



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial

Evaluación del uso de sensores fotónicos basados en
capas porosas de óxido de titanio para la detección de
gliadina

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Biomédica

AUTOR/A: Pavez Higuera, Carolina

Tutor/a: García Rupérez, Jaime

Cotutor/a: Ponce Alcántara, Salvador

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer el tiempo y dedicación que mis tutores, Jaime y Salva, han invertido en mi como alumna y en este trabajo, también darles las gracias por entender en todo momento mi situación personal, aunque esta pudiese entorpecer el ritmo del trabajo. En todas las tutorías y horas de laboratorio siempre me he sentido cómoda, respetada e invitada a preguntar, esto no hubiese sido posible si ambos no fuesen grandes docentes.

A mis amigos de la carrera me gustaría agradecerles las horas compartidas y la compañía que me han brindado durante estos cuatro años. Hemos desayunado, comido, cenado, peleado, dormido, reído, viajado... Cuando estoy con ellos me siento muy feliz y lo único que les deseo es lo mejor, tanto en su vida profesional como en la personal, también espero estar ahí para verlo.

A mis amigas de toda la vida solo puedo darles las gracias por escucharme cada vez que he necesitado desahogarme, por entenderme, por calmarme, por ser tan pacientes, divertidas y buenas conmigo, no me imagino mi vida sin ellas.

A toda mi familia.

A mi padre, al que tengo presente siempre aunque nos separen tantos kilómetros, por ser un hombre tan cariñoso y comprensivo.

A mi madre, por ser una mujer fuerte e independiente y una persona que me enseña a ser valiente y a tomar decisiones difíciles, por animarme a comerme el mundo.

Pero sobre todo y aunque no me gusta ponerme sentimental, me gustaría agradecer especialmente a mis abuelos, María y Paco. Mis abuelos son personas muy inteligentes aunque no ostentan ningún título universitario y siempre me han repetido como un mantra la importancia de estudiar. Tal vez este no es el mejor Trabajo de Fin de Grado que hay (ni lo pretende ser), pero supongo que me siento orgullosa de poder decir que todas las horas que mi abuelo pasó ayudándome a hacer ejercicios de matemáticas y todas esas tardes de invierno (y algunas de verano) leyendo al lado de mi abuela en silencio y cada una en un sillón, no han sido en vano, han forjado mi carácter y tal vez soy mejor persona de lo que hubiese sido si hubiese tenido otro abuelos (¡que horror!).

Por último, agradecerte a ti, que estás leyendo mi Trabajo de Fin de Grado, gracias por tu tiempo

Resumen

Los sensores fotónicos son una de las alternativas más interesantes para el desarrollo de dispositivos de análisis con aplicación en múltiples campos como por ejemplo el diagnóstico médico, la seguridad alimentaria, la monitorización medioambiental o la detección de amenazas biológicas, entre muchos otros. El interés en la tecnología fotónica para el desarrollo de sensores viene determinado por las múltiples ventajas que presenta, como por ejemplo, su alta sensibilidad, su reducido tamaño, la posibilidad de realizar una detección sin marcadores o el requerimiento de volúmenes de muestra muy reducidos para llevar a cabo el análisis.

Dentro del campo de los sensores fotónicos, el uso de materiales porosos para su creación ha despertado un enorme interés en los últimos años. Esto es debido al hecho de que su naturaleza porosa permite que las sustancias a detectar puedan penetrar dentro de la propia estructura de sentido, algo que puede aumentar la sensibilidad todavía más. Además, la elevada relación superficie-volumen que proporcionan estos materiales también permite disponer de una mayor superficie sobre la que inmovilizar los bioreceptores necesarios para la detección específica de las sustancias, de forma que sea posible detectar un mayor número de bioreconocimientos.

En este contexto, en este Trabajo Fin de Grado se plantea la evaluación de la capacidad de usar este tipo de sensores fotónicos basados en capas porosas para la detección de un analito de interés en el campo de la salud alimentaria, como es la gliadina, una de las principales proteínas del gluten y que está relacionada con la enfermedad celíaca. En concreto, se trabajará en el uso de capas porosas de óxido de titanio creadas por síntesis en el Centro de Tecnología Nanofotónica de la UPV, las cuales pueden ser obtenidas mediante un proceso sencillo y de bajo coste. Estas capas porosas serán modeladas inicialmente de forma teórica de cara a determinar su comportamiento y su sensibilidad, para posteriormente evaluar de forma experimental la posibilidad de usarlas para la detección específica de gliadina en muestras sintéticas.

Palabras clave: sensores; fotónica; capas porosas; biodetección; gliadina; celiaquía

Resum

Els sensors fotònics són una de les alternatives més interessants per al desenvolupament de dispositius d'anàlisi amb aplicació en múltiples camps com, per exemple, el diagnòstic mèdic, la seguretat alimentària, la monitorització mediambiental o la detecció d'amenaques biològiques, entre molts altres. L'interès en la tecnologia fotònica per al desenvolupament de sensors ve determinat per les múltiples avantatges que presenta, com ara la seua alta sensibilitat, el seu reduït tamany, la possibilitat de realitzar una detecció sense marcadors o el requeriment de volums de mostra molt reduïts per dur a terme l'anàlisi.

Dins del camp dels sensors fotònics, l'ús de materials porosos per a la seua creació ha despertat un enorme interès en els últims anys. Això és degut al fet que la seua naturalesa porosa permet que les substàncies a detectar puguen penetrar dins de la pròpia estructura de sensat, fet que pot augmentar la sensibilitat encara més. A més, l'elevada relació superfície-volum que proporcionen aquests materials també permet disposar d'una major superfície sobre la qual immobilitzar els bioreceptors necessaris per a la detecció específica de les substàncies, de manera que siga possible detectar un major nombre de bioreconeixements.

En aquest context, en aquest Treball Fi de Grau es planteja l'avaluació de la capacitat d'usar aquest tipus de sensors fotònics basats en capes poroses per a la detecció d'un analit d'interès en el camp de la salut alimentària, com és la gliadina, una de les principals proteïnes del gluten i que està relacionada amb la malaltia celíaca. En concret, es treballarà en l'ús de capes poroses d'òxid de titani creades per síntesi en el Centre de Tecnologia Nanofotònica de la UPV, les quals poden ser obtingudes mitjançant un procés senzill i de baix cost. Aquestes capes poroses seran modelades inicialment de forma teòrica per a determinar el seu comportament i la seua sensibilitat, per a posteriorment avaluar de forma experimental la possibilitat d'usar-les per a la detecció específica de gliadina en mostres sintètiques.

Paraules clau: sensors; fotònica; capes poroses; biodetecció; gliadina; celiaquia.

Abstract

Photonic sensors are one of the most intriguing alternatives for the development of analytical devices with applications in various fields such as medical diagnosis, food safety, environmental monitoring, or the detection of biological threats, among many others. The interest in photonic technology for sensor development is driven by the numerous advantages it offers, such as high sensitivity, compact size, the possibility of marker-free detection, and the requirement for very small sample volumes to perform the analysis.

Within the field of photonic sensors, the use of porous materials for their creation has garnered significant interest in recent years. This is due to the fact that their porous nature allows the substances to be detected to penetrate into the sensing structure itself, which can further enhance sensitivity. Additionally, the high surface-to-volume ratio provided by these materials also allows for a larger surface area to immobilize the necessary bioreceptors for specific substance detection, enabling the detection of a greater number of biomolecules.

In this context, this Bachelor's thesis aims to assess the feasibility of using these porous-layer-based photonic sensors for the detection of an analyte of interest in the field of food safety, namely gliadin, one of the main proteins in gluten associated with celiac disease. Specifically, the research will focus on the use of porous layers of titanium oxide created through synthesis at the Nanophotonic Technology Center of UPV, which can be obtained through a straightforward and cost-effective process. These porous layers will be initially theoretically modeled to determine their behavior and sensitivity, followed by experimental evaluation to assess their potential for specific gliadin detection in synthetic samples.

Keywords: sensors; photonics; porous layers; biodetection; gliadin; celiac disease.

Lista de Figuras

Figura 2.1	Modelo A23 introducido por la empresa Yellow Spring Instruments en 1972, primer instrumento comercial capaz de medir glucosa en sangre total diluida mediante el uso de un biosensor basado en enzimas (Reilly Dixon, 2021)	7
Figura 2.2	Recuento anual de publicaciones sobre biosensores basado(s) en datos de Web of Science capturados en mayo de 2019. La tendencia de publicación basada en los datos originales de PubMed de 2018 también se incluye como punto de referencia (Olson & Bae, 2019)	8
Figura 2.3	Esquema de los elementos básicos de un biosensor (Martín Sánchez, 2019a)	9
Figura 2.4	Propuesta de clasificación de los distintos tipos de biosensores (Alhadrami, 2018)	11
Figura 2.5	Esquema de la detección indirecta y directa de analitos mediante absorbancia y reflectancia (Martín Sánchez, 2019a)	13
Figura 2.6	Esquema de sensor basado en resonancia de plasmones de superficie (Iranzo Egea, 2017)	14
Figura 2.7	Sensor basado en anillo resonante. (A) Anillo resonante en una disolución sin biopartículas de interés. (B) El analito presente en el medio capturado por el anillo interactúa con el campo evanescente produciendo un desplazamiento en la longitud de onda (Sarkaleh et al., 2017)	15
Figura 2.8	Diagrama esquemático de un interferómetro de Mach-Zehnder para biosensado (Sepúlveda et al., 2006)	16
Figura 2.9	Representación de la interferencia constructiva y la interferencia destructiva en un interferómetro de Fabry-Pérot (Martín Sánchez, 2019)	17
Figura 2.10	Espectro de reflectividad simulado (Martín Sánchez, 2019)	17
Figura 2.11	Ejemplo de desplazamiento del espectro de reflectividad al producirse el evento de reconocimiento molecular (Martín Sánchez, 2019)	18
Figura 3.1	Esquematización de las de los medios	20
Figura 3.2	Simulación del espectro de reflectividad (Martín Sánchez, 2019a)	20
Figura 3.3	Sección transversal de un biosensor de microcavidad de pSi. Esta imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) muestra los efectos de filtrado por exclusión de tamaño de los poros de pSi, donde se impide que las células sanguíneas entren en la capa (Jane et al., 2009)	21
Figura 3.4	Imágenes SEM que muestran las vistas superior y de sección transversal de la estructura AAO (Santos et al., 2013)	22
Figura 3.5	Imágenes FE-SEM de (a) películas de TiO ₂ y (b) películas de TiO ₂ mesoporosas (Niu et al., 2018)	22
Figura 4.1	Esquematización del objetivo del código	25
Figura 4.2	Representación gráfica del sistema de tres capas considerado para el modelo, d es el espesor de la capa (Cárdenas Hernández, 2012)	25
Figura 4.3	Sistema dieléctrico estratificado multicapa (Cárdenas Hernández, 2012)	27
Figura 4.4	Esquematización de los ejemplos	29
Figura 4.5	Perfil de reflectancia para el Ejemplo 1 obtenido a través de la función TMM_function	30
Figura 4.6	Perfil de reflectancia para el Ejemplo 2 obtenido a través de la función TMM_function	30
Figura 4.7	Imagen tomada por microscopía electrónica de barrido de una estructura multicapa de TiO ₂ poroso (Ortiz de Zárate et al., 2022)	31

Figura 4.8	Esquematación del caso. A la izquierda el sistema AIRE antes de fluir agua ultrapura (DIW), a la derecha el sistema AGUA, tras fluir a través de la estructura porosa de TiO ₂	32
Figura 4.9	Resultado de los perfiles de reflectancia y su desplazamiento de la muestra (longitud de onda en nm) antes (Sistema AIRE) y después (Sistema AGUA) de fluir DIW para cada uno de los espesores de capa	33
Figura 4.10	Resultado de los perfiles de reflectancia y su desplazamiento de la muestra (longitud de onda en nm) antes (Sistema AIRE) y después (Sistema AGUA) de fluir DIW para cada uno de los espesores de capa	34
Figura 4.11	Diagrama del proceso de obtención de sensibilidad para cada espesor	35
Figura 4.12	Perfiles de reflectancia del Sistema DIW + delta (agua con etanol al 10%) frente al Sistema DIW (agua ultrapura)	35
Figura 4.13	Representación de la variación de longitud de onda frente a la variación del índice de refracción para cada uno de los espesores.	36
Figura 4.14	Representación gráfica de los valores de sensibilidad para cada uno de los espesores de capa.	37
Figura 5.1	Variación de longitud de onda frente a variación del índice de refracción para cada espesor con un 30 % de porosidad	39
Figura 5.2	Valor de la sensibilidad para cada espesor de capa con un 30 % de porosidad	39
Figura 5.3	Variación de longitud de onda frente a variación del índice de refracción para cada espesor con un 40 % de porosidad	40
Figura 5.4	Valor de la sensibilidad para cada espesor de capa con un 40 % de porosidad	40
Figura 5.5	Variación de longitud de onda frente a variación del índice de refracción para cada espesor con un 50 % de porosidad	41
Figura 5.6	Valor de la sensibilidad para cada espesor de capa con un 50 % de porosidad	41
Figura 5.7	Variación de longitud de onda frente a variación del índice de refracción para cada espesor con un 60 % de porosidad	42
Figura 5.8	Valor de la sensibilidad para cada espesor de capa con un 60 % de porosidad	42
Figura 5.9	Variación de longitud de onda frente a variación del índice de refracción para cada espesor con un 70 % de porosidad	43
Figura 5.10	Valor de la sensibilidad para cada espesor de capa para un 70 % de porosidad	43
Figura 5.11	Sensibilidades según el porcentaje de porosidad y es espesor de la capa	44
Figura 6.1	Diagrama del método de sensado	47
Figura 7.1	Imágenes HRFSEM de capas de TiO ₂ mesoporoso fabricadas con plantilla P123, vista superior de una monocapa (Ortiz de Zárate et al., 2022b)	50
Figura 7.2	Plataforma óptica de sensado. (A) Vista de perfil de la plataforma donde se puede apreciar la estructura que sujeta los brazos de fibra óptica. (B) Primer plano de la luz incidiendo sobre la muestra	50
Figura 7.3	A) Lámpara halógena de tungsteno (HL-2000 de Ocean Optics). (B) Espectrómetro (Flame T spectrometer de Ocean Optics)	51
Figura 7.4	(A) Bomba de extracción de volúmenes empleada en los experimentos. (B) Close-up de la jeringuilla de la bomba de extracción	51
Figura 7.5	(A) Celda microfluídica. (B) Placa de sujeción para la muestra	52
Figura 8.1	Esquematación de la funcionalización de la muestra	53
Figura 8.2	Gliadina comercial empleada para los experimentos de este estudio	54
Figura 8.3	Esquematación de la matriz de combinaciones para la funcionalización por incubación	55
Figura 8.4	Matriz de muestras para funcionalizar. (A) Matriz de muestras sin funcionalizar. (B) Muestras cubiertas por una capa de α -Gliadina sin secar	56
Figura 9.1	Evolución temporal del pico de FP para las diferentes diluciones de etanol en agua destilada (DIW) fluidas (García-Rupérez et al., 2010)	57
Figura 9.2	Valores relativos de desplazamiento para el Experimento 1	58

Figura 9.3	Evolución del desplazamiento durante el flujo de Gliadina	59
Figura 9.4	Valores relativos del desplazamiento para el Experimento 2	59
Figura 9.5	Evolución del desplazamiento durante el flujo de Gliadina	60
Figura 9.6	Desplazamiento de la longitud de onda a lo largo del experimento 3	60
Figura 9.7	Valores relativos del desplazamiento para el Experimento 3	61
Figura 9.8	Esquematización de la matriz de combinaciones para la funcionalización por incubación	61
Figura 9.9	Desplazamiento relativo para cada una de las muestras funcionalizadas mediante incubación	62
Figura 9.10	Desplazamiento relativo de la Muestra 2-1	62
Figura 9.11	Desplazamiento relativo de la Muestra 3-1	63
Figura 9.12	Desplazamiento relativo de las muestras sin los outliers	63
Figura 9.13	Desplazamiento relativo de las muestras con mejor respuesta	64
Figura 11.1	Cuadro de mano de obra	69
Figura 11.2	Cuadro de materiales	69
Figura 11.3	Cuadro de maquinaria	70
Figura 11.4	Cuadro de precios unitarios	70
Figura 11.5	Cuadro de mediciones	71
Figura 11.6	Hoja resumen del PEC con IVA	72

Lista de Tablas

Tabla 4.1	Índices de refracción para el Ejemplo 1	29
Tabla 4.2	Índices de refracción para el Ejemplo 2	30
Tabla 4.3	Tabla de parámetros del Ejemplo 5, donde n_1 , n_2 y n_3 son los índices de refracción efectivos de cada capa	33
Tabla 4.4	Tabla de parámetros del Ejemplo 6, donde n_1 , n_2 y n_3 son los índices de refracción efectivos de cada capa	34
Tabla 5.1	Tabla de parámetros introducidos	38
Tabla 6.1	Proceso seguido durante los experimentos funcionalizados por flujo	48
Tabla 8.1	Conjunto de disoluciones preparadas para la funcionalización por flujo, así como su composición	54
Tabla 8.2	Concentraciones de las disoluciones de proteína AG empleadas para la funcionalización por incubación	55
Tabla 8.3	Concentraciones de las disoluciones de α -Gliadina empleadas para la funcionalización por incubación	55
Tabla 8.4	Método de funcionalización por incubación	55

Índice de contenidos

Agradecimientos.....	i
Resumen.....	ii
Resum.....	iii
Abstract	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tablas	viii
Índice de contenidos.....	ix
I INFORME DE TRABAJO	1
Capítulo 1: Introducción	2
1.1 Antecedentes y motivación	2
1.2 Estructura del trabajo	3
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general	4
2.3.3 Objetivos específico	4
II PRELIMINARES	6
Capítulo 2: Estado del arte	7
2.1 Biosensores	9
2.2 Clasificación de los biosensores	11
2.3 Transductores ópticos	13
2.3.1 Biosensores basados en resonancia de plasmón de superficie.....	13
2.3.2 Biosensores de fibra óptica.....	14
2.3.3 Biosensores basados en anillo resonador	14
2.3.4 Biosensores basados en el interferómetro de Mach-Zehnder	15
Capítulo 3: Biosensores ópticos interferométricos de capa porosa	19
III DISEÑO DEL MODELO DE SENSIBILIDAD	23
Capítulo 4: Fundamentos teóricos del modelo	24
4.1 Método de Matriz de Transferencia (TMM)	24
4.1.1 Resultados Ejemplo 1	29
4.1.2 Resultados Ejemplo 2.....	30
4.2 Índice de refracción efectivo de la capa	31
4.3 Seguimiento de máximos y mínimos.....	32
4.1.1 Resultados Ejemplo 3	33

4.1.2 Resultados Ejemplo 4.....	34
Capítulo 5: Resultados del modelo	38
5.1 Resultados para el 30% de porosidad.....	38
5.2 Resultados para el 40% de porosidad.....	40
5.3 Resultados para el 50% de porosidad.....	41
5.4 Resultados para el 60% de porosidad.....	42
5.5 Resultados para el 70% de porosidad.....	43
5.6 Interpretaciones finales.....	44
IV EVALUACIÓN EXPERIMENTAL.....	46
Capítulo 6: Método de sensado.....	47
6.1 Procedimiento para muestras funcionalizadas por flujo	48
Capítulo 7: Materiales	49
7.1 Capas porosas de TiO ₂	49
7.2 Plataforma óptica de medida.....	50
7.3 Bomba de extracción de volúmenes	51
7.4 Celda microfluídica	52
Capítulo 8: Preparación de disoluciones	53
8.1 Funcionalización de las muestras	53
4.1.1 Disoluciones para funcionalización por flujo	34
4.1.2 Disoluciones para funcionalización por incubación	35
Capítulo 9: Resultados y discusión.....	57
9.1 Muestras funcionalizadas por flujo	57
2.3.1 Resultados del Experimento 1	57
2.3.2 Resultados del Experimento 2	59
2.3.3 Resultados del Experimento 3	59
9.2 Muestras funcionalizadas por incubación	61
V CONCLUSIONES	65
Capítulo 10: Conclusiones	66
10.1 Líneas futuras	67
VI PRESUPUESTO	65
Capítulo 11: Presupuesto	69
11.1 Cuadro de mano de obra	69
11.2 Cuadro de materiales.....	69
11.3 Cuadro de maquinaria	70

11.4 Cuadro de precios unitarios	70
11.5 Cuadro de precios mediciones	71
11.6 Presupuesto de ejecución por contrata	72
A Scripts de Matlab	76
B Justificación de precios	78
Bibliografía	82

I

Informe de trabajo

Capítulo 1

Introducción

1.1 Antecedentes y motivación

Las aplicaciones de los dispositivos biosensores disponibles en la actualidad son sumamente diversas, entre las ventajas que ostentan los biosensores sobre otros métodos de detección, como el radioinmunoensayo o los ensayos de fluorescencia y luminiscencia, comprenden aspectos como la automatización, una mayor reproductibilidad, rapidez en el análisis, así como análisis en tiempo real. Las áreas principales de desarrollo compartidas por este tipo de sensores incluyen la multiplexación, la capacidad para analizar simultáneamente una muestra en busca de más de un contaminante y la portabilidad. En el presente, los biosensores desempeñan un papel crucial en sectores como la agricultura, la seguridad alimentaria y el campo de la medicina; con nuevos avances en tecnología, instrumentación, reactivos y manejo de muestras que seguramente robustecerán esta posición (Nikolelis et al., 2018).

El pionero en el desarrollo de los biosensores es Leland C. Clark, Jr., cuyo objetivo era medir la reducción de oxígeno utilizando un electrodo de platino para determinar los niveles de oxigenación en la sangre. Sin embargo, su primer sensor fue un fracaso debido a la adsorción de componentes sanguíneos en la superficie del electrodo, lo que produjo alteraciones en la señal obtenida. Tras este resultado, Clark tuvo la ingeniosa idea de emplear el envoltorio de celofán de una cajetilla de cigarrillos en su sensor. Bajo este enfoque solo las sustancias de bajo peso molecular, mayormente oxígeno, alcanzaban el electrodo y podían ser medidas con precisión. La corriente de reducción reflejaba la concentración de oxígeno, y de esta manera nació el electrodo de Clark. En la actualidad, la membrana está compuesta de teflón, y este sensor sigue siendo una herramienta de vital importancia en el ámbito médico (Renneberg et al., n.d.).

Los nanobiosensores encuentran su fundamento en la convergencia entre la nanotecnología y los biosensores. En los últimos años, se ha explorado una variedad de nanomateriales en términos de sus propiedades electrónicas y mecánicas para comprender su potencial en la optimización de los mecanismos de señalización biológica y de transducción (Nikolelis et al., 2018).

El estudio detallado de diferentes nanomateriales y su interacción con los sistemas biológicos juega un papel fundamental en la mejora continua de los nanobiosensores. La manipulación de propiedades electrónicas, ópticas y mecánicas de estos materiales a nanoescala puede influir de manera significativa en la sensibilidad y selectividad de los sensores resultantes (Nikolelis et al., 2018). Explorar cómo los nanomateriales afectan la bioreconocimiento, la transducción de señales y la estabilidad del sensor es esencial para impulsar el avance de esta tecnología y ampliar aún más su gama de aplicaciones prácticas.

Las investigaciones y avances en tecnología de nanobiosensores han dado lugar a una generación de dispositivos innovadores y a un crecimiento constante en lo que respecta a diversos nanomateriales, con su implementación ya sea en las partes operativas de transductores o en receptores como objetivo. Esto se hace con la finalidad de mejorar la eficiencia de su capacidad de detección multidimensional y su sensibilidad. Los nanomateriales se convierten en elementos que intervienen tanto en el bioreconocimiento como en la transducción, o incluso a ambos. Los nanosensores, las nanosondas y otros sistemas de escala nano han revolucionado los campos del análisis químico y biológico, permitiendo llevar a cabo el análisis rápido de múltiples sustancias tóxicas y perjudiciales, en numerosos casos incluso *in vivo* (Nikolelis et al., 2018).

La versatilidad de los nanobiosensores se refleja en su aplicación en sectores tan cruciales como la medicina, la industria alimentaria y el monitoreo ambiental. Estos sensores ofrecen la posibilidad de detectar biomoléculas y agentes tóxicos con una precisión incomparable, lo que transforma la forma en que abordamos los desafíos de salud pública y seguridad (Nikolelis et al., 2018). El diseño y la optimización de nanobiosensores requieren una profunda comprensión del comportamiento de los nanomateriales que los componen.

Por tanto, el estudio de los nanobiosensores y su interacción con diversos nanomateriales es un campo de investigación prometedor que tiene el potencial de transformar la forma en que abordamos desafíos en áreas primordiales como la salud (Renneberg et al., n.d.). La sinergia entre la nanotecnología y la biología abre un horizonte de posibilidades, y el entendimiento en constante evolución de cómo los nanomateriales influyen en el rendimiento de los sensores es crucial para alcanzar el máximo potencial de esta tecnología innovadora.

1.2 Estructura del trabajo

Dentro de este contexto, el presente Trabajo Fin de Grado se orienta hacia la evaluación de la viabilidad de emplear sensores fotónicos basados en capas porosas para la detección de un analito de relevancia en el ámbito de la salud alimentaria: la gliadina, una de las proteínas fundamentales del gluten vinculada con la enfermedad celíaca. En particular, se abordará la utilización de capas porosas de óxido de titanio (TiO_2) elaboradas mediante un procedimiento de síntesis en el Centro de Tecnología Nanofotónica de la UPV. El óxido de titanio, que se caracteriza por su simplicidad y bajo coste, brinda un enfoque innovador para la creación de estas capas porosas.

Inicialmente, se desarrollará un modelado teórico de estas capas con el propósito de elucidar su comportamiento y sensibilidad. Para lograrlo, se llevará a cabo una revisión bibliográfica de los fundamentos conceptuales sobre cuyas bases se asientan los principios físicos que dictan la dinámica de la onda electromagnética y su relación con el entorno. Así, esta predicción matemática puede servir de herramienta a la hora de pronosticar la interacción de la luz y las capas porosas del material propuesto.

Una vez finalizado el modelo matemático, se llevarán a cabo dos métodos de evaluación experimental para determinar la posibilidad de utilizar este tipo de estructura óptica de manera específica en la detección de gliadina en muestras sintéticas.

Se darán dos líneas experimentales, que diferirán en el método de funcionalización. La primera, en la que las estructuras de sensado se funcionalizarán fluyendo las disoluciones con las

moléculas pertinentes, y, la segunda, de la cual el método de funcionalización se basa en una incubación de los compuestos a diferentes valores de concentraciones, con tal de determinar qué combinación es la que devuelve una respuesta más significativa. Se registrarán los datos de reflectividad para todos los casos experimentales y se procesarán por medio de los programas *Ocean Optics*, *Matlab* y *Excel*.

En síntesis, se emprende una doble vertiente en esta investigación, que comprende la formulación de un modelo matemático con la finalidad de anticipar el comportamiento espectral y la sensibilidad manifestada por las capas compuestas de óxido de titanio y un abordaje experimental sobre las muestras elaboradas en el Centro de Tecnología Nanofotónica de la Universitat Politècnica de València. Este enfoque de investigación se orienta a la detección precisa de un analito de interés en el ámbito de la salud alimentaria: la gliadina.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo consiste en evaluar la viabilidad de la implementación de sensores fotónicos basados en capas porosas como herramientas de detección en el ámbito de la salud alimentaria, centrándose en la detección específica de la gliadina, una de las principales proteínas del gluten asociada a la enfermedad celíaca. El objetivo primordial es explorar el potencial de estas capas porosas de óxido de titanio como transductores de señales en la detección de analitos de interés, mediante un enfoque interdisciplinario que integre la nanotecnología, la química y la biología.

1.3.2 Objetivos específicos

Con el propósito de alcanzar el objetivo general de la tesis, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar un modelo matemático teórico para predecir el comportamiento espectral y la sensibilidad de las capas porosas de óxido de titanio en la detección de gliadina.
2. Utilizar estructuras porosas, específicamente capas porosas de óxido de titanio (TiO₂), como transductores en experimentos de biosensado para la detección de gliadina.
3. Realizar la biofuncionalización de superficies mediante la aplicación del anticuerpo del analito de interés, la α -gliadina, y proteína AG, con el propósito de facilitar el reconocimiento molecular específico de la gliadina como analito.
4. Investigar distintos enfoques de biofuncionalización, a través de flujos y procesos de incubación de elementos de bioreconocimiento, para optimizar la interacción entre las capas porosas y los elementos de reconocimiento.
5. Analizar la eficacia de los métodos de biofuncionalización mediante la variación de concentraciones de marcador y analito, evaluando la capacidad de detección y sensibilidad de los biosensores.

6. Detectar la Gliadina empleando los elementos de reconocimiento establecidos en el objetivo 3, y evaluar la capacidad de los sensores para discernir con precisión la presencia de este analito específico.
7. Familiarizarse con el software de laboratorio *Ocean Optics Software* para monitorear en tiempo real las respuestas de los biosensores durante las pruebas experimentales.
8. Procesar los datos recolectados a través de *Matlab* y *Excel*, así como interpretar los resultados generados por ambos programas para obtener información significativa sobre el desempeño de los sensores y la detección de gliadina.

II

Preliminares

Capítulo 2

Estado del arte

Los biosensores, que son dispositivos que se componen una sonda biológica y un transductor, han despertado un interés creciente en aplicaciones ambientales, industriales y de diagnóstico biomédico. Utilizando como elemento de reconocimiento bioreceptores de organismos biológicos o receptores que han sido diseñados imitando sistemas biológicos, se ha creado un nuevo medio de análisis bioquímico, que cuenta con la alta selectividad de los sistemas de reconocimiento biológico que encontramos en la naturaleza. Estos elementos de bioreconocimiento, coordinados con diversos métodos de transducción de señal, han contribuido, con su rápido crecimiento, al avance del campo del bioanálisis y las tecnologías relacionadas, conocidas como biosensores y biochips (Vo-Dinh et al., 2001).

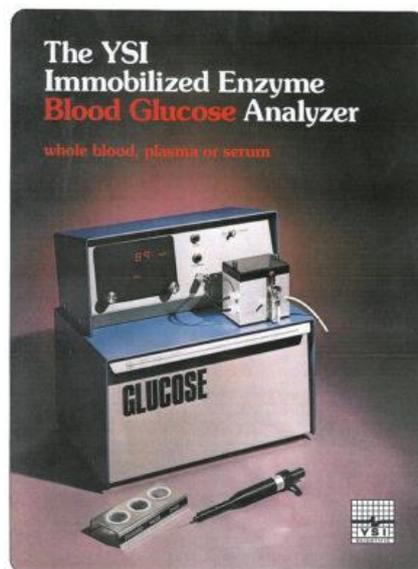


Figura 2.1: Modelo A23 introducido por la empresa Yellow Spring Instruments en 1972, primer instrumento comercial capaz de medir glucosa en sangre total diluida mediante el uso de un biosensor basado en enzimas (Reilly Dixon, 2021)

Los biosensores presentan la capacidad de acortar el lapso temporal entre la captación de la muestra y los resultados, no obstante, su evolución se centra en lograr selectividades y sensibilidades equiparables a los métodos establecidos, pero con el valor añadido de una disminución considerable del costo. Aunque, en un principio, no se trate de aspectos a los que se les otorga una extrema relevancia, cabe tener en cuenta cuestiones como la facilidad de uso, el mantenimiento y el funcionamiento ininterrumpido, además la adecuación de técnicas de fabricación a nivel micro y nano en el mundo de los biosensores tiene un gran potencial y están empezando a surgir diversas aplicaciones (Lazcka et al., 2007).

La nanotecnología abarca el estudio, manipulación, creación y uso de materiales, dispositivos y sistemas generalmente con dimensiones inferiores a 100 nm [Jianrong et al., 2004]. La aparición de la nanotecnología está abriendo nuevas perspectivas para el desarrollo de nanosensores y nanosondas con dimensiones submicrométricas adecuadas para mediciones intracelulares.

La sensibilidad y otros atributos de los biosensores pueden mejorarse mediante el uso de nanomateriales en su construcción. Los nanomateriales, o matrices con al menos una de sus dimensiones en una escala de 1 a 100 nm, exhiben características físicas y químicas únicas debido a efectos como el efecto de tamaño cuántico, el efecto de tamaño reducido, el efecto de superficie y el efecto de túnel macro-cuántico (Vo-Dinh et al., 2001).

Entre las ventajas de adoptar esta perspectiva a una escala más reducida se incluye la producción a gran escala y una disminución de los costos por unidad. Además, se logra trabajar con volúmenes de muestra en el rango de los nanolitros o incluso menos, lo que conlleva el abaratamiento del proceso con costos más bajos para los reactivos. La microfluídica también tiene un impacto positivo al mejorar las tasas de mezcla y el transporte de masa, lo que implica tiempos de análisis significativamente más cortos. Por otra parte, este enfoque permite la realización de análisis de múltiples analitos en un mismo dispositivo, acelerando los tiempos de análisis. Dada la reducida escala de los volúmenes que se manipulan, estos dispositivos ofrecen mayor seguridad y son más respetuosos con el medio ambiente. Además, el consumo de energía es menor comparado a otras técnicas de análisis y la posibilidad de utilizar volúmenes a escala de mililitros y configuraciones similares a cartuchos podría facilitar la contención de la contaminación asociada a los materiales de desecho (Lazcka et al., 2007).

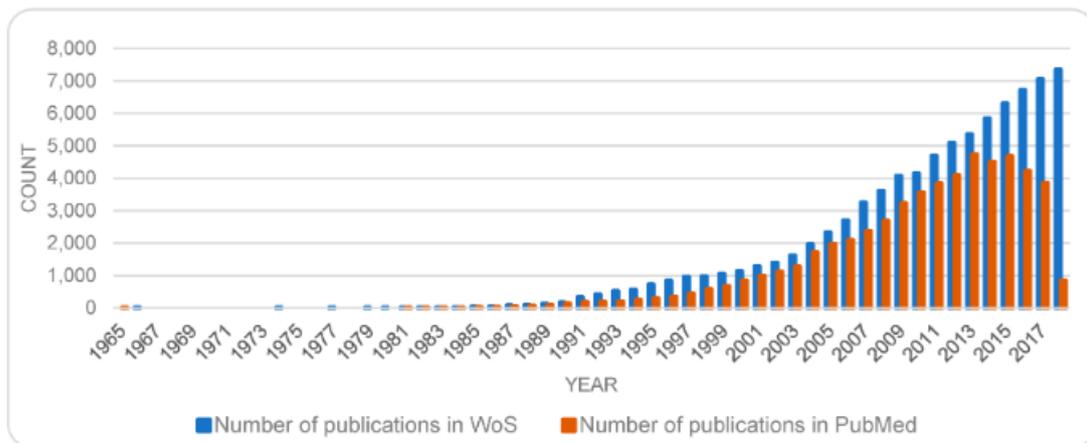


Figura 2.2: Recuento anual de publicaciones sobre biosensores basado(s) en datos de Web of Science capturados en mayo de 2019. La tendencia de publicación basada en los datos originales de PubMed de 2018 también se incluye como punto de referencia (Olson & Bae, 2019)

En lo que respecta a las publicaciones sobre biosensores, el número de publicaciones ha aumentado a lo largo de los años, evolucionando desde apenas unas pocas en las dos primeras décadas, a más de 3000 artículos por año desde 2009. La Figura 2.2 sugiere un descenso en el número de publicaciones sobre biosensores en los años más recientes, con un pico en 2013 con 4729 artículos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que suele haber un lapso de tiempo entre el registro y la inclusión de publicaciones en las bases de datos científicas. Además, la velocidad de registro puede variar de una base de datos a otra. Con tal de examinar aún más este descenso en los números, en su estudio, Olson & Bae, estudiaron datos adicionales al mismo tiempo (marzo de 2018) de la base de datos de Web of Science para su comparación. Los

datos de Web of Science no respaldaron los hallazgos anteriores y la disminución reciente, sino que indicaron un crecimiento continuo incluso en los años más recientes (Olson & Bae, 2019).

2.1 Biosensores

Un biosensor se puede definir como un dispositivo analítico compacto, que incorpora un elemento de detección biológico o, en todo caso, biomimético, integrado o conectado a un sistema de transducción (Velasco-Garcia & Mottram, 2003).

En un biosensor se pueden diferenciar dos elementos básicos: La capa bioquímica que actúa como elemento de reconocimiento y un transductor fisicoquímico.



Figura 2.3: Esquema de los elementos básicos de un biosensor (Martín Sánchez, 2019a)

La detección se efectúa mediante los biorreceptores, los cuales ejecutan un reconocimiento molecular altamente específico y de alta afinidad hacia el analito, conocido como bioreconocimiento (Thévenot et al., 2001). Dependiendo de las características del analito de interés o de los propios objetivos del biosensado, esta capa de reconocimiento puede estar constituida por una gran variedad de moléculas (Martín Sánchez, 2019a).

Este proceso de detección se realiza de manera rápida y directa a partir del transductor, el cual transforma la interacción en una señal cuantificable, que es amplificada y sometida a procesamiento posterior para que pueda ser interpretada por el usuario. En la mayoría de los casos esta señal es eléctrica, óptica o mecánica y suele ser proporcional a la concentración de analito presente en la muestra (Thévenot et al., 2001)

A la hora de propiciar el evento de reconocimiento molecular, se funcionaliza la superficie de contacto mediante técnicas de inmovilización. La más común es la adsorción física del receptor a la superficie del transductor, pero dependerá de las características fisicoquímicas del analito de interés y del material y funcionamiento del propio transductor (Lechuga & Calle Martín, 1995).

La detección de analitos orgánicos suele presentar dificultades basadas exclusivamente en sus características físicas fundamentales, lo que requiere el uso de etiquetas como marcadores fluorescentes o moléculas radiactivas, como la biotina unida al analito. En consecuencia, la señal final del sensor, que es proporcional al número de etiquetas, cuantifica la cantidad de analito unido. Las técnicas de detección empleadas en biosensores se pueden clasificar de manera amplia en detección con etiquetas (*label-based*) y detección sin etiquetas (*label free*), basadas en el uso de estas (Samuel & Rao, 2022).

Las técnicas *label-based* a menudo demandan mucho tiempo y son laboriosas, además, el uso de etiquetas podría modificar los sitios de unión de las biomoléculas al bloquearlos. Esto podría tener un impacto negativo en cómo el receptor y el analito interactúan (Samuel & Rao, 2022).

Sin embargo, en la tecnología de detección *label-free*, no es necesario recurrir a las etiquetas. Se basa en las propiedades inherentes de los analitos, como su masa atómica, tamaño, carga superficial, impedancia eléctrica e índice de refracción, para su detección (Samuel & Rao, 2022). Además, el desarrollo de nanobiosensores permite un análisis en tiempo real con alta precisión y a concentraciones muy bajas, reduciendo el derroche de materiales, ya que varios analitos pueden detectarse en cuestión de minutos, es por esto por lo que para este trabajo se ha optado por un enfoque *label-free*.

Con tal de obtener un diseño lo más eficiente posible, para el conjunto del dispositivo se tiene en cuenta lo siguiente (Martín Sánchez, 2019; Tébar Saiz, 2021):

- **Miniaturización:** El diseño de dispositivos a escala micrométrica o nanométrica es primordial, en ocasiones, para cumplir con los requisitos. Por otra parte, esto abre la puerta a la producción de un gran número de transductores en un mismo circuito integrado, siendo posibles así aplicaciones de sensado múltiple (Soleymani & Li, 2017).
- **Automatización:** El hecho de que este tipo de dispositivos sean así de simples debe a que están orientados hacia procesos de detección autónomos, con tal de poder prescindir de los laboratorios de análisis tradicionales (Bharadwaj & Singh, 2012).
- **Volumen de la muestra:** Uno de los beneficios de los biosensores es su propósito de reducir lo máximo posible la cantidad de muestra necesaria para la detección (Martín Sánchez, 2019).
- **Portabilidad:** Los recientes avances en los biosensores portátiles permiten la detección rápida, precisa y en el lugar de biomarcadores, previniendo la propagación de enfermedades mediante el control de su procedencia. Además, se requiere de un acopio de muestras menos invasivo para utilizar biosensores portátiles en entornos remotos para diagnósticos y pruebas precisas en el lugar (Senf et al., 2020).
- **Coste:** Como norma general, los bajos costes se asocian a una mayor expansión del uso de biosensores y fomentan la aparición de nuevas aplicaciones (Vigneshvar et al., 2016).
- **Reproducibilidad:** Los dispositivos que se pretende diseñar deben caracterizarse por su precisión y exactitud, deben de ser capaces de generar la misma respuesta para una misma entrada, pues esto determina la fiabilidad del dispositivo (Martín Sánchez, 2019).

- **Sensibilidad:** Este parámetro mide la relación entre la señal generada a la salida del transductor y la cantidad de analito en la entrada. Es uno de los principios que mejor representa y cuantifica el desempeño un sensor sensor y muchas de las publicaciones se centran en maximizar su valor (Martín Sánchez, 2019a)
- **Linealidad:** Se dará en aquellos rangos de concentraciones en las que la respuesta del biosensor sea directamente proporcional a la concentración de la muestra. Así, es posible la obtención de un modelo capaz de anticipar el comportamiento del detector (Bhalla et al., 2016).
- **Exactitud:** Se puede definir esta propiedad como la capacidad del dispositivo de obtener un resultado experimental lo más próximo posible al valor teórico (Román Páez et al., 2017)
- **Selectividad:** Esta cualidad representa una de las características más destacadas de estos dispositivos. Permite la detección precisa del analito objetivo en una muestra real, incluso cuando esta contiene varios componentes, evitando cualquier interferencia del resto de elementos presentes (Bhalla et al., 2016). En otras palabras, estos dispositivos son capaces de identificar el analito de interés de manera selectiva y sin verse afectados por otros componentes presentes en la muestra.

2.2 Clasificación de los biosensores

Los biosensores se pueden clasificar bajo numerosos criterios, sin embargo, las dos categorías más populares son el elemento de bioreconocimiento y el tipo de señal que se emplea en la transducción (Alhadrami, 2018). Lo ilustra un ejemplo de clasificación de los biosensores bajo ambas perspectivas.

Recognizing biomolecule	Example	Signal transduction	Example
Antibodies (Immunosensors)	Monoclonal Polyclonal	Electrochemical	Amperometric Conductimetric Impedimetric Potentiometric
Protein receptors	Metabotropic receptors Ionotropic receptors	Optical	Absorbance Fluorescence Phosphorescence Bio/chemiluminescence Reflectance Raman scattering Refractive index
Enzymes	β -glucuronidase (encoded by <i>gusA</i> marker gene) β -galactosidase (encoded by <i>lacZ</i> marker gene)	Mass sensitive	Surface acoustic wave biosensor Cantilever biosensors
Whole cells	Microbial sensors Mammalian cells tissue	Optical	<i>E. coli</i> K12C600 <i>E. coli</i> HB101 <i>E. coli</i> DPD1718
Nucleic acids	Hybridization DNA-aptamers based biosensors	Optical (Fluorescence)	Fluorescence-based aptasensor

Figura 2.4: Propuesta de clasificación de los distintos tipos de biosensores (Alhadrami, 2018)

Según el método de transmisión de la señal (Alhadrami, 2018):

- **Biosensores electroquímicos:** Económicos, portátiles, altamente sensibles y compatibles con los métodos actuales de microfabricación.

- **Biosensores ópticos:** Son también muy comunes debido a su elevada velocidad de detección, sensibilidad, robustez y capacidad de detectar múltiples analitos.
- **Biosensores sensibles a masa:** Se usan con menos frecuencia ya que emplean materiales piezoeléctricos y su sensibilidad tiende a disminuir en comparación con otros biosensores. No obstante, presentan algunas ventajas como la capacidad de monitoreo a tiempo real en entornos con líquido, vacío o aire.
- **Biosensores termométricos:** Han sido principalmente empleados para el monitoreo de procesos clínicos e industriales.

Si se considera la clasificación según la naturaleza del elemento de bioreconocimiento:

- **Biosensores enzimáticos:** Se fundamentan en el principio de la alteración, catalizada por enzimas, de un sustrato indetectable en un resultado electroquímicamente medible, o viceversa (Hassan et al., 2016a). Muchas reacciones catalizadas por enzimas involucran la liberación o utilización de un resultado medible (es decir, O₂, CO₂ e iones), que puede ser medido utilizando un transductor adecuado acoplado a una enzima inmovilizada (Marco & Barceló, 1996). Las enzimas analíticas clave que se han empleado en este tipo de biosensores son las oxidorreductasas y las hidrolasas (Collings & Caruso, 1997).
- **Biosensores basados en proteínas no catalíticas:** Los biosensores basados en receptores de proteínas o también llamados biosensores de proteínas no catalíticas, utilizan proteínas de la membrana celular como receptores. Estas proteínas permiten transmitir la señal de unión a través de la membrana, ya sea mediante receptores metabotrópicos (que liberan enzimas) o mediante receptores ionotrópicos. En otras palabras, estos biosensores utilizan proteínas especiales en la superficie celular para detectar sustancias específicas y convertir esa detección en una señal útil (Alhadrami, 2018).
- **Inmunosensores:** Se suele emplear una técnica que recibe el nombre de inmunosenso en fase sólida, en la que, tanto antígenos como anticuerpos, se fijan a una fase sólida, permitiendo la interacción entre ambos elementos. El atractivo principal de los inmunosensores es su alta sensibilidad y la gran capacidad que tienen de detectar específicamente el analito de interés (Alhadrami, 2018)
- **Biosensores basados en aptámeros o ADN:** Este tipo de biosensores se han desarrollado como alternativas a los inmunosensores dado su bajo coste, su alta estabilidad y su especificidad. Los aptámeros se definen como minúsculas secuencias de ADN o ARN con aproximadamente 100 nucleótidos o menos (Stoltenburg et al., 2007). Las interacciones únicas intramoleculares entre estos nucleótidos hacen que los aptámeros se plieguen en una distintiva estructura tridimensional. Los biosensores basados en aptámeros de ADN pueden unirse selectivamente con una especificidad y afinidad superiores a bacterias específicas, virus, proteínas, hormonas, analitos e incluso moléculas e iones pequeños (Alhadrami, 2018)
- **Biosensores whole-cell:** Utilizan células procariotas o eucariotas para informar en tiempo real sobre la composición química, toxicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad

de las sustancias (He et al., 2016). Se han desarrollado con el propósito de detectar no solo la presencia o ausencia del analito de interés, sino también para medir de manera precisa la concentración subletal que puede producir efectos tóxicos o mutagénicos (Hassan et al., 2016b), más relevante en comparación con las técnicas analíticas convencionales.

2.3 Transductores ópticos

Los transductores ópticos son aquellos cuyas propiedades ópticas se ven alteradas ante el evento de reconocimiento molecular (Garcés Montoya, n.d.). La detección de los analitos se puede llevar a cabo de manera indirecta o directa (Martín Sánchez, 2019a)

En la detección indirecta, la unión del analito a la superficie funcionalizada no genera una señal medible por el dispositivo, sino que se precisa de un tercer elemento que, sirviéndose del resultado de la unión molecular, genere una señal que sí que pueda ser medida por el transductor. Comúnmente, se emplean componentes químicos con propiedades fotoluminiscentes marcando los receptores moleculares, de manera que, cuando se produce el evento de reconocimiento, se generan cambios en los marcadores, ocasionando luminiscencia (Martín Sánchez, 2019a; Strianese et al., 2012). Según la intensidad de la fluorescencia, se puede determinar la afinidad de la interacción entre moléculas. Estas técnicas se caracterizan por una gran sensibilidad, pero el marcaje con terceros es tedioso y complejo, además de que es complicado obtener resultados cuantitativos (Tébar Saiz, 2021).

La transducción directa, por su parte, sí que mide las modificaciones en la propagación de la señal electromagnética a través del transductor (Martín Sánchez, 2019a). Hoy en día, algunos sistemas ópticos directos están disponibles comercialmente y utilizan este enfoque dinámico. Todos los métodos comerciales utilizan técnicas de campo evanescente para monitorear la reacción de afinidad mediante la variación del índice de refracción debido al cambio en la concentración del ligando (Brecht & Gauglitz, 1995).

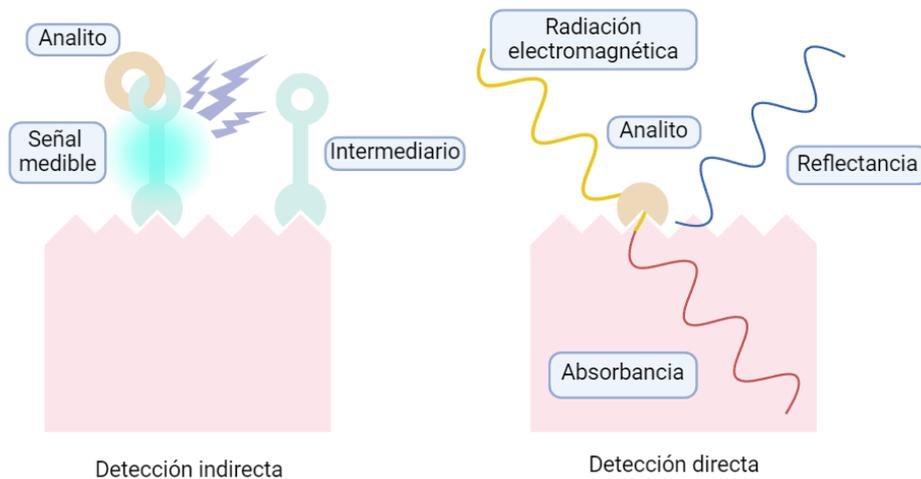


Figura 2.5: Esquema de la detección indirecta y directa de analitos mediante absorbancia y reflectancia (Martín Sánchez, 2019a)

2.3.1 Biosensores basados en la resonancia de plasmón de superficie

Los biosensores ópticos de este tipo se encuentran entre los más avanzados y ampliamente explorados, encontrando aplicaciones destacadas en campos como la biotecnología y la biomedicina. Estos dispositivos presentan una estructura que involucra una interfaz metal-dieléctrico, y cuando son excitados en un ángulo específico, generan plasmones superficiales. Cuando se detecta o reconoce un analito objetivo, el índice de refracción experimenta modificaciones, lo que a su vez provoca variaciones en las características de propagación de las ondas plasmónicas. Estas variaciones pueden ser cuantificadas mediante mediciones de cambio de fase o cambio de longitud de onda (Guo, 2012).

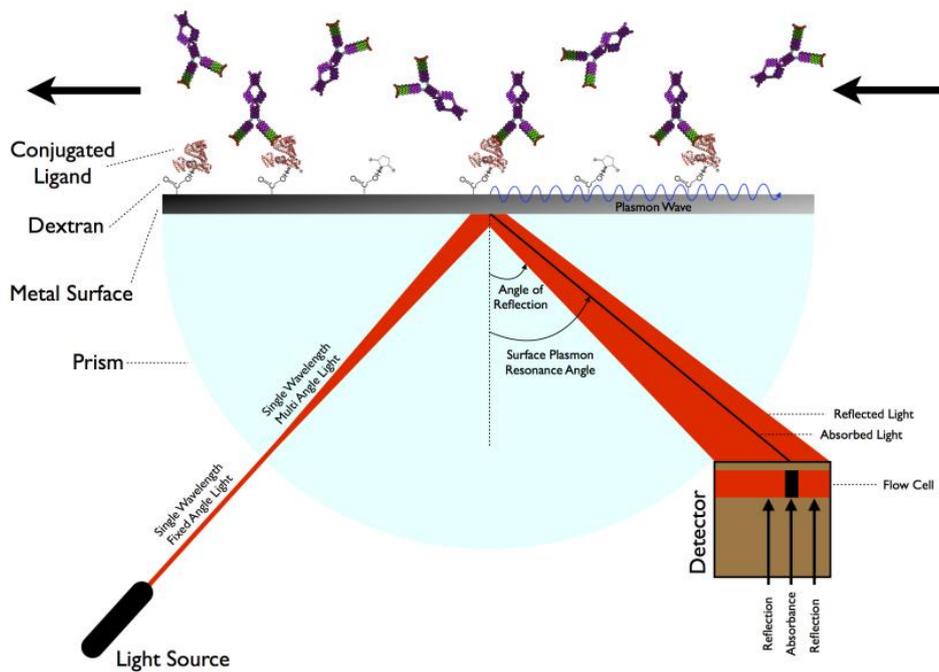


Figura 2.6: Esquema de sensor basado en resonancia de plasmones de superficie (Iranzo Egea, 2017)

2.3.2 Biosensores de fibra óptica

Una de las ventajas destacadas de estos dispositivos radica en su elevada selectividad y su reducido límite de detección. La estructura de estos biosensores se basa en una fibra cilíndrica revestida, típicamente con sílice, y un núcleo dopado con germanio. Esta configuración se diseña cuidadosamente para asegurar que el índice de refracción interno sea mayor que el índice externo, lo que da lugar al fenómeno de reflexión total interna (TIR) y permite la propagación de la luz en el interior de la fibra (Tébar Saiz, 2021)

Para lograr la interacción de la luz con los analitos, se requiere un campo evanescente que, lamentablemente, no existe debido al recubrimiento. Por lo tanto, se deben crear regiones especializadas para la detección, donde se reduzca o elimine el revestimiento y se permita que el campo evanescente interactúe con las sustancias de interés. Existen diversas estrategias para lograrlo, siendo las más utilizadas: descubrir parcialmente el núcleo en una zona, estrechar el revestimiento en forma de cono, adoptar una forma de "U" o configurar la punta del sensor en forma cónica para facilitar la detección (Leung et al., 2007)

2.3.3 Biosensores basados en anillo resonador

Es importante destacar que estos dispositivos están constituidos por un resonador en forma de anillo, a través del cual la luz se propaga principalmente mediante *Whispering Gallery Mode* (WGM). Estos modos permiten detectar el analito mediante el campo evanescente generado en la superficie del resonador. La eficiencia del resonador y la cantidad de pérdidas asociadas se caracterizan mediante el factor de calidad (Q), cuyo valor más bajo indica una mayor tasa de pérdidas. Hasta el momento, se han empleado diversas configuraciones, que incluyen resonadores en forma de anillo, discos microtoroides, microesferas, entre otras (Fan et al., 2008; Tébar Saiz, 2021).

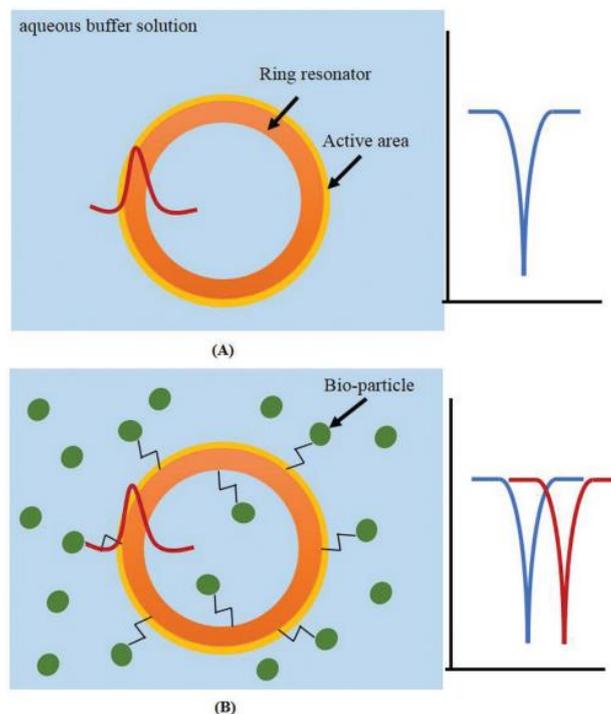


Figura 2.7: Sensor basado en anillo resonante. (A) Anillo resonante en una disolución sin biopartículas de interés. (B) El analito presente en el medio capturado por el anillo interactúa con el campo evanescente produciendo un desplazamiento en la longitud de onda (Sarkaleh et al., 2017)

2.3.4 Biosensores basados en el interferómetro de Mach-Zehnder

El principio de funcionamiento de este sensor se basa en la inyección de un haz de luz láser en una guía de onda monomodo, que se bifurca en dos caminos, adoptando así una configuración similar a una letra "Y". Uno de los caminos está recubierto con una capa, mientras que el otro presenta una zona no recubierta, permitiendo la interacción con el analito a través del campo evanescente. Esta interacción induce un desfase en la onda con respecto a la onda de referencia, el cual puede ser detectado mediante la interferencia de ambas ondas al reunirse nuevamente al final del sensor (Fan et al., 2008; Tébar Saiz, 2021).

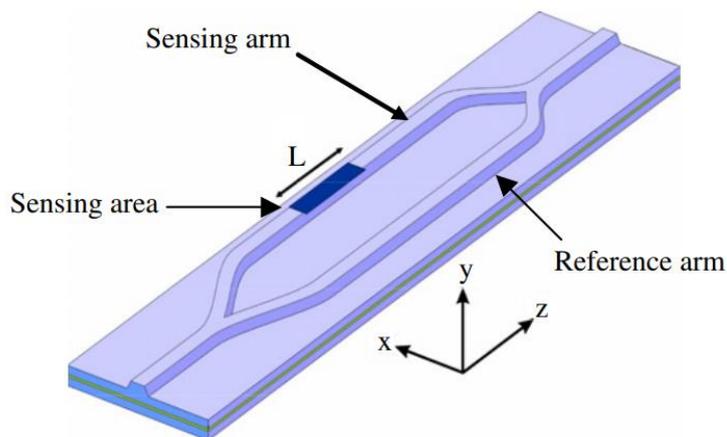


Figura 2.8: Diagrama esquemático de un interferómetro de Mach-Zehnder para biosensado (Sepúlveda et al., 2006)

2.3.5 Biosensores ópticos basados en el interferómetro de Fabry-Perót

El interferómetro de Fabry-Pérot basa su fundamento en el fenómeno de la interferencia, cuando dos ondas electromagnéticas procedentes de distintos caminos ópticos se topan, ambas solapan en el espacio, al igual que en el biosensor anterior, provocando lo que se conoce como interferencias. La interferencia depende de la dirección de la propagación, la frecuencia y la amplitud de cada onda, se puede diferenciar entre interferencias constructivas y destructivas, dependiendo de si la amplitud de onda resultante es la suma o la resta de ambas señales (David D. Nolte, 2012), el interferómetro de Fabry-Pérot es una de las estructuras más sencillas que aprovecha este acontecimiento físico y es el que se ha empleado en el presente estudio.

Este tipo de interferómetro se basa de un material de un determinado espesor, delimitado por dos superficies paralelas y rodeado por un medio óptico. Cuando la radiación electromagnética alcanza la frontera entre ambos medios, esta se divide en dos componentes: la una señal reflejada y la señal transmitida. La señal reflejada se propaga nuevamente por el medio con un ángulo de salida igual que el de incidencia. La señal transmitida, por su parte, modifica su dirección siguiendo la ley de Snell (Martín Sánchez, 2019):

$$n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2) \quad (2.1)$$

Donde θ_1 es el ángulo de incidencia y θ_2 es el de salida, n_1 es el índice de refracción del medio original y n_2 es el índice de refracción del nuevo medio. Al atravesar el nuevo medio, la radiación vuelve a encontrarse con la siguiente interfaz entre ambos y la luz vuelve a dividirse en transmitida y reflejada, generando un conjunto de reflexiones y transmisiones que interactúan entre sí (Figura 2.9) (Martín Sánchez, 2019).

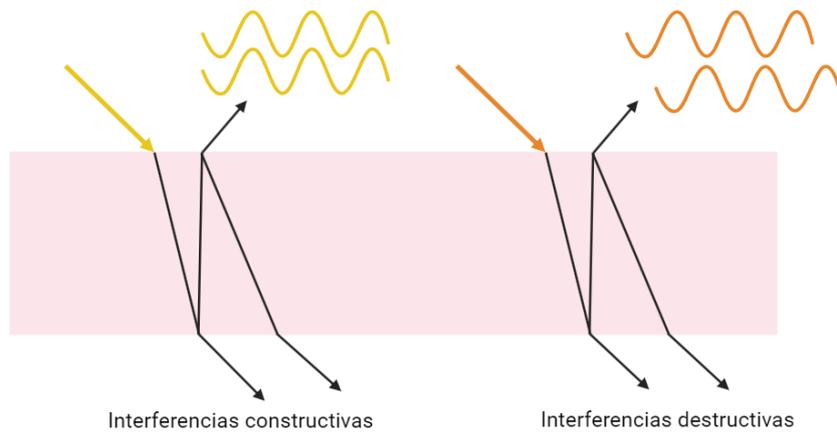


Figura 2.9: Representación de la interferencia constructiva y la interferencia destructiva en un interferómetro de Fabry-Pérot (Martín Sánchez, 2019)

Las amplitudes y las frecuencias serán similares en este estudio puesto que la radiación electromagnética procede de la misma fuente para todos los casos, esto provoca interferencias en el desfase entre señales ante por las modificaciones del índice de refracción o por el espesor de la capa. Así, en un perfil de reflectividad, se pueden diferenciar regiones de alta magnitud (interferencias constructivas) y regiones de baja magnitud (interferencias destructivas) (Martín Sánchez, 2019).

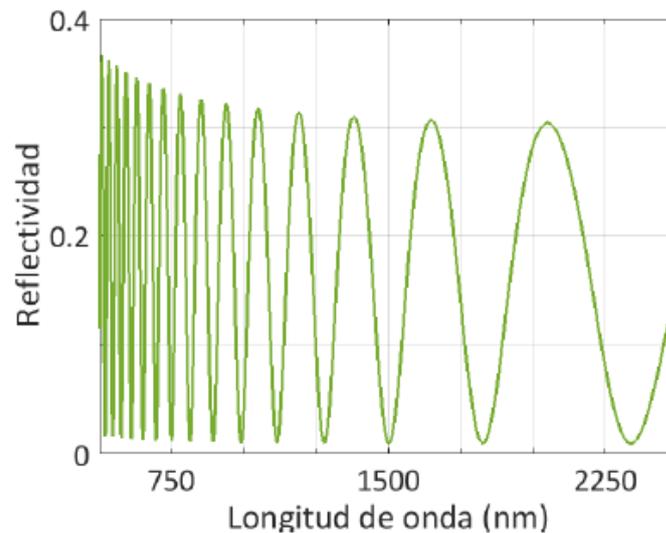


Figura 2.10: Espectro de reflectividad simulado (Martín Sánchez, 2019)

La unión de los analitos a los receptores provocando el evento de reconocimiento molecular genera un cambio en el valor del índice de refracción de la capa y, por tanto, en la dirección de propagación de la onda (Martín Sánchez, 2019).

Incrementos en el índice de refracción ocasionan que tanto las interferencias constructivas como las destructivas se den en longitudes de onda mayores, provocando un efecto de ‘deslizamiento’ o ‘desplazamiento’ del espectro de reflectividad, proporcional a los cambios en el índice de refracción.

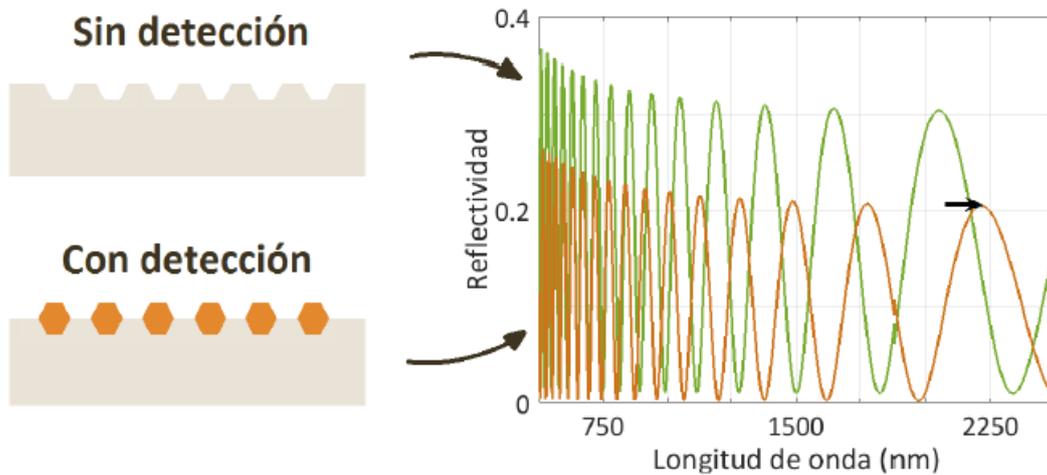


Figura 2.11: Ejemplo de desplazamiento del espectro de reflectividad al producirse el evento de reconocimiento molecular (Martín Sánchez, 2019)

La posición, tanto de los máximos como de los mínimos, viene determinada por la siguiente expresión:

$$\lambda = 2n \frac{h}{m} \quad (2.2)$$

Donde λ es la longitud de onda, n es el índice de refracción, h es el espesor de la capa y m es un número entero. De esta expresión se puede deducir que los desplazamientos espectrales serán mayores en valores de longitud de onda más elevados, también se puede comprobar que los máximos de reflectividad están menos alejados entre sí a medida que aumenta la frecuencia, por lo que a mayores longitudes de onda se da una mejor sensibilidad.

Capítulo 3

Biosensores ópticos interferométricos de capa porosa

Como se ha indicado en apartados anteriores, existen diversos métodos de transducción que se usan frecuentemente a la hora de diseñar dispositivos de sensado; no obstante, a pesar de la variedad, los sensores ópticos parecen destacar dadas sus excepcionales ventajas: elevada sensibilidad, miniaturización extrema, resultados rápidos, volúmenes mínimos de muestra y reactivos necesarios, detección *label-free*, tolerancia y resistencia a condiciones severas e inmunidad a la interferencia electromagnética (Ortiz de Zárate et al., 2022a).

De acuerdo con lo expresado, el principio de funcionamiento de estos dispositivos se basa en la medida de las modificaciones producidas en la señal óptica (amplitud, fase, polarización, etc.) al producirse cambios en el índice de refracción debidos a la presencia de sustancias de interés en el complejo óptico o a los alrededores de su estructura. No obstante, la sensibilidad del sistema óptico se puede ver comprometida, ya que tan solo una pequeña fracción de la señal óptica que no se encuentra confinada por la propia estructura es la que se emplea para el sensado, lo que se conoce como campo evanescente. Por lo que, con tal de maximizar la interacción entre la luz y el analito, en la comunidad científica se ha despertado un reciente interés en la implementación de nuevas estructuras ópticas (Ortiz de Zárate et al., 2021).

Entre la gran variedad de materiales nanoestructurados, destacan los complejos porosos. En primer lugar, su arquitectura tridimensional permite aumentar la superficie de contacto disponible para su biofuncionalización con los elementos de bioreconocimiento y, por otro lado, los materiales porosos permiten que el analito de interés penetre en la estructura de sensado, aumentando así la cantidad de analito que interacciona con la luz, lo que conlleva a la correspondiente mejora de la sensibilidad (Ortiz de Zárate et al., 2022a)

Para estos nuevos mecanismos de sensado se emplea la espectroscopia de reflectancia interferométrica, que se fundamenta en el seguimiento de las modificaciones de la luz generadas por los cambios del índice de refracción en la estructura óptica, inducidos por el evento de reconocimiento molecular (Moretta et al., 2021). En el *set-up* de espectroscopia de reflectancia interferométrica, una luz incidente blanca se ve reflejada desde la interfaz del complejo óptico que se comporta como un interferómetro de Fabry-Pérot, originando un patrón característico en el espectro de reflectancia, que depende del espesor óptico efectivo (*effective optical thickness*, EOT) de la capa:

$$EOT = 2nL \quad (3.1)$$

Donde n se corresponde con el índice de refracción y L con el espesor de la capa.

Este biosensor óptico sin marcado, en particular, sirve como base para todas las mediciones y pruebas de detección realizadas en este estudio. Esto se debe a que las muestras consisten en materiales como el TiO_2 , que, al ser expuesto a la luz, actúa como una cavidad de Fabry-Pérot.

Así, en términos más generales, estas cavidades se componen de una capa de un material específico, que al formar interfaces con otros medios da lugar a diferentes reflexiones, devolviendo un espectro de reflectividad característico con un perfil de picos máximos y mínimos (Tébar Saiz, 2021), como el de la Figura 3.1.

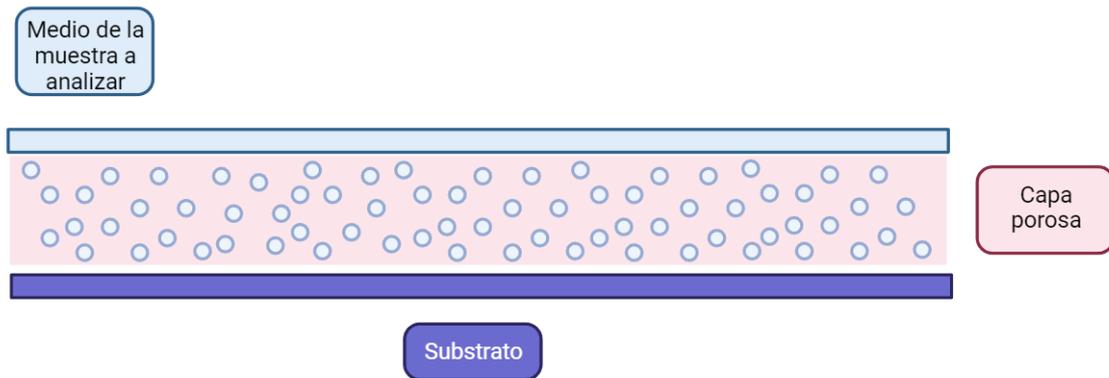


Figura 3.1: Esquemización de las de los medios

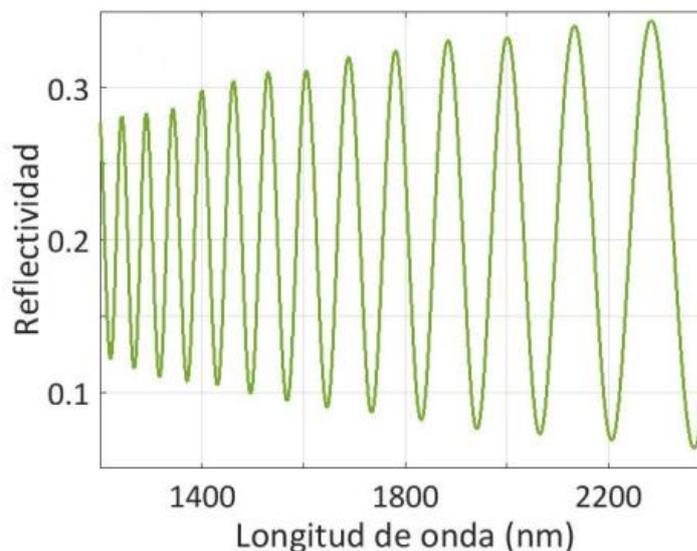


Figura 3.2: Simulación del espectro de reflectividad (Martín Sánchez, 2019a)

Estos complejos ópticos están compuestos de dos fracciones diferenciadas, la fracción o matriz sólida y la porosa, de manera que el índice de refracción variará en función del contenido que ocupe los poros. Cuando el aire de dentro de los poros es reemplazado por otra especie química que le hace aumentar su índice de refracción, se produce un desplazamiento en el espectro reflejado hacia longitudes de onda mayores. Por el contrario, si este disminuye, entonces se

producirá un desplazamiento hacia la izquierda, donde las longitudes de onda presentan valores inferiores (Moretta et al., 2021).

Estos desplazamientos de los espectros reflejados dependen de dos parámetros, uno es la habilidad de la sustancia de completar el volumen del poro, y la otra el valor del índice de refracción.

El primero depende estrictamente de la naturaleza química de la sustancia (características como viscosidad, hidrofilia, hidrofobia, etc.); la segunda, por su parte, es una propiedad intrínseca de la sustancia que se considere. Por ello, estos dispositivos de sensado son considerados como sensores ópticos específicos, esto es, devuelven distintas respuestas para distintas sustancias, pero no son selectivos, es decir, en una combinación compleja de sustancia no son capaces de diferenciar unas de otras (De Stefano, 2019).

En cuanto a la fabricación de este tipo de capas porosas, existen dos enfoques principales: el método *top-down* y el método *bottom-up*. El enfoque *top-down* es la técnica más comúnmente empleada, caracterizada por partir de un material en su escala macroscópica y eliminar sucesivamente material para obtener la forma y patrón deseados. Este proceso implica realizar operaciones específicas considerando las propiedades del material presente en cada una, y se desarrolla desde la parte superior hacia la base de la estructura (Clemente Jiménez, 2019).

En contraste, el método *bottom-up* se fundamenta en un enfoque molecular y se basa en agregar capas de material progresivamente para alcanzar la nanoestructura deseada. Esta técnica presenta, en algunas ocasiones, una mayor complejidad y costos asociados, y se emplea especialmente en la síntesis de nanopartículas a partir de soluciones. Ambos enfoques ofrecen distintas ventajas y desafíos en la fabricación de nanoestructuras, lo que permite elegir el método más apropiado según las necesidades y objetivos específicos de cada aplicación (Clemente Jiménez, 2019).

Los materiales más comunes para la generación de estos sustratos porosos suelen ser aquellos generados por medio de técnicas *top-down*, como el popular silicio poroso (pSi) o el óxido de aluminio anódico (AAO) (Ortiz de Zárate et al., 2022a). La fabricación de estos materiales porosos conlleva la anodización de la materia constitutiva de la matriz sólida (el silicio o el aluminio) al aplicar corriente eléctrica en una solución ácida; sin embargo, este método de producción puede conllevar algunos inconvenientes. Por ejemplo, es posible que aparezcan inhomogeneidades en la capa como distintos tamaños de poro, cambios en el espesor y porosidad dispar a lo largo de la estructura. Cabe destacar que los poros generados mediante este método de fabricación parecen presentar en su mayoría una elongación vertical y estar pobremente interconectados, lo que compromete su llenado al presentar geometrías bruscas, reduciendo la difusión al fluir el analito a través de la estructura porosa.

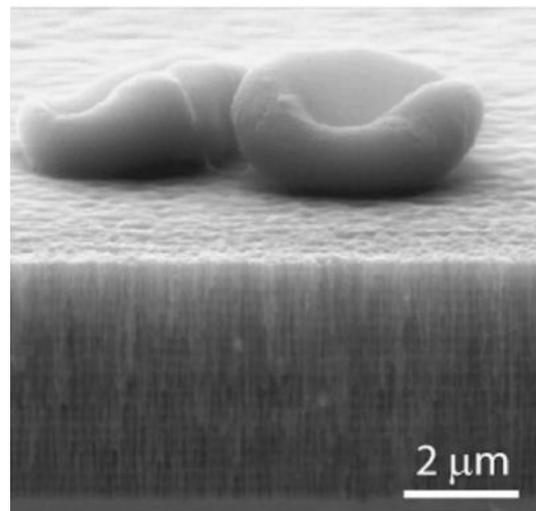


Figura 3. 3: Sección transversal de un biosensor de microcavidad de pSi. Esta imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) muestra los efectos de filtrado por exclusión de tamaño de los poros de pSi, donde se impide que las células sanguíneas entren en la capa (Jane et al., 2009)

Este tipo de problemas pueden condicionar la producción en masa de estos sustratos y, por tanto, su aplicación práctica (Ortiz de Zárate et al., 2022).

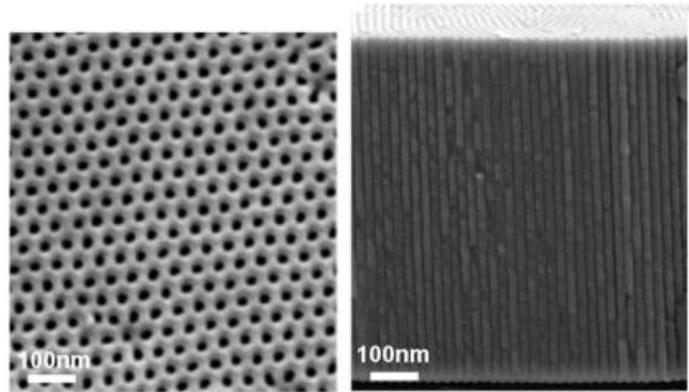


Figura 3.3: Imágenes SEM que muestran las vistas superior y de sección transversal de la estructura AAO (Santos et al., 2013)

Con tal de superar estas limitaciones, se han propuesto nuevos enfoques basados en técnicas de síntesis *bottom-up*, como la posibilidad de generar sensores ópticos basados en una red de nanofibras poliméricas fabricadas por medio de *electrospinning*, no obstante, el bajo índice de refracción de los polímeros necesarios para esta técnica de producción provoca que las características espectrales empleadas para el sensado estén peor definidas, lo que incrementa el ruido y reduce el límite de detección adquirible (Ortiz de Zárate et al., 2022a)

Dadas las circunstancias y limitaciones anteriormente presentadas, el TiO_2 se presenta como un material inorgánico que, mediante un proceso de síntesis *bottom-up*, es capaz de generar una capa porosa con un gran nivel de interconectividad y homogeneidad. El TiO_2 asegura un índice de refracción elevado ($n_{\text{TiO}_2} \approx 2.56$), proporcionando un valor lo suficientemente alto como para proporcionar una respuesta de sensado adecuada. Además, este compuesto presenta características muy interesantes para su aplicación en el campo del biosensado, entre otras destacan su alta estabilidad mecánica y química, su biocompatibilidad y su capacidad de autolimpiado por medio de exposición a radiaciones UV (Niu et al., 2018).

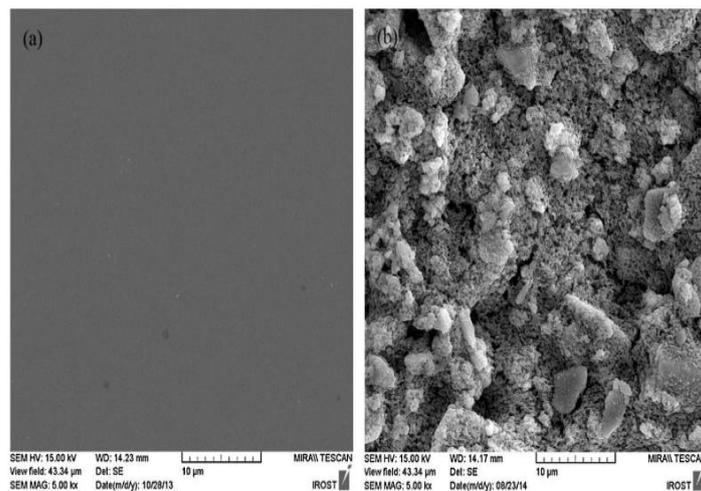


Figura 3.4: Imágenes FE-SEM de (a) películas de TiO_2 y (b) películas de TiO_2 mesoporosas (Niu et al., 2018)

III

Diseño del modelo de sensibilidad

Capítulo 4

Fundamentos teóricos del modelo

Como se ha indicado previamente, los biosensores fotónicos son unos candidatos ideales a la hora de desarrollar chips microfluídicos electroópticos integrados. Las numerosas ventajas que ofrecen, los convierten en dispositivos capaces de lograr análisis totalmente automatizados y diagnósticos clínicos, que pueden ser de gran ayuda en la industria sanitaria y biotecnológica (Guider et al., 2015).

La sensibilidad *bulk* de un sensor se define como su capacidad para detectar cambios en la propiedad o la concentración del analito de interés en una muestra que afecta a toda la muestra en su conjunto, en lugar de centrarse en la superficie o en una zona específica de la estructura. En decir, la sensibilidad *bulk* consiste en la capacidad del sensor para detectar alteraciones en la muestra en la totalidad de su estructura. La sensibilidad *bulk*, por tanto, en el contexto de los sensores ópticos de capa porosa, implica que el sensor puede detectar cambios en la concentración o en las propiedades ópticas de la muestra en toda la masa de esta, lo que puede ser especialmente útil en aplicaciones donde es importante obtener una medida global de la sensibilidad de la estructura.

Comprender y cuantificar la sensibilidad *bulk* de la capa porosa de estos biosensores es crucial para optimizar su diseño y rendimiento, ya que esta propiedad está directamente relacionada con la detección eficiente y específica de las moléculas objetivo. La simulación en MATLAB proporciona una plataforma para estudiar y analizar cómo diferentes parámetros geométricos y ópticos influyen en la sensibilidad del biosensor, permitiendo así tomar decisiones fundamentadas en el diseño de futuros dispositivos sin la necesidad de someterlos a test experimentales.

4.1 Método de Matriz de Transferencia (TMM)

La sensibilidad espectral de un sensor se define en función de la siguiente expresión (Beléndez, 2000):

$$S = \Delta\lambda/\Delta n \quad (4.1)$$

Donde $\Delta\lambda$ se corresponde con la variación de la longitud de onda frente a Δn , la variación del índice de refracción del medio que se fluye por la estructura porosa.

Por lo tanto, en un principio, al conocer los cambios que se van a efectuar en el índice de refracción (pues se corresponden con la naturaleza de la sustancia que se está fluyendo), si se

hace un seguimiento de la variación de la longitud de onda correspondiente a las modificaciones en el índice de refracción, es posible conocer la sensibilidad.

Con la intención de conocer la sensibilidad espectral de una muestra de sensado óptico porosa, se ha elaborado un modelo que, a partir de la extracción teórica de los espectros de reflectancia de distintos sistemas que variarán en función del índice de refracción de la capa porosa, sea capaz de medir el desplazamiento de los máximos o mínimos, calcular la diferencia entre el máximo/mínimo inicial y su correspondiente desplazado tras fluir una disolución con un índice de refracción distinto y devolver un valor de sensibilidad *bulk* para la capa, que dependerá de su espesor y porosidad.

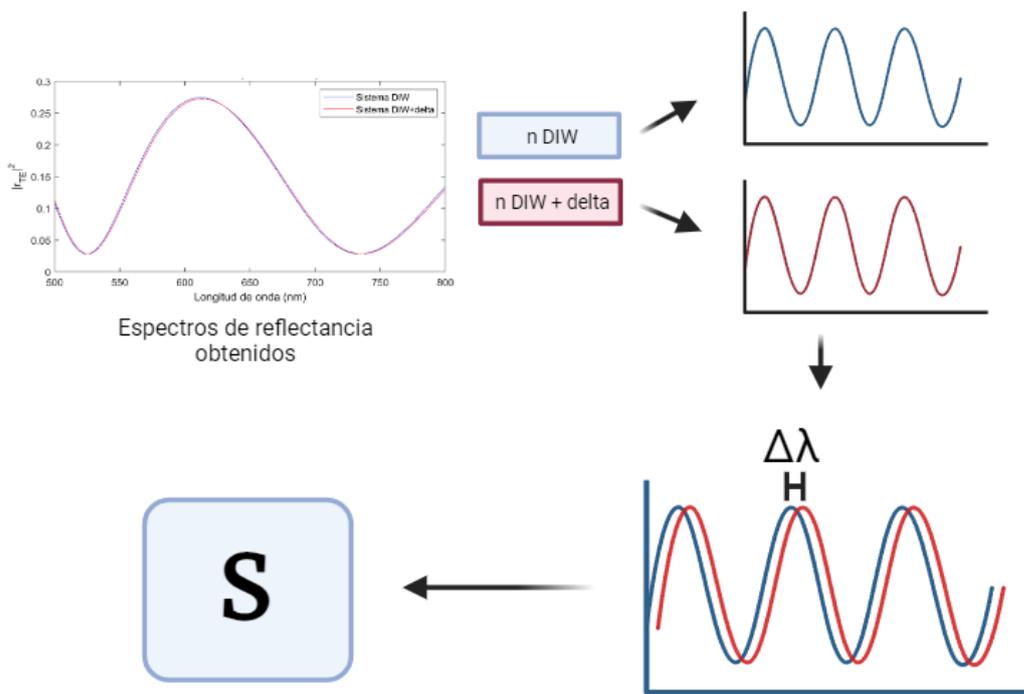


Figura 4.1: Esquematización del objetivo del código

A la hora de desarrollar este modelo, se ha considerado, en un principio, un modelo simple de tres capas como en la siguiente figura:

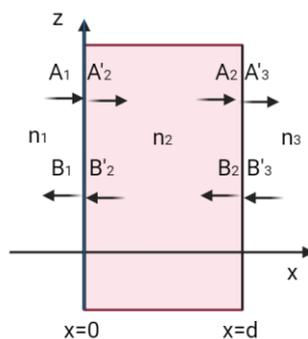


Figura 4.2: Representación gráfica del sistema de tres capas considerado para el modelo, d es el espesor de la capa (Cárdenas Hernández, 2012)

Para cada una de las tres capas, se tiene que:

$$n(x) = \begin{cases} n_1, x < 0 \\ n_2, 0 < x < d \\ n_3, x > d \end{cases} \quad (4.2)$$

Donde n_1, n_2 y n_3 son los índices de refracción de cada capa y d es el espesor de la capa intermedia, al suponer que todo el medio es homogéneo en la capa dirección z (Cárdenas Hernández, 2012), y, por tanto, se debe cumplir que:

$$\frac{\partial n}{\partial z} = 0 \quad (4.3)$$

Por lo que el campo eléctrico presenta la siguiente forma (Cárdenas Hernández, 2012):

$$\mathbf{E} = E(x) \exp(i(\omega t - \beta z)) \quad (4.4)$$

Donde β representa la componente z del vector de onda y ω es la frecuencia angular. En este contexto, se considera que la onda electromagnética se propaga en el plano XZ. Además, se hace la suposición de que el campo electromagnético puede tener dos tipos de polarización: polarización s , en la cual el campo eléctrico es paralelo al eje y , y polarización p o TE, en la cual el campo magnético es paralelo al eje y .

La descripción del campo eléctrico $\mathbf{E}(\mathbf{x})$ consiste en dos componentes: una onda viajera que se desplaza hacia la derecha y otra que lo hace hacia la izquierda (Cárdenas Hernández, 2012). Esta descripción puede expresarse de la siguiente manera:

$$\mathbf{E}(\mathbf{x}) = R \exp(-ik_x x) + L \exp(ik_x x) = A(x) + B(x) \quad (4.5)$$

Donde R y L son constantes que dependen del medio a través del cual la onda se propaga y k_x es la componente del vector de onda en la dirección del eje x . Ahora, se puede representar la amplitud de la onda que viaja hacia la derecha como $A(x)$ y la onda que viaja hacia la izquierda como $B(x)$.

El campo eléctrico, por tanto, se puede escribir como un vector columna, relacionando ambos medios:

$$\begin{pmatrix} A_1 \\ B_1 \end{pmatrix} = D_1^{-1} D_2 \begin{pmatrix} A'_2 \\ B'_2 \end{pmatrix} = D_{12} \begin{pmatrix} A'_2 \\ B'_2 \end{pmatrix} \quad (4.6)$$

$$\begin{pmatrix} A'_2 \\ B'_2 \end{pmatrix} = P_2 \begin{pmatrix} A_2 \\ B_2 \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} A_1 \\ B_1 \end{pmatrix} = D_1^{-1} D_2 P_2 \begin{pmatrix} A_2 \\ B_2 \end{pmatrix}$$

Así:

$$\begin{pmatrix} A_1 \\ B_1 \end{pmatrix} = D_1^{-1} D_2 P_2 D_2^{-1} D_3 \begin{pmatrix} A'_3 \\ B'_3 \end{pmatrix} \quad (4.7)$$

Los vectores columna representan las amplitudes de la onda en cada capa y están relacionadas entre sí por el producto consecutivo de matrices 2×2 . Cada frontera entre medios viene representada por la matriz dinámica D_α y el medio por el cual se propaga la propia onda se representa por medio de la matriz de propagación P_α . Al multiplicar las matrices dinámicas y de propagación se obtiene una matriz 2×2 , que denominamos matriz de transferencia desde el medio de n_1 hasta el n_3 .

Ahora, para para generar un modelo de N capas como el siguiente:

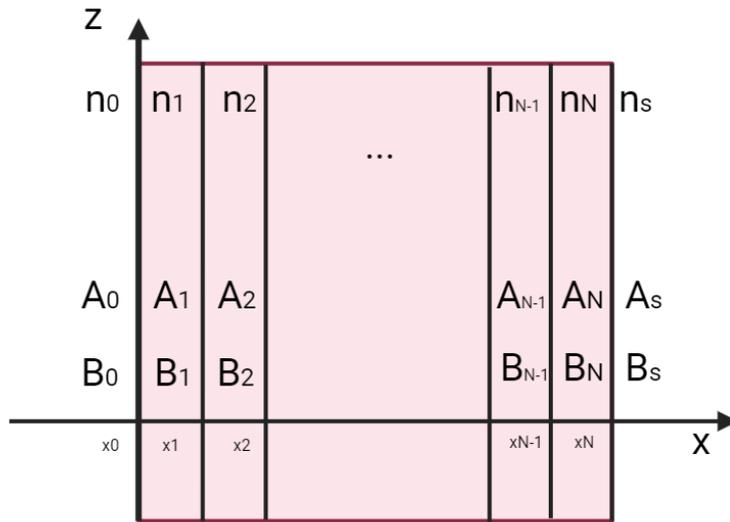


Figura 4.3: Sistema dieléctrico estratificado multicapa (Cárdenas Hernández, 2012)

La distribución del campo eléctrico vendrá descrita por (Cárdenas Hernández, 2012) :

$$\mathbf{E}(x) = \begin{cases} A_0 \exp(-ik_{0x}(x - x_0)) + B_0 \exp(ik_{0x}(x - x_0)), & x < x_0 \\ A_l \exp(-ik_{lx}(x - x_l)) + B_l \exp(ik_{lx}(x - x_l)), & x_{l-1} < x < x_l \\ A'_s \exp(-ik_{sx}(x - x_s)) + B_s \exp(ik_{sx}(x - x_N)), & x_N < x \end{cases} \quad (4.8)$$

Así, empleando el mismo argumento que anteriormente (Cárdenas Hernández, 2012):

$$\begin{pmatrix} A_0 \\ B_0 \end{pmatrix} = D_0^{-1} D_1 \begin{pmatrix} A_1 \\ B_1 \end{pmatrix} \quad (4.9)$$

$$\begin{pmatrix} A_l \\ B_l \end{pmatrix} = P_l D_l^{-1} D_l \begin{pmatrix} A_{l+1} \\ B_{l+1} \end{pmatrix}, \quad l = 1, 2, 3, \dots, N \quad (4.10)$$

Donde la capa $N + 1$ representaría la del medio (s) de la Figura 2, por tanto:

$$A_{N+1} = A'_s$$

$$B_{N+1} = B'_s.$$

Para una polarización TE (p), que es la que se ha usado en este trabajo, las matrices dinámicas (Cárdenas Hernández, 2012) vienen descritas como:

$$D_\alpha = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ n_l \cos \theta_l & -n_l \cos \theta_l \end{pmatrix} \quad (4.11)$$

Y las matrices de propagación (Cárdenas Hernández, 2012):

$$P_\alpha = \begin{pmatrix} \exp(iK_{[z]}d) & 0 \\ 0 & \exp(-iK_{[z]}d) \end{pmatrix} \quad (4.12)$$

Y con $k_{[z]}$ (Cárdenas Hernández, 2012):

$$k_{[z]} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{n_l^2 - (n_0 \sin \theta)^2} \quad (4.13)$$

Así, las amplitudes de las N capas pueden ser escritas como:

$$\begin{pmatrix} A_0 \\ B_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} M_{11} & M_{12} \\ M_{21} & M_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A'_s \\ B'_s \end{pmatrix} \quad (4.14)$$

Así:

$$M = \begin{pmatrix} M_{11} & M_{12} \\ M_{21} & M_{22} \end{pmatrix} = D_0^{-1} \left[\prod_{l=1}^N D_l P_l D_l^{-1} \right] D_s \quad (4.15)$$

El producto de matrices resultará en el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned} A_0 &= M_{11}A'_s + M_{12}B'_s \\ B_0 &= M_{21}A'_s + M_{22}B'_s \end{aligned} \quad (4.16)$$

Al no haber ninguna onda electromagnética que se desplace desde el medio dieléctrico hacia el sistema, $B'_s = 0$ y:

$$\begin{aligned} A_0 &= M_{11}A'_s \\ B_0 &= M_{21}A'_s \end{aligned} \quad (4.17)$$

Así, la relación de reflectancia (la razón entre amplitud de onda incidente y de onda reflejada) que nos interesa para este trabajo queda como (Cárdenas Hernández, 2012):

$$r = \left| \frac{B_0}{A_0} \right|^2 = \left| \frac{M_{21}}{M_{11}} \right|^2 \quad (4.18)$$

Este es el fundamento teórico de la función desarrollada en Matlab *TMM_function* (Anejo A), que, al alimentar con un vector con los índices de refracción de cada capa, el espesor de cada capa y la longitud de onda y el ángulo de la luz incidente, devuelve el perfil de reflectancia en polarización TE del sistema.

A continuación, algunos ejemplos de espectro de reflectancia para distintas combinaciones de índices de refracción con un barrido de longitud de onda desde 200 nm hasta 1000 nm, un ángulo de incidencia de 0° y un espesor de capa intermedia de 400 nm.

4.1.1 Resultados Ejemplo 1

Para una estructura de sensado como se presenta en la siguiente esquematización:

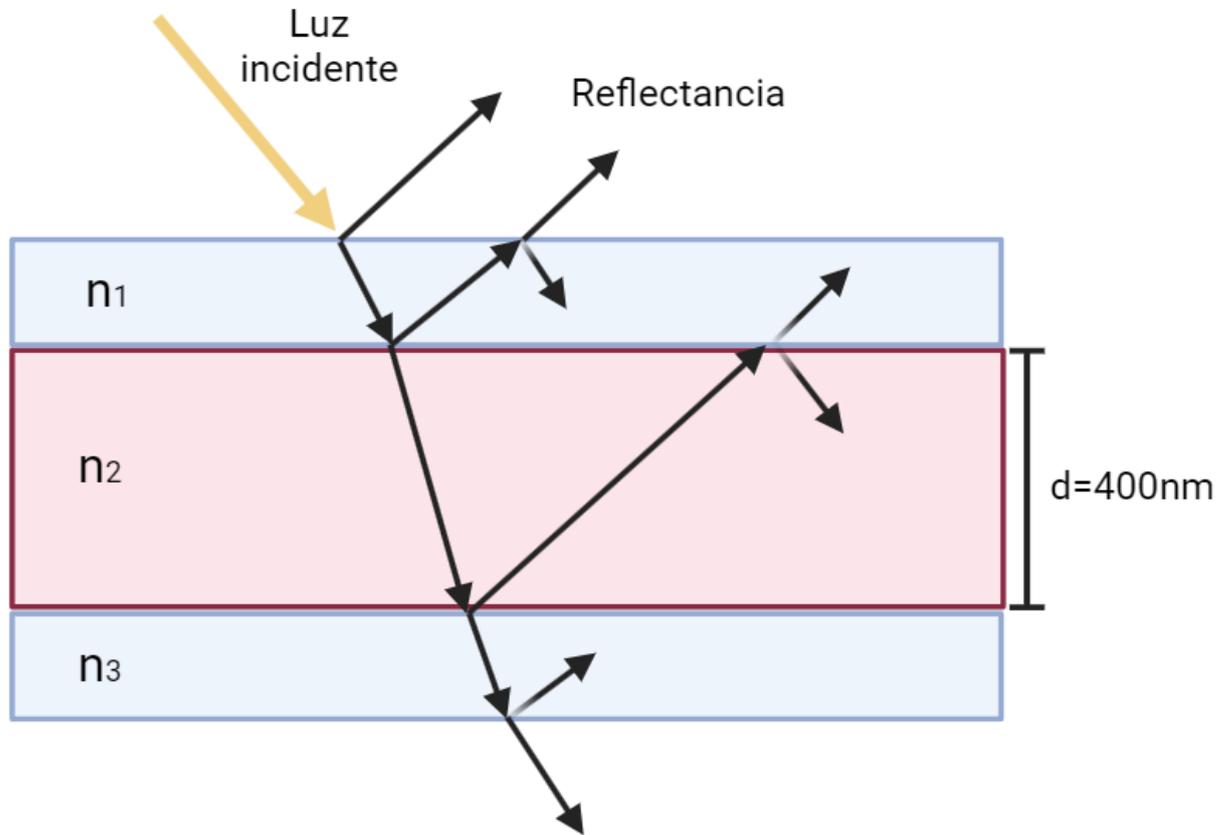


Figura 4.4: Esquematización de los ejemplos

Se han proporcionado los siguientes valores de índice de refracción para obtener el perfil de reflectancia:

Índices de refracción		
Medio 1	n_1	1.000
Medio 2	n_2	1.333
Medio 3	n_3	3.931

Tabla 4.1: índices de refracción para el Ejemplo 1

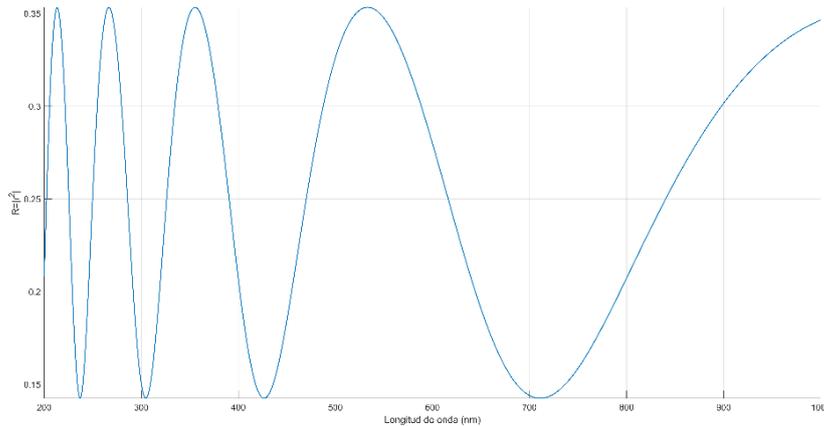


Figura 4.5: Perfil de reflectancia para el Ejemplo 1 obtenido a través de la función TMM_function

4.1.2 Resultados Ejemplo 2

Índices de refracción		
Medio 1	n_1	1.000
Medio 2	n_2	2.000
Medio 3	n_3	3.931

Tabla 4.2: índices de refracción para el Ejemplo 2

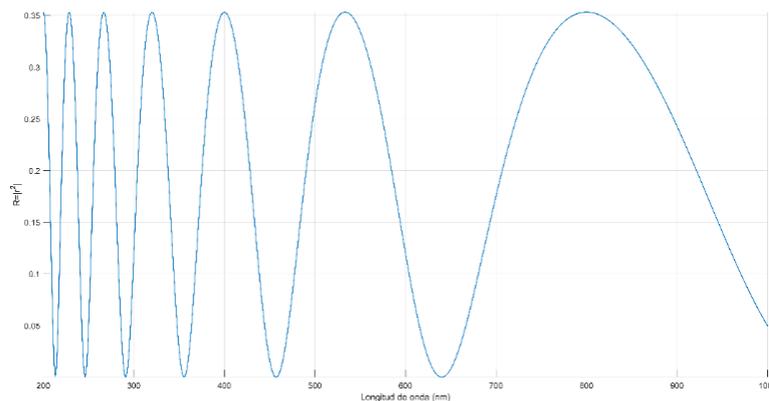


Figura 4.6: Perfil de reflectancia para el Ejemplo 2 obtenido a través de la función TMM_function

Como se puede apreciar en los ejemplos anteriores, al incrementar el índice de refracción tanto las interferencias constructivas como las destructivas se producen a longitudes de onda mayores, provocando un efecto de ‘deslizamiento’ o ‘desplazamiento’ del espectro de reflectividad, proporcional a los cambios en el índice de refracción.

4.2 Índice de refracción efectivo de la capa

A pesar de haber conseguido el espectro de reflectancia del sistema, cabe tener en cuenta que la estructura óptica que se emplea para el sensado es porosa, por lo que se ha desarrollado una función capaz de devolver el valor del índice de refracción efectivo de la capa.

Al tratarse de una configuración porosa, su constitución se divide en un porcentaje de poros y en una matriz sólida, por tanto, el índice de refracción del material en cuestión no sería fiel a la realidad física de la estructura si no se consideran estas cavidades. Es por esto, que se ha generado la función *effectiveN_fuction_vector* (Anejo A), cuyo desarrollo se detalla en esta sección.

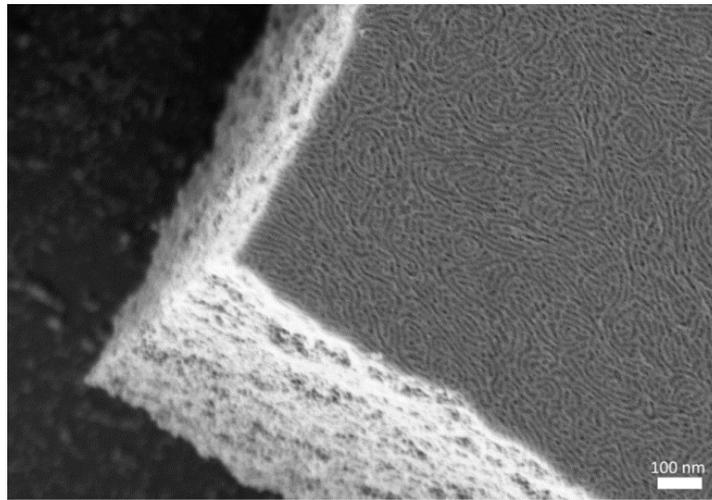


Figura 4.7: Imagen tomada por microscopía electrónica de barrido de una estructura multicapa de TiO₂ poroso (Ortiz de Zárate et al., 2022)

Como el índice de refracción de un material se puede expresar en función de la permitividad y la permeabilidad relativas (Beléndez, 2000):

$$n = \sqrt{\epsilon_r \mu_r} \quad (4.19)$$

Para la mayoría de las sustancias que transmiten ondas electromagnéticas, $\mu_r = 1$ (Beléndez, 2000). Por lo que el índice de refracción y la permitividad relativa se pueden describir por medio de la relación de Maxwell:

$$n = \sqrt{\epsilon_r} \quad (4.20)$$

Por tanto, a partir de la expresión anterior podemos conocer el índice de refracción, ya que la permitividad viene descrita por la propuesta de Bruggeman (Humlicek, 2013):

$$f \frac{\epsilon_b - \epsilon_{eff}}{\epsilon_b + 2 \epsilon_{eff}} + (1 - f) \frac{\epsilon_a - \epsilon_{eff}}{\epsilon_a + 2 \epsilon_{eff}} = 0 \quad (4.21)$$

Que se resuelve por medio de la siguiente ecuación cuadrática (Humlicek, 2013):

$$2 \epsilon_{eff}^2 + \epsilon_{eff} [(3f - 2) \epsilon_a + (1 - 3f) \epsilon_b] - \epsilon_a \epsilon_b = 0 \quad (4.22)$$

Siendo f la fracción volumétrica, ϵ_{eff} la permitividad efectiva y ϵ_a y ϵ_b las permitividades del material de la matriz sólida y del material que ocupa el interior de los poros.

Por lo tanto, a través de la función *effectiveN_fuction_vector*, es posible conocer el valor del índice de refracción efectivo, introduciendo la fracción volumétrica de poros (f) y la permitividad de ambos materiales (ϵ_a y ϵ_b) hallando las raíces de la ecuación cuadrática y despejando n_{eff} (el índice de refracción efectivo).

4.3 Seguimiento de máximos y mínimos

Una vez conocido el índice de refracción efectivo de la capa de interés (que en este caso será la capa intermedia compuesta por TiO_2), por medio de la función *generatePlotsOverlay* (Anejo A), es posible obtener un *overlay* de los perfiles de reflectancia de distintos sistemas.

Esto es interesante ya que el objetivo principal del modelo es estudiar cómo se ‘desplaza’ el espectro de reflectancia al producirse cambios en el índice de refracción y determinar la sensibilidad. Por lo tanto, gracias a esta función, se puede conseguir la evolución del sistema al fluir distintas sustancias a través de la estructura óptica. Además, también permite obtener distintos *outcomes* para distintas condiciones, por ejemplo, para distintas porosidades y espesores de capa.

A la función *generatePlotsOverlay* se le introducen dos vectores de índices de refracción ($n_vector1$ y $n_vector2$), ambos representan el valor del índice de refracción de la capa de interés antes y después de fluir una sustancia en concreto, también se alimenta a la función con un vector de espesores de capa con tal de conocer el perfil electromagnético según las características geométricas de distintas muestras, el rango de longitudes de onda del estudio y el ángulo de incidencia de la luz.

Por ejemplo, para los siguientes casos, se considera un barrido de longitud de onda desde los 200 nm hasta los 1000 nm y una capa de TiO_2 con una porosidad del 50%:

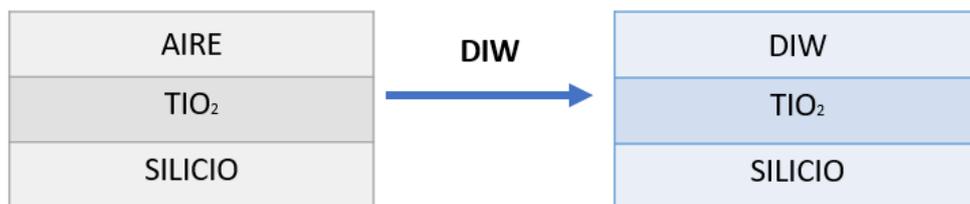


Figura 4.8: Esquematización del caso. A la izquierda el sistema AIRE antes de fluir agua ultrapura (DIW), a la derecha el sistema AGUA, tras fluir a través de la estructura porosa de TIO₂

4.3.1 Resultados Ejemplo 3

	<i>Sistema AIRE</i>		<i>Sistema AGUA</i>	
n_1	1		1.333	
n_2	1.727		1.915	
n_3	3.931		3.931	
Espesores de capa (nm)	400	500	600	700
Ángulo de incidencia (°)	0			

Tabla 4.3: Tabla de parámetros del Ejemplo 3, donde n_1 , n_2 y n_3 son los índices de refracción efectivos de cada capa

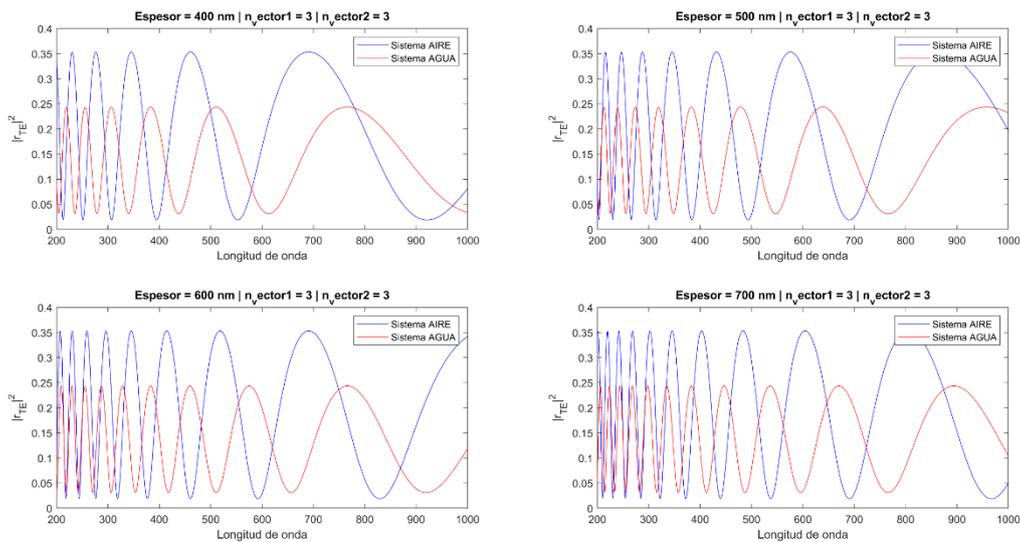


Figura 4.9: Resultado de los perfiles de reflectancia y su desplazamiento de la muestra (longitud de onda en nm) antes (Sistema AIRE) y después (Sistema AGUA) de fluir DIW para cada uno de los espesores de capa

Como se puede observar en la figura anterior, el modelo devuelve la superposición de la reflectancia de ambos sistemas, permitiendo el seguimiento de los mínimos y los máximos del espectro, que serán valores de monitoreo clave a la hora de determinar la sensibilidad de un sistema con unos parámetros concretos.

4.3.2 Resultados Ejemplo 4

	Sistema AIRE		Sistema AGUA	
n_1	1		1.333	
n_2	1.727		1.915	
n_3	3.931		3.931	
Espesores de capa (nm)	400	500	600	700
Ángulo de incidencia (°)	33			

Tabla 4.4: Tabla de parámetros del Ejemplo 4, donde n_1 , n_2 y n_3 son los índices de refracción efectivos de cada capa

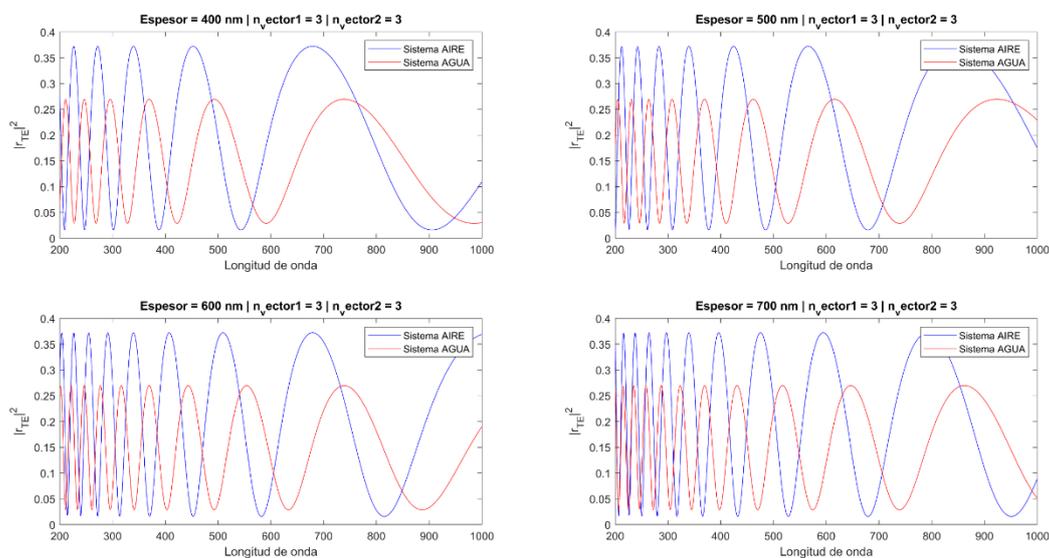


Figura 4.10: Resultado de los perfiles de reflectancia y su desplazamiento de la muestra (longitud de onda en nm) antes (Sistema AIRE) y después (Sistema AGUA) de flujar DIW para cada uno de los espesores de capa

4.4 Sensibilidad

La función *Sensitivity* (Anejo A) evalúa la sensibilidad de una capa mediante la manipulación de distintos medios de muestra. En el siguiente ejemplo se considera la introducción secuencial de agua, agua con etanol (EtOH) al 5%, nuevamente agua y, por último, agua con etanol (EtOH) al 10%.

El objetivo fundamental de esta función es estimar y visualizar la sensibilidad inherente de la capa en estudio según su espesor. Para lograrlo, la función calcula las respuestas reflectivas con

un ángulo de incidencia de 33° para dos casos distintos: etanol al 5% en y etanol al 10% (Sistemas DIW + delta) en comparación cada uno con agua (Sistema DIW).

Se puede visualizar con mayor facilidad el estudio de la sensibilidad en el siguiente diagrama:

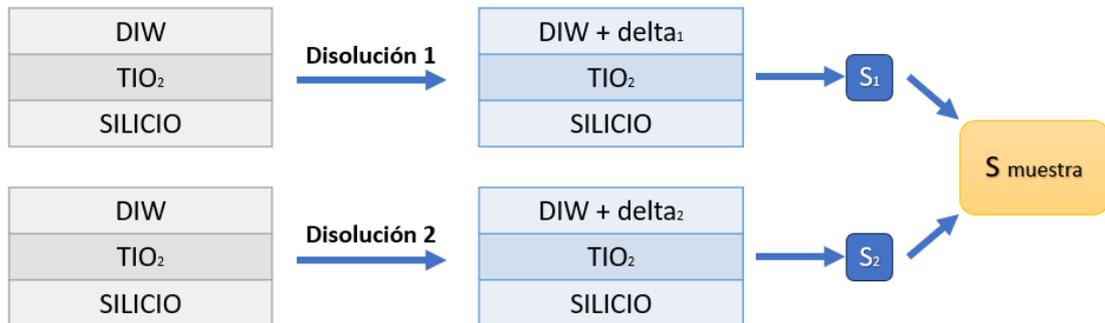


Figura 4.11: Diagrama del proceso de obtención de sensibilidad para cada espesor

Como se puede apreciar en la Figura 5.11, el perfil obtenido al fluir agua se desplaza muy ligeramente (en la gráfica es prácticamente imperceptible) al fluir agua con etanol al 5%. Por tanto, se puede hacer un seguimiento de los máximos o los mínimos de la reflectancia para los dos estados, agua y agua más etanol al 5 %.

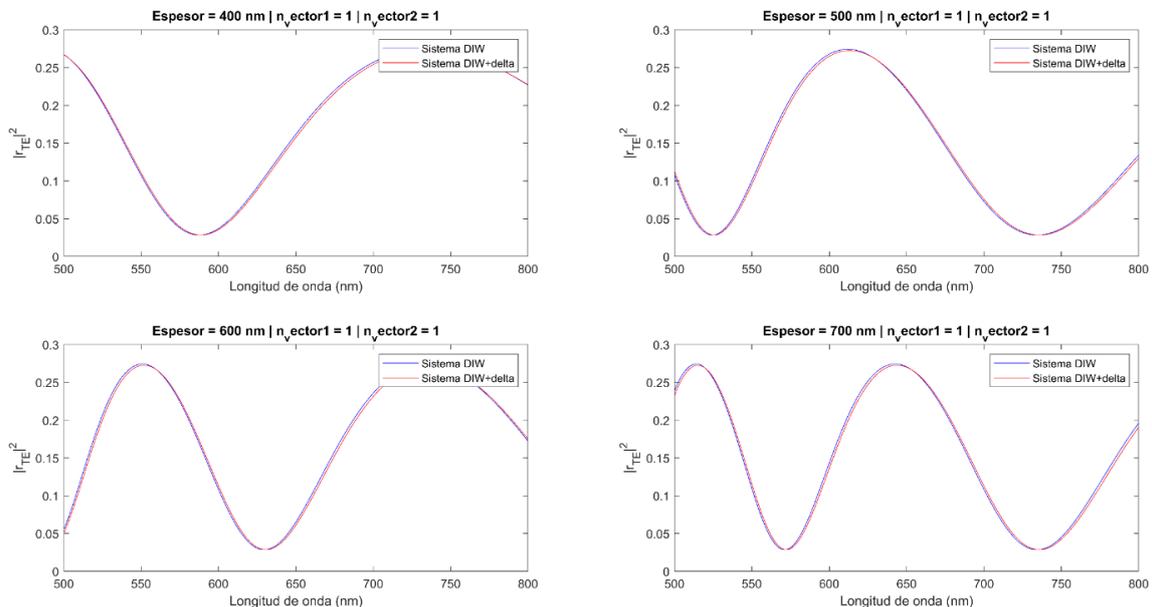


Figura 4.12: Perfiles de reflectancia del Sistema DIW + delta (agua con etanol al 10%) frente al Sistema DIW (agua ultrapura)

Lo mismo sucede, aunque en mayor medida, al fluir agua con etanol al 10 %. En la figura siguiente se superponen el espectro de reflectancia al fluir agua (Sistema DIW) y al fluir la disolución con etanol (Sistema DIW + delta) Figura 4.12: Perfiles de reflectancia del Sistema DIW + delta (agua con etanol al 5%) frente al Sistema DIW (agua ultrapura)

La función halla los máximos (aunque también se pueden considerar los mínimos) por medio de la herramienta *findpeaks*, que, barriando los valores de cada uno de los perfiles de reflectancia, genera un vector con los valores de los picos y su localización.

Al tratarse de desplazamientos tan suaves, realmente no se pierde la correspondencia entre máximos, es decir, la variación de longitud de onda que se produce al fluir el Sistema DIW y el Sistema DIW + delta es minúscula. Por tanto, todos aquellos máximos que se encuentran en el perfil del Sistema DIW, aparecen en el del Sistema DIW + delta levemente trasladados.

La selección del máximo se define en términos del valor más elevado, lo que proporciona una indicación clara de la sensibilidad más prominente. La inclinación por esta aproximación se fundamenta en el objetivo de obtener la representación más robusta del espectro de sensibilidad para cada uno de los espesores considerados.

Una vez localizada la longitud de onda de los máximos de los dos perfiles, la función calcula la diferencia absoluta entre ambos, así como la variación del índice de refracción producida de pasar del Sistema DIW al Sistema DIW + delta en los dos casos (de agua a etanol 5 % y de agua a etanol 10 %) y se representan los valores obtenidos para cada una de las densidades en un *scatter plot*.

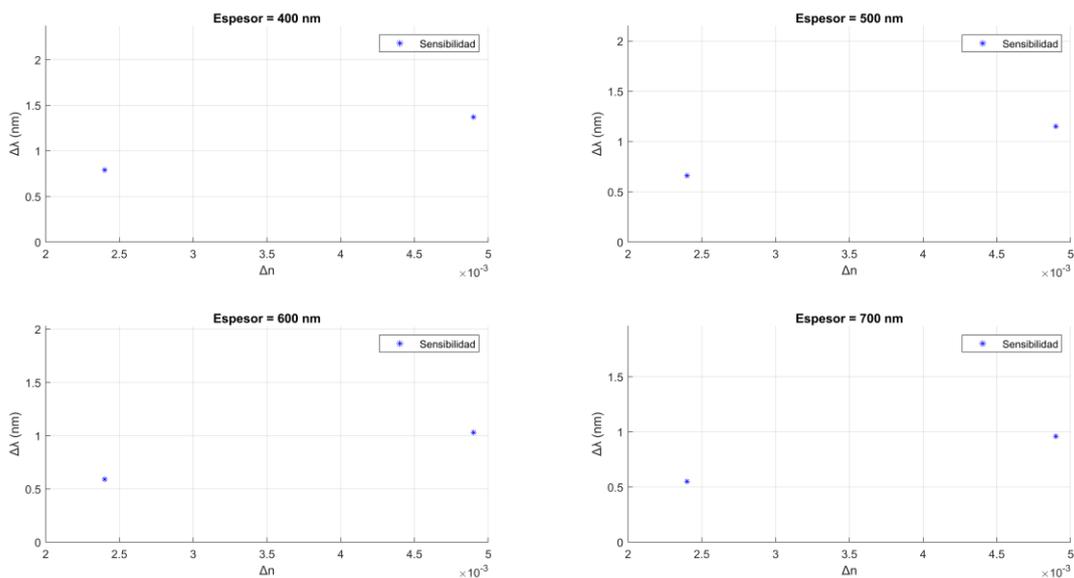


Figura 4.13: Representación de la variación de longitud de onda frente a la variación del índice de refracción para cada uno de los espesores.

En la figura anterior aparecen representados los valores de sensibilidad para cada caso (agua a etanol al 5 % y agua a etanol al 10 %) en cada uno de los espesores.

Ahora, para lograr la sensibilidad correspondiente a cada espesor, se calcula la variación de la longitud de onda del etanol 5 % a etanol 10 % entre la variación del índice de refracción correspondiente entre ambos estados y los valores de sensibilidad se representan en un *scatter plot* frente a los valores de espesor de capa.

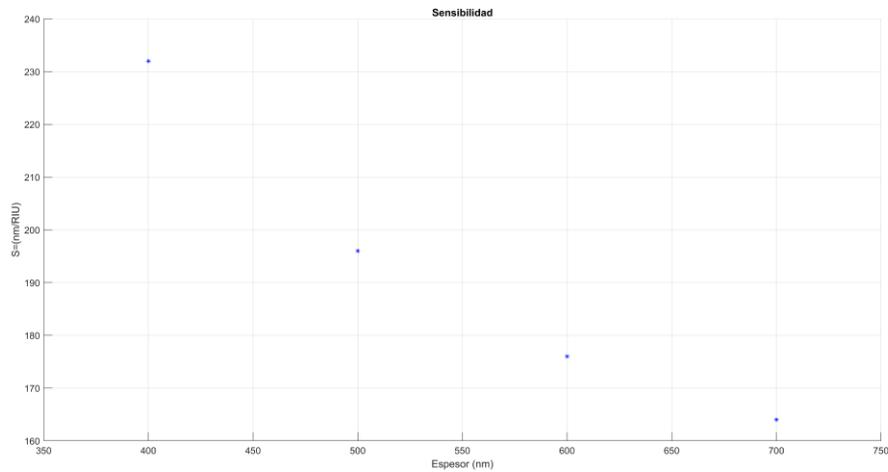


Figura 4.14: Representación gráfica de los valores de sensibilidad para cada uno de los espesores de capa.

Los resultados alumbrados por medio de la función *Sensitivity* parecen indicar que, para capas de espesor igual a 700 nm, la sensibilidad es la menos alta.

$$S = \Delta\lambda/\Delta n \quad (4.1)$$

Los espesores que presentan mejores resultados son 400 nm y 500 nm, parece lógico que sean los que mayor sensibilidad ofrecen, pues son los que mayor desplazamiento de longitud de onda experimentan ante cambios en el índice de refracción.

Capítulo 5

Resultados del modelo

Con tal de validar el modelo desarrollado, se alimenta con los parámetros de la tabla anterior Tabla 5.1 con el objetivo de conocer los valores de sensibilidad según el espesor y la porosidad de la muestra.

Se ha considerado un barrido de longitud de onda desde los 500 nm hasta los 800 nm y el vector de porosidades:

$$f = [0.3 \ 0.4 \ 0.5 \ 0.6 \ 0.7]$$

Que se le suministra a la función *effectiveN_function_vector* con tal de conocer los índices de refracción que, en un principio, presentarían las muestras con esa porosidad.

5.1 Resultados para el 30% de porosidad

		A		B	
n₁		1.333	1.3354	1.333	1.3379
n₂(f)	f	n₂	n₂	n₂	n₂
	0.3	2.1779	2.1786	2.1779	2.1794
	0.4	2.0467	2.0478	2.0467	2.0488
	0.5	1.9156	1.9169	1.9156	1.9183
	0.6	1.7863	1.7879	1.7863	1.7896
	0.7	1.6612	1.6631	1.6612	1.6651
n₃		3.931		3.931	
Espesores de capa (nm)		400	500	600	700
Ángulo de incidencia (°)		33			

Tabla 5.1: Tabla de parámetros introducidos

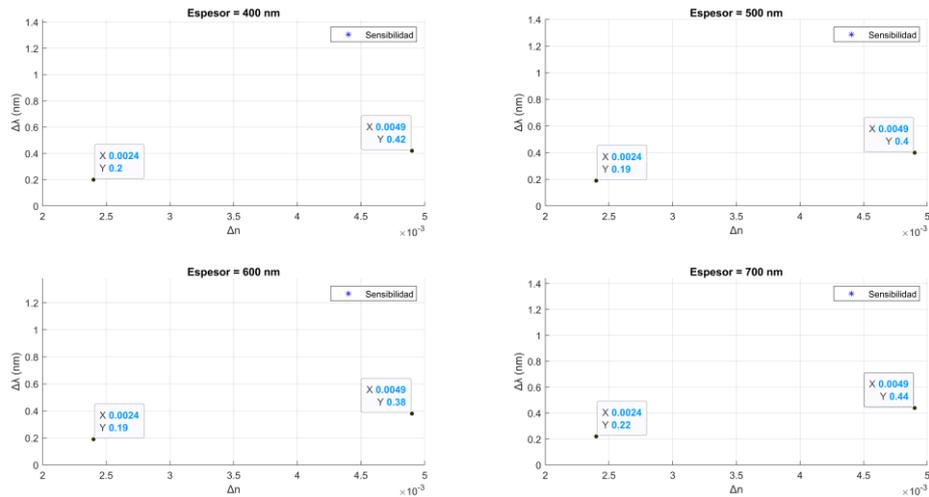


Figura 5.1: Variación de longitud de onda frente a variación del índice de refracción para cada espesor con un 30 % de porosidad

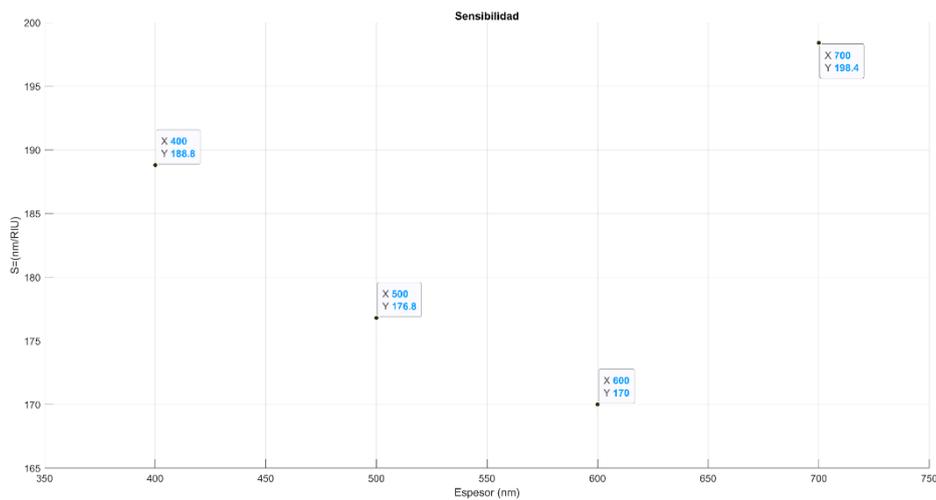


Figura 5.2: Valor de la sensibilidad para cada espesor de capa con un 30 % de porosidad

Para una porosidad del 30%, la muestra presenta la sensibilidad más elevada para un espesor de capa de 700 nm con 198.4 nm/RIU. El grosor que peores resultados presenta es el de 600 nm, esto es porque de las cuatro geometrías, es el que presenta una menor variación de longitud de onda ante cambios en el índice de refracción.

5.2 Resultados para el 40% de porosidad

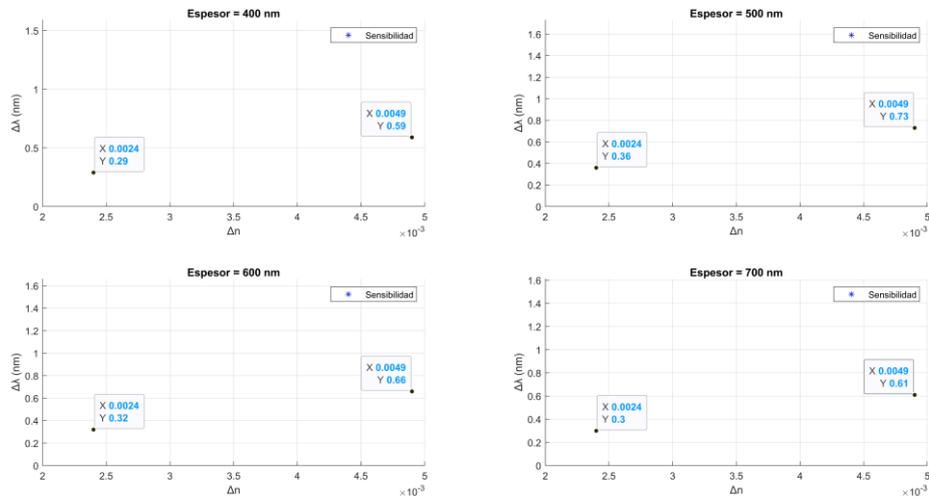


Figura 5.3: Variación de longitud de onda frente a variación del índice de refracción para cada espesor con un 40 % de porosidad

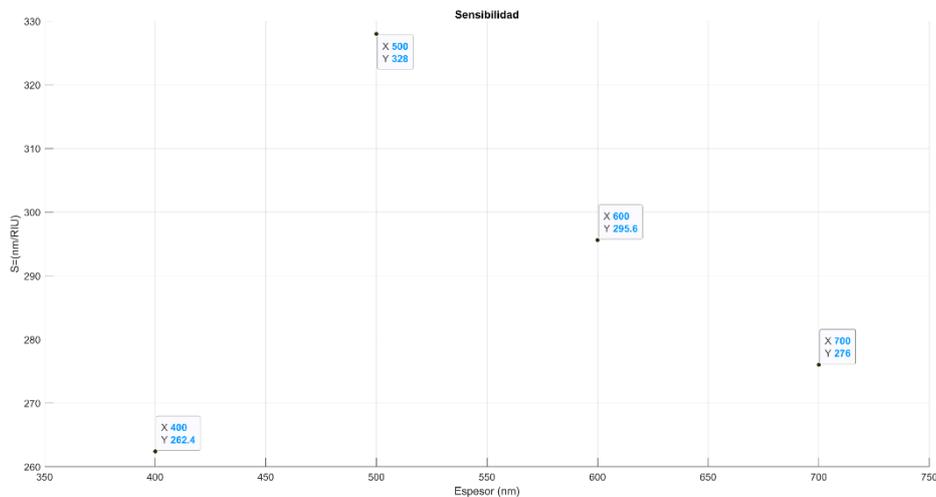


Figura 5.4: Valor de la sensibilidad para cada espesor de capa con un 40 % de porosidad

En este caso, el espesor que arroja conclusiones más favorables es el de 500 nm con una sensibilidad de 328 nm/RIU. De los cuatro posibles espesores, el que refleja el menor nivel de sensibilidad es el de 400 nm, con un valor de sensibilidad de 262.4 nm/RIU. De nuevo, en la Figura 18 se puede constatar que la diferencia entre los valores obtenidos para 400 nm es inferior a la del resto de espesores.

5.3 Resultados para el 50% de porosidad

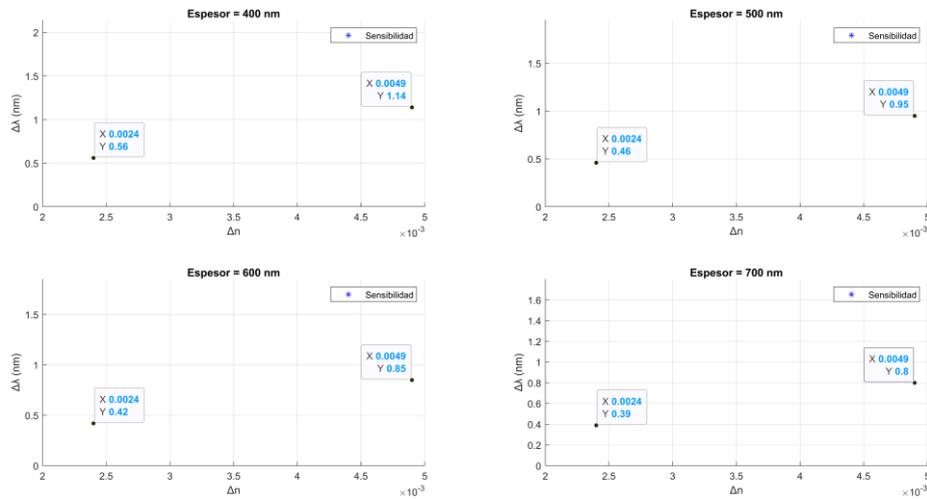


Figura 5.5: Variación de longitud de onda frente a variación del índice de refracción para cada espesor con un 50 % de porosidad

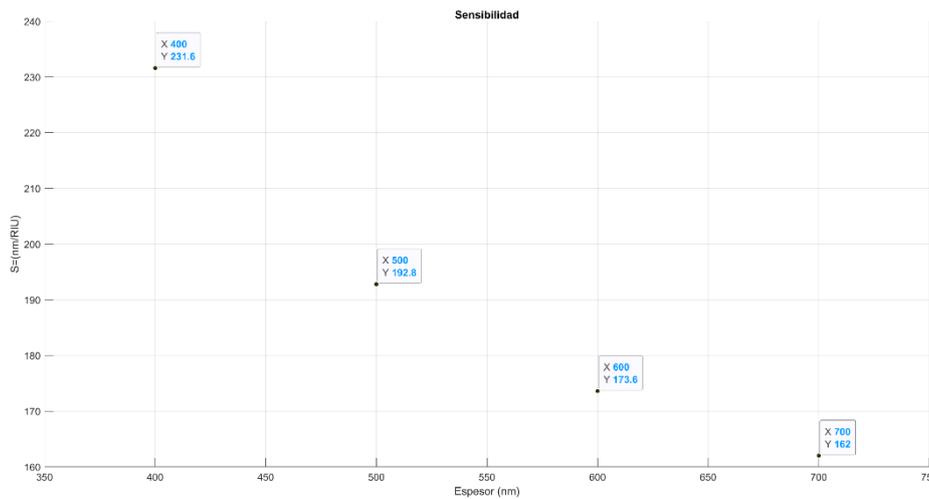


Figura 5.6: Valor de la sensibilidad para cada espesor de capa con un 50 % de porosidad

El desempeño más acertado se corresponde con un espesor de capa de 400 nm, para el que se obtiene una sensibilidad de 231.6 nm/RIU, seguido por los 500 nm y los 600 nm con 192.8 nm/RIU y 173.7 nm/RIU respectivamente. Los resultados más desfavorables son los obtenidos para un espesor de capa de 700 nm, efectivamente la variación de la longitud de onda para un espesor de 700 nm es de 0.405 nm, inferior al desplazamiento observado en los otros tres casos.

La Figura 21, en la que aparecen representadas, las distintas sensibilidades para los distintos espesores de capa, parece describir una función de tendencia exponencial negativa a media que se aumenta el grosor de la muestra.

5.4 Resultados para el 60% de porosidad

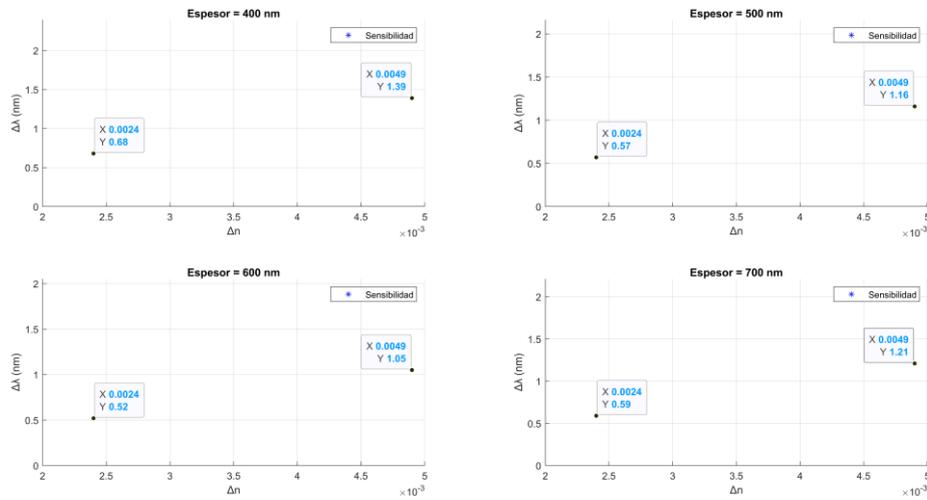


Figura 5.7: Variación de longitud de onda frente a variación del índice de refracción para cada espesor con un 60 % de porosidad

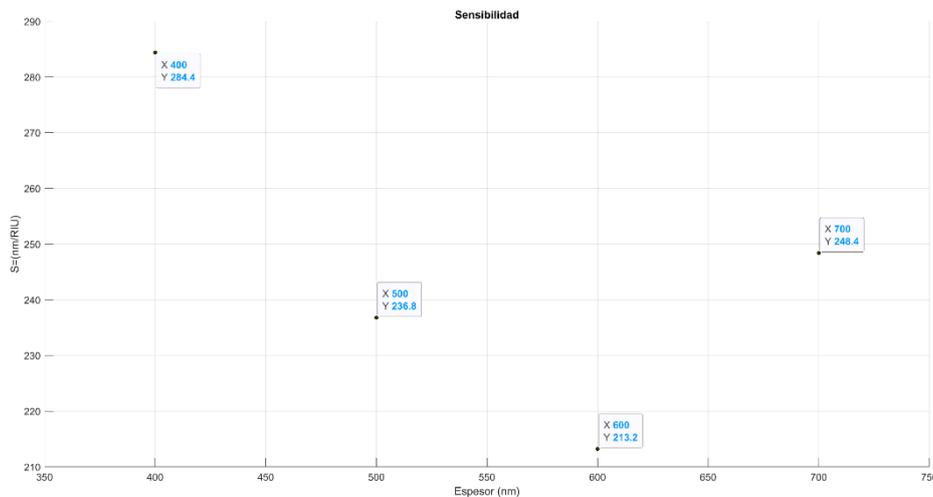


Figura 5.8: Valor de la sensibilidad para cada espesor de capa con un 60 % de porosidad

El rendimiento más preciso se observa cuando el espesor de la capa es de 400 nm, lo que proporciona una sensibilidad de 284.4 nm/RIU. Le siguen en orden los espesores de 700 nm y 500 nm, con sensibilidades de 248.4 nm/RIU y 236.8 nm/RIU, respectivamente. Por otro lado, los resultados menos favorables se obtienen cuando el espesor de la capa es de 600 nm. De hecho, en este caso, la variación en la longitud de onda es de tan solo 1.078 nm, siendo inferior al desplazamiento observado en los otros tres escenarios, lo que conlleva una sensibilidad de 213.2 nm/RIU.

5.5 Resultados para el 70% de porosidad

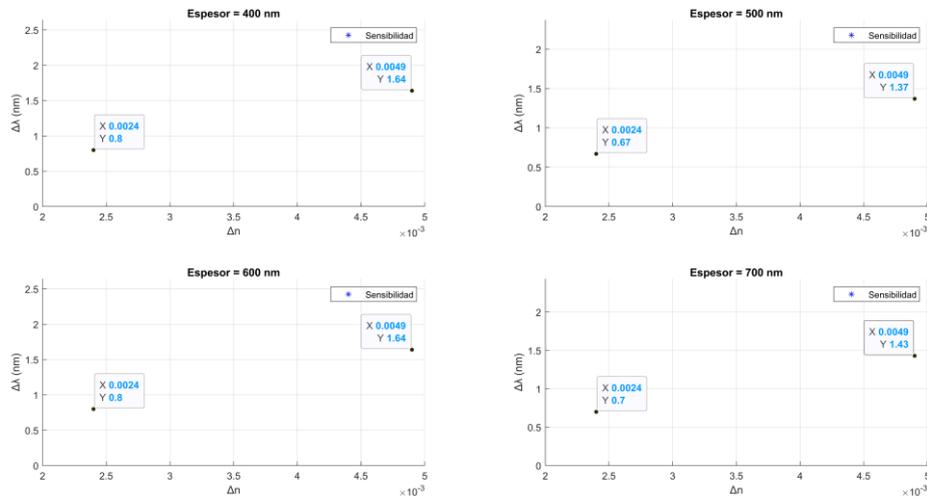


Figura 5.9: Variación de longitud de onda frente a variación del índice de refracción para cada espesor con un 70 % de porosidad

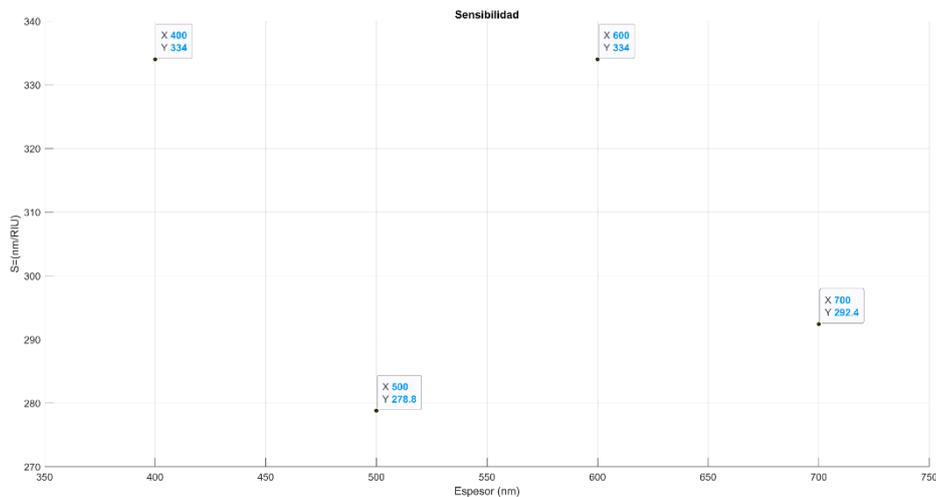


Figura 5.10: Valor de la sensibilidad para cada espesor de capa para un 70 % de porosidad

Para un 70 % de porosidad, la mayor precisión en los resultados se manifiesta al emplear espesores de capa de 400 nm y 600 nm, lo que conduce a una sensibilidad de 334 nm/RIU, el hecho de que presenten el mismo valor se debe a que la variación en la longitud de onda es la misma para el máximo considerado para 400 nm que para 600nm.

Le siguen en orden los espesores de 700 nm y 500 nm, los cuales generan sensibilidades de 292.4 nm/RIU y 278.8 nm/RIU, respectivamente. Por contraste, los resultados menos favorables emergen al emplear un espesor de capa de 500 nm. En este contexto específico, la variación en la longitud de onda se reduce a 0.697 nm, mostrándose inferior al desplazamiento observado en los otros tres casos.

5.6 Interpretaciones finales

Por último, gracias a los datos de proporcionados por el modelo, es posible representar los valores obtenidos en un *scatter plot*, con tal de identificar bajo qué condiciones se logra una mayor sensibilidad.

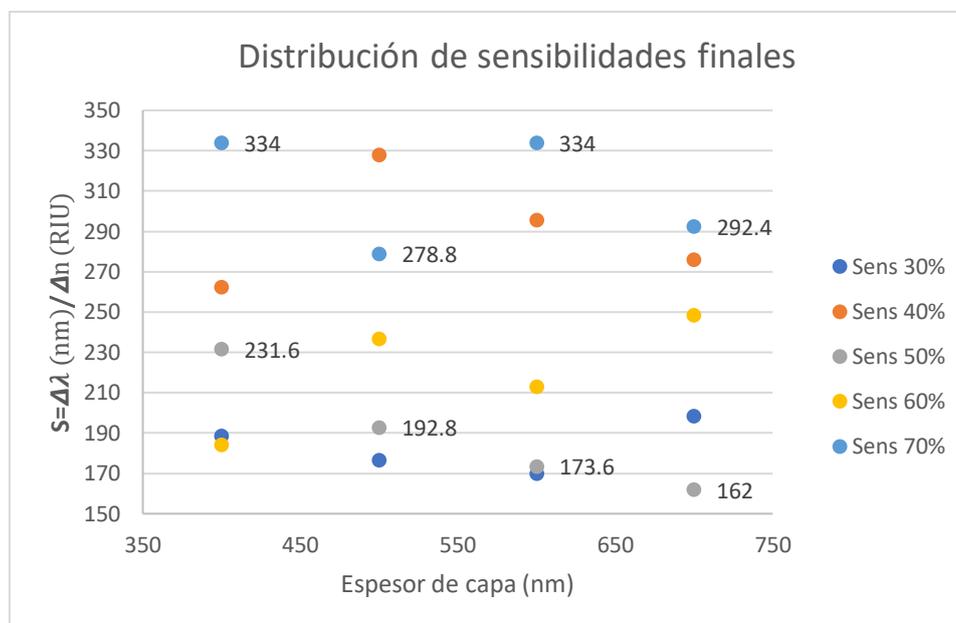


Figura 5.11: Sensibilidades según el porcentaje de porosidad y es espesor de la capa

Para el conjunto de porosidades, las que parecen presentar un mejor desempeño son las porosidades del 70 % y del 40 %, mientras que las porosidades del 30 % y del 50% son las responsables de los valores más bajos de sensibilidad.

En un principio, los resultados podrían indicar que las combinaciones que mayor sensibilidad presentan (334 nm/RIU) son porosidad del 70 % con un espesor de capa de 400 nm, o bien, con un espesor de 500 nm. Por su parte, el conjunto de variables que alumbró el menor valor de sensibilidad (162 nm/RIU) sería una porosidad del 50 % combinada con un grosor de capa de 700 nm.

Sin embargo, cabe tener en cuenta que al aumentar la porosidad debería, a su vez, aumentar la sensibilidad, pues hay un mayor porcentaje de volumen que cambiará de índice de refracción, por lo que el cambio en el índice efectivo será mayor. Al aumentar la porosidad, el espectro se desplaza hacia longitudes de onda inferiores, sin embargo, hay más sensibilidad pues al contar con poros, se da más volumen 'vacío' de la matriz porosa, zonas en las que se produciría el reconocimiento molecular.

La posición de los máximos y de los mínimos en el espectro de reflectancia varía en función del espesor de la capa, es decir si se hace el seguimiento de un único lóbulo, para espesores determinados, su máximo/mínimo se encontrará en valores de longitud de onda inferiores y para otros espesores se encontrará en valores superiores y esto afectará al valor de la sensibilidad. Sin embargo, esto no significa que la capa realmente sea más sensible, sino que se debe al desplazamiento del lóbulo a valores de longitud de onda más elevados. Como se ha

señalado con anterioridad, la sensibilidad de la estructura será mayor si se trabaja a longitudes de onda superiores, sin embargo, esto no implica necesariamente que la estructura sea más sensible.

Según lo anteriormente mencionado, el enfoque más oportuno sería una representación 3D de los lóbulos para comprobar que se está siguiendo al mismo lóbulo o, de alguna manera, que la función fuese capaz de devolver la sensibilidad etiquetada con la longitud de onda del lóbulo en cuestión, de tal forma, que al comparar porosidades no se cometen errores por desplazamientos del lóbulo en la longitud de onda.

IV

Evaluación experimental

Capítulo 6

Método de sensado

Para los experimentos de este trabajo se ha llevado a cabo un sensado dinámico, que consiste en el flujo de las distintas preparaciones de biofuncionalización, así como las disoluciones de interés para la biodetección, este tipo de sensado recibe el nombre de *flowing experiment*.

Como se puede apreciar en la Figura 11.1, el tubo de entrada de la celda microfluídica se introduce en las distintas disoluciones y, gracias al efecto de succión de la bomba, circulan a través de la muestra hasta acabar en la jeringuilla. Al mismo tiempo, la señal recogida por el espectrómetro se refleja en el equipo de visualización.

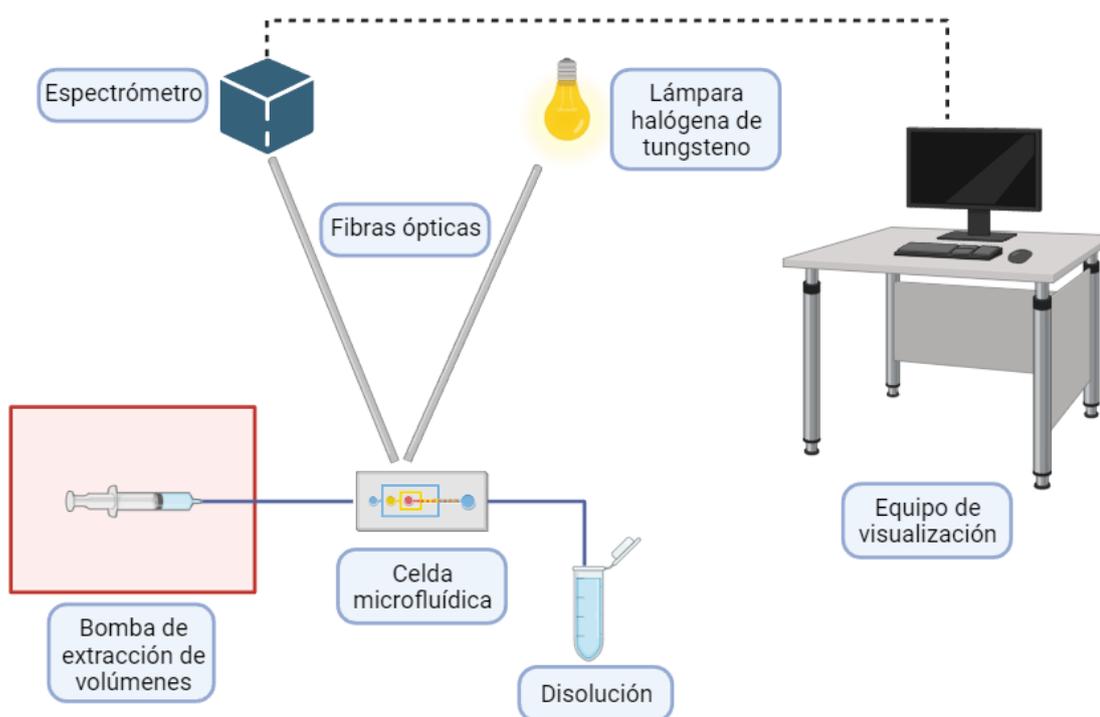


Figura 6.1: Diagrama del método de sensado

6.1 Procedimiento para muestras funcionalizadas por flujo

En este bloque se siguió proceso de flujo que se detalla a continuación:

Etapa de flujo	Disolución	Tiempo (min)
<i>Etapa 1</i>	MES 0.1M	15
<i>Etapa 2</i>	Proteína AG	30
<i>Etapa 3</i>	MES 0.1m	15
<i>Etapa 4</i>	PBS 1X	20
<i>Etapa 5</i>	α -Gliadina	30
<i>Etapa 6</i>	PBS 1X	15
<i>Etapa 7</i>	Caseína + PBS	30
<i>Etapa 8</i>	Gliadina al 6% de EtOH	30
<i>Etapa 9</i>	PBS 1X	15

Tabla 6.1: Proceso seguido durante los experimentos funcionalizados por flujo

Se hicieron tres experimentos de sensado, para cada uno de los cuales se calibró el equipo con un espejo de aluminio. Tras concluir el ciclo de sensado en las tres muestras sometidas a la funcionalización mediante el proceso de flujo, se procedió al análisis de los datos resultantes de las tres mediciones realizadas. El objetivo principal fue discernir patrones emergentes y alteraciones significativas en las propiedades evaluadas

6.2 Procedimiento para muestras funcionalizadas por incubación

Para las muestras funcionalizadas por incubación se hizo un total de nueve sensados, calibrando el equipo de la misma forma que se indica en el apartado anterior y siguiendo el siguiente dinámica:

Etapa de flujo	Disolución	Tiempo (min)
<i>Etapa 1</i>	Caseína + PBS 1X	30
<i>Etapa 2</i>	Gliadina al 6% de EtOH	30
<i>Etapa 3</i>	PBS 1X	30

Tabla 6.2: Proceso de flujo seguido durante los experimentos funcionalizados por incubación

Posterior a los procesos de sensado, se procedió a analizar los resultados obtenidos de las nueve instancias de sensado en las muestras funcionalizadas por incubación. Los datos recopilados fueron evaluados con el propósito de identificar tendencias, relaciones y cambios significativos en las propiedades medidas.

Capítulo 7

Materiales

En esta sección, se detallará el enfoque metodológico empleado para llevar a cabo el presente estudio. A lo largo del capítulo, se describirán en detalle los componentes cruciales que conformaron la base de la evaluación experimental, especificando los materiales y los procedimientos empleados.

7.1 Capas porosas de TiO₂

Las muestras empleadas con las que se han llevado cabo los distintos sensores han sido proporcionadas por el Centro de Tecnología Nanofotónica de la Universitat Politècnica de València y cuyo proceso de síntesis es el siguiente:

Las muestras han sido fabricadas por medio de la síntesis de una solución homogénea de TiO₂. Previo a la aplicación de cualquier capa de TiO₂ mesoporoso, se procedió a una limpieza de los sustratos de silicio. Este proceso incluyó tres enjuagues consecutivos utilizando acetona, isopropanol y agua desionizada, seguidos por un paso de secado mediante un flujo de gas nitrógeno. Posteriormente, se empleó una máquina de deposición por giro EVG101 ubicada en un ambiente de sala limpia clase 100 para depositar uniformemente el sol envejecido sobre los sustratos. La velocidad de giro se fijó en 3000 rpm durante 15 segundos (a una temperatura de 20 °C y una humedad relativa del 45%) (Ortiz de Zárate et al., 2022b).

Acto seguido, se aplicó un proceso de envejecimiento durante la noche a temperatura ambiente bajo una humedad relativa del 60% a las capas obtenidas, paso crucial para lograr la mesoestructuración de las capas de manera eficiente. Las capas de TiO₂ mesoporoso se fabricaron posteriormente mediante un tratamiento térmico, cuyo propósito fue mejorar la resistencia mecánica y térmica de las capas y eliminar el surfactante orgánico. Este proceso condujo a la formación de capas mesoporosas de alta uniformidad (Ortiz de Zárate et al., 2022b).

La etapa de calcinación se llevó a cabo en un horno en presencia de aire, consistió en un aumento gradual de la temperatura hasta llegar a 300 °C a una velocidad de 1 °C por minuto. Esta etapa permitió un mayor entrelazado de la titania y aseguró una completa degradación térmica de la plantilla utilizada para estructurar los poros. Este proceso culminó en la obtención exitosa de capas de TiO₂ mesoporoso, caracterizadas por su estructura uniforme, mayor resistencia mecánica y térmica (Ortiz de Zárate et al., 2022b).

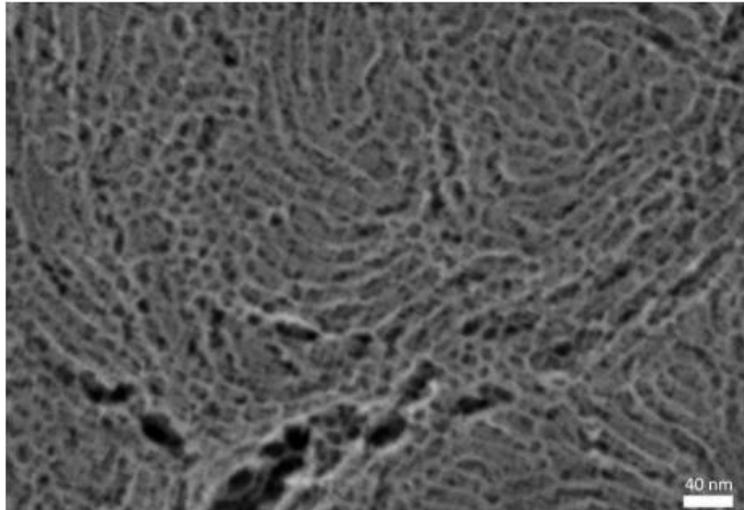


Figura 7.1: Imágenes HRFSEM de capas de TiO₂ mesoporoso fabricadas con plantilla P123, vista superior de una monocapa (Ortiz de Zárate et al., 2022b)

7.2 Plataforma óptica de medida

Los perfiles de reflectancia se midieron en la siguiente estructura de sensado:

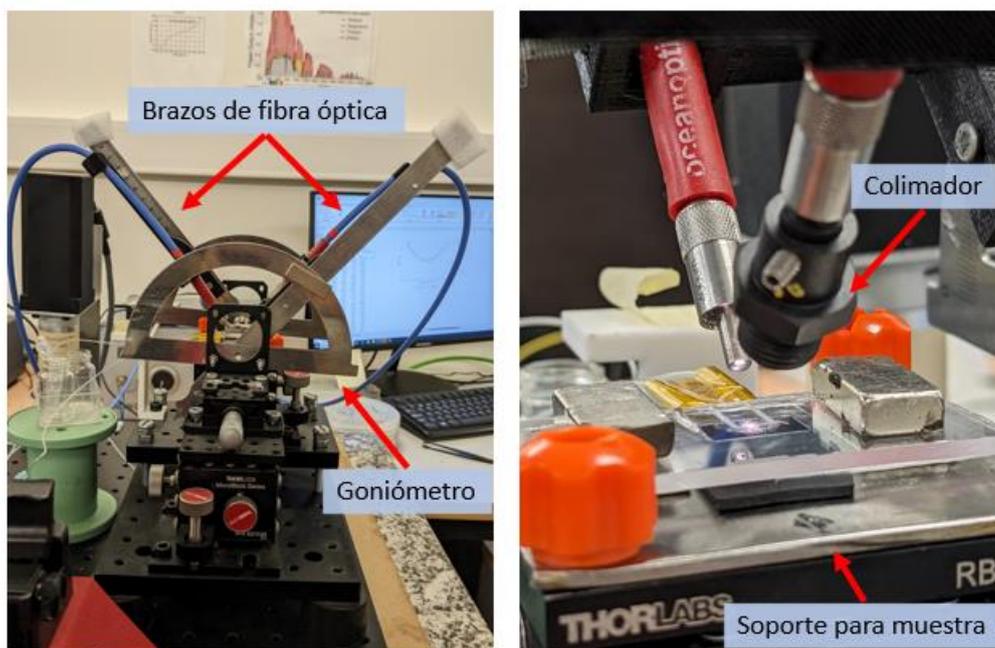


Figura 7.2: Plataforma óptica de sensado. (A) Vista de perfil de la plataforma donde se puede apreciar la estructura que sujeta los brazos de fibra óptica. (B) Primer plano de la luz incidiendo sobre la muestra

La luz es generada por una lámpara de halógena de tungsteno (HL-2000 de *Ocean Optics*), viaja por la fibra óptica e incide sobre la muestra atravesando el colimador. La luz reflejada por la muestra, es decir la información de interés para el estudio, es recogida por la otra fibra óptica y viaja a través de ella hasta llegar al espectrómetro (*Flame T spectrometer* de *Ocean Optics*); este es el encargado de grabar los resultados de la reflectividad y de proporcionar el espectro correspondiente a tiempo real.

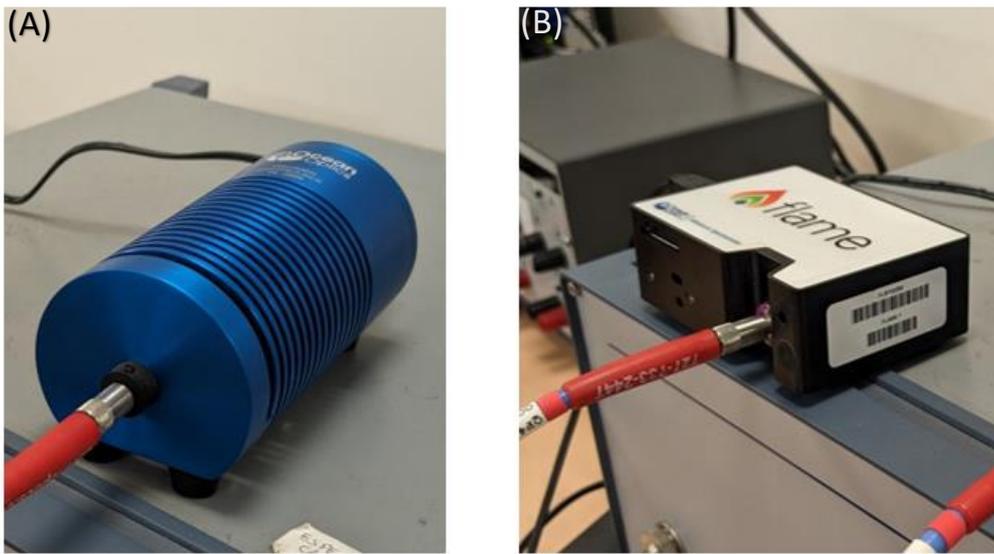


Figura 7.3: (A) Lámpara halógena de tungsteno (HL-2000 de Ocean Optics). (B) Espectrómetro (Flame T spectrometer de Ocean Optics)

7.3 Bomba de extracción de volúmenes

Con tal de fluir las disoluciones del experimento a través de la muestra es necesario generar un efecto de succión, para lo que se empleó una bomba de extracción de volúmenes que genera presión negativa por medio de una jeringuilla que provoca que la sustancia fluya a través de los canales de la celda microfluídica, ocupando la estructura porosa de la muestra.

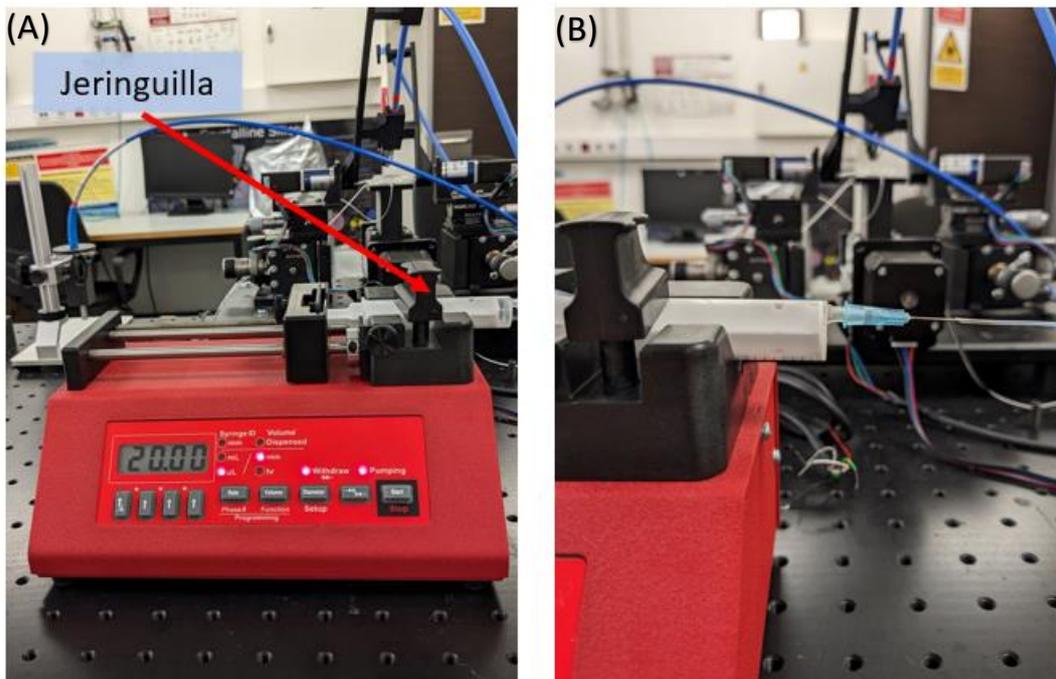


Figura 7.4: (A) Bomba de extracción de volúmenes empleada en los experimentos. (B) Close-up de la jeringuilla de la bomba de extracción

7.4 Celda microfluídica

La celda microfluídica se compone de una cubierta de Polimetilmetacrilato (PMMA), que se adhiere a la muestra deseada mediante adhesivo de doble cara. La parte con mayor reflectividad se posiciona precisamente sobre los dos orificios dispuestos en la celda, los cuales actúan como canales para el flujo de las disoluciones. En inglés, estos canales por los que fluyen las sustancias se conocen como "flowing channels" (ver Figura 7.5).

De estos canales emergen dos tubos: uno para la entrada de las disoluciones que se utilizan en el proceso de sensado, y otro para la salida hacia una jeringa ubicada en la bomba de extracción de volúmenes.

Para garantizar una mayor estabilidad, se emplean imanes para sujetar esta cámara a una placa, la cual puede ser fijada a una base inmóvil. Esto permite focalizar la luz y prevenir interferencias debidas a movimientos involuntarios o posibles inconvenientes que puedan surgir (Figura 9.5).

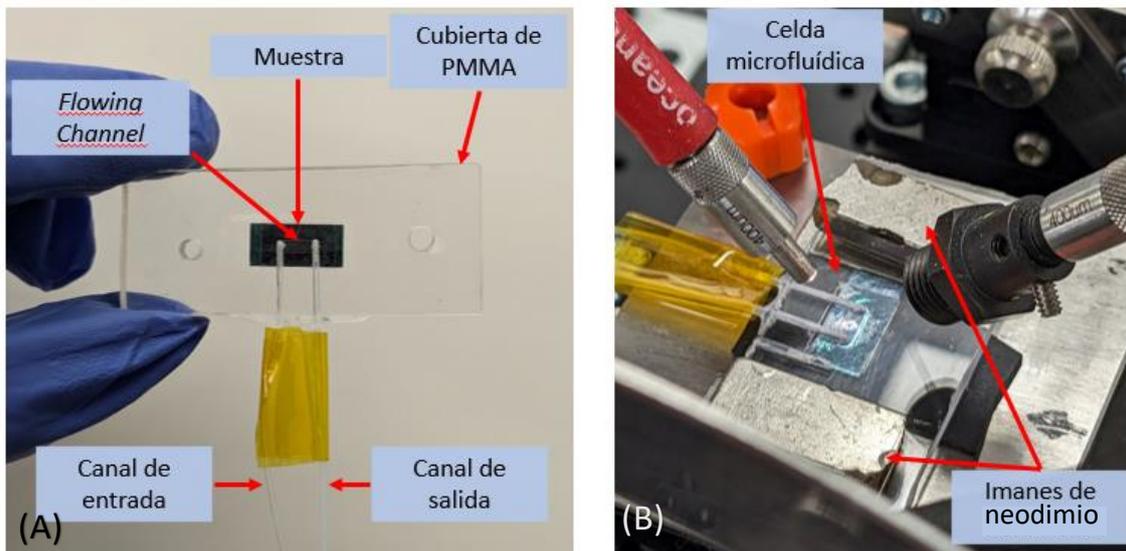


Figura 7.5: (A) Celda microfluídica. (B) Placa de sujeción para la muestra

Preparación de disoluciones

Para la funcionalización de las muestras se buscó el siguiente objetivo:

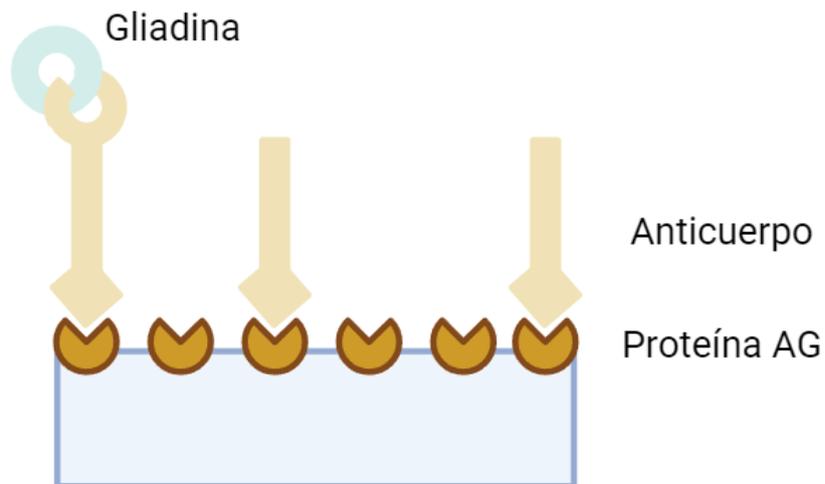


Figura 8.1: Esquematación de la funcionalización de la muestra

La función de la proteína AG es actuar como capa intermedia con tal de que el anticuerpo (α -Gliadina) quede correctamente orientado para propiciar el evento de reconocimiento molecular.

8.1 Funcionalización de las muestras

En cuanto a la funcionalización de la superficie, se llevó a cabo por medio de adsorción física, proceso mediante el cual se modifican las superficies de los materiales o sustratos al unir moléculas o grupos químicos específicos a través de interacciones no covalentes, como fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas (Estupiñán Durán, 2014). En el contexto de la detección biosensorial, la funcionalización por adsorción física se utiliza para unir sondas moleculares o biomoléculas específicas a la superficie del sensor. Estas sondas son capaces de interactuar selectivamente con los analitos (moléculas objetivo) y, por lo tanto, permiten la detección de esas moléculas específicas en una muestra.

Como se ha indicado con anterioridad, el bloque experimental se divide en dos secciones según el método de funcionalización de las muestras: funcionalización mediante flujo y funcionalización por incubación. En este apartado se detallarán las preparaciones que se llevaron a cabo para cada uno de los enfoques.

8.1.1 Disoluciones para funcionalización por flujo

La funcionalización de la superficie por flujo consiste en la circulación de la disolución que se desea depositar en la superficie de la muestra por un período determinada de tiempo, es decir, se trata de un proceso dinámico pues se da una corriente de disolución durante el asentamiento de la especie química. El objetivo principal de la funcionalización por flujo es el seguimiento de cada una de la etapas experimentales, se trata de un proceso lento, laborioso y que solo se puede hacer con una única muestra.

Para los experimentos de funcionalización por flujo se prepararon las siguientes soluciones:

Disolución	Composición		Volumen total	
MES 1M	0.2132 g de MES	1000 μ L de DIW	1 mL	
MES 0.1M	150 μ L de MES 1M	1500 μ L de DIW	1.5 mL	
Proteína AG	26 μ L de proteína AG	1275 μ L de MES 0.1M	1.3 mL	
PBS 1X	100 μ L de PBS 10X	1000 μ L de DIW	1.1 mL	
Caseína + PBS	250 μ L de Caseína	750 μ L de PBS 1X	1 mL	
α -Gliadina (anticuerpo)	28 μ L de α -Gliadina	980 μ L de PBS 1X	1.008 mL	
Gliadina al 70% EtOH	1 mg de gliadina	700 μ L de EtOH	300 μ L de PBS + Caseína	1 mL
Gliadina al 6% EtOH	20 μ L de base de Gliadina EtOH al 70%	48 μ L de EtOH	932 μ L de Caseína + PBS 1X	1 mL

Tabla 8.1: Conjunto de disoluciones preparadas para la funcionalización por flujo, así como su composición



Figura 8.2: Gliadina comercial empleada para los experimentos de este estudio

8.1.2 Disoluciones para funcionalización por incubación

Para llevar a cabo la funcionalización por incubación, se elaboraron preparaciones con las siguientes concentraciones:

Proteína AG		
[AG] ₁	[AG] ₂	[AG] ₃
200 µg/mL	50 µg/mL	12.5 µg/mL

Tabla 8.2: Concentraciones de las disoluciones de proteína AG empleadas para la funcionalización por incubación

α-Gliadina		
[Ab] ₁	[Ab] ₂	[Ab] ₃
200 µg/mL	50 µg/mL	12.5 µg/mL

Tabla 8.3: Concentraciones de las disoluciones de α-Gliadina empleadas para la funcionalización por incubación

La matriz de muestras se funcionalizó según las siguientes combinaciones:

	[AG] ₁	[AG] ₂	[AG] ₃
[Ab] ₁	1-1	1-2	1-3
[Ab] ₂	2-1	2-2	2-3
[Ab] ₃	3-1	3-2	3-3

Figura 8.3: Esquematización de la matriz de combinaciones para la funcionalización por incubación

Se preparó también para las pruebas de sensado Gliadina al 6% de Etanol, pero esta vez a una concentración de 10µg/mL.

Para esta funcionalización el procedimiento consistió en lo siguiente:

Compuesto	Tiempo
Proteína AG	2h
Enjuague con agua y secado con aire comprimido	
α-Gliadina	2h

Tabla 8.4: Método de funcionalización por incubación

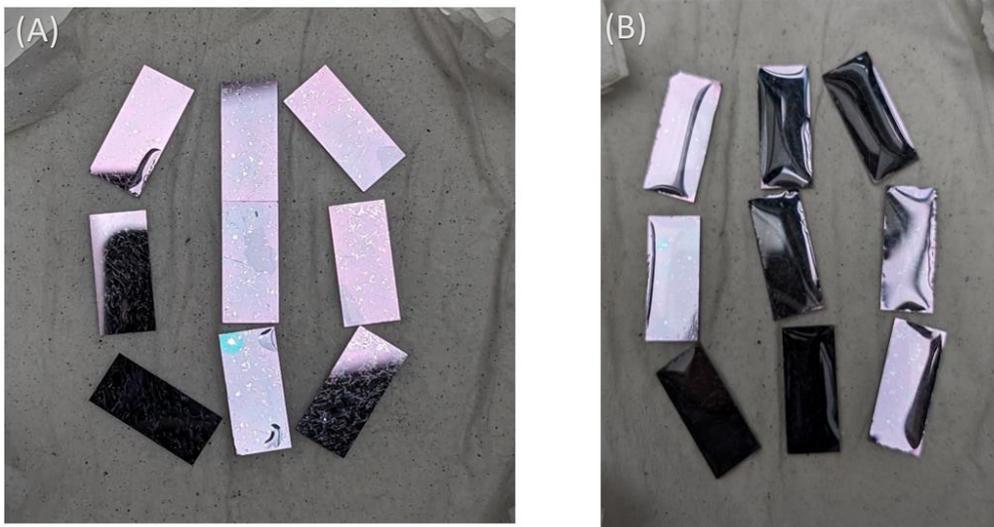


Figura 8.4: Matriz de muestras para funcionalizar. (A) Matriz de muestras sin funcionalizar. (B) Muestras cubiertas por una capa de α -Gliadina sin secar

La funcionalización por incubación permite la exposición de las muestras a distintas condiciones, es más rápida y la medida solo se hace para el *target* que se pretende detectar, en este caso la Gliadina.

Capítulo 9

Resultados y discusión

A continuación, en este apartado se expondrán los resultados obtenidos tras el procesamiento de los datos recogidos tras cada uno de los experimentos, tanto para el bloque de la funcionalización por flujo, como el bloque de la funcionalización por incubación.

Al fluir las distintas disoluciones en cada una de las etapas, deberían de producirse los desplazamientos correspondientes en función al índice de refracción del ciclo que esté fluyendo, como en el ejemplo de la siguiente figura, en ella se puede apreciar que ante el flujo de distintas sustancias, el máximo o mínimo seleccionada se desplaza más o menos, en función del índice de refracción de la sustancia fluida.

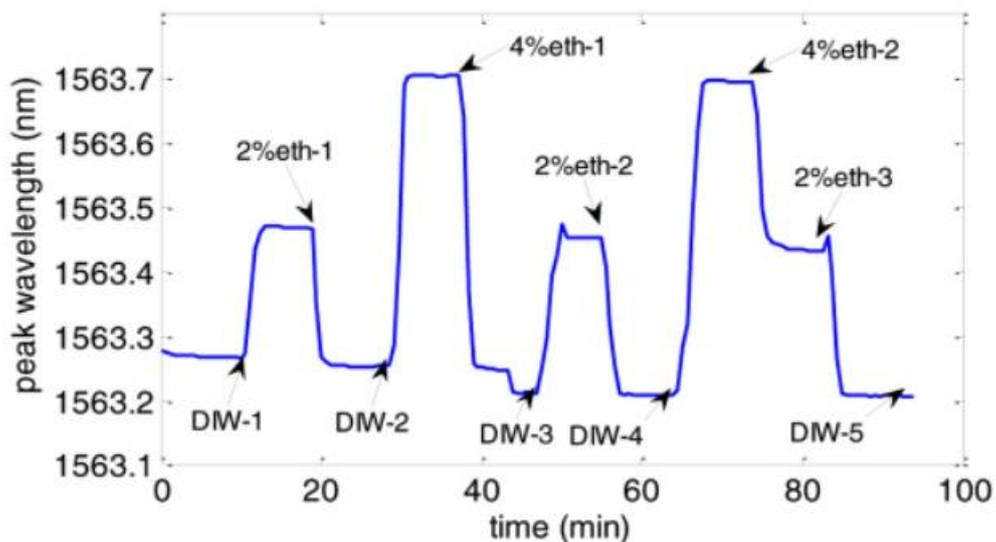


Figura 9.1: Evolución temporal del pico de FP para las diferentes diluciones de etanol en agua destilada (DIW) fluídas (García-Rupérez et al., 2010)

9.1 Muestras funcionalizadas por flujo

9.1.1 Resultados del Experimento 1

Para el primer experimento se obtuvo el siguiente desplazamiento de longitud de onda a medida que se fueron fluyendo las distintas disoluciones, tanto las de la fase de biofuncionalización como las de biodetección.

En la Figura 9.1, se pueden observar las evoluciones nanométricas de la longitud de onda del mínimo de seguimiento. Los máximos desplazamientos parecen ocurrir durante el flujo de la

proteína AG, Caseína + PBS 1X y Gliadina, aunque se da un aumento en el desplazamiento también durante en flujo final de PBS 1X.

En líneas generales, los desplazamientos más destacados del espectro se producen al inducirse los cambios más acusados en el índice de refracción. El desfase de la curva de desplazamiento con respecto a las marcas temporales del flujo como puede ser el del PBS 1X, se puede deber principalmente a que no es un procedimiento binario, el índice de refracción de la muestra cambia de manera progresiva a medida que se fluyen las distintas soluciones. Es por esto por lo que el estado estacionario para cada disolución no se alcanza al instante.

Aquellos desplazamientos más bruscos o acusados que parecen no coincidir con los *slots* temporales del flujo de disoluciones son, probablemente, pequeñas burbujas que se han colado en el sistema microfluídico y que, al ser succionadas por la bomba de extracción de volúmenes, generan un cambio muy rápido de los valores del índice de refracción y esto se ve reflejado en el espectro de reflectancia recogido.

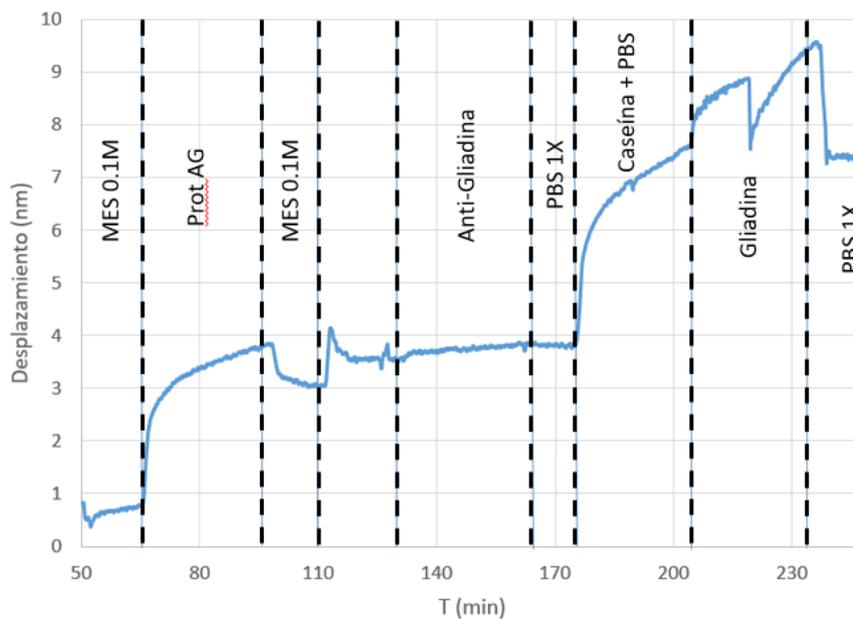


Figura 9.2: Valores relativos de desplazamiento para el Experimento 1

En cuanto a la funcionalización por flujo sí que se da un desplazamiento notable cuando se comienza a fluir la Gliadina, con un desplazamiento neto de alrededor 5.7 nm, indicativo de que se produce el evento de reconocimiento molecular.

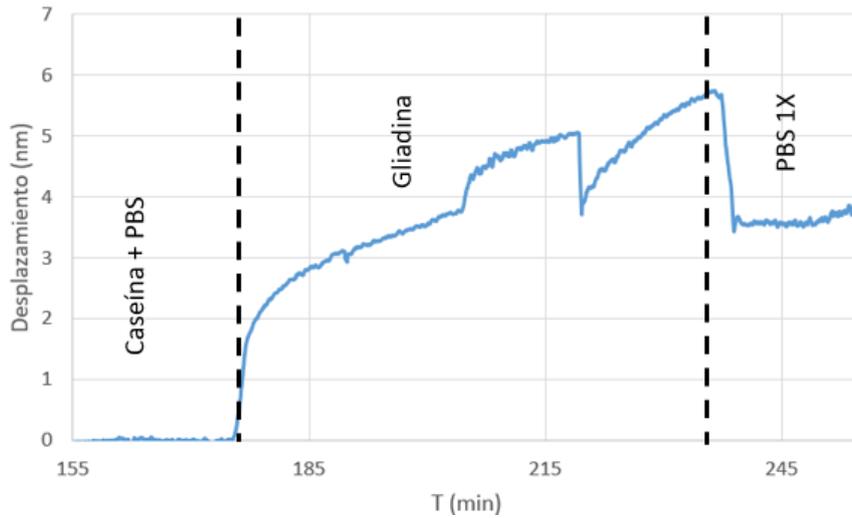


Figura 9.3: Evolución del desplazamiento durante el flujo de Gliadina

9.1.2 Resultados del Experimento 2

Para el experimento número dos, los resultados no se alinearon con las expectativas. A pesar de producirse y detectarse desplazamientos en la longitud de onda, se dan cambios nanométricos bruscos y la señal parece ser inestable, con numerosos picos en varios de los *slots* de flujo.

Los picos que aparecen en la gráfica son desplazamientos de longitud de onda repentinos que, entre otras cosas, se pueden deber a burbujas o aire en el canal de flujo, generado modificaciones en el índice de refracción repentinas.

La anomalía más destacada es el desplazamiento de la longitud de onda durante en *slot* de la Gliadina, puesto que el valor del índice de refracción debería ser más elevado y desplazar el espectro hacia longitudes de onda superiores al producirse el reconocimiento molecular, alrededor del mino 170, la curva parece recuperar su *baseline* y la señal parece más estable, sin tanto ruido y produciéndose el reconocimiento de la Gliadina con un desplazamiento de unos 2.2 nm, sin embargo también es cierto que no se sabe cómo de fiable ha sido la funcionalización anterior. No obstante, sí que parece haber un desplazamiento notable durante el flujo de la Anti-Gliadina pues se dan desplazamientos acusados durante el flujo de la proteína, indicando la funcionalización de la muestra.

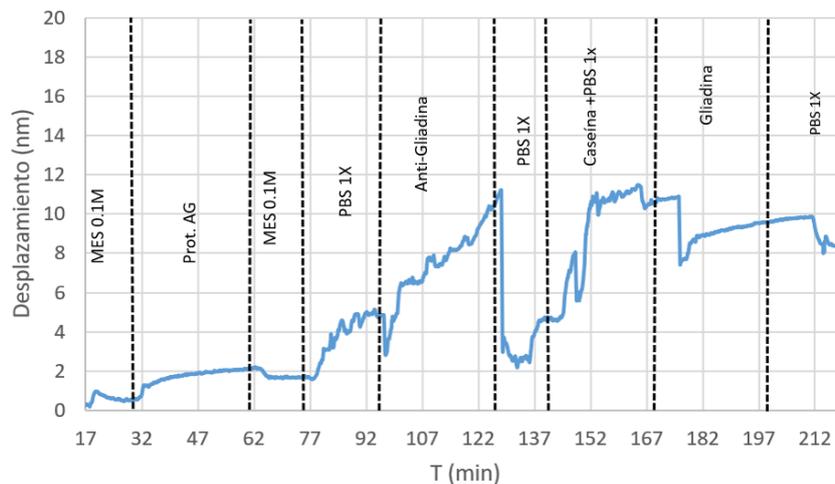


Figura 9.4: Valores relativos del desplazamiento para el Experimento 2

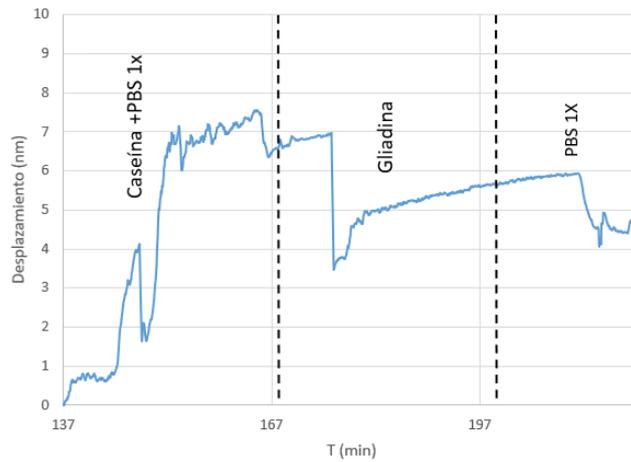


Figura 9.5: Evolución del desplazamiento durante el flujo de Gliadina

En la Figura 9.5 se pueden apreciar los desplazamientos propiciados por la Caseína y el comportamiento inesperado de la Gliadina.

9.1.3 Resultados del Experimento 3

Con respecto a los resultados del Experimento 3, tampoco fueron los previstos. En el marco experimental general que se puede apreciar en la figura 12.7, se da un descenso abrupto y muy acusado del registro de desplazamiento coincidiendo con el flujo de PBS 1X.

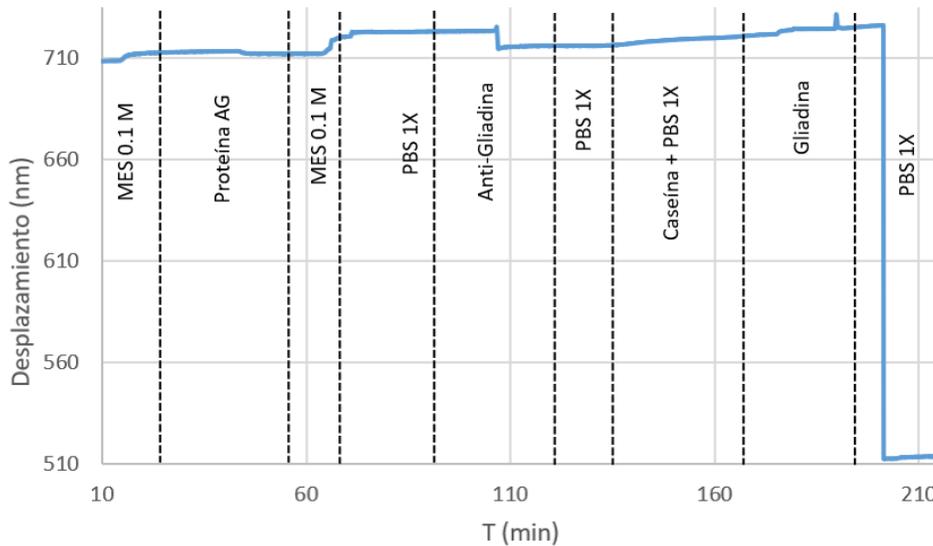


Figura 9.6: Desplazamiento de la longitud de onda a lo largo del experimento 3

Con tal de analizar con mayor precisión los desplazamientos producidos durante el experimento, a continuación, se presenta el gráfico con el eje ajustado a los valores obtenidos a lo largo del flujo de las distintas disoluciones.

En el Experimento 3, los desplazamientos en las longitudes de onda se ajustan, en grandes rasgos, a los *slots* temporales de cada ciclo. Los saltos anómalos que aparecen en la curva deben de nuevo por burbujas o aire atrapados en el canal. Aunque durante el flujo de Caseína+PBS 1X y Gliadina la funcionalización parece haber surtido efecto ya que se produce un aumento de los

valores del desplazamiento de onda, la onda no toma la forma esperada de ascenso-meseta-descenso. Por otra parte, durante el flujo de la Anti-Gliadina, se da un movimiento abrupto hacia longitudes de onda inferiores, es un escalon que precede al resto de resultados del experimento.

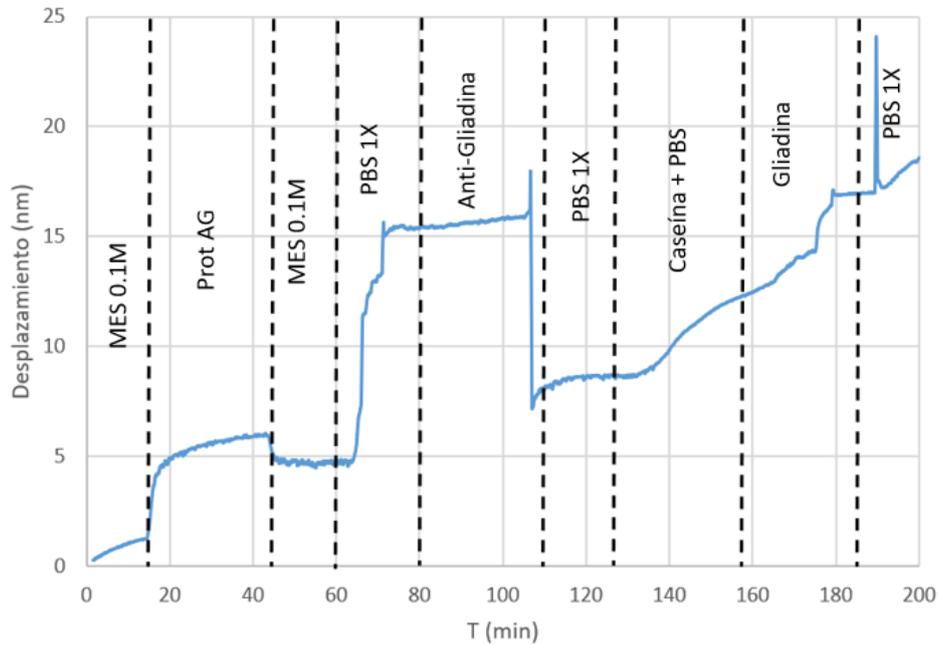


Figura 9.7: Valores relativos del desplazamiento para el Experimento 3

9.2 Muestras funcionalizadas por incubación

Como se indicó en apartados anteriores, la matriz de biofuncionalización ha sido la siguiente:

	[AG] ₁	[AG] ₂	[AG] ₃
[Ab] ₁	1-1	1-2	1-3
[Ab] ₂	2-1	2-2	2-3
[Ab] ₃	3-1	3-2	3-3

Figura 9.8: Esquematización de la matriz de combinaciones para la funcionalización por incubación

Se han obtenido los siguientes resultados para cada una de las muestras sometidas al flujo posterior:

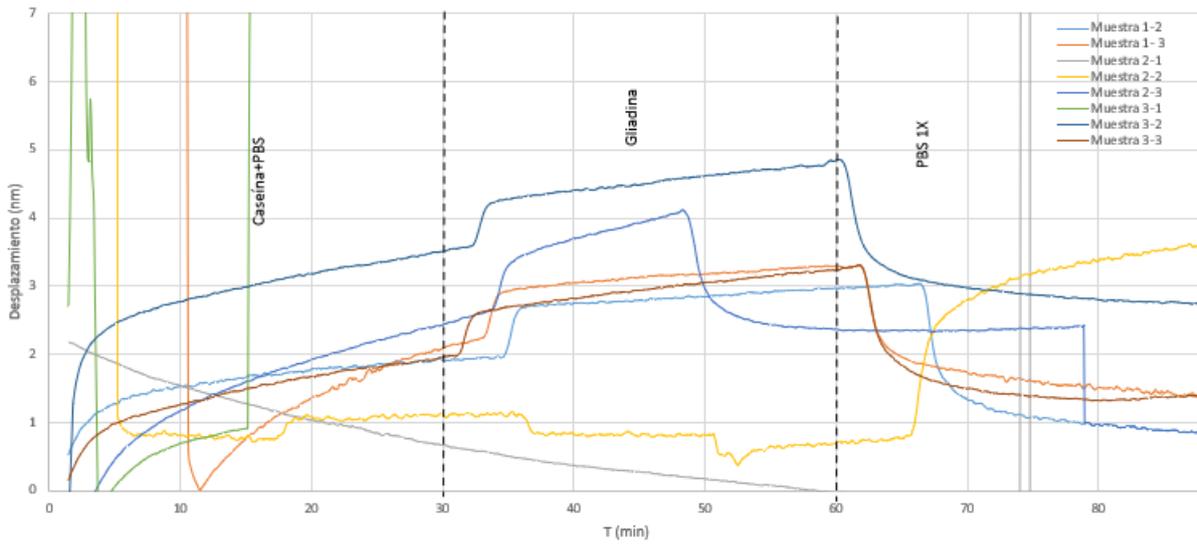


Figura 9.9: Desplazamiento relativo para cada una de las muestras funcionalizadas mediante incubación

En la Figura 9.9 se observan datos anómalos para dos de las muestras, concretamente la Muestra 2-1 y la Muestra 3-1, a continuación, se adjuntan sus gráficas individuales con tal de apreciar mejor su evolución durante el experimento.

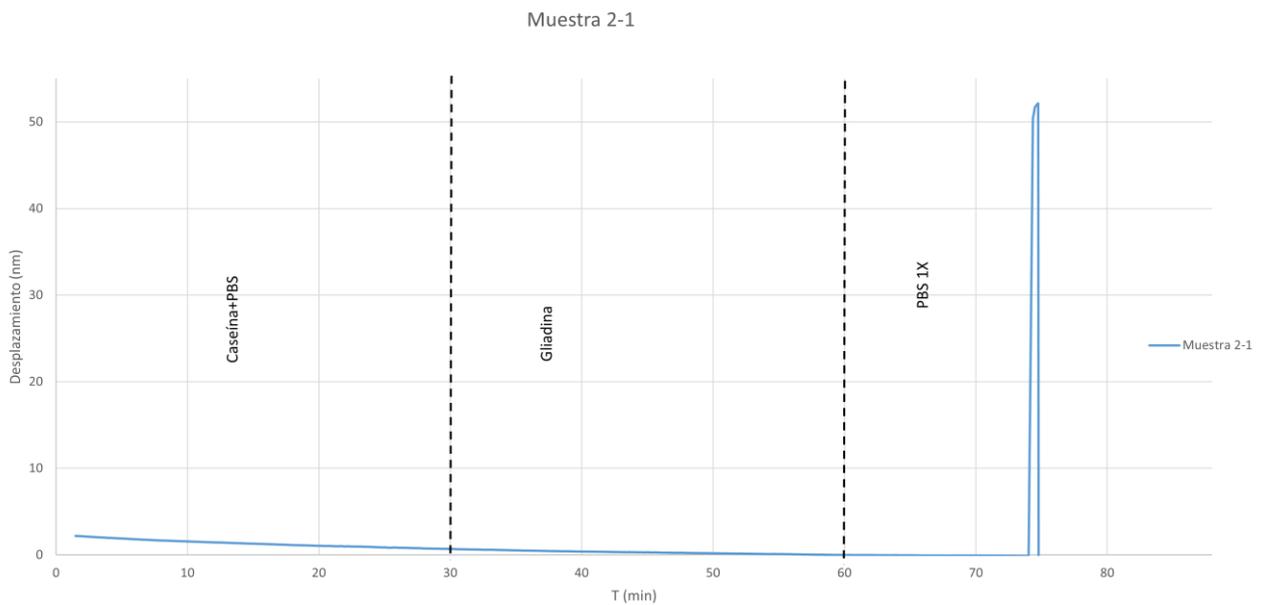


Figura 9.10: Desplazamiento relativo de la Muestra 2-1

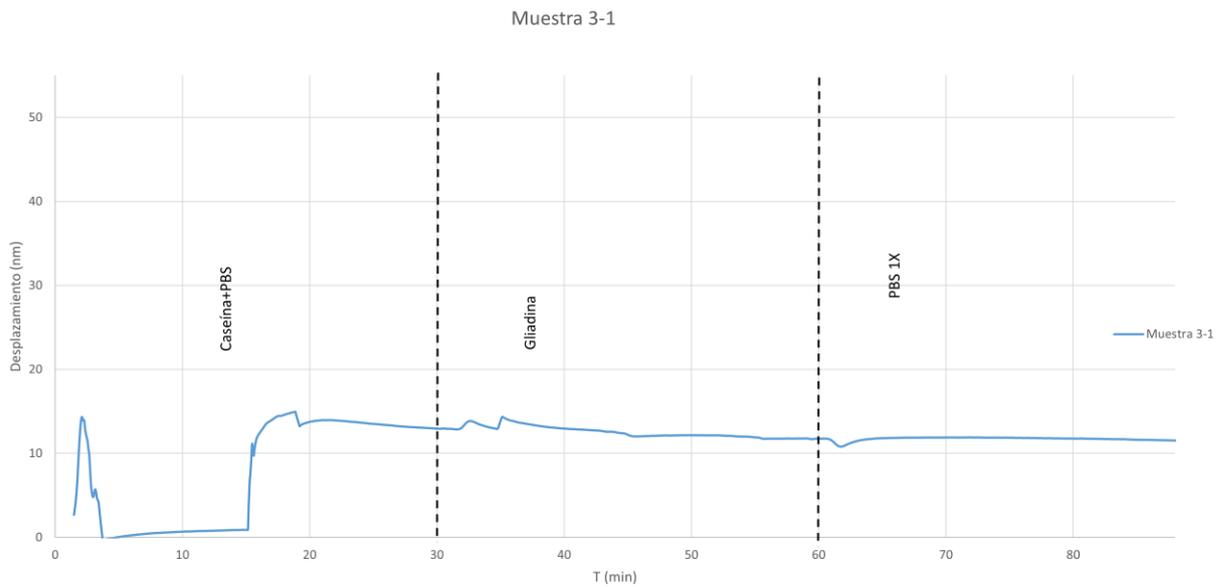


Figura 9.11: Desplazamiento relativo de la Muestra 3-1

Para la Muestra 2-1, los valores de funcionalización fueron de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína AG y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de α -Gliadina, mientras que la Muestra 3-1 se funcionalizó con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína AG también y 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de α -Gliadina. Como se puede apreciar en ambas figuras, ninguna se ajusta a las expectativas experimentales como el resto de las muestras.

Con tal de analizar el comportamiento del resto de las muestras sin que la representación gráfica se vea influenciada por la escala de los outliers, se presenta a continuación sin la evolución del desplazamiento de la longitud sin la Muestra 2-1 y la Muestra 3-1.

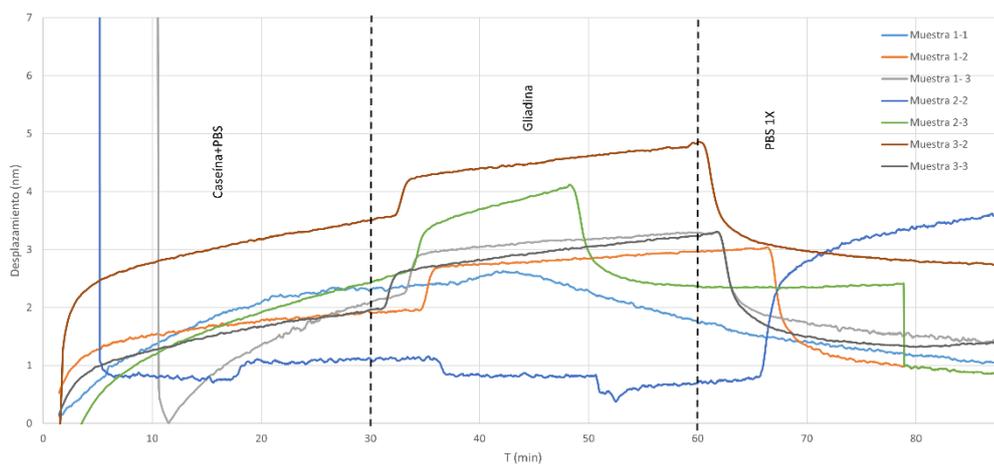


Figura 9.12: Desplazamiento relativo de las muestras sin los outliers

En la figura anterior, destaca el comportamiento de la Muestra 1-1 y la Muestra 2-2, que, aparentemente, no han tenido una respuesta adecuada frente a la funcionalización. La Muestra 1-1 se funcionalizó con una concentración de proteína AG de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y una concentración de α - Gliadina de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que la Muestra 2-2 se funcionalizó con una concentración de proteína AG de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y una concentración de α - Gliadina de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

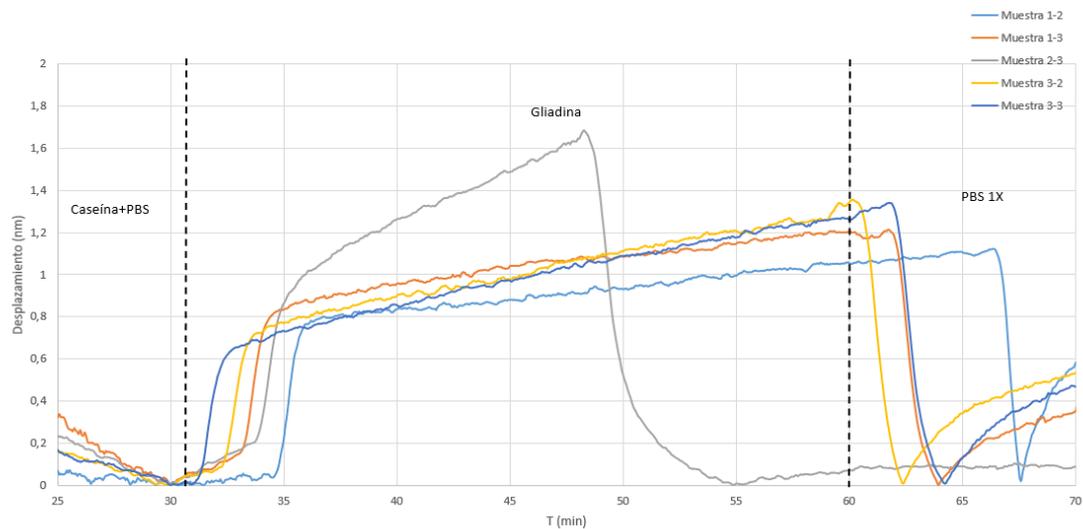


Figura 9.13: Desplazamiento relativo de las muestras con mejor respuesta

En la Figura 9.13 es la Muestra 2-3 la que presenta el mayor desplazamiento ante el flujo de la Gliadina con 1.67 nm, la funcionalización de esta muestra fue de una concentración de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína AG y de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo de α - Gliadina.

El menor desplazamiento es el de la Muestra 1-2 con un movimiento de 1.1 nm , esta muestra se funcionalizó con una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína AG y una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de α - Gliadina y de las 5 muestras es la que parece presentar una respuesta más atenuada frente al flujo de Gliadina.

V

Conclusiones

Capítulo 10

Conclusiones

En primer lugar, en cuanto al modelo de *Matlab* diseñado, es capaz de:

- Obtener el espectro de reflectancia de la muestra a partir del ángulo de incidencia, índice de refracción y espesor de las capas y el rango de longitud de onda.
- Representar la superposición espectral de distintos sistemas por medio de gráficos con tal de facilitar la visualización del desplazamiento de la longitud de onda.
- Calcular el índice de refracción efectivo de la capa, conociendo la fracción volumétrica del poro y los índices de refracción de la matriz sólida y del material que ocupa el poro.
- Calcular la sensibilidad de la capa para distintas fracciones volumétricas de poro, espesores de capa y ángulos de incidencia.

En la memoria presentada, se muestran las pruebas experimentales que demuestran que el sensor óptico responde ante las modificaciones en el índice de refracción del flujo, sin embargo, no se pueden hacer afirmaciones sobre aspectos como la repetitividad o la sensibilidad.

Si bien los resultados obtenidos de los experimentos de las muestras funcionalizadas por flujo no han sido esclarecedores, pues no se han ajustado a las perspectivas de comportamiento espectral, una gran parte de las muestras funcionalizadas por incubación para distintas concentraciones de proteína AG y de α -Gliadina sí que han mostrado desplazamientos correspondientes a los flujos de las distintas disoluciones, es decir, tanto la α -Gliadina como la Gliadina parecen haberse unido en el evento de reconocimiento biomolecular y esto se traduce en que la Gliadina es una molécula medible por medio de este proceso de sensado.

Como se ha indicado con anterioridad, las muestras funcionalizadas por incubación han arrojado resultados más sólidos y constantes, mientras que las muestras funcionalizadas por flujo han presentado curvas de desplazamiento algo anómalas, en parte debido a la presencia de aire o burbujas en el canal. También, cabe destacar que tanto la funcionalización de las muestras, así como el flujo del analito de interés para la funcionalización por incubación supuso un proceso más ágil y que consumió menos tiempo que la funcionalización por flujo, a pesar de tratarse de un total de nueve muestras.

Las conclusiones resultantes de este proyecto, que a la vez cumplen con el objetivo general propuesto son las siguientes:

1. Se ha llevado a cabo un el diseño computacional de la sensibilidad de capa de interés, capaz de caracterizar la muestra sin necesidad de someterla a un estudio experimental.
2. Se ha cumplido con la propuesta de funcionalización de la superficie de las muestras de TiO₂ poroso, tanto por flujo del elemento de reconocimiento, así como por incubación.
3. Los experimentos se han llevado cabo en el laboratorio mediante el método de *flowing experiment* y se recogieron los datos experimentales necesarios.
4. La *data* ha sido procesada por medio de los programas *Ocean Optics Software*, *Matlab* y *Excel*.

10.1 Líneas futuras

Todavía queda trabajo por hacer a la hora de evaluar la viabilidad de la aplicación de los sensores fotónicos para la detección de este tipo de analito, algunas de las perspectivas de futuro derivadas de este trabajo son:

1. Mejorar el código de sensibilidad, de manera que sea posible hacer un seguimiento de lóbulos espectrales específicos para distintas porosidades y, así, llevar a cabo comparativas entre los distintos parámetros en un marco más fiable.
2. Ampliar la evaluación experimental por flujo con tal de determinar si los resultados obtenidos durante este trabajo se deben a anomalías de la muestra, de cómo se han preparado la disoluciones o si intervienen más parámetros en la funcionalización por flujo de este tipo de estructuras.
3. Proponer nuevas combinaciones de proteína AG y anticuerpo en la funcionalización por incubación, con tal de hallar aquellas propuestas más eficientes y de bajo coste.
4. Diseñar procedimientos de sensado nuevos con tiempos más reducidos de forma que el proceso sea lo más eficaz posible con vistas a una implementación industrial.
5. Evaluar la respuesta y sensibilidad de la detección de Gliadina en otro tipo de sensores ópticos, no necesariamente aquellos basados en el interferómetro de Fabry-Pérot y de este modo estimar el más competente.

VI

Presupuesto

Capítulo 11

Presupuesto

11.1 Cuadro de mano de obra

Cuadro de mano de obra

Núm. Código	Denominación de la mano de obra	Precio	Horas	Total
1 MO.TUT	Mano de obra del tutor	31,00	56,50 h	1.751,50
2 MO.IL	Mano de obra del Ingeniero de laboratorio	31,00	6,00 h	186,00
3 MO.IBJ	Ingeniero Biomédico Junior	15,00	330,00 h	4.950,00
			Total mano de obra:	6.887,50

Figura 11.1: Cuadro de mano de obra

11.2 Cuadro de materiales

Cuadro de materiales

Núm. Código	Denominación del material	Precio	Cantidad	Total
1 MAT.PIP	Pipetas de varios volúmenes	370,00	4,00 u	1.480,00
2 MAT.SET	Set-up óptico	30,00	1,00 u	30,00
3 MES.OceanOpt	Licencia Software Ocean Optics	24,30	15,00 u	364,50
4 MES.LMTLB	Licencia MATLAB Estándar	24,00	65,00 h	1.560,00
5 MAT.GUANT	Pack de guantes de látex	13,00	1,00 u	13,00
6 MAT.JER	Jeringa bomba de extracción	10,00	1,00 u	10,00
7 MAT.PINZAS	Pinzas para manipular las muestras	2,00	3,00 u	6,00
8 MES.PCp	Portátil	1,46	78,00 h	113,88
9 MES.PCm	Ordenador de sobremesa	1,15	20,00 h	23,00
10 MES.LO365	Licencia de Office 365	0,90	207,00 h	186,30
11 MAT.IMAN	Imanes de neodimio	0,50	4,00 u	2,00
12 MAT.MUESTR	Muestras para el sensado	0,45	18,00 u	8,10
13 MAT.DIS	Disoluciones empleadas en un sensado	0,14	15,00 u	2,10
14 MAT.EPP	Tubos eppendorf	0,03	100,00 u	3,00
15 MAT.PUNT	Puntas de pipeta	0,01	150,00 u	1,50
			Total materiales:	3.803,38

Figura 5: Cuadro de materiales

11.3 Cuadro de maquinaria

Cuadro de maquinaria

Núm. Código	Denominación de la maquinaria	Precio	Cantidad	Total
1 MAQ.ESP	Flame T Spectrometer	0,08	60,00 h	4,80
2 MAQ.BOMBA	Bomba de extracción de volúmenes	0,03	60,00 h	1,80
Total maquinaria:				6,60

Figura 11.3: Cuadro de maquinaria

11.4 Cuadro de precios unitarios

Cuadro de precios nº 1			
Nº	Designación	Importe	
		En cifra (Euros)	En letra (Euros)
	1 Definición del proyecto		
1.1	h Reunión inicial con el director del TFG	46,00	CUARENTA Y SEIS EUROS
1.2	h Reunión planificación actividades a realizar	46,00	CUARENTA Y SEIS EUROS
	2 Investigación del estado del arte		
2.1	h Investigación del estado del arte	18,26	DIECIOCHO EUROS CON VEINTISEIS CÉNTIMOS
	3 Reuniones de seguimiento		
3.1	Reuniones de seguimientos de los resultados obtenidos	77,00	SETENTA Y SIETE EUROS
	4 Desarrollo de la herramienta		
	4.1 Obtención del modelo		
4.1.1	h Desarrollo del código	71,46	SETENTA Y UN EUROS CON CUARENTA Y SEIS CÉNTIMOS
4.1.2	h Depuración del código	71,46	SETENTA Y UN EUROS CON CUARENTA Y SEIS CÉNTIMOS
	5 Estudios de simulación		
5.1	u Ejecución de simulaciones	41,61	CUARENTA Y UN EUROS CON SESENTA Y UN CÉNTIMOS
5.2	h Interpretación de los resultados	47,46	CUARENTA Y SIETE EUROS CON CUARENTA Y SEIS CÉNTIMOS
	6 Sensados realizados		
6.1	u Experimentos de sensado realizados	2.488,14	DOS MIL CUATROCIENTOS OCHENTA Y OCHO EUROS CON CATORCE CÉNTIMOS
	7 Procesado e interpretación de los resultados		
7.1	h Obtención de resultados	81,16	OCHENTA Y UN EUROS CON DIECISEIS CÉNTIMOS
	8 Redacción y defensa		
8.1	h Redacción de los documentos	15,90	QUINCE EUROS CON NOVENTA CÉNTIMOS
8.2	h Revisión y corrección de la memoria	23,65	VEINTITRES EUROS CON SESENTA Y CINCO CÉNTIMOS
8.3	h Preparación y práctica de la defensa	15,90	QUINCE EUROS CON NOVENTA CÉNTIMOS

Figura 11.4: Cuadro de precios unitarios

11.5 Cuadro de precios mediciones

01 Definición del proyecto			
Nº	Ud	Descripción	Medición
01.01	H	Reunión inicial con el director del TFG	
			Total h : 2,00
01.02	H	Reunión planificación actividades a realizar	
			Total h : 2,00
02 Investigación del estado del arte			
Nº	Ud	Descripción	Medición
02.01	H	Investigación del estado del arte	
			Total h : 10,00
03 Reuniones de seguimiento			
Nº	Ud	Descripción	Medición
03.01		Reuniones de seguimientos de los resultados obtenidos	
			Total : 6,00
04 Desarrollo de la herramienta			
Nº	Ud	Descripción	Medición
04.01.01	H	Desarrollo del código	
			Total h : 20,00
04.01.02	H	Depuración del código	
			Total h : 10,00
05 Estudios de simulación			
Nº	Ud	Descripción	Medición
05.01	U	Ejecución de simulaciones	
			Total u : 20,00
05.02	H	Interpretación de los resultados	
			Total h : 3,00
06 Sensados realizados			
Nº	Ud	Descripción	Medición
06.01	U	Experimentos de sensado realizados	
			Total u : 1,00
07 Procesado e interpretación de los resultados			
Nº	Ud	Descripción	Medición
07.01	H	Obtención de resultados	
			Total h : 15,00
08 Redacción y defensa			
Nº	Ud	Descripción	Medición
08.01	H	Redacción de los documentos	
			Total h : 150,00
08.02	H	Revisión y corrección de la memoria	
			Total h : 24,00
08.03	H	Preparación y práctica de la defensa	
			Total h : 8,00

Figura 11.5: Cuadro de mediciones

Scripts de *Matlab*

Función del índice efectivo de capa

```
function [n_eff] = effectiveN_function_vector(f, ep_a, ep_b)

% Verificar si el vector de fracciones es una fila o una columna
if size(f, 1) > 1
    f = f.'; % Transponer si es una columna
end

n_eff = zeros(size(f)); % Inicializar el vector de índices efectivos

for i = 1:length(f)
    p = [2 ((3*f(i) - 2)*ep_a + (1 - 3*f(i))*ep_b) -ep_a*ep_b];
    epsilon = roots(p);
    n_eff(i) = sqrt(epsilon(find(imag(epsilon) == 0 & real(epsilon) >
0)));
end

end
```

Función de superposición de espectros

```
function generatePlotsOverlay(n_vector1, n_vector2, n1_system1,
n2_system1, n1_system2, n2_system2, x, d_vector, tecta)
    % Verificar que los vectores tengan la misma longitud
    if length(n_vector1) ~= length(n_vector2)
        error('Los vectores n_vector1 y n_vector2 deben tener la misma
longitud.');
```

```
    end

    % Crear las celdas de vectores n_vectors1 y n_vectors2
    n_vectors1 = cell(length(n_vector1), 1);
    n_vectors2 = cell(length(n_vector2), 1);

    % Generar los vectores n_vectors1 y n_vectors2 con los valores fijos
y variables proporcionados
    for i = 1:length(n_vector1)
        n_vector_system1 = [n1_system1, n_vector1(i), n2_system1]; %
Vector para el sistema 1 con valores fijos y variable
```

```

        n_vector_system2 = [n1_system2, n_vector2(i), n2_system2]; %
Vector para el sistema 2 con valores fijos y variable

        % Asignar los vectores a las celdas correspondientes
        n_vectors1{i} = n_vector_system1;
        n_vectors2{i} = n_vector_system2;
    end

    for i = 1:length(n_vectors1)
        figure; % Crear una nueva figura para cada combinación de
n_vectors1 y n_vectors2
        for j = 1:length(d_vector)
            d_current = d_vector(j); % Obtener el espesor
correspondiente a la iteración actual

            r_TE1 = TMM_function(n_vectors1{i}, d_current, x, tecta);
            r_TE2 = TMM_function(n_vectors2{i}, d_current, x, tecta);

            subplot(2, 2, j);
            plot(x, abs(r_TE1).^2, 'b', x, abs(r_TE2).^2, 'r'); %
Overlay de las dos gráficas

            title(['Espesor = ' num2str(d_current) ' nm | n_vector1 = '
num2str(i) ' | n_vector2 = ' num2str(i)]);
            xlabel('Longitud de onda (nm)');
            ylabel('|r_{TE}|^2');

            legend('Sistema DIW', 'Sistema DIW+delta'); % Agregar
leyenda

            hold on

        end

    end

end

end
end

```

Función de Sensitivity

```
function Sensitivity(n_vector1, n_vector2, n_vector3, n_vector4,
n1_system1, n2_system1, n1_system3,n2_system3,n1_system4,n2_system4,
n1_system2, n2_system2, x, d_vector, tecta)
% Verificar que los vectores tengan la misma longitud
if length(n_vector1) ~= length(n_vector2)
    error('Los vectores n_vector1 y n_vector2 deben tener la misma
longitud.');
```

end

```
% Crear las celdas de vectores n_vectors1 y n_vectors2
n_vectors1 = cell(length(n_vector1), 1);
n_vectors2 = cell(length(n_vector2), 1);
n_vectors3= cell(length(n_vector3), 1);
n_vectors4= cell(length(n_vector4), 1);

% Generar los vectores n_vectors1 y n_vectors2 con los valores fijos
y variables proporcionados
for i = 1:length(n_vector1)
    n_vector_system1 = [n1_system1, n_vector1(i), n2_system1]; %
Vector para el sistema 1 con valores fijos y variable
    n_vector_system2 = [n1_system2, n_vector2(i), n2_system2]; %
Vector para el sistema 2 con valores fijos y variable
    n_vector_system3 = [n1_system3, n_vector3(i), n2_system3];
    n_vector_system4 = [n1_system4, n_vector4(i), n2_system4];

% Asignar los vectores a las celdas correspondientes
n_vectors1{i} = n_vector_system1;
n_vectors2{i} = n_vector_system2;
n_vectors3{i} = n_vector_system3;
n_vectors4{i} = n_vector_system4;
end

sensibilidad=[];
espesores=[];
for i = 1:length(n_vectors1)
    figure;

        % Crear una nueva figura para cada combinación de n_vectors1 y
n_vectors2
        for j = 1:length(d_vector)
            d_current = d_vector(j); % Obtener el espesor
correspondiente a la iteración actual
            % Caso 1
            r_TE1 = TMM_function(n_vectors1{i}, d_current, x, tecta);
            r_TE2 = TMM_function(n_vectors2{i}, d_current, x, tecta);
```

```

% Caso 2
r_TE3 = TMM_function(n_vectors3{i}, d_current, x, tecta);
r_TE4 = TMM_function(n_vectors4{i}, d_current, x, tecta);

[~, max_indices1] = findpeaks(abs(r_TE1).^2);
xloc1=x(max_indices1)
[~, max_indices2] = findpeaks(abs(r_TE2).^2);
xloc2=x(max_indices2)
[~, max_indices3] = findpeaks(abs(r_TE3).^2);
xloc3=x(max_indices3)
[~, max_indices4] = findpeaks(abs(r_TE4).^2);
xloc4=x(max_indices4)

max_diff1= abs((xloc2(1)) - (xloc1(1)))'
max_diff2 = abs((xloc4(1)) - (xloc3(1)))'

delta_lambda=cat(2,max_diff1,max_diff2)

vector1 = n_vectors1{i};
n_index1 = vector1(1);
vector2 = n_vectors2{i};
n_index2 = vector2(1);

vector3 = n_vectors3{i};
n_index3 = vector3(1);
vector4 = n_vectors4{i};
n_index4 = vector4(1);

index_diff1 = abs(n_index2 - n_index1);
index_diff2 = abs(n_index4 - n_index3);

x1=index_diff1*ones(1,length(max_diff1));
x2=index_diff2*ones(1,length(max_diff2));

delta_index=[x1,x2]

subplot(2,2,j)
scatter(delta_index,delta_lambda,25,'blue','*')
hold on;

%plot(delta_index, r, ':r', 'LineWidth', 0.5);
%hold off;

title(['Espesor = ' num2str(d_current) ' nm']);
xlabel('Δn');
ylabel('Δλ (nm)');

```

```

        legend('Sensibilidad')
        ylim([0 (max(delta_lambda)+1)]);
        %xlim([0 0.006])
        grid on;

        m = abs((delta_lambda(2) - delta_lambda(1))) / (delta_index(2) -
delta_index(1));
        sensibilidad = [sensibilidad, m];
        espesores=[espesores,d_vector(j)];

    end

    figure;
    scatter(espesores,sensibilidad,25,"blue",'*');
    title(['Sensibilidad']);
    xlim([350 750]);

    xlabel('Espesor (nm)');
    ylabel('S=(nm/RIU)');
    grid on;

end

end

```

Anejo B

Justificación de precios

Anejo de justificación de precios

Núm.	Código	Ud	Descripción		Total
1	01.01	h	Reunión inicial con el director del TFG		
	MO.TUT	1,00 h	Mano de obra del tutor	31,00	31,00
	MO.IBJ	1,00 h	Ingeniero Biomédico Junior	15,00	15,00
		0,00 %	Costes indirectos	46,00	0,00
			Total por h		46,00

Son CUARENTA Y SEIS EUROS por h.

2	01.02	h	Reunión planificación actividades a realizar		
	MO.TUT	1,00 h	Mano de obra del tutor	31,00	31,00
	MO.IBJ	1,00 h	Ingeniero Biomédico Junior	15,00	15,00
		0,00 %	Costes indirectos	46,00	0,00
			Total por h		46,00

Son CUARENTA Y SEIS EUROS por h.

3	02.01	h	Investigación del estado del arte		
	MO.IBJ	1,00 h	Ingeniero Biomédico Junior	15,00	15,00
	MES.PCp	1,00 h	Portátil	1,46	1,46
	MES.LO365	1,00 h	Licencia de Office 365	0,90	0,90
	MES.LW10	1,00 h	Licencia Windows 10	0,90	0,90
		0,00 %	Costes indirectos	18,26	0,00
			Total por h		18,26

Son DIECIOCHO EUROS CON VEINTISEIS CÉNTIMOS por h.

4	03.01		Reuniones de seguimientos de los resultados obtenidos		
	MO.TUT	1,00 h	Mano de obra del tutor	31,00	31,00

MO.IBJ	1,00 h	Ingeniero Biomédico Junior	15,00	15,00
MO.IL	1,00 h	Mano de obra del Ingeniero de laboratorio	31,00	31,00
	0,00 %	Costes indirectos	77,00	0,00
Total por				77,00

Anejo de justificación de precios

Núm.	Código	Ud	Descripción		Total
5	04.01.01	h	Desarrollo del código		
	MO.TUT	1,00 h	Mano de obra del tutor	31,00	31,00
	MO.IBJ	1,00 h	Ingeniero Biomédico Junior	15,00	15,00
	MES.PCp	1,00 h	Portátil	1,46	1,46
	MES.LMTLB	1,00 h	Licencia MATLAB Estándar	24,00	24,00
		0,00 %	Costes indirectos	71,46	0,00
Total por h					71,46

Son SETENTA Y UN EUROS CON CUARENTA Y SEIS CÉNTIMOS por h.

6	04.01.02	h	Depuración del código		
	MO.TUT	1,00 h	Mano de obra del tutor	31,00	31,00
	MO.IBJ	1,00 h	Ingeniero Biomédico Junior	15,00	15,00
	MES.PCp	1,00 h	Portátil	1,46	1,46
	MES.LMTLB	1,00 h	Licencia MATLAB Estándar	24,00	24,00
		0,00 %	Costes indirectos	71,46	0,00
Total por h					71,46

Son SETENTA Y UN EUROS CON CUARENTA Y SEIS CÉNTIMOS por h.

7	05.01	u	Ejecución de simulaciones		
	MO.IBJ	1,00 h	Ingeniero Biomédico Junior	15,00	15,00
	MES.PCp	1,00 h	Portátil	1,46	1,46
	MES.PCm	1,00 h	Ordenador de sobremesa	1,15	1,15
	MES.LMTLB	1,00 h	Licencia MATLAB Estándar	24,00	24,00
		0,00 %	Costes indirectos	41,61	0,00
Total por u					41,61

Son CUARENTA Y UN EUROS CON SESENTA Y UN CÉNTIMOS por u.

8 05.02 h Interpretación de los resultados

MO.IBJ	1,00 h	Ingeniero Biomédico Junior	15,00	15,00
MO.TUT	1,00 h	Mano de obra del tutor	31,00	31,00

Anejo de justificación de precios

Núm.	Código	Ud	Descripción		Total
	MES.PCp	1,00 h	Portátil	1,46	1,46
		0,00 %	Costes indirectos	47,46	0,00
				Total por h	47,46

Son CUARENTA Y SIETE EUROS CON CUARENTA Y SEIS CÉNTIMOS por h.

06.01 u Experimentos de sensado realizados

MO.IBJ	60,00 h	Ingeniero Biomédico Junior	15,00	900,00	
MAT.SET	1,00 u	Set-up óptico	30,00	30,00	
MAT.IMAN	4,00 u	Imanes de neodimio	0,50	2,00	
MAT.JER	1,00 u	Jeringa bomba de extracción	10,00	10,00	
MAT.DIS	15,00 u	Disoluciones empleadas en un sensado	0,14	2,10	
MAT.PIP	4,00 u	Pipetas de varios volúmenes	370,00	1.480,00	
MAT.PUNT	150,00 u	Puntas de pipeta	0,01	1,50	
MAT.GUANT	1,00 u	Pack de guantes de latex	13,00	13,00	
MAT.EPP	100,00 u	Tubos eppendorf	0,03	3,00	
MAT.PINZAS	3,00 u	Pinzas para manipular las muestras	2,00	6,00	
MAQ.LAMP	60,00 h	Lampara de Tungsteno	0,02	1,20	
MAQ.ESP	60,00 h	Flame T Spectrometer	0,08	4,80	
MAQ.BOMBA	60,00 h	Bomba de extracción de volúmenes	0,03	1,80	
MAT.MUESTR	18,00 u	Muestras para el sensado	0,45	8,10	
%4.00	1,00 %	Costes indirectos	2.463,50	24,64	
				Total por u	2.488,14

Son DOS MIL CUATROCIENTOS OCHENTA Y OCHO EUROS CON CATORCE CÉNTIMOS por u.

07.01 h Obtención de resultados

MO.IBJ	1,00 h	Ingeniero Biomédico Junior	15,00	15,00
MES.PCp	1,00 h	Portátil	1,46	1,46
MES.LMTLB	1,00 h	Licencia MATLAB Estándar	24,00	24,00
MES.LO365	1,00 h	Licencia de Office 365	0,90	0,90

MES.OceanOpt	1,00 u	Licencia Software Ocean Optics	24,30	24,30
MO.TUT	0,50 h	Mano de obra del tutor	31,00	15,50
	0,00 %	Costes indirectos	81,16	0,00

Anejo de justificación de precios

Núm.	Código	Ud	Descripción	Total
------	--------	----	-------------	-------

Total por h: 81,16

Son OCHENTA Y UN EUROS CON DIECISEIS CÉNTIMOS por h.

11 08.01 h Redacción de los documentos

MO.IBJ	1,00 h	Ingeniero Biomédico Junior	15,00	15,00
MES.LO365	1,00 h	Licencia de Office 365	0,90	0,90
	0,00 %	Costes indirectos	15,90	0,00

Total por h: 15,90

Son QUINCE EUROS CON NOVENTA CÉNTIMOS por h.

12 08.02 h Revisión y corrección de la memoria

MO.TUT	0,25 h	Mano de obra del tutor	31,00	7,75
MO.IBJ	1,00 h	Ingeniero Biomédico Junior	15,00	15,00
MES.LO365	1,00 h	Licencia de Office 365	0,90	0,90
	0,00 %	Costes indirectos	23,65	0,00

Total por h: 23,65

Son VEINTITRES EUROS CON SESENTA Y CINCO CÉNTIMOS por h.

13 08.03 h Preparación y práctica de la defensa

MO.IBJ	1,00 h	Ingeniero Biomédico Junior	15,00	15,00
MES.LO365	1,00 h	Licencia de Office 365	0,90	0,90
	0,00 %	Costes indirectos	15,90	0,00

Total por h: 15,90

Son QUINCE EUROS CON NOVENTA CÉNTIMOS por h.

Bibliografía

- Alhadrami, H. A. (2018). Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(3), 497–508. <https://doi.org/10.1002/bab.1621>
- Beléndez, A. (2000). *Tema 10: Ondas electromagnéticas (Resumen). Fundamentos Físicos de la Ingeniería.*
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Bharadwaj, R., & Singh, A. K. (2012). *Autonomous Lab-on-a-Chip Technologies* (pp. 217–235). https://doi.org/10.1007/5346_2012_31
- Brecht, A., & Gauglitz, G. (1995). Optical probes and transducers. *Biosensors and Bioelectronics*, 10(9–10), 923–936. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(95\)99230-I](https://doi.org/10.1016/0956-5663(95)99230-I)
- Cárdenas Hernández, M. (2012). *Estudio de las funciones de reflectancia y Transmitancia en la generación de plasmones Superficiales (SPR) bajo la configuración de Kretschmann, utilizando el método de matriz de Transferencia (MMT).*
- Clemente Jiménez, J. (2019). *Nanoestructuración de superficies para optimizar la deposición de materiales por láser.* Universidad Pública de Navarra.
- Collings, A. F., & Caruso, F. (1997). Biosensors: recent advances. *Reports on Progress in Physics*, 60(11), 1397–1445. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/60/11/005>
- David D. Nolte. (2012). *Optical interferometry for biology and medicine.*
- De Stefano, L. (2019). Porous Silicon Optical Biosensors: Still a Promise or a Failure? *Sensors*, 19(21), 4776. <https://doi.org/10.3390/s19214776>
- Estupiñán Durán, H. A. (2014). Evaluación de la corrosión de un acero Aisi Sae 1020 en mezclas de gasolina-bioetanol del 5, 10, 15, 20 y 100% por medio de técnicas gravimétricas y electroquímicas. *Prospectiva*, 10(2), 50. <https://doi.org/10.15665/rp.v10i2.233>
- Fan, X., White, I. M., Shopova, S. I., Zhu, H., Suter, J. D., & Sun, Y. (2008). Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta*, 620(1–2), 8–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.022>
- Garcés Montoya, K. (n.d.). *Transductor de fibra óptica con potencial uso como biosensor.*
- García-Rupérez, J., Toccafondo, V., Bañuls, M. J., Castelló, J. G., Griol, A., Peransi-Llopis, S., & Maquieira, Á. (2010). Label-free antibody detection using band edge fringes in SOI planar photonic crystal waveguides in the slow-light regime. *Optics Express*, 18(23), 24276. <https://doi.org/10.1364/OE.18.024276>
- Guidar, R., Gandolfi, D., Chalyan, T., Pasquardini, L., Samusenko, A., Pederzoli, C., Pucker, G., & Pavesi, L. (2015). Sensitivity and Limit of Detection of biosensors based on ring

- resonators. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 6, 99–102.
<https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2015.08.002>
- Guo, X. (2012). Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review. *Journal of Biophotonics*, 5(7), 483–501. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200015>
- Hassan, S. H. A., Van Ginkel, S. W., Hussein, M. A. M., Abskharon, R., & Oh, S.-E. (2016a). Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors. *Environment International*, 92–93, 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.003>
- Hassan, S. H. A., Van Ginkel, S. W., Hussein, M. A. M., Abskharon, R., & Oh, S.-E. (2016b). Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors. *Environment International*, 92–93, 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.003>
- He, W., Yuan, S., Zhong, W.-H., Siddikee, Md. A., & Dai, C.-C. (2016). Application of genetically engineered microbial whole-cell biosensors for combined chemosensing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1109–1119. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7160-6>
- Humlicek, J. (2013). Data Analysis for Nanomaterials: Effective Medium Approximation, Its Limits and Implementations. In *Ellipsometry at the Nanoscale* (pp. 145–178). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-33956-1_3
- Iranzo Egea, P. (2017). *Sensor de resonancia de plasmones de superficie en óptica integrada*. Universitat Politècnica de València.
- Jane, A., Dronov, R., Hodges, A., & Voelcker, N. H. (2009). Porous silicon biosensors on the advance. *Trends in Biotechnology*, 27(4), 230–239.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.12.004>
- Jianrong, C., Yuqing, M., Nongyue, H., Xiaohua, W., & Sijiao, L. (2004). Nanotechnology and biosensors. *Biotechnology Advances*, 22(7), 505–518.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.03.004>
- Lazcka, O., Campo, F. J. Del, & Muñoz, F. X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(7), 1205–1217.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.036>
- Lechuga, L. M., & Calle Martín, A. (1995). *Biosensores: Los dispositivos analíticos del futuro (I)* (pp. 132–140).
- Leung, A., Shankar, P. M., & Mutharasan, R. (2007). A review of fiber-optic biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 125(2), 688–703. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.03.010>
- Marco, M.-P., & Barceló, D. (1996). Environmental applications of analytical biosensors. *Measurement Science and Technology*, 7(11), 1547–1562. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/7/11/002>
- Martín Sánchez, D. (2019a). *Desarrollo de biosensores fotónicos basados en membranas de silicio poroso*.
- Martín Sánchez, D. (2019b). *Desarrollo de biosensores fotónicos basados en membranas de silicio poroso* [Universitat Politècnica de València].
<https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/125695>

- Moretta, R., De Stefano, L., Terracciano, M., & Rea, I. (2021). Porous silicon optical devices: Recent advances in biosensing applications. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 21, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/s21041336>
- Nikolelis, D. P., Nikoleli, G. P., & (Eds.). (2018). *Nanotechnology and Biosensors*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-00358-0>
- Niu, B., Wang, X., Wu, K., He, X., & Zhang, R. (2018). Mesoporous Titanium Dioxide: Synthesis and Applications in Photocatalysis, Energy and Biology. *Materials*, 11(10), 1910. <https://doi.org/10.3390/ma11101910>
- Olson, N., & Bae, J. (2019). Biosensors—Publication Trends and Knowledge Domain Visualization. *Sensors*, 19(11), 2615. <https://doi.org/10.3390/s19112615>
- Ortiz de Zárate, D., Serna, S., Ponce-Alcántara, S., & García-Rupérez, J. (2022a). Evaluation of Mesoporous TiO₂ Layers as Glucose Optical Sensors. *Sensors*, 22(14), 5398. <https://doi.org/10.3390/s22145398>
- Ortiz de Zárate, D., Serna, S., Ponce-Alcántara, S., & García-Rupérez, J. (2022b). Evaluation of Mesoporous TiO₂ Layers as Glucose Optical Sensors. *Sensors*, 22(14), 5398. <https://doi.org/10.3390/s22145398>
- Ortiz de Zárate, D., Serna, S., Ponce-Alcántara, S., Kovylyna, M., & García-Rupérez, J. (2021). Bottom-Up Synthesis of Mesoporous TiO₂ Films for the Development of Optical Sensing Layers. *Chemosensors*, 9(12), 329. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9120329>
- Renneberg, R., Pfeiffer, D., Lisdat, F., Wilson, G., Wollenberger, U., Ligler, F., & Turner, A. P. F. (n.d.). Frieder Scheller and the Short History of Biosensors. In *Biosensing for the 21st Century* (pp. 1–18). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2007_086
- Román Páez, M. A., Betancur Nieto, M. I., Cadavid Muñoz, N., Martínez Varela, B. A., Imbachí Narváez, P. C., Muñoz Echeverri, L. M., & Jiménez Henao, A. (2017). *Conceptos básicos para validación de metodologías analíticas*.
- Samuel, V. R., & Rao, K. J. (2022). A review on label free biosensors. *Biosensors and Bioelectronics: X*, 11, 100216. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100216>
- Sarkaleh, A. K., Lahijani, B. V., Saberhari, H., & Esmaeeli, A. (2017). Optical Ring Resonators: A Platform for Biological Sensing Applications. *Journal of Medical Signals and Sensors*, 7(3), 185–191.
- Senf, B., Yeo, W.-H., & Kim, J.-H. (2020). Recent Advances in Portable Biosensors for Biomarker Detection in Body Fluids. *Biosensors*, 10(9), 127. <https://doi.org/10.3390/bios10090127>
- Sepúlveda, B., Río, J. S. del, Moreno, M., Blanco, F. J., Mayora, K., Domínguez, C., & Lechuga, L. M. (2006). Optical biosensor microsystems based on the integration of highly sensitive Mach–Zehnder interferometer devices. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 8(7), S561–S566. <https://doi.org/10.1088/1464-4258/8/7/S41>
- Soleymani, L., & Li, F. (2017). Mechanistic Challenges and Advantages of Biosensor Miniaturization into the Nanoscale. *ACS Sensors*, 2(4), 458–467. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00069>

- Stoltenburg, R., Reinemann, C., & Strehlitz, B. (2007). SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*, 24(4), 381–403. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.06.001>
- Strianese, M., Staiano, M., Ruggiero, G., Labella, T., Pellecchia, C., & D’Auria, S. (2012). *Fluorescence-Based Biosensors* (pp. 193–216). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-806-1_9
- Tébar Saiz, M. (2021). *Estudio experimental de biosensores fotónicos basados en substratos porosos bajo diversas condiciones*. Universitat Politècnica de València.
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification1International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical Chemistry).1. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(1–2), 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
- Velasco-Garcia, M. N., & Mottram, T. (2003). Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. *Biosystems Engineering*, 84(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S1537-5110\(02\)00236-2](https://doi.org/10.1016/S1537-5110(02)00236-2)
- Vigneshvar, S., Sudhakumari, C. C., Senthilkumaran, B., & Prakash, H. (2016). Recent Advances in Biosensor Technology for Potential Applications – An Overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00011>
- Vo-Dinh, T., Cullum, B. M., & Stokes, D. L. (2001). Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 74(1–3), 2–11. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(00\)00705-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00705-X)