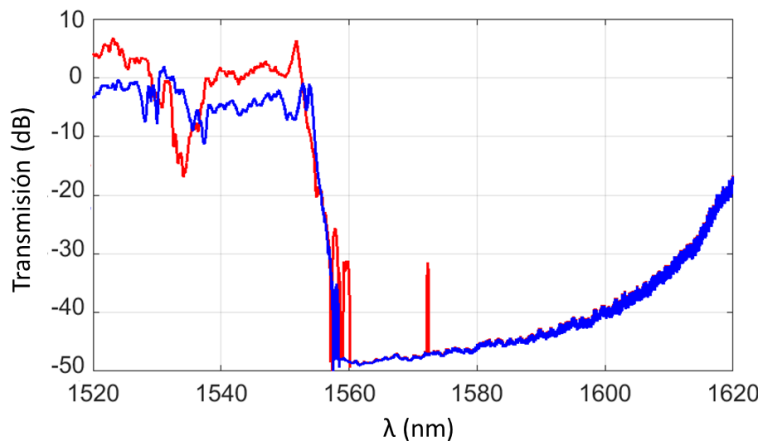
experimentales:

PBG_λ(wi80)~1540 nm

PBG_λ(wi100)~1565 nm

Figura 2.28. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de *band gap* fotónico (corr3D) escaneando su parámetro *wi*.

Mediante la Figura 2.29 se pretende comparar los espectros de transmisión proporcionados por dos configuraciones corr3Ds cuyos parámetros nominales son idénticos. Tal y como ocurría en la simulación, esta configuración experimentalmente proporciona el borde inferior del PBG 2 alrededor de 1550 nm en un medio acuoso. A pesar que los parámetros nominales varían ligeramente de los reales, éstos guardan una gran similitud entre las dos configuraciones corr3Ds interrogadas. De hecho, se puede observar gráficamente que ambas estructuras proporcionan un espectro de transmisión muy similar. Además, la relación de extinción del PBG es extremadamente alta (~50 dB).



Parámetros nominales:

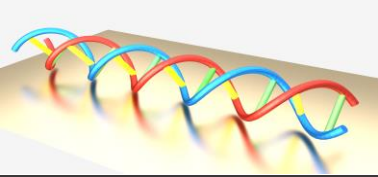
- a=400nm
- wi=100 nm
- we=2000 nm

Parámetros reales:

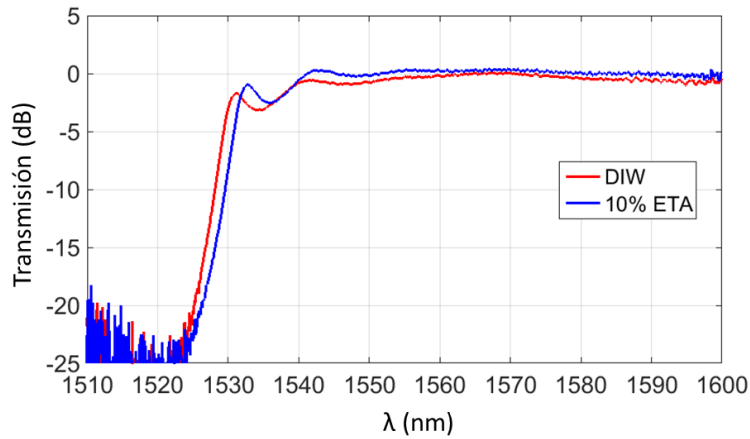
- a=421,9 nm
- wi=127,2 nm
- we=2046 nm
- a=421,9 nm
- wi=128,9 nm
- we=2052 nm

Figura 2.29. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por dos estructuras de *band gap* fotónico (corr3D) cuyos parámetros nominales son idénticos.

Por último, la Figura 2.30 muestra el espectro de transmisión proporcionado por una estructura de *band gap* fotónico corr3D cuando su superficie es cubierta de agua ($n=1,315$) (representado en rojo) y cuando es cubierta de una disolución del 10% de etanol en agua ($n=1,325$) (representado en azul). La interrogación de esta estructura proporciona un abrupto



borde del PBG localizado en torno a 1531 nm, en el primero de los casos, y presenta una sensibilidad aproximada de 107 nm/RIU.



Parámetros nominales:

- $a=380\text{nm}$
- $w_i=100\text{ nm}$
- $w_e=1500\text{ nm}$

Parámetros reales:

- $a=380\text{nm}$
- $w_i=90\text{ nm}$
- $w_e=1500\text{ nm}$

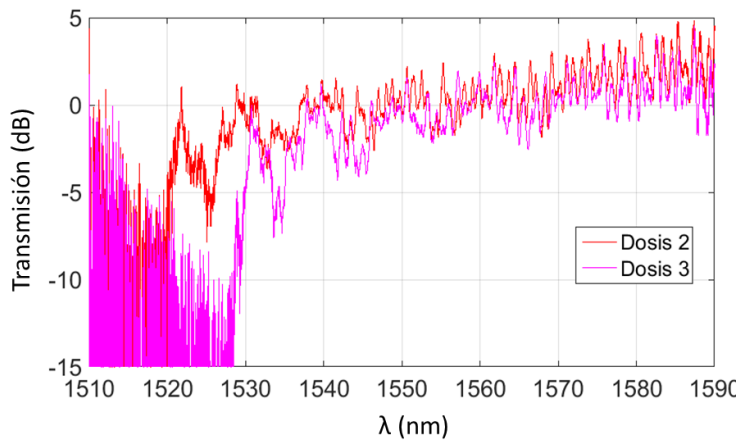
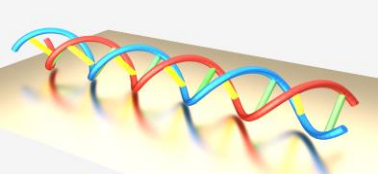
Sensibilidad Exp: ~ 107 nm/RIU

Figura 2.30. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de *band gap* fotónico (corr3D) considerando sobre su superficie agua (color rojo) y una disolución del 10% de etanol en agua (color azul).

El espectro de transmisión ha mejorado significativamente en comparación con las anteriores figuras, como resultado de la optimización del proceso de fabricación. Las dimensiones reales de la estructura guardan una gran similitud con los parámetros nominales y en consecuencia el espectro obtenido experimentalmente es muy parecido al que se obtuvo durante la fase de simulación. La relación de extinción del PBG es de aproximadamente 22 dB, apenas hay pérdidas de transmisión y el ruido es despreciable.

➤ *Inverse corrugated waveguide (corr3Dinv)*

En la Figura 2.31 son representados los espectros de transmisión proporcionados por una configuración expuesta con diferentes dosis y sin ningún tipo de recubrimiento superior. Como ocurría para la configuración corr3D, **a medida que aumenta la dosis, el PBG se localiza en longitudes de onda mayores con un margen de 10 nm.**



Parámetros nominales:

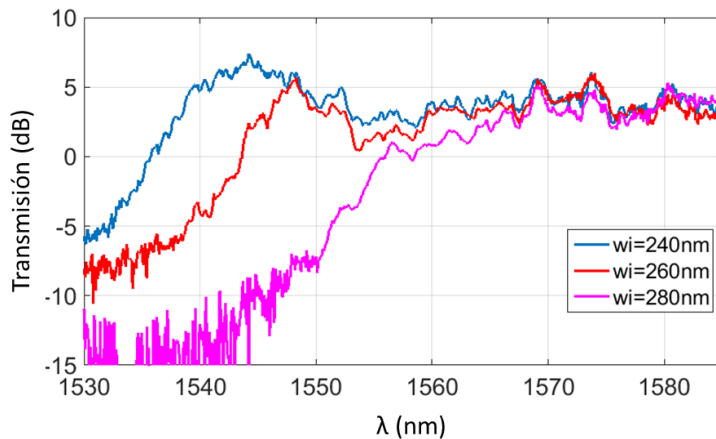
- $a=360$ nm
- $w_i=280$
- $w_e=350$ nm

Resultados experimentales:

$PBG_\lambda(D2)\sim 1522$ nm
 $PBG_\lambda(D3)\sim 1532$ nm

Figura 2.31. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de *band gap* fotónico (corr3Dinv) expuesta con diferentes dosis.

Para analizar cómo varía la localización del borde del PBG en función de uno de los parámetros de diseño de la estructura, se representa el espectro de transmisión proporcionado por la configuración anterior **variando 20 nm la dimensión w_i** . En la Figura 2.32 se puede observar que **este ligero incremento/decremento en el valor de w_i se traduce en un respectivo incremento/decremento de aproximadamente 10 nm en la posición del borde del PBG**.



Parámetros nominales:

- $a=360$ nm
- $w_e=350$ nm

Resultados

experimentales:
 $PBG_\lambda(w_i240)\sim 1540$ nm
 $PBG_\lambda(w_i260)\sim 1547$ nm
 $PBG_\lambda(w_i280)\sim 1557$ nm

Figura 2.32. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de *band gap* fotónico (corr3Dinv) escaneando su parámetro w_i .

En las Figuras 2.31 y 2.32 se puede observar que el PBG no está claramente definido en el espectro. A diferencia de los resultados de simulación, el PBG no es demasiado abrupto y su relación de extinción es muy baja, tan solo aproximadamente 5 dB. Además, el ruido es significativamente notorio. Hay que tener en cuenta que se trata de las primeras estructuras fabricadas, cuyos parámetros ni siquiera son los propuestos como óptimos durante la fase de simulación.

La Figura 2.33 muestra el espectro de transmisión proporcionado por una estructura de *band gap* fotónico corr3Dinv cuando su superficie es cubierta de agua (representado en rojo) y cuando es cubierta de IPA ($n_{IPA}=1,38$) (representado en azul). La interrogación de esta estructura proporciona un abrupto borde del PBG localizado en torno a 1555 nm, en el primero de los casos, y una sensibilidad aproximada de 420 nm/RIU.

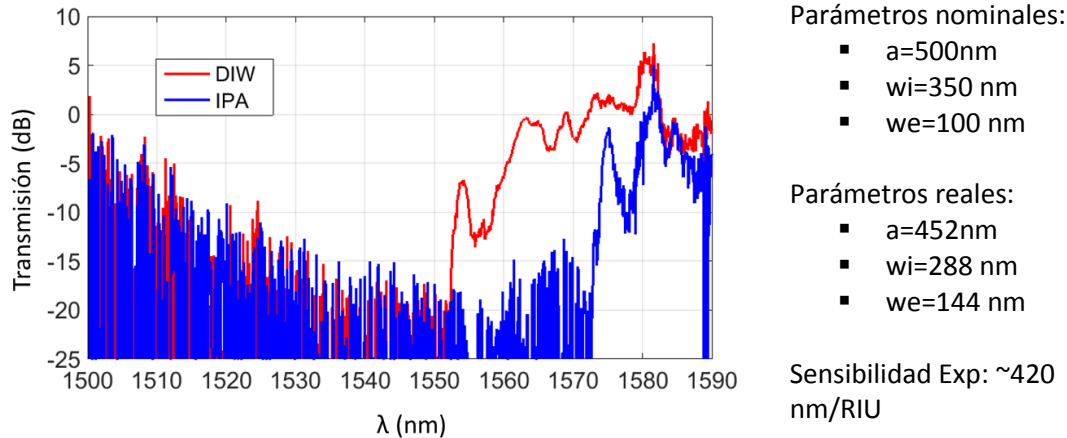
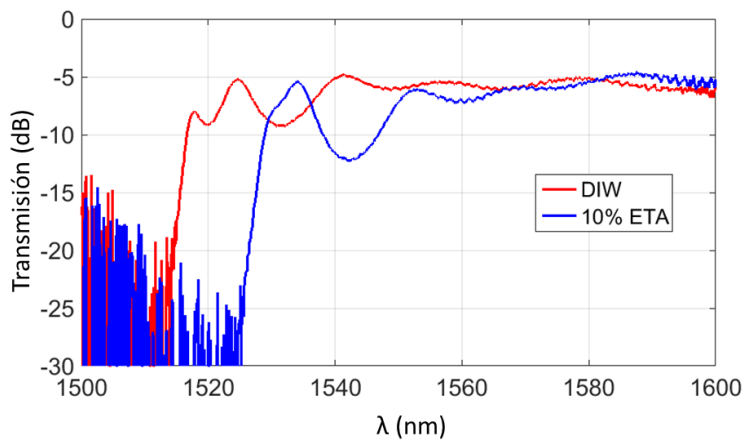


Figura 2.33. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de *band gap* fotónico (corr3Dinv) considerando agua (color rojo) e IPA sobre su superficie.

A pesar de que las dimensiones reales de la estructura difieren de los parámetros nominales y que la banda de transmisión no es plana, esta estructura proporciona una elevada sensibilidad experimental. No obstante, hay que tener en cuenta que también se trata de una de las primeras estructuras fabricadas.

La Figura 2.34 muestra el espectro de transmisión proporcionado por una estructura de *band gap* fotónico corr3Dinv cuando su superficie es cubierta de agua ($n=1,315$) (representado en rojo) y cuando es cubierta de una disolución del 10% de etanol en agua ($n=1,325$) (representado en azul). La interrogación de esta estructura proporciona un abrupto borde del PBG localizado en torno a 1515 nm en el primero de los casos y una sensibilidad aproximada de 626,7 nm/RIU.



Parámetros nominales:

- $a=500\text{nm}$
- $w_i=300\text{ nm}$
- $w_e=60\text{ nm}$

Parámetros reales:

- $a=500\text{nm}$
- $w_i=320,3\text{ nm}$
- $w_e=32,5\text{ nm}$

Sensibilidad Exp: $\sim 626,7\text{ nm/RIU}$

Figura 2.34. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de *band gap* fotónico (corr3Dinv) considerando agua (color rojo) y una disolución del 10% de etanol en agua (color azul) sobre su superficie.

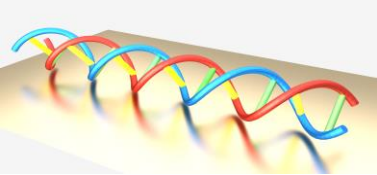
Tal y como ocurría en la Figura 2.30, la respuesta de transmisión observada en la Figura 2.34 mejora significativamente en comparación con las anteriores figuras, ya que se trata de una de las últimas estructuras fabricadas durante el proceso de optimización. En este caso, se observa un PBG muy abrupto con una gran relación de extinción ($\sim 20\text{ dB}$) y el ruido es moderado. Sin embargo, presenta pérdidas de transmisión de transmisión en torno a 5 dB.

2.4.6. Conclusiones

Se han llevado a cabo numerosas iteraciones de diseño-fabricación-caracterización, centradas en optimizar las dimensiones de las estructuras de *band gap* fotónico, con el objetivo de que su respuesta espectral proporcione **un borde de PBG alrededor de 1550 nm en un medio acuoso**. A partir de la caracterización experimental de las estructuras fabricadas, tanto física como óptica, es posible extraer las siguientes conclusiones:

- Se requiere alta precisión de las dimensiones de la estructura para obtener el borde del PBG ubicado alrededor de 1550 nm en un medio acuoso. Esta precisión debe ser extremadamente alta para aquellas configuraciones con mayor sensibilidad, ya que **esta mayor sensibilidad también se traduce en una menor tolerancia a cualquier ligera desviación de fabricación**.
- Las configuraciones corr3D cuyo parámetro w_e es menor muestran mayor facilidad para proporcionar un borde de PBG en el rango de longitud de onda requerido.
- La creación de las estructuras donde se introducen cavidades rectangulares dentro de la guía de ondas (corr3Dslot, 1Dsquareholes3D, corr+squareholes3D) muestran mayor dificultad de fabricación que aquellas en las que se introducen elementos transversales en la guía de ondas.

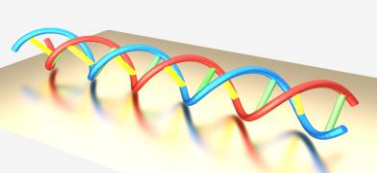
Teniendo en cuenta todo el trabajo realizado para el desarrollo de las estructuras de *band gap* fotónico y las dificultades observadas para obtener las estructuras que proporcionan las sensibilidades más altas, **la configuración corr3D se considera la mejor candidata para el desarrollo de biosensores nanofotónicos** para la detección de oligonucleótidos, tal y como se dijo en el punto 2.3.4. Concretamente la configuración con las siguientes dimensiones: $a=380$



nm, $w_i=120$ nm y $w_e=1500$ nm, a pesar de no proporcionar los mayores valores de sensibilidad, **presenta una complejidad estructural moderada y sus dimensiones han demostrado mayor tolerancia a las desviaciones de fabricación.** Asimismo, **su caracterización experimental proporciona un espectro de transmisión con escasas pérdidas, una relación de extinción del PBG muy elevada (~22 dB), un rizado moderado en el borde de la banda y un borde de PBG considerablemente abrupto.** Por tanto, ésta es la configuración escogida para llevar a cabo la detección de oligonucleótidos, descartando así el uso de la configuración corr3Dinv.

La caracterización física mediante AFM muestra una rugosidad de 2 nm en las paredes laterales de esta estructura de *band gap* fotónico. Finalmente, un estudio del perfil de campo evanescente usando la técnica SNOM revela un **decremento exponencial de la intensidad del campo evanescente a medida que se aleja de la superficie de la estructura corr3D, disminuyendo significativamente para alturas superiores a 100 nm.** Esta distancia de penetración delimita el área sobre la superficie del sensor donde es posible la interacción de la onda evanescente con el complejo receptor-analito. Por tanto, **para alcanzar altos valores de sensibilidad, se requiere que la capa biológica de reconocimiento molecular sea lo más delgada posible.**

En vista de las desviaciones espectrales de la posición del PBG en la caracterización experimental de las estructuras fabricadas, incluso entre las incluidas en un mismo chip fotónico, se opta por trabajar con una plataforma de interrogación espectral durante la fase de desarrollo de los biosensores de *band gap* fotónico. Hay que tener en cuenta que un ligero incremento/decremento en la anchura (20 nm) de los elementos transversales de la configuración corr3D supone una desviación espectral de la posición del borde del PBG entre 25 nm y 35 nm. Por tanto, la interrogación espectral permitirá estudiar el comportamiento, forma y localización del PBG y así optimizar progresivamente el proceso de fabricación.



Capítulo 3 Detección de oligonucleótidos usando sensores de *band gap* fotónico biofuncionalizados con *molecular beacons*

Actualmente se conocen numerosos sistemas de detección basados en la hibridación entre un ADN/ARN objetivo y su hebra complementaria, en los que típicamente sondas lineales monocatenarias de ADN (una única hebra de ADN) se utilizan en formatos de *microarrays* [ESC-12, VAI-03].

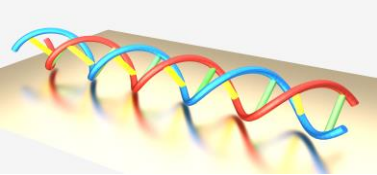
Dada la relevancia de la detección de estos ADN/ARN objetivos para el bioanálisis y la investigación biomédica, se estudian diferentes alternativas para su reconocimiento. Entre ellas, destaca el uso de sondas MB: una configuración particular de ácido nucleico con una estructura *stem-loop* donde el reconocimiento de la hebra objetivo produce un cambio conformacional de la propia sonda [TYA-96]. El uso de MBs marcados con fluoróforos ha demostrado tener alto potencial para la detección de secuencias cortas de ADN/ARN, también llamadas oligonucleótidos [DUB-01, HEIN-03, RIC-01]. Además, la estabilidad termodinámica extraordinaria que ofrece su configuración y la posibilidad de utilizar una amplia variedad de biomarcadores convierten a los MBs en excepcionales sondas de análisis molecular con excelente sensibilidad, selectividad y capacidad de detección en tiempo real [WIL-96].

3.1. Concepto del sensor

El sensor fotónico propuesto para la detección de oligonucleótidos se basa en la combinación de sondas MB y estructuras de *band gap* fotónico, sobre las que son inmovilizadas dichas sondas. Las características y principio de transducción de este tipo de estructuras periódicas fueron descritos en el punto 1.3.1, así como su diseño, fabricación y caracterización experimental fueron explicados detalladamente a lo largo del capítulo 2. Por tanto, en el punto 3.1.1. se procede a describir la configuración óptima de las estructuras de *band gap* fotónico utilizadas para llevar a cabo la detección de oligonucleótidos. Asimismo, en el punto 3.1.2. se explica en qué consiste una sonda MB, su principio de funcionamiento y cómo éste produce una variación en la respuesta espectral de la estructura de *band gap* fotónico.

3.1.1. Configuración óptima de las estructuras de *band gap* fotónico

La configuración óptima seleccionada se muestra en la Figura 3.1. Consiste en una guía de ondas monomodo de anchura $w=460$ nm y altura $h=220$ nm donde se introducen 50 elementos transversales, de anchura $w_i=120$ nm y longitud $w_e=1500$ nm, con una periodicidad de $a=380$ nm. Esta configuración presenta el borde superior de su segundo PBG a 1550 nm,



considerando un revestimiento superior acuoso, y proporciona una sensibilidad teórica ante variaciones de índice de refracción de aproximadamente 175 nm/RIU.

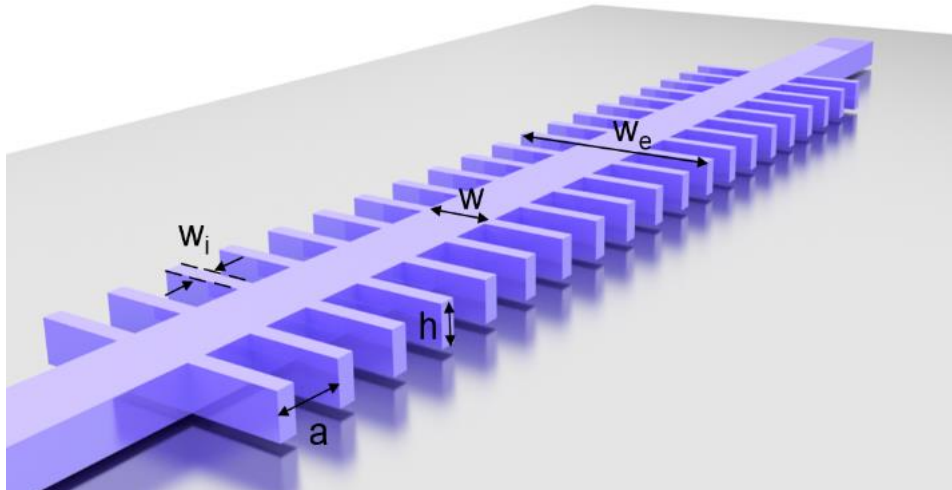


Figura 3.1. Representación esquemática de la configuración óptima de la estructura de *band gap* fotónico. (La estructura periódica de silicio es fabricada sobre un revestimiento inferior de SiO_2).

La Figura 3.2.a) muestra el diagrama de bandas calculado en MPB de la estructura de *band gap* fotónico. Las bandas representadas en colores rojo y azul representan el diagrama de bandas considerando un revestimiento superior de agua ($n=1,333$) y de SiO_2 ($n=1,444$), respectivamente. En la gráfica aparecen dos PBGs (representados en color rojo sombreado): uno entre la primera y la segunda banda guiada y otro entre la segunda y la tercera banda guiada. El área sombreada en gris representa la región del diagrama de bandas que se encuentra por debajo de la línea de luz del SiO_2 . Dentro de esta región, los modos no están confinados en la dirección vertical y radían hacia el revestimiento inferior de SiO_2 , por lo que no se consideran para determinar la posición de los PBGs. La Figura 3.2.b) muestra el espectro de transmisión proporcionado por la estructura de *band gap* fotónico en las simulaciones realizadas en CST. Los espectros de transmisión para un revestimiento superior de agua y SiO_2 son representados en colores rojo y azul, respectivamente. Los dos PBGs observados en los diagramas de bandas MPB también se obtienen en estas simulaciones. El recuadro muestra la distribución del campo eléctrico (modo TE) a lo largo de la estructura de *band gap* fotónico a una longitud de onda de 1550 nm.

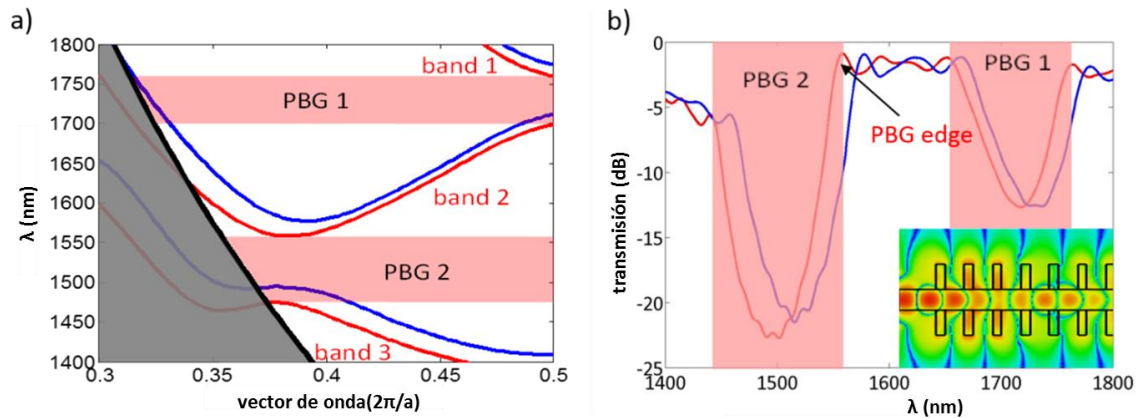
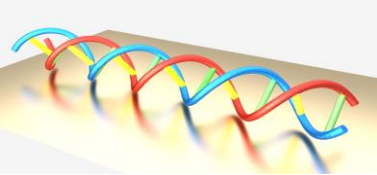


Figura 3.2. a) Diagrama de bandas y b) espectro de transmisión; de la estructura de *band gap* fotónico.

3.1.2. Sondas *molecular beacon*

Una sonda MB es un oligonucleótido monocatenario que tiene una configuración *stem-loop* en su estado inicial [WAN-09, ZHE-15]. Una vez hibridado con su hebra complementaria, el MB abre el *stem* adoptando la configuración de doble hélice. La aplicación típica de MB se muestra en la Figura 3.3 [TYA-96], donde un marcador fluorescente (*reporter*) y un *quencher* se unen a los extremos 5' y 3' del MB, respectivamente. Por tanto, cuando tiene lugar la hibridación, el cambio conformacional del MB separa el *quencher* del *reporter*, restaurando la fluorescencia. Esta aplicación de sondas MB, basada en fluorescencia, se utiliza ampliamente para la detección de oligonucleótidos en ensayos homogéneos en los que los MBs son inmovilizados sobre sustratos sólidos [GUO-16, MEI-17, LI-15, SU-14], pero su rendimiento está limitado por la dificultad de detectar los pequeños cambios de fluorescencia producidos por pequeñas concentraciones de oligonucleótidos.

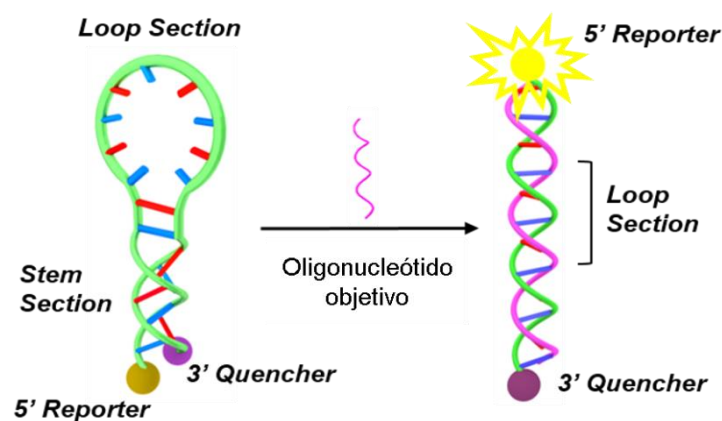


Figura 3.3. Explicación esquemática del principio de funcionamiento de una sonda MB, marcada con un fluoróforo, en el bioconocimiento de oligonucleótidos.

En el presente trabajo, en lugar de utilizar la configuración basada en fluorescencia descrita anteriormente, la sonda MB es inmovilizada directamente sobre la superficie de la estructura de *band gap* fotónico, como muestra la Figura 3.4. De esta manera, el

bioreconocimiento del oligonucleótido objetivo por el MB originará una variación en la distribución del índice de refracción sobre la superficie de la estructura. En consecuencia, tal y como muestra la Figura 3.5, la posición del PBG será desplazada espectralmente, es decir, cambiará el rango espectral donde la propagación de la luz no es permitida debido a la periodicidad de la estructura. Este cambio en la respuesta espectral de la estructura de *band gap* fotónico no solo es debido a la hibridación, como ocurre con las típicas sondas lineales de oligonucleótidos, sino también a la contribución del cambio conformacional de las sondas MB.

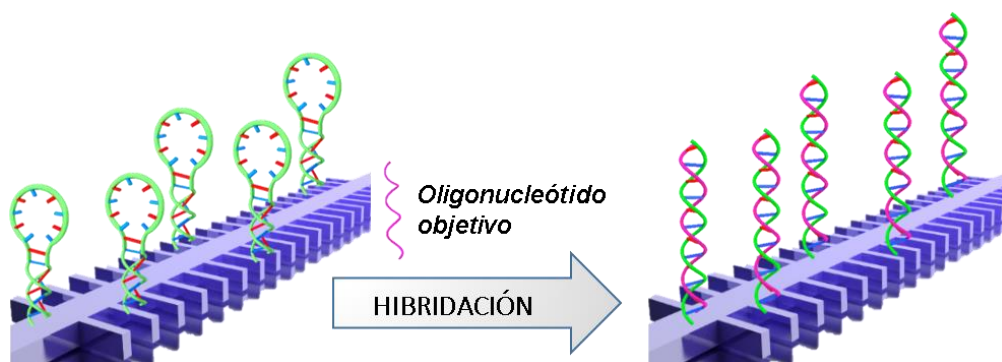


Figura 3.4. Esquema del evento de hibridación de los oligonucleótidos objetivo con las sondas MB inmovilizadas en la superficie de una estructura de *band gap* fotónico.

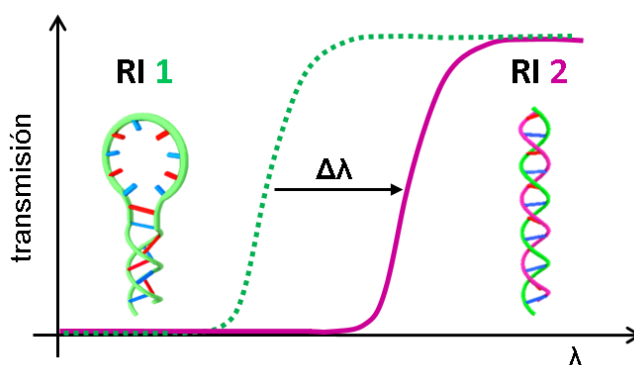
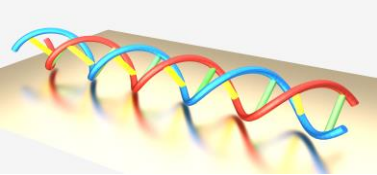


Figura 3.5. Explicación esquemática del desplazamiento espectral del borde del PBG cuando la sonda MB reconoce el oligonucleótido objetivo. (RI: índice de refracción).

3.2. Diseño del chip fotónico

Para llevar a cabo la detección multiplexada de oligonucleótidos, se diseña un chip fotónico donde se incluyen las estructuras de *band gap* fotónico, cuya configuración ha sido previamente seleccionada. Considerando los requerimientos del montaje experimental de laboratorio, cuyo funcionamiento será explicado detalladamente en el punto [3.4.](#), se toman en cuenta una serie de consideraciones para su diseño:

- Varios GCs son colocados en el acceso de entrada del chip. Éstos serán los encargados de acoplar la luz procedente de un colimador que homogeneiza los rayos de luz



emitidos por la fuente láser de la plataforma de interrogación. Por tanto, deben situarse lo suficientemente próximos como para acoplar la luz simultáneamente en todos ellos, pero lo suficientemente distanciados como requiere el proceso de fabricación para evitar su solape.

- La luz es distribuida utilizando guías de onda y curvas hasta llegar a las estructuras de *band gap* fotónico, las cuales son situadas en cuatro posiciones diferentes. En esta distribución, dichas posiciones distan 1.5 mm consecutivamente con el fin de facilitar el proceso de biofuncionalización usando diferentes receptores de oligonucleótidos.
- Ante posibles desviaciones sufridas en el dimensionado de las estructuras durante el proceso de fabricación, en cada posición son introducidas dos estructuras con idéntica configuración salvo una ligera variación en la anchura transversal de sus elementos ($w_i=120$ nm y $w_i=140$ nm). Como se estudió en el capítulo 2, **un aumento de 20 nm en w_i provoca una localización del borde del PBG a una longitud de onda 25-30 nm superior**. Por tanto, la inclusión de esta pareja de estructuras presupone la garantía de obtener al menos uno de los dos bordes del PBG localizado alrededor de 1550 nm en un medio acuoso.
- Para propagar la luz a través de cada pareja de estructuras se utiliza un MMI de una entrada y dos salidas, cuya optimización de diseño será mostrada en el punto [3.2.1](#). Éste permite reducir el número de GCs de entrada, dado que el colimador puede excitar un número limitado de GCs simultáneamente.
- Tres guías de onda monomodo son también introducidas como referencia del sistema, una de ellas en la parte central del chip y las otras dos en los extremos superior e inferior. Su caracterización permitirá controlar la estabilidad de la luz acoplada al chip fotónico.
- En el acceso de salida del chip fotónico, se colocan varios GCs para recoger la luz procedente de cada una de las guías contenidas en el chip. Todas estas señales de salida se medirán simultáneamente usando la cámara de radiación infrarroja (IR) de la plataforma de interrogación que será explicada posteriormente en el punto [3.4.1](#). Por tanto, se han de situar equidistantes y en zig-zag para que los *spots* puedan distinguirse unos de otros.

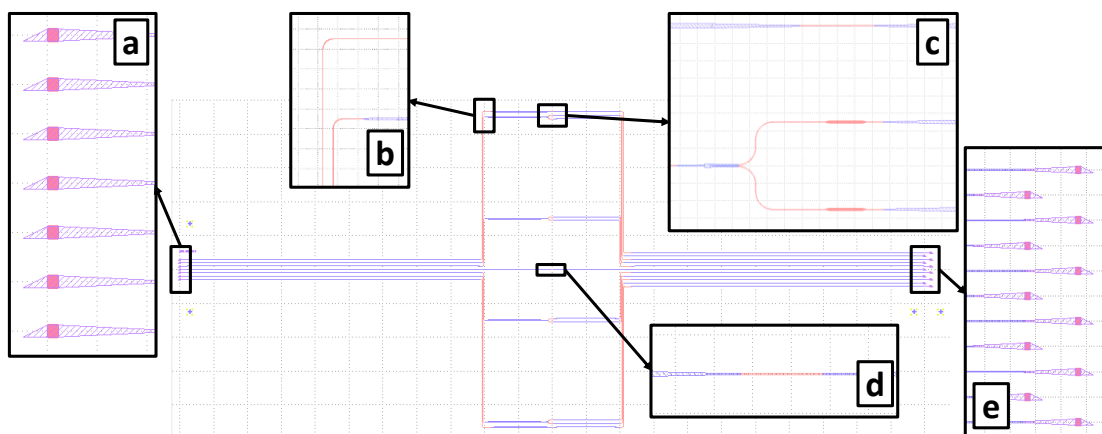
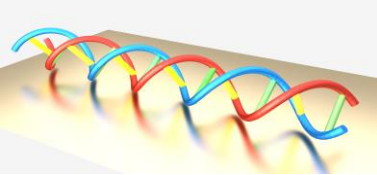


Figura 3.6. Distribución de los elementos contenidos en el chip fotónico para realizar la detección multiplexada de oligonucleótidos. a) GCs de entrada, b) curvas encargadas de distribuir la luz a lo largo del chip, c) pareja de estructuras de *band gap* fotónico, arriba: guía de referencia, d) guía de referencia central, e) GCs de salida.



3.2.1. Diseño de MMIs

3.2.1.1. Interferencia multimodal

La teoría de interferencia multimodal o de autoimágenes se basa en la propiedad de las guías de onda multimodo por la cual un perfil de campo inicial de entrada, se reproduce en una o múltiples imágenes, en intervalos periódicos a lo largo de la dirección de propagación de la guía [SOL-95].

En un acoplador de interferencia multimodal, el modo fundamental de la guía de acceso excita varios modos (Φ_i) de la zona multimodo central, que, al tener diferentes constantes de propagación, interfieren de manera constructiva y destructiva a medida que se propagan. Dicha interferencia es la que da lugar a imágenes múltiples (réplicas) de la excitación, las cuales pueden ser acopladas a las guías de salida, fijando adecuadamente la longitud del MMI.

La distancia a la que se forman las imágenes es directamente proporcional a la longitud de batido (L_π) de los primeros modos de la zona multimodo:

$$L_\pi = \frac{\pi}{\beta_0 - \beta_1}$$

donde β_0 y β_1 son las constantes de propagación de los dos primeros modos (Φ_0 y Φ_1).

3.2.1.2. Optimización paramétrica

Haciendo uso de CST, se diseña un MMI de una entrada y dos salidas (1x2) con un espesor de 220 nm de la capa de silicio considerando la plataforma SOI, tal y como se hizo con las estructuras de *band gap* fotónico.

A partir de un MMI de dimensiones arbitrarias ($2\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$) se conoce la distribución del campo eléctrico a una longitud de onda de 1550 nm, como muestra la Figura 3.7. Asimismo, se determina la longitud de batido y se estima la longitud del MMI en torno a $10/3 \mu\text{m}$, posición en la que aparecen las dos autoimágenes como réplica de la excitación del modo fundamental a la entrada del MMI.

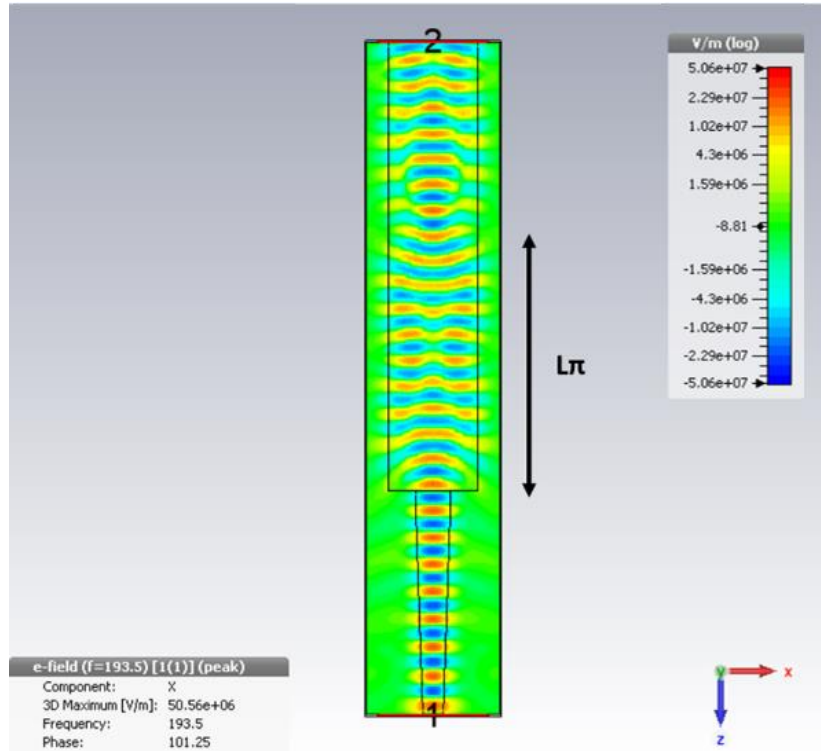
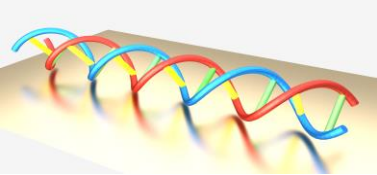


Figura 3.7. Distribución del campo eléctrico a lo largo de un MMI de longitud $10 \mu\text{m}$ y anchura $2 \mu\text{m}$.

A continuación, se procede al escaneo de la longitud del MMI (L_{MMI}) desde $2,5 \mu\text{m}$ hasta $3,5 \mu\text{m}$, considerando aire sobre su superficie. La Figura 3.8 muestra la respuesta espectral, definida por los parámetros S_{21} y S_{31} , en cada acceso de salida de las configuraciones óptimas, es decir, cuando su longitud varía en el rango $[3, 3,2] \mu\text{m}$. En ella se puede observar que la transmisión hacia ambos accesos de salida es muy similar, proporcionando unas pérdidas aproximadas de $3,2 \text{ dB}$.

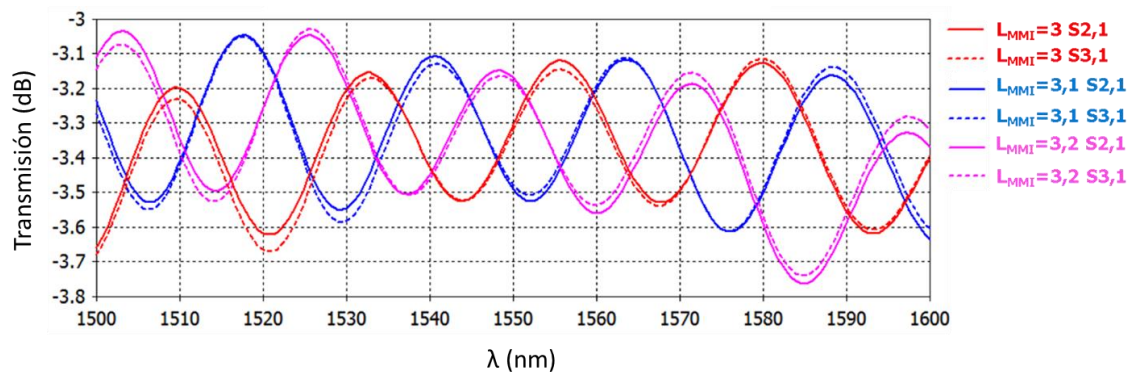
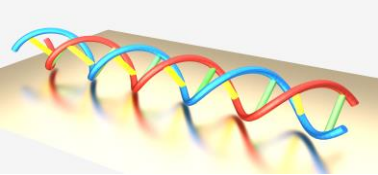


Figura 3.8. Respuesta espectral proporcionada por MMIs cuyas longitudes son $3, 3,1$ y $3,2 \mu\text{m}$.



Posteriormente, se escanean el resto de parámetros que definen el MMI pero ninguno de ellos resulta ser restrictivo para el diseño del mismo. No obstante, se define la configuración óptima del MMI con una longitud de $3,2 \mu\text{m}$ y una anchura de $2 \mu\text{m}$.

Tanto a la entrada como a la salida del MMI, también se optimizan los *tapers* estableciendo una longitud de $5 \mu\text{m}$ y una anchura de acceso al MMI de $0,8 \mu\text{m}$ (la otra anchura viene determinada por la anchura de la guía monomodo).

Finalmente, se llevan a cabo otras simulaciones considerando posibles recubrimientos superiores a emplear durante los experimentos, tales como agua ($n_{\text{DIW}}=1,315$), PMMA ($n_{\text{PMMA}}=1,478$) o polidimetilsiloxano (PDMS) ($n_{\text{PDMS}}=1,399$). Como se puede observar en la Figura 3.9, a medida que aumenta el valor del índice de refracción del recubrimiento superior, la señal es más estable (sufre menos oscilaciones). Cuanto mayor es ese índice más simetría en el eje vertical presenta la estructura, ya que su revestimiento inferior de SiO_2 tiene un índice de refracción menor que el silicio ($n_{\text{Si}}=3,477$; $n_{\text{SiO}_2}=1,444$). Esto hace que el modo tienda a irse en mayor medida hacia el revestimiento superior proporcionando una señal más estable.

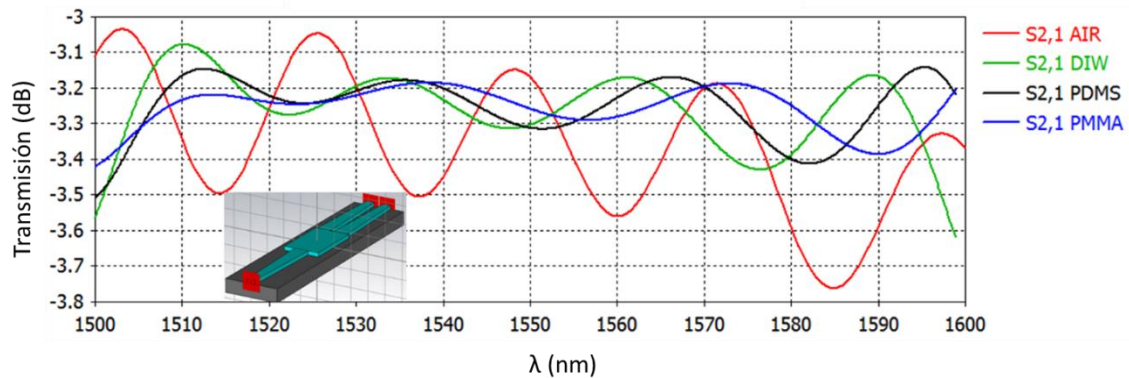


Figura 3.9. Respuesta espectral proporcionada por el MMI diseñado considerando diferentes recubrimientos superiores: aire (AIR), agua (DIW), PDMS y PMMA.

3.2.1.3. Caracterización experimental de la respuesta espectral

Con el objetivo de caracterizar experimentalmente el espectro de transmisión proporcionado por el MMI, éste se fabrica haciendo un escaneo de su longitud, concretamente $L_{\text{MMI}}=[2,8 \ 2,9 \ 3 \ 3,1 \ 3,2 \ 3,3 \ 3,4 \ 3,5] \mu\text{m}$. Su respuesta espectral se caracteriza en un chip fotónico, inicialmente sin ningún recubrimiento superior y posteriormente cubierto de SiO_2 . Ésta última caracterización se muestra en la Figura 3.10, concretamente considerando un MMI de longitud $3,2 \mu\text{m}$. A partir de ella, se puede comprobar que las señales de ambos accesos muestran un comportamiento similar e introducen aproximadamente 3 dB de pérdidas a una longitud de onda de 1550 nm .

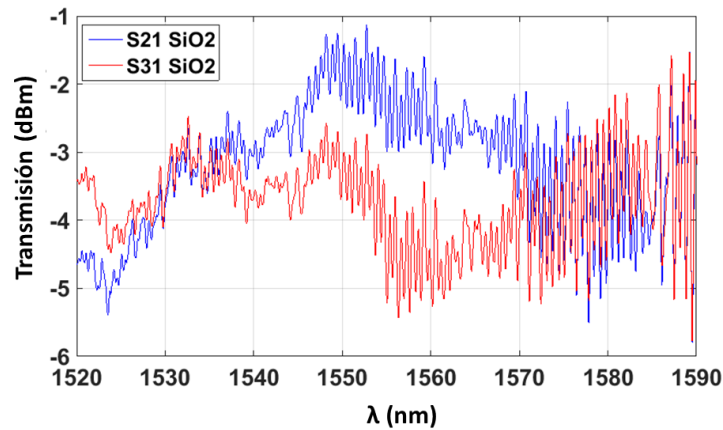
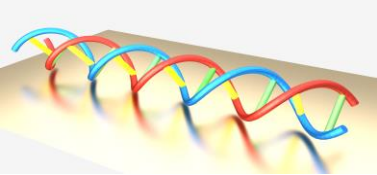


Figura 3.10. Espectro de transmisión proporcionado por un MMI cubierto de SiO₂ y cuya longitud es 3,2 μ m.

3.2.2. Dimensionado del chip fotónico

Una vez el diseño es expuesto mediante EBL sobre una oblea SOI, como fue descrito en el punto 2.4.3., es necesario que el chip sea cortado con unas dimensiones específicas debido a los requerimientos tanto de la plataforma de interrogación como de la celda microfluídica que será empleada en los experimentos de laboratorio. Para evitar posibles reflexiones, el corte a la entrada del chip se realiza muy próximo a los GCs (40 μ m), por lo que ha de ser un corte muy preciso que requiere ser realizado con un equipo de laboratorio. A pesar de que el corte a la salida del chip es menos restrictivo, éste ha de distar aproximadamente 1 mm de los GCs para poder visualizar los *spots* haciendo uso de la cámara IR de la plataforma de interrogación. El chip fotónico se muestra en la Figura 3.11, cuyas dimensiones son 12x12 mm.

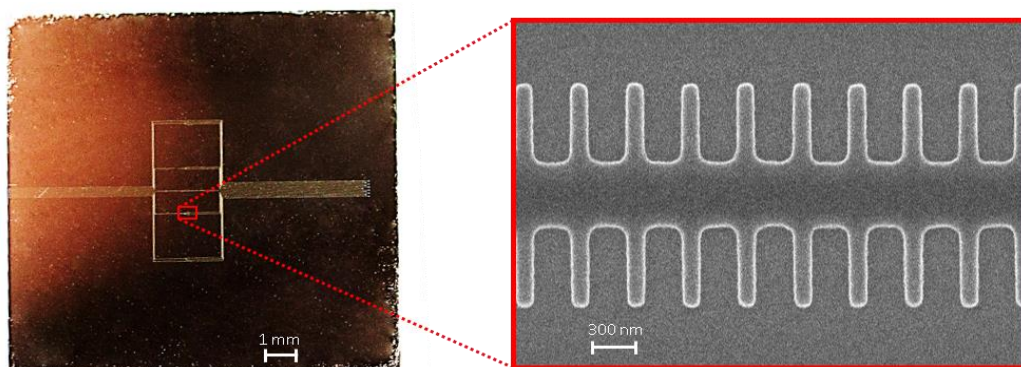
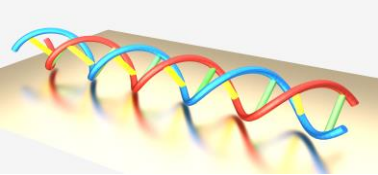


Figura 3.11. Imagen del chip fotónico fabricado en tecnología SOI. El rectángulo rojo muestra una imagen SEM de la estructura de *band gap* fotónico incluida en el chip.

3.3. Proceso de biofuncionalización

3.3.1. Secuencias de oligonucleótidos

Para llevar a cabo los experimentos de detección, se selecciona una secuencia objetivo de oligonucleótido 35-mer (5'-3' AUC GAC UUA AUG CUA AUC GUG AUA GGG GUG UCG AU), la



cual es diluida en citrato de sodio salino (SSC, NaCl 750 nM, citrato de sodio 75 mM, pH7) en una concentración 0,5 μ M. Con objeto de confirmar su efectiva hibridación con la secuencia del MB inmovilizado en la superficie del sensor, se incluye un marcador fluorescente Cy5 (AlexaFluor647) en su terminación 5'. Todos los oligonucleótidos marcados con un fluoróforo y funcionalizados fueron suministrados por Eurofins Genomic. La Figura 3.12 muestra la sonda MB utilizada para su detección. Como se puede observar, la secuencia del oligonucleótido es totalmente complementaria a la secuencia del MB.

Cabe destacar que la secuencia del oligonucleótido objetivo fue seleccionada bajo la creencia de tratarse del biomarcador miRNA-155 y, de hecho, la UEA diseñó la configuración óptima de la sonda MB para la detección de este biomarcador. Tras comprobar un fallo en el suministro de oligonucleótidos, fue posible constatar que se trata de dos secuencias muy similares pero de distinta longitud, ya que se habían considerado también las secuencias complementarias a la sección *stem* del MB. El miRNA-155 está realmente formado por 23 bases y su secuencia es solamente complementaria a la secuencia del MB contenida en la región *loop*. No obstante, en el capítulo 5 se abordará el bioreconocimiento del miRNA-155, lo que permitirá comparar tanto la respuesta de detección como el rendimiento de hibridación de este “pseudo-miRNA155”.

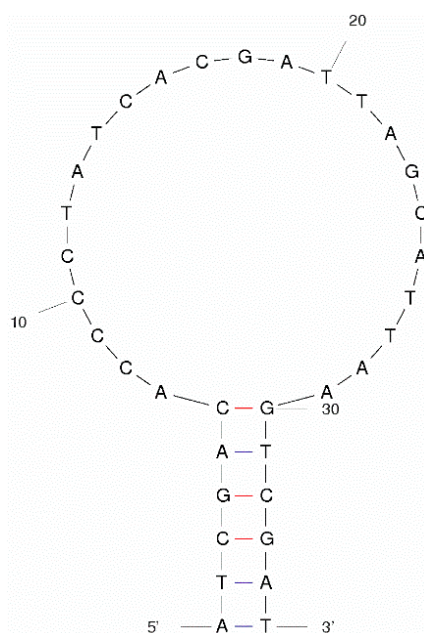
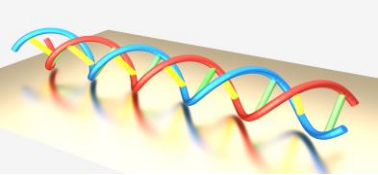


Figura 3.12. Configuración óptima de la sonda MB diseñada para la detección de biomarcadores miRNA-155.

3.3.2. Funcionalización *Thiol-ene Coupling*

La inmovilización de los MBs sobre las estructuras fotónicas debe ser robusta y biocompatible. Para ello se recurre a la química TEC, ya que proporciona una biofuncionalización rápida y homogénea de la superficie bajo condiciones no agresivas [ESC-14, WIN-10, GON-17]. Para lograr la inmovilización, los MBs tiolados se unen covalentemente a la superficie de las estructuras fotónicas, la cual es previamente derivatizada con terminaciones vinilo siguiendo un protocolo de funcionalización optimizado.



En primer lugar, para introducir los grupos vinilo, el chip fotónico se enjuaga con etanol y agua e inmediatamente se activa mediante radiación ultravioleta a 254 nm (50 mW/cm^2) durante 10 minutos. Posteriormente, se sumerge en una solución del 2% de viniltrióxido (Sigma-Aldrich, Alemania) en tolueno durante 2 horas, se lava con acetona y se deja secar al aire. Finalmente, tras curar el chip durante 30 minutos a 80° , se obtiene un ángulo de contacto con el agua (WCA) de $76.7 \pm 0.1^\circ$, lo que demuestra la correcta funcionalización.

Siguiendo el diagrama esquemático de biofuncionalización mostrado en la Figura 3.13, las sondas MB se inmovilizan sobre las estructuras de *band gap* fotónico funcionalizadas con vinilo.

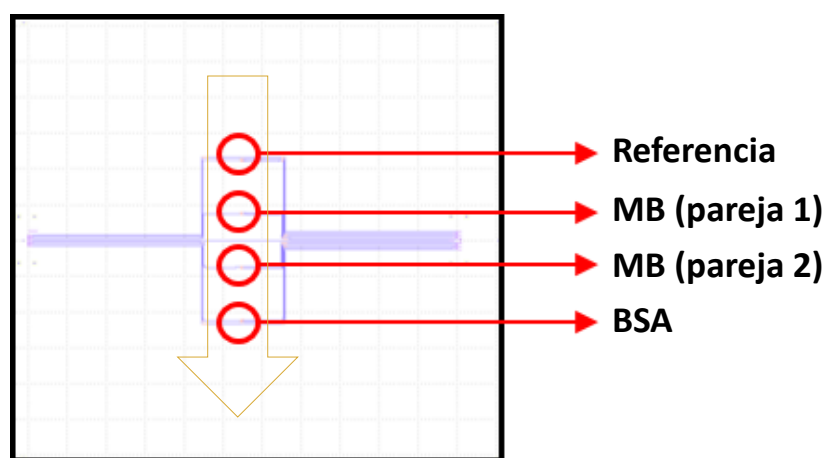


Figura 3.13. Diagrama esquemático de la biofuncionalización del chip fotónico. La flecha amarilla indica el sentido de flujo de los oligonucleótidos objetivo durante el experimento.

Las disoluciones de sonda MB tiolada (30 nL, $10 \mu\text{M}$ en agua ultrapura) se depositan gota a gota sobre dos de las cuatro parejas de sensores y se dejan secar a temperatura ambiente. Más tarde, el chip se irradia a 254 nm (50 mW/cm^2) durante 30 segundos para inducir la foto-inmovilización. Una vez los MBs son inmovilizados, el chip fotónico se lava a fondo con disolución salina con fosfato (PBS-T, fosfato 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4, 0,5%, *tween* 20) y agua destilada y se deja secar al aire.

Una de las otras dos parejas de sensores del chip se cubre con una gota de una solución de bloqueo de BSA (2% de albúmina de suero bovino en agua ultrapura) y, tras incubar el chip durante 2 horas, se enjuaga. Sobre el último par de sensores contenido en el chip no se aplican modificaciones, ya que serán empleados como referencias.

La densidad de inmovilización de las sondas MB obtenida siguiendo este procedimiento es de 14 pmol/cm^2 . Un análisis de microscopía de fluorescencia confocal (CFM), donde son usadas sondas marcadas con un fluoróforo, demuestra que toda la superficie de los sensores es cubierta homogéneamente con sondas MB, tal y como se puede observar en la Figura 3.14.

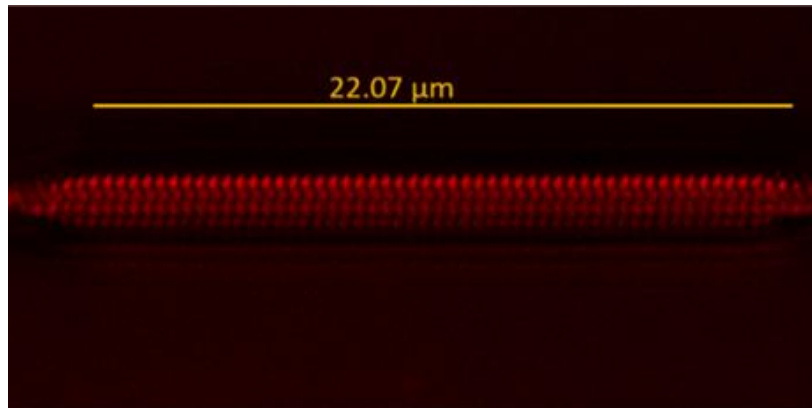
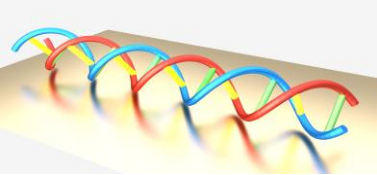


Figura 3.14. Imagen CFM de la estructura de *band gap* fotónico biofuncionalizada usando sondas MB marcadas con un fluoróforo.

3.4. Montaje experimental

3.4.1. Plataforma de interrogación opto-fluídica

La Figura 3.15 muestra un diagrama de los elementos que comprende la plataforma de interrogación óptica que permite la caracterización autónoma y simultánea de varias estructuras nanofotónicas, incluidas en un mismo chip fotónico, haciendo uso de una cámara de IR como elemento de lectura.

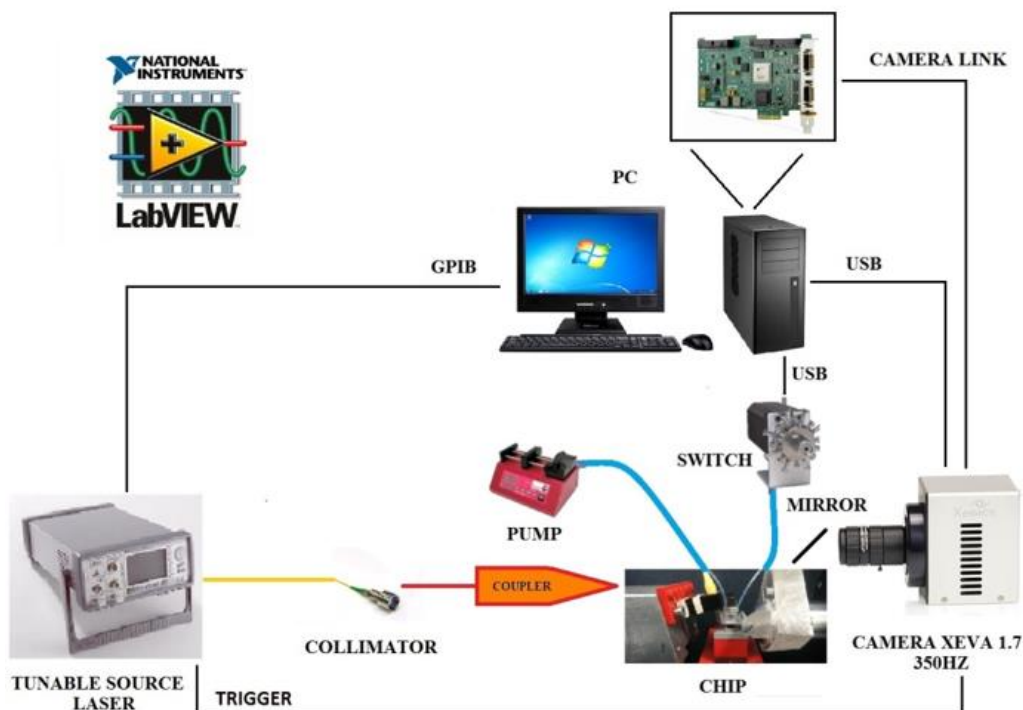
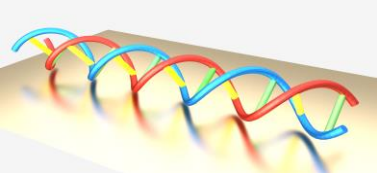


Figura 3.15. Diagrama esquemático de la interconexión de los elementos que componen la plataforma de interrogación basada en la adquisición de la respuesta espectral mediante una cámara de IR.



Esta plataforma de interrogación genera una serie de barridos en el espectro IR (rango de 1475 nm a 1630 nm) utilizando los láseres sintonizables Keysight 81940A y 81980A a velocidades comprendidas entre 0,5 nm/s y 50 nm/s. La luz del láser sintonizable es acoplada verticalmente (con un ángulo de 10° respecto al eje vertical) y de manera simultánea a todos los GCs a la entrada del chip fotónico utilizando un colimador esférico (Thorlabs CFS2-1550-APC) que genera un *spot* de salida de $\sim 0,38$ mm ($1/e^2$ diámetro a la distancia focal). La luz es propagada a través de las estructuras nanofotónicas y en los GCs de salida es redirigida al plano horizontal mediante un espejo (colocado a 30° con respecto al eje horizontal). La luz es recogida con un objetivo (20X Olympus Plan Achromat, 0,4 NA), como muestra la Figura 3.16, y finalmente medida usando una cámara IR Xenics Xeva-1.7-350Hz con un sensor InGaAs.

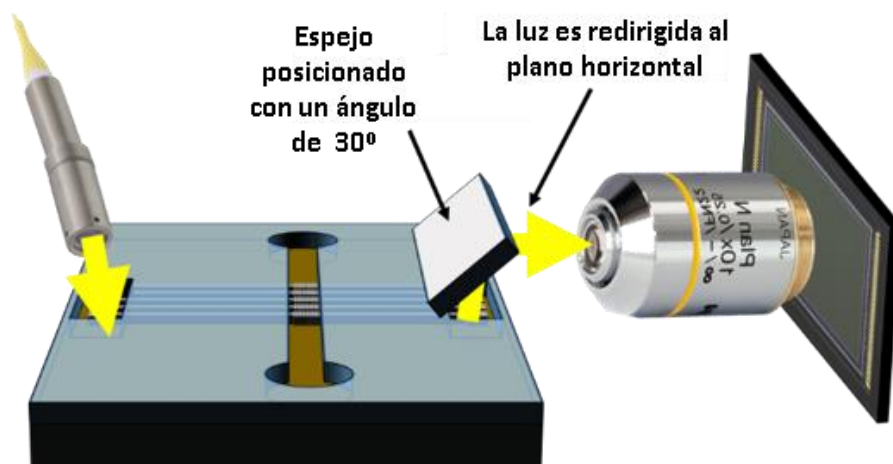
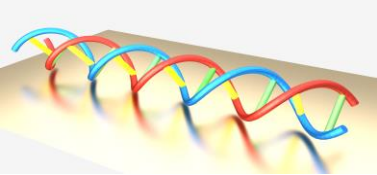


Figura 3.16. Diagrama esquemático que indica cómo la luz de salida es redirigida al plano horizontal mediante un espejo en la salida del chip fotónico.

La cámara IR está conectada a un ordenador de control mediante una conexión *Universal Serial Bus* (USB) y una interfaz *Camera Link* combinada con una tarjeta *Frame Grabber* (NI PCIe-1433), que proporciona una conexión más rápida y permite trabajar a mayores *frame rates*. Para sincronizar el barrido láser con la adquisición de la cámara, ambos instrumentos están conectados a través de un cable de *trigger*. El código de sincronización es implementado en LabVIEW, reservando un núcleo del microprocesador para controlar cada instrumento. Gracias a esta sincronización es posible conocer exactamente a qué longitud de onda corresponde cada *frame* que irá adquiriendo sucesivamente la cámara y donde se visualizarán los diferentes *spots* de salida del chip fotónico. En cada *frame* se realizará un procesamiento de cada *spot* para dibujar una traza que representa la respuesta espectral de cada estructura nanofotónica de detección. Finalmente, los espectros de transmisión de todas las estructuras nanofotónicas dentro de un chip fotónico serán adquiridos simultáneamente en un intervalo de tiempo de 2-3 segundos, trabajando a *frame rates* de la cámara de IR incluso por encima de 1000 fps.

Con un sistema de microfluídica formado por una bomba de jeringa en modo extracción, una celda microfluídica colocada sobre el chip fotónico y un selector fluídico controlado por el ordenador para seleccionar el fluido a analizar, se hará circular el fluido objetivo sobre las estructuras nanofotónicas.



La Figura 3.17 muestra una imagen de la plataforma de interrogación óptica basada en la adquisición continua de la respuesta espectral de estructuras nanofotónicas mediante una cámara IR. La Figura 3.18 muestra el detalle del soporte de chip fotónico y las etapas de acoplamiento de luz.



Figura 3.17. Imagen de la plataforma de interrogación óptica basada en la continua adquisición de la respuesta espectral de estructuras nanofotónicas mediante una cámara IR.

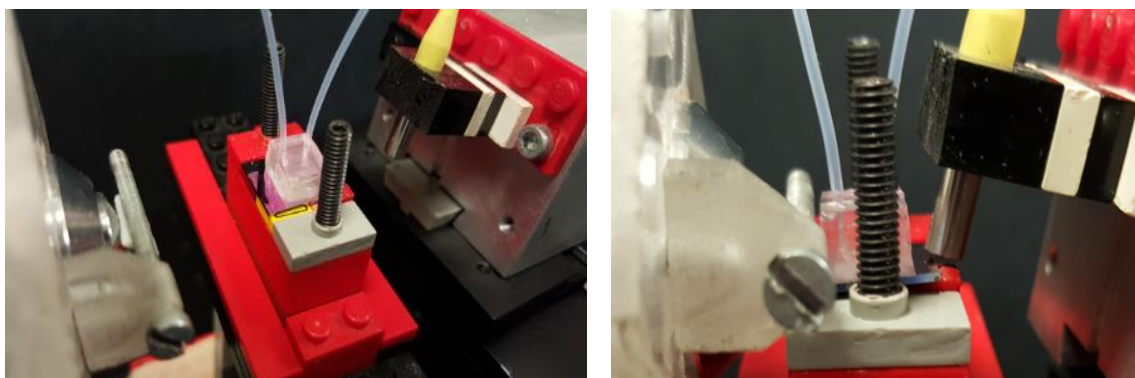
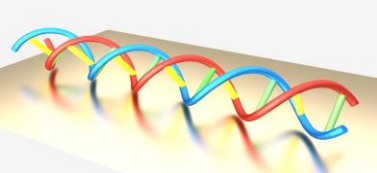


Figura 3.18. Imágenes de la plataforma de interrogación óptica basada en una cámara de IR. Detalles del soporte del chip y las etapas de acoplamiento de la luz de entrada/salida.

3.4.2. Celda microfluídica

Para la realización de los experimentos de detección de oligonucleótidos se fabrican varias celdas de flujo de PDMS con canales microfluídicos de diferentes dimensiones. El hecho de tratarse de una “fabricación casera” permite crear canales microfluídicos estrechos que



garanticen una entrega óptima del oligonucleótido objetivo hacia las estructuras de detección con la mayor difusión posible. Sin embargo, tener un canal estrecho complica su alineación con las estructuras de *band gap* fotónico en el chip usando un procedimiento pasivo. Por tanto, se requiere el uso de una herramienta de alineamiento (Finetech) disponible en el NTC para alinear/ensamblar correctamente la celda de flujo PDMS con el chip fotónico.

La Figura 3.19.a) muestra el canal microfluídico de la celda PDMS utilizada en el experimento de detección de oligonucleótidos, cuyas dimensiones son 400 μm de anchura y 50 μm de altura. En la Figura 3.19.b) se puede observar cómo la celda PDMS es ensamblada con el chip fotónico en un soporte apto para la plataforma de interrogación.

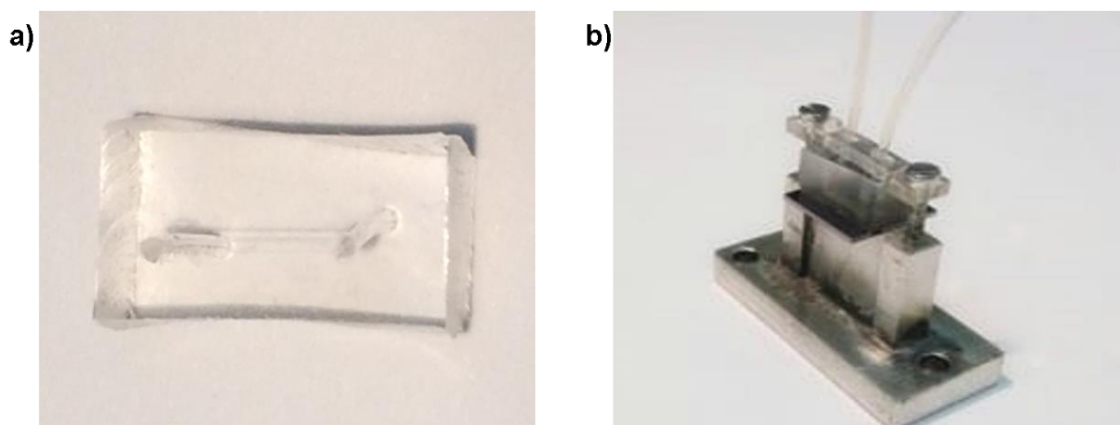


Figura 3.19. a) Imagen del canal microfluídico de la celda PDMS utilizada en los experimentos de detección de oligonucleótidos. b) Ensamblaje de la celda PDMS con el chip fotónico.

Haciendo uso de la bomba de extracción del sistema opto-fluídico previamente descrito, el oligonucleótido objetivo será fluido a través de unos tubos de teflón a una velocidad constante de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

3.5. Resultados experimentales en el bioreconocimiento de oligonucleótidos

3.5.1. Caracterización espectral de los sensores de *band gap* fotónico

Las siguientes gráficas muestran los espectros de transmisión proporcionados por las estructuras de *band gap* fotónico incluidas en el chip en un flujo de SSC 5X. Dependiendo de la dimensión de los elementos transversales de cada estructura de la pareja, el borde superior del PBG 2 se localiza alrededor de 1570 nm (para $w_i=120$ nm) o alrededor de 1595 nm (para $w_i=140$ nm).

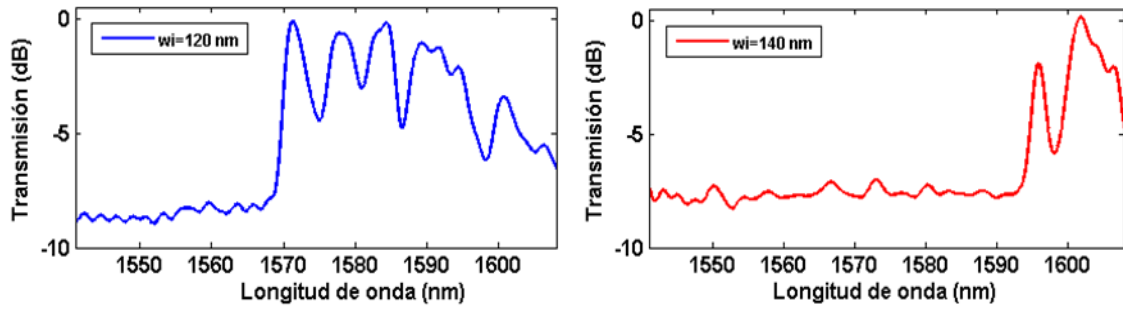
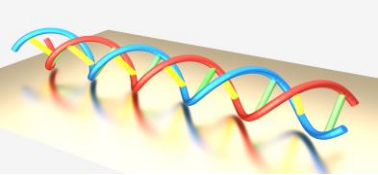


Figura 3.20. Espectro de transmisión proporcionado por la pareja 1 de las estructuras biofuncionalizadas con MBs en un flujo de SSC 5X.

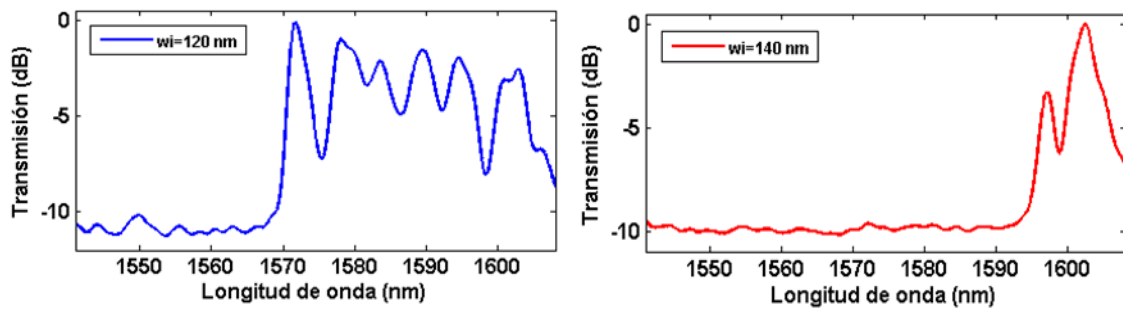


Figura 3.21. Espectro de transmisión proporcionado por la pareja 2 de las estructuras biofuncionalizadas con MBs en un flujo de SSC 5X.

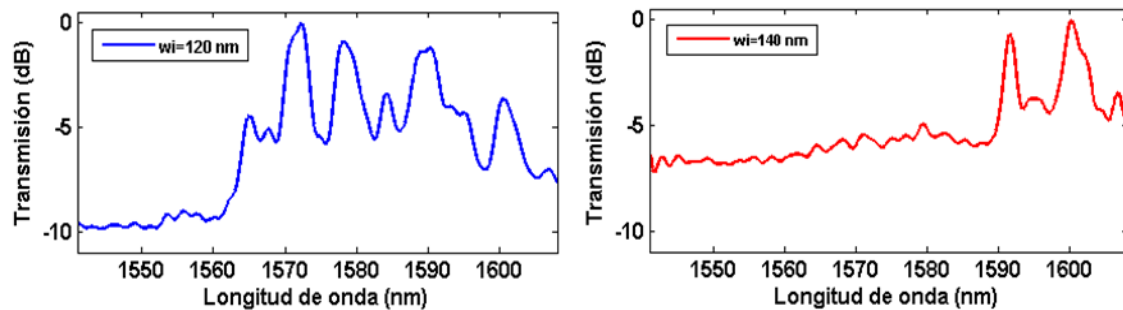
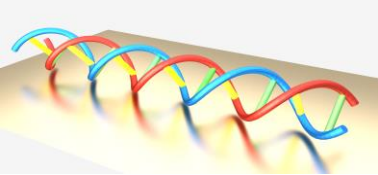


Figura 3.22. Espectro de transmisión proporcionado por la pareja de las estructuras bloqueadas con BSA en un flujo de SSC 5X.

En las Figuras 3.20, 3.21 y 3.2 se observa que el PBG proporcionado por las estructuras de *band gap* fotónico es abrupto pero su relación de extensión no es tan elevada como la obtenida teóricamente y, posteriormente, durante la caracterización experimental llevaba a cabo en el capítulo 2. Asimismo, la banda de transmisión no es plana sino que presenta muchas oscilaciones, posiblemente ocasionadas por defectos de fabricación. Las guías contenidas en el chip fotónico son muy largas, lo que supone un mayor tiempo de exposición y, por tanto, mayor vulnerabilidad a imperfecciones/desviaciones en la fabricación.



3.5.2. Seguimiento espectral del *band gap* fotónico

A pesar de que las respuestas espectrales proporcionadas por las estructuras de *band gap* fotónico son bastante ruidosas, mediante un procesado adecuado es posible realizar el seguimiento espectral de la posición del borde del PBG. Para ello, se filtra la señal y posteriormente el lóbulo del borde del PBG se ajusta con la combinación de dos funciones, una Gaussiana y una Lorentziana.

Las Figuras 3.23 y 3.24 muestran la evolución espectral del borde superior del PBG, previamente caracterizado para cada una de las estructuras incluidas en el chip fotónico, durante el experimento de bioreconocimiento de oligonucleótidos (“pseudo-miRNA-155”). En primer lugar, se fluye un tampón SSC 5X sobre las estructuras periódicas para obtener la posición inicial del borde del PBG. Posteriormente, se fluye durante 10 minutos una disolución en SSC 5X de 0,5 μ M del oligonucleótido objetivo, previamente marcado con un fluoróforo. Finalmente, el tampón SSC 5X se fluye de nuevo para eliminar cualquier oligonucleótido no hibridado presente en el medio.

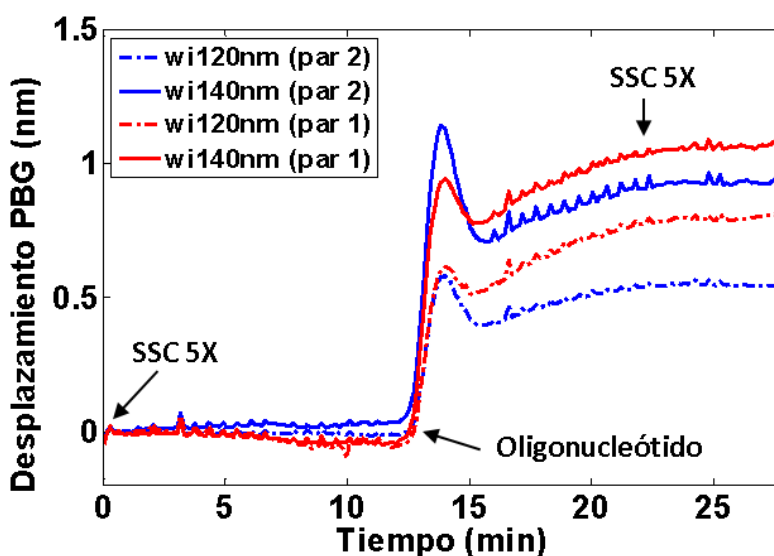


Figura 3.23. Evolución espectral de la posición del borde del PBG proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con sondas MB cuando el oligonucleótido objetivo es fluido sobre su superficie. La evolución espectral de cada pareja es representada en un color diferente y se usan diferentes formatos de línea para indicar distintas anchuras de sus elementos transversales.

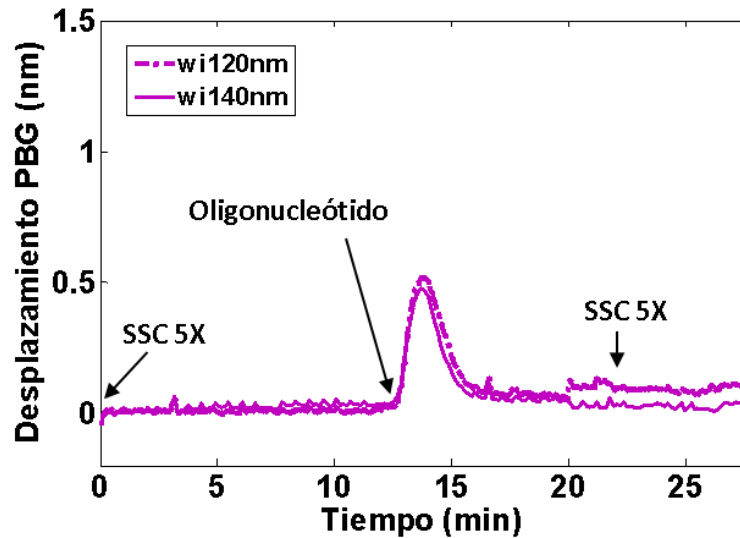
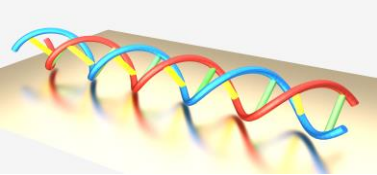


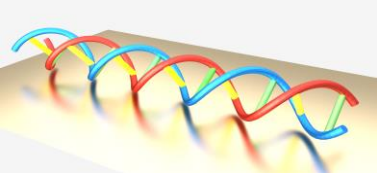
Figura 3.24. Evolución espectral de la posición del borde del PBG proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico bloqueadas con BSA cuando el oligonucleótido objetivo es fluido sobre su superficie. Se usan diferentes formatos de línea para indicar distintas anchuras de sus elementos transversales.

A partir de la Figura 3.23 se puede observar un desplazamiento significativo de la posición del borde del PBG cuando se fluye el oligonucleótido objetivo sobre las estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con las sondas MB. Este desplazamiento, típico en los procesos de bioreconocimiento [MOR-95, SRI-08, ERI-03], permanece inalterado cuando el tampón SSC 5X se fluye nuevamente, indicando que **el oligonucleótido objetivo hibrida de manera efectiva e irreversible con la sonda MB bajo las condiciones consideradas**. Por contra, la Figura 3.24 muestra que las estructuras de *band gap* fotónico bloqueadas con BSA no proporcionan un desplazamiento neto cuando el tampón SSC 5X se fluye de nuevo tras el flujo de oligonucleótidos, lo que indica que **la capa BSA bloqueante evita adecuadamente la adsorción inespecífica del oligonucleótido objetivo sobre las estructuras de detección**.

Además del cambio en la respuesta óptica (o ausencia de él para las estructuras bloqueadas con BSA), se observa un notable desplazamiento instantáneo de la posición del borde del PBG cuando la disolución del oligonucleótido objetivo alcanza los sensores. Este precipitado desplazamiento dura solamente alrededor de 2-3 minutos y el borde del PBG vuelve bruscamente a su posición inicial, como se puede observar claramente cuando las estructuras de *band gap* fotónico son bloqueadas. Este desplazamiento "hacia arriba y hacia abajo" es fruto de una acumulación del oligonucleótido objetivo en el tubo, justo en la transición entre el tampón SSC 5X inicial y la solución del oligonucleótido. Como consecuencia, es originado un aumento del índice de refracción sobre la superficie de las estructuras de *band gap* fotónico y ópticamente es traducido en un breve desplazamiento espectral del borde del PBG. Sin embargo, después de este comportamiento transitorio, la concentración nominal del oligonucleótido objetivo es recuperada y el índice de refracción del medio vuelve a su valor inicial.

3.5.3. Análisis de los resultados

Evaluando la respuesta óptica proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico funcionalizadas con MBs cuando éstos reconocen los oligonucleótidos, **los desplazamientos**



netos del borde del PBG varían desde aproximadamente 520 pm hasta incluso alrededor de 1100 pm. Estos elevados desplazamientos representan una mejora significativa en términos de sensibilidad, en comparación con los obtenidos utilizando sensores basados en los típicos anillos resonantes, cuyos desplazamientos suelen ser inferiores a 100 pm [QAV-10, SCH-12]. No obstante, los desplazamientos obtenidos son incluso superiores a los proporcionados por sensores usando técnicas de amplificación basadas en anticuerpos [RAM-08]. Por tanto, **la detección de oligonucleótidos haciendo uso de la estructura fotónica diseñada, directamente funcionalizada con sondas MB, no sólo muestra ser una técnica altamente efectiva para el reconocimiento de oligonucleótidos sino que además proporciona una extremada sensibilidad ante pequeñas variaciones de índice de refracción originadas en la superficie del sensor.**

Por último, cabe destacar la **tremenda influencia de los parámetros estructurales de las estructuras de *band gap* fotónico sobre su sensibilidad.** En la Figura 3.23 se puede observar que el valor del desplazamiento del borde del PBG asciende desde unos 800 pm hasta alrededor de 1100 pm, cuando la anchura de los elementos transversales de la primera pareja de estructuras es simplemente incrementada de $w_i=120$ nm a $w_i=140$ nm (representado en azul). Asimismo, el desplazamiento del borde del PBG asciende desde aproximadamente 520 pm hasta unos 950 pm para este pequeño incremento de 20 nm en la anchura de los elementos transversales de la segunda pareja de estructuras (representado en rojo). Por tanto, **basta con seleccionar correctamente los parámetros estructurales de la estructura de *band gap* fotónico para obtener una mejora significativa en la sensibilidad sin necesidad de aumentar el *footprint*.** Ésta es una gran ventaja en comparación con otras configuraciones típicas de sensores fotónicos tales como anillos resonantes, donde la sensibilidad está limitada por su principio de funcionamiento, o interferómetros, donde el logro de sensibilidades más altas supone un aumento significativo del tamaño de la estructura. Por otro lado, **esta alta influencia de los parámetros estructurales sobre la sensibilidad también implica una menor tolerancia a las desviaciones dimensionales propias de fabricación.** Esta limitación fue explicada durante la caracterización de las estructuras en el capítulo 2 y también se puede observar a partir de los diferentes desplazamientos del borde del PBG obtenidos tras la interrogación de las estructuras de *band gap* fotónico, cuyos parámetros nominales son idénticos. En definitiva, el proceso de fabricación ha de ser cuidadosamente ajustado para obtener una mejor reproducibilidad de las estructuras fabricadas y obtener respuestas de detección idénticas.

3.5.4. Test de fluorescencia

Una vez terminado el experimento de detección de oligonucleótidos, se desensambla el chip fotónico de la celda microfluídica para medir la intensidad de fluorescencia del oligonucleótido objetivo.

La fluorescencia se observa selectivamente sobre las dos parejas de estructuras biofuncionalizadas con sondas MB, como muestra la Figura 3.25.a). La cuantificación de esa fluorescencia es representada en la Figura 3.25.b). **Los valores de intensidad de fluorescencia son muy altos en las posiciones en las que las sondas MB han sido inmovilizadas, lo cual confirma el efectivo reconocimiento de los oligonucleótidos objetivo. Por el contrario, la intensidad de fluorescencia medida en las estructuras de detección bloqueadas con BSA es extremadamente baja, confirmando así la eficacia de la etapa de bloqueo.** Finalmente, la ausencia de fluorescencia en la posición de las estructuras de referencia confirma la inexistencia de oligonucleótidos sobre su superficie.

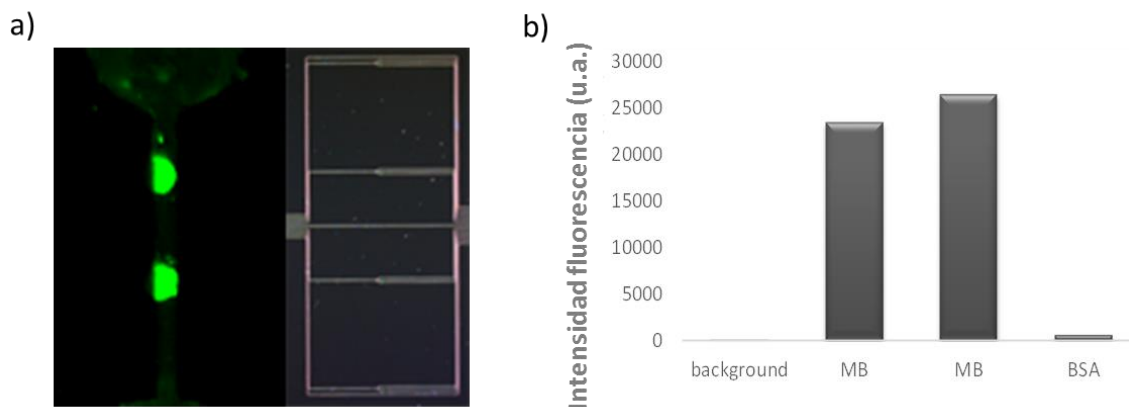
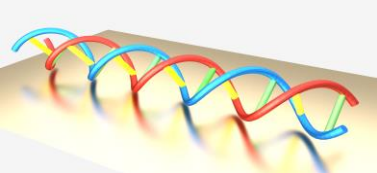
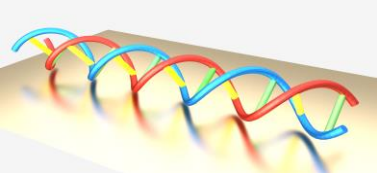


Figura 3.25. a) Fluorescencia observada (izquierda) tras la detección de oligonucleótidos y su posición relativa en el chip fotónico (derecha). b) Valores de intensidad de fluorescencia medidos en cada pareja de estructuras de *band gap* fotónico tras la detección de oligonucleótidos.

3.6. Conclusiones

Tanto la sensibilidad teórica obtenida durante la fase de diseño como la sensibilidad proporcionada por la estructura de *band gap* fotónico experimentalmente ante variaciones de índice de refracción es de ~ 175 nm/RIU. A pesar de que este valor no es extremadamente alto comparativamente con otros sensores tales como anillos resonantes (80 nm/RIU), la respuesta proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico ante la detección de oligonucleótidos es muy elevada. En este contexto, proporciona desplazamientos del borde del PBG muy superiores (hasta 1100 pm) a los reportados hasta la actualidad, los cuales siempre han sido inferiores a 100 pm [QAV-10, SCH-12]; e incluso superiores a los obtenidos usando técnicas de amplificación basadas en anticuerpos [RAM-08]. Sin embargo, estos significativos desplazamientos han sido posibles, no sólo a causa de la alta sensibilidad mostrada por las estructuras de *band gap* fotónico, sino posiblemente también a la redistribución de la materia producida por el cambio conformacional sufrido por las sondas MB tras la hibridación, ya que provocan una variación más notoria del índice de refracción sobre la superficie de los sensores.

En definitiva, las estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con las sondas de reconocimiento MB han proporcionado sensibilidades extremadamente altas para la detección *label-free* de los oligonucleótidos objetivo. Por tanto, esta técnica de detección hace que no sea necesario realizar un marcaje de los oligonucleótidos objetivo ni aumentar el *footprint* del sensor nanofotónico. Además, la estructura de *band gap* fotónico funcionalizada con MBs posibilita un sobresaliente incremento de su sensibilidad seleccionando adecuadamente sus parámetros estructurales, así como aumentando la densidad de sonda sobre la superficie [HU-14, QIN-16]. Finalmente, los resultados experimentales aquí descritos son prometedores para el desarrollo de chips fotónicos de elevada sensibilidad y altamente multiplexados, cuyo objetivo sea la detección de oligonucleótidos.



Capítulo 4 Influencia del cambio conformacional de sondas MB sobre sensores de onda evanescente

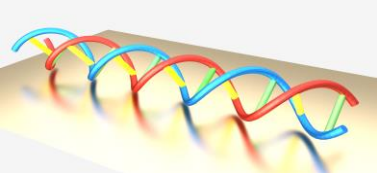
En la literatura se pueden encontrar algunos ejemplos de ensayos homogéneos donde las sondas MB son inmovilizadas sobre un sustrato sólido. En algunos de ellos se trabaja en el rango óptico (fluorescencia [SU-14, MEI-17, GUO-16, DOG-04], *surface enhanced Raman spectroscopy* (SERS) [VAN-11] y *nanotweezers* [KOT-14]) y otros utilizan plataformas electrónicas de detección [WEI-03, LI-15]. Sin embargo, existen muy pocos trabajos donde el cambio conformacional de la sonda MB sea utilizada para cambiar su interacción sobre un elemento de transducción. Normalmente en esos trabajos una partícula/molécula, capaz de interactuar con un transductor electroquímico, se une a la sonda MB. La hibridación promueve el desplazamiento de la partícula/molécula lejos de la superficie del sensor, debido al cambio conformacional de la sonda MB, originando variaciones en la señal eléctrica medida y proporcionando límites de detección muy bajos [LI-15, MIA-14, RAI-12, LI-17]. Estos trabajos demuestran el alto potencial de aprovechar el cambio conformacional de la sonda MB tras la hibridación, cambiando la interacción de una partícula/molécula dada con un elemento de transducción, en vista de desarrollar biosensores de alto rendimiento.

En el caso de biosensores basados en onda evanescente, cuando el oligonucleótido hibrida con el MB, inmovilizado sobre su superficie y marcado con una partícula/molécula, se espera que el cambio conformacional de éste aleje la partícula/molécula de la superficie provocando una variación adicional en la respuesta de detección. Particularizando para las estructuras de *band gap* fotónico, el distanciamiento de la materia de la superficie del sensor origina un decremento del índice de refracción y, por tanto, el PBG se desplaza hacia longitudes de onda inferiores. Cuanto mayor sea el tamaño de la molécula y/o el índice de refracción de la partícula, mayor será ese desplazamiento negativo del PBG, el cual podría incluso llegar a predominar muy considerablemente sobre el desplazamiento positivo del PBG proporcionado por la detección directa de oligonucleótidos. Este hecho supondría una significativa mejora en términos de sensibilidad del biosensor, posibilitando la detección de concentraciones más bajas de oligonucleótidos. Bajo esta premisa, se estudia y analiza la influencia del cambio conformacional de sondas MB, originado tras el bioreconocimiento de oligonucleótidos, en el comportamiento espectral de sensores de *band gap* fotónico de onda evanescente.

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Estructuras de *band gap* fotónico y MBs

Para llevar a cabo este estudio se hace uso del sensor fotónico de onda evanescente descrito en el punto 3.1. Concretamente se recurre a la configuración óptima de las



estructuras de *band gap* fotónico detallada en el punto [3.1.1.](#), sobre cuya superficie son inmovilizadas las sondas MB. Éstas son adaptadas incorporando una biotina cerca de su terminación 3', lo que permite la incorporación de una molécula de estreptavidina al MB mediante el bioreconocimiento biotina-estreptavidina [[BAY-90](#)].

El bioreconocimiento del oligonucleótido objetivo por la sonda MB, marcada con estreptavidina, inducirá un cambio en la respuesta espectral de la estructura de *band gap* fotónico debido a ambos: la hibridación y el cambio conformacional de la sonda MB. Tal y como muestra la Figura 4.1, dicho cambio conformacional alejará la molécula de estreptavidina de la superficie de la estructura de *band gap* fotónico, cuya interacción con la onda evanescente será analizada. Sendas respuestas espectrales proporcionadas por estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas, con sondas MB marcadas y sin marcar con estreptavidina, serán comparadas con objeto de determinar la influencia del desplazamiento de la molécula sobre el comportamiento del sensor fotónico.

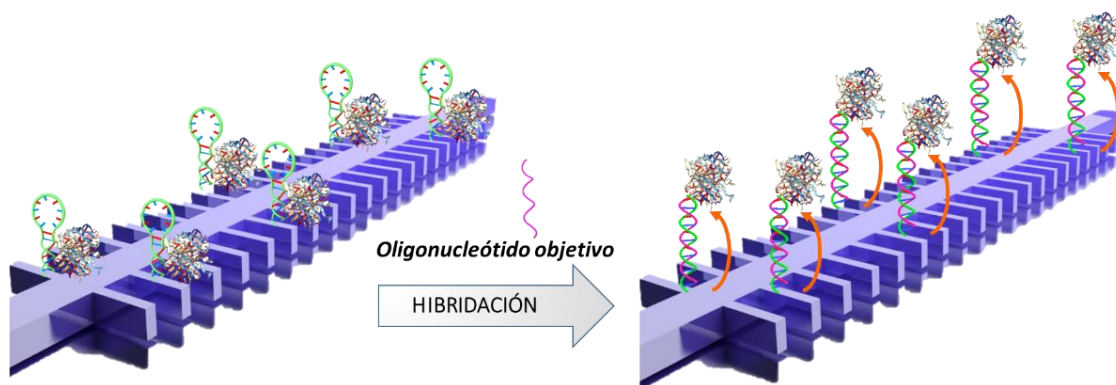


Figura 4.1. Esquema del evento de hibridación de los oligonucleótidos objetivo con las sondas MB inmovilizadas en la superficie de una estructura de *band gap* fotónico.

En un único chip fotónico se incluyen ocho estructuras de *band gap* fotónico con el fin de llevar a cabo la detección multiplexada de oligonucleótidos. Para ello se recurre a la fabricación del chip fotónico diseñado en el punto [3.2.](#)

4.1.2. Proceso de biofuncionalización

4.1.2.1. Secuencias de oligonucleótidos

La Tabla 4.1 muestra la secuencia objetivo del oligonucleótido 35-mer seleccionado para realizar este experimento y la secuencia que define la sonda óptima MB para su detección. Se trata de las mismas secuencias utilizadas previamente en los experimentos de detección de oligonucleótidos y, tal y como se describió en el punto [3.3.1.](#), la secuencia objetivo del oligonucleótido es marcada con un fluoróforo Cy5 (AlexaFluor647) que permita confirmar la hibridación efectiva con la secuencia del MB una vez finalizado el experimento. Sin embargo en esta ocasión, en la secuencia de la sonda MB, * denota una T modificada donde se incorpora una biotina (Eurofins Scientific, Luxemburgo).

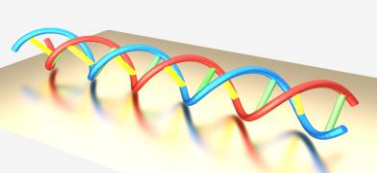


Tabla 4.1. Secuencia del oligonucleótido objetivo 35-mer y secuencia de la sonda MB óptima diseñada para su detección.

	5'	3'	Secuencia (5'-3')
Oligonucleótido objetivo	Cy5		AUCGACUUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGUGUCGAU
MB	SH		ATCGACACCCTATCACGATTAGCATTAAAG*TCGAT

4.1.2.2. Biofuncionalización y marcaje de biotina-estreptavidina en los MBs

Las estructuras de *band gap* fotónico son funcionalizadas y sobre su superficie son inmovilizadas covalentemente las sondas MB tioladas (30 nL, 10 μ M en agua ultrapura). Para ello se recurre de nuevo a la química de acoplo TEC, siguiendo el protocolo de biofuncionalización descrito en el punto [3.3.2](#).

La estreptavidina se une a los MBs depositando una disolución de estreptavidina (5 μ L, 20 ppm en PBS-T (disolución salina con fosfato al 0.5% y *tween* 20)) sobre las estructuras de *band gap* indicadas en la Figura 4.2. Tras incubar el chip fotónico en una cámara húmeda que promueve el enlace estreptavidina-biotina a temperatura ambiente, éste es lavado intensamente con PBS-T y agua para eliminar cualquier estreptavidina unida inespecíficamente a los MBs.

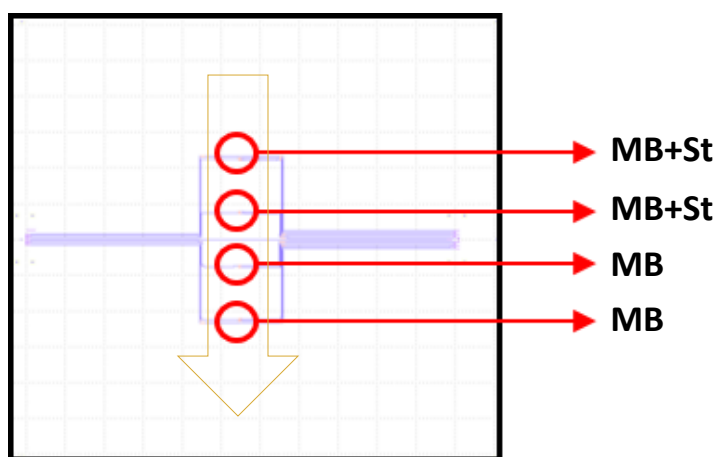
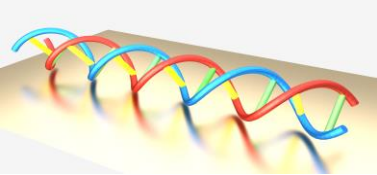


Figura 4.2. Diagrama esquemático de la biofuncionalización del chip fotónico. La flecha amarilla indica el sentido de flujo de los oligonucleótidos objetivo durante el experimento.

4.1.3. Montaje experimental

Para fluir el oligonucleótido objetivo el chip fotónico se ensambla en una celda microfluídica fabricada por microTEC Gesellschaft für Mikrotechnologie mbH (Alemania). Como se puede observar en la Figura 4.3, la celda está formada por un soporte inferior, donde es ensamblado el chip fotónico, y una tapa superior que contiene un canal de caucho de 500 μ m de anchura, 500 μ m de altura y 7,5 mm de longitud. El hecho de que comprenda dos piezas facilita el proceso de alineación del canal microfluídico sobre las estructuras de *band gap* fotónico, ya que está diseñada específicamente con las dimensiones del chip fotónico y



permite su ensamblaje directamente sin necesidad de utilizar ninguna herramienta de alineamiento. Además, como el canal microfluídico es de caucho, el desensamblado de la celda con el chip fotónico resulta muy sencillo de cara a su reutilización. Sin embargo, tras reiterados experimentos, el caucho no se adhiere a la superficie del chip y ocasiona problemas en la difusión del reactivo.

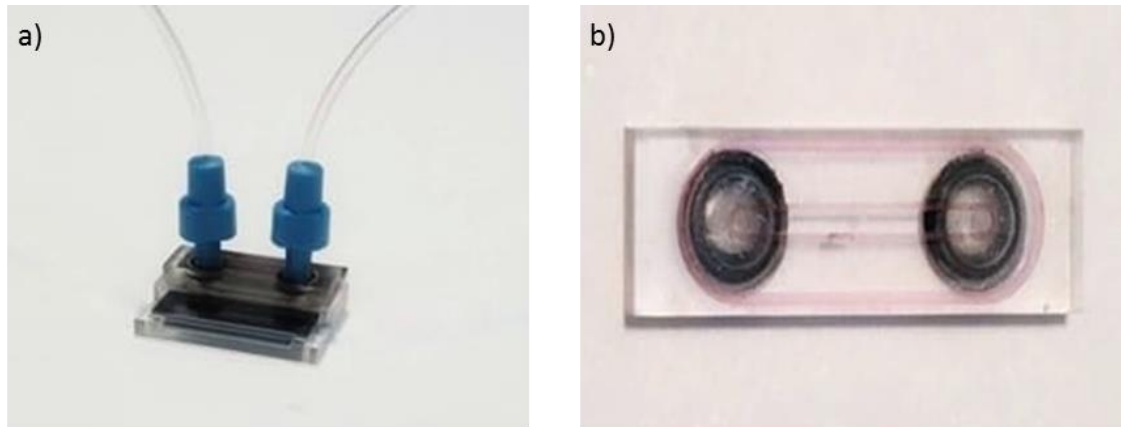


Figura 4.3. a) Ensamblaje de la celda fabricada por microTEC con el chip fotónico. b) Imagen de la tapa superior de la celda, la cual contiene el canal microfluídico de caucho.

La Figura 4.4 muestra el chip fotónico, una vez ensamblado en la celda microfluídica, posicionado en la plataforma de interrogación óptica descrita en el punto [3.4.1](#), capaz de adquirir continuamente el espectro de transmisión de las estructuras de *band gap* fotónico para monitorizar su evolución espectral. Haciendo uso de la bomba de extracción del sistema opto-fluídico, previamente descrito, el oligonucleótido objetivo será fluido a través de unos tubos de silicona a una velocidad constante de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

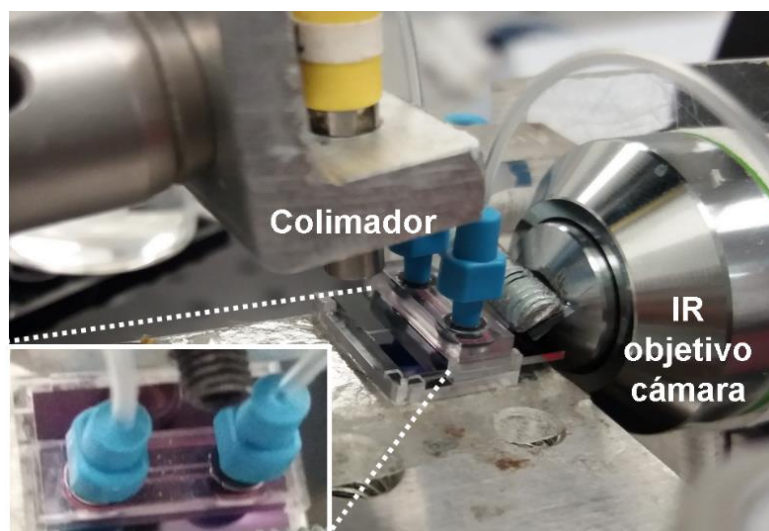
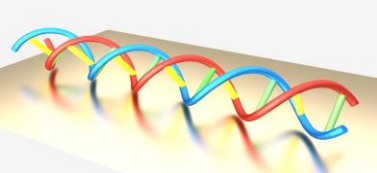


Figura 4.4. Imagen del chip fotónico ensamblado y posicionado en la plataforma de interrogación óptica e imagen detallada del canal microfluídico.



4.2. Resultados experimentales del estudio

4.2.1. Caracterización espectral de los sensores de *band gap* fotónico

Las Figuras 4.5.a) y 4.5.b) muestran los espectros de transmisión proporcionados por cuatro de las ocho estructuras de *band gap* fotónico incluidas en el chip en un flujo de SSC 5X. Éstos han sido normalizados respecto a una guía de referencia. Desafortunadamente, las cuatro estructuras restantes no han transmitido luz durante su interrogación debido a cortes en las guías, probablemente ocasionados por la manipulación del chip fotónico. Sin embargo, los espectros de transmisión muestran un PBG abrupto, con una gran relación de extinción (~ 18 dB), un borde de PBG bien definido y una respuesta óptica menos ruidosa que la obtenida durante el experimento de detección de oligonucleótidos descrito en el capítulo 3, lo que implica una mejor calidad estructural de las estructuras fabricadas.

Los espectros de transmisión mostrados en la Figura 4.5.a) son proporcionados por estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con MBs a los que no se le ha añadido estreptavidina. Dependiendo de la anchura de los elementos transversales de la estructura fotónica, el borde del PBG se encuentra alrededor de 1535 nm (para $w_i=120$ nm) o alrededor de 1560 nm (para $w_i=140$ nm). La Figura 4.5.b) muestra los espectros de transmisión proporcionados por las estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con MBs, a los que se le ha añadido estreptavidina (MB+St). Ambos espectros son proporcionados por estructuras cuya anchura de sus elementos transversales es idéntica, es decir $w_i=140$ nm, y ambos muestran un borde del PBG en torno a 1560 nm. El hecho de que dichos espectros muestren tal similitud entre ellos denota una buena reproducibilidad durante el proceso de fabricación.

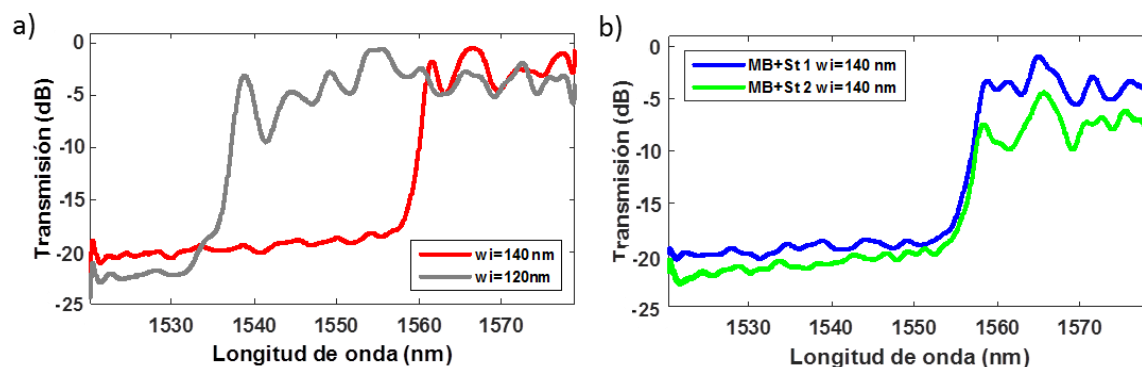
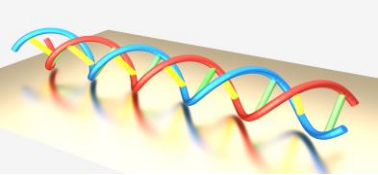


Figura 4.5. Espectros de transmisión en un flujo de SSC 5X proporcionados por estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con sondas MB a) sin estreptavidina; b) con estreptavidina (MB+St).

4.2.2. Seguimiento espectral del *band gap* fotónico

A continuación se representan las respuestas de detección, es decir la evolución espectral experimentada por el borde del PBG, como consecuencia de la hibridación de los oligonucleótidos objetivo con los MBs. En la Figura 4.6.a) se consideran las estructuras de *band gap* fotónico sobre las que se han inmovilizado MBs sin estreptavidina y en la Figura 4.6.b) aquellas cuyos MBs han sido inmovilizados y marcados con estreptavidina. La línea base inicial se obtiene fluyendo un buffer SSC 5X, el cual es empleado como tampón durante todo el



experimento. En $t=14$ minutos se fluye una disolución del oligonucleótido objetivo ($0,5 \mu\text{M}$ en SSC 5X) sobre la superficie de las estructuras de *band gap* fotónico, cuyo reconocimiento de las sondas MB origina el desplazamiento del borde del PBG proporcionado por cada estructura de *band gap* fotónico. Finalmente, en $t=24$ minutos se fluye un ciclo adicional del tampón SSC 5X para eliminar cualquier oligonucleótido no hibridado presente en el medio. Las posiciones del borde del PBG permanecen inalteradas, indicando la efectiva hibridación de los oligonucleótidos objetivo con los MBs.

La Figura 4.6.a) establece una comparativa entre los desplazamientos del borde del PBG proporcionados por las estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con MBs considerando diferentes anchuras de sus elementos transversales. **El valor de dicho desplazamiento es aproximadamente el doble cuando $w_i=140 \text{ nm}$ (1020 pm) con respecto a cuando $w_i=120 \text{ nm}$ (620 pm).** Esto no solo confirma la influencia de los parámetros estructurales sobre la sensibilidad ofrecida por las estructuras, previamente demostrada en el capítulo 3, sino que también indica una adecuada reproducibilidad en la respuesta de detección de las estructuras incluidas en diferentes chips fabricados.

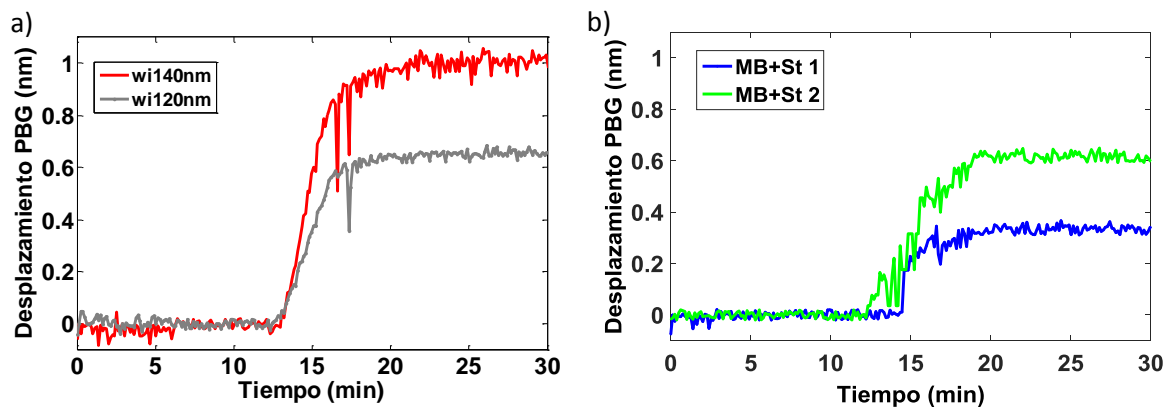


Figura 4.6. Evolución temporal de la posición espectral del borde del PBG proporcionado por las estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con sondas MB a) sin estreptavidina; b) con estreptavidina (MB+St).

Las respuestas de detección proporcionadas por todas las estructuras de *band gap* fotónico, cuyo valor de anchura transversal de sus elementos es 140 nm , son mostradas en la Figura 4.7. En ella se compara la evolución espectral obtenida cuando las estructuras son biofuncionalizadas con sondas MB marcadas y sin marcar con estreptavidina.

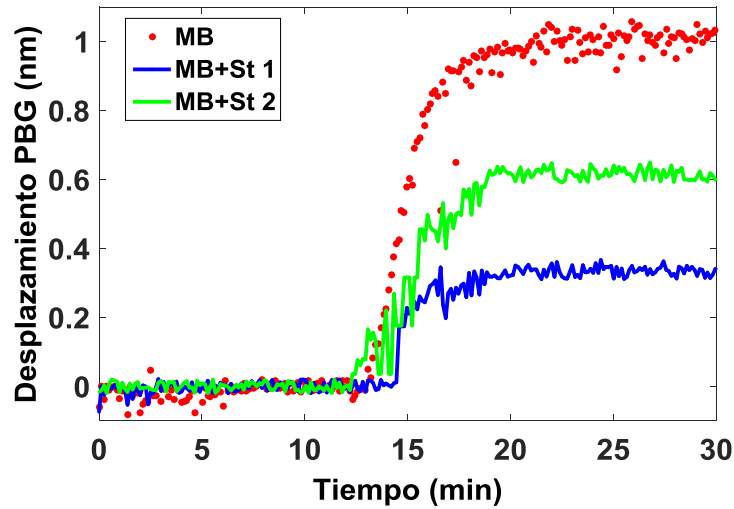


Figura 4.7. Evolución temporal de la posición del borde del PBG proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico con idénticas dimensiones, en cuya superficie se han inmovilizado sondas MB marcadas (MB+St) y sin marcar con estreptavidina.

En la Figura 4.7 se puede observar que los desplazamientos del borde del PBG son muy notables en todos los casos cuando el bioreconocimiento de los oligonucleótidos objetivo tiene lugar (desde aproximadamente 350 pm hasta incluso 1000 pm). Sin embargo, la respuesta de detección es significativamente diferente para las tres estructuras de detección, incluso entre las biofuncionalizadas con sondas MB marcadas con estreptavidina.

4.2.3. Calibración de la sensibilidad del índice de refracción y normalización de medidas

Para determinar si la diferencia entre las respuestas de detección obtenidas se debe a diferencias en el proceso de bioreconocimiento de las sondas MB o a las diferentes sensibilidades ofrecidas por las propias estructuras de *band gap* fotónico, se realiza un ciclo de calibración, considerando diferentes índices de refracción, que permita normalizar las respuestas de detección.

La Figura 4.8 muestra la evolución temporal de la posición espectral del borde del PBG durante el ciclo de calibración. Tras fluir SSC 5X sobre las estructuras de *band gap* fotónico, en t=14 minutos, se fluye agua ultrapura, cuya presencia origina una variación del índice de refracción sobre la superficie de las estructuras y, en consecuencia, el borde del PBG es desplazado espectralmente. En t=24 minutos, el tampón SSC 5X es fluido de nuevo, cuya variación del índice de refracción es detectada una vez más por las estructuras, provocando el retorno del borde del PBG a su posición espectral inicial.

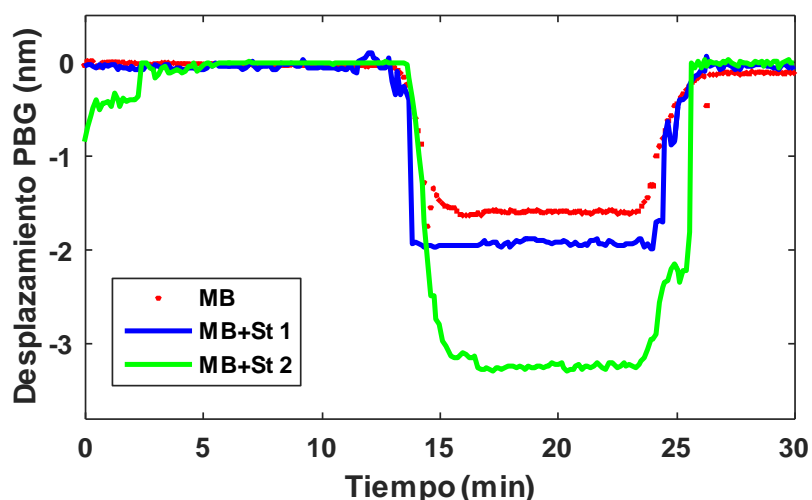
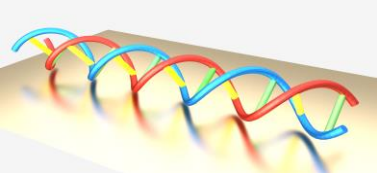


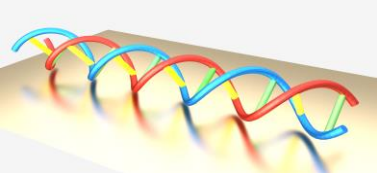
Figura 4.8. Evolución temporal de la posición espectral del borde del PBG proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico ante las variaciones de índice de refracción originadas por el flujo de SSC 5X, agua ultrapura y SSC 5X de nuevo.

La Tabla 4.2 muestra los desplazamientos del borde del PBG proporcionados por las estructuras de *band gap* fotónico tanto en el bioreconocimiento de los oligonucleótidos como en la detección de cambios de índice de refracción. Asimismo son mostrados los **valores normalizados del desplazamiento del borde del PBG en la detección de oligonucleótidos**, los cuales son calculados considerando el valor absoluto del desplazamiento sufrido por el PBG durante el ciclo de calibración.

Dado que el experimento original únicamente arroja resultados experimentales de una estructura de *band gap* fotónico sobre la que se han inmovilizado sondas MB sin estreptavidina, la Tabla 4.2 también incluye los desplazamientos del PBG obtenidos en el capítulo anterior. Estos resultados (MB 1* y MB 2*) son los proporcionados por estructuras de *band gap* fotónico, cuyos parámetros de configuración son idénticos a los de las estructuras bajo análisis. Como se indicó en el punto [4.1.2.1.](#), las secuencias de oligonucleótidos empleadas también fueron las mismas.

Tabla 4.2. Desplazamientos espectrales de PBG medidos en el bioreconocimiento de los oligonucleótidos objetivo y en el ciclo de calibración. La última columna indica los desplazamientos del borde de PBG normalizados para el experimento de detección de los oligonucleótidos objetivo. *Denota los resultados mostrados en el capítulo 3.

	Detección de oligonucleótidos (pm)	Calibración (pm)	Detección de oligonucleótidos normalizada
MB+St 1	345	-1890	0,183
MB+St 2	620	-3230	0,192
MB	1020	-1560	0,654
MB 1*	920	-1390	0,662
MB 2*	1120	-1804	0,621



La Figura 4.9 muestra la respuesta normalizada durante la detección de oligonucleótidos. **Los desplazamientos del borde del PBG normalizados son idénticos para las dos estructuras de detección biofuncionalizadas con sondas MB marcadas con estreptavidina (~0.19).** Por tanto, los diferentes desplazamientos observados previamente en la Figura 4.7 son atribuidos a las diferentes sensibilidades ofrecidas por cada una de las estructuras de detección, probablemente debido a las desviaciones en el proceso de fabricación. Sin embargo, los valores de estos desplazamientos normalizados son significativamente inferiores a los valores normalizados del desplazamiento del borde del PBG proporcionados por las estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con sondas de MB sin estreptavidina (~0,65). Tal diferencia indica **una interacción diferente de la sonda MB con el campo evanescente producido en la superficie de la estructura de *band gap* fotónico al incorporar estreptavidina.**

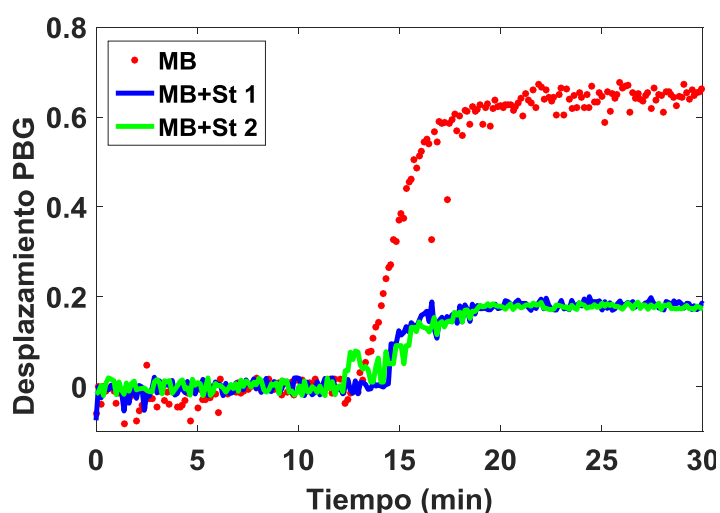


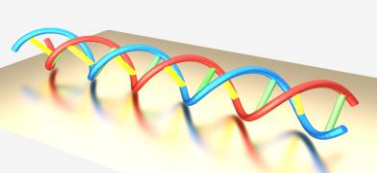
Figura 4.9. Evolución temporal normalizada de la posición del borde del PBG proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico, en cuya superficie se han inmovilizado sondas MB y sondas MB marcadas con estreptavidina (MB+St).

4.2.4. Análisis de los resultados

Los resultados experimentales obtenidos revelan una disminución significativa de la respuesta de detección normalizada (por un factor $\sim 3.5\times$) proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico cuando las sondas MB son o no marcadas con estreptavidina.

A priori, cabe pensar que la estreptavidina pueda obstaculizar el reconocimiento del oligonucleótido objetivo por la sonda MB, conduciendo a un rendimiento de hibridación inferior. Sin embargo, los valores de intensidad de fluorescencia medidos tras la hibridación de los oligonucleótidos objetivo, marcados previamente con fluoróforos, son similares en las posiciones de ambas configuraciones de sondas MB, por lo que se descarta esta hipótesis. Por tanto, **la diferencia observada en la evolución espectral del borde del PBG, considerando ambas configuraciones de sonda MB, es consecuencia del efecto producido sobre la onda evanescente cuando la estreptavidina es alejada de la superficie del sensor.**

Como explica esquemáticamente la Figura 4.10, cuando el oligonucleótido objetivo es reconocido por el MB, éste cambia su conformación adoptando la configuración de doble



hélice y a su vez desplazando la estreptavidina. La eliminación de materia sobre la superficie del sensor produce una disminución del índice de refracción, la cual es detectada por la estructura de *band gap* fotónico desplazando el borde del PBG hacia longitudes de onda inferiores. Sin embargo, tal y como fue descrito en el capítulo anterior, la detección directa del oligonucleótido objetivo, mediante la combinación de estas estructuras de detección y las sondas MB inmovilizadas en su superficie (sin estreptavidina), proporciona desplazamientos positivos del borde del PBG tan elevados que la magnitud de ese desplazamiento en retroceso es considerablemente menor. Como resultado de la combinación de ambos efectos sobre la onda evanescente, es decir, la detección directa del oligonucleótido y el desplazamiento de la estreptavidina, se observa un desplazamiento neto positivo del borde del PBG cuando el bioreconocimiento del oligonucleótido tiene lugar mediante las sondas MB marcadas con estreptavidina, el cual es menor al caso en el que se utiliza el MB sin marcar.

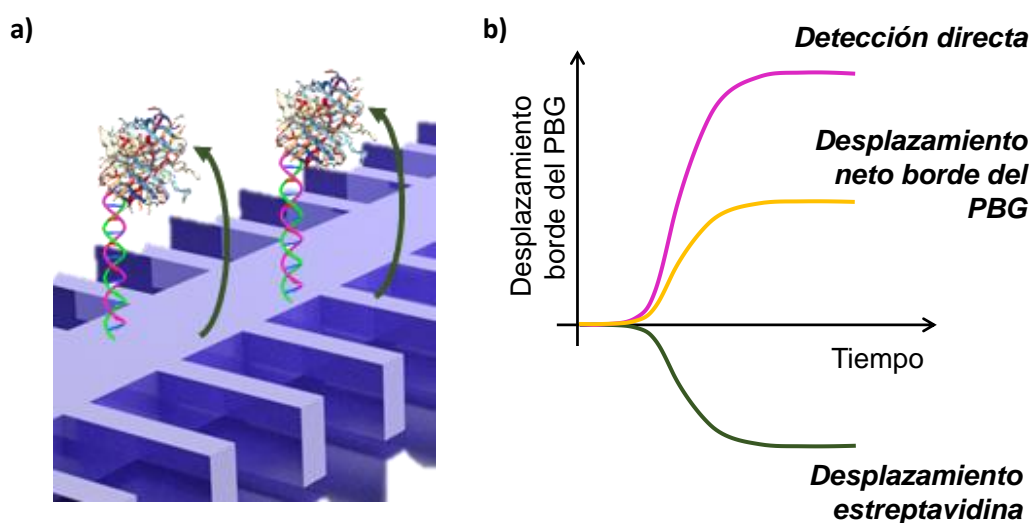
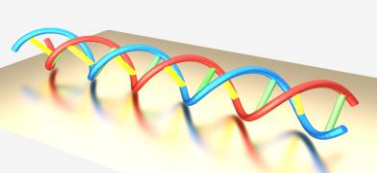


Figura 4.10. a) Representación esquemática del desplazamiento sufrido por la estreptavidina desde la superficie de la estructura de *band gap* fotónico cuando la sonda MB cambia su conformación debido a la hibridación con el oligonucleótido objetivo. b) Representación esquemática de la respuesta de detección del sensor de onda evanescente cuando es biofuncionalizado con sondas MB marcadas con estreptavidina.

4.3. Conclusiones

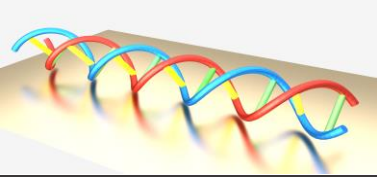
En este trabajo, se estudia y observa experimentalmente por primera vez la influencia de los cambios conformacionales de las sondas MB sobre sensores fotónicos de onda evanescente. Al marcar las sondas de MB con una molécula, es posible obtener una respuesta de detección como combinación del evento de detección directa del oligonucleótido objetivo y el desplazamiento de esa molécula producido por el cambio conformacional del MB que la aleja de la superficie del sensor. En este estudio experimental, el desplazamiento neto obtenido del borde del PBG supone una reducción de la respuesta de detección en comparación con la detección directa del oligonucleótido objetivo (es decir, cuando no se usa ninguna molécula). Sin embargo, la selección adecuada de la molécula/partícula añadida al MB (por ejemplo, una molécula de mayor tamaño o una nanopartícula de alto índice de refracción) podría inducir un mayor desplazamiento en retroceso del borde del PBG, que domine



significativamente el proceso de detección, y en definitiva, una amplificación de la respuesta de detección de la estructura de *band gap* fotónico.

Otra posible aplicación potencial de este efecto consiste en mejorar la sensibilidad en la detección de objetivos de muy bajo peso molecular, por ejemplo pesticidas o antibióticos, cuya detección directa proporciona un desplazamiento espectral extremadamente bajo. En este caso el MB sería reemplazado por un aptámero, al que se le uniría una molécula/partícula. El cambio conformacional originado al reconocer el objetivo alejaría la molécula/partícula de la superficie del sensor promoviendo un desplazamiento en retroceso dominante del borde del PBG y, en consecuencia, un desplazamiento neto negativo significativamente mayor que el de la detección directa del objetivo.

Además, este efecto podría ser ampliamente explotado mediante un diseño adecuado del sensor nanofotónico de onda evanescente. En él se excitarían varios modos ópticos con diferente perfil del campo evanescente, permitiendo interactuar de manera diferente con el oligonucleótido objetivo hibridado y con la molécula/nanopartícula desplazada [\[HUE-16\]](#).



Capítulo 5 Detección de biomarcadores de cáncer miRNA y regeneración en línea

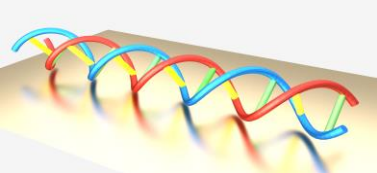
Tal y como se describió en el capítulo 1, el uso de biomarcadores miRNA resulta un método útil y fiable para el diagnóstico de cáncer (y otras enfermedades), permitiendo incluso distinguir entre diferentes variedades moleculares y genéticas de tumores dentro de un mismo tipo de cáncer. Por tanto, la detección de biomarcadores miRNA permitirá el diagnóstico rápido y precoz de cáncer con gran precisión y con el consiguiente impacto en el manejo clínico, reduciendo el coste de los tratamientos y aumentando la tasa de supervivencia.

En vista del papel de los miRNAs como biomarcadores de diagnóstico médico y su estabilidad en sangre, el IVO identificó candidatos miRNA para ser implementados como biomarcadores dentro del dispositivo biosensor SAPHELY, distinguiendo entre las cuatro tipologías de cáncer con mayor tasa de incidencia en la sociedad mundial: colon, mama, pulmón y próstata. Estos biomarcadores miRNA están recogidos en la Tabla 5.1. Asimismo, la UEA diseñó sondas MB óptimas para hibridar con cada uno de ellos. Por tanto, en este capítulo se aborda la detección de biomarcadores de cáncer miRNA haciendo uso de los biosensores de *band gap* fotónico desarrollados en este trabajo de Tesis Doctoral. Además, se describe el proceso de optimización llevado a cabo en el diseño y fabricación de los chips fotónicos con el que se pretende mejorar su robustez y, por consiguiente, la calidad de la señal proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico.

Tabla 5.1. Candidatos biomarcadores miRNA identificados para los tipos de cáncer con mayor tasa de incidencia en la sociedad mundial.

Tipo de tumor	Candidatos biomarcadores miRNA
Colon	miR-21, miR-29a, miR-92a, miR-155, miR-200c, miR-210, miR-221
Mama	miR-21, miR-92a, miR-155, miR-205
Pulmón	miR-21, miR-34b, miR-125b, miR-200b, miR-203, miR-205, miR-429
Próstata	miR-21, miR-125b, miR-141, miR-182, miR-375

Por otro lado, el desarrollo óptimo de biosensores hasta su aplicación real es una tarea costosa y que requiere mucho tiempo, ya que, más allá de su diseño, fabricación y biofuncionalización, precisa de la realización de una enorme cantidad de experimentos. Por tanto, la posibilidad de reutilizar los biosensores es altamente deseable. Bajo esta premisa, se han desarrollado diferentes estrategias de regeneración [LEA-15, GOO-15, JOS-18]. Sin embargo, la mayoría de los protocolos de regeneración requieren retirar el transductor del sistema experimental y volver a montarlo en el sistema tras la regeneración.



En este capítulo se describe también una estrategia que posibilita la reutilización de los biosensores desarrollados a lo largo de este trabajo, sin retirarlos del montaje experimental. Particularmente se trata de una estrategia de regeneración química de sensores nanofotónicos para su uso en la detección de miRNAs. Esta estrategia tiene como objetivo realizar una llamada regeneración en línea que no solo permite ahorrar tiempo sino que también reduce la variación entre las medidas obtenidas en experimentos diferentes, siendo especialmente útil cuando se testean niveles similares de analito.

5.1. Optimización del diseño y fabricación del chip fotónico

5.1.1. Problemática

Tras la realización de numerosos experimentos de detección de miRNAs usando el chip fotónico diseñado en el punto [3.2.](#), se detectan una serie de problemas que limitan el rendimiento de los experimentos de detección e impiden la reutilización del chip fotónico. En general, los espectros de transmisión proporcionados por las estructuras de *band gap* fotónico son muy ruidosos e incluso en ocasiones algunas estructuras no han podido ser caracterizadas experimentalmente debido a la ausencia de señal a su salida.

Mediante una exhaustiva inspección física de los chips fotónicos se detectan numerosos cortes/roturas en las guías de onda contenidas en el chip, como se puede observar en la Figura 5.1. Típicamente estos cortes se producen en las guías monomodo, cuya anchura es de 460 nm, pero no en aquellas secciones implementadas con guías multimodo (con una anchura de 2,5 μm). Resulta complicado determinar con exactitud el origen de estos cortes, pero probablemente estén relacionados con el almacenamiento y manipulación de los chips fotónicos. Hay que tener en cuenta que éstos son sometidos a cambios de temperatura, más allá incluso de los ocasionados durante el propio proceso de biofuncionalización. Generalmente se almacenan a temperatura ambiente, pero cuando están biofuncionalizados se conservan en frío. Además, la manipulación del chip fotónico resulta inevitable para la realización de experimentos de detección de miRNAs, sobre todo durante el ensamblado del chip en la celda microfluídica.

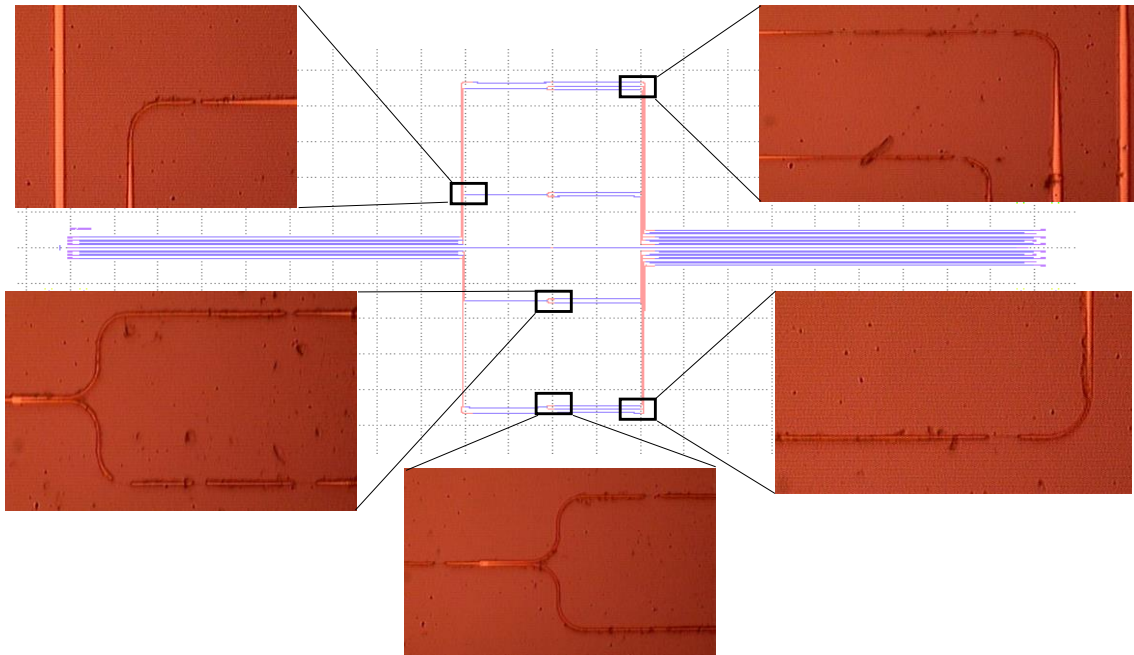


Figura 5.1. Imágenes tomadas con el microscopio óptico que muestran los cortes/roturas producidos en las guías monomodo. Las guías monomodo y multimodo son representadas en rojo y azul en el diseño GDS, respectivamente.

5.1.2. Rediseño del chip fotónico

La primera medida adoptada para evitar este tipo de problemas consiste en la modificación del diseño del chip fotónico. Para ello se sustituyen las guías monomodo por guías multimodo en todas aquellas secciones donde los requerimientos de diseño y fabricación lo permiten. Como muestra la Figura 5.2, algunas secciones no pueden ser sustituidas, tales como curvas, accesos a MMIs o las propias estructuras de *band gap* fotónico. El objetivo es reducir la cantidad de guías monomodo contenidas en el chip tanto como sea posible y así minimizar la probabilidad de que se originen cortes/roturas.

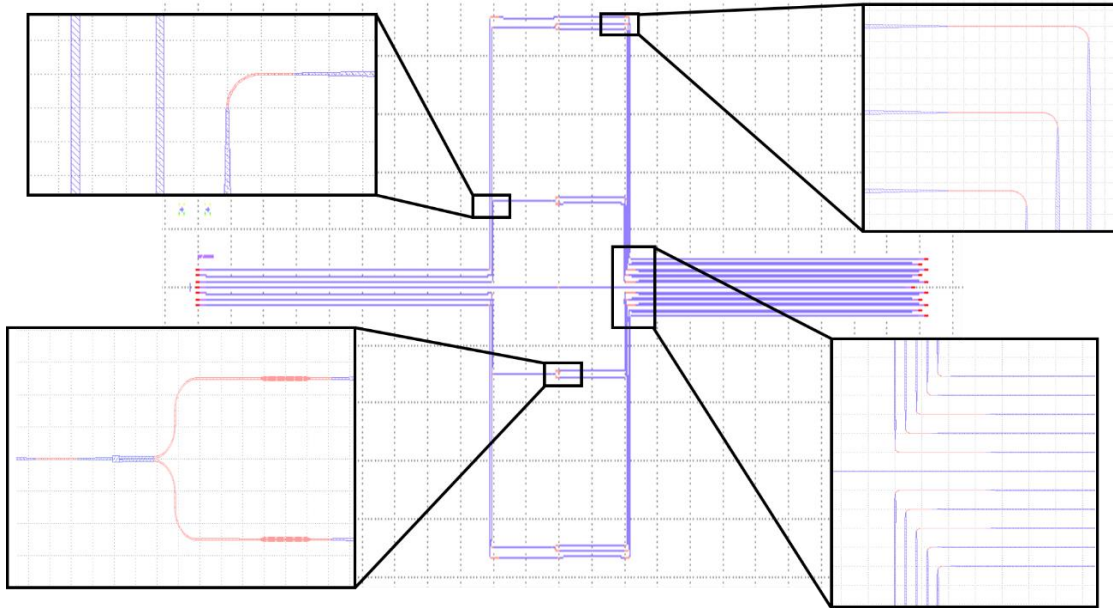


Figura 5.2. Imágenes de las guías monomodo contenidas en el diseño GDS del chip fotónico usado para su fabricación.

La segunda medida adoptada para aumentar la robustez de los chips fotónicos consiste en depositar sobre su superficie un revestimiento protector de SiO_2 con un espesor de 400 nm. Este revestimiento superior proporcionará una completa protección de las estructuras fotónicas contenidas en el chip frente a posibles factores externos. Sin embargo, será necesario eliminar esta capa de SiO_2 en las posiciones donde se colocan las estructuras de detección de *band gap* fotónico, pues han de estar accesibles para su biofuncionalización y posteriormente llevar a cabo el proceso de detección de miRNAs. Por tanto, mediante un proceso fotolitográfico, se abre una ventana en forma de canal sobre todas las estructuras de *band gap* fotónico. Para ello se deposita sobre el chip una capa de fotoresina, de aproximadamente 1 μm de espesor, mediante un proceso de *spin coating*. Se trata de una resina positiva AZ-MIR701, la cual se expone con un *mask aligner* con luz UV (375 nm). Una máscara de plástico (con zonas negras y otras transparentes) deja pasar la luz exclusivamente en las zonas donde la capa de SiO_2 quiere ser eliminada. Una vez revelada la capa de resina, se abren las ventanas y se transfieren a la capa de SiO_2 a través de un ataque inductivo de plasma (ICP).

La Figura 5.3 muestra el nuevo diseño GDS usado para la fabricación de los chips fotónicos. En él se modifican también los grupos de estructuras de *band gap* fotónico: en lugar de dos estructuras periódicas en cada grupo, se disponen cuatro estructuras con valores de $w_i=80, 100, 120$ y 140 nm, garantizando más posiciones espectrales proporcionadas por el borde del PBG. Para ello, se introduce un nivel adicional de MMIs para cada grupo de sensores. Como se puede observar, los MMIs son desplazados lejos de la posición donde se encuentran las estructuras de *band gap* fotónico con el objetivo de que permanezcan cubiertos de SiO_2 cuando se abra la ventana, la cual es representada esquemáticamente sobre las estructuras de *band gap* fotónico.

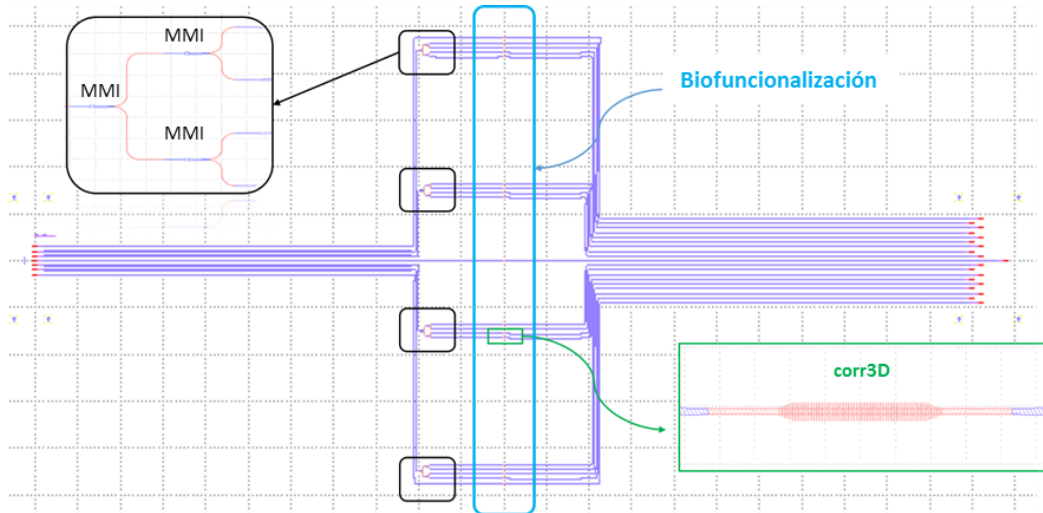


Figura 5.3. Nuevo diseño GDS usado para la fabricación del chip fotónico, sobre el que se deposita un revestimiento superior de SiO_2 . El rectángulo azul muestra el área sobre las estructuras de *band gap* fotónico, cuya capa de SiO_2 será eliminada.

La Figura 5.4.a) muestra el diseño de una máscara de “fabricación casera” creada con una impresora comercial para la apertura de las ventanas sobre las estructuras de sensado. Este diseño en forma de canal a priori es fácil tanto de fabricar como de alinear con las estructuras de *band gap* fotónico contenidas en el chip. Sin embargo, elimina una gran área del revestimiento de SiO_2 y su diseño podría influir en el flujo del líquido sobre las estructuras de *band gap* fotónico. La Figura 5.4.b) muestra una imagen del canal creado en la capa de SiO_2 usando la máscara de “fabricación casera”. El canal está correctamente abierto, pero sus paredes son muy rugosas y las estructuras de *band gap* fotónico no están perfectamente posicionadas en el centro del canal. Cabe destacar que las imágenes corresponden a una fabricación preliminar del chip fotónico y su inclusión en este trabajo pretende mostrar el aspecto de los chip fotónicos utilizados en este capítulo. No obstante, en lo sucesivo se empleó una máscara de mayor calidad que permitió la apertura de ventanas cuyas paredes quedaron mejor definidas y las estructuras de *band gap* fotónico se posicionaron más centradas en el canal.

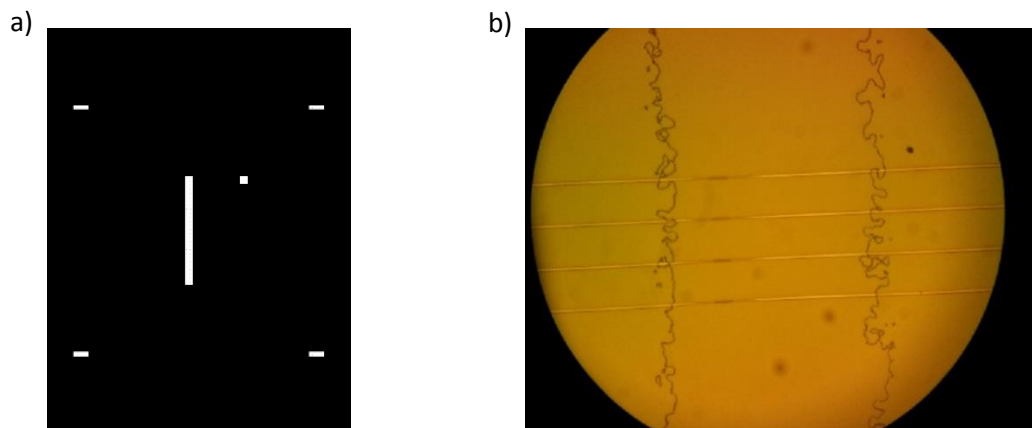
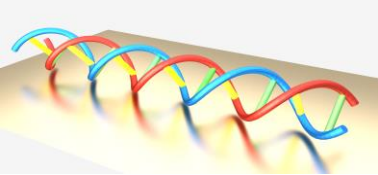


Figura 5.4. a) Diseño de “fabricación casera” de la máscara para abrir ventanas sobre el recubrimiento superior de SiO_2 del chip fotónico. b) Imagen tomada con el microscopio después de abrir la ventana sobre las estructuras de *band gap* fotónico contenidas en el chip.



5.2. Detección de biomarcadores de cáncer miRNA

El miRNA-21 es un biomarcador presente en la mayoría de tumores y cuya desregulación está asociada a las cuatro variedades de cáncer con mayor tasa de incidencia en la población, tal y como se puede observar en la Tabla 5.1. A nivel mundial se traduce al año en alrededor de 5,9 millones de casos y 2,4 millones de muertes a causa de cáncer de mama, próstata, pulmón y colorrectal [GCO]. Por tanto, el objetivo de este punto consiste en la detección de biomarcadores miRNA-21 mediante la combinación de la ingeniería de MBs y estructuras de *band gap* fotónico, cuyo concepto de sensor fue presentado en el punto 3.1.

5.2.1. Proceso de biofuncionalización

En esta ocasión, las sondas MB son inmovilizadas sobre la superficie del sensor usando la técnica LAMI [NEV-06], tecnología desarrollada por la AAU.

5.2.1.1. Secuencias de oligonucleótidos

El miRNA-21 es un oligonucleótido constituido por 22 nucleótidos, cuya secuencia es: 5'-3' UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A (Eurofins Genomic). Para realizar los experimentos, se prepara en una disolución de SSC 2,5X y se incluye un marcador fluorescente Cy5 (AlexaFluor647) en 5' que permita confirmar su efectiva hibridación con la secuencia del MB una vez finalizado el experimento. La Figura 5.5 muestra la sonda óptima MB que la UEA ha diseñado para para la detección del miRNA-21. Como se puede observar, la secuencia del miRNA-21 es totalmente complementaria a la secuencia contenida en la región *loop* del MB.

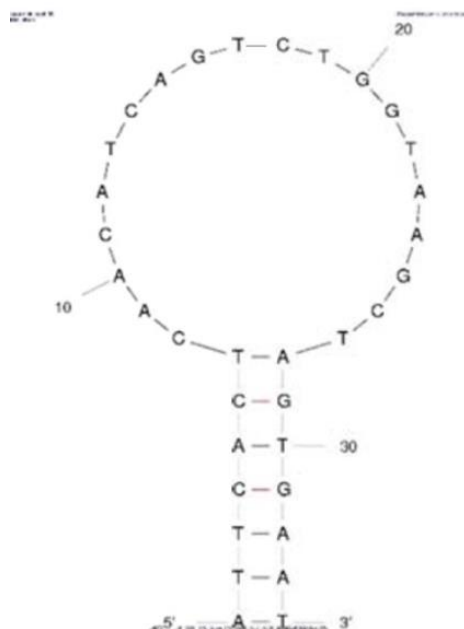
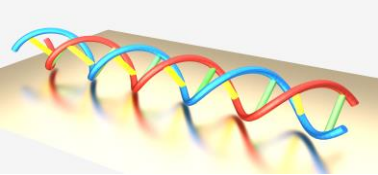


Figura 5.5. Configuración óptima de la sonda MB diseñada para la detección del biomarcador miRNA-21.



5.2.1.2. Funcionalización LAMI

LAMI es una tecnología fotónica que permite inmovilizar covalentemente biomoléculas sobre superficies tioladas con una resolución espacial micrométrica e incluso sub-micrométrica [SKO-09, PAR-11]. Al igual que la técnica de biofuncionalización TEC, expuesta en el punto 3.3.2., LAMI presenta algunas ventajas sobre otras técnicas de inmovilización [JON-08, WIL-02], ya que no requiere pasos químicos o térmicos previos para lograr la inmovilización orientada espacialmente de biomoléculas.

La tecnología LAMI explota una propiedad natural inherente de las proteínas y los péptidos que tiene lugar cuando un residuo aromático se localiza espacialmente próximo a un puente de disulfuro [NEV-02, NEV-06]. La excitación de la cadena lateral del residuo aromático induce la expulsión de electrones que reaccionan con el disulfuro cercano creando grupos tioles libres que unirán covalentemente péptidos/proteínas a superficies tioladas mediante la formación de enlaces disulfuro.

La Figura 5.6 representa esquemáticamente la tecnología LAMI empleada para el bioconocimiento del miRNA-21. El MB se une a un péptido que contiene un triptófano (residuo aromático) cerca de un puente de disulfuro (KAMHAWGCGGGC-NH₂). El puente disulfuro en el péptido se rompe con la excitación del triptófano permitiendo la unión covalente del MB a los grupos tiol libres presentes en la superficie SOI del biosensor. Hay que tener en cuenta que dicha superficie es previamente modificada químicamente mediante silanización de acuerdo con un método desarrollado y optimizado por la AAU [NEV-06].

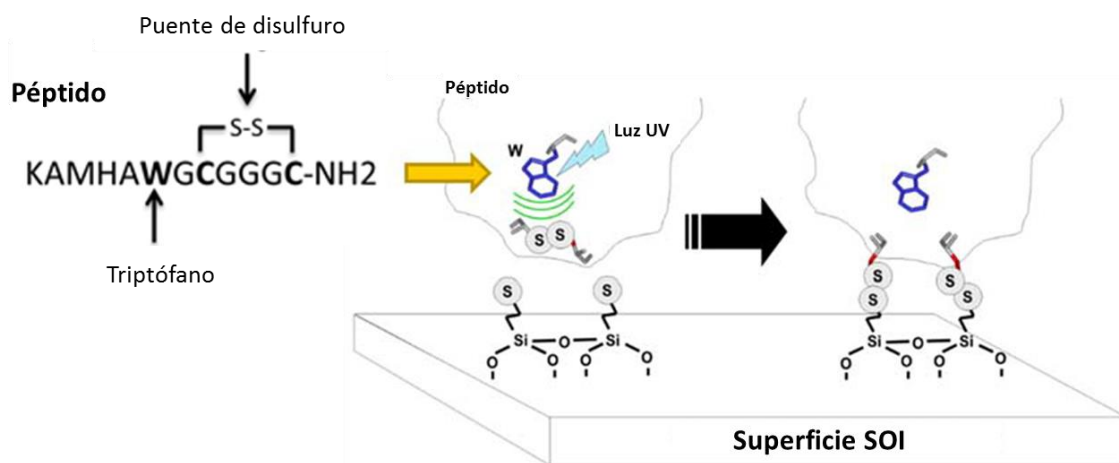


Figura 5.6. Representación esquemática de la tecnología LAMI empleada para el bioconocimiento del biomarcador miRNA-21.

Las construcciones MB+péptido son proporcionadas por Biosynthesis (Texas, USA) en forma liofilizada y se suspenden en PBS 1X en una concentración de 10 μ M. Las disoluciones se dividen en alícuotas y se almacenan a -20 $^{\circ}$ C hasta su uso. Las sales para hacer PBS (cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato de sodio dibásico heptahidratado y fosfato de potasio monobásico) son suministradas por Sigma-Aldrich (Missouri, USA).

La inmovilización de MBs sobre la superficie SOI tiolada se lleva a cabo en la AAU haciendo uso de un *setup* de iluminación [GONÇ-17], cuya metodología está representada esquemáticamente en la Figura 5.7. En primer lugar se deposita una gota de la disolución (1 μ L)

sobre la superficie y se deja secar a temperatura ambiente. Posteriormente se radia la muestra a 280 nm con la luz procedente de un láser, la cual es enfocada a través de un objetivo UV 40X. Finalmente los MBs son inmovilizados sobre la superficie con una orientación espacial uniforme.

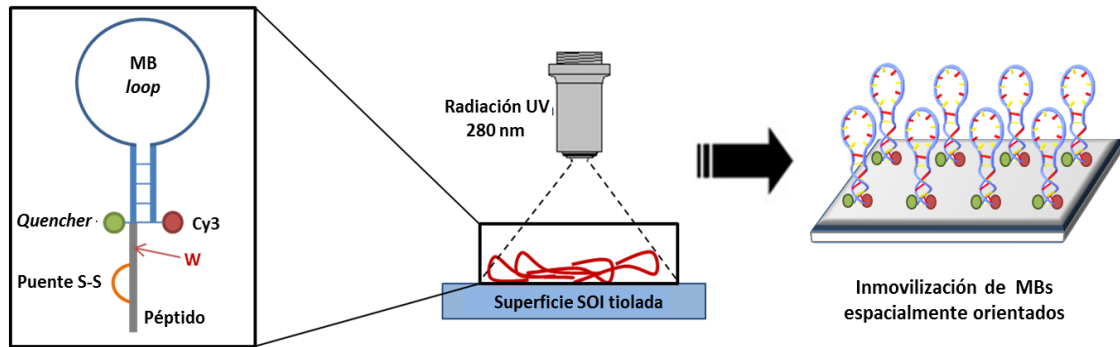


Figura 5.7. Representación esquemática del proceso de iluminación aplicado en la tecnología LAMI.

Como se puede observar en la Figura 5.7, el MB está marcado con un quencher (DABCYL) y un fluoróforo Cy3 (543 nm), lo que permite realizar un análisis de CFM. La Figura 5.8.a) muestra parte de un patrón de líneas inmovilizadas de MBs (50 líneas con 50 μm de separación), a una velocidad de 100 $\mu\text{m}/\text{s}$ y una potencia de 40 μW . La Figura 5.8.b) representa el promedio del perfil de intensidad de la emisión de fluorescencia obtenida en la Figura 5.8.a). A la vista de los resultados, los MBs son inmovilizados con éxito sobre la superficie tiolada SOI. La distribución general de la intensidad de la emisión de fluorescencia de los patrones inmovilizados es homogénea. Los picos son abruptos y bien definidos con una distribución periódica, correlacionada con el patrón de línea definido.

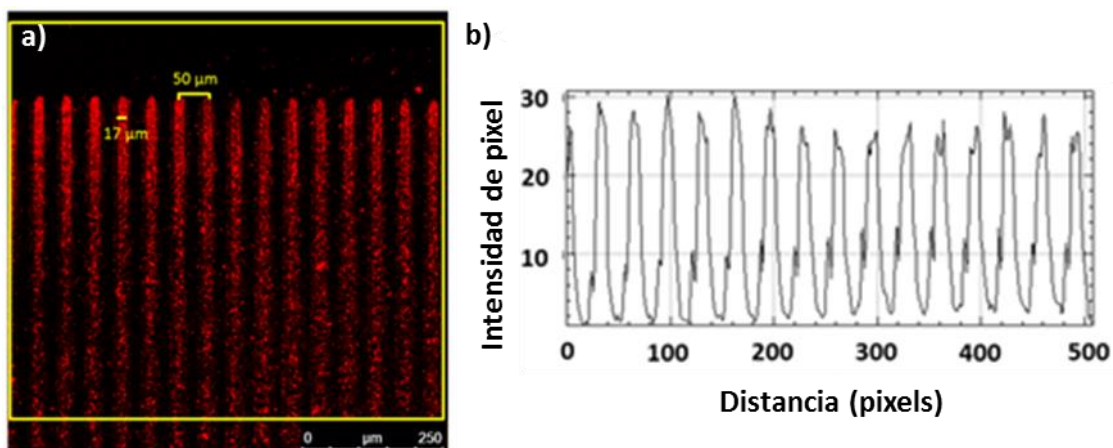
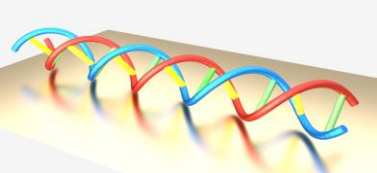


Figura 5.8. a) Imagen CFM de la fluorescencia Cy3 emitida de acuerdo al patrón de línea de iluminación definido. b) Promedio de la intensidad de emisión de fluorescencia.



Según el diagrama esquemático de biofuncionalización mostrado en la Figura 5.9, se inmovilizan los MBs sobre la superficie tiolada de los grupos 1 y 2 de estructuras de *band gap* fotónico incluidas en el chip optimizado, descrito en el punto 5.1.2. Para ello se deposita una gota de la disolución de MBs en PBS (10 μ M) sobre cada grupo y se deja secar a temperatura ambiente. Más tarde se ajusta la distancia entre el objetivo y la superficie del chip fotónico hasta que el área de la muestra está totalmente cubierta por la luz UV. Finalmente se ilumina continuamente durante 60 minutos a 280 nm. Después de la iluminación, se sumerge el chip en PBS 1X (0,1% *tween* 20) durante una noche, se enjuaga con PBS 1X y se seca con aire comprimido. Sobre los grupos 3 y 4 de estructuras de *band gap* fotónico no se inmovilizan MBs, por lo que se usarán de control.

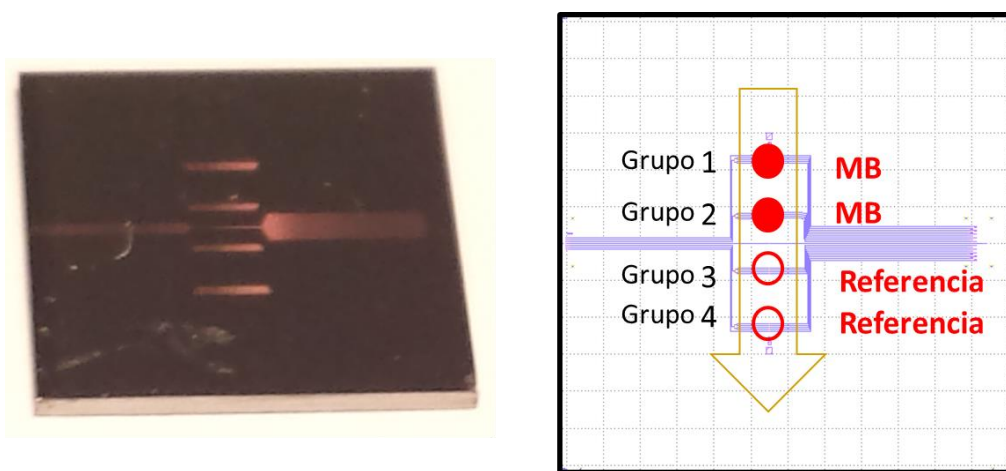


Figura 5.9. Izquierda: Imagen del chip fotónico optimizado fabricado en tecnología SOI que contiene estructuras de *band gap* fotónico. Derecha: Diagrama esquemático de la biofuncionalización del chip fotónico. La flecha amarilla indica el sentido de flujo de los biomarcadores miRNA-21 durante el experimento.

5.2.2. Resultados experimentales

Una vez el chip fotónico es biofuncionalizado, éste es ensamblado en una celda de flujo de PDMS cuyo canal microfluídico tiene una anchura de 400 μ m y una altura de 50 μ m. Tanto la celda microfluídica como el procedimiento de ensamblaje fueron descritos detalladamente en el punto 3.4.2. Asimismo el punto 3.4.1. describe el *setup* opto-fluídico que permite adquirir continuamente la respuesta espectral de las estructuras de *band gap* fotónico, el cual es utilizado para llevar a cabo los experimentos de detección de biomarcadores miRNA-21. La adquisición de la respuesta espectral se configura en un rango comprendido entre 1520 nm y 1630 nm con una velocidad de barrido de 10 nm/s y una resolución espectral de 20 pm. La bomba de extracción se configura para que los biomarcadores miRNA-21 sean fluidos sobre las estructuras de *band gap* fotónico a una velocidad constante de 20 μ l/min.

A pesar de que el diseño optimizado del chip fotónico incluye en cada grupo cuatro estructuras de *band gap* fotónico con diferentes valores de w_i , el rango espectral configurado en la plataforma de interrogación solo permite caracterizar simultáneamente la respuesta espectral de los sensores cuyo parámetro w_i es 120 nm y 140 nm. Por ello, en lo sucesivo se abandona la nomenclatura “grupos” de sensores y se hace referencia a las “parejas” de estructuras de *band gap* fotónico, respetando las posiciones indicadas en la Figura 5.9.

5.2.2.1. Caracterización espectral de los sensores de *band gap* fotónico.

Las Figuras 5.10 y 5.11 muestran los espectros de transmisión proporcionados por las estructuras de *band gap* fotónico incluidas en el chip: estructuras biofuncionalizadas con sondas MB (parejas 1 y 2) y estructuras usadas de control (parejas 3 y 4) respectivamente. Las respuestas espectrales se adquieren en un flujo de SSC 2,5X y su representación está normalizada respecto a una guía de referencia.

Dependiendo de la dimensión de los elementos transversales el borde del PBG está ubicado en una longitud de onda diferente:

- Entre 1530 nm y 1540 nm para $w_i=120$ nm (representado en color azul).
- Entre 1555 nm y 1575 nm para $w_i=140$ nm (representado en color rojo).

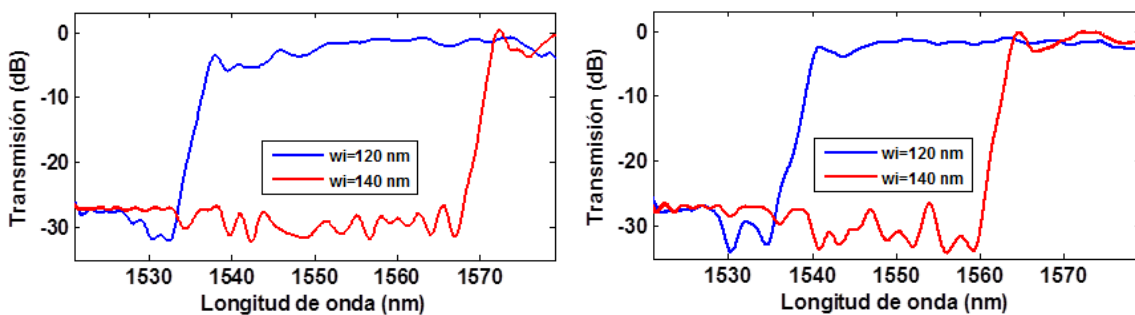


Figura 5.10. Espectro de transmisión proporcionado por la pareja 1 (izquierda) y pareja 2 (derecha) de estructuras de *band gap* fotónico funcionalizadas con MBs. Los colores azul y rojo representan anchuras de los elementos transversales $w_i=120$ nm y $w_i=140$ nm respectivamente.

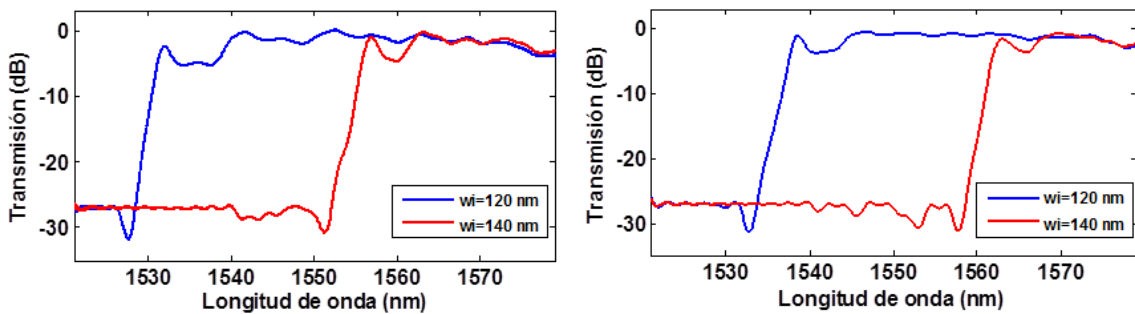
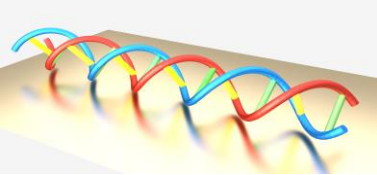


Figura 5.11. Espectro de transmisión proporcionado por la pareja 3 (izquierda) y la pareja 4 (derecha) de estructuras de *band gap* fotónico usadas de control. Los colores azul y rojo representan anchuras de los elementos transversales $w_i=120$ nm y $w_i=140$ nm respectivamente.

Tras la visualización de los espectros de transmisión se puede comprobar la significativa mejora en la calidad de la señal de la respuesta espectral de las estructuras de *band gap* fotónico, siendo uno de los objetivos establecidos en esta etapa de optimización. El PBG es muy abrupto, está claramente definido en el espectro y presenta una gran relación de extinción, cuyo valor (~ 28 dB) es incluso mayor al obtenido en la fase de simulación. Tanto el ruido como el rizado de la banda de transmisión son prácticamente despreciables. Esta mejora se debe a una fabricación del chip fotónico de mejor calidad, la cual ha sido posible tras la



inclusión en su diseño de las modificaciones expuestas en el punto 5.1.2. y el uso de un recubrimiento superior de SiO₂. Además, esta optimización posibilita la reutilización de los chips fotónicos. De hecho, nótese que los espectros mostrados en las Figuras 5.10 y 5.11 son los proporcionados por estructuras de *band gap* fotónico incluidas en un chip reutilizado. Concretamente es la 4ª vez que se biofuncionaliza habiendo limpiado previamente los residuos orgánicos del sustrato con una solución piraña.

5.2.2.2. Seguimiento espectral del *band gap* fotónico

La Figura 5.12 muestra la evolución espectral del borde del PBG proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico durante el experimento de detección de biomarcadores miRNA-21. En la Figura 5.12.a) se considera la pareja 1 de sensores incluidos en el chip fotónico (curvas de color verde y magenta), mientras que en la Figura 5.12.b) se considera la pareja 2 del mismo (curvas de color rojo y azul). En ellas se distinguen las respuestas de detección ofrecidas por estructuras con diferentes anchos transversales ($w_i=120$ nm y $w_i=140$ nm). Ambas parejas de sensores han sido biofuncionalizadas con sondas MB. La curva de color gris, común a ambas gráficas, representa un ejemplo de la respuesta de detección experimentada por una estructura de *band gap* fotónico sobre la que no se han inmovilizado MBs y, por tanto, se usa de control.

En primer lugar, se fluye durante 10 minutos un tampón de SSC 2,5X sobre las estructuras de *band gap* fotónico, obteniéndose la línea base inicial. Durante los 10 minutos posteriores se fluye una disolución en SSC 2,5X de 0,5 μ M de miRNA-21. Por último, el tampón SSC 2,5X se fluye de nuevo con objeto de eliminar cualquier miRNA-21 no hibridado presente en el medio.

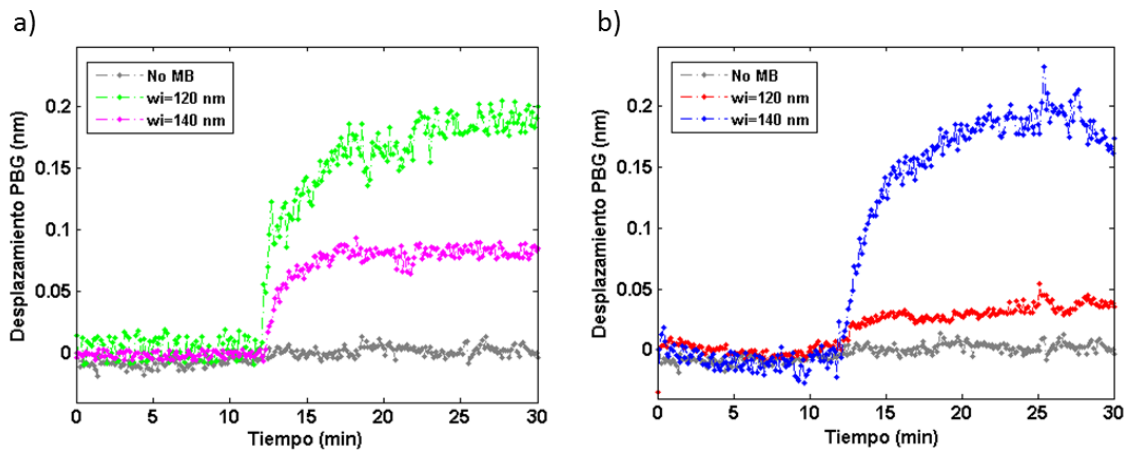
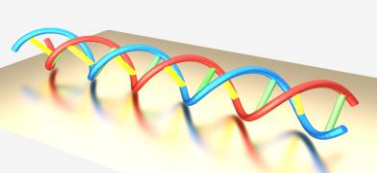


Figura 5.12. Evolución espectral de la posición del borde del PBG proporcionada por cada pareja de estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con MBs y por una estructura de control (representada en color gris). a) Pareja 1. b) Pareja 2.

En la Figura 5.12 se puede observar un significativo desplazamiento del borde del PBG cuando el miRNA-21 es fluido sobre las estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con MBs. Éste mantiene su posición espectral cuando se fluye el ciclo adicional del tampón SSC 2,5X, lo cual denota la hibridación entre las secuencias del miRNA-21 y del MB y, por tanto, el efectivo bioreconocimiento del miRNA-21. Por contra, la posición del PBG proporcionado por



las estructuras de *band gap* fotónico usadas de control permanece inalterado a lo largo de todo el experimento, lo que conduce a descartar la presencia de biomarcadores miRNA-21 sobre su superficie.

Los valores obtenidos de los desplazamientos del borde del PBG varían aproximadamente desde 45 pm hasta 185 pm. Concretamente estos valores son los proporcionados por la pareja 2 de estructuras cuando se considera $w_i=120$ nm y $w_i=140$ nm respectivamente (Figura 5.12.b)). En base a las conclusiones obtenidas en los capítulos anteriores, estos resultados satisfacen el comportamiento esperado, ya que las estructuras con $w_i=140$ nm han demostrado proporcionar mayores desplazamientos de PBG en repetidas ocasiones (en un factor $\sim 2\times$). Sin embargo, en la pareja 1 sucede todo lo contrario (Figura 5.12.a)). El mayor desplazamiento del borde del PBG es el experimentado por la estructura de *band gap* fotónico cuya anchura transversal es 120 nm y, a su vez, el valor de este desplazamiento es muy diferente al proporcionado por la otra estructura de parámetros idénticos. En definitiva, la respuesta de detección es significativamente diferente para cada pareja de estructuras, lo que conlleva a normalizar las medidas obtenidas respecto a un ciclo de calibración. El objetivo es determinar si este comportamiento se debe propiamente al evento de bioreconocimiento de las sondas MB o a las diferentes sensibilidades ofrecidas por cada una de las estructuras de *band gap* fotónico.

5.2.2.3. Calibración de la sensibilidad del índice de refracción y normalización de medidas

Con el fin de normalizar las medidas obtenidas durante el experimento de detección de biomarcadores miRNA-21, se calcula el desplazamiento espectral que experimenta el borde del PBG ante variaciones de índice de refracción en la superficie de las estructuras de *band gap* fotónico.

La Figura 5.13 muestra la evolución temporal de la posición espectral del borde del PBG durante un ciclo de calibración llevado a cabo con agua ultrapura ($n=1,315$) y una disolución de etanol 5% ($n=1,319$) en la misma. Tras fluir agua ultrapura, en $t=7$ minutos la disolución de etanol alcanza las estructuras de *band gap* fotónico originando un desplazamiento de la posición espectral del PBG, debido a la variación en el índice de refracción.

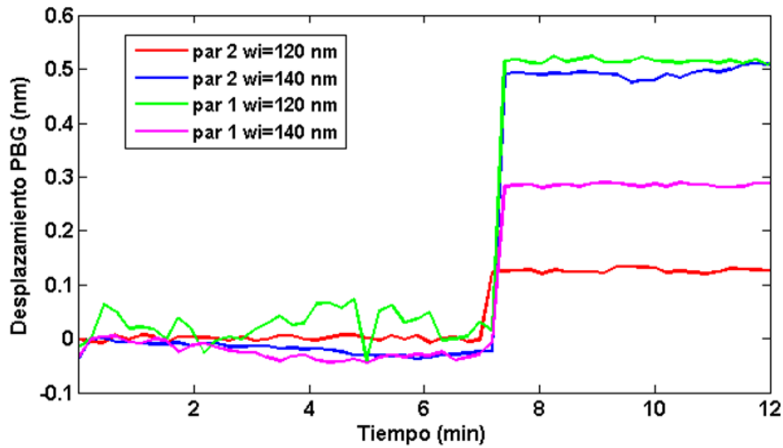
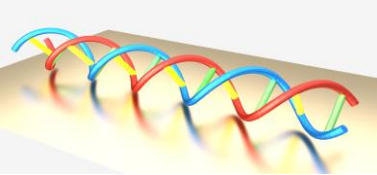


Figura 5.13. Evolución temporal de la posición espectral del borde del PBG proporcionado por las estructuras de *band gap* fotónico ante las variaciones de índice de refracción originadas por el flujo de agua ultrapura y etanol 5% en la misma.

La Tabla 5.2 registra los valores de los desplazamientos espectrales del PBG experimentados por las dos parejas de estructuras de *band gap* fotónico bajo análisis; tanto en el reconocimiento de biomarcadores miRNA-21 como en el ciclo de calibración. Se considera el desplazamiento normalizado del PBG como el cociente resultado de dividir estos desplazamientos y su valor numérico es mostrado en la última columna de la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Desplazamientos espectrales de PBG medidos en el reconocimiento de biomarcadores miRNA-21 y en el ciclo de calibración. La última columna registra los desplazamientos del borde del PBG normalizados.

Pareja	wi (nm)	Detección de miRNA-21 (pm)	Calibración (pm)	Detección de miRNA-21 normalizada
1	120	185	520	0,355
	140	90	280	0,321
2	120	45	125	0,36
	140	185	510	0,362

Los desplazamientos normalizados que experimenta el borde del PBG en la detección de biomarcadores miRNA-21 son representados gráficamente en la Figura 5.14. En ella se puede observar la gran similitud en la respuesta de detección normalizada ofrecida por cada uno de los sensores biofuncionalizados con MBs. **Con independencia de la anchura de sus elementos transversales, las cuatro estructuras de *band gap* fotónico proporcionan desplazamientos normalizados del borde del PBG en torno a 0,35; lo que indica un similar rendimiento de hibridación en el evento de bioreconocimiento.** Por tanto, los diferentes desplazamientos observados previamente en la Figura 5.12 se atribuyen a las diferentes sensibilidades proporcionadas por cada una de las estructuras de *band gap* fotónico.

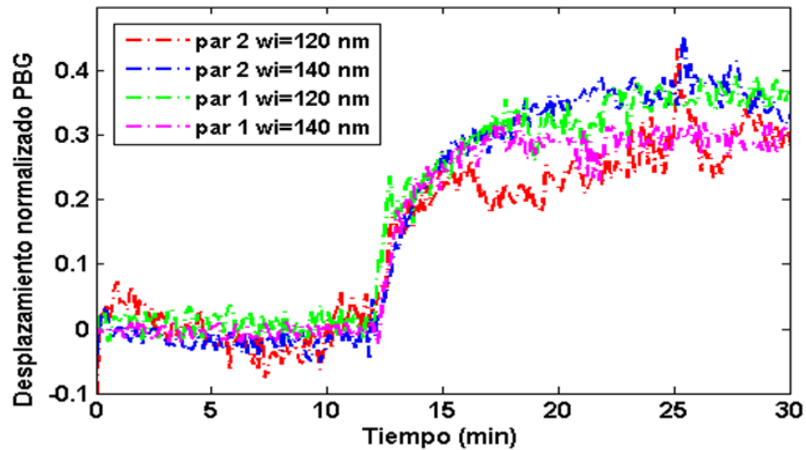
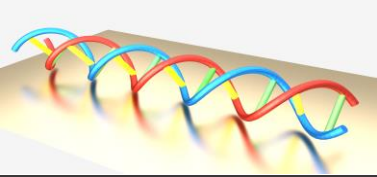


Figura 5.14. Evolución temporal normalizada de la posición del borde del PBG proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con sondas MB.

5.2.2.4. Test de fluorescencia

Una vez terminado el experimento de detección de biomarcadores miRNA-21, se desensambla el chip fotónico de la celda microfluídica para medir la intensidad de fluorescencia de Cy5.

La fluorescencia se observa selectivamente sobre las parejas 1 y 2 de estructuras de *band gap* fotónico, las cuales han sido biofuncionalizadas con sondas MB, como muestra la Figura 5.15.a). La cuantificación de esa fluorescencia es representada en la Figura 5.15.b). **Los valores de intensidad de fluorescencia son extremadamente altos en las posiciones en las que las sondas MB han sido inmovilizadas, lo cual confirma el efectivo reconocimiento de los biomarcadores miRNA-21. Por el contrario, la intensidad de fluorescencia medida en las estructuras de *band gap* fotónico usadas de control es extremadamente baja, confirmando la inexistencia de biomarcadores miRNA-21 sobre su superficie.**

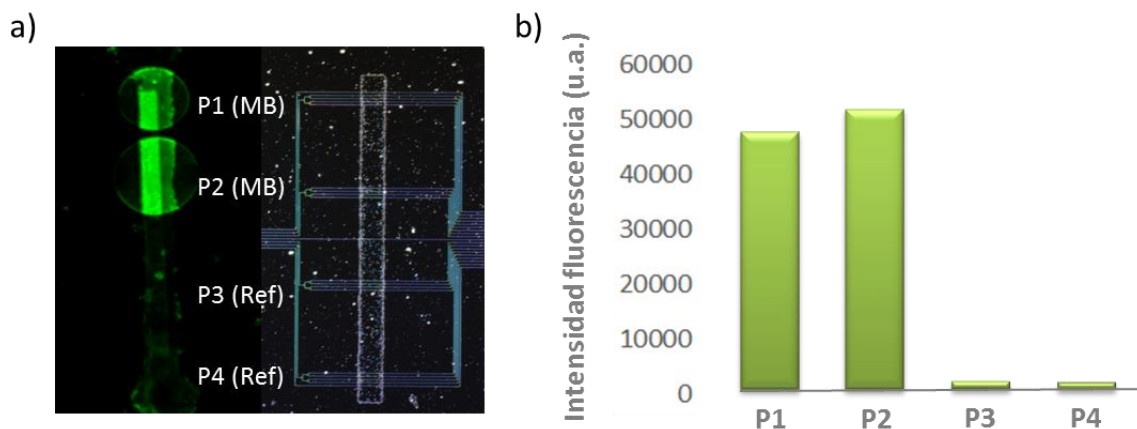
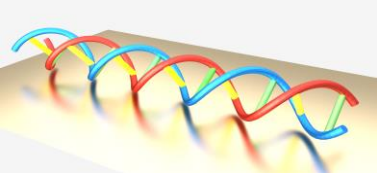


Figura 5.15. a) Fluorescencia observada (izquierda) tras la detección de biomarcadores miRNA-21 y su posición relativa en el chip fotónico (derecha). b) Valores de intensidad de fluorescencia medidos en cada pareja de sensores tras la detección de biomarcadores miRNA-21.



5.2.2.5. Análisis de los resultados

Sin lugar a dudas los resultados experimentales obtenidos confirman la hibridación entre las secuencias de MBs y biomarcadores miRNA-21 y, por tanto, el efectivo bioreconocimiento de los mismos. Así lo muestra la respuesta de detección proporcionada por las cuatro estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con sondas MB (Figura 5.12) y, finalmente, el test de fluorescencia (Figura 5.15). Además, se confirma la inexistencia de biomarcadores miRNA-21 en la superficie de las parejas 3 y 4 de sensores, utilizados como control, ya que la posición espectral del PBG en tales casos permanece inalterada ante la presencia de biomarcadores miRNA-21. De hecho, solo se observa fluorescencia en las posiciones del chip en las que se ubican las parejas 1 y 2 de sensores.

Sin embargo, las estructuras de *band gap* fotónico teóricamente idénticas, es decir con una misma anchura transversal, proporcionan desplazamientos de PBG cuyos valores son muy diferentes. La normalización de estos valores, respecto a los desplazamientos de PBG originados por una variación del índice de refracción, muestra respuestas de detección prácticamente idénticas ($\sim 0,35$) para las cuatro estructuras de *band gap* fotónico. Por tanto, la diferencia numérica reflejada en los distintos desplazamientos de PBG obtenidos, en ningún caso se debe a rendimientos de hibridación diferentes sino a las distintas sensibilidades ofrecidas por cada una de las estructuras de *band gap* fotónico. Esta diferencia posiblemente sea debida a desviaciones en las dimensiones paramétricas de las estructuras en el proceso de fabricación. Hay que tener en cuenta que al abrir las ventanas en la capa de SiO₂, utilizada como revestimiento superior del chip, pueden quedar restos de SiO₂ en las paredes de las estructuras que originen un decremento de la sensibilidad del sensor. No obstante, en este experimento se observa una sensibilidad muy inferior a la obtenida en los experimentos previos de detección de oligonucleótidos (probablemente, también debido a la presencia de esos restos de SiO₂).

5.3. Regeneración en línea en la detección de biomarcadores de cáncer miRNA

En este punto se describe una estrategia de regeneración en línea que permite la reutilización de los chips fotónicos de una manera sencilla, simplemente como un paso siguiente al propio proceso de detección del ensayo experimental. Concretamente esta estrategia se utiliza para deshibridar miRNAs que previamente han sido bioreconocidos por sondas MB inmovilizadas sobre la superficie de las estructuras de *band gap* fotónico. Tal y como muestra esquemáticamente la Figura 5.16, cuando el miRNA hibrida con la sonda MB, ésta adopta la configuración de doble hélice y finalmente vuelve a su configuración original mediante una regeneración química, en la que formamida es el agente desnaturalizante de ADN/ARN [FUC-10]. En este instante, el sensor se considera regenerado y, por tanto, listo para detectar biomarcadores miRNA de nuevo.



Figura 5.16. Representación esquemática de sendos eventos: bioreconocimiento de miRNAs y regeneración química del sensor, siendo éste una estructura de *band gap* fotónico biofuncionalizada con sondas MB.

5.3.1. Materiales y métodos

El biomarcador de cáncer seleccionado para realizar estos experimentos es el miRNA-155 (5'-3' UAA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU), cuya desregulación está asociada a cáncer de colon y mama (véase Tabla 5.1). Las sondas MB, cuya configuración óptima para detectar este biomarcador fue representada en la Figura 3.12, son inmovilizadas sobre la superficie de las estructuras de *band gap* fotónico mediante el proceso de biofuncionalización TEC, descrito en el punto 3.3.2. El uso de esta tecnología para la realización de este ensayo experimental permitirá comparar la respuesta de detección del miRNA-155 y el "pseudo-miRNA-155" bajo un mismo protocolo de biofuncionalización, aunque en esta ocasión usando un chip cubierto de SiO₂. Además, posibilitará establecer una comparativa entre sendas técnicas de inmovilización que han demostrado capacidad de biofuncionalizar sensores fotónicos para la detección de biomarcadores de cáncer miRNA: TEC y LAMI.

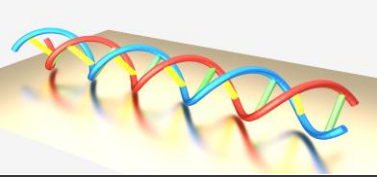
La interrogación óptica de las estructuras de *band gap* fotónico, como viene siendo habitual, se realiza haciendo uso del montaje experimental descrito en el punto 3.4.

5.3.2. Resultados experimentales

5.3.2.1. Ensayo de regeneración con formamida

El ensayo experimental se realiza en tres ciclos cuyos objetivos son los siguientes:

1. Detección de biomarcadores de cáncer miRNA-155.
2. Regeneración química del sensor con formamida.
3. Detección de biomarcadores de cáncer miRNA-155.



Para la detección de biomarcadores miRNA-155 se fluye inicialmente un tampón de SSC 5X sobre la superficie de las estructuras de *band gap* fotónico. Una vez establecida la línea base con el tampón, se fluye una disolución de 0,5 μM de miRNA-155 en SSC 5X durante 15 minutos.

La regeneración química se lleva a cabo siguiendo un protocolo similar. Tras fluir agua ultrapura durante 20 minutos, se fluye formamida al 25% en agua ultrapura durante 20 minutos y finalmente se vuelve a fluir agua ultrapura durante 40 minutos. Con el agua ultrapura se pretende que la superficie quede bien limpia, es decir, que no haya restos orgánicos en el medio.

5.3.2.2. Análisis de los resultados

La Figura 5.17 muestra ejemplos de las respuestas de detección proporcionadas por dos estructuras de *band gap* fotónico, cuya anchura transversal es 120 nm. En cada gráfica se puede observar el desplazamiento espectral experimentado por el borde del PBG en la detección de biomarcadores miRNA-155 antes y después de la regeneración en línea de cada sensor.

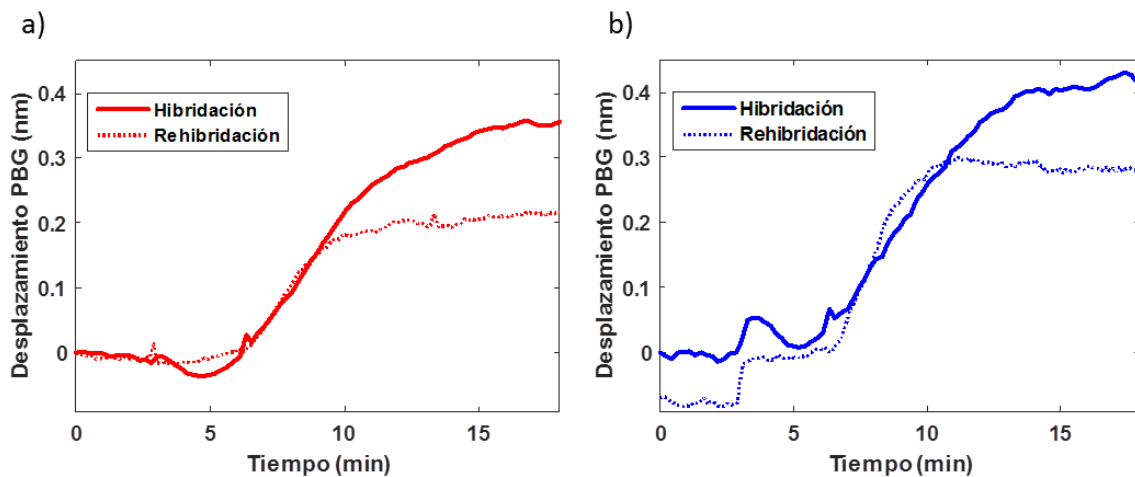
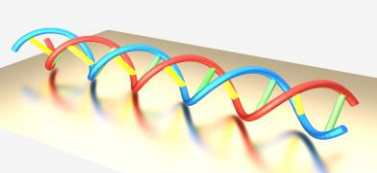


Figura 5.17. Ejemplos de la evolución temporal de la posición espectral en la detección de biomarcadores miRNA-155 antes y después de la regeneración en línea.

Ambos sensores proporcionan desplazamientos de PBG similares durante el primer ciclo de detección de biomarcadores miRNA-155, en torno a 400 pm. Tras la regeneración química, se observa nuevamente la hibridación, pero en este caso es determinada por desplazamientos inferiores. **Las capacidades porcentuales de regeneración observadas en las Figuras 5.17.a) y 5.17.b) son aproximadamente del 50% y 75% respectivamente.**

Estos resultados confirman la viabilidad de la regeneración en línea basada en formamida permitiendo el bioeconomío de oligonucleótidos en ciclos encadenados sin la necesidad de desensamblar el chip fotónico de la celda microfluídica.



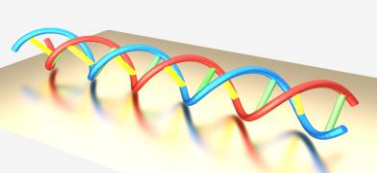
5.4. Conclusiones

A lo largo de ese capítulo se ha demostrado el efectivo reconocimiento de biomarcadores de cáncer miRNAs (miRNA-21 y miRNA-155) usando estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas mediante las técnicas TEC y LAMI. Éstas presentan algunas ventajas sobre otras técnicas tradicionales de biofuncionalización [NIM-14], permitiendo obtener una inmovilización espacial orientada en la superficie del biosensor. No obstante, las sondas MB son inmovilizadas homogéneamente, ya que una alta densidad originaría una aglomeración de las mismas y dificultaría la hibridación. A pesar de que las sondas MB son inmovilizadas mediante radiación UV, ésta no repercute sobre la capacidad de las estructuras de *band gap* fotónico para reconocer los biomarcadores miRNA. La luz UVB (280-315 nm) podría inducir cambios en el ADN/ARN como desaminación de bases, despirimidinación, depurinación o la formación de radicales libres o especies reactivas de oxígeno [RAS-10]. **Ambas técnicas presentan alta reproducibilidad y permiten la inmovilización de sondas MB sin comprometer la biodisponibilidad de las estructuras de *band gap* fotónico.** Así pues, inmovilizando la sonda MB diseñada para hibridar específicamente con un determinado biomarcador miRNA es posible detectar cualquiera de ellos y, por tanto, el futuro diagnóstico de diferentes tipos de cáncer.

En cuanto a los desplazamientos del PBG obtenidos en la detección del miRNA-155, se observan valores significativamente mayores (~400 pm) que los obtenidos en la detección del miRNA-21 (~185 pm en el mejor caso). Aunque cabría esperar desplazamientos similares, hay que tener en cuenta varios factores. Los experimentos se han realizado en dos espacios temporales diferentes, entre los cuales se ha ido optimizando progresivamente la fabricación del chip fotónico cubierto de SiO₂ y, por tanto, mejorando la sensibilidad de los sensores. Además, la ingeniería de cada MB es diferente y se han empleado distintas técnicas de biofuncionalización. A pesar de que ambas tecnologías han demostrado biocompatibilidad en la detección de miRNAs, la proximidad de localización del SYM y el NTC ha permitido la realización de numerosos experimentos y, por consiguiente, un nivel superior de optimización de la biofuncionalización TEC. Asimismo, **la tecnología SOI, concretamente las estructuras de *band gap* fotónico, han demostrado ser biosensores de miRNAs versátiles sobre los que es posible aplicar cualquiera de las dos técnicas de inmovilización de MBs desarrolladas, TEC y LAMI.**

Pese a que, en la detección del biomarcador miRNA-155, las estructuras de *band gap* fotónico proporcionan desplazamientos muy superiores (en un factor ~4×) a los obtenidos típicamente en la detección de miRNAs (por debajo de ~100 pm) [QAV-10, SCH12]; éstos no son tan significativos como los obtenidos en la detección del “pseudo-miRNA-155” en los capítulos 3 y 4. Esto probablemente sea debido a que la fabricación del chip todavía no ha sido optimizada en su totalidad y los restos de SiO₂ del revestimiento superior del chip penalizan la sensibilidad del sensor. Además, se observa que la hibridación de la secuencia objetivo con la secuencia del MB proporciona una mayor respuesta de detección cuando dichas secuencias son totalmente complementarias; lo cual no sucede en la detección de miRNAs de este capítulo, pero sí en la detección del “pseudo-miRNA-155”. Por tanto, el diseño apropiado de sondas MB con bases complementarias en su región *stem* podría mejorar el rendimiento de hibridación y, por tanto, la respuesta de detección.

Por otro lado, **las modificaciones introducidas en el diseño del chip y su revestimiento superior de SiO₂ han permitido mejorar la calidad de la señal y la robustez del chip, posibilitando su reutilización.** Así lo han demostrado los espectros de transmisión mostrados en las Figuras 5.10 y 5.11, en los que **se ha reducido muy significativamente el ruido y el rizado de la banda de transmisión.** El compromiso entre la robustez y la sensibilidad



del chip debe superarse en el desarrollo de futuros chips fotónicos optimizando al máximo el proceso de fabricación.

Finalmente, se muestra un efectivo protocolo de regeneración en línea de biosensores nanofotónicos en la detección de miRNAs basado en una regeneración química con formamida. **El proceso de regeneración se puede integrar fácilmente en un experimento como un paso adicional a la detección de los biomarcadores, consiguiendo una respuesta de detección entre el 50% y el 75% de la original.** Sin embargo, se trata de un ensayo experimental que requiere ser optimizado. Para ello se podría testear diferentes concentraciones de formamida, explorar distintos periodos de regeneración e incluso combinar la regeneración química con cambios de temperatura que favorezcan la desnaturalización de oligonucleótidos hibridados [FUC-10]. Generalmente, en las aplicaciones de diagnóstico clínico se requiere que los chips sean desechables para evitar la contaminación cruzada y reducir el riesgo de falsos positivos y falsos negativos. Sin embargo, **la regeneración de los biosensores resulta de suma importancia de cara a su desarrollo y optimización, ya que supone un significativo ahorro de tiempo de personal altamente cualificado y de costes de materiales y reactivos.** Además, este protocolo de regeneración podría ser de gran utilidad en otras aplicaciones, ya que la reutilización de los chips generaría una ventaja comercial y una mayor relación calidad-precio para usuarios finales.

Capítulo 6 Conclusiones y Líneas Futuras

6.1. Conclusiones

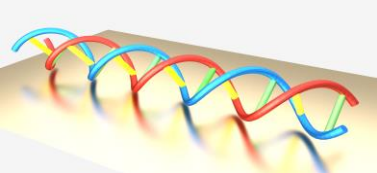
Actualmente en el mercado POC existe una demanda cada vez mayor de dispositivos novedosos, baratos y eficientes para el diagnóstico de enfermedades, con especial interés en el cáncer. El descubrimiento de nuevos biomarcadores de enfermedades, por ejemplo miRNAs, ha impulsado, como alternativa a las técnicas convencionales de detección, el desarrollo de biosensores *label-free*, posibilitando el reconocimiento de una amplia variedad de moléculas y estructuras moleculares de una manera más rápida, sencilla y eficiente. Entre las diferentes tecnologías de transducción, la tecnología fotónica integrada es una prometedora candidata para el desarrollo de este tipo de biosensores, especialmente cuando se utilizan materiales y procesos basados en silicio y compatibles con CMOS.

Bajo la premisa de integrar biosensores en dispositivos LOC más complejos se han desarrollado estructuras de *band gap* fotónico en una oblea SOI usando la tecnología EBL y un ataque inductivo de plasma de la capa superior de silicio. El desarrollo de estas estructuras de sensado ha tenido lugar mediante un proceso de optimización que comprende diferentes etapas retroactivas: diseño, fabricación y caracterización experimental.

Inicialmente, se ha llevado a cabo un exhaustivo estudio de optimización paramétrica de cinco configuraciones diferentes, con el objetivo de obtener alta sensibilidad, una banda de transmisión plana y un borde de PBG abrupto, con una gran relación de extinción y localizado a 1550 nm en un entorno acuoso. A partir de simulaciones FDTD y PWE **se han obtenido valores de sensibilidad desde ~70 nm/RIU hasta ~600 nm/RIU**, mostrando una significativa mejora en función de la configuración seleccionada. Estos valores de sensibilidad ofrecidos por este tipo de estructuras de *band gap* fotónico llegan a ser hasta 10 veces superior al obtenido usando otras estructuras de detección, como anillos resonantes.

Posteriormente, la caracterización experimental ha permitido confirmar las propiedades del borde del PBG para cada una de las estructuras estudiadas, así como observar el comportamiento espectral del PBG ante diferentes dosis de fabricación, variaciones de índice de refracción, e incrementos/decrementos en la magnitud de la anchura de sus elementos transversales.

A partir de los resultados obtenidos se observa que, **para obtener un borde de PBG ubicado exactamente a ~1550 nm en un entorno acuoso, se requiere alta precisión en las dimensiones de la estructura de *band gap* fotónico. Además, cuanto mayor es la sensibilidad ofrecida por ésta, menor tolerancia presenta a cualquier desviación paramétrica de fabricación.**



Entre las configuraciones estudiadas, se ha seleccionado la corr3D ($a=380$ nm, $w_i=120$ nm y $w_e=1500$ nm), ya que, gracias a su complejidad estructural moderada, sus dimensiones han mostrado mayor tolerancia a las desviaciones de fabricación. **Su caracterización experimental proporciona un espectro de transmisión con escasas pérdidas, una relación de extinción del PBG muy elevada (~ 22 dB), un rizado moderado en el borde de la banda y un borde de PBG bastante abrupto.** La caracterización física mediante AFM muestra una rugosidad de 2 nm en las paredes laterales de las estructuras fabricadas. Finalmente, un estudio del perfil de campo evanescente revela un **decremento exponencial de la intensidad del campo evanescente a medida que se aleja de la superficie de la estructura corr3D, disminuyendo significativamente para alturas superiores a 100 nm.** Por tanto, **para alcanzar altos valores de sensibilidad, se requiere que la capa biológica de reconocimiento molecular sea lo más delgada posible.**

Una vez seleccionada la estructura óptima de *band gap* fotónico para la detección de oligonucleótidos, se ha diseñado un chip en el que se incluyen varias de ellas y el cual es capaz de implementar varias funcionalidades y permitir varios análisis simultáneamente. A lo largo del trabajo de esta Tesis Doctoral este chip fotónico ha sido optimizado introduciendo pequeñas modificaciones en su diseño y finalmente cubriéndolo con una capa de revestimiento de SiO_2 . **Como resultado se han obtenido chips fotónicos más robustos y reutilizables, cuya interrogación ha proporcionado espectros de transmisión de mayor calidad, a cambio de una penalización en sensibilidad,** como se detallará más abajo.

El biosensor desarrollado para la detección de oligonucleótidos, y más concretamente biomarcadores miRNA, consiste en la combinación de las estructuras de *band gap* fotónico con la inmovilización de sondas MB sobre su superficie. La hibridación del oligonucleótido objetivo con el MB induce una variación en la señal óptica proporcionada por la estructura de *band gap* fotónico, probablemente no solo por el evento de hibridación en sí sino por la redistribución de la materia originada por el cambio conformacional que sufre el MB, provocando una variación más notoria del índice de refracción sobre la superficie del sensor.

La inmovilización de los MBs se ha llevado a cabo utilizando dos métodos basados en la inmovilización asistida por luz UV: TEC y LAMI. Estas técnicas de biofuncionalización han logrado una inmovilización homogénea y espacialmente orientada en la superficie de las estructuras de *band gap* fotónico y, pese a que utilizan radiación UV, ésta no repercute sobre su capacidad de bioconocimiento de miRNAs. **Ambas técnicas presentan alta reproducibilidad y permiten la inmovilización de sondas MB sin comprometer la biodisponibilidad de las estructuras de *band gap* fotónico, lo que confiere versatilidad al biosensor.** Por tanto, inmovilizando la sonda MB diseñada para hibridar específicamente con un determinado biomarcador miRNA es posible detectar cualquiera de ellos.

La detección de biomarcadores miRNA usando estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con sondas MB ha sido demostrada a lo largo de este trabajo en repetidas ocasiones. Para conseguir tal objetivo, comúnmente se ha fluído el biomarcador objetivo ($0,5$ μm en SSC), a lo largo de un canal microfluídico a una velocidad de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, sobre la superficie de los sensores de *band gap* fotónico, cuya respuesta espectral ha sido continuamente adquirida para monitorizar el desplazamiento del PBG. Este desplazamiento espectral del PBG ha determinado el efectivo reconocimiento de los biomarcadores miRNA, el cual ha tenido lugar utilizando distintas técnicas de biofuncionalización, sistemas de suministro microfluídico y chips fotónicos (cubiertos y sin cubrir de SiO_2). Todos estos datos están resumidos en la Tabla 6.1, considerando diferentes anchuras de los elementos transversales que componen las estructuras de *band gap* fotónico.

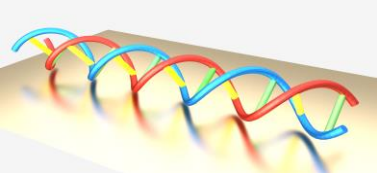
Tabla 6.1. Desplazamiento del PBG obtenido considerando diferentes anchuras de los elementos transversales de las estructuras de *band gap* fotónico, técnicas de biofuncionalización, sistemas de suministro microfluídico y chips fotónicos.

Biomarcador miRNA	Técnica inmovilización MBs	Celda microfluídica	Revestimiento superior SiO ₂	wi (nm)	Desplazamiento PBG (pm)
"pseudo miRNA-155"	TEC	PDMS	-	120	520 - 800
				140	920 - 1120
"pseudo miRNA-155"	TEC	microTEC	-	120	650
				140	1020
miRNA-21	LAMI	PDMS	√	120	45 - 185
				140	185 - 90
miRNA-155	TEC	PDMS	√	120	400

Los desplazamientos de PBG obtenidos en el bioreconocimiento de oligonucleótidos ("pseudo-miRNA-155") varían en un rango desde ~520 pm (para $w_i=120$ nm) hasta incluso ~1120 pm (para $w_i=140$ nm). Pese a que la configuración corr3D no presentaba inicialmente una elevada sensibilidad teórica (~175 nm/RIU), estos desplazamientos representan una significativa mejora en términos de sensibilidad comparados con los obtenidos usando biosensores basados en anillos resonantes, los cuales típicamente proporcionan desplazamientos por debajo de 100 pm [QAV-10, SCH-12]; e incluso comparados a los obtenidos cuando se usan técnicas de amplificación basadas en anticuerpos [RAM-08]. Adicionalmente se demostró que **una capa BSA bloqueante evita adecuadamente la adsorción inespecífica del oligonucleótido objetivo sobre las estructuras de *band gap* fotónico de referencia.**

Cabe destacar la tremenda influencia de los parámetros estructurales de los sensores de *band gap* fotónico en su sensibilidad. En la Tabla 6.1. se puede observar un incremento del desplazamiento del PBG desde 520 pm hasta 920 pm y de 800 a 1120 pm cuando la anchura de los elementos transversales es incrementada tan solo 20 nm. Por tanto, mediante la selección adecuada de sus parámetros, las estructuras de *band gap* fotónico permiten mejorar su sensibilidad considerablemente sin la necesidad de incrementar el *footprint*. Se trata de una gran ventaja comparada con otras estructuras de detección como los anillos resonantes, cuya sensibilidad está limitada por su propio principio de funcionamiento, o los interferómetros, en los que se requiere aumentar su tamaño considerablemente para aumentar su sensibilidad. Sin embargo, **esta alta influencia de los parámetros estructurales sobre la sensibilidad también implica menor tolerancia a desviaciones de fabricación.**

En cuanto a los desplazamientos del PBG obtenidos en la detección de los biomarcadores de cáncer miRNA, se observan valores significativamente mayores en el bioreconocimiento del miRNA-155 (~400 pm) frente a los obtenidos en la detección del miRNA-21 (~185 pm en el mejor caso). Esta diferencia en la respuesta de detección viene determinada por la optimización de la fabricación del chip fotónico y por la técnica de biofuncionalización. Sin embargo la detección del biomarcador de cáncer miRNA-155 no ha proporcionado desplazamientos del PBG tan significativos como los obtenidos en el bioreconocimiento del "pseudo-miRNA-155", donde los chips fotónicos no estaban cubiertos de SiO₂. Este decremento en sensibilidad viene determinado por los restos de SiO₂ que quedan



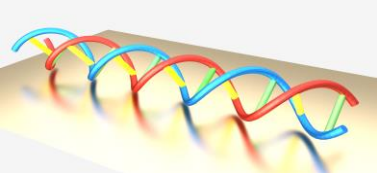
en las paredes de las estructuras de *band gap* fotónico al abrir las ventanas. No obstante, el compromiso entre la robustez y la sensibilidad del chip debe superarse en el desarrollo de futuros chips fotónicos optimizando al máximo el proceso de fabricación. Además, se observa que la hibridación de la secuencia objetivo con la secuencia del MB proporciona una mayor respuesta de detección cuando dichas secuencias son totalmente complementarias; lo cual no sucede en el bioreconocimiento de los biomarcadores de cáncer miRNA-21 y miRNA-155, pero sí en la detección del “pseudo-miRNA-155”. Por tanto, el diseño apropiado de sondas MB con bases complementarias en su región *stem* podría mejorar el rendimiento de hibridación y, por tanto, la respuesta de detección.

Aprovechando el cambio conformacional sufrido por los MBs tras su hibridación con los oligonucleótidos, se añade una molécula de estreptavidina en una de sus terminaciones bajo la premisa de que cuando el MB reconozca el oligonucleótido alejará la molécula de la superficie, amplificando la respuesta de detección. Sin embargo, el desplazamiento del PBG originado por la detección directa del oligonucleótido es tan extremadamente alto, que el desplazamiento negativo del PBG, originado simultáneamente por el distanciamiento de la estreptavidina de la superficie del sensor, no predomina sobre el primero. En consecuencia, el desplazamiento neto obtenido es inferior al desplazamiento ocasionado por la detección directa. Sin embargo, este estudio experimental ha permitido estudiar la influencia del cambio conformacional de MBs sobre la onda evanescente, confirmando que la estreptavidina efectivamente es alejada de la superficie del sensor, ya que se obtienen distintas respuestas de detección que denotan una diferente interacción entre la onda evanescente y los MBs marcados y sin marcar con estreptavidina. Por tanto, esta técnica, que permitiría amplificar la respuesta de detección de biosensores de onda evanescente, puede ser ampliamente explotada de diferentes formas. El desplazamiento negativo experimentado por el PBG, en consecuencia del distanciamiento de la molécula de la superficie del sensor, podría ser predominante en la respuesta de detección cuando esta molécula fuera de gran tamaño o se tratase de una partícula con alto índice de refracción. También podría sustituirse el MB por un aptámetro para detectar objetivos de peso molecular muy bajo (por ejemplo, pesticidas o antibióticos), cuya detección directa proporciona desplazamientos espectrales extremadamente bajos y, por tanto, el desplazamiento negativo predominaría en su respuesta de detección. Además, se podría rediseñar la estructura de *band gap* fotónico en la que se excitaran varios modos y cada perfil de campo evanescente interactuara de diferente manera con el oligonucleótido hibridado y con la molécula/partícula desplazada.

Finalmente se propone una estrategia de regeneración en línea de los biosensores fotónicos basada en una regeneración química usando formamida como agente desnaturante de ácidos nucleicos. Los resultados obtenidos confirman su viabilidad exhibiendo una capacidad de regeneración entre el 50% y el 75%. Se trata de un protocolo preliminar, ya que puede ser ampliamente optimizado testeando diferentes tiempos de regeneración y/o provocando cambios de temperatura que favorezcan la desnaturación del ADN/ARN.

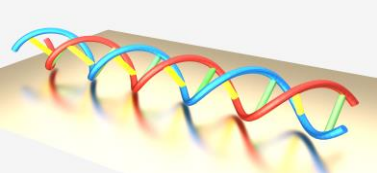
6.2. Líneas Futuras

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha trabajado en el desarrollo de biosensores de miRNAs basados en estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con sondas MB mediante diferentes técnicas de inmovilización (es decir, TEC y LAMI). Los resultados obtenidos demuestran el efectivo reconocimiento de biomarcadores miRNA proporcionando altas sensibilidades, lo cual convierte a las estructuras de *band gap* fotónico, adecuadamente



biofuncionalizadas, en un prometedor biosensor para monitorizar eventos de interacción bioquímica. Sin embargo, todavía queda un largo camino por recorrer antes de su implementación en el mercado como un sistema de detección práctico, fiable y de interés comercial. Por tanto, las líneas futuras de este trabajo van dirigidas principalmente a la consecución de un dispositivo POC compacto y de bajo coste para su aplicación en el diagnóstico precoz y mínimamente invasivo de cáncer, tal como establece el objetivo del proyecto SAPHELY. Para ello se proponen varias líneas futuras de actuación:

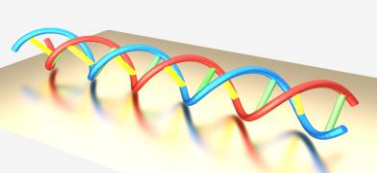
- ❖ El proceso de fabricación deberá ser optimizado para obtener un mayor grado de reproducibilidad tanto de las estructuras de *band gap* fotónico como de los chips. Para ello será necesario trabajar constantemente en la mejora de los procedimientos de fabricación, especialmente cuando se elimina la capa de SiO₂ sobre las estructuras de *band gap* fotónico. Es importante optimizar este proceso para minimizar los restos de SiO₂ que puedan quedar en las paredes de las estructuras, ya que conducirá a una considerable mejora en la sensibilidad del biosensor. De cara a su integración en un dispositivo POC, se han realizado también pruebas de transferencia del proceso de fabricación de los chips fotónicos a la tecnología NIL, la cual posibilitaría su producción en masa y, por tanto, una reducción de los costes. En este caso, el chip fotónico será accedido, tanto a la entrada como a la salida, mediante GCs *full-etch*, compatibles con esta tecnología. Pese a que se han diseñado algunas configuraciones de GCs *full-etch*, su diseño y fabricación precisan de una optimización mayor para conseguir la máxima eficiencia de acoplo.
- ❖ La técnica de biofuncionalización LAMI ha permitido inmovilizar las sondas MB sobre las estructuras de *band gap* fotónico sin comprometer su biodisponibilidad. Sin embargo, los biosensores funcionalizados con esta técnica no han ofrecido tan altos rendimientos de detección como los biofuncionalizados con la tecnología TEC. Por tanto, sería interesante continuar trabajando en la optimización de la adaptación de este método de inmovilización a las estructuras de *band gap* fotónico y estudiar su comportamiento.
- ❖ Las técnicas de inmovilización propuestas en este trabajo han demostrado la selectividad de las sondas MB en el bioreconocimiento de oligonucleótidos sobre superficies SOI usando fluorescencia. De cara a desarrollar un dispositivo POC fiable, la selectividad deberá ser confirmada experimentalmente por los biosensores nanofotónicos propuestos en este trabajo. Para ello se podría llevar a cabo experimentos de detección multi-análito en los que cada estructura de *band gap* fotónico se funcionalizase con MBs específicos para el reconocimiento de distintos biomarcadores miRNA. Asimismo, sería importante testear diferentes concentraciones de miRNAs para conocer el LOD proporcionado por este tipo de biosensores. Finalmente, el mayor reto consistirá en detectar biomarcadores miRNAs en muestras humanas (por ejemplo, suero o sangre). Gracias a la identificación de potenciales biomarcadores de cáncer miRNA llevada a cabo en el proyecto SAPHELY, el efectivo bioreconocimiento de estos miRNAs supondría un gran avance para el futuro diagnóstico de los cuatro tipos de cáncer con más incidencia sobre la población mundial.
- ❖ A pesar de que no ha sido posible mejorar la sensibilidad de los biosensores mediante la técnica de amplificación basada en la variación del índice de refracción, originado por el distanciamiento de una molécula/partícula de la superficie del sensor (debido al cambio conformacional que sufre el MB tras la hibridación), esta técnica es



una de posibilidades más interesantes que ofrece el biosensor desarrollado. Por tanto, una de las líneas futuras consiste en continuar el estudio experimental llevado a cabo en este trabajo con el objetivo de mejorar la sensibilidad del biosensor. Sería interesante estudiar la interacción de onda-evanescente con el MB (antes y después de hibridar), usando una partícula de alto índice de refracción o una molécula de gran tamaño. Ese mismo estudio podría llevarse a cabo usando configuraciones de MB cuya sección *stem* sea de mayor longitud y permita un mayor distanciamiento de la molécula/partícula de la superficie del sensor. Otra de las opciones sería rediseñar la estructura de *band gap* fotónico para excitar varios modos y que cada perfil de campo evanescente interaccione de diferente manera con el oligonucleótido hibridado y con la molécula/partícula desplazada.

- ❖ Otra opción para aumentar la sensibilidad de los sistemas de detección nanofotónicos es actuar en la entrega de los analitos objetivo sobre la estructura de detección para tener una mayor interacción entre el sensor y esos analitos. Existen sistemas de suministro microfluídicos que controlan la velocidad de los analitos con una determinada movilidad mediante la combinación de efectos electroosmóticos y electroforéticos [PAP-17]. De esta forma, es posible incrementar la concentración efectiva de los analitos en varios órdenes de magnitud y, por tanto, aumentar la sensibilidad del biosensor.
- ❖ Tal y como se indicó en el apartado 2.3.1. solamente se han considerado los modos TE en el diseño de los biosensores porque, según la literatura y trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación, el PBG solo aparece para esta polarización cuando se consideran configuraciones donde hay continuidad del dieléctrico de alto índice de refracción, como es el caso de las configuraciones estudiadas. La aparición de PBGs para una polarización TM podría tener lugar en estructuras periódicas con dieléctricos aislados, tal es el caso de la configuración estudiada en esta Tesis Doctoral *1D slot waveguide* y comúnmente conocida en la literatura como *subwavelength grating structures* [LUA-19, WANG-14, WANG-19]. Por tanto, una posible línea futura sería el estudio de este tipo de estructuras considerando los modos TM.
- ❖ La lectura espectral de los biosensores de *band gap* fotónico ha sido de gran utilidad para identificar el PBG y evaluar su comportamiento en un gran rango espectral. Sin embargo, la interrogación de las estructuras de *band gap* fotónico en el dispositivo POC se llevará a cabo mediante la técnica de bajo coste propuesta en el proyecto SAPHELY. En ésta, la respuesta de detección vendrá determinada por el solapamiento entre las respuestas de una fuente de banda ancha y la de la estructura fotónica. (véase los puntos 1.6. y 2.1.)

Por último, cabe destacar que la tecnología del dispositivo POC planteado podría ser adaptada para el diagnóstico de cualquier enfermedad a la que se le asocie una desregulación de miRNA (~400 enfermedades), simplemente cambiando adecuadamente las sondas MB inmovilizadas sobre la superficie del sensor. Asimismo, las técnicas de funcionalización desarrolladas han demostrado biocompatibilidad en la inmovilización de proteínas y anticuerpos sobre las estructuras de *band gap* fotónico. Esta versatilidad convierte este tipo de biosensores en un sistema de detección perfectamente válido para el diagnóstico de otras enfermedades, incluso COVID-19, dada su repercusión mundial causada por la pandemia.



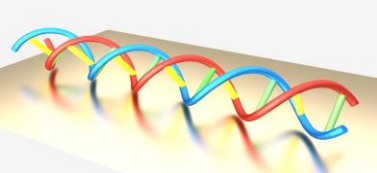
Contribuciones originales

Publicaciones en revistas internacionales

- [1] O. S. Lopes Gonçalves, G. Wheeler, T. Dalmy, H. Dai, M. Castro, P. Castro, J. García-Rupérez, **Á. Ruiz-Tórtola**, A. Griol, J. Hurtado, L. Bellieres, M. J. Bañuls, D. González-Lucas, J. A. López-Guerrero and M. T. Neves-Petersen, "Detection of miRNA cancer biomarkers using light activated Molecular Beacons", RSC Advances 9, 12766-12783 (2019).
- [2] **Á. Ruiz-Tórtola**, F. Prats-Quílez, D. González-Lucas, M. J. Bañuls, Á. Maquieira, G. Wheeler, T. Dalmy, A. Griol, J. Hurtado, H. Bohlmann, R. Götzen and J. García-Rupérez, "Experimental study of the evanescent-wave photonic sensors response in presence of molecular beacon conformational changes", Journal of Biophotonics 11:e201800030 (2018).
- [3] **Á. Ruiz-Tórtola**, F. Prats-Quílez, D. González-Lucas, M. J. Bañuls, Á. Maquieira, G. Wheeler, T. Dalmy, A. Griol, J. Hurtado and J. García-Rupérez, "High sensitivity and label-free oligonucleotides detection using photonic bandgap sensing structures biofunctionalized with molecular beacon probes", Biomedical Optic Express 9 (4), 1717-1727 (2018).

Contribuciones a congresos

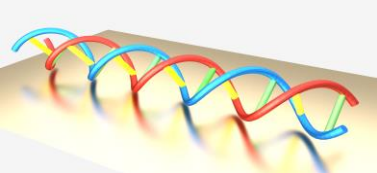
- [1] M. Gómez-Gómez, **Á. Ruiz-Tórtola**, D. González-Lucas, M. J. Bañuls and J. García-Rupérez, "New Method for Online Regeneration of Silicon-Based Nanophotonic Biosensors", 5th International Electronic Conference on Sensors and Applications (ECSA-5), Online, 5 – 30 November, 2018.
- [2] **Á. Ruiz-Tórtola**, F. Prats-Quílez, D. González-Lucas, M. J. Bañuls, Á. Maquieira, G. Wheeler, T. Dalmy, A. Griol, J. Hurtado, H. Bohlmann, R. Götzen and J. García-Rupérez, "Use of evanescent-wave photonic sensors for the optical characterization of molecular beacon conformational changes", 28th Anniversary World Congress on Biosensors (Biosensors 2018), Miami (USA), 12 – 15 June, 2018.
- [3] **Á. Ruiz-Tórtola**, F. Prats-Quílez, D. González-Lucas, M. J. Bañuls, Á. Maquieira, G. Wheeler, T. Dalmy, A. Griol, J. Hurtado and J. García-Rupérez, "Photonic sensors biofunctionalized with molecular beacon probes for high sensitivity and label-



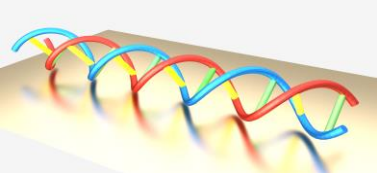
- free detection”, 28th Anniversary World Congress on Biosensors (Biosensors 2018), Miami (USA), 12 – 15 June, 2018.
- [4] **Á. Ruiz-Tórtola**, F. Prats-Quílez, D. González-Lucas, M. J. Bañuls, Á. Maquieira, G. Wheeler, T. Dalmay, A. Griol, J. Hurtado, H. Bohlmann, R. Götzen and J. García-Rupérez, “High sensitivity oligonucleotides photonic detection and optical characterization of molecular beacon conformational changes”, 20th European Conference on Integrated Optics (ECIO 2018), Valencia (Spain), 30 May – 1 June, 2018.
- [5] **Á. Ruiz-Tórtola**, F. Prats-Quílez, D. González-Lucas, M. J. Bañuls, Á. Maquieira, G. Wheeler, T. Dalmay, A. Griol, J. Hurtado, H. Bohlmann, R. Götzen and J. García-Rupérez, “Photonic Bandgap Biosensing Structures Biofunctionalized with Molecular Beacon Probes”, ImagineNano2018 International Event - 3PM 2018 Conference, Bilbao (Spain), 13 – 15 March, 2018.
- [6] J. García-Rupérez, S. Ponce-Alcántara, D. Ortiz de Zárate, R. Caroselli, F. Prats, **Á. Ruiz-Tórtola**, D. Martín-Sánchez and P. Martínez-Pérez, “Nanophotonic Sensing Technology for High Sensitivity Analysis of Water Resources”, International Symposium and Exhibition on Hydro-Environment Sensors and Software (HydroSenSoft 2017), Madrid (Spain), 1 – 3 March, 2017.
- [7] F. Prats, R. Caroselli, **Á. Ruiz-Tórtola** and J. García-Rupérez, “High Throughput Interrogation Platform for Real Time and Highly Multiplexed Photonic Detection Using Photonic Bandgap Structures”, IEEE Sensors 2016, Orlando (USA), 30 October – 2 November, 2016.
- [8] F. Prats, R. Caroselli, D. Zurita, **Á. Ruiz-Tórtola** and J. García-Rupérez, “Sistema de seguimiento de características espectrales en estructuras nanofotónicas”, XXIII Seminario Anual de Automática, Electrónica Industrial e Instrumentación (SAAEI 2016), Elche (Spain), 6 – 8 July, 2016.
- [9] **Á. Ruiz-Tórtola**, A. Griol, J. Hurtado and J. García-Rupérez, “Biosensing using photonic bandgap structures on silicon”, V Spanish Nanophotonics Conference (CEN 2016), Valencia (Spain), 20 -22 June, 2016.
- [10] F. Prats, R. Caroselli, D. Zurita, **Á. Ruiz-Tórtola** and J. García-Rupérez, “Ultra-Fast Spectral Optical Analysis of Nanophotonic Structures”, V Spanish Nanophotonics Conference (CEN 2016), Valencia (Spain), 20 -22 June, 2016.
- [11] **Á. Ruiz-Tórtola**, A. Griol and A. Martínez, “Design and characterization of plasmonic nanostructures on silicon waveguides for sensing”, V Spanish Nanophotonics Conference (CEN 2016), Valencia (Spain), 20 -22 June, 2016.
- [12] J. García-Rupérez, F. Prats-Quílez, **Á. Ruiz-Tórtola**, R. Caroselli, A. Griol, J. Hurtado, “Plataforma fotónica de análisis para la detección precoz de cáncer”, Jornada Encuentro de Investigadores en Cáncer: ‘dando la cara por la sociedad’, Alcoi (Spain), 15 March, 2016.

Referencias

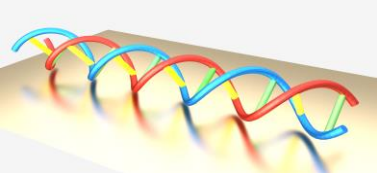
- [ARL-11] J. L. Arlett, E. B. Myers, and M. L. Roukes, "Comparative advantages of mechanical biosensors", *Nat. Nano.* 6, 203-215 (2011).
- [ARN-90] M. A. Arnold, "Fibre-Optic Biosensors", *J. Biotechnol.* 36, 39 (1990).
- [BAC-08] M. Bacci, C. Cucci, A. Azelio-Mencaglia, and A. Grazia-Mignani, "Innovative Sensors for Environmental Monitoring in Museums", *Sensors* 8, 1984-2005 (2008).
- [BAR-02] C. Barzen, A. Brecht, and G. Gauglitz, "Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control", *Biosensor & Bioelectronics* 17(4), 289-295 (2002).
- [BAY-90] E. A. Bayer and M. Wilchek, "Biotin-binding proteins: overview and prospects", *Methods in Enzymology* 184, 49-51 (1990).
- [BEN-10] V. Benes and M. Castoldi, "Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available", *Methods* 50(4), 244-249 (2010).
- [BOG-05] W. Bogaerts, R. Baets, P. Dumon, V. Wiaux, S. Beckx, D. Taillaert, B. Luyssaert, J. Van Campenhout, P. Bienstman, and D. Van Thourhout, "Nanophotonic waveguides in silicon-on-insulator fabricated with CMOS technology", *Journal of Lightwave Technology* 23(1), 401-412 (2005).
- [BOT-19] M. Bottani, G. Banfi, and G. Lombardi, "Perspectives on miRNAs as Epigenetic Markers in Osteoporosis and Bone Fracture Risk: A Step Forward in Personalized Diagnosis", *Frontiers in genetics* 10, 1044 (2019).
- [BUN-12] A. Bunschoten, T. Buckle, J. Kuil, G. D. Luker, K. E. Luker, O. E. Nieweg, and F. W. B. van Leeuwen, "Targeted non-covalent self-assembled nanoparticles based on human serum albumin", *Biomaterials* 33(3), 867-875, (2012).
- [CAL-02] G. A. Calin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, and C. M. Croce, "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(24), 15524-15529 (2002).
- [CAS-11] J. G. Castelló, V. Toccafondo, P. Pérez-Millán, N. S. Losilla, J. L. Cruz, M. V. Andrés, and J. García-Rupérez, "Real-time and low-cost sensing technique based on photonic bandgap structures", *Op. Lett.* 36, 2707-2709 (2011).
- [CAS-12] J. G. Castelló, V. Toccafondo, J. Escorihuela, M. J. Bañuls, A. Maquieira, and J. García-Rupérez, "Real-time observation of antigen-antibody association using a



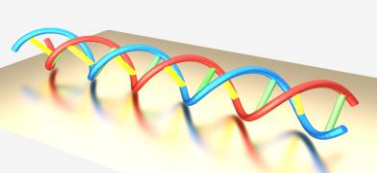
- low-cost biosensing system based on photonic bandgap structures”, *Op. Lett.* 37, 3684-3686 (2012).
- [CASA-12] I. Casanova-Salas, J. Rubio-Briones, A. Fernández-Serra, and J. A. López-Guerrero, “miRNAs as biomarkers in prostate cancer”, *Clin. Transl. Oncol.* 14(11), 803–811 (2012).
- [CHA-05] J. A. Chan, A. M. Krichevsky, and K. S. Kosik, “MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells”, *Cancer Res.* 65(14), 6029–6033 (2005).
- [CHE-08] X. Chen, Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, K. Zen, C. Y. Zhang, “Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases”, *Cell. Res.* 1, 997-1006 (2008).
- [COO-02] M.A. Cooper, “Optical Biosensors in drug discovery”, *Nature Reviews* 1, 515-528 (2002).
- [DEB-07] S. Debernardi, S. Skoulakis, G. Molloy, T. Chaplin, A. Dixon-Mclver, and B. D. Young, “MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid leukaemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis”, *Leukemia* 21(5), 912–916 (2007).
- [DOG-04] A. Dodge, G. Turcatti, I. Lawrence, N. F. de Rooij, and E. Verpoorte, “A Microfluidic Platform Using Molecular Beacon-Based Temperature Calibration for Thermal Dehybridization on Surface-Bound DNA”, *Anal. Chem.* 76(6), 1778-1787 (2004).
- [DOR-08] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, and E. Reimhult, “Electrochemical Biosensors – Sensor Principles and Architectures”, *Sensors* 8(3), 1400-1458 (2008).
- [DUB-01] B. Dubertret, M. Calame, and A. Libchaber, “Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides”, *Nat. Biotechnol.* 19, 365-370 (2001).
- [DUN-06] Dunne, C. Cullmann, M. Ritter, N. M. Soria, B. Drescher, S. Debernardi, S. Skoulakis, O. Hartmann, M. Krause, J. Krauter, A. Neubauer, B. D. Young, and O. Heidenreich, “siRNA-mediated AML1/MTG8 depletion affects differentiation and proliferation-associated gene expression in t(8;21)-positive cell lines and primary AML blasts”, *Oncogene* 25(45), 6067–6078 (2006).
- [DUT-13] H. S. Dutta and S. Pal, “Design of a highly sensitive photonic crystal waveguide platform for refractive index based biosensing”, *Opt. Quantum Electron.* 45(9), 907–917 (2013).
- [ERI-03] D. Erickson, D. Li, and J. Krull, “Modeling of DNA hybridization kinetics for spatially resolved biochips”, *Anal. Biochem.* 317, 186-200 (2003).
- [ESC-12] J. Escorihuela, M. J. Bañuls, R. Puchades, and A. Maquieira, “Development of Oligonucleotide Microarrays onto Si-Based Surfaces via Thioether Linkage Mediated by UV Irradiation”, *Bioconjug. Chem.* 23(10), 2121-2128 (2012).



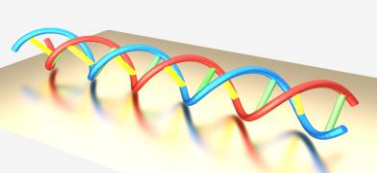
- [ESC-14] J. Escorihuela, M.-J. Bañuls, S. Grijalvo, R. Eritja, R. Puchades, and Á. Maquieira, "Direct Covalent Attachment of DNA Microarrays by Rapid Thiol-Ene "Click" Chemistry", *Bioconjugate Chem.* 25(3), 618-627 (2014).
- [EST-12] M. C. Estevez, M. Alvarez, and L. M. Lechuga, "Integrated optical devices for lab-on-a-chip biosensing applications", *Laser Photonics Rev.* 6(4), 463-487 (2012).
- [FAN-08] X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, and Y. Sun, "Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review", *Anal. Chim. Acta* 620(1-2), 8-26 (2008).
- [FER-09] G. N. M. Ferreira, A.-C. Da-Silva, and B. Tomé, "Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance", *Trends in Biotechnology* 27, 689-697 (2009).
- [FIN-09] S. K. Fineberg, K. S. Kosik, and B. L. Davidson, "MicroRNAs Potentiate Neural Development", *Neuron* 64(3), 303-309 (2009).
- [FUC-10] J. Fuchs, D. Dell'Atti, A. Buhot, R. Calemczuk, M. Macini, and T. Livache, "Effects of formamide on the thermal stability of DNA duplexes on biochips", *Anal. Biochem.* 397, 132-134 (2010).
- [FYF-20] I. Fyfe, "MicroRNAs — diagnostic markers in Parkinson disease?", *Nat. Rev. Neurol.* 16, 65 (2020).
- [GAR-08] J. García, P. Sanchis, A. Martínez, and J. Martí, "1D periodic structures for slow-wave induced non-linearity enhancement", *Opt. Express* 16(5), 3146-3160 (2008).
- [GARC-08] J. García-Rupérez, "Estudio de los fenómenos de onda lenta y dispersión en estructuras periódicas de fotónica integrada", in *Departamento de Comunicaciones Valencia: Universidad Politécnica Valencia* (2008).
- [GCO] GLOBAL CANCER OBSERVATORY|GLOBOCAN 2020, <https://gco.iarc.fr/>, activo a fecha 21/12/2020.
- [GOH-19] S. Y. Goh, Y. X. Chao, S. T. Dheen, E. K. Tan, and S. S. Tay, "Role of MicroRNAs in Parkinson's Disease", *International journal of molecular sciences* 20(22), 5649 (2019).
- [GON-17] D. González-Lucas, M. J. Bañuls, J. García-Rupérez, and Á. Maquieira, "Covalent attachment of biotinylated molecular beacons via thiol-ene coupling. A study on conformational changes upon hybridization and streptavidin binding", *Microchim Acta* 184, 3231-3238 (2017).
- [GONÇ-17] O. Gonçalves, S. Snider, R. Zadoyan, Q. T. Nguyen, H. Vorum, S. B. Petersen, and M. T. Neves-Petersen, "Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications IX", *Proc. Of SPIE* 10079, 100790F-1 (2017).
- [GOO-15] J. A. Goode, J.V. Rushworth, and P. A. Millner. "Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes", *Langmuir* 31, 6267-6276 (2015).



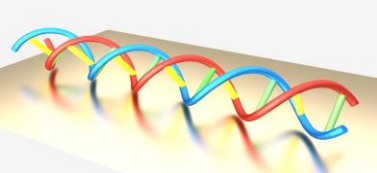
- [GOOD-15] H. Goodarzi, X. Liu, H. C. B. Nguyen, S. Zhang, L. Fish, and S. F. Tavazoie, "Endogenous tRNA-Derived Fragments Suppress Breast Cancer Progression via YBX1 Displacement", *Cell* 161(4), 790–802 (2015).
- [GRA-16] R. M. Graybill and R. C. Bailey, "Emerging Biosensing Approaches for microRNA Analysis", *Anal. Chem.* 88(1), 431–450 (2016).
- [GRS-10] S.M. Grist, L. Chrostowski, and K.C. Cheung, "Optical Oxygen Sensors for Applications in Microfluidic Cell Culture", *Sensors* 10(10), 9286–9316 (2010).
- [GUO-16] Q. Guo, Z. Bai, Y. Liu, and Q. Sun, "A molecular beacon microarray based on a quantum dot label for detecting single nucleotide polymorphisms", *Biosens. Bioelectron.* 77, 107–110 (2016).
- [GUT-15] M. Gutierrez-Arcelus, H. Ongen, T. Lappalainen, S. B. Montgomery, A. Buil, A. Yurovsky, J. Bryois, I. Padioleau, L. Romano, A. Planchon, E. Falconnet, D. Bielser, M. Gagnebin, T. Giger, C. Borel, A. Letourneau, P. Makrythanasis, M. Guipponi, C. Gehrig, S. E. Antonarakis, and E. T. Dermitzakis, "Tissue-Specific Effects of Genetic and Epigenetic Variation on Gene Regulation and Splicing", *PLoS Genet.* 11(1), e1004958 (2015).
- [GVR-20] GRAND VIEW RESEARCH, "Biosensors Market Size Worth \$36.0 Billion By 2027 | CAGR: 7.9%" (2020), <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-biosensors-market>, activo a fecha 25/12/2020.
- [HE-04] L. He and G. J. Hannon, "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation", *Nat. Rev. Genet.* 5(7), 522–531 (2004).
- [HEIN-03] T. Heinlein, J. P. Knemeyer, O. Piestert, and M. J. Sauer, "Photoinduced Electron Transfer between Fluorescent Dyes and Guanosine Residues in DNA-Hairpins", *J. Phys. Chem. B* 107(31), 7957–7964 (2003).
- [HEM-06] C. Hempen and U. Karst, "Labeling strategies for bioassays", *Anal. Bioanal. Chem.* 384(3), 572–583 (2006).
- [HOF-13] E. Hofslis, W. Sjursen, W. S. Prestvik, J. Johansen, M. Rye, G. Trano, H. H. Wasmuth, I. Hatlevoll, and L. Thommensen, "Identification of serum microRNA profiles in colon cancer". *BR. J. Cancer* 108, 1712–1719 (2013).
- [HU-14] S. Hu, Y. Zhao, K. Qin, S. T. Retterer, I. I. Kravchenko, and S. M. Weiss, "Enhancing the Sensitivity of Label-Free Silicon Photonic Biosensors through Increased probe Molecule Density", *ACS Photonics* 1, 590–597 (2014).
- [HUE-16] C. S. Huertas, D. Fariña, and L. M. Lechuga, "Direct and Label-Free Quantification of Micro-RNA-181a at Attomolar Level in Complex Media Using a Nanophotonic Biosensor", *ACS Sens.* 1(6), 748–756 (2016).
- [IQB-15] L. M. Smith, G. Wright, S. Bhagavathi, K. Dybkaer, K. Fu, T. C. Greiner, J. M. Vose, E. Jaffe, L. Rimsza, A. Rosenwald, G. Ott, J. Delabie, E. Campo, R. M. Braziel, J. R. Cook, R. R. Tubbs, J. O. Armitage, D. D. Weisenburger, L. M. Staudt, R. D. Gascoyne, T. W. McKeithan, and W. C. Chan, "Global microRNA expression profiling uncovers molecular markers for classification and prognosis in aggressive B-cell lymphoma", *Blood* 125, 1137–1145, (2015).



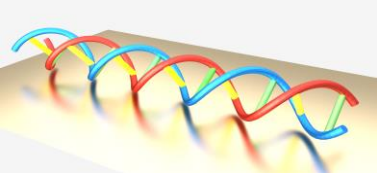
- [JAN-12] M. D. Jansson and A. H. Lund, "MicroRNA and cancer", *Mol. Oncol* 6, 590-610 (2012).
- [JON-08] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C. M. Niemeyer, and H. Waldmann, "Chemical strategies for generating protein biochips", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47(50), 9618–9647 (2008).
- [JOS-18] S. Joshi, V. D. Bhatt, A. Märtil, M. Becherer, and P. Lugli, "Regenerative, Highly-Sensitive, Non-Enzymatic Dopamine Sensor and Impact of Different Buffer System in Dopamine Sensing", *Biosensors* 8,9 (2018).
- [JUD-09] A. D. Judge, M. Robbins, I. Tavakoli, J. Levi, L. Hu, A. Fronda, E. Ambegia, K. McClintock, and I. MacLachlan, "Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice", *J. Clin. Invest.* 119(3), 661–673 (2009).
- [KAU-20] A. Kaur, S. T. Mackin, K. Schlosser, F. L. Wong, M. Elharram, C. Delles, D. J. Stewart, N. Dayan, T. Landry, and L. Pilote, "Systematic review of microRNA biomarkers in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease", *Cardiovascular Research* 116 (6), 1113-1124 (2020).
- [KED-12] S. Kedenburg, M. Vieweg, T. Gissibl, and H. Giessen, "Linear refractive index and absorption measurements of nonlinear optical liquids in the visible and near-infrared spectral region," *Opt. Mater. Express* 2, 1588-1611 (2012).
- [KOT-14] A. Kotnala and R. Gordon, "Double nanohole optical tweezers visualize protein p53 suppressing unzipping of single DNA-hairpins", *Biomed. Opt. Express* 5, 1886-1894 (2014).
- [KRE-01] E. Kress-Rogers, and C.J.B. Brimelow, "Instrumentation and Sensors for the Food Industry", Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2001.
- [KWO-00] W. K. Kwong, "Catalytic biosensors: novel analytical tools and their applications in sports, food and environmental monitoring" (2000).
- [LAG-02] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, and T. Tuschl, "Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse", *Curr. Biol.* 12(9), 735–739 (2002).
- [LEA-15] S. Leahy and Y. Lai. "Regeneration silicon biosensors through thermal ablation with a hot plate", *Sens. Bio-Sens. Res.* 6, 24-27 (2015).
- [LEE-06] J. W. Lee, K. Beebe, L. A. Nangle, J. Jang, C. M. Longo-Guess, S. A. Cook, M. T. Davisson, J. P. Sundberg, P. Schimmel, and S. L. Ackerman, "Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration", *Nature* 443(7107), 50–55 (2006).
- [LEE-09] Y. S. Lee and A. Dutta, "MicroRNAs in Cancer", *Annu. Rev. Pathol.* 4, 199-227 (2009).
- [LI-14] Y. Li, Qiu, J. Tu, B. Geng, J. Yang, T. Jiang, and Q. Cui, "HMDD v2.0: a database for experimentally supported human microRNA and disease associations", *Nucleic Acids Research* 42(D1), D1070–D1074 (2014).



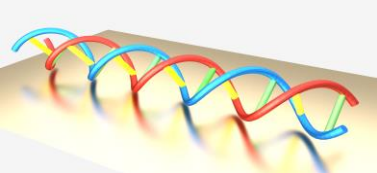
- [LI-15] S. Li, Y. Wang, C. Gao, S. Ge, J. Yu, and M. Yan, ““Signal-off” photoelectrochemical DNA sensing strategy based on target dependent DNA probe conformational conversion using CdS quantum dots sensitized TiO₂ nanorods array as photoactive material”, *Electroanal. Chem.* 759, 38-45 (2015).
- [LI-17] J. Li, Y. Liu, X. Zhu, G. Chang, H. He, X. Zhang, and S. Wang, “A Novel Electrochemical Biosensor Based on a Double-Signal Technique for d(CAG)_n Trinucleotide Repeats”, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9(50), 44231-44240 (2017).
- [LIM-05] L. P. Lim, N. C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J. M. Schelter, J. Castle, D. P. Bartel, P. S. Linsley, and J. M. Johnson, “Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs”, *Nature* 433(7027), 769–773 (2005).
- [LIN-09] C. H. Lin, A. L. Jackson, J. Guo, P. S. Linsley, and R. N. Eisenman, “Myc-regulated microRNAs attenuate embryonic stem cell differentiation”, *EMBO J.* 28(20), 3157–3170 (2009).
- [LIU-17] E. Y. Liu, C. P. Cali, and E. B. Lee, “RNA metabolism in neurodegenerative disease”, *Dis. Model. Mech.* 10(5), 509–518 (2017).
- [LLA-10] J. Llandro, J. J. Palfreyman, A. Ionescu, and C. H. W. Barnes, “Magnetic biosensor technologies for medical applications: a review”, *Me. Biol. Eng. Comput.* 48, 977-988 (2010).
- [LOD-09] M. J. Lodes, M. Caraballo, D. Suci, S. Munro, A. Kumar, and B. Anderson, “Detection of Cancer with Serum miRNAs on an Oligonucleotide Microarray”, *PLoS One* 4(7), e6229 (2009).
- [LOW-89] C. R. Lowe, “Biosensors”, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 324(1224), 487-496 (1989).
- [LUA-19] E. Luan, H. Yun, L. Laplatine, Y. Dattner, D. M. Ratner, K. C. Cheung, and L. Chrostowski, “Enhanced Sensitivity of Subwavelength Multibox Waveguide Microring Resonator Label-Free Biosensors,” *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* 25(3), 1–11 (2019).
- [LUC-12] M. S. Luchansky and R. C. Bailey, “High-Q optical sensors for chemical and biological analysis”, *Anal. Chem.* 84(2), 793–821 (2012).
- [MAN-18] A. Y. Mandourah, L. Ranganath, R. Barraclough, S. Vinjamuri, R. Van’T Hof, S. Hamill, G. Czanner, A. A. Dera, D. Wang, and D. L. Barracloughand, “Circulating microRNAs as potential diagnostic biomarkers for osteoporosis”, *Sci. Rep.* 8, 8421 (2018).
- [MAR-08] C. H. Marrows, “Magnetic Biosensor Techniques”, *Handbook of Biosensors and Biochips* (2008).
- [MAT-87] D. R. Matthews, R. R. Holman, E. Bown, J. Steemson, A. Watson, S. Hughes, and D. Scott, “Pen-sized digital 30-second blood glucose meter”, *Lancet.* 1(8536), 778-779 (1987).
- [MAU-13] R. L. Maute, C. Schneider, P. Sumazin, A. Holmes, A. Califano, K. Basso, and R. Dalla-Favera, “tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA



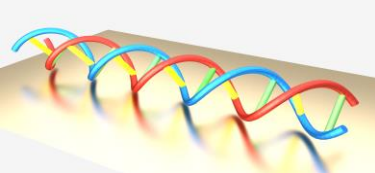
- damage response and is down-regulated in B cell lymphoma”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(4), 1404–1409 (2013).
- [MEI-17] Z. Mei and L. Tang, “Surface-Plasmon-Coupled Fluorescence Enhancement Based on Ordered Gold Nanorod Array Biochip for Ultrasensitive DNA Analysis”, *Anal. Chem.* 89(1), 633-639 (2017).
- [MIA-14] X. Miao, X. Guo, Z. Xiao, and L. Ling, “Electrochemical molecular beacon biosensor for sequence-specific recognition of double-stranded DNA”, *Biosens. Bioelectron.* 59, 54-57 (2014).
- [MIT-08] P. S. Mitchell, R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin, and M. Tewari, “Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, 10513-10518 (2008).
- [MOR-95] T. A. Morton, D. G. Myszka, and I. M. Chaiken, “Interpreting Complex Binding Kinetics from Optical biosensors: A Comparison of Analysis by Linearization, the Integrated Rate Equation, and Numerical Integration”, *Anal. Biochem.* 227, 176-185 (1995).
- [MOR-96] C. L. Morgan, D. J. Newman, and C. P. Price, “Immunosensors: Technology and opportunities in laboratory medicine”, *Clinical Chemistry* 42, 193-209 (1996).
- [MUH-08] P. Muhonen and H. Holthofer, “Epigenetic and microRNA-mediated regulation in diabetes”, *Nephrol. Dial. Transplant.* 24(4), 1088–1096 (2008).
- [NAD-15] E. Nadal, A. Truini, A. Nakata, J. Lin, R. M. Reddy, A. C. Chang, N. Ramnath, N. Gotoh, and D. G. Beer, G. Chen, “A Novel Serum 4-microRNA Signature for Lung Cancer Detection”, *Sci. Rep.* 5, 12464 (2015).
- [NEV-02] M. T. Neves-Petersen, Z. Gryczynski, J. Lakowicz, P. Fojan, S. Pedersen, E. Petersen, and S. B. Petersen, “High probability of disrupting a disulphide bridge mediated by an endogenous excited tryptophan residue”, *Protein Sci.* 11(3), 588–600 (2002).
- [NEV-06] M. T. Neves-Petersen, T. Snabe, S. Klitgaard, M. Duroux, and S. B. Petersen, “Photonic activation of disulfide bridges achieves oriented protein immobilization on biosensor surfaces”, *Protein Sci.* 15, 343-351 (2006).
- [NIM-14] S. B. Nimse, K. Song, M. D. Sonawane, D. R. Sayyed, and T. Kim, “Immobilization Techniques for Microarray: Challenges and Applications”, *Sensors* 14(12), 22208–22229 (2014).
- [NUN-10] P. S. Nunes, N. A. Mortensen, J. P. Kutter, and K. B. Mogensen, “Refractive index sensor based on a 1D photonic crystal in a microfluidic channel”, *Sensors (Basel)* 10(3), 2348–2358 (2010).
- [PAP-17] V. A. Papadimitriou, L. I. Segerink, A. van den Berg, J. C. Eijkel, “Continuous Extraction Depletion Zone Isotachopheresis (edz-ITP)”, in *Proc. μTAS 2017, Georgia, USA, October 2017*.



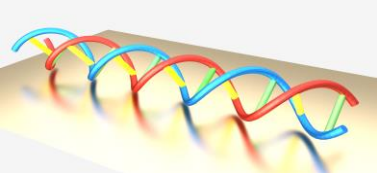
- [PAR-11] A. Parracino, G. P. Gajula, A. Kold di Gennaro, M. T. Neves-Petersen, M. Correia, J. Rafaelsen, and S. B. Petersen, "Photonic Immobilization of BSA for nanobiomedical applications: creation of high density microarrays and superparamagnetic bioconjugates", *Biotechnol. Bioeng.* 108, 999-1010 (2011).
- [PER-07] D. O. Perkins, C. D. Jeffries, L. F. Jarskog, J. M. Thomson, K. Woods, M. A. Newman, J. S. Parker, J. Jin, and S. M. Hammond, "microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder", *Genome Biol.* 8(2), R27 (2007).
- [PHO-15] PHOCNOSIS PROJECT 2015, <https://phocnosis.eu/>, activo a fecha 30/12/2020.
- [POV-05] M. Povinelli, S. Johnson, and J. Joannopoulos, "Slow-light, band-edge waveguides for tunable time delays", *Opt. Express* 13(18), 7145–7159 (2005).
- [QAV-10] A. J. Qavi, and R. C. Bailey, "Multiplexed Detection and Label-Free Quantitation of MicroRNAs Using Arrays of Silicon Photonic Microring Resonators", *Angew. Chem. Int.* 49, 4608-4611 (2010).
- [QAV-11] A. J. Qavi, J. T. Kindt, M. A. Gleeson, and R. C. Bailey, "Anti-DNA: RNA Antibodies and Silicon Photonic Microring Resonators: Increased Sensitivity for Multiplexed microRNA Detection", *Anal. Chem* 83(15), 5949-5956 (2011).
- [QIN-16] K. Qin, S. Hu, S. T. Retterer, I. I. Kravchenko, and S. M. Weiss, "Slow light Mach-Zehnder interferometer as label-free biosensor with scalable sensitivity", *Opt. Letters* 41(4), 753-756 (2016).
- [RAI-12] V. Rai, Y. T. Nyine, H. C. Hapuarachchi, H. M. Yap, L. C. Ng, and C.-S. Toh, "Electrochemically amplified molecular beacon biosensor for ultrasensitive DNA sequence-specific detection of Legionella sp.", *Biosens. Bioelectron.* 32, 133-140 (2012).
- [RAM-08] A. Ramachandran, S. Wang, J. Clarke, S. J. Ja, D. Goad, L. Wald, E. M. Flood, E. Knobbe, J. V. Hryniewicz, S. T. Chu, D. Gill, W. Chen, O. King, and B. E. Little, "A universal biosensing platform based on optical micro-ring resonators", *Biosens. Bioelectron.* 23, 939-944 (2008).
- [RAS-10] R. P. Rastogi, A. K. Richa, M. B. Tyagi and R. P. Sinha, "Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair", *J. Nucleic Acids* 2010, 592980 (2010).
- [RIC-01] P. V. Riccelli, F. Merante, K. T. Leung, S. Bortolin, R. L. Zastawny, R. Janeczko, and A. S. Benight, "Hybridization of single-stranded DNA targets to immobilized complementary DNA probes: comparison of hairpin versus linear capture probes", *Nucleic Acids Res.* 29(4), 996–1004 (2001).
- [ROG-11] K. Rogers and A. Mulchandani, "Affinity Biosensors: Techniques and Protocols", Softcover reprint of hardcover 1st ed. 1998, Humana Press (2011).
- [RON-10] N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, "Electrochemical biosensors", *Chem. Soc. Rev.* 39, 1747 (2010).
- [SAB-09] M. Saberi, D. Bjelica, S. Schenk, T. Imamura, G. Bandyopadhyay, P. Li, V. Jadhar, C. Vargeese, W. Wang, K. Bowman, Y. Zhang, B. Polisky, and J. M. Olefsky, "Novel



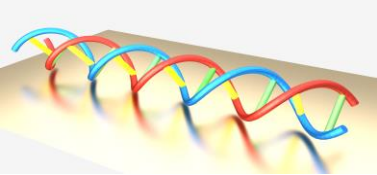
- liver-specific TORC2 siRNA corrects hyperglycemia in rodent models of type 2 diabetes”, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297(5), E1137–E1146 (2009).
- [SAB-19] J. Sabek, F. J. Díaz-Fernández, L. Torrijos-Morán, Z. Díaz-Betancor, Á. Maquieira, M.-J. Bañuls, E. Pinilla-Cienfuegos, and J. García-Rupérez, “Experimental study of an evanescent-field biosensor based on 1D photonic bandgap structures” *J. Beilstein J. Nanotechnol.* 10, 967–974 (2019).
- [SAP-15] SAPHELY PROJECT 2015, <https://saphely.eu/>, activo a fecha 29/12/2020.
- [SCH-12] O. Scheler, J. T. Kindt, A. J. Qavi, L. Kaplinski, B. Glynn, T. Barry, A. Kurg, and R. C. Bailey, “Label-free, multiplexed detection of bacterial tmRNA using silicon photonic microring resonators”, *Biosens. Bioelectron.* 36(1), 56-61 (2012).
- [SEP-06] B. Sepúlveda, J. S. Río, M. Moreno, F. J. Blanco, K. Mayora, C. Domínguez, and L. M. Lechuga, “Optical biosensor microsystems based on the integration of highly sensitive Mach-Zehnder interferometer devices”, *J. Opt. A* 8(7), S561–S566 (2006).
- [SEY-05] M. Seydack, “Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods”, *Biosens. Bioelectron.* 20(12), 2454–2469 (2005).
- [SIA-20] G. Siasos, E. Bletsas, P. K. Stampouloglou, E. Oikonomou, V. Tsigkou, S. A. Paschou, K. Vlasis, G. Marinos, M. Vavuranakis, C. Stefanadis, and D. Tousoulis, “MicroRNAs in cardiovascular disease”, *Hellenic Journal of Cardiology* 61 (3), 165-173 (2020).
- [SKO-09] E. Skovsen, A. B. Kold, M. T. Neves-Petersen, and S. B. Petersen, “Photonic Immobilization of High Density Protein Arrays Using Fourier Optics”, *Proteomics* 9, 3945–3948 (2009).
- [SOL-95] L. B. Soldano, and E. Pennings, “Optical multi-mode interference devices based on self-imaging: principles and applications”, *J. Lightwave Technol.* 13, 615-627 (1995).
- [SRI-08] M. Srisa-Art, E. C. Dyson, A. J. deMello, and J. B. Edel, “Monitoring of Real-Time Streptavidin-Biotin Binding Kinetics Using Droplet Microfluidics”, *Anal. Chem.* 80, 7063-7067 (2008).
- [STR-09] S. Streit, C. W. Michalski, M. Erkan, J. Kleeff, and H. Friess, “Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues”, *Nat. Protoc.* 4(1), 37–43 (2009).
- [SU-14] Q. Su, D. Wesner, H. Schönderr, and G. Nöll, “Molecular Beacon Modified Sensor Chips for Oligonucleotide Detection with Optical Readout”, *Langmuir* 30, 14360-14367 (2014).
- [SWA-19] S. Swarbrick, N. Wragg, S. Ghosh, and A. Stolzing, “Systematic Review of miRNA as Biomarkers in Alzheimer’s Disease”, *Mol. Neurobiol.* 56, 6156–6167 (2019).
- [TAI-06] D. Taillaert, F. Van Laere, M. Ayre, W. Bogaerts, D. Van Thourhout, P. Bienstman, and R. Baets, “Grating Couplers for Coupling between Optical Fibers and Nanophotonic Waveguides”, *Jpn. J. Appl. Phys.* 45(8A), 6071-6077 (2006).



- [THA-16] S. Thakur, R. K. Grover, S. Gupta, A. K. Yadav, and B. C. Das, "Identification of Specific miRNA Signature in Paired Sera and Tissue Samples of Indian Women with Triple Negative Breast Cancer", *PLoS One* 11(7), e0158946 (2016).
- [TOC-10] V. Toccafondo, J. García-Rupérez, M. J. Bañuls, A. Griol, J. G. Castelló, S. Peransi-Llopis, and A. Maquieira, "Single-strand DNA detection using a planar photonic-crystal-waveguide-based sensor", *Opt. Lett.* 35(21), 3673–3675 (2010).
- [TYA-96] S. Tyagi and F. R. Kramer, "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization", *Nat. Biotechnol.* 14(3), 303–308 (1996).
- [VAI-03] A. Vainrub and B. M. Pettitt, "Sensitive Quantitative Nucleic Acid Detection Using Oligonucleotide Microarrays", *J. Am. Chem. Soc.* 125(26), 7798-7799 (2003).
- [VAN-07] F. Van Laere, T. Claes, J. Schrauwen, S. Scheerlinck, W. Bogaerts, D. Taillaert, L. O'Faolain, D. Van Thourhout, and R. Baets, "Compact focusing grating couplers for silicon-on-insulator integrated circuits", *IEEE Photonics Technol. Lett.* 19, 1919–1921 (2007).
- [VAN-11] D. Van Lierop, K. Faulds, and D. Graham, "Separation Free DNA Detection Using Surface Enhanced Raman Scattering", *Anal. Chem.* 83(15), 5817-5821 (2011).
- [VAR-08] E. Várallyay, J. Burgyán, and Z. Havelda, "MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes" *Nat. Protoc.* 3(2), 190–196 (2008).
- [VOL-06] S. Volinia, G. A. Calin, C.-G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris, and C. M. Croce, "A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2257-2261 (2006)
- [VOS-07] K. De Vos, I. Bartolozzi, E. Schacht, P. Bienstman, and R. Baets, "Silicon-on-Insulator micro ring resonator for sensitive and label-free biosensing", *Optics Express* 15(12), 7610 (2007).
- [WAL-08] M. D. Walker, "Role of MicroRNA in Pancreatic β -Cells: where More is less", *Diabetes* 57(10), 2567–2568 (2008).
- [WAN-00] J. Wang, "From DNA biosensors to gene chips", *Nucleic Acids Research* 28, 3011-3016 (2000).
- [WAN-09] K. Wang, Z. Tang, C. J. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, Z. Cao, J. Li, P. Colon, H. Lin, and W. Tan, "Molecular engineering of DNA: molecular beacons", *Angew. Chem. Int. Ed.* 48(5), 856-870 (2009).
- [WAN-12] J. Wang, X. Yi, H. Tang, H. Han, M. Wu, and F. Zhou, "Direct quantification of microRNA at low PM level in sera of glioma patients using a competitive hybridization followed by amplified voltammetric detection", *Anal. Chem.* 86, 6400-6406 (2012).
- [WAN-14] S. Y. Wang, S. Shiboski, C. D. Belair, M. R. Cooperberg, J. P. Simko, H. Stoppler, J. Cowan, and P. R. Carroll, R. Blesloch, "miR-19, miR-345, miR-519c-5p serum levels predict adverse pathology in prostate cancer patients eligible for active surveillance". *PLoS One* 9, e98597 (2014).



- [WAN-19] M. Wan, L. Qin, and B. Tang. "MicroRNAs in Alzheimer's Disease", *Frontiers in genetics* 10, 153 (2019).
- [WANG-14] J. G. Wangüemert-Pérez, P. Cheben, A. Ortega-Moñux, C. Alonso-Ramos, D. Pérez-Galacho, R. Halir, Í. Molina-Fernández, D.-X. Xu, and J. H. Schmid, "Evanescent field waveguide sensing with subwavelength grating structures in silicon-on-insulator," *Opt. Lett.* 39(15), 4442–4445 (2014).
- [WANG-19] J. G. Wangüemert-Pérez, A. Hadij-ElHouati, A. Sánchez-Postigo, J. Leuermann, D.-X. Xu, P. Cheben, A. Ortega-Monux, R. Halir, and Í. Molina-Fernández, "[INVITED] Subwavelength structures for silicon photonics biosensing", *Opt. Laser Technol.* 109, 437–448 (2019).
- [WEI-03] F. Wei, B. Sun, W. Liao, J. Ouyang, and X. Sheng Zhao, "Achieving differentiation of single-base mutations through hairpin oligonucleotide and electric potential control", *Biosens. Bioelectron.* 18(9), 1149-1155 (2003).
- [WHO] WHO|Cancer, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, activo a fecha 21/12/2020.
- [WIL-02] D. S. Wilson and S. Nock, "Functional protein microarrays ", *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6(1), 81–85 (2002).
- [WIL-96] D. J. Williams and K. B. Hall, "Thermodynamic Comparison of the Salt Dependence of Natural RNA Hairpins and RNA Hairpins with Non-Nucleotide Spacers", *Biochemistry* 35(46), 14665-14670 (1996).
- [WIN-10] D. Winrich, M. Köhn, P. Jonkheijm, U. Westerlind, L. Dehmelt, H. Engelkamp, P. C. M. Christianen, J. Kuhlmann, J. D. Maan, D. Nüsse, H. Schröder, R. Wacker, E. Voges, R. Breinbauer, H. Kunz, C. M. Niemeyer, and H. Waldmann, "Preparation of Biomolecule Microstructures and Microarrays by Thiol-ene Photoimmobilization", *ChemBioChem* 11, 235-247 (2010).
- [ZHA-15] L. Zhang, Y. Xu, X. Jin, Z. Wang, Y. Wu, D. Zhao, G. Chen, D. Li, X. Wang, H. Cao, Y. Xie, and Z. Liang, "A circulating miRNA signature as a diagnostic biomarker for non-invasive early detection of breast cancer". *Breast Cancer Res. Treat.* 154(2), 423-434 (2015).
- [ZHE-15] J. Zheng, R. Yang, M. Shi, C. Wu, X. Fang, Y. Li, J. Li, and W. Tan, "Rationally designed molecular beacons for bioanalytical and biomedical applications", *Chem. Soc. Rev.* 44(10), 3036-3055 (2015).



Lista de Figuras

- Figura 1.1.** Estimación de la incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial, expresada en número de casos anuales en 2020. Fuente: GLOBOCAN 2020. -----2
- Figura 1.2.** Dispositivos POC: a) i-STAT de Abbott; b) cobas h 232 de Roche; c) Maverick Detection System de Genalyte. -----4
- Figura 1.3.** Representación esquemática del principio de funcionamiento de un biosensor. La muestra a analizar se pone en contacto con el dispositivo, siendo posible detectar solamente el analito para el que está diseñado el receptor. Cuando tiene lugar la reacción de reconocimiento biológico se producen una serie de cambios físico-químicos detectados por el transductor, que produce una señal cuantificable, directamente proporcional a la concentración del analito. -----5
- Figura 1.4.** Ilustración esquemática del principio de detección de campo evanescente: la onda evanescente se propaga a lo largo de la superficie de la estructura fotónica e interacciona con la capa biológica de reconocimiento molecular a) bioreceptores y b) complejo analito-receptor. ---- 10
- Figura 1.5.** Representación de las configuraciones típicas de estructuras fotónicas integradas: a) anillo resonante; b) interferómetro Mach-Zehnder; c) cristal fotónico. ----- 10
- Figura 1.6.** Ilustración de la interacción entre el analito y la onda evanescente (izquierda) sin la inmovilización sobre la superficie de los bioreceptores y (derecha) en presencia de éstos. Una capa biológica gruesa conduce a una interacción más débil. ----- 11
- Figura 1.7.** Representación del concepto del fenómeno de onda lenta en una estructura periódica 1D. La velocidad de la onda se reduce y su amplitud aumenta, mejorando la interacción luz-materia. ---- 13
- Figura 1.8.** Descripción esquemática del principio de transducción de estructuras de *band gap* fotónico 1D en la detección de miRNAs: a1) Espectro de transmisión antes de la interacción biomolecular; a2) Espectro de transmisión después de la interacción biomolecular, la cual origina un desplazamiento espectral del PBG; c) Desplazamiento experimentado por el PBG tras la detección de miRNAs. ----- 14
- Figura 1.9.** Distribución de las capas de una oblea SOI. El recuadro muestra esquemáticamente una guía de ondas SOI. ----- 15
- Figura 1.10.** Representación esquemática del confinamiento de la luz en una guía de ondas SOI, debido al alto contraste de índices de refracción. ----- 16
-
- Figura 2.1.** Estructuras de *band gap* fotónico estudiadas teóricamente. Para cada configuración se indica el nombre y el alias utilizado para su denominación. ----- 24
- Figura 2.2.** Ejemplos de visualización de diferentes planos de corte de una estructura de *band gap* fotónico usando MayaVi. ----- 27
- Figura 2.3.** Ejemplo de un diagrama de bandas de una estructura de *band gap* fotónico (corr3D), considerando sobre su superficie agua (color rojo) y SiO₂ (color azul). ----- 27
- Figura 2.4.** a) Ejemplo de una estructura de *band gap* fotónico (corr3D) simulada en CST. b) Propagación del modo TE a lo largo de la estructura. ----- 29
- Figura 2.5.** Ejemplo de un espectro de transmisión proporcionado por una estructura de *band gap* fotónico (corr3D) mediante simulaciones CST. ----- 29
- Figura 2.6.** a) Diagrama de bandas; b) Espectro de transmisión; proporcionados por una de las configuraciones óptimas de la estructura corr3D ($a=400$ nm, $w_i=100$ nm y $w_e=2000$ nm). ----- 31

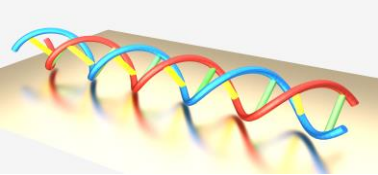


Figura 2.7. a) Diagrama de bandas; b) Espectro de transmisión; proporcionados por una de las configuraciones óptimas de la estructura corr3D ($a=380$ nm, $w_i=120$ nm y $w_e=1500$ nm). -----	32
Figura 2.8. a) Diagrama de bandas; b) Espectro de transmisión; proporcionados por la configuración óptima de la estructura corr3Dinv ($a=500$ nm, $w_i=350$ nm y $w_e=100$ nm). -----	33
Figura 2.9. a) Diagrama de bandas; b) Espectro de transmisión; proporcionados por la configuración óptima de la estructura corr3Dslot ($a=500$ nm, $w_i=340$ nm y $w_e=450$ nm).-----	34
Figura 2.10. a) Diagrama de bandas; b) Espectro de transmisión; proporcionados por la configuración óptima de la estructura 1Dsquareholes3D ($a=500$ nm, $w_i=230$ nm y $w_e=250$ nm).-----	35
Figura 2.11. a) Diagrama de bandas; b) Espectro de transmisión; proporcionados por la configuración óptima de la estructura corr+squareholes3D ($a=500$ nm, $w_{i_corr}=100$ nm, $w_{e_corr}=1000$ nm, $w_{i_hole}=390$ nm $w_{e_hole}=250$ nm). -----	37
Figura 2.12. Esquema de la metodología empleada durante el proceso de fabricación de estructuras de <i>band gap</i> fotónico. -----	38
Figura 2.13. Izquierda: Ejemplo del típico diseño del chip fotónico empleado para caracterizar las estructuras de <i>band gap</i> fotónico. Derecha: Ejemplo de varias de las estructuras periódicas 1D incluidas en el diseño. -----	39
Figura 2.14. a) Representación esquemática del principio de funcionamiento de un GC; b) Respuesta óptica del GC. [TAI-06].-----	40
Figura 2.15. Ejemplo de un diseño de un chip fotónico cuya distancia entre sus accesos de entrada y de salida es 10 mm. -----	41
Figura 2.16. Representación esquemática del proceso de fabricación de nanoestructuras fotónicas. ---	42
Figura 2.17. Imágenes SEM preliminares de algunas estructuras de <i>band gap</i> fotónico fabricadas. -----	43
Figura 2.18. Imágenes SEM de algunas estructuras de <i>band gap</i> fotónico optimizadas y del <i>taper</i> introducido entra la guía de acceso/salida y la estructura corr3D. -----	43
Figura 2.19. Resultados de la caracterización AFM, la cual determina una rugosidad lateral de las guías de onda de 2 nm. -----	44
Figura 2.20. Intensidad normalizada del campo evanescente en función de la distancia a la superficie de la estructura de <i>band gap</i> fotónico obtenida mediante SNOM (color morado) y simulaciones FDTD (color azul). Las áreas sombreadas representan la desviación estándar a lo largo del área de la estructura resaltada en los recuadros [SAB-19]. -----	45
Figura 2.21. a) Imagen de la plataforma de interrogación fibra a fibra. En la pantalla de la derecha de la imagen, se aprecia una imagen de las dos fibras utilizadas para acoplar la luz a la entrada y salida de la estructura fotónica del chip. b) Detalle de las dos fibras utilizadas para medir las estructuras fotónicas en el chip. -----	45
Figura 2.22. Representación esquemática del acoplo de la luz al chip fotónico mediante GCs y control visual del alineamiento.-----	46
Figura 2.23. Diagrama esquemático de la interconexión de los elementos involucrados en la plataforma de interrogación basada en la caracterización fibra a fibra. -----	47
Figura 2.24. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de <i>band gap</i> fotónico (corr3D) antes y después de cubrir el chip fotónico con un revestimiento de SiO ₂ .-----	48
Figura 2.25. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de <i>band gap</i> fotónico (corr3D) expuesta con diferentes dosis y cubierta de SiO ₂ . -----	48
Figura 2.26. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de <i>band gap</i> fotónico (corr3D) expuesta con diferentes dosis y cubierta de SiO ₂ . -----	49
Figura 2.27. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de <i>band gap</i> fotónico (corr3D) escaneando su parámetro w_i .-----	49
Figura 2.28. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de <i>band gap</i> fotónico (corr3D) escaneando su parámetro w_i .-----	50

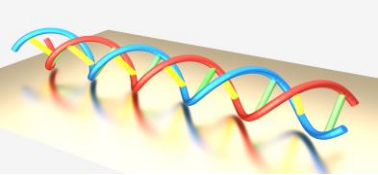
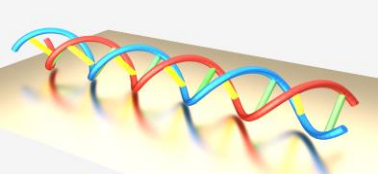
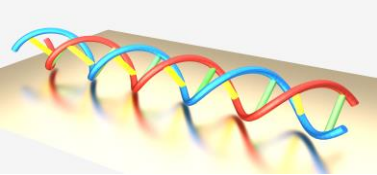


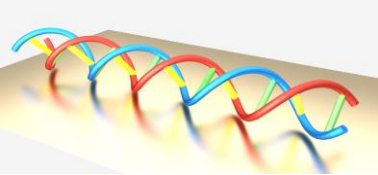
Figura 2.29. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por dos estructuras de <i>band gap</i> fotónico (corr3D) cuyos parámetros nominales son idénticos. -----	50
Figura 2.30. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de <i>band gap</i> fotónico (corr3D) considerando sobre su superficie agua (color rojo) y una disolución del 10% de etanol en agua (color azul). -----	51
Figura 2.31. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de <i>band gap</i> fotónico (corr3Dinv) expuesta con diferentes dosis. -----	52
Figura 2.32. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de <i>band gap</i> fotónico (corr3Dinv) escaneando su parámetro w_i . -----	52
Figura 2.33. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de <i>band gap</i> fotónico (corr3Dinv) considerando agua (color rojo) e IPA sobre su superficie. -----	53
Figura 2.34. Espectro de transmisión proporcionado experimentalmente por una estructura de <i>band gap</i> fotónico (corr3Dinv) considerando agua (color rojo) y una disolución del 10% de etanol en agua (color azul) sobre su superficie. -----	54
Figura 3.1. Representación esquemática de la configuración óptima de la estructura de <i>band gap</i> fotónico. (La estructura periódica de silicio es fabricada sobre un revestimiento inferior de SiO_2). -----	58
Figura 3.2. a) Diagrama de bandas y b) espectro de transmisión; de la estructura de <i>band gap</i> fotónico. -----	59
Figura 3.3. Explicación esquemática del principio de funcionamiento de una sonda MB, marcada con un fluoróforo, en el bioeconamiento de oligonucleótidos. -----	59
Figura 3.4. Esquema del evento de hibridación de los oligonucleótidos objetivo con las sondas MB inmovilizadas en la superficie de una estructura de <i>band gap</i> fotónico. -----	60
Figura 3.5. Explicación esquemática del desplazamiento espectral del borde del PBG cuando la sonda MB reconoce el oligonucleótido objetivo. (RI: índice de refracción). -----	60
Figura 3.6. Distribución de los elementos contenidos en el chip fotónico para realizar la detección multiplexada de oligonucleótidos. a) GCs de entrada, b) curvas encargadas de distribuir la luz a lo largo del chip, c) pareja de estructuras de <i>band gap</i> fotónico, arriba: guía de referencia, d) guía de referencia central, e) GCs de salida. -----	61
Figura 3.7. Distribución del campo eléctrico a lo largo de un MMI de longitud $10\ \mu\text{m}$ y anchura $2\ \mu\text{m}$. -----	63
Figura 3.8. Respuesta espectral proporcionada por MMIs cuyas longitudes son 3 , $3,1$ y $3,2\ \mu\text{m}$. -----	63
Figura 3.9. Respuesta espectral proporcionada por el MMI diseñado considerando diferentes recubrimientos superiores: aire (AIR), agua (DIW), PDMS y PMMA. -----	64
Figura 3.10. Espectro de transmisión proporcionado por un MMI cubierto de SiO_2 y cuya longitud es $3,2\ \mu\text{m}$. -----	65
Figura 3.11. Imagen del chip fotónico fabricado en tecnología SOI. El rectángulo rojo muestra una imagen SEM de la estructura de <i>band gap</i> fotónico incluida en el chip. -----	65
Figura 3.12. Configuración óptima de la sonda MB diseñada para la detección de biomarcadores miRNA-155. -----	66
Figura 3.13. Diagrama esquemático de la biofuncionalización del chip fotónico. La flecha amarilla indica el sentido de flujo de los oligonucleótidos objetivo durante el experimento. -----	67
Figura 3.14. Imagen CFM de la estructura de <i>band gap</i> fotónico biofuncionalizada usando sondas MB marcadas con un fluoróforo. -----	68
Figura 3.15. Diagrama esquemático de la interconexión de los elementos que componen la plataforma de interrogación basada en la adquisición de la respuesta espectral mediante una cámara de IR. -----	68
Figura 3.16. Diagrama esquemático que indica cómo la luz de salida es redirigida al plano horizontal mediante un espejo en la salida del chip fotónico. -----	69
Figura 3.17. Imagen de la plataforma de interrogación óptica basada en la continua adquisición de la respuesta espectral de estructuras nanofotónicas mediante una cámara IR. -----	70



- Figura 3.18.** Imágenes de la plataforma de interrogación óptica basada en una cámara de IR. Detalles del soporte del chip y las etapas de acoplamiento de la luz de entrada/salida.----- 70
- Figura 3.19.** a) Imagen del canal microfluídico de la celda PDMS utilizada en los experimentos de detección de oligonucleótidos. b) Ensamblaje de la celda PDMS con el chip fotónico. ----- 71
- Figura 3.20.** Espectro de transmisión proporcionado por la pareja 1 de las estructuras biofuncionalizadas con MBs en un flujo de SSC 5X. ----- 72
- Figura 3.21.** Espectro de transmisión proporcionado por la pareja 2 de las estructuras biofuncionalizadas con MBs en un flujo de SSC 5X. ----- 72
- Figura 3.22.** Espectro de transmisión proporcionado por la pareja de las estructuras bloqueadas con BSA en un flujo de SSC 5X.----- 72
- Figura 3.23.** Evolución espectral de la posición del borde del PBG proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con sondas MB cuando el oligonucleótido objetivo es fluido sobre su superficie. La evolución espectral de cada pareja es representada en un color diferente y se usan diferentes formatos de línea para indicar distintas anchuras de sus elementos transversales. ----- 73
- Figura 3.24.** Evolución espectral de la posición del borde del PBG proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico bloqueadas con BSA cuando el oligonucleótido objetivo es fluido sobre su superficie. Se usan diferentes formatos de línea para indicar distintas anchuras de sus elementos transversales. ----- 74
- Figura 3.25.** a) Fluorescencia observada (izquierda) tras la detección de oligonucleótidos y su posición relativa en el chip fotónico (derecha). b) Valores de intensidad de fluorescencia medidos en cada pareja de estructuras de *band gap* fotónico tras la detección de oligonucleótidos. ----- 76
-
- Figura 4.1.** Esquema del evento de hibridación de los oligonucleótidos objetivo con las sondas MB inmovilizadas en la superficie de una estructura de *band gap* fotónico.----- 78
- Figura 4.2.** Diagrama esquemático de la biofuncionalización del chip fotónico. La flecha amarilla indica el sentido de flujo de los oligonucleótidos objetivo durante el experimento. ----- 79
- Figura 4.3.** a) Ensamblaje de la celda fabricada por microTEC con el chip fotónico. b) Imagen de la tapa superior de la celda, la cual contiene el canal microfluídico de caucho. ----- 80
- Figura 4.4.** Imagen del chip fotónico ensamblado y posicionado en la plataforma de interrogación óptica e imagen detallada del canal microfluídico.----- 80
- Figura 4.5.** Espectros de transmisión en un flujo de SSC 5X proporcionados por estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con sondas MB a) sin estreptavidina; b) con estreptavidina (MB+St). 81
- Figura 4.6.** Evolución temporal de la posición espectral del borde del PBG proporcionado por las estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con sondas MB a) sin estreptavidina; b) con estreptavidina (MB+St).----- 82
- Figura 4.7.** Evolución temporal de la posición del borde del PBG proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico con idénticas dimensiones, en cuya superficie se han inmovilizado sondas MB marcadas (MB+St) y sin marcar con estreptavidina. ----- 83
- Figura 4.8.** Evolución temporal de la posición espectral del borde del PBG proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico ante las variaciones de índice de refracción originadas por el flujo de SSC 5X, agua ultrapura y SSC 5X de nuevo. ----- 84
- Figura 4.9.** Evolución temporal normalizada de la posición del borde del PBG proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico, en cuya superficie se han inmovilizado sondas MB y sondas MB marcadas con estreptavidina (MB+St). ----- 85
- Figura 4.10.** a) Representación esquemática del desplazamiento sufrido por la estreptavidina desde la superficie de la estructura de *band gap* fotónico cuando la sonda MB cambia su conformación debido a la hibridación con el oligonucleótido objetivo. b) Representación esquemática de la

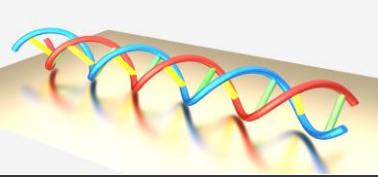


- respuesta de detección del sensor de onda evanescente cuando es biofuncionalizado con sondas MB marcadas con estreptavidina.----- 86
- Figura 5.1.** Imágenes tomadas con el microscopio óptico que muestran los cortes/roturas producidos en las guías monomodo. Las guías monomodo y multimodo son representadas en rojo y azul en el diseño GDS, respectivamente. ----- 91
- Figura 5.2.** Imágenes de las guías monomodo contenidas en el diseño GDS del chip fotónico usado para su fabricación. ----- 92
- Figura 5.3.** Nuevo diseño GDS usado para la fabricación del chip fotónico, sobre el que se deposita un revestimiento superior de SiO₂. El rectángulo azul muestra el área sobre las estructuras de *band gap* fotónico, cuya capa de SiO₂ será eliminada. ----- 93
- Figura 5.4.** a) Diseño de “fabricación casera” de la máscara para abrir ventanas sobre el recubrimiento superior de SiO₂ del chip fotónico. b) Imagen tomada con el microscopio después de abrir la ventana sobre las estructuras de *band gap* fotónico contenidas en el chip. ----- 93
- Figura 5.5.** Configuración óptima de la sonda MB diseñada para la detección del biomarcador miRNA-21. ----- 94
- Figura 5.6.** Representación esquemática de la tecnología LAMI empleada para el bioreconocimiento del biomarcador miRNA-21. ----- 95
- Figura 5.7.** Representación esquemática del proceso de iluminación aplicado en la tecnología LAMI. --- 96
- Figura 5.8.** a) Imagen CFM de la fluorescencia Cy3 emitida de acuerdo al patrón de línea de iluminación definido. b) Promedio de la intensidad de emisión de fluorescencia. ----- 96
- Figura 5.9.** Izquierda: Imagen del chip fotónico optimizado fabricado en tecnología SOI que contiene estructuras de *band gap* fotónico. Derecha: Diagrama esquemático de la biofuncionalización del chip fotónico. La flecha amarilla indica el sentido de flujo de los biomarcadores miRNA-21 durante el experimento. ----- 97
- Figura 5.10.** Espectro de transmisión proporcionado por la pareja 1 (izquierda) y pareja 2 (derecha) de estructuras de *band gap* fotónico funcionalizadas con MBs. Los colores azul y rojo representan anchuras de los elementos transversales $w_i=120$ nm y $w_i=140$ nm respectivamente. ----- 98
- Figura 5.11.** Espectro de transmisión proporcionado por la pareja 3 (izquierda) y la pareja 4 (derecha) de estructuras de *band gap* fotónico usadas de control. Los colores azul y rojo representan anchuras de los elementos transversales $w_i=120$ nm y $w_i=140$ nm respectivamente. ----- 98
- Figura 5.12.** Evolución espectral de la posición del borde del PBG proporcionada por cada pareja de estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con MBs y por una estructura de control (representada en color gris). a) Pareja 1. b) Pareja 2. ----- 99
- Figura 5.13.** Evolución temporal de la posición espectral del borde del PBG proporcionado por las estructuras de *band gap* fotónico ante las variaciones de índice de refracción originadas por el flujo de agua ultrapura y etanol 5% en la misma. ----- 101
- Figura 5.14.** Evolución temporal normalizada de la posición del borde del PBG proporcionada por las estructuras de *band gap* fotónico biofuncionalizadas con sondas MB. ----- 102
- Figura 5.15.** a) Fluorescencia observada (izquierda) tras la detección de biomarcadores miRNA-21 y su posición relativa en el chip fotónico (derecha). b) Valores de intensidad de fluorescencia medidos en cada pareja de sensores tras la detección de biomarcadores miRNA-21. ----- 102
- Figura 5.16.** Representación esquemática de sendos eventos: bioreconocimiento de miRNAs y regeneración química del sensor, siendo éste una estructura de *band gap* fotónico biofuncionalizada con sondas MB. ----- 104
- Figura 5.17.** Ejemplos de la evolución temporal de la posición espectral en la detección de biomarcadores miRNA-155 antes y después de la regeneración en línea. ----- 105



Lista de Tablas

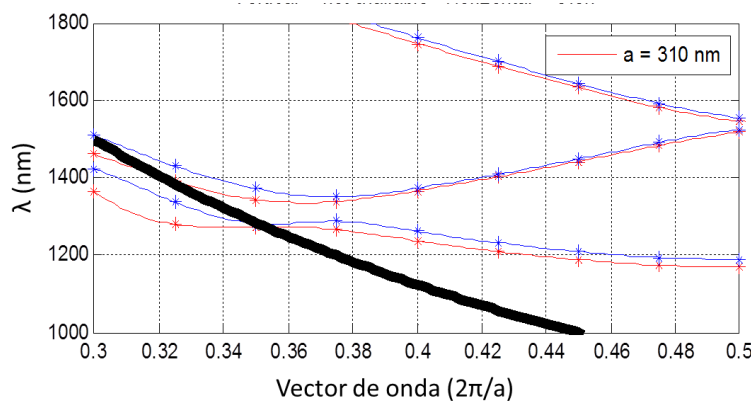
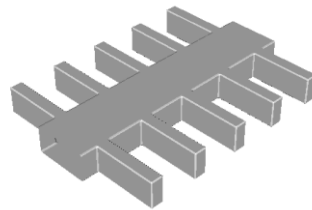
Tabla 1.1. Comparativa de las características generales de los biosensores y las técnicas convencionales.	7
Tabla 2.1. Resultados obtenidos en las simulaciones de las estructuras de <i>band gap</i> fotónico (corr3D) que proporcionan mayores valores de sensibilidad.	31
Tabla 2.2. Resultados obtenidos en las simulaciones de las estructuras de <i>band gap</i> fotónico (corr3Dinv) que proporcionan mayores valores de sensibilidad.	33
Tabla 2.3. Resultados obtenidos en las simulaciones de las estructuras de <i>band gap</i> fotónico (corr3Dslot) que proporcionan mayores valores de sensibilidad.	34
Tabla 2.4. Resultados obtenidos en las simulaciones de las estructuras de <i>band gap</i> fotónico (1Dsquareholes3D) que proporcionan mayores valores de sensibilidad.	35
Tabla 2.5. Resultados obtenidos en las simulaciones de las estructuras de <i>band gap</i> fotónico (corr+squareholes3D) que proporcionan mayores valores de sensibilidad.	36
Tabla 4.1. Secuencia del oligonucleótido objetivo 35-mer y secuencia de la sonda MB óptima diseñada para su detección.....	79
Tabla 4.2. Desplazamientos espectrales de PBG medidos en el bioreconocimiento de los oligonucleótidos objetivo y en el ciclo de calibración. La última columna indica los desplazamientos del borde de PBG normalizados para el experimento de detección de los oligonucleótidos objetivo. *Denota los resultados mostrados en el capítulo 3.	84
Tabla 5.1. Candidatos biomarcadores miRNA identificados para los tipos de cáncer con mayor tasa de incidencia en la sociedad mundial.	89
Tabla 5.2. Desplazamientos espectrales de PBG medidos en el reconocimiento de biomarcadores miRNA-21 y en el ciclo de calibración. La última columna registra los desplazamientos del borde del PBG normalizados.	101
Tabla 6.1. Desplazamiento del PBG obtenido considerando diferentes anchuras de los elementos transversales de las estructuras de <i>band gap</i> fotónico, técnicas de biofuncionalización, sistemas de suministro microfluídico y chips fotónicos.	111



Anexo A Simulación

El presente anexo se incluye para completar el estudio de optimización de diseño de estructuras de *band gap* fotónico descrito en el capítulo 2. En este anexo se muestra un análisis más detallado de algunos de los resultados obtenidos mediante las simulaciones PWE y FDTD, cuyo objetivo consiste en determinar las configuraciones óptimas de las estructuras de *band gap* propuestas en el punto 2.2. Para ello se incluyen los diagramas de bandas y espectros de transmisión proporcionados por las configuraciones que presentan mayor sensibilidad. A partir de los ellos se extraen las características más relevantes, tales como la localización espectral del PBG (en agua y SiO₂), la sensibilidad (Sens) y la relación de extinción del PBG (R.E.). Todos estos resultados fueron resumidos en el punto 2.3.3. mediante tablas.

1) Corrugated waveguide (corr3D)



PBG 1 – Borde superior

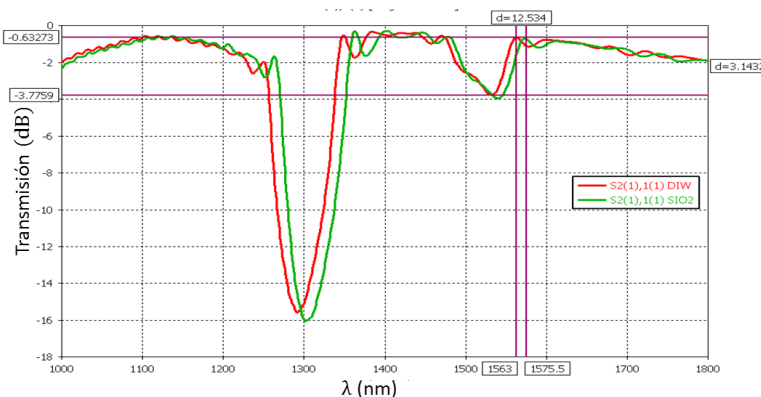
- a=310 nm
- wi=100 nm
- we=1000 nm

Diagrama de bandas:

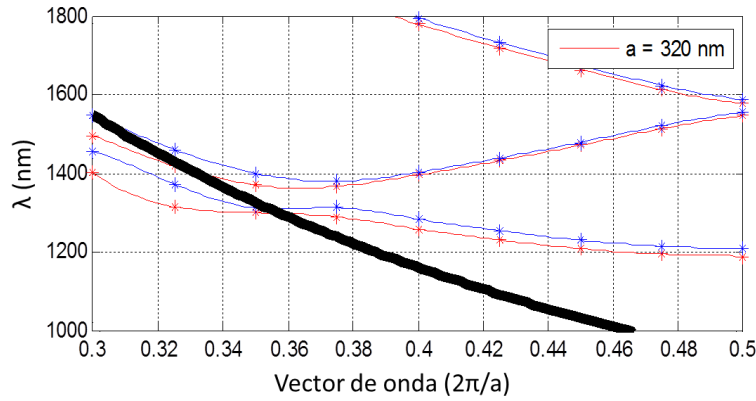
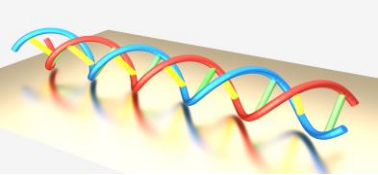
PBG_λ(agua)=1544,9 nm
 PBG_λ(SiO₂)=1554,4 nm
 Sens=85,6 nm/RIU

Espectro de transmisión:

PBG_λ(agua)=1563 nm
 PBG_λ(SiO₂)=1575,5 nm
 Sens=112,6 nm/RIU
 R.E.~4dB



Dada la baja R.E. que presenta el PBG y que su borde inferior no es demasiado abrupto, probablemente otros modos sean excitados en la parte ascendente de la segunda banda.



PBG 1 – Borde inferior

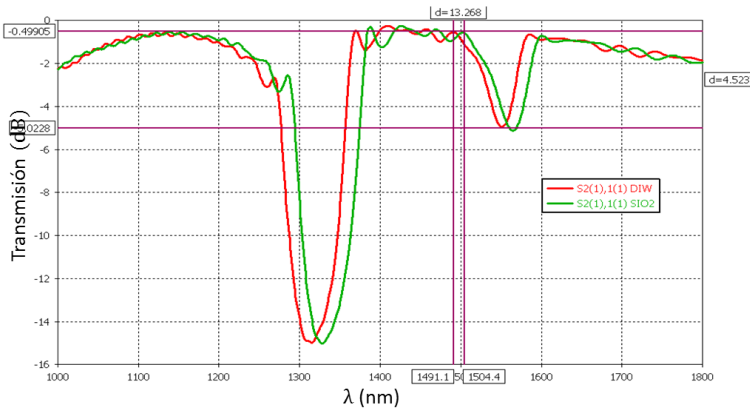
- a=320nm
- wi=100 nm
- we=1000 nm

Diagrama de bandas:

PBG_λ(agua)=1546,7 nm
 PBG_λ(SiO₂)=1554,6 nm
 Sens=71,2 nm/RIU

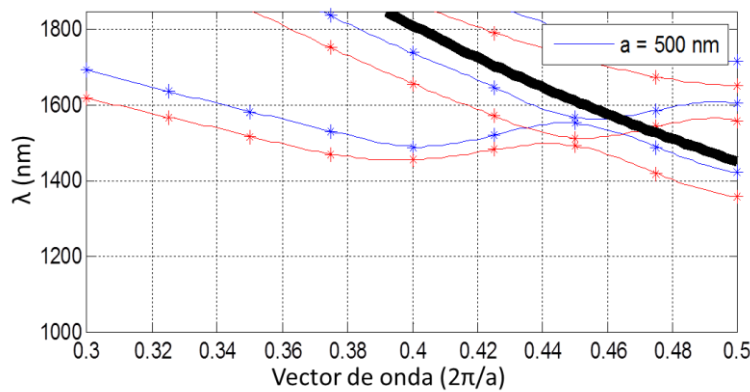
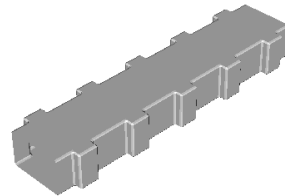
Espectro de transmisión:

PBG_λ(agua)=1491,1 nm
 PBG_λ(SiO₂)=1504,4 nm
 Sens=119,8 nm/RIU
 R.E.~5 dB



Dada la baja R.E. que presenta el PBG y que su borde no es demasiado abrupto, probablemente otros modos sean excitados en la parte ascendente de la segunda banda.

2) *Inverse corrugated waveguide (corr3Dinv)*

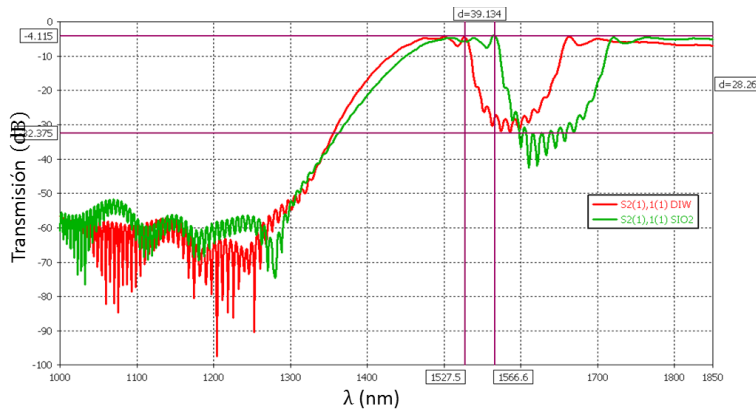
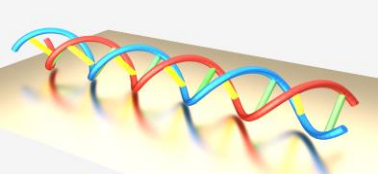


PBG - Borde inferior

- a=500nm
- wi=230 nm
- we=100 nm

Diagrama de bandas:

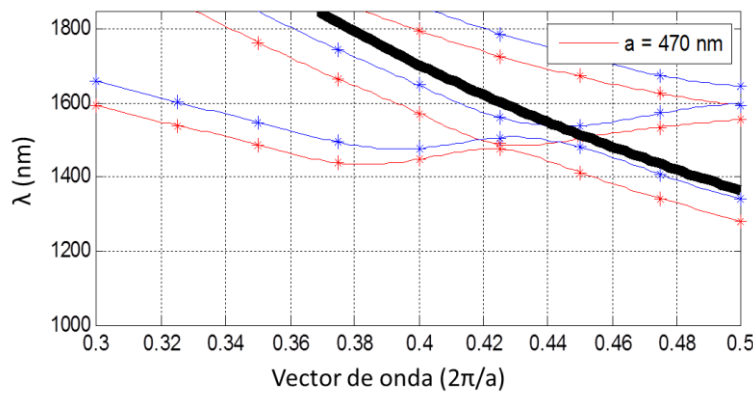
PBG_λ(agua)=1559,8 nm
 PBG_λ(SiO₂)=1603,6 nm
 Sens=394,6 nm/RIU



Espectro de transmisión:

$PBG_{\lambda}(\text{agua})=1527,5 \text{ nm}$
 $PBG_{\lambda}(\text{SiO}_2)=1566,6 \text{ nm}$
 $\text{Sens}=352,3 \text{ nm/RIU}$
 $\text{R.E.}\sim 28\text{dB}$

El rizado en el borde de la banda es moderado, el PBG es muy profundo y su borde es bastante abrupto. Sin embargo, no hay una óptima transmisión de la banda, ya que sufre una pérdida aproximada de 4dB.

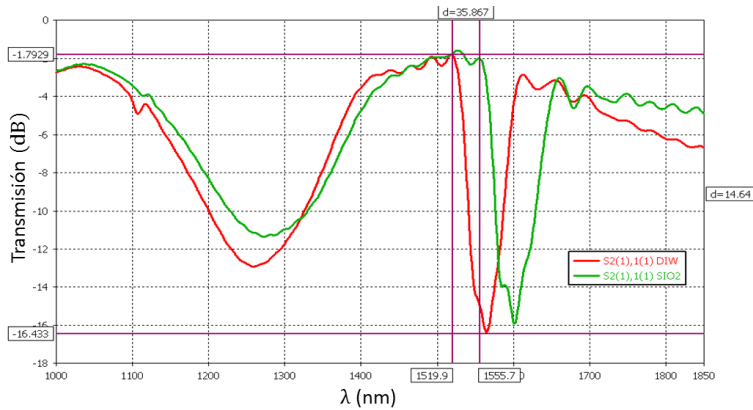


PBG - Borde inferior

- $a=470\text{nm}$
- $w_i=350 \text{ nm}$
- $w_e=250 \text{ nm}$

Diagrama de bandas:

$PBG_{\lambda}(\text{agua})=1555,5 \text{ nm}$
 $PBG_{\lambda}(\text{SiO}_2)=1596 \text{ nm}$
 $\text{Sens}=364,9 \text{ nm/RIU}$

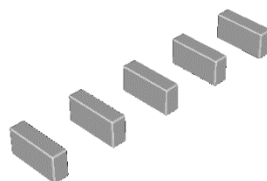


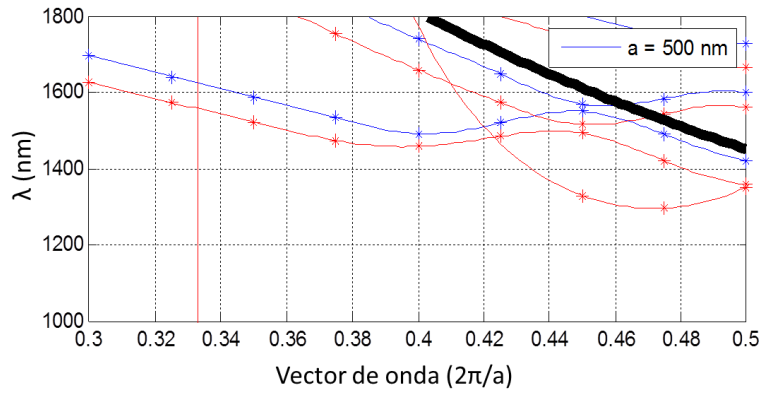
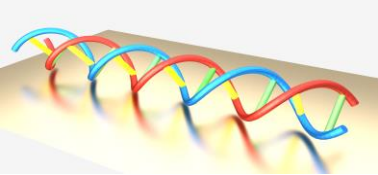
Espectro de transmisión:

$PBG_{\lambda}(\text{agua})=1519,9 \text{ nm}$
 $PBG_{\lambda}(\text{SiO}_2)=1555,7 \text{ nm}$
 $\text{Sens}=322,5 \text{ nm/RIU}$
 $\text{R.E.}\sim 14\text{dB}$

El rizado en el borde de la banda es bajo, el PBG es profundo y su borde es extremadamente abrupto. La transmisión de la banda presenta muy bajas pérdidas.

3) 1D slot waveguide (corr3Dslot)





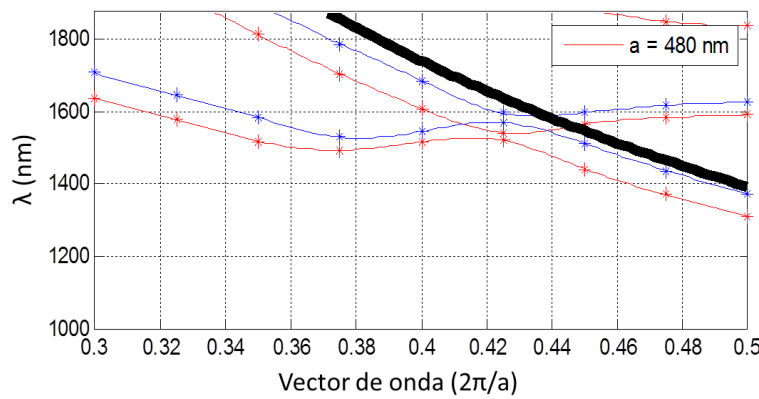
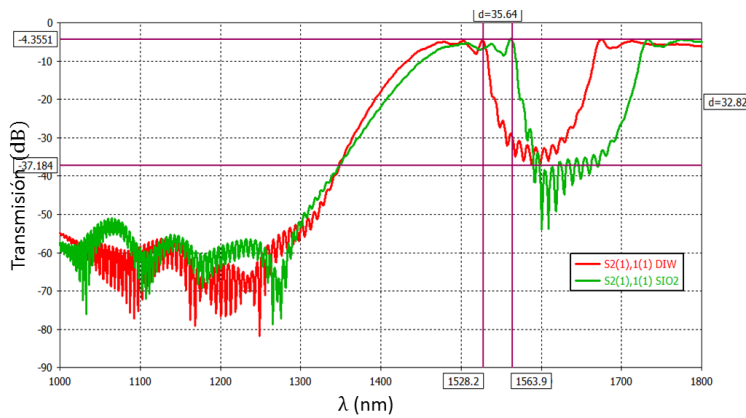
PBG - Borde inferior

- a=500 nm
- wi=200 nm
- we=400 nm

Diagrama de bandas:
 $PBG_{\lambda}(\text{agua})=1559 \text{ nm}$
 $PBG_{\lambda}(\text{SiO}_2)=1598,7 \text{ nm}$
 $Sens=357,7 \text{ nm/RIU}$

Espectro de transmisión:
 $PBG_{\lambda}(\text{agua})=1528,2 \text{ nm}$
 $PBG_{\lambda}(\text{SiO}_2)=1563,9 \text{ nm}$
 $Sens=321,6 \text{ nm/RIU}$
 $R.E. \sim 32\text{dB}$

El borde de la banda presenta un rizado moderado. El PBG es muy profundo y su borde es abrupto. Sin embargo, no hay una transmisión perfecta de la banda, ya que sufre una pérdida de 4 dB.



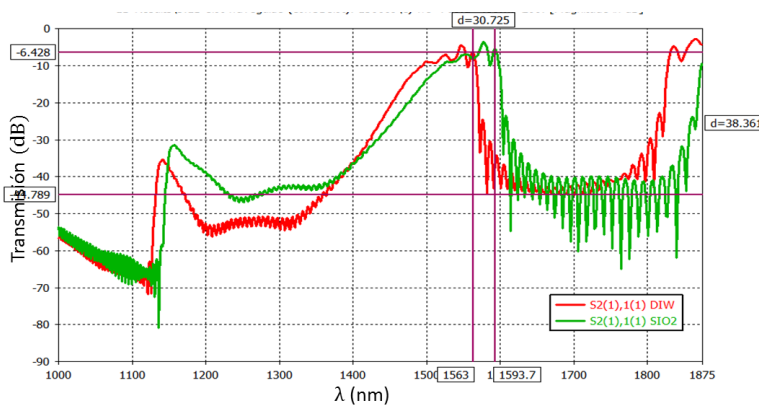
PBG - Borde inferior

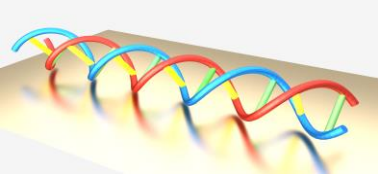
- a=480 nm
- wi=200 nm
- we=700 nm

Diagrama de bandas:
 $PBG_{\lambda}(\text{agua})=1591,8 \text{ nm}$
 $PBG_{\lambda}(\text{SiO}_2)=1625,6 \text{ nm}$
 $Sens=304,5 \text{ nm/RIU}$

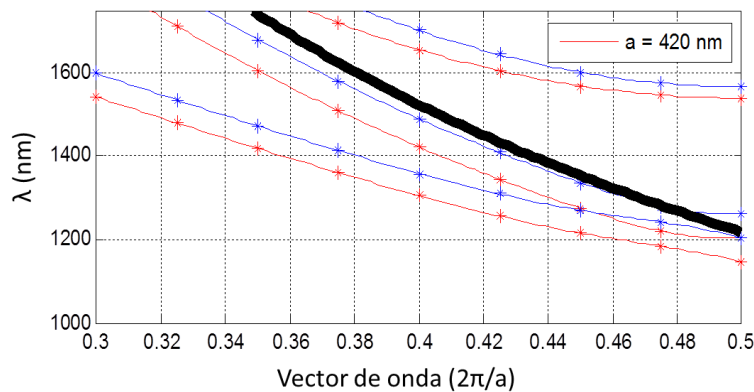
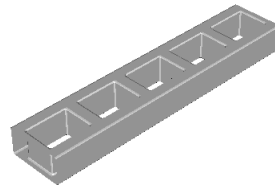
Espectro de transmisión:
 $PBG_{\lambda}(\text{agua})=1563,2 \text{ nm}$
 $PBG_{\lambda}(\text{SiO}_2)=1593,7 \text{ nm}$
 $Sens=276,6 \text{ nm/RIU}$
 $R.E. \sim 38\text{dB}$

El borde de la banda presenta rizado, el PBG es muy profundo y su borde es muy abrupto. Sin embargo, no hay una transmisión perfecta de la banda debido a las pérdidas que sufre de aproximadamente 6 dB.





4) 1D holes waveguide (1Dsquareholes3D)



PBG - Borde superior

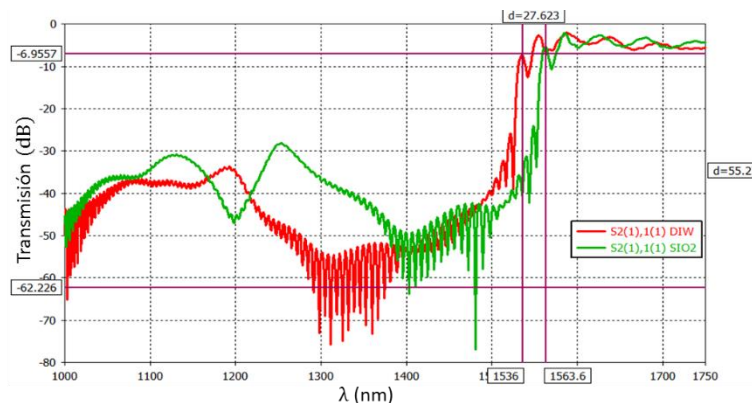
- a=420 nm
- wi=300 nm
- we=250 nm

Diagrama de bandas:

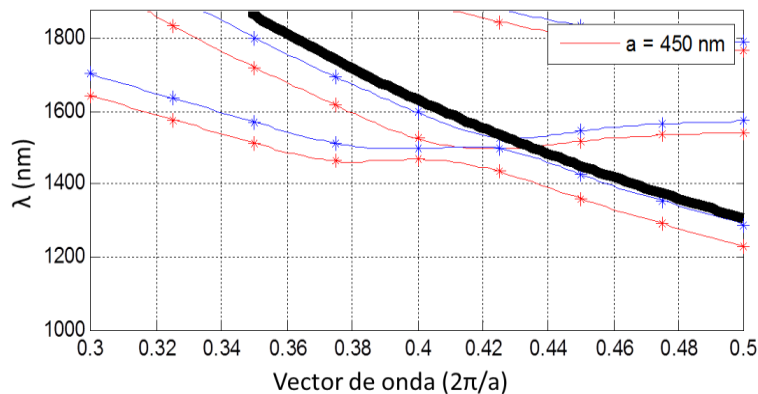
PBG_λ(agua)=1539,1 nm
 PBG_λ(SiO₂)=1566,2 nm
 Sens=244,1 nm/RIU

Espectro de transmisión:

PBG_λ(agua)=1536 nm
 PBG_λ(SiO₂)=1563,6 nm
 Sens=248,6 nm/RIU
 R.E.~34dB



El borde de la banda presenta rizado, el PBG es muy profundo y su borde es muy abrupto. Sin embargo, la banda de transmisión no es perfecta debido a que sufre pérdidas en torno a 6 dB. Además, hay una gran similitud entre los datos obtenidos con ambas simulaciones (PWE y FDTD).

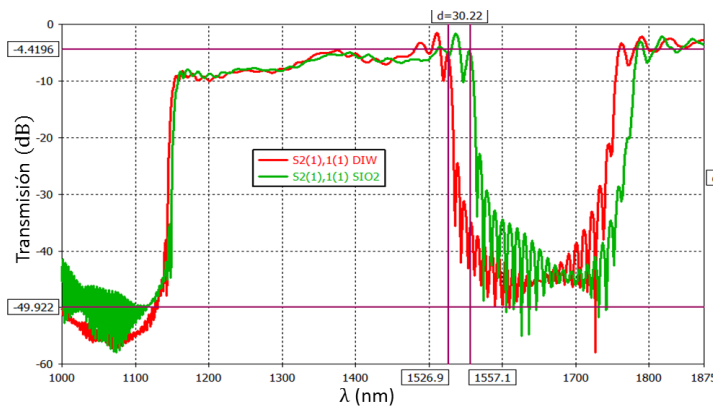
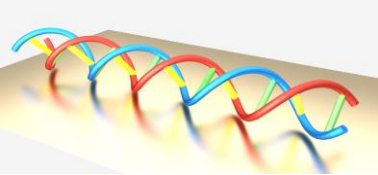


PBG - Borde inferior

- a=450nm
- wi=150 nm
- wi=250 nm

Diagrama de bandas:

PBG_λ(agua)=1541,2 nm
 PBG_λ(SiO₂)=1572,9 nm
 Sens=285,6 nm/RIU

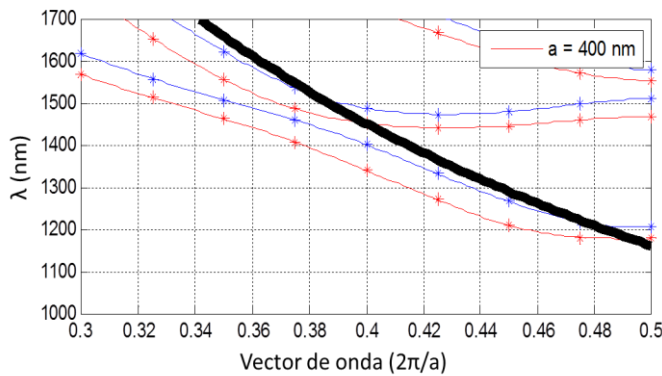
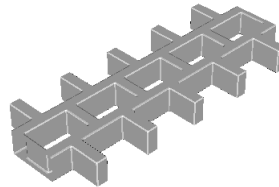


Espectro de transmisión:

$PBG_{\lambda}(\text{agua})=1526,9 \text{ nm}$
 $PBG_{\lambda}(\text{SiO}_2)=1557,1 \text{ nm}$
 $\text{Sens}=272,1 \text{ nm/RIU}$
 $R.E.\sim 40\text{dB}$

El borde de la banda presenta rizado, el PBG es extremadamente profundo y su borde es muy abrupto. Sin embargo, la banda de transmisión sufre pérdidas en torno a 4 dB.

5) 1D corrugated and holes waveguide (corr+squareholes3D)

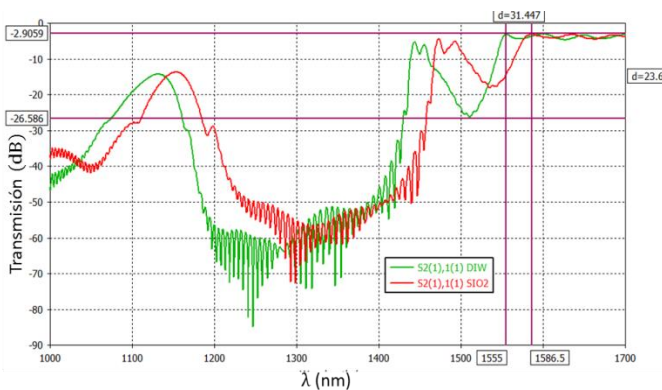


PBG 1 - Borde superior

- $a=400\text{nm}$
- $wi_corr=200 \text{ nm}$
- $we_corr=1000 \text{ nm}$
- $wi_hole=300 \text{ nm}$
- $we_hole=250 \text{ nm}$

Diagrama de bandas:

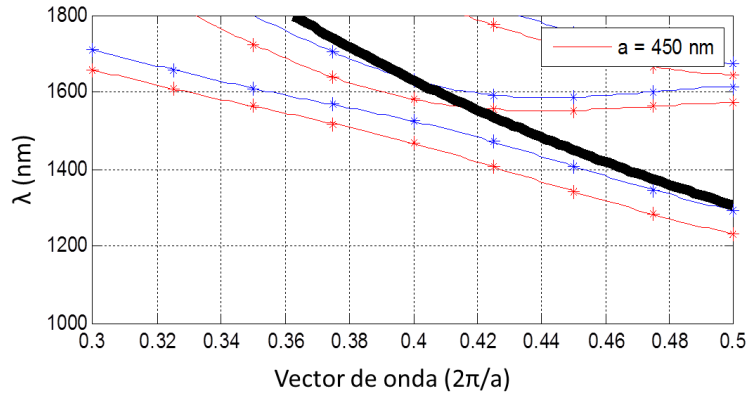
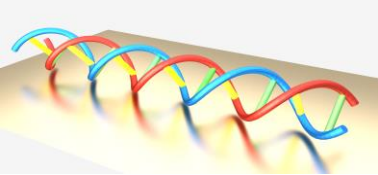
$PBG_{\lambda}(\text{agua})=1552,8 \text{ nm}$
 $PBG_{\lambda}(\text{SiO}_2)=1577,9 \text{ nm}$
 $\text{Sens}=226,1 \text{ nm/RIU}$



Espectro de transmisión:

$PBG_{\lambda}(\text{agua})=1555 \text{ nm}$
 $PBG_{\lambda}(\text{SiO}_2)=1586,5 \text{ nm}$
 $\text{Sens}=283,8 \text{ nm/RIU}$
 $R.E.\sim 24\text{dB}$

A pesar de que el PBG es profundo, su borde no es abrupto. Es posible que otros modos sean excitados en la parte ascendente de la segunda banda de transmisión. No obstante, los resultados obtenidos en ambas simulaciones (PWE y FDTD) presentan gran similitud.



PBG 2 - Borde superior

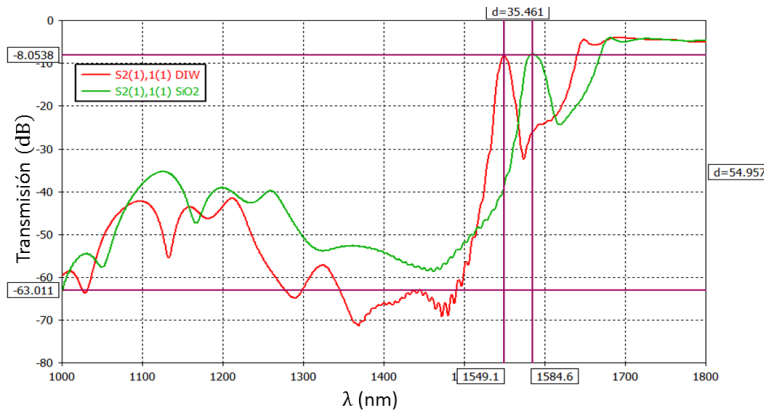
- a=450 nm
- wi_corr=100 nm
- we_corr=1500 nm
- wi_hole=310 nm
- we_hole=250 nm

Diagrama de bandas:

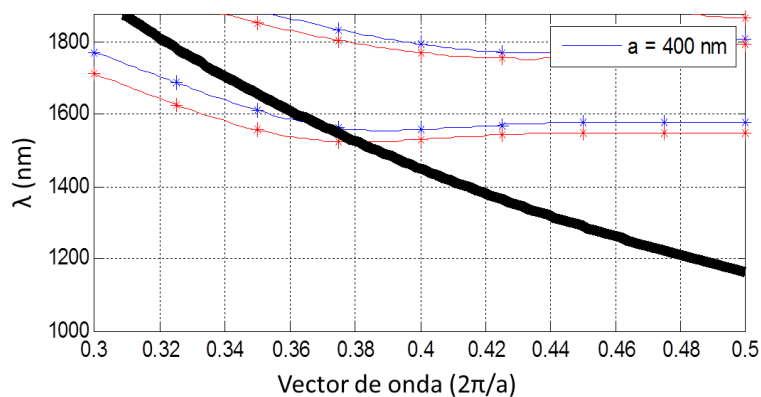
PBG_λ(agua)=1551,5 nm
 PBG_λ(SiO₂)=1586,1 nm
 Sens=311,7 nm/RIU

Espectro de transmisión:

PBG_λ(agua)=1549,1 nm
 PBG_λ(SiO₂)=1584,6 nm
 Sens=319,8 nm/RIU
 R.E.~55dB



El PBG es extremadamente profundo y su borde PBG es muy abrupto. Sin embargo, la banda de transmisión es muy estrecha y presenta pérdidas en torno a 8 dB. No obstante, hay una gran similitud entre los datos obtenidos en cada una de las simulaciones (PWE y FDTD).

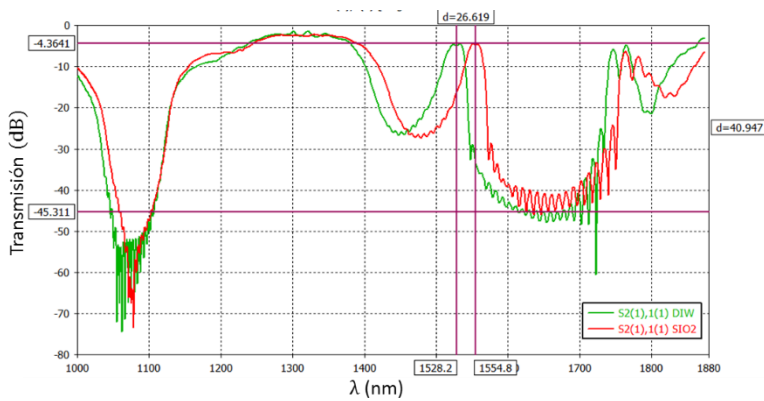
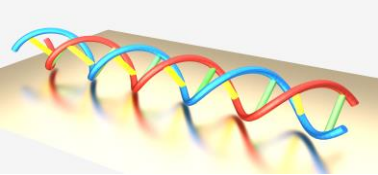


PBG 2 - Borde inferior

- a=400 nm
- wi_corr=200 nm
- we_corr=2000 nm
- wi_hole=100 nm
- we_hole=110 nm

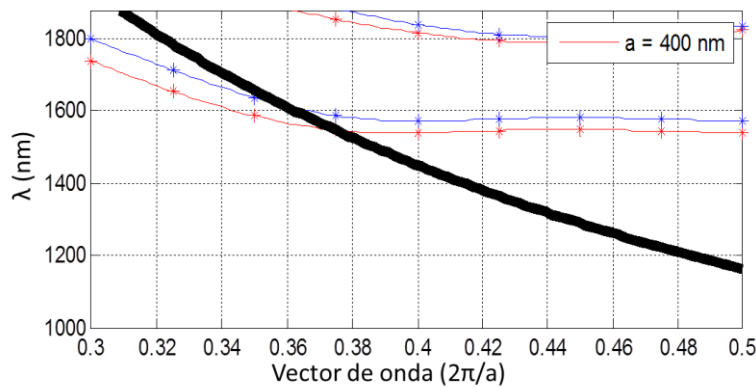
Diagrama de bandas:

PBG_λ(agua)=1550,7 nm
 PBG_λ(SiO₂)=1578,2 nm
 Sens=247,7 nm/RIU



Espectro de transmisión:
 $PBG_{\lambda}(\text{agua})=1528,2 \text{ nm}$
 $PBG_{\lambda}(\text{SiO}_2)=1554,8 \text{ nm}$
 $\text{Sens}=239,6. \text{ nm/RIU}$
 $\text{R.E.} \sim 35\text{dB}$

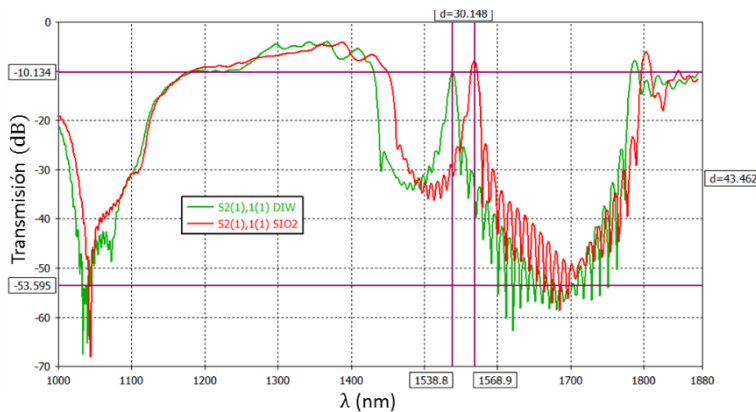
El PBG es muy profundo y su borde es extremadamente abrupto. Sin embargo, la banda de transmisión es muy estrecha y presenta pérdidas en torno a 4 dB.



PBG 2 - Borde inferior

- $a=400 \text{ nm}$
- $wi_corr=250 \text{ nm}$
- $we_corr=2000 \text{ nm}$
- $wi_hole=150 \text{ nm}$
- $we_hole=100 \text{ nm}$

Diagrama de bandas:
 $PBG_{\lambda}(\text{agua})=1548,8 \text{ nm}$
 $PBG_{\lambda}(\text{SiO}_2)=1581,8 \text{ nm}$
 $\text{Sens}=297,3 \text{ nm/RIU}$



Espectro de transmisión:
 $PBG_{\lambda}(\text{agua})=1538,8 \text{ nm}$
 $PBG_{\lambda}(\text{SiO}_2)=1568,8 \text{ nm}$
 $\text{Sens}=271,2 \text{ nm/RIU}$
 $\text{R.E.} \sim 40\text{dB}$

El PBG presenta una R.E. considerablemente alta y su borde es muy profundo. Sin embargo, la banda de transmisión es muy estrecha (parece una resonancia) y presenta pérdidas en torno a 10 dB.