



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial

Desarrollo de una plataforma automatizada para la medida
multiplexada de sensores fotónicos basados en capas
porosas

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Biomédica

AUTOR/A: Torres Sastre, Vicent Gabriel

Tutor/a: García Rupérez, Jaime

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

*Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Industrial*

Desarrollo de una plataforma automatizada
para la medida multiplexada de sensores
fotónicos basados en capas porosas

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Biomédica

AUTOR/A: Torres Sastre, Vicent

Tutor/a: García Rupérez, Jaime

CURSO ACADÉMICO: 2024

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias más sinceras a todas las personas que han ayudado de una forma u otra a la realización de este Trabajo de Fin de Grado. En primer lugar, a mi tutor Jaime García Rupérez por la gran disposición y el asesoramiento proporcionado en todo momento. Igualmente debo hacer mención a Salvador Ponce Alcántara, ingeniero electrónico del Instituto Universitario de Tecnología Nanofotónica, cuya predisposición siempre ha sido a ayudar en todo lo posible. También me gustaría agradecer a mis compañeros y amigos que siempre estuvieron a mi lado con apoyo incondicional. Finalmente, a mi familia, por la paciencia y comprensión, en especial a mis padres que saben más que nadie el esfuerzo que hay detrás de este trabajo. Este trabajo es tan mío como suyo.

RESUMEN

Los sensores fotónicos siguen siendo una de las áreas más interesantes en el desarrollo de dispositivos de análisis con aplicaciones como el diagnóstico médico, la seguridad alimentaria, la monitorización ambiental y la detección de amenazas biológicas. La tecnología fotónica es atractiva por su alta sensibilidad, tamaño reducido, detección sin etiquetas y bajo volumen de muestra necesario. El uso de materiales porosos en sensores fotónicos ha despertado interés debido a que su porosidad permite que las sustancias penetren en la estructura del sensor, aumentando la sensibilidad. Además, estos materiales ofrecen una mayor superficie para inmovilizar los biorreceptores necesarios para la detección específica, permitiendo más bioreconocimientos. Sin embargo, una desventaja de los sensores con superficies porosas es la necesidad de iluminar y recoger la señal reflejada/transmitida en puntos específicos de la muestra, lo cual requiere múltiples fuentes/detectores o una medida secuencial. Este Trabajo Fin de Grado propone una plataforma de interrogación de sensores fotónicos basada en capas porosas que permite medir secuencialmente en varios puntos de uno o más chips. Los chips se colocarán en una etapa de traslación de bajo coste controlada por Arduino para adquirir el espectro de reflexión en diferentes posiciones con un solo espectrómetro. Se desarrollará una aplicación en Matlab para controlar el sistema de medida, incluyendo la sincronización del movimiento y la adquisición de espectros, el postprocesado de los datos y la monitorización en tiempo real de las variaciones en la respuesta de los sensores. La plataforma será evaluada mediante experimentos de sensado de índice de refracción y detección de biomoléculas.

Palabras Clave: sensores fotónicos; capas porosas; plataforma interrogación; set-up de medida; multiplexado; automatización; Matlab; Arduino

RESUM

La tecnologia fotònica continua sent una de les àrees més interessants en el desenvolupament de dispositius d'anàlisi per a aplicacions de diagnòstic mèdic, seguretat alimentària, la monitorització ambiental i detecció d'amenaques biològiques. La tecnologia fotònica és d'interès per la gran sensibilitat dels sensors, la seua naturalesa intrínsecament miniaturitzada, la detecció sense etiquetes i el baix volum de mostra. L'ús de sensors fotònics amb materials porosos és molt prometedor donat que, a través de la seua porositat, els materials faciliten l'entrada de la substància en l'arquitectura del sensor per incrementar la capacitat de sensibilitat del sensor. A més, els materials ofereixen una alta àrea de superfície sobre la qual els biorreceptors d'interès per a la detecció en particular poden ser immobilitzats, permetent així més bioreconeixements. No obstant això, un dels inconvenients dels sensors porosos és que la senyal reflectida/transmesa ha de ser recopilada/interrogada en punts discrets de la mostra, cosa que requereix múltiples fonts/detectors o una mesura seqüencial. En aquest Treball de Fi de Grau es mostra una plataforma d'interrogació de sensors fotònics porosos amb la capacitat d'interrogar en cascada a través de múltiples punts d'un o més xips. Els xips estaran en una configuració de moviment baix cost controlada per Arduino per mostrejar l'espectre de reflexió en diferents ubicacions amb un sol espectròmetre. S'escriurà un programa de Matlab per controlar el sistema de mesura, que serà capaç de sincronitzar el moviment i l'adquisició d'espectres, fer postprocessament de dades, així com monitoritzar en temps real l'evolució de la resposta dels sensors. Es provarà en una aplicació de sensat d'índex de refracció i detecció de biomolècules.

Paraules clau: sensors fotònics; capes poroses; plataforma interrogació; set-up de mesura; multiplexat; automatització; Matlab; Arduino

ABSTRACT

Photonic sensors continue to be one of the most interesting areas in the development of analytical devices, with applications such as medical diagnostics, food safety, environmental monitoring, and the detection of biological threats. Photonic technology is attractive due to its high sensitivity, small size, label-free detection, and low sample volume requirement. The use of porous materials in photonic sensors has sparked interest because their porosity allows substances to penetrate the sensor structure, increasing sensitivity. Additionally, these materials offer a larger surface area for immobilizing bioreceptors necessary for specific detection, allowing for more biorecognitions. However, a disadvantage of sensors with porous surfaces is the need to illuminate and collect the reflected/transmitted signal at specific points of the sample, which requires multiple sources/detectors or sequential measurement. This Final Degree Project proposes a platform for interrogating photonic sensors based on porous layers that allows sequential measurement at various points on one or more chips. The chips will be placed on a low-cost translation stage controlled by Arduino to acquire the reflection spectrum at different positions using a single spectrometer. A Matlab application will be developed to control the measurement system, including synchronization of movement and spectrum acquisition, data post-processing, and real-time monitoring of sensor response variations. The platform will be evaluated through refractive index sensing and biomolecule detection experiments.

Keywords: photonic sensors; porous layers; interrogation platform; measurement set-up; multiplexed; automation; Matlab; Arduino

ÍNDICES

DOCUMENTOS CONTENIDOS EN EL TFG

| | |
|--|----|
| <i>MEMORIA</i> | 1 |
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN | 2 |
| CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN | 12 |
| CAPÍTULO 3. OBJETIVOS | 14 |
| CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 16 |
| CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 50 |
| CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES | 72 |
| CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA | 75 |
| <i>ANEXOS</i> | 79 |
| CAPÍTULO 1. PRESUPUESTO | 80 |
| CAPÍTULO 2. PLANOS | 86 |
| CAPÍTULO 3. ELEMENTOS AUXILIARES DE LA INTERFAZ | 89 |
| CAPÍTULO 4. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE | 94 |

ÍNDICE DE LA MEMORIA

| | |
|---|-----------|
| <i>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....</i> | <i>2</i> |
| 1. Sensores basados en capas porosas frente a sensores de campo evanescente..... | 3 |
| 2. Principio físico: interferometría Fabry-Perot | 4 |
| 2.1. Cuantificación de concentración de sustancias..... | 5 |
| 2.2. Detección de biomoléculas específicas | 6 |
| 3. Capas mesoporosas de TiO₂: propiedades, síntesis y caracterización | 7 |
| 4. Proceso de medida “previo” | 8 |
| 5. Limitaciones del proceso y propuestas de mejora | 10 |
| | |
| <i>CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN</i> | <i>12</i> |
| | |
| <i>CAPÍTULO 3. OBJETIVOS.....</i> | <i>14</i> |
| 1. Generales | 14 |
| 2. Específicos..... | 14 |
| | |
| <i>CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</i> | <i>16</i> |
| 1. Proceso de fabricación de la plataforma de medida | 16 |
| 1.1. Componentes de la plataforma..... | 17 |
| 1.2. Circuito electrónico | 22 |
| 1.3. Posicionamiento de piezas en la base..... | 23 |
| 2. Proceso de desarrollo del software del sistema de medida | 25 |
| 2.1. Herramientas empleadas para el software | 25 |
| 2.2. Búsqueda de necesidades | 26 |
| 2.2.1. Requisitos del usuario | 26 |
| 2.2.2. Necesidades del programa para el sistema y los experimentos | 26 |
| 2.3. Análisis de viabilidad técnica..... | 27 |
| 2.4. Diseño preliminar del programa | 28 |
| 2.4.1. Arquitectura del Software..... | 28 |
| 2.4.2. Interfaces gráficas del usuario..... | 30 |
| 2.4.3. Comunicaciones entre sistemas..... | 31 |
| 2.5. Captura de espectros: control y optimización..... | 32 |
| 2.5.1. Manipulación de parámetros básicos de adquisición | 32 |
| 2.5.2. Corrección de luz ambiental..... | 33 |
| 2.5.3. Normalización de espectro | 33 |
| 2.6. Control del motor paso a paso..... | 34 |
| 2.6.1. Control desde Arduino IDE | 34 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 2.6.2. | <i>Comunicación puerto serie</i> | 35 |
| 2.6.3. | <i>Control desde MATLAB</i> | 35 |
| 2.7. | Menús de la interfaz principal..... | 36 |
| 2.7.1. | <i>Menú para visualización del espectro en tiempo real y configuraciones básicas de adquisición</i> | 37 |
| 2.7.2. | <i>Menú para movimiento básico de la base de muestras</i> | 38 |
| 2.7.3. | <i>Menú de búsqueda de muestras</i> | 39 |
| 2.7.4. | <i>Menú de configuración de parámetros de medida</i> | 40 |
| 2.7.5. | <i>Ventana de visualización de experimentos</i> | 42 |
| 2.8. | Mejora estética y compilación | 44 |
| 3. | Proceso de elaboración del sistema de microfluídica | 44 |
| 3.1. | Elementos utilizados para el sistema de flujo | 45 |
| 3.2. | Elaboración y montaje de cartucho de celdas con sensores..... | 47 |
| 4. | Metodología seguida para las pruebas | 48 |
| <i>CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> | | <i>50</i> |
| 1. | Plataforma y software definitivos: simulación de experiencia del usuario | 50 |
| 2. | Pruebas de estabilidad del sistema de medida | 55 |
| 3. | Pruebas de validación del sistema de flujo | 57 |
| 4. | Evaluación de la plataforma mediante medidas de índice de refracción | 58 |
| 5. | Evaluación de la plataforma mediante pruebas de biosensado | 64 |
| <i>CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES</i> | | <i>72</i> |
| 1. | Futuras líneas de investigación | 73 |
| <i>CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA</i> | | <i>75</i> |

ÍNDICE DE LOS ANEXOS

| | |
|--|--------|
| <i>CAPÍTULO 1. PRESUPUESTO</i> | 80 |
| 1. Coste de mano de obra..... | 80 |
| 2. Coste de maquinaria | 81 |
| 3. Coste de materiales..... | 82 |
| 4. Coste total del proyecto | 83 |
| <i>CAPÍTULO 2. PLANOS</i> | 86 |
| <i>CAPÍTULO 3. ELEMENTOS AUXILIARES DE LA INTERFAZ</i> | 89 |
| 1. Barra de menús | 89 |
| 2. Ventana de salidas e información de errores..... | 90 |
| 3. Interfaces secundarias..... | 90 |
| 3.1. Menú de configuración adicional del motor | 91 |
| 3.2. Menú de configuración de guardado de espectros..... | 91 |
| 3.3. Menú de configuración de guardado de experimentos | 92 |
| 3.4. Menú de cambio de nombre de muestras | 92 |
| <i>CAPÍTULO 4. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE</i> | 94 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Diagrama del funcionalización y reconocimiento de un sensor de campo evanescente basado en guías de luz. (Soler, 2015)..... | 3 |
| Figura 2. Superficie externa e interna de una estructura porosa biofuncionalizada para el reconocimiento de un analito específico. | 4 |
| Figura 3. (a): Cavidad de Fabry-Pérot con onda de luz incidente e interferencia de ondas reflejada. (b): espectro de cavidad de Fabry-Pérot (Jauregui-Vazquez et al., 2021)..... | 5 |
| Figura 4. Desplazamiento espectral del máximo de interferencia del espectro de reflexión ubicado en 620 cuando fluyen concentraciones seleccionadas de glucosa en DIW (Deionized Water). (Ortiz De Zárate et al., 2022) | 6 |
| Figura 5. Desplazamiento hacia longitudes de onda mayores del espectro de reflectividad de la estructura porosa por adsorción de analitos a la superficie. | 6 |
| Figura 6. Unión antígeno-anticuerpo. (Kaiser, 2022) | 7 |
| Figura 7. Set-up óptico y cámara de microfluídica empleada para las mediciones ópticas. (Martínez-Pérez et al., 2020) | 9 |
| Figura 8. Orientación de fibras a la estructura de sensado. (a): Fibra emisora de luz y fibra receptora. (b): Fibra bifurcada perpendicular a la superficie | 9 |
| Figura 9. Esquema des sistema de interrogación de sensores ópticos a desarrollar. | 17 |
| Figura 10. Fuente de luz H1-2000-HP. («Tungsten Halogen Light Source», 2024)..... | 17 |
| Figura 11. Espectrómetro HR4000. (Spectrometers & Accessories Glossary, 2024) . | 18 |
| Figura 12. Fibra óptica bifurcada QBIF200-VIR-NIR. (Spectrometers & Accessories Glossary, s. f.)..... | 18 |
| Figura 13. Plataforma para la colocación y fijación de los sensores. | 18 |
| Figura 14. Soporte para la fibra óptica. (Bysameyee Soporte de aleación de Aluminio para microscopio Digital USB/Wi-Fi, Montaje de Metal de diámetro Universal con | |

| | |
|---|----|
| Estuche de Transporte para microscopio : Amazon.es: Industria, empresas y ciencia, 2024)..... | 19 |
| Figura 15. Plancha para el soporte de tubos Eppendorf..... | 19 |
| Figura 16. Motor paso a paso NEMA 17 con actuador lineal. (Befenybay - Actuador lineal de viaje con rieles lineales cuadrados con motor paso a paso NEMA17 para piezas de router CNC DIY eje X Y Z : Amazon.es: Industria, empresas y ciencia, s. f.) | 19 |
| Figura 17. Sensor óptico final de carrera. (Oiyagai 5pcs LM393 Chip Motor Comparador de medición Sensor de Velocidad Módulo de Ranura Tipo de optoacoplador IR para MCU Arduino : Amazon.es: Informática, 2024)..... | 20 |
| Figura 18. Driver TB6600. (COVVY TB6600 4A DC 9-42V controlador de motor paso a paso controlador CNC 32 segmentos 2/4 fase híbrido paso a paso del motor placa del conductor : Amazon.es: Industria, empresas y ciencia, s. f.)..... | 20 |
| Figura 19. Arduino NANO con leyenda de los pines. (Placa de desarrollo Arduino Nano V3.0 ATMEGA328P CH340 MINI USB, nueva - AliExpress 502, s. f.) | 21 |
| Figura 20. Placa Protoboard y conexiones macho-macho. (Cables tipo DuPont Macho - Macho (40 cm / 40 unidades) BricoGeek BricoGeek.com, s. f.; Protoboard placa de 400 pines, s. f.) | 21 |
| Figura 21. Esquema del circuito electrónico. | 22 |
| Figura 22. Imagen del circuito electrónico incorporado a la plataforma. | 23 |
| Figura 23. Motor incorporado a la plataforma. (a): piezas de soporte. (b): plataforma móvil..... | 23 |
| Figura 24. Región de la plataforma para el manejo de fluidos. | 24 |
| Figura 25. Región de la plataforma con el hardware de espectroscopía. | 24 |
| Figura 26. Incorporación de finales de carrera al motor. (a): lengüetas para detección de la plataforma móvil. (b): sensor origen. (c): sensor final. | 25 |
| Figura 27. Arquitectura de alto nivel. Relaciones entre UI, lógica de negocio, memoria y controladores del hardware. | 29 |
| Figura 28. Flujograma de la experiencia de un usuario en la aplicación. | 30 |
| Figura 29. Esquema básico de interfaz preliminar del software de control | 31 |

| | |
|--|----|
| Figura 30. Diagrama de intercambios y flujos de información entre componentes del sistema..... | 32 |
| Figura 31. Interfaz principal. Ventana de configuración completa + ventana de resultados. | 36 |
| Figura 32. Panel de visualización y configuración básica del espectro..... | 37 |
| Figura 33. Panel de configuración y movimiento básico del motor. | 38 |
| Figura 34. Panel de búsqueda de posiciones de los sensores. (a): desactivado. (b): barriendo. | 39 |
| Figura 35. Respuesta espectral de diferentes regiones de la plataforma. (a): chip (b): borde PMMA (metacrilato)..... | 39 |
| Figura 36. Panel de configuración de parámetros de medida para cada sensor. | 40 |
| Figura 37. Ventana de visualización de desplazamiento espectral en tiempo real destacando la barra de control inferior | 42 |
| Figura 38. Estructuras de TiO ₂ utilizadas como sensores. (a): Oblea. (b): Chips cortados..... | 44 |
| Figura 39. Tipos de flujo a través de las cámaras de microfluídica. (a): en serie. (b): en paralelo..... | 45 |
| Figura 40. Bomba de jeringa. (Syringe Pump - Advanced Precision Programmable Syringe Pumps - SyringePump.com, 2024) | 46 |
| Figura 41. Tubos Eppendorf acoplados sobre el soporte impreso..... | 46 |
| Figura 42. Componentes del cartucho de celdas. (a): Placa PMMA con agujeros para tornillos y canales. (b): Sensores y superficies de solapado. (c): base impresa con agujeros con regiones para compresión con tornillos y tuercas. (d): cabezales canal-celda. (e): micro canales..... | 46 |
| Figura 43. Elaboración de canales. (a): entre celdas. (b): cartucho-bomba/cartucho-Eppendorf. | 47 |
| Figura 44. Solapamiento del exceso de los agujeros de canales con tubo de silicona. | 47 |
| Figura 45. Posicionamiento de chips sobre la plataforma del cartucho con piezas de silicona para favorecer el solapamiento en las celdas..... | 48 |

| | |
|--|----|
| Figura 46. (a): Posicionador de celdas finalizado. (b): prueba preliminar de flujo. | 48 |
| Figura 47. Apariencia final de la plataforma de medida. | 51 |
| Figura 48. Resultado de algoritmo de corrección de oscuridad. | 51 |
| Figura 49. Resultado de algoritmo de normalización. (a): espectro de referencia (aluminio). (b): espectro normalizado. | 52 |
| Figura 50. Intentos de establecer conexión con Arduino desde el panel de control del motor. (a): conexión fallida. (b): conexión establecida | 52 |
| Figura 51. Parámetros de búsqueda de posiciones de sensores. (a): Sumatorio. (b): Máximo. (c): Máximo - mínimo. (d): Correlación respecto a un patrón. (e): Índice con correlación y máx - min..... | 53 |
| Figura 52. Selección de puntos para definir posiciones a medir. Índice de correlación y rango elegido como parámetro..... | 54 |
| Figura 53. Definición de características de medida para cada sensor. Uso de función fitting..... | 54 |
| Figura 54. Comparación de precisión en la medida con el fitting activado y desactivado a partir de 1 minuto y 30 segundos de experimento..... | 55 |
| Figura 55. Resultados desplazamiento - tiempo de pruebas de estabilidad..... | 56 |
| Figura 56. Evolución del intervalo entre un ciclo y el siguiente a lo largo de una prueba. | 57 |
| Figura 57. Resultados de primeras pruebas de cambio de índice de refracción. (a): muestras de TiO ₂ usadas. (b): prueba con algunas muestras de TiO ₂ usadas y algunas nuevas (3 y 4). | 59 |
| Figura 58. Cambio de respuesta espectral según medio y calidad de la muestra. .. | 60 |
| Figura 59. Prueba final de cambio de índice de refracción para caracterizar sensibilidad del sistema. Flujo de EtOH a 5 y 10%. (a): prueba completa. (b): escalón DIW - EtOH 10%..... | 61 |
| Figura 60. Chips reservados en ambiente húmedo durante el proceso de incubación..... | 65 |

| | |
|---|----|
| Figura 61. Resultados de la prueba de funcionalización de superficies de sensado con múltiples condiciones de proteína inmovilizadora A/G (flujo del Ab en PBS).. | 65 |
| Figura 62. Resultados de la prueba de funcionalización de superficies de sensado con múltiples condiciones de proteína inmovilizadora A/G (flujo del Ab en MES).. | 66 |
| Figura 63. Resultado de biosensado de BSA en múltiples chips en serie con múltiples condiciones de biofuncionalización mediante anti-BSA inmovilizado con A/G..... | 67 |
| Figura 64. Resultados de prueba de sensado de BSA en MES con múltiples funcionalizaciones..... | 68 |
| Figura 65. Resultados de experimento de sensado de BSA en MES. (a): desplazamiento por cambio MES – BSA 1 µg/ml. (b): desplazamiento por cambio MES – BSA 10 µg/ml | 69 |
| Figura 66. Barra con menús desplegables | 89 |
| Figura 67. Menú desplegado de captura de espectros..... | 89 |
| Figura 68. Menú desplegado de configuración de motor | 89 |
| Figura 69. Menú desplegado de configuración de experimentos..... | 90 |
| Figura 70. Indicador de códigos de errores | 90 |
| Figura 71. Ventana de información de estados y acciones..... | 90 |
| Figura 72. Ventana con interfaz auxiliar para configuración adicional del motor . | 91 |
| Figura 73. Ventana con interfaz auxiliar para configuración de guardado de espectros | 91 |
| Figura 74. Ventana con interfaz auxiliar para configuración de guardado de espectros de los experimentos | 92 |
| Figura 75. Ventana con interfaz auxiliar para renombrar los sensores..... | 92 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Resultados de sensibilidad obtenidos en la prueba de cambio de índice de refracción | 61 |
| Tabla 2. Resultados de límite de detección tras la prueba de cambio de índice de refracción..... | 62 |
| Tabla 3. Resultados de velocidad de respuesta tras la prueba de cambio de índice de refracción..... | 63 |
| Tabla 4. Planificación experimento de optimización de inmovilización de anticuerpos con A/G..... | 64 |
| Tabla 5. Planificación experimento de optimización de biofuncionalización de una superficie porosa mediante inmovilizaciones de anticuerpos y AGp en múltiples condiciones. Sensado de BSA diluida en PBS. | 66 |
| Tabla 6. Planificación experimento sensado de BSA en una superficie porosa con múltiples condiciones de biofuncionalización. BSA diluida en MES..... | 68 |
| Tabla 7. Resultados de desplazamientos parciales para cada concentración (1 y 10 µg/ml BSA) y totales para cada sensor..... | 70 |
| Tabla 8. Coste mano de obra desglosado y total..... | 80 |
| Tabla 9. Coste maquinaria desglosado y total | 81 |
| Tabla 10. Coste materiales desglosado y total..... | 82 |
| Tabla 11. Coste de ejecución material | 83 |
| Tabla 12. Coste de ejecución por contrata | 84 |
| Tabla 13. Coste total del proyecto | 84 |
| Tabla 14. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible. | 94 |

MEMORIA

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Los sensores potencian la capacidad humana de interactuar con el entorno, con el fin de concebir nuevas herramientas que hagan nuestras vidas mejores, más fáciles y seguras. Están diseñados principalmente para explotar mecanismos de transducción mecánica, física, química, óptica o electromagnética con el fin de identificar y cuantificar analitos específicos como proteínas, anticuerpos, ADN/ARN, patógenos o contaminantes de interés en una amplia gama de campos como la atención médica, monitorización ambiental, control de alimentos, desarrollo de medicamentos, entre muchos otros.

Los sensores ópticos, más concretamente, poseen propiedades que los diferencian del resto:

- Gran sensibilidad
- Alto nivel de miniaturización
- Resultados en tiempo real
- Bajo volumen de muestras y reactivos
- Detección sin etiquetas
- Robustez frente a interferencias magnéticas

El mecanismo principal de estos dispositivos es medir los cambios producidos en una señal óptica cuando los cambios en el índice de refracción se dan por la presencia de sustancias o analitos a detectar en el entorno del sensor. Esto significa que se pueden dar cambios en la señal óptica no relacionados con la aparición de las partículas diana que interesan. Estas interferencias limitan el rendimiento de la estructura de sensado. Para reducir este efecto y maximizar la interacción entre la luz y la sustancia a detectar o cuantificar se deben implementar estructuras ópticas con propiedades especiales capaces de aprovechar al máximo la luz de la señal de entrada.

Más concretamente en el ámbito de los sensores ópticos, un nanobiosensor es un dispositivo que combina tecnología nanométrica con técnicas de detección biológica para detectar y analizar biomoléculas a escala nanométrica. Estos dispositivos utilizan estructuras nanométricas, como guías, nanotubos, nanopartículas, nanohilos o nanofibras, como componentes clave en su diseño. (Martínez-Pérez et al., 2020)

A continuación, se explica el funcionamiento de dos tipos de sensores ópticos basados en estructuras nanométricas muy utilizados: los de guías de onda, que son un subtipo de sensores de campo evanescente, y los basados en capas porosas. Además, se destacarán las ventajas específicas de los sensores de capas porosas, que han llevado a su elección para este proyecto.

1. SENSORES BASADOS EN CAPAS POROSAS FRENTE A SENSORES DE CAMPO EVANESCENTE

Los sensores de guías de onda son un tipo de sensores de campo evanescente. Esto significa que funcionan mediante la generación de un campo evanescente, una onda electromagnética que se extiende ligeramente fuera de la superficie de la guía de onda. Este campo es extremadamente sensible a los cambios en el índice de refracción del entorno cercano, permitiendo la detección de moléculas presentes cerca de la guía.

La superficie de la guía de onda puede funcionalizarse con moléculas de bioreconocimiento que son específicas a ciertos analitos que interactúan con el campo evanescente [Figura 1], alterando su índice de refracción. Estas alteraciones modifican la constante de propagación de la onda, lo que se traducirá en un cambio en la fase de la onda tras propagarse por la guía. Como ese cambio es complicado de medir, lo que se suele hacer es crear algún tipo de estructura con esas guías capaz de convertir el cambio de fase en un cambio de amplitud de la señal, más sencillo de identificar. El espectro de la luz propagada a través de la guía puede ser analizada por un espectrómetro para identificar y cuantificar las sustancias presentes.

Los sensores de campo evanescente destacan por su alta sensibilidad y capacidad de proporcionar resultados en tiempo real. Sin embargo, están limitados a este pequeño campo evanescente, produciendo como resultado una baja sensibilidad y una superficie de funcionalización reducida, en caso de llevar a cabo detección de biomoléculas específicas. (Chamorro-Garcia & Merkoçi, 2016)

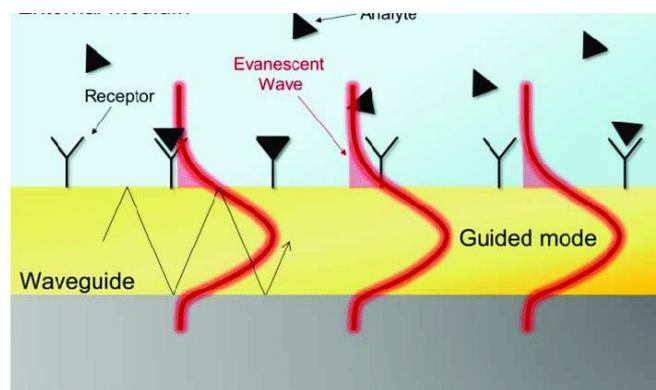


Figura 1. Diagrama del funcionalización y reconocimiento de un sensor de campo evanescente basado en guías de luz. (Soler, 2015)

Por otro lado, los materiales porosos ofrecen una opción muy interesante en la construcción de estructuras de sensado en sensores ópticos. El uso de este tipo de estructuras nanométricas ha crecido considerablemente a lo largo de los últimos años.

En comparación con los sensores mencionados anteriormente, los sensores basados en capas porosas no dependen del campo evanescente, sino que utilizan materiales porosos que permiten que la sustancia diana penetre directamente en la estructura de detección; incrementando la cantidad de analito que interactúa con la señal óptica ya que no únicamente lo hace con la superficie externa. Como consecuencia se logra un aumento considerable de la sensibilidad. A mayor porosidad se logrará una mayor sensibilidad, ya que hay un mayor volumen de la estructura en el que la sustancia de interés puede penetrar, pero se deberá

tener en cuenta la estabilidad estructural. Es por esto por lo que no se deben utilizar valores de porosidad extremadamente elevados.

Además, la arquitectura porosa de estos materiales permite aumentar la superficie específica disponible para funcionalización con elementos de bioreconocimiento que logren detectar la presencia de la molécula diana, maximizando el número de interacciones de sentido específicas que pueden detectarse, como se puede observar en la Figura 2.

La relación superficie-volumen, además de depender de la porosidad, es inversamente proporcional al tamaño de poro. Por tanto, una estructura con poros más pequeños resulta más interesante a la hora de realizar pruebas de biosensado, sin dejar de tener en cuenta que deberemos tener un tamaño de poro mínimo que permita a las moléculas o los analitos entrar dentro del mismo.

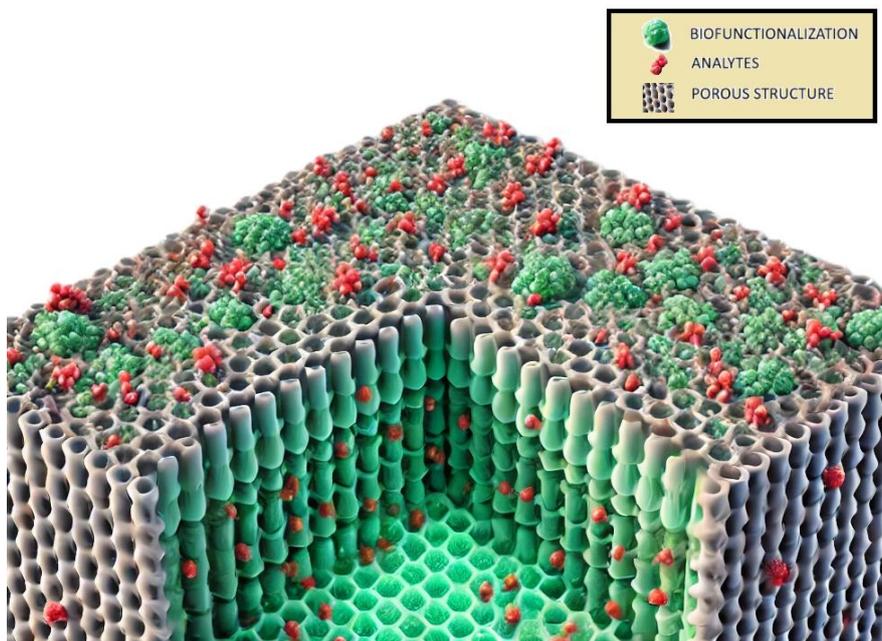


Figura 2. Superficie externa e interna de una estructura porosa biofuncionalizada para el reconocimiento de un analito específico.

2. PRINCIPIO FÍSICO: INTERFEROMETRÍA FABRY-PEROT

La respuesta interferométrica de Fabry-Pérot es un fenómeno óptico que se utiliza en estos tipos de sensores ópticos para medir cambios en el índice de refracción. En nuestro caso, se van a utilizar estos cambios en la estructura porosa medida como indicadores de presencia de sustancias diana y se medirán gracias a este principio.

El interferómetro de Fabry-Pérot consiste en dos superficies reflectantes paralelas separadas por una distancia fija, formando una cavidad resonante. Cuando la luz incide sobre esta cavidad, parte de la luz se refleja entre las dos superficies múltiples veces antes de salir. Las múltiples reflexiones dan lugar a interferencias constructivas y destructivas, creando un patrón de interferencia característico. Véase la Figura 3.

- **Interferencia Constructiva:** Ocurre cuando la diferencia de camino óptico entre las ondas reflejadas es un múltiplo entero de la longitud de onda de la luz, lo que refuerza la intensidad de la luz transmitida o reflejada.
- **Interferencia Destructiva:** Ocurre cuando la diferencia de camino óptico es un múltiplo impar de la mitad de la longitud de onda, lo que reduce la intensidad de la luz transmitida o reflejada.

La condición de interferencia depende de la longitud de la cavidad (d), el índice de refracción del medio dentro de la cavidad (n) y la longitud de onda de la luz incidente (λ).

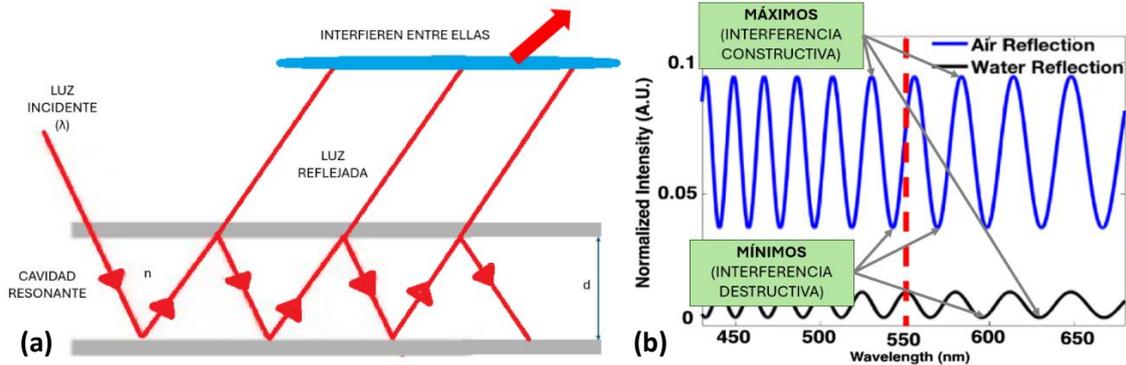


Figura 3. (a): Cavity de Fabry-Pérot con onda de luz incidente e interferencia de ondas reflejada. (b): espectro de cavity de Fabry-Pérot (Jauregui-Vazquez et al., 2021)

La cavity resonante se forma a partir de las estructuras nanométricas mencionadas anteriormente: una capa con propiedades que permitan que los analitos o las moléculas penetren y modifiquen el índice de refracción efectivo de la región, lo que producirá desplazamientos del espectro en el rango de longitudes de onda de trabajo. Se medirán estos desplazamientos espectrales para detectar la presencia y concentración del analito.

Este principio nos permite utilizar las capas porosas como estructuras nanométricas en sensores ópticos, que hacen la función de cavidades resonantes. Se ilumina el material con una fuente de luz mientras se fluye una disolución con analitos o moléculas diana y se miden los cambios en el índice de refracción que va a producir la presencia de la sustancia a detectar. Fundamentalmente encontraremos dos tipos de pruebas.

2.1. CUANTIFICACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE SUSTANCIAS

Con una concentración de soluto en el medio poroso mayor, aumentará el índice de refracción del medio poroso. Este aumento producirá un desplazamiento del espectro de reflectividad captado por el espectrómetro hacia longitudes de onda mayores: este desplazamiento será medido mediante el seguimiento de la posición de los lóbulos espectrales, tanto máximos como mínimos. Con los resultados de la prueba realizada tendremos el cambio de longitudes de onda que ha sufrido el espectro de reflectividad a lo largo del tiempo: gráfico desplazamiento-tiempo, como en el caso de la Figura 4. En este caso se debe tener en cuenta que no puede haber otras sustancias en la disolución, de lo contrario el desplazamiento espectral se vería alterado por su presencia y sí sería necesario hacer la superficie específica para el soluto cuya concentración deseamos conocer.

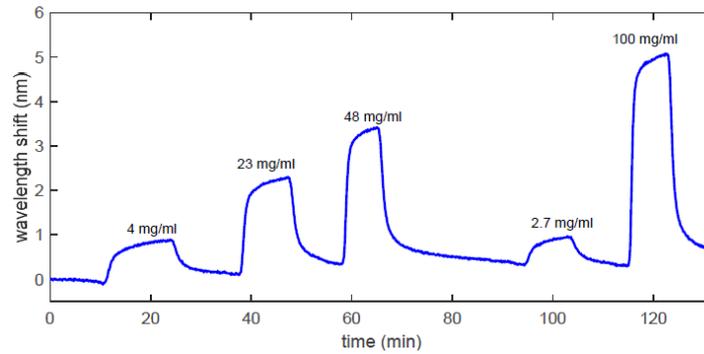


Figura 4. Desplazamiento espectral del máximo de interferencia del espectro de reflexión ubicado en 620 cuando fluyen concentraciones seleccionadas de glucosa en DIW (Deionized Water). (Ortiz De Zárate et al., 2022)

2.2. DETECCIÓN DE BIOMOLÉCULAS ESPECÍFICAS

Este tipo de pruebas nos permiten determinar la presencia de un analito específico en una disolución. Para llevarlas a cabo es necesaria la actuación de un biorreceptor específico de la molécula diana. Esto se consigue biofuncionalizando la zona de sensado para favorecer la unión del analito; por ejemplo, aprovechando la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo.

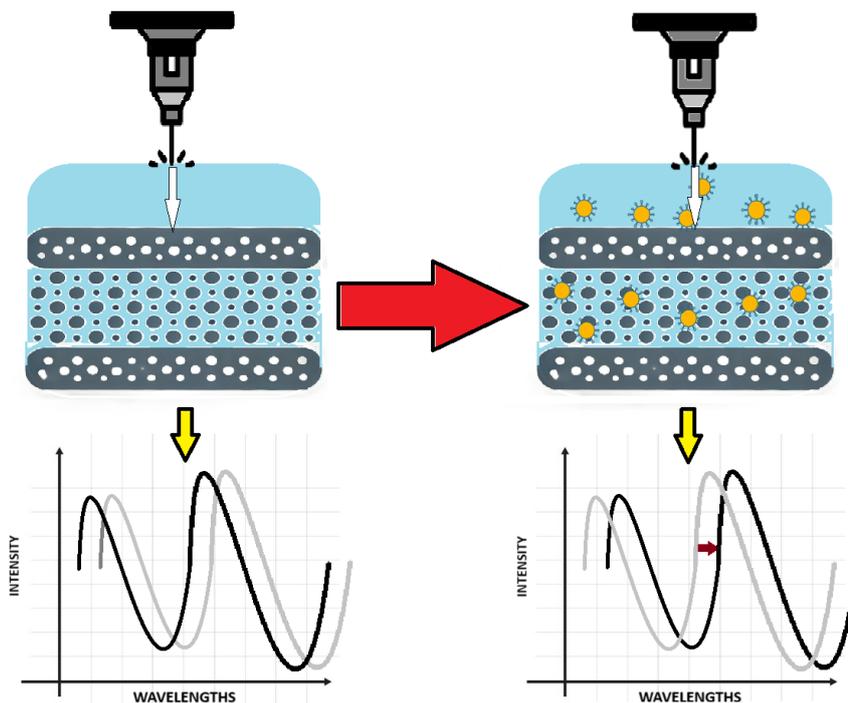


Figura 5. Desplazamiento hacia longitudes de onda mayores del espectro de reflectividad de la estructura porosa por adsorción de analitos a la superficie.

Para la detección de analitos específicos se hace servir la especificidad proporcionada por la unión antígeno-anticuerpo. Primero, se deberán colocar biorreceptores en la superficie de la muestra (p.ej. anticuerpos) y posteriormente fluir la disolución con el analito, que gracias a la especificidad con el biorreceptor quedará unido. En el caso de utilizar anticuerpos como

biorreceptores, la interacción tiene lugar entre la región de unión a antígenos del anticuerpo (Fab) y el epítipo del antígeno, como aparece en la Figura 6. Para que la interacción se dé correctamente es necesaria una orientación adecuada del anticuerpo a la superficie porosa. La región Fab debe quedar libre por lo que es la región constante (Fc) la que se tendrá que unir a la capa. Aunque exista especificidad, si no hay una correcta orientación del anticuerpo no se unirán los antígenos. Muchas veces para favorecer este fenómeno se utilizan proteínas intermedias, que se adsorben a la superficie nanométrica y unen la región Fc del anticuerpo a esta, exponiendo así la región Fab.

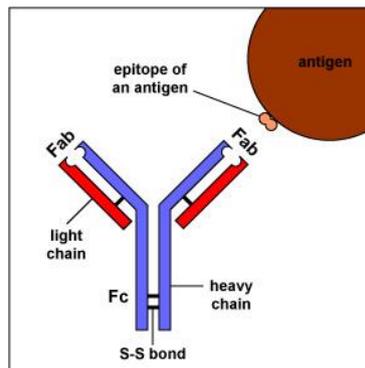


Figura 6. Unión antígeno-anticuerpo. (Kaiser, 2022)

Por tanto, para la fase de biofuncionalización, o bien se fluye una concentración con el anticuerpo (biorreceptor) por la celda de medida o se incuba directamente sobre la superficie de sensado. Si se utiliza una proteína intermedia para una mejor orientación del biorreceptor en la superficie, se realizará también uno de estos procedimientos; pero de forma previa a la biofuncionalización. Para la biodetección, se fluye la muestra de interés. Esta será la disolución en la cual queremos detectar la presencia de una determinada sustancia (específica del anticuerpo unido a la superficie). Si contiene la proteína específica quedará unida a la región Fab del biorreceptor y se podrá observar un progresivo aumento del índice de refracción como consecuencia de la acumulación de antígeno en la capa porosa, tal y como se representaba en la Figura 5. El aumento será progresivo debido al flujo y a los biorreceptores: llega el analito a la superficie de medida y se une a los anticuerpos, quedándose en la capa. Se van acumulando hasta que no quedan anticuerpos libres, saturando la superficie. Cuando ocurra esto, el índice de refracción dejará de aumentar.

Sin la presencia de los biosensores específicos del analito no se podría observar este aumento. Es destacable, por tanto, la realización de otra prueba con las mismas condiciones, pero omitiendo el flujo del anticuerpo a modo de medida de control.

3. CAPAS MESOPOROSAS DE TiO₂: PROPIEDADES, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

En este caso, para el proyecto se ha trabajado con estructuras de sensado fabricadas en óxido de titanio (TiO₂) poroso. Con estas se superan algunos inconvenientes que presentan otras capas porosas que representan el estado del arte. Por ejemplo, las de silicio poroso (pSi) o de óxido de aluminio anódico (AAO), obtenidas mediante técnicas de fabricación top-down. En este caso, el material inicial se anodiza con la aplicación de una corriente eléctrica en una

disolución ácida. Con este proceso se crean estructuras porosas, aunque con ciertas limitaciones:

- **Baja interconectividad:** la consecuencia es una estructura porosa difícil de llenar con el líquido de la muestra, reduciendo la difusión de la sustancia diana y bajando considerablemente el rendimiento del sensor.
- **Heterogeneidades en propiedades estructurales:** dificulta obtener una distribución de densidad de corriente homogénea a lo largo de la superficie del sustrato.
- **Limitaciones en la producción:** La fabricación generalmente se realiza sobre sustratos de dimensiones reducidas (alrededor de unos pocos centímetros cuadrados) y se lleva a cabo de manera individual. Esta metodología incrementa la variabilidad entre muestras y complica la producción en masa de chips porosos.

Las técnicas bottom-up para la fabricación de sustratos porosos buscan acabar con estos inconvenientes. Es por ello por lo que se han empleado para este TFG sensores con estructuras porosas de TiO₂ creadas con técnicas de bottom-up, las cuales permiten obtener capas mesoporosas con un alto nivel de homogeneidad e interconectividad ideal para el uso de ellas como biosensores. Se crean así poros de tamaño en el rango mesoporoso: entre 2 y 50 nm.

La elaboración de capas mesoporosas TiO₂ mediante técnicas bottom-up, para el desarrollo de sensores ópticos basados en interferometría Fabry-Pérot, es un proceso que implica la preparación de un sol de TiO₂ mediante la hidrólisis de TTIP en una mezcla ácida con 1-butanol, ácido clorhídrico y agua, junto con el copolímero P123 como agente estructural para poros más grandes. Se preparan dos soluciones separadas de TTIP con ácido clorhídrico y P123 con 1-butanol y se mezclan. Los sustratos de silicio sobre los que se crearán las capas porosas se limpian y se recubren con el sol mediante un "*spin coater*". Tras un proceso de envejecimiento, se lleva a cabo un tratamiento térmico para formar capas mesoporosas, eliminando el *template* orgánico y mejorando la resistencia mecánica y térmica.

Una vez fabricadas las capas porosas es necesario llevar a cabo su caracterización, donde se analizan diferentes propiedades tales como el espesor, la naturaleza de los poros, la homogeneidad, entre otros. El objetivo de este paso es garantizar que se cumplen las características esperadas en las estructuras fabricadas. (Ortiz De Zárate et al., 2021)

4. PROCESO DE MEDIDA "PREVIO"

A continuación, se explicará el proceso de medida actual que se utiliza en el Instituto Universitario de Tecnología Nanofotónica para la detección de biomoléculas específicas en los sensores ópticos basados en capas mesoporosas de TiO₂.

Es un proceso en tiempo real y en disolución; es decir, cada prueba tiene lugar mientras se fluye un líquido a través de las capas porosas para que, en caso de contener la sustancias a detectar, sean capaces de interactuar con la estructura nanométrica.

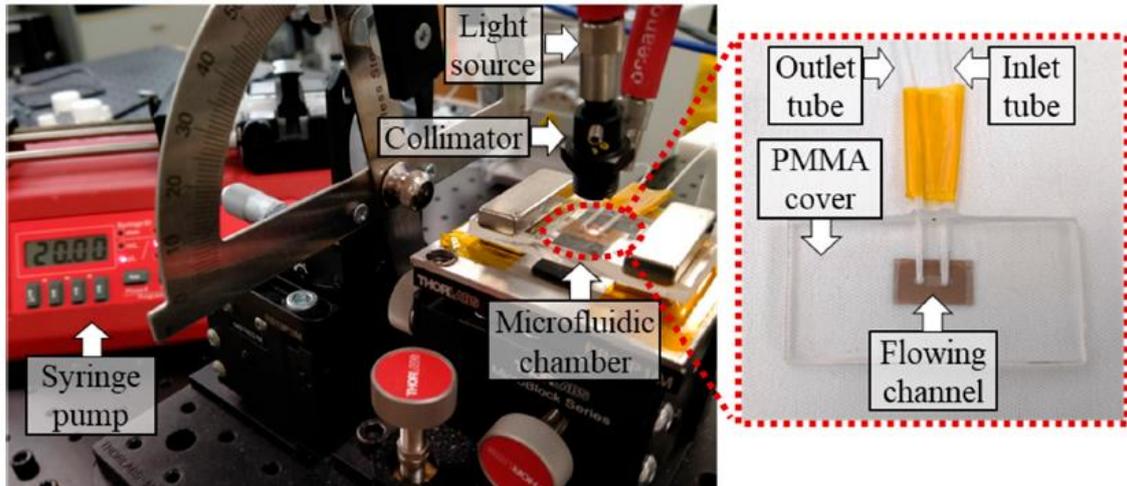


Figura 7. Set-up óptico y cámara de microfluídica empleada para las mediciones ópticas. (Martínez-Pérez et al., 2020)

Se pueden observar las partes que conforman el set-up utilizado para la interrogación de los sensores en la Figura 7. La plataforma de medida cuenta con una fuente de luz, conectada mediante una fibra óptica a un colimador. Otra fibra óptica se conecta al espectrómetro que recogerá la luz reflejada. Estas dos fibras se sitúan apuntando a la muestra a medir: el haz de luz iluminándola y la fibra del espectrómetro recogiendo la luz reflejada para almacenar los espectros durante el experimento. Pueden formar un ángulo determinado prefijado con un goniómetro como el caso de la Figura 8 (a) o estar integradas en una misma fibra, como es el caso de la Figura 8 (b).

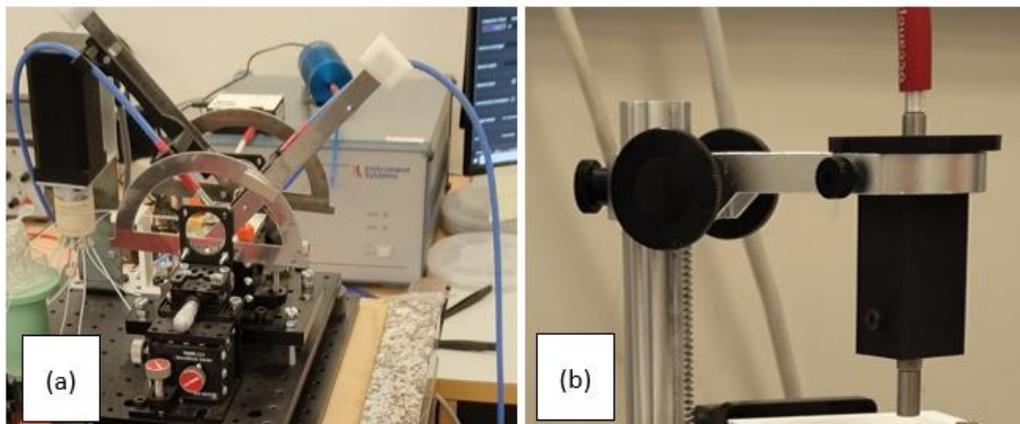


Figura 8. Orientación de fibras a la estructura de sensado. (a): Fibra emisora de luz y fibra receptora. (b): Fibra bifurcada perpendicular a la superficie

El sensor se fija a una plataforma con la máxima estabilidad posible y donde se crea una cámara de microfluídica que tendrá un canal de entrada, que se introducirá en un Eppendorf con la disolución a fluir, y uno de salida conectado a una bomba de jeringa succionando para que el líquido atravesase la zona de sensado. La apariencia final de esta estructura se observa en la Figura 7.

Mediante la aplicación de espectroscopía OceanView proporcionada con el propio espectrómetro se ajustan ciertos parámetros de adquisición, preprocesado y almacenamiento de los datos que recoge el espectrómetro; se captan los espectros y se guardan en el equipo.

Durante el experimento, se fluyen las distintas disoluciones de sensado, de caracterización o de control al tiempo que se van registrando y guardando espectros.

Una vez concluida la prueba, se lleva a cabo el procesado de los datos, esto conlleva la extracción de los parámetros mediante algún entorno de programación (como MATLAB) que nos permitirán medir la variación del índice de refracción, por lo que hasta que no se realice este procesado no se podrán visualizar los resultados. Se extraen las posiciones de los lóbulos espectrales de los ficheros (con los espectros) que el software OceanView ha ido almacenado en el equipo a lo largo de la prueba, de forma que se realice un seguimiento de los desplazamientos que se han dado en el espectro, excelente indicador de los cambios del índice de refracción. Cuando concluya el procesado ya se podrán visualizar los gráficos desplazamiento-tiempo.

5. LIMITACIONES DEL PROCESO Y PROPUESTAS DE MEJORA

Estudios han demostrado la eficacia tanto de las capas porosas de TiO_2 como del interferómetro Fabry-Pérot como principio físico de este tipo de biosensores ópticos. Además, se ha probado la capacidad de detectar la presencia específica de ciertos analitos diana en medio acuoso con una adecuada biofuncionalización y su aplicación como medidor de concentración de un soluto, en concreto la glucosa. (Ortiz De Zárate et al., 2022)

El método de interrogación, sin embargo, presenta ciertas limitaciones. La larga duración de las pruebas dificulta la realización de múltiples medidas debido a la gran cantidad de tiempo necesario. Esto supone un problema ya que para sacar conclusiones robustas donde se demuestre reproducibilidad se debe repetir el experimento en numerosas ocasiones. De la misma forma, las pruebas de detección de biomoléculas diana necesitan una medida de control para contrastar la acción que produce el biorreceptor con otro caso en el que no se incorpora. Estas dos necesidades hacen que surja la idea de medir con varios sensores a la vez. Esto permitiría llevar a cabo biodetección multiplexada con la biofuncionalización de varios sensores con diferentes biorreceptores.

Además, el procedimiento está poco integrado. La adquisición y preprocesado de los espectros se realiza en un software (OceanView); mientras que el postprocesado y visualización se realiza en otro (MATLAB) sin ningún tipo de interoperabilidad entre ellos. Aunque sea una medida en tiempo real, el hecho de que no se procesen los datos hasta que se concluye el experimento impide una visualización en vivo de los resultados. Implementar esta función podría ayudar a modo de 'vista previa' para controlar en cada momento cómo está funcionando la prueba.

Por estas razones, en el presente trabajo se va a diseñar y desarrollar un sistema alternativo de bajo coste para la interrogación de sensores ópticos basados en capas porosas de TiO_2 . Va a tener como misión la integración del procedimiento de medida en un único software de control y en una única plataforma que compacte los componentes donde se den todos los procesos necesarios: adquisición, preprocesado, procesado, postprocesado y visualización de resultados en tiempo real. Además, va a incorporar la opción de medida de sensores de forma multiplexada. El sistema va a tener la posibilidad de fluir disoluciones por distintas estructuras y captar los respectivos espectros en paralelo. Para esta función, se va a controlar un motor que sitúe los diferentes sensores debajo del haz de luz al tiempo que se capturan espectros. Esto reducirá el número de experimentos requeridos para llevar a cabo un estudio, permitiendo la toma de varias medidas simultáneamente.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN

Principalmente, la razón por la que quise hacer este proyecto fueron unas prácticas extracurriculares que hice el año pasado en el Instituto Universitario de Tecnologías Nanofotónicas, durante las cuales trabajé con el entorno de medición descrito en el capítulo 1 para interrogar los sensores de los que se habla.

En ellas, con la ayuda de Jaime García Rupérez, tutor del presente trabajo, y Salvador Ponce Alcántara viví experiencias de lo que es trabajar en un laboratorio de biofotónica realizando experimentos, procesando y analizando resultados. Aquí me encontré por primera vez con el set-up de medida para interrogar los sensores fotónicos. Desde el inicio, me fascinó la precisión y la tecnología avanzada involucrada. Al completar esas prácticas, me dio la impresión de que era un mundo con el que me sentía realizado. Además, estaba especialmente interesado en las aplicaciones que esos sensores fotónicos podrían tener en el campo médico como herramientas de diagnóstico.

Identifiqué varias limitaciones en el método de sensado utilizado, lo que me llevó a pensar en posibles mejoras. La oportunidad de contribuir a superar estos desafíos se convirtió en una fuerte motivación personal y la posibilidad de innovar y mejorar la tecnología existente y el potencial de la tecnología en el ámbito médico, como fuente de ilusión para un futuro ingeniero biomédico, fueron algunas de las razones clave por las que decidí embarcarme en este Trabajo Fin de Grado. Como viví de primera mano las deficiencias de la estrategia que se estaba siguiendo en los experimentos de sensado y las limitaciones con las que contaba el set-up de medida, cuando se me presentó la oportunidad de trabajar en mi proyecto para desarrollar una plataforma para realizar pruebas con este tipo de sensores de una forma más efectiva, no lo pensé dos veces.

Sabía que trabajar en este proyecto no solo me permitiría profundizar en un área que me apasiona, sino que también me daría la posibilidad de sentir que lo que hacía podría aportar una contribución significativa a la comunidad científica. Cada paso en este camino ha sido impulsado por la curiosidad, el aprendizaje continuo y el deseo de avanzar en el ámbito personal y profesional como ingeniero biomédico.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

1. GENERALES

En el presente trabajo de fin de grado se han definido los siguientes objetivos generales:

- Desarrollar un sistema de medida multiplexada de sensores ópticos que integre los procesos y permita la visualización de resultados en tiempo real.
- Llevar a la práctica real el sistema creado con la realización de distintas pruebas experimentales.

2. ESPECÍFICOS

Mediante la creación del nuevo sistema de interrogación de sensores y los experimentos que se llevarán a cabo con este se han definido los siguientes objetivos específicos:

1. Controlar de forma precisa el motor para posicionar correctamente los sensores debajo del haz de luz.
2. Controlar la captura de espectros y otros parámetros del espectrómetro desde el software de control.
3. Coordinar el movimiento del motor y la captura de espectros para medir correctamente en cada sensor.
4. Validación del sistema para conocer el alcance de las mejoras conseguidas y analizar las posibles limitaciones introducidas.
5. Medir el rendimiento del sistema en pruebas de cambio de índice de refracción con el flujo de disoluciones a diferentes concentraciones.
6. Llevar a la práctica el set-up de medida con pruebas de biodetección de proteínas para evaluar la calidad del sistema en este tipo de experimentos con mayor potencial de aplicación clínica.

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de un sistema de medidas alternativo conlleva la creación tanto de una plataforma con los componentes de hardware necesarios como la de un software de control general del sistema que permita realizar las acciones de una forma controlada y coordinada.

En este capítulo se van a detallar las herramientas utilizadas para la fabricación del sistema de medida de múltiples sensores, tanto para la construcción de la plataforma, como para la programación del software de control del set-up como para el sistema de flujo. Además, se explicará ampliamente su proceso de diseño y desarrollo. Finalmente, se va a indicar la planificación que se ha seguido para llevar a cabo las pruebas de validación del proyecto.

1. PROCESO DE FABRICACIÓN DE LA PLATAFORMA DE MEDIDA

El set-up se situará sobre una base en la que se integren todos sus componentes. Estará inspirado en el sistema tradicional especificado en el capítulo 2 (apartado Proceso de medida “previo”) incluyendo los componentes básicos: fuente de luz, espectrómetro, fibras ópticas y base de sujeción de muestras.

Como el sistema es de multiplexado y se busca abaratar el coste, se fabricará únicamente con un espectrómetro, una fibra y una fuente de luz. Para ello se van a recorrer, con un motor paso a paso, las diferentes estructuras de sensado ya que, si se multiplicara el número de componentes por muestras en la prueba, el coste del set-up se dispararía. El motor, unido a un eje lineal de traslación, permitirá tomar medidas en multiplexado incorporando a una plataforma móvil los sensores y situando periódicamente la fibra en cada uno con movimientos controlados de motor. De esta forma, en un ciclo se capturarán espectros de todos los sensores.

Como consecuencia, se tienen que añadir más componentes a la plataforma: motor paso a paso, Arduino y un circuito electrónico que incluirá componentes como un controlador del motor, amplificador de corriente o sensores ópticos de final de carrera que permitan generar un eje de coordenadas en la guía lineal. El esquema del sistema se representa en la Figura 9.

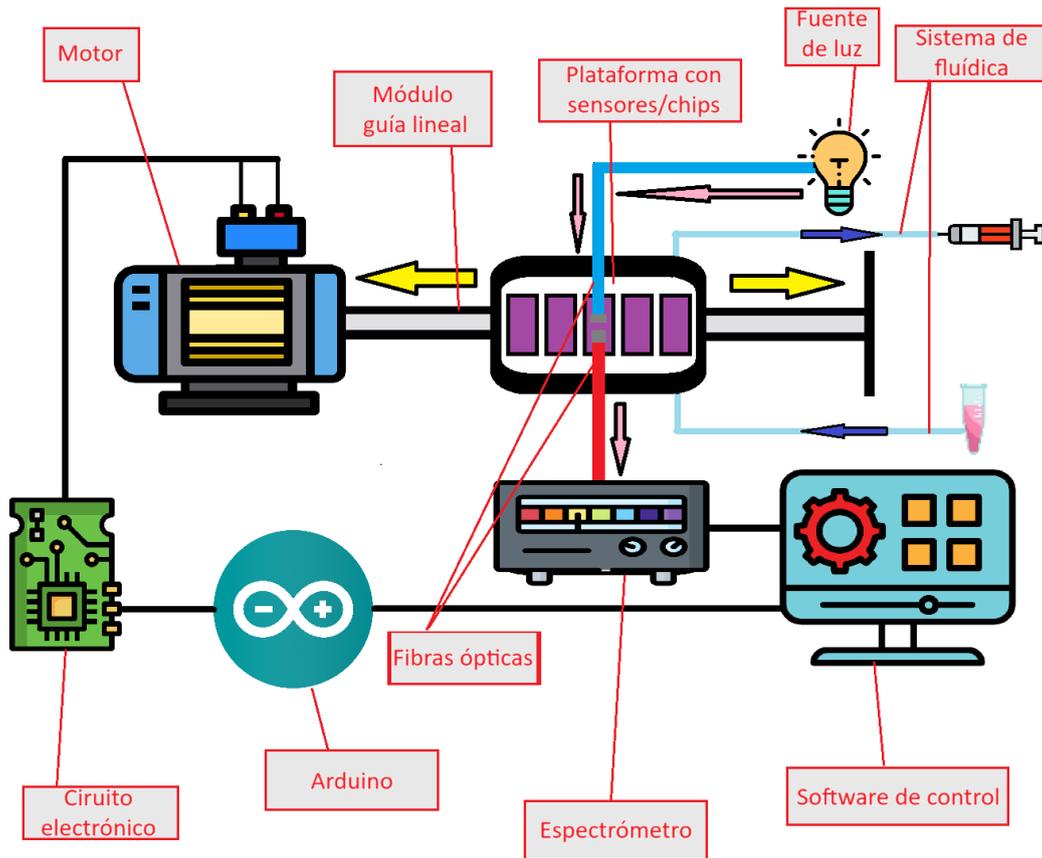


Figura 9. Esquema del sistema de interrogación de sensores ópticos a desarrollar.

1.1. COMPONENTES DE LA PLATAFORMA

Para el caso de la plataforma, se han utilizado los siguientes materiales:

- Los diferentes componentes del set-up se sitúan sobre una base de policarbonato con una configuración de agujeros para fijarlos de forma sencilla y robusta atornillándose a la base. La placa ha sido fabricada mediante un equipo de mecanizado CNC (control numérico computarizado), considerando la inclusión de cuatro patas en cada esquina para darle una pequeña altura a la base que permita un mejor atornillado de las piezas.
- La luz elegida para iluminar las muestras será fuente halógena de tungsteno HL-2000-HP de Ocean Insight. La fuente cuenta con un rango de longitudes de onda flexible desde los 350 hasta los 2500 nm. Se alimenta con un voltaje de 12V y se enchufa directamente a la toma de corriente.



Figura 10. Fuente de luz HL-2000-HP. («Tungsten Halogen Light Source», 2024)

- El espectrómetro utilizado es el HR4000 de Ocean Optics. El dispositivo tiene un rango de medida de longitud de onda mucho menor al de la fuente de luz: 550 – 750 nm. Se conecta mediante USB al puerto del ordenador, tanto para la alimentación como para la entrada de los espectros adquiridos al software de control.



Figura 11. *Espectrómetro HR4000. (Spectrometers & Accessories Glossary, 2024)*

- Para transmitir luz entre los diferentes componentes del set-up se emplea una fibra óptica bifurcada donde los extremos que se dividen son los que parten de la fuente y del espectrómetro. El extremo donde las fibras se encuentran en un mismo canal llega a la base donde se situarán las estructuras porosas cuya respuesta espectral es medida, iluminando la zona de medida y recogiendo la luz reflejada por el mismo brazo. Es una fibra bifurcada de Ocean Optics QBIF200-VIR-NIR. Transmite eficientemente luz de longitud de onda entre 400 y 2100 nm.

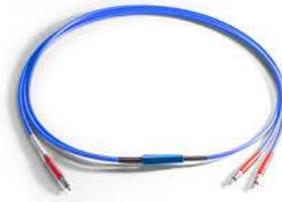


Figura 12. *Fibra óptica bifurcada QBIF200-VIR-NIR. (Spectrometers & Accessories Glossary, s. f.)*

- La base para colocar los sensores donde apunta y mide la fibra óptica es una pieza fabricada mediante impresión 3D con cuatro agujeros para atornillar de forma estable las muestras al motor y que queden fijas en su eje de coordenadas. Además, se ha incorporado a esta una pieza que presiona las muestras contra el borde de la base inmovilizando los sensores durante la prueba.

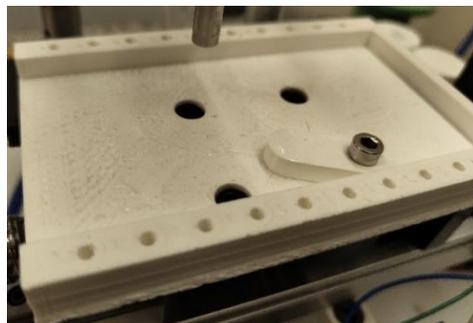


Figura 13. *Plataforma para la colocación y fijación de los sensores.*

- Se emplea un soporte para fijar la fibra bifurcada y que apunte constantemente en la dirección deseada: formando un ángulo de 90° con la base de medidas. La estructura tiene una altura regulable.



Figura 14. Soporte para la fibra óptica. (Bysameyee Soporte de aleación de Aluminio para microscopio Digital USB/Wi-Fi, Montaje de Metal de diámetro Universal con Estuche de Transporte para microscopio : Amazon.es: Industria, empresas y ciencia, 2024)

- Se imprimió una pieza como elemento de soporte para los tubos Eppendorf y colocar más cómodamente los canales del sistema de microfluídica.

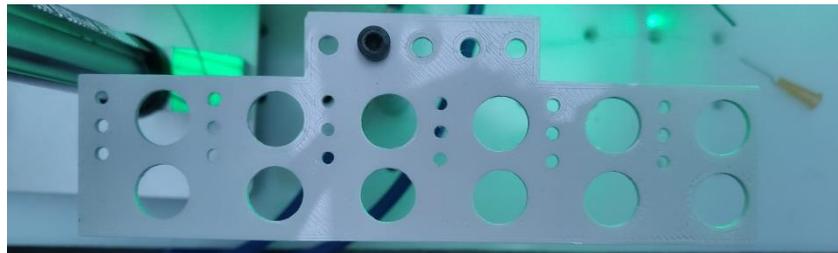


Figura 15. Plancha para el soporte de tubos Eppendorf.

- El motor paso a paso es un NEMA17 unido a una guía lineal para el desplazamiento de una base con aproximadamente 40000 pasos a lo largo del raíl. Cada paso es del orden de micrómetros. Cuenta con un par de pines de alimentación (bipolar) y otro par de entradas digitales que indican la dirección y ordenan dar pasos con la llegada de pulsos.

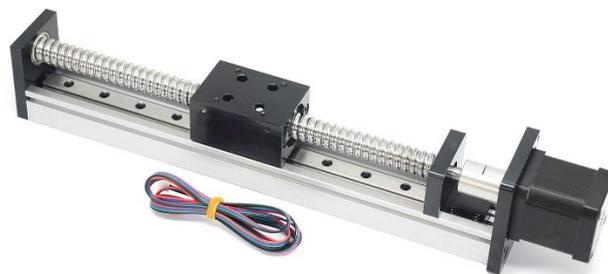


Figura 16. Motor paso a paso NEMA 17 con actuador lineal. (Befenybay - Actuador lineal de viaje con rieles lineales cuadrados con motor paso a paso NEMA17 para piezas de router CNC DIY eje X Y Z : Amazon.es: Industria, empresas y ciencia, s. f.)

- Sensores origen y final de carrera: permiten establecer una parada de seguridad del motor y también introducir coordenadas distintivas a cada posición del motor en el eje de movimiento, siendo el origen la posición 0. Los sensores seleccionados son sensores ópticos integrados en un chip.

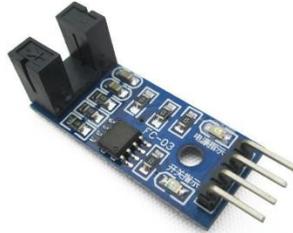


Figura 17. Sensor óptico final de carrera. (Oiyagai 5pcs LM393 Chip Motor Comparador de medición Sensor de Velocidad Módulo de Ranura Tipo de optoacoplador IR para MCU Arduino : Amazon.es: Informática, 2024)

- Controlador del motor. Se utiliza el driver TB6600, un controlador para motores paso a paso bipolares permitiendo controlar motores de hasta 3.5A de corriente. Compatibles con microcontroladores que puedan generar señales de pulso de 5V. Soporta gran variedad de voltajes de entrada: desde 9 hasta 42V. Incluye controles de dirección y de pulso, además puede configurarse para microstepping mediante unos microinterruptores añadidos. El esquema se representa en la Figura 21, junto al resto del circuito electrónico.



Figura 18. Driver TB6600. (COVVY TB6600 4A DC 9-42V controlador de motor paso a paso controlador CNC 32 segmentos 2/4 fase híbrido paso a paso del motor placa del conductor : Amazon.es: Industria, empresas y ciencia, s. f.)

- Se utiliza una placa Arduino Nano (véase la Figura 19). Se trata de una plataforma de creación de electrónica de código abierto basada en hardware y software libre que facilita la creación de proyectos electrónicos interactivos. Más adelante se explicará la parte software, pero en este caso el hardware del Arduino Nano está formado por un microcontrolador donde se ejecuta el código, pines digitales y analógicos de entrada y salida que permiten la conexión con sensores, actuadores y otros componentes electrónicos y una conexión USB para alimentar la placa y cargar programas desde el ordenador. Más específicamente, las Nano son versiones simplificadas de las originales Arduino UNO que durante el desarrollo de pruebas y prototipos también han sido utilizadas. Estas placas empleadas finalmente consumen mucha menos energía y el

espacio que ocupan en la plataforma es mucho más reducido a comparación con estas conservando la mayoría de las funcionalidades del modelo UNO.

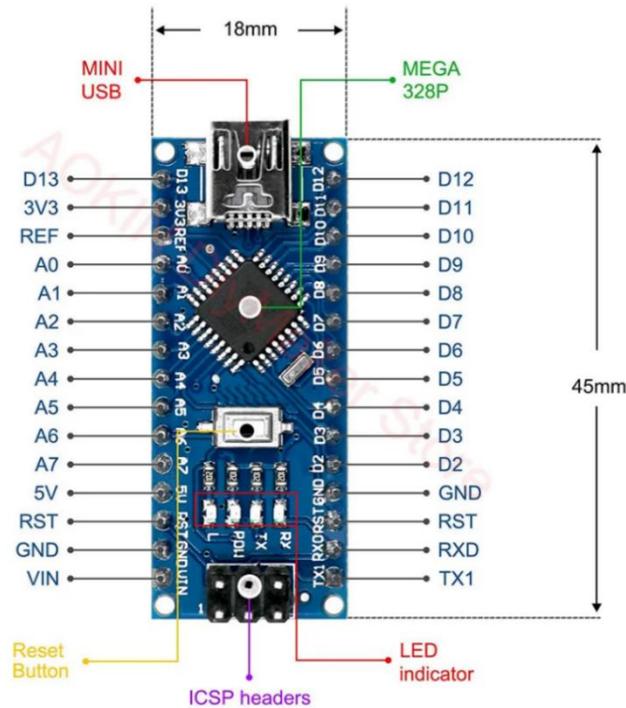


Figura 19. *Arduino NANO con leyenda de los pines.* (Placa de desarrollo Arduino Nano V3.0 ATMEGA328P CH340 MINI USB, nueva - AliExpress 502, s. f.)

- El circuito electrónico ha sido necesario en la plataforma para comunicar y coordinar los componentes electrónicos como el motor, los sensores de inicio y final de carrera, el controlador del motor y el Arduino Nano para combinar los movimientos del motor de forma eficaz con la captura de los espectros por parte del espectrómetro según las órdenes del software de control. El circuito ha sido diseñado en una placa protoboard donde ha sido incorporado el Arduino para poder utilizar los pines mediante conexiones con los componentes del sistema, además se han utilizado numerosos cables tipo DuPont macho-macho o macho-hembra.



Figura 20. *Placa Protoboard y conexiones macho-macho.* (Cables tipo DuPont Macho - Macho (40 cm / 40 unidades) BricoGeek | BricoGeek.com, s. f.; Protoboard placa de 400 pines, s. f.)

- Piezas de unión y anclaje. Se ha necesitado una variedad de tornillos, tuercas, postes, barras y piezas de unión para la fabricación de la plataforma.

1.2. CIRCUITO ELECTRÓNICO

La electrónica de la plataforma de medidas se encarga de comunicar el motor paso a paso con el equipo en el que se mide. Para esto se hacen servir el Arduino Nano y el driver TB6600, explicados en los materiales. También se incluyen en el circuito los mencionados sensores ópticos de inicio y final de carrera.

El esquema de la Figura 21 representa el circuito electrónico diseñado para el sistema. La conexión verde alimenta el driver a 12V que hace de amplificador debido a la alta necesidad de corriente que necesita el motor a comparación de la requerida por el Arduino. Esta placa simplemente se alimenta por el puerto USB del PC y posee un pin de salida con una tensión de 5V que se utiliza para alimentar los sensores ópticos.

Los 5V será la tensión que tendrán los pines digitales en estado alto. En el driver se comparará esta tensión máxima con la que habrá en los pines lógicos y se amplificará, llegando al motor por los bornes de salida *High-voltage*.

Además de las conexiones de masa y de alimentación, el motor cuenta con los pines de dirección y de pasos: cables que llegan al motor marrón y gris claro. El driver amplifica estas señales a partir de las que llegan del Arduino por el cable azul y morado, provenientes de pines lógicos programados para la dirección y pasos que dará el motor. Los otros dos pines utilizados son los que reciben la señal digital de salida de los sensores ópticos de inicio (verde) y final (amarillo) de carrera.

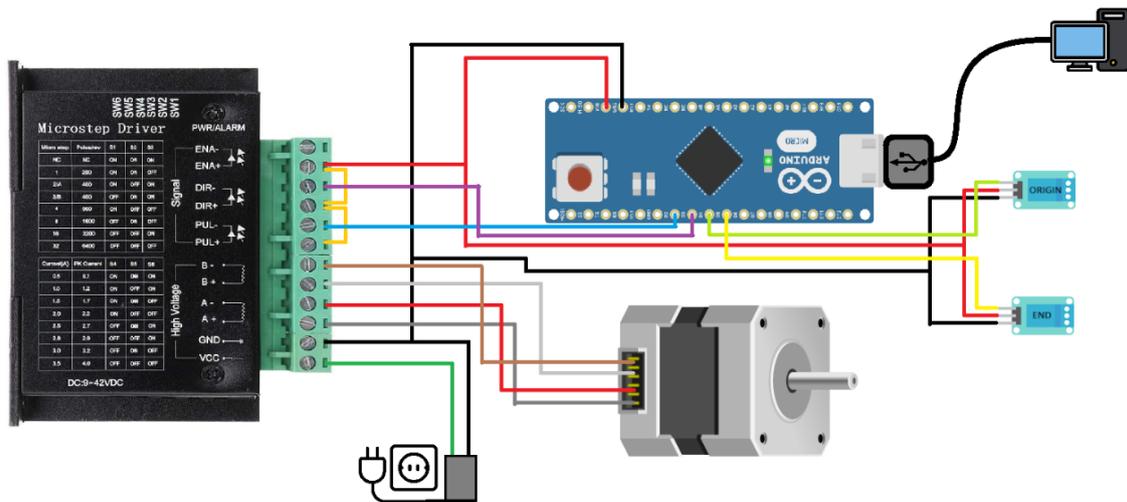


Figura 21. Esquema del circuito electrónico.

En la Figura 22 se muestra cómo se ve el circuito en la plataforma. Para cortocircuitar pines y acoplar el Arduino Nano, se empleó una placa protoboard. Los cables utilizados fueron generalmente pin-pin, aunque se tuvo que emplear algún pin-socket para establecer conexiones con los módulos de los sensores ópticos.

Para alimentar el circuito a la red eléctrica se requirió la soldadura de los pines de alimentación y masa del driver a un adaptador que permitiera establecer conexión entre estos y un conector compatible con una toma de red.

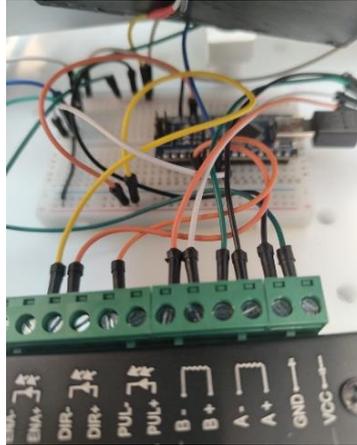


Figura 22. Imagen del circuito electrónico incorporado a la plataforma.

1.3. POSICIONAMIENTO DE PIEZAS EN LA BASE

Encima de la placa como base del set-up se ubicarían los componentes para facilitar el transporte de la plataforma. El espacio debería ser suficiente para: fuente de luz, espectrómetro, driver del motor, base de fibra óptica, circuito electrónico y motor con su correspondiente guía lineal.

Para que el espectrómetro sea capaz de medir las intensidades para cada longitud de onda con las que la muestra refleja la luz, es necesario que se sitúe la fibra óptica suministradora y captadora de luz apuntando al raíl del motor, concretamente a una zona de circulación de la plataforma con los chips.

Para el caso de este trabajo, se utilizará una fibra bifurcada, en lugar de dos independientes para el espectrómetro y fuente de luz. Por tanto, el vector que forme la fibra óptica debe ser normal a la superficie de los sensores para captar, por el mismo canal óptico que se emite la luz, el espectro de la luz reflejada.

El motor de traslación se acopló con 4 tornillos a la base con el apoyo de una pieza impresa en 3D para cada par de tornillos y unos pequeños postes como se aprecia en la Figura 23 (a). En la plataforma móvil del motor se acopló la base de sujeción de sensores, con una pieza para inmovilizarlas (Figura 23 (b)).

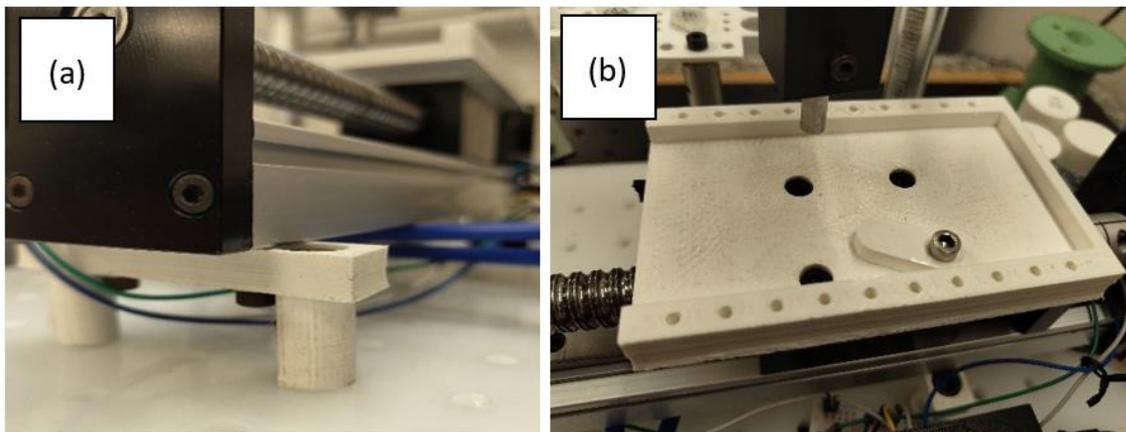


Figura 23. Motor incorporado a la plataforma. (a): piezas de soporte. (b): plataforma móvil.

El holder (soporte), sustentador de la fibra, fue atornillado a la plataforma desde la base en la que se apoya el mástil con el soporte de la fibra, cuya altura es regulable. Esta debe estar en la parte superior de la guía lineal.

Aprovechando esta zona cercana a la celda de medidas, se desarrolló una pequeña región para trabajar con las disoluciones, como aparece en la Figura 24, donde se posicionó la plancha soporte de tubos Eppendorf. El resto de espacio de la región se deja libre ya que está pensado para ubicar la bomba de jeringa y es necesario que pase el canal hacia esta.

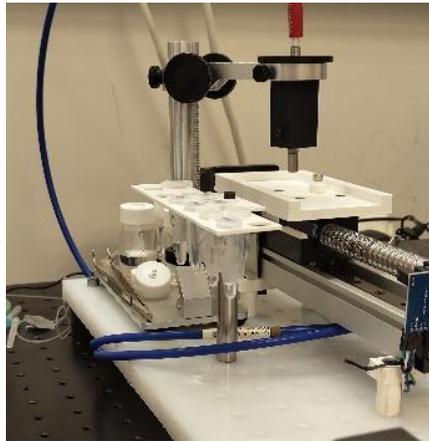


Figura 24. *Región de la plataforma para el manejo de fluidos.*

En el otro costado de la plataforma se colocarán los componentes restantes necesarios para la captura de espectros: la fuente de luz y el espectrómetro. La parte central del set-up se reservó para ubicar el circuito electrónico de la Figura 22, que fue cubierto para esconder el cableado. (véase la Figura 25)

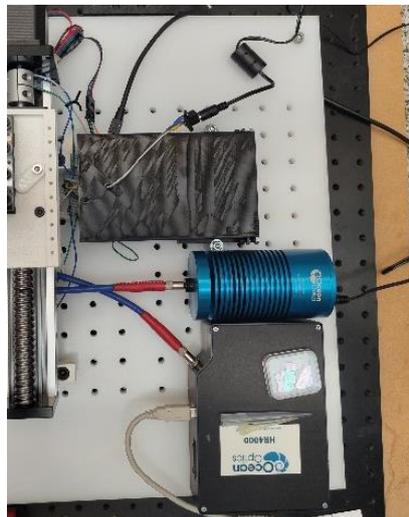


Figura 25. *Región de la plataforma con el hardware de espectroscopía.*

Los sensores ópticos de final e inicio de carrera se pegaron a los extremos de la guía. Se atravesarán con una lengüeta, que se pegó a la plataforma móvil, cuando se lleguen a las posiciones límite (Figura 26 (a)).

Se incorporaron los sensores ópticos de forma que la lengüeta entre en las ranuras. Así se aprecia en la Figura 26 (c) con el sensor de final y en la Figura 26 (b) con el de origen.

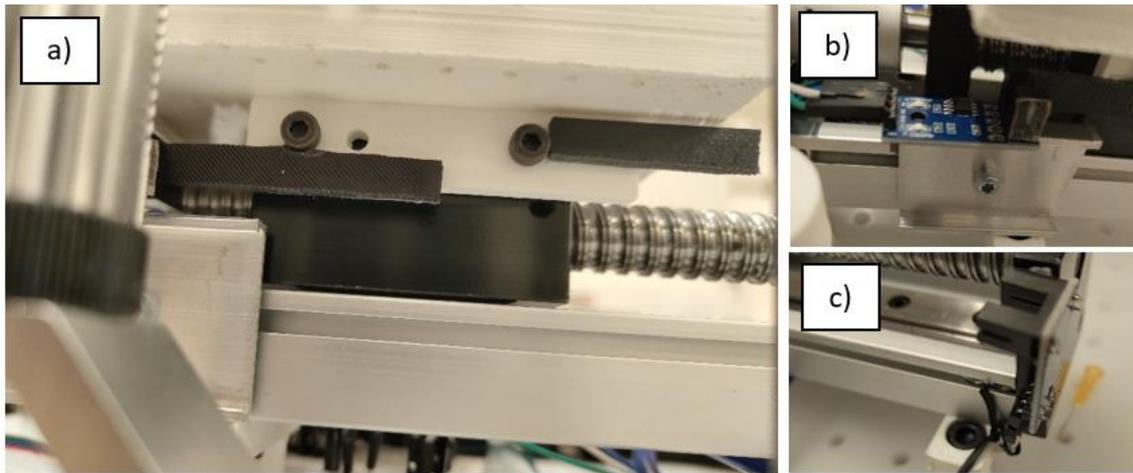


Figura 26. Incorporación de finales de carrera al motor. (a): lengüetas para detección de la plataforma móvil. (b): sensor origen. (c): sensor final.

2. PROCESO DE DESARROLLO DEL SOFTWARE DEL SISTEMA DE MEDIDA

A continuación, se explicarán cada uno de los pasos seguidos para la elaboración de la aplicación de control del sistema de medida multiplexada de biosensores fotónicos basados en capas porosas.

2.1. HERRAMIENTAS EMPLEADAS PARA EL SOFTWARE

Para la programación de la aplicación encargada de configurar las pruebas y recoger y visualizar los resultados se ha tenido que recurrir a un abanico de materiales, fundamentalmente de naturaleza informática. A continuación, se detallan los programas, entornos, librerías y herramientas necesarias para su desarrollo:

- **MATLAB®**, es una de las plataformas de programación y cálculo numérico utilizadas por los ingenieros y científicos para el análisis de datos, desarrollo de algoritmos y la creación de modelos. Es un sistema de cómputo numérico que ofrece un IDE con un lenguaje de programación propio (M). Ha sido utilizado para el desarrollo como lenguaje principal (versiones 2023b/2024a) con la creación de funciones que se han incorporado en la aplicación o el uso de scripts para testeo u optimización de tareas. Más concretamente, se ha hecho uso de MATLAB App Designer, que es un entorno de desarrollo interactivo propio de MATLAB® para diseñar aplicaciones y programar su comportamiento.
- El driver **OceanDirect** de Ocean Insight, es el principal controlador de dispositivos para espectrómetros de Ocean Insight. Ofrece una extensa librería de funciones que permiten la creación de softwares personalizados que puedan controlar el comportamiento de espectrómetros USB de la misma marca (equivalente Ocean Optics). OceanDirect es un SDK de plataforma cruzada con una API que lo convierten en un controlador de software muy completo. Además, es compatible con distintos lenguajes de programación entre los que se encuentra MATLAB.

- **Arduino IDE** es la parte software libre que ofrece Arduino. Es un entorno de programación con el que cualquiera puede crear aplicaciones para las placas Arduino, en el caso de este trabajo la placa Nano, de forma que se les puede dar infinidad de utilidades. Para poder hacer posible el control del motor ha sido necesario el uso de este entorno integrado de programación con el fin de cargar las órdenes deseadas al microcontrolador. La comunicación con el puerto serie ha hecho posible el intercambio de datos con el software, desarrollado en MATLAB.

2.2. BÚSQUEDA DE NECESIDADES

Para empezar, se realizó una búsqueda de necesidades que tenía que cubrir el programa a modo de definir los requisitos principales. Este paso permite comprender e identificar las expectativas y necesidades de los usuarios finales que estarán al mando cada vez que se realice una prueba.

2.2.1. Requisitos del usuario

En cuanto a los requisitos no funcionales que el usuario espera de la aplicación de control suelen destacar aspectos sobre usabilidad, rendimiento o seguridad. Entre los más destacados se encuentran los siguientes:

1. **Interfaz fácil de utilizar:** se espera que la interfaz de usuario sea lo suficientemente intuitiva y amigable como para que pueda ser utilizada por una persona preparada para la realización de pruebas y familiarizada con todo el entorno que conllevan. Se busca que sea incluso más fácil que realizar medidas con el método tradicional.
2. **Configurabilidad:** debe permitir la máxima personalización con el fin de que el usuario tenga la máxima libertad a la hora de realizar pruebas de cualquier índole.
3. **Información de estado:** es importante que el usuario conozca el estado del sistema. Por ejemplo, la posición actual del motor o el modo actual de captura de espectros, entre otros.
4. **Eficiencia:** transiciones y operaciones rápidas y sin retrasos notables
5. **Escalabilidad:** uno de los objetivos del nuevo sistema de medida es permitir la medición multiplexada; por lo tanto, el programa debe ser capaz de configurar y gestionar simultáneamente un número significativo de sensores.
6. **Tolerancia a fallos y copias de seguridad:** se buscará tratar de minimizar los errores en la aplicación. Por otra parte, en caso de error, minimizar las pérdidas de información importante. Esto implica que al usuario se le permita guardar datos en tiempo real en el equipo durante el transcurso de pruebas.

2.2.2. Necesidades del programa para el sistema y los experimentos

Los siguientes requisitos están más relacionados en aspectos técnicos y aportan a la aplicación funcionalidades necesarias más específicas:

1. **Inicialización robusta y personalizada:** el programa debe inicializarse en base a ciertos parámetros del espectrómetro y configurarse lo más automáticamente posible. Por otra parte, la inicialización debe ser robusta y si algún componente no se encuentra

- conectado correctamente lanzar mensajes de error que impidan inicializar la aplicación.
2. **Adquisición de espectros ajustable:** los parámetros básicos deben poder ser accesibles y modificados por el usuario según el experimento lo requiera.
 3. **Guardado de espectros:** el sistema debe permitir el almacenamiento en el equipo de espectros en distintos formatos: *txt*, *mat*, *dat*; y asignar metadatos a cada dato guardado: hora, tipo de espectro capturado o número de muestra.
 4. **Distintos modos de captura de espectros:** según el preprocesado aplicado a los datos.
 5. **Configuración básica del motor desde los menús:** parámetros como la velocidad de paso, los pasos a realizar o la dirección deben ser modificables fácilmente.
 6. **Implementar mecanismo en el programa que permita encontrar las posiciones de las muestras fácilmente:** como la guía cuenta con aproximadamente 40000 pasos, es necesario que las posiciones en las que cada sensor se sitúa bajo el haz sean identificables con facilidad mediante algún algoritmo.
 7. **Editar parámetros de seguimiento de picos (desplazamiento espectral):** acceder fácilmente a cada sensor para definir la región de longitud de onda donde buscar los picos para cuantificar el movimiento del espectro de reflectividad, además de otras variables.
 8. **Visualización y almacenamiento de pruebas:** proporcionar visualización en tiempo real de los datos adquiridos con gráficos de desplazamiento – tiempo. También se tiene que permitir una personalización de los gráficos: nombre de muestras, añadir notas o cambiar escalas. Paralelamente almacenar en el directorio deseado los espectros capturados durante la prueba para tratarlos con otras herramientas o realizar futuros estudios.

2.3. ANÁLISIS DE VIABILIDAD TÉCNICA

Para el análisis de viabilidad se exploraron las limitaciones que se podrían encontrar para el desarrollo del software. Básicamente, consistió en explorar la comunicación que se establecería con los componentes del set-up, que sería donde podrían surgir las complicaciones.

El driver de OceanDirect permitiría al programa intercambiar información con el espectrómetro. Por otra parte, el motor encargado de mover la plataforma con las muestras a través del raíl recibiría las órdenes a través de Arduino (con el driver TB6600 como intermediario).

Se estudió a fondo la librería de funciones que incluía el controlador para conocer las posibilidades que ofrecía y comprobar si el driver OceanDirect estaba capacitado para realizar el proyecto planteado.

Por otra parte, el movimiento de las muestras respecto al espectrómetro debía cumplir una serie de condiciones que no se vieran alteradas por la comunicación entre el motor y el software:

- Alta velocidad (orden de miles de pasos por segundo)
- Bidireccionalidad (hacia adelante/hacia atrás)
- Precisión de número de pasos

Se hicieron unas primeras pruebas de movimiento de la plataforma desde el entorno de Arduino, donde se observó que el motor conseguía alcanzar una velocidad de 4500 pasos/segundo. Se decidió situar el límite en 4000 pasos/segundo, debido a que superado este umbral aumentaba mucho la posibilidad de que no se interpretaran bien los pulsos y el motor se saltara pasos, aspecto que repercutiría en la precisión. De todas formas, la velocidad conseguida era exitosa.

La bidireccionalidad era posible definirla con un pin de estado donde su actividad indicaba si los pasos realizados por el motor eran hacia adelante o hacia atrás.

El mayor conflicto se tuvo con la precisión de los pasos. Las órdenes se podían dar con un nivel de detalle elevado ya que los pasos eran del orden de micrómetros. Sin embargo, la precisión no era la mejor y con el tiempo la posición aparecía sesgada. Si había algún error de pasos respecto a los deseados, siempre era porque se saltaba pasos. El error era acumulativo por lo que un proceso de horas repitiendo el mismo ciclo tendía a desviar la posición de la muestra en una dirección provocando una decaída progresiva de la exactitud.

Sobre todo, se observó que el origen principal del error en la ejecución de pasos estaba en los cambios de dirección de la plataforma. Si se alternaba un movimiento en una dirección y después se hacía el mismo en la dirección opuesta, en ocasiones no se regresaba al mismo lugar de partida.

La solución impuesta fue la introducción de un regreso al origen en cada ciclo. Con un poco más de duración para cada ciclo, cada vez que se terminan de recorrer los sensores se reinicia la cuenta de pasos suprimiendo la acumulación del sesgo. La excelente velocidad conseguida pudo hacer que esto no fuese un gran sacrificio.

2.4. DISEÑO PRELIMINAR DEL PROGRAMA

En esta sección se explica la idea teórica inicial que se diseñó del programa, tanto la arquitectura de alto nivel como el esquema inicial de la interfaz gráfica del usuario.

2.4.1. *Arquitectura del Software*

La arquitectura del programa de alto nivel está representada en la Figura 27. El sistema puede interactuar tanto con el motor como con el espectrómetro gracias a los controladores de hardware de los que se disponen. Para la experiencia del usuario, se cuenta con una serie de paneles integrados en una interfaz con los que se seguirán las pruebas realizadas y se podrán llevar a cabo las acciones necesarias en cada instante. Consiste en una interfaz principal donde se realizan la mayoría de los procesos y unos menús auxiliares para las configuraciones más específicas.

Desarrollo de una plataforma automatizada para la medida multiplexada de sensores fotónicos basados en capas porosas

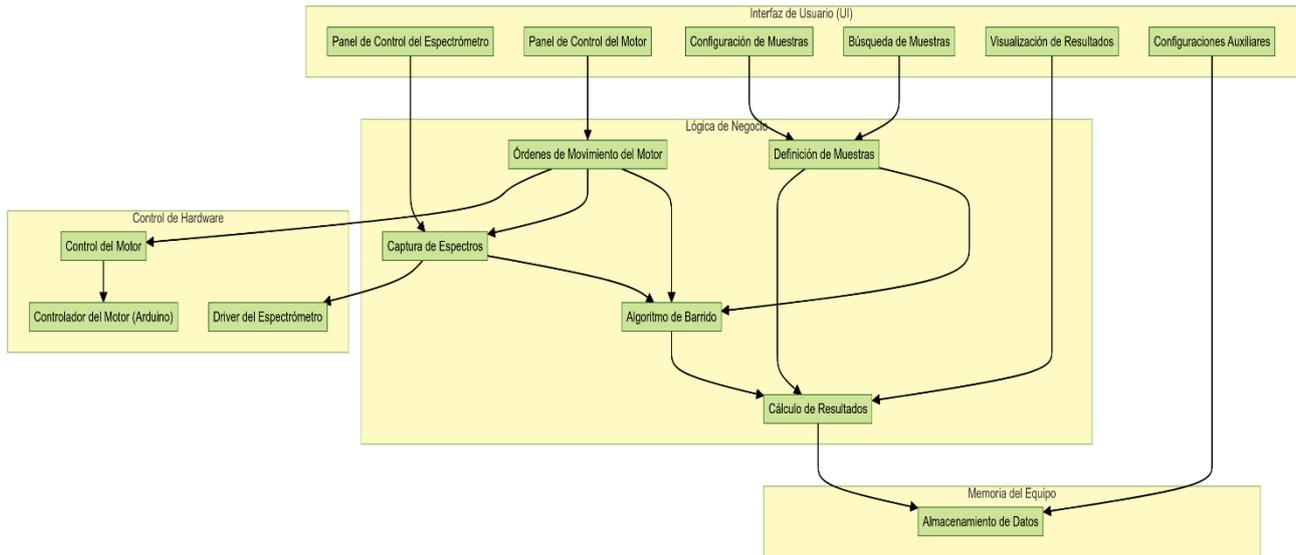


Figura 27. Arquitectura de alto nivel. Relaciones entre UI, lógica de negocio, memoria y controladores del hardware.

En la interfaz principal, en el panel de control del espectrómetro se realiza la captura básica de espectros. Toda aquella adquisición y visualización de lo que capta el espectrómetro. En ella se ajustarán los parámetros de adquisición, se aplicará el método de preprocesado adecuado y sobre todo nos aseguraremos de que aspectos como la fuente de luz o la muestra funcionan correctamente.

El panel de control de motor contiene la configuración básica de la plataforma móvil gracias a la comunicación mutua con el Arduino. Podemos realizar algunas comprobaciones iniciales de conexión con el motor mediante esta sección y llevar a cabo algunos movimientos de la plataforma para situar la muestra (o alguna de las muestras) aproximadamente en la posición de medición del sistema.

En la sección de búsqueda de muestras se aplica un algoritmo de barrido que captura espectros al mismo tiempo que recorre un tramo del raíl gracias al movimiento del motor controlado. Distintos parámetros de los espectros capturados nos ayudarán a identificar las posiciones en las que se encuentran los sensores, y almacenarlas en el sistema.

Con una sección de configuración de muestras se definen las características necesarias para el desarrollo de los experimentos. Son una serie de parámetros a definir independientes de cada sensor que se utilizarán en el seguimiento de los picos con el fin de determinar el desplazamiento espectral.

Una vez se completen los campos de este último panel se podrá iniciar una prueba de interrogación de los sensores. Para ello, el usuario tendrá acceso a una interfaz donde pueda visualizar en tiempo real los resultados de la prueba que serán facilitados por un algoritmo de cálculo. Se mostrarán en un gráfico desplazamiento (longitud de onda) – tiempo (minutos) integrado en un panel de visualización. Además, tendrá unos botones que permitan al usuario pausar o manipular ciertos aspectos del experimento en todo momento.

El mismo algoritmo de cálculo almacenará los espectros capturados en la memoria del equipo, siguiendo una ruta especificada. El objetivo de esta función es que sea posible realizar un análisis a posteriori de los datos obtenidos en la prueba en caso de ser pertinente, tal y como se realizaba en las pruebas tradicionales explicadas en la sección 4 del capítulo 1.

2.4.2. Interfaces gráficas del usuario

Inicialmente, exceptuando las configuraciones adicionales, todo el procedimiento principal se integró en una misma interfaz. Este procedimiento se indica en la Figura 28 a modo de flujograma y representa la experiencia de un supuesto usuario desde que inicia la aplicación hasta que termina una prueba de interrogación.

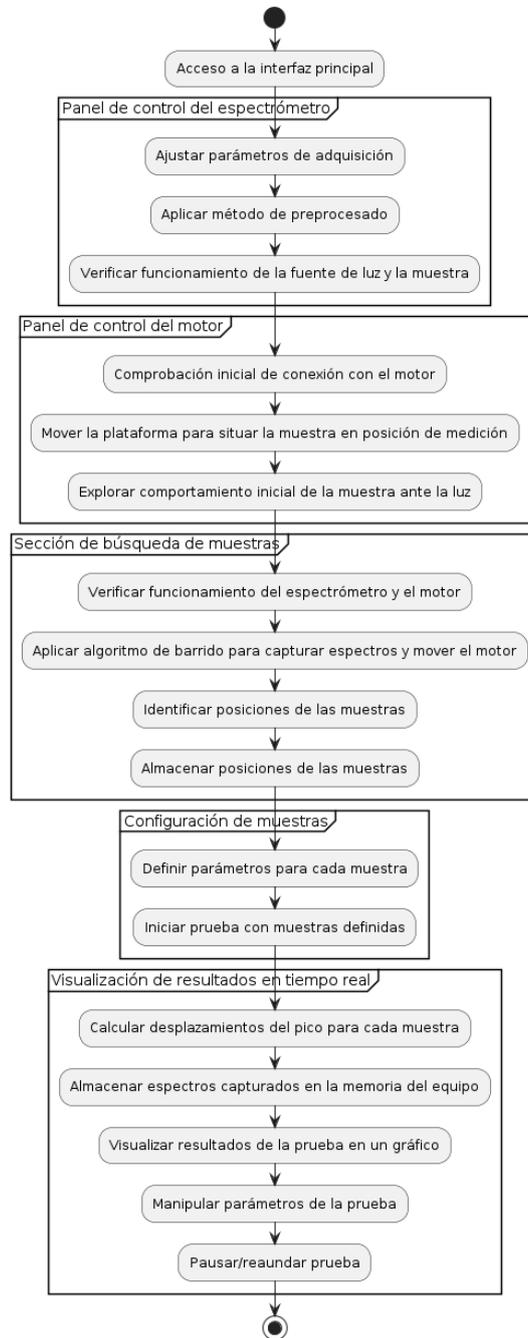


Figura 28. Flujograma de la experiencia de un usuario en la aplicación.

Para la integración de los paneles en la interfaz se empleó la distribución seguida en la Figura 29, que traza el procedimiento como una especie de recorrido. Las configuraciones adicionales se incluirían como una barra de tareas superior o ventanas adicionales llamadas desde una barra menú.

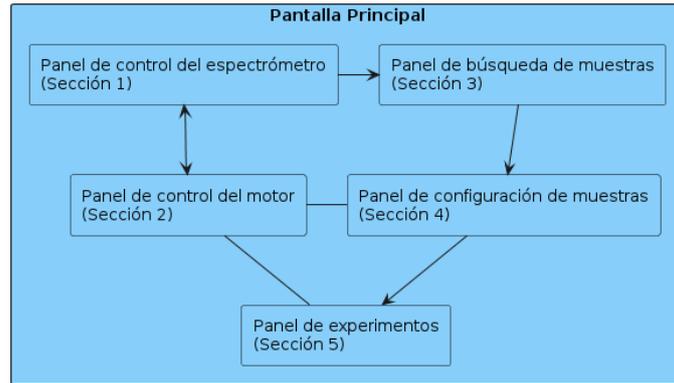


Figura 29. Esquema básico de interfaz preliminar del software de control

2.4.3. Comunicaciones entre sistemas

El sistema de medida está compuesto por una variedad de componentes electrónicos que necesitan intercambiar información entre sí. El programa informático se encarga de controlar el funcionamiento del set-up combinando datos provenientes de diferentes partes. Requiere, sin embargo, de una comunicación entre sistemas electrónicos e informáticos bien definida.

El esquema de la Figura 30 representa el mecanismo de comunicaciones que hacen posible el flujo de información y la ejecución de acciones entre sistemas. Los elementos del esquema se explican a continuación:

- **Software de Control del Sistema de Medida (Matlab):** Envía la orden de movimiento al Arduino a través de la comunicación por puerto serie y la orden de captura de espectro al espectrómetro llamando a funciones del controlador OceanDirect.
- **Arduino Nano:** Recibe la orden de movimiento del software de control por puerto serie y la ejecuta, enviándola al driver del motor. Envía la confirmación de ejecución de vuelta a Matlab a través de la comunicación por puerto serie.
- **Driver del Motor (TB6600):** Recibe las órdenes de movimiento del Arduino y las ejecuta, controlando el motor.
- **Motor:** Realiza los movimientos de la plataforma con los chips que le indica el driver.
- **OceanDirect:** Proporciona acceso al espectrómetro desde la aplicación de control, permitiendo el intercambio de datos software-espectrómetro. Realiza la adquisición del espectro final que llega al software a partir de los espectros capturados por el espectrómetro.
- **Espectrómetro:** Cuando se reciben órdenes a través del driver se ejecutan. Se encarga de la captura de espectros, que serán digitalizados y transferidos a Matlab.

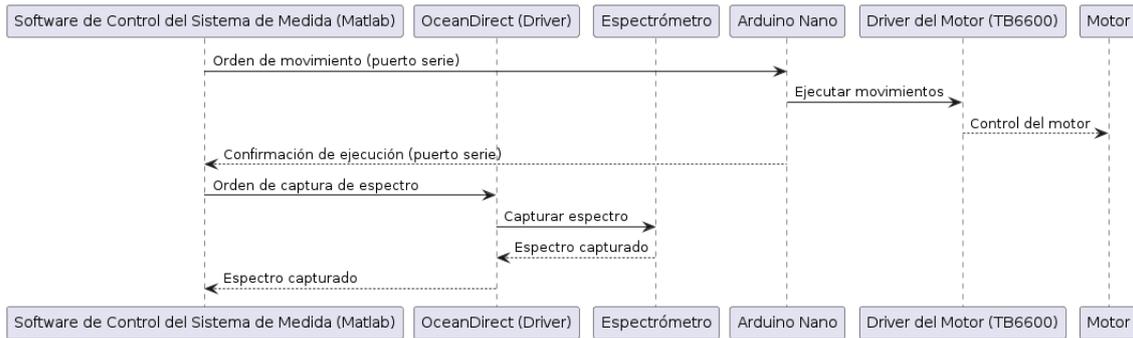


Figura 30. Diagrama de intercambios y flujos de información entre componentes del sistema.

2.5. CAPTURA DE ESPECTROS: CONTROL Y OPTIMIZACIÓN

Tras la primera exploración del driver y el diseño preliminar de cómo se integraría en el software, se empezó a experimentar con las herramientas del controlador del espectrómetro con el objetivo de conseguir de la forma más efectiva la adquisición y el preprocesado de los espectros capturados.

2.5.1. *Manipulación de parámetros básicos de adquisición*

Los parámetros de adquisición más importantes fueron estudiados con el fin de determinar el impacto que tenían sobre la calidad del espectro capturado, de cara a introducirlos en la aplicación.

El **tiempo de integración** del espectrómetro es análogo a la velocidad de obturación de una cámara, se trata de la cantidad de tiempo durante la cual el detector captura la luz de cara a adquirir el espectro. Normalmente viene definido en milisegundos o microsegundos. A valores más altos de tiempo de integración, el detector monitoreará los fotones entrantes durante un instante más prolongado. Esto aumentará la intensidad del espectro adquirido; es por ello por lo que en situaciones con una fuente de luz menos potente se necesitará de un tiempo de integración más elevado. En cambio, si este parámetro se encuentra por encima de lo requerido puede saturar los píxeles del detector de forma que, aunque aumenten los fotones de la longitud de onda específica del píxel, el valor de intensidad se mantendrá constante en este límite. Esto distorsionará considerablemente el espectro adquirido. Por tanto, este parámetro depende de la intensidad de la fuente de luz y de la reflectividad de la capa, por lo que debe ser fácilmente modificable desde la interfaz del usuario. Además de poder modificarlo libremente, mediante un algoritmo iterativo se automatizó el cálculo del tiempo de integración óptimo en cada caso. El tiempo de integración óptimo es el que sitúa la intensidad espectral máxima al 85% del límite de saturación del espectrómetro (Morris, 2022).

El promediado del espectro tiene como objetivo la reducción del ruido. Se consigue gracias al aumento de la relación señal ruido (SNR) de la señal adquirida por el driver que se recibe en el programa respecto a la capturada por el espectrómetro. Existen dos tipos de promediado en OceanDirect, los cuales han sido introducidos como modificables por el usuario en los menús:

1. **Promediado temporal.** Consiste en promediar múltiples espectros secuenciales para generar un único espectro promedio. Con el parámetro definido se elige el número de escaneos promediados (SA) provenientes de diferentes espectros independientes. Se

establecerá el parámetro dependiendo del ruido que deseemos eliminar ya que como consecuencia hay un aumento del tiempo de adquisición. Se aumenta el SNR por un factor de raíz cuadrada el número de SA, pero el tiempo se multiplica también por el número de escaneos promediados.

2. **Promediado espacial.** Se conoce como el suavizado *boxcar* (BS) y se encarga de suavizar el espectro adquirido (I_s) promediando los píxeles adyacentes del que se ha capturado, según la ecuación 1. El parámetro que se define aquí es la anchura de la ventana de promediado, indicando el número de píxeles que se promediarán entre sí. Se aumenta el SNR por un factor de raíz cuadrada el número de píxeles promediados y el proceso tiene como consecuencia una disminución de la resolución espacial que puede ocultar detalles espectrales.

$$I_s(k) = \frac{\sum_{i=k-X}^{k+X} I_c(i)}{2X+1} \quad (1)$$

- $I_c(i)$: Intensidad original del píxel i del espectro capturado
- X : Parámetro de anchura de ventana (semianchura de ventana *boxcar*)
- k : Píxel actual a promediar

2.5.2. Corrección de luz ambiental

El espectrómetro capta una luz residual con la fuente apagada. Para un resultado más exacto, debe eliminarse; de lo contrario puede introducir artefactos en la medida.

El driver permite almacenar un espectro de oscuridad con el objetivo de corregir la luz de fondo que se pueda introducir en la medida. Este preprocesado es interesante en ambientes con un fondo muy iluminado. Para automatizar el proceso se creó una función que, con un espectro de oscuridad previamente almacenado, aplica la corrección tras adquirir un espectro de reflectividad. Este preprocesado se podrá activar cuando sea necesario llamando a la función que aplicará la corrección siguiendo la ecuación 2.

$$S'_\lambda = S_\lambda - D_\lambda \quad (2)$$

- S'_λ : Intensidad de la muestra a la longitud de onda λ corregida
- S_λ : Intensidad de la muestra a la longitud de onda λ
- D_λ : Intensidad de la luz ambiental a la longitud de onda λ

2.5.3. Normalización de espectro

Los espectros obtenidos representan la intensidad reflejada en función de cada longitud de onda del haz de luz emitido por la fuente. Por lo tanto, esta intensidad depende tanto de la luz emitida por la fuente y su distribución espectral, como de la respuesta espectral del espectrómetro, que puede variar según la longitud de onda. El propósito de la normalización del espectro es hacer que la medición sea independiente tanto de la fuente de luz como de la respuesta del espectrómetro, permitiendo así la introducción de unidades de reflectancia (%).

La reflectancia es el retorno de la radiación por una superficie, sin cambio de longitud de onda. Para ello, comparamos el espectro de la medida con uno capturado midiendo una superficie de aluminio, la cual refleja prácticamente toda la luz que le llega (reflectividad de 100%), siguiendo la ecuación 3.

$$\%T_{\lambda} = \frac{S_{\lambda} - D_{\lambda}}{R_{\lambda} - D_{\lambda}} \times 100\% \quad (3)$$

- $\%T_{\lambda}$: Reflectancia de la muestra a la longitud de onda λ
- S_{λ} : Intensidad de la muestra a la longitud de onda λ
- D_{λ} : Intensidad de la luz ambiental a la longitud de onda λ
- R_{λ} : Intensidad de la referencia (aluminio) a la longitud de onda λ

Por ello, se necesitará una muestra de aluminio que se utilizará como patrón. Previo a un experimento, se captura su espectro de intensidades reflejadas al iluminarla con el haz de luz del sistema. Estos datos se guardarán para el resto de la prueba, asumiéndose como el 100% de reflectividad. Siguiendo el procedimiento anterior, se creó un algoritmo encargado de normalizar el espectro (calcular la reflectancia), pudiendo activarlo cuando se desee; siempre y cuando se haya incorporado este espectro de referencia.

2.6. CONTROL DEL MOTOR PASO A PASO

Con la captura de espectros implementada, se procedió al desarrollo del programa que haría posible el movimiento controlado del motor. Recordemos que el motor del set-up va a tener como misión aportar desplazamiento a la plataforma móvil con las estructuras de sensado para situarlas una a una, de forma cíclica, en la zona de medida del haz de luz. Cada vez que finalice un ciclo, la plataforma va a volver a una posición de origen para evitar una deriva por imprecisiones en el número de pasos del motor que puedan afectar a la medida. La posición de origen se definirá con un sensor de final de carrera, como el que aparece en la Figura 17, que cuando detecte la presencia de la plataforma, concretamente de la lengüeta preparada para ello (Figura 26 (a)), mandará una señal digital alta, de lo contrario se mantendrá en un estado bajo.

El otro sensor óptico (Figura 26 (b)), cumple función de seguridad: en caso de que la plataforma móvil alcance el final de la guía el motor se detendrá evitando que un exceso de pasos dañe el hardware.

2.6.1. *Control desde Arduino IDE*

Fundamentalmente se van a querer realizar dos tipos de movimientos con el motor: realizar un número determinado de pasos en la dirección y la velocidad deseada; y volver al origen independientemente del número de pasos hacia atrás que hagan falta para ello. El código para mover el motor fue programado desde Arduino IDE. Para poder llevar a cabo satisfactoriamente las dos acciones principales, debe analizar primero qué tipo de orden le está llegando:

1. **Realizar movimiento específico.** Cuando se recibe un comando completo de este tipo, del mismo se tendrán que extraer el número de pasos, la velocidad y la dirección del movimiento. Para eso se diseñó una serie de codificación sencilla para almacenar en un *string* toda esta información, además de unos identificadores de inicio y final de mensaje que rechazan todos aquellos datos que lleguen sin este formato. Los textos recibidos se estructuran como `idIni_numPasos_velocidad_direccion_idFin`. Dependiendo de la dirección especificada, el motor se mueve el número de pasos indicado a la velocidad

deseada. La velocidad se regula introduciendo un retardo inversamente proporcional al número de pasos por segundo indicados entre la señal digital alta y baja. Para ajustar el retardo de forma que la velocidad especificada fuera la real se calibraron las pausas con pruebas de velocidad.

2. **Volver a la posición de origen.** Si se recibe una orden de reinicio, el motor se mueve hacia su posición de origen hasta que se reciba una señal lógica elevada por la conexión del sensor óptico de origen (`oriPin`). La orden de origen es un comando corto y sencillo, como no contiene parámetros que el programa tenga que decodificar, se busca la máxima simplicidad y velocidad de lectura: R. Cuando se recibe el comando se van realizando pasos de motor hacia la posición inicial. Durante el movimiento, si se detecta una señal de inicio de carrera (`oriPin`), el motor se detiene entendiendo que se encuentra en el principio de la guía. La velocidad juega un papel importante en este caso ya que el tiempo que tarda en enviarse la señal desde sensor óptico es tiempo que la plataforma sigue avanzando. El exceso de pasos que realizará la plataforma vendrá determinado por la velocidad del motor. Sin embargo, nos interesa que el movimiento de vuelta al origen se ejecute rápidamente con el fin de perder el mínimo de tiempo en cada uno de los ciclos de experimento. Para solucionar esta contradicción entre la velocidad y la precisión del proceso, se introdujo un algoritmo de vuelta al inicio en el que se realizan los pasos hacia atrás a una alta velocidad hasta que se detecta una señal alta en el pin del sensor de origen, produciendo un exceso notable de pasos. Llegado a este punto, se cambia la dirección de movimiento y se empiezan a dar pasos a una velocidad muy reducida hacia adelante. Mientras el pin del sensor continúe en estado alto se irán dando pasos lentamente alejando la plataforma del extremo origen de la guía. Cuando se deje de leer la señal alta del sensor se dejarán de dar pasos, entendiendo que la plataforma se encuentra en la posición 0.

Además de estas acciones, el código creado cuenta con comprobaciones que aportan robustez frente a errores.

2.6.2. Comunicación puerto serie

El puerto serie se utiliza como medio de comunicación entre la aplicación creada en Matlab y el programa de Arduino. Las órdenes que se tienen que dar al motor se envían por aquí. Se trata de un canal de comunicación bidireccional ya que se envía y se recibe información a través de él. El programa creado está constantemente esperando información a través del puerto serie. Cuando reciba la información, la procesa y en caso de ser coherente ejecuta las acciones pertinentes. Si no es coherente la rechaza y continúa escuchando.

Al final de cada movimiento o en caso de error, se envía una confirmación de ejecución (o un mensaje de error) a través del puerto serie informando al usuario o sistema de control del desenlace de la orden recibida.

2.6.3. Control desde MATLAB

Nos interesa que las órdenes de movimientos del motor se envíen desde la interfaz de MATLAB. Tenemos el programa de Arduino cargado a la placa y escuchando por el puerto serie a la espera de mensajes que ordenen desplazamientos.

MATLAB tiene la opción de conectarse a un puerto serie y leer y escribir en este. Primero desde el programa buscaremos el puerto al que está conectado el Arduino. Desde la interfaz, cuando el usuario ejecute algún movimiento, se escribirá codificado en el puerto serie. Le llegará a la placa, lo procesará, ejecutará el movimiento y enviará por el puerto serie la confirmación del movimiento. Esta confirmación podrá ser leída desde MATLAB a modo de garantía de que se ha realizado el movimiento correctamente.

2.7. MENÚS DE LA INTERFAZ PRINCIPAL

Una vez completada la capa de control del hardware de la aplicación, se pasó a la integración de esta con el resto de las funciones de la unidad lógica del programa en la interfaz.

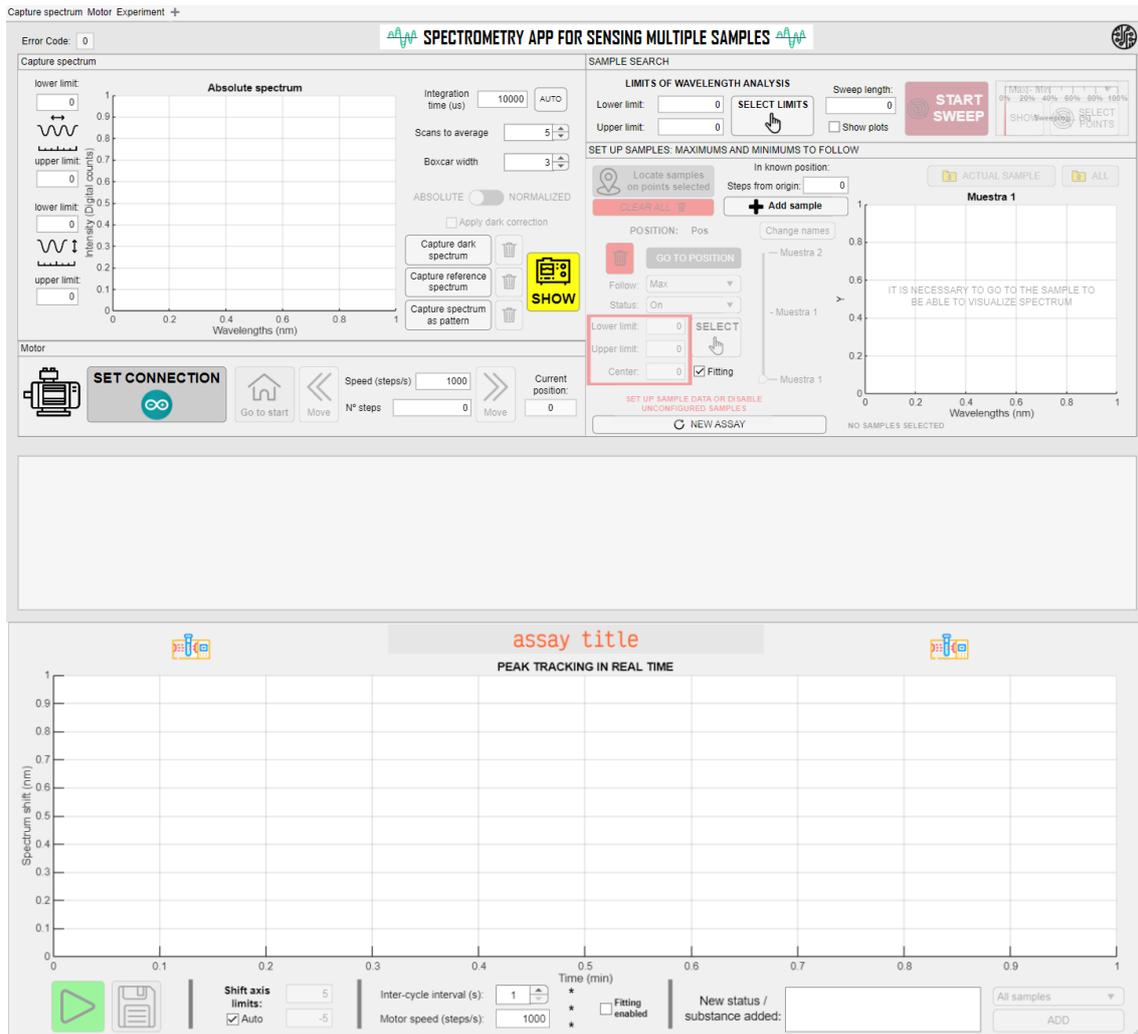


Figura 31. Interfaz principal. Ventana de configuración completa + ventana de resultados.

La interfaz principal consiste en dos ventanas (Figura 31): la del preparado de los experimentos y la de visualización de experimento en tiempo real. A continuación, se explicará detalladamente cada una de las secciones de la interfaz.

2.7.1. Menú para visualización del espectro en tiempo real y configuraciones básicas de adquisición

El primer panel de la interfaz permite la visualización inicial del espectro actual capturado. Se muestra lo que está en la zona de medida sin ningún tipo de procesamiento más allá de la configuración de adquisición y del tipo de preprocesado.

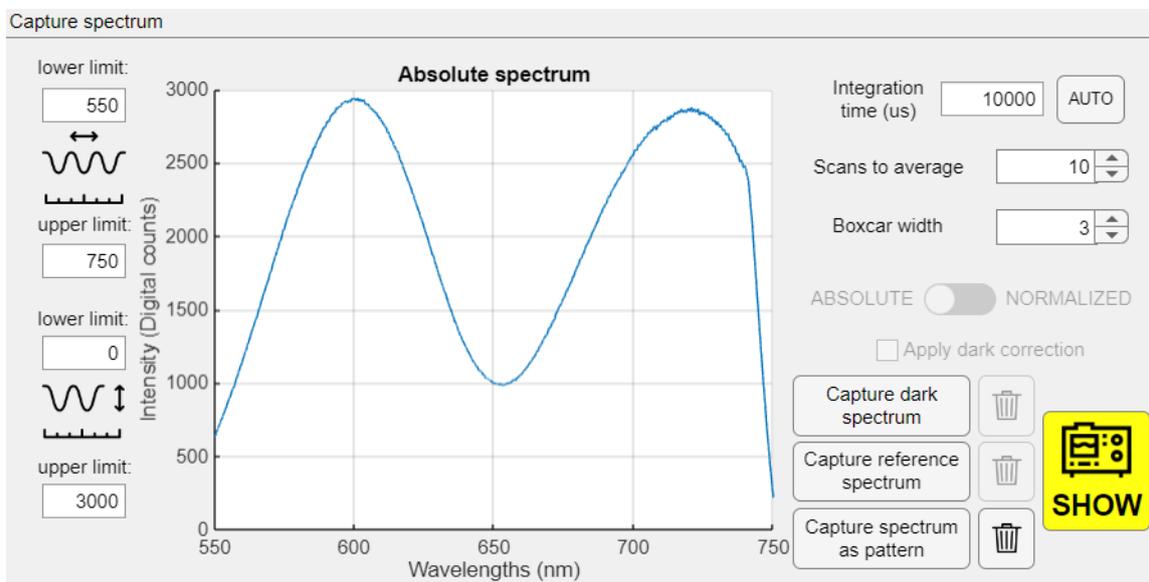


Figura 32. Panel de visualización y configuración básica del espectro.

Para visualizar el espectro en tiempo real se activa o desactiva el botón de estado amarillo *SHOW* a una tasa de refresco como máximo de 10Hz. Para ajustar la escala y límites de visualización del espectro capturado se han diseñado los cuadros de texto de la izquierda.

Cuando el botón está activo, se visualizará en los ejes el espectro en tiempo real adquirido según los parámetros configurados en la parte superior derecha: tiempo de integración, número de escaneos temporales promediados y el ancho de la ventana de promediado espacial (*boxcar*).

Para el caso del tiempo de integración se puede ajustar automáticamente con el botón de *Auto* al 85% de la saturación del espectrómetro gracias al algoritmo iterativo creado.

Se puede alternar activando y desactivando tipos de preprocesado según cómo se desee corregir el espectro visualizado: corrección de luz ambiental o normalización del espectro adquirido respecto a una referencia, mediante el llamado de su función con los botones de estado. Para poder utilizarlos es necesario incorporar al programa los siguientes datos:

1. Para la corrección de luz ambiental: se necesita el espectro en oscuridad. Este puede ser importado o capturado, con la fuente de luz apagada, mediante el botón de *Capture dark spectrum* en la parte inferior, que recoge el espectro actual y lo toma como oscuridad. Puede exportarse o eliminarse con el símbolo de la papelera.
2. Para la corrección del efecto de la fuente de luz (normalizar espectro): se requiere un espectro de referencia. Como se comentó en el apartado 2.5.3 de este capítulo, lo habitual es capturar un espectro de aluminio debido a su elevada reflectividad. De la misma forma que se captura un espectro oscuro, con el botón *Capture reference spectrum*, si colocamos una muestra de referencia en la zona a medir se adquirirá el

espectro que utilizará el programa para normalizar las intensidades si activamos esta opción. Como en el caso anterior, es posible exportarlo, importarlo o eliminarlo de la RAM.

También existe la opción de capturar el espectro actual que se visualiza por la gráfica para utilizarlo como espectro-patrón de las muestras que se van a analizar. Esto será útil para el barrido de búsqueda de posiciones donde tengamos los sensores colocados, permitiendo identificar más inequívocamente las posiciones donde se encuentran los chips.

2.7.2. Menú para movimiento básico de la base de muestras

La sección del movimiento básico de la plataforma se encarga de establecer la conexión con el motor y permite además realizar movimientos básicos de control o desplazamientos a posiciones puntuales.

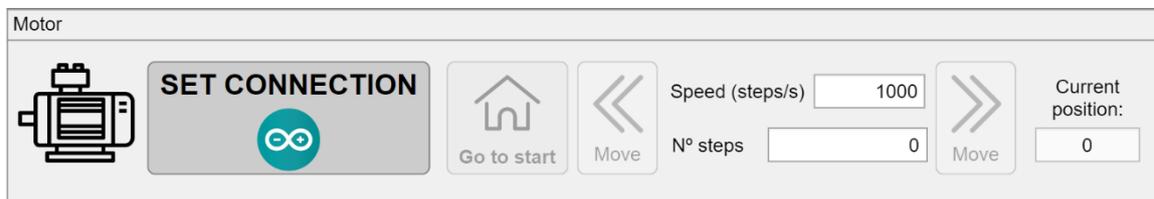


Figura 33. Panel de configuración y movimiento básico del motor.

Para iniciar la comunicación se creó un algoritmo de inicialización. El programa cargado en el Arduino, una vez se conecta a un puerto USB entrará en estado de buscar conexión. Este envía un código constantemente por el canal en búsqueda de respuesta por parte del software. Pulsando el botón de *SET CONNECTION* ejecutamos el algoritmo de inicialización que pone al programa a escuchar a través del puerto serie seleccionado desde configuraciones auxiliares de la aplicación. Si recibe el código de búsqueda de conexión, mandará a través del puerto el código de respuesta. Este código de respuesta será leído por Arduino y hará que la placa entre en modo de funcionamiento, quedando lista para realizar movimientos siempre y cuando el driver se encuentre alimentado. Si el controlador no está conectado el programa lo detectará devolviendo la conexión como fallida.

Lo primero que hace el motor una vez se establece la conexión es buscar el sensor de inicio. Este desplazamiento tiene como objetivo establecer un eje de coordenadas respecto al origen. La posición relativa respecto al origen en la que se encuentra la plataforma con los chips aparecerá en todo momento en el cuadro de texto de *Current Position* expresada como número de pasos.

Para realizar desplazamientos hacia adelante o hacia atrás se utilizan las flechas, que realizarán los pasos especificados en *Nº steps* a la velocidad que introduzcamos en *Speed*, expresada en número de pasos por segundo.

Para volver al sensor óptico de inicio se puede pulsar en todo momento el botón de *Go to start*. Se enviará por el puerto serie el código que Arduino interpreta como volver al origen, detallado en la sección 2.6.1 de este mismo capítulo.

Finalmente, una vez terminado el uso del motor, pausamos la conexión con el Arduino desde el mismo botón. La placa volverá a entrar en modo buscar conexión.

2.7.3. Menú de búsqueda de muestras

Es el primer panel al que accederá el usuario para preparar una prueba una vez estén correctamente configurados el espectrómetro y el motor. El objetivo principal es encontrar la posición (nº de pasos respecto al origen) en la que la plataforma sitúa cada uno de los sensores en la zona del haz de la fibra óptica. Se querrán obtener tantas posiciones como muestras de capas de TiO₂ vayamos a utilizar como sensores en el experimento.

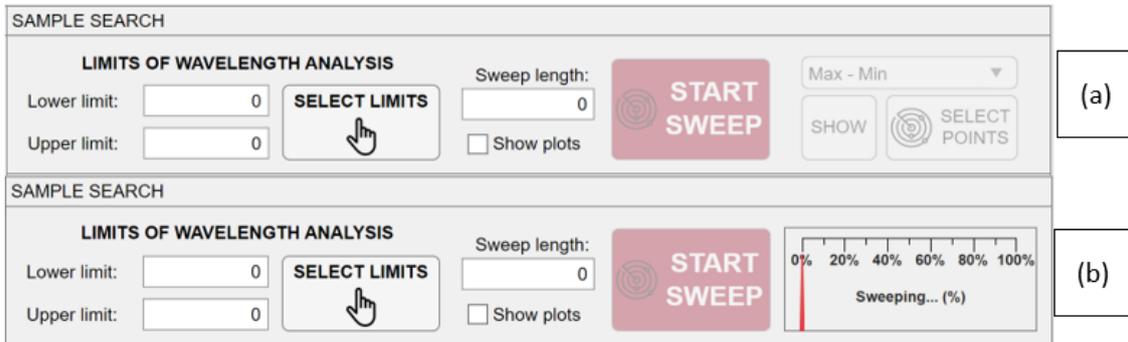


Figura 34. Panel de búsqueda de posiciones de los sensores. (a): desactivado. (b): barriendo.

Lo que se ha desarrollado para conseguirlo es un algoritmo que realiza un barrido a lo largo de la guía por la que se desplaza la plataforma. Desde el origen, se desplazará tantos pasos como se le indiquen en la longitud total de barrido, en el cuadro de texto *Sweep length*. El barrido lo realizará con tamaños de paso y velocidades que se le configuren en un menú auxiliar. Empezará cuando se pulse el botón de *START SWEEP*, siempre y cuando esté correctamente configurado el hardware y se hayan definido unos límites de análisis y una longitud total de barrido.

Los límites de análisis definen el rango de longitudes de onda que se analizará en el algoritmo de búsqueda. Con esta función, podremos seleccionar la región del espectro (en longitud de onda) que se considere ‘más característica’ de cara a diferenciar la posición en la que haya un chip respecto a la que haya un borde o una región vacía. Durante el barrido se ha incorporado una animación de carga para informar al usuario del porcentaje de proceso completado presente en la Figura 34 (b).

Para identificar las posiciones de los sensores, se utiliza la diferencia del espectro de estas estructuras respecto al de otros elementos que encontraremos en la guía lineal como un borde de metacrilato o la base de plástico. Véase la diferencia en la Figura 35.

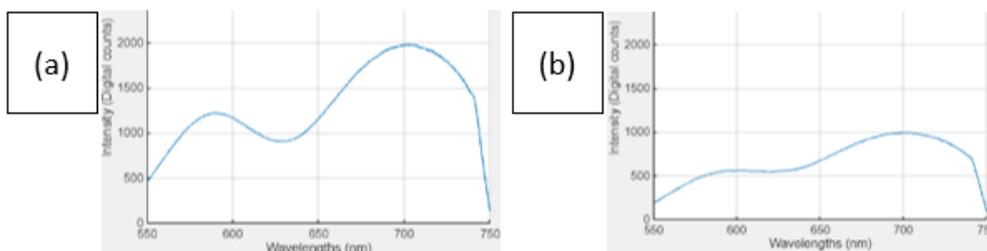


Figura 35. Respuesta espectral de diferentes regiones de la plataforma. (a): chip (b): borde PMMA (metacrilato).

En cada desplazamiento que se haga se captará un espectro, se seleccionará únicamente la región comprendida por los límites seleccionados y se extraerán los siguientes parámetros:

1. **Sumatorio:** se suman las intensidades de toda la banda seleccionada
2. **Máximo:** se selecciona la intensidad máxima de la banda seleccionada
3. **Rango:** se restan el valor máximo y el mínimo de la banda seleccionada
4. **Correlación respecto a patrón:** se correlaciona la banda seleccionada con la del espectro patrón, en caso de que se haya capturado o importado uno.
5. **Índice de correlación por rango:** multiplicación de la correlación (4) por el rango (3). Si no hay parámetro de correlación no se representará tampoco este índice.

Si dejamos seleccionada la casilla de *Show plots* una vez termine el barrido aparecerán las gráficas de los 5 parámetros como ventanas emergentes. De lo contrario, para verlas, se deberá clicar en *SHOW* y tener seleccionado en el desplegable el parámetro deseado.

Los gráficos representados tendrán en el eje X el número de pasos realizados para tomar cada espectro y en el eje Y el valor del parámetro asociado al espectro.

Finalmente, el botón *SELECT POINTS* ofrece la opción de seleccionar desde una gráfica, la del parámetro deseado según la que mejor diferencie las posiciones, los puntos en los que se van a localizar las muestras. Estos puntos no son más que coordenadas (pasos) respecto al origen.

2.7.4. Menú de configuración de parámetros de medida

El panel que aparece a continuación en la Figura 36 se trata del menú mediante el cual vamos a definir las características del seguimiento de los picos espectrales para cada sensor.

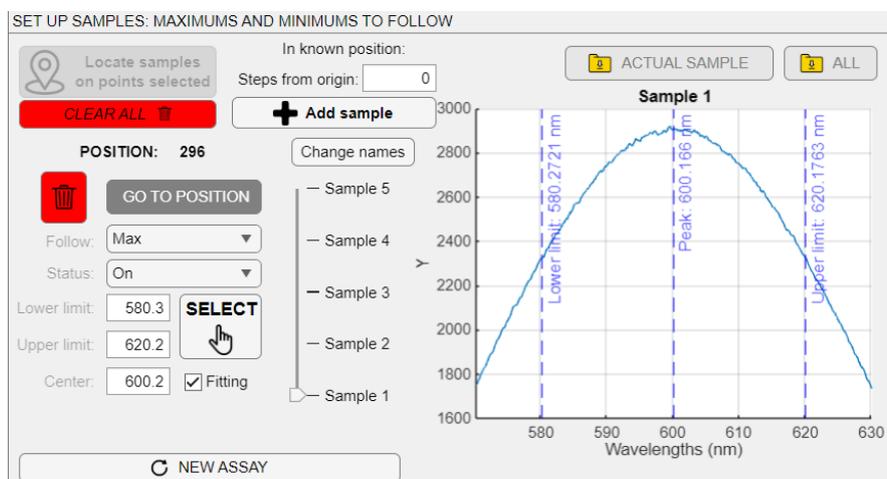


Figura 36. Panel de configuración de parámetros de medida para cada sensor.

Para empezar a introducir las características de cada estructura de sensado, estas deben ser creadas. Para ello, se define la posición en la que se encuentra cada una ya sea añadiendo la localización manualmente en el cuadro de texto *Steps from origin* y pulsando en *Add sample*, en caso de que se sepa el número de pasos a los que se encuentra del origen el sensor a definir; o cargando las posiciones (botón *Locate Samples on points selected*) que se han seleccionado desde el panel anterior de búsqueda de muestras.

Una vez se definan las localizaciones, aparecerán en la etiqueta *Pos* y mediante el control deslizante se podrá ir alternando entre los sensores. En la barra aparecerán tantos como los que se hayan definido, identificados numéricamente y ordenados ascendentemente por lejanía al origen.

Para eliminar alguna instancia es suficiente con seleccionarla desde el control deslizante y pulsar el botón rojo con la papelera de la izquierda. Para eliminarlas todas se clicará en *CLEAR ALL*.

Para la introducción de los parámetros necesarios para el *tracking* se ha creado el formulario que aparece en la parte izquierda del panel de la Figura 36, donde para cada muestra se definirá:

1. **Tipo de pico a seguir:** el usuario seleccionará si se sigue un máximo o un mínimo espectral.
2. **Actividad del sensor:** se podrá decidir dejar inactiva una muestra para el experimento, aunque no se quiera eliminar. Seleccionar ON/OFF.
3. **Rango de búsqueda del pico espectral:** con la selección de dos límites (*lower limit* y *upper limit*) se definirá el rango en el cual se va a buscar el máximo o mínimo que permita cuantificar el desplazamiento en longitudes de onda del espectro a lo largo de la prueba. Conviene revisar el espectro para asegurarse de seleccionar una región que contenga algún pico, de lo contrario la prueba no tendría sentido. Para la introducción de estos parámetros se pueden utilizar los cuadros de texto o el botón de *SELECT*, explicado a continuación.
4. **Pico de referencia inicial:** se indicará la posición del máximo o mínimo a priori. Se utilizará en las primeras iteraciones como referencia o punto de partida del pico. Sin embargo, se recalcula a partir de la longitud de onda del pico registrada en los primeros ciclos del experimento. También puede seleccionarse desde *SELECT*.

El botón de *NEW ASSAY* iniciará el experimento con las características indicadas. Requiere que todos los campos de la Figura 36 estén completos para que no falten datos durante la prueba, de lo contrario el software impide iniciar un experimento.

Desde este menú se tiene acceso también a un botón de movimiento a cada una de las muestras: *GO TO POSITION*. En este botón incluye un algoritmo de movimiento más preciso para evitar desplazamientos erróneos de la plataforma a posiciones inexactas. Ante el error encontrado de pérdida de precisión con cambios de dirección de la plataforma, como se indicó en el apartado 2.3, el algoritmo cada vez que detecta la necesidad de que el motor cambie la dirección de su movimiento, ordena a este que regrese al origen.

Como se ve en la Figura 36, en este panel también hay la opción de visualizar espectros. Pertenecen a los de los propios sensores y se adquieren cuando se realiza un desplazamiento de la plataforma a ellos. Por esta razón, para su visualización se debe ir como mínimo una vez, independiente para cada uno. El botón de *SELECT* también mueve la plataforma hasta colocar en la zona de medida el chip seleccionado, como el botón de ir a la posición. A diferencia de este, *SELECT* también abre una ventana emergente para la selección de los límites y el punto de referencia. Cada vez que se va a la muestra, el espectro visualizado en los ejes de esta se actualizará.

Podemos almacenar en la memoria el espectro de una muestra mediante el botón *ACTUAL SAMPLE*, o el de todas con *ALL SAMPLES*. Automáticamente, el algoritmo que hay detrás de los botones recorre cada una de las muestras adquiere el espectro y lo guarda en la memoria del equipo, pudiendo elegir la ruta deseada.

El panel también permite que la elección del punto de referencia (*Center*) se haga con la ayuda de un postprocesado. Consiste en la incorporación de un ajuste del espectro contenido en el

rango de búsqueda del pico, a una gaussiana positiva o negativa, según se busque un máximo o un mínimo. La incorporación de esta opción fue posible gracias a la facilitación de una función de ajuste del laboratorio. Después de ajustar la gaussiana, selecciona su pico y es devuelto como el punto de referencia. La función se llama desde el botón *SELECT* siempre y cuando se tenga marcada la opción *Fitting*.

2.7.5. Ventana de visualización de experimentos

La ventana de resultados se abre cuando se pulsa el botón del panel anterior *New assay* si todos los campos mencionados se encuentran rellenos y el control del hardware se encuentra en correcto funcionamiento. Aparece como ventana modal, inhabilitando la pantalla de configuración principal anterior, la representada en la 0.



Figura 37. Ventana de visualización de desplazamiento espectral en tiempo real destacando la barra de control inferior

Incluye una amplia gráfica para visualizar el desplazamiento de los picos de los espectros de reflectividad de las estructuras de sensado a lo largo de la prueba. Se permiten abrir varias ventanas de este tipo a la vez, cargando para cada una diferentes condiciones especificadas en la sección de configuración de muestras.

En la parte inferior de la pantalla se ha situado un pequeño menú de control de las pruebas, manipulable tanto antes, durante o después del experimento. Los parámetros de control son:

1. **Escala del desplazamiento espectral.** Es posible ajustarlo de forma automática o delimitarlo con los límites definidos en *Shift axis limits*.
2. **Intervalo de tiempo inter-ciclo:** tiempo, en segundos, que habrá entre un ciclo de medida y el siguiente, como mínimo. Un ciclo de medida consiste en recorrer todas las muestras calculando el desplazamiento. Este valor está definido “como mínimo” ya que no se puede poner un tiempo inferior al que se tardará en llegar del origen hasta la última muestra sumado al tiempo de adquisición de espectros y la ejecución del algoritmo de cálculo y visualización. Si se pone un tiempo inferior al necesario para un ciclo, en terminar el ciclo automáticamente se empezará el siguiente.
3. **Velocidad del motor.** La velocidad de paso en el desplazamiento de la plataforma para recorrer las muestras es modificable, el rango de valores que puede tomar es el mismo que el de la velocidad del motor durante la configuración de las muestras. Aumentar la velocidad de movimiento reducirá el tiempo mínimo inter-ciclo.
4. **Aplicar fitting.** Se puede ajustar la ventana espectral de búsqueda a una Gaussiana de igual forma que se puede hacer en la configuración de las muestras para la selección del punto de referencia. Si aplicamos la opción se disminuirá el ruido porque, en lugar de seleccionar el máximo o el mínimo dando lugar a que se desplace por perturbaciones de la señal, el algoritmo selecciona el pico de la función gaussiana que es mucho más estable.
5. **Añadir información acerca de la prueba.** Con el cuadro de texto situado en la esquina inferior derecha es posible añadir información a la gráfica de resultados. Información cuya posición está determinada por el momento en el que se añade, quedando una línea vertical que corta el eje del tiempo (X) en el instante en el que se produce la acción que se describe. La acción o estado introducido generalmente se trata de un cambio de disolución fluida, una variación del flujo, una acción que ha producido un artefacto en los resultados, entre otros. Con el desplegable situado a la derecha del cuadro de texto se puede seleccionar las muestras a las que afecta la información que añadimos. Se añaden pulsando el botón *ADD*.

Para empezar la prueba se debe pulsar el botón verde. Se empezará a ejecutar el algoritmo de cálculo y el botón se volverá rojo con un símbolo de pausa, botón que pulsará el usuario para pausar la prueba o detenerla. La prueba puede detenerse, pero el contador no: se sigue asumiendo el paso del tiempo y aunque se detenga la captura de espectros y no se almacenen resultados todo el instante de pausa será representado en la gráfica si se retoma el experimento.

En todo momento, mediante el botón de guardar se pueden almacenar en la memoria estructuras de datos con variables que permiten visualizar y analizar la gráfica de los resultados en un futuro, aunque ya hayamos cerrado esta pestaña, incluso la aplicación.

El algoritmo de cálculo consiste en un bucle infinito (hasta que se presione el botón de pausa) en el que dentro otro bucle recorre las muestras; captura los espectros; se extrae la región de búsqueda de pico seleccionada; se extrae el máximo, mínimo o en caso de estar activado el *fitting*, se ajusta a una gaussiana y se selecciona su pico; y se resta a la referencia. La referencia se obtiene del promediado de las primeras iteraciones, por este motivo conviene no introducir cambios en el inicio de las pruebas y buscar una estabilidad que permita establecer un buen punto de referencia.

Si la opción de almacenar los espectros está activada, cada vez que se ejecute el algoritmo de cálculo sobre una muestra el espectro capturado se guardará en el directorio seleccionado en la fase de configuración de las pruebas, con el formato y el prefijo configurados.

Cuando se presione el botón de pausa, se podrá volver a interactuar con la interfaz de configuración principal. Desde esta es posible abrir nuevas ventanas de experimentos sin necesidad de cerrar las anteriores.

2.8. MEJORA ESTÉTICA Y COMPILACIÓN

En las fases finales del desarrollo de la aplicación se le otorgó estética, robustez y un extra de cuidado a la interfaz. Para ello, se mejoró la apariencia de algunos botones, se añadieron elementos y ventanas auxiliares; además de iconos y figuras que mejoran el aspecto de la pantalla y dan una visión profesional al software. Estos elementos, por su menor importancia, se ha decidido introducirlos en los anexos, como “elementos auxiliares de la interfaz” (CAPÍTULO 3).

Por otra parte, se coordinó la actividad e inactividad de ciertos botones para proveer una mayor robustez al programa. Se incluyeron excepciones que desbloqueaban la aplicación de estados de error evitables. También se desactivaron botones cuando no eran necesarios y se bloquearon partes de la pantalla en momentos que podrían causar problemas de funcionamiento.

Finalmente, con las mejoras estéticas incorporadas y las pruebas correspondientes para validar la aplicación se procedió a la compilación del programa. Esto no se realizó hasta una vez concluida la fase de pruebas del sistema de medidas, detallada en el Capítulo 5.

3. PROCESO DE ELABORACIÓN DEL SISTEMA DE MICROFLUÍDICA

El flujo de las biomoléculas a través de los sensores se consigue modificando la celda de microfluídica sobre la que se posicionan, descrita en el capítulo 1. La modificación principalmente tiene como objetivo posicionar los múltiples sensores que van a participar en el experimento. Estos sensores son chips cortados de obleas de TiO_2 como aparecen en la Figura 38. El líquido, como en los experimentos tradicionales, llega desde el Eppendorf hasta la celda para seguir hasta la jeringa que succiona la bomba. En este trayecto pasará por cada una de las celdas de microfluídica que se desarrollará para cada chip.

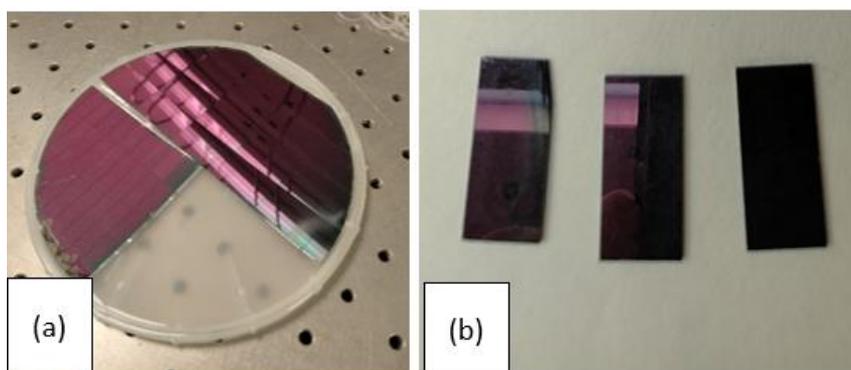


Figura 38. Estructuras de TiO_2 utilizadas como sensores. (a): Oblea. (b): Chips cortados.

Dependiendo de cómo se distribuyan los líquidos a través de los sensores, se pueden realizar dos tipos de pruebas:

1. **Flujo en serie:** los fluidos pasan de una muestra a otra de manera secuencial. Esto significa que el líquido entra en el primer canal, recorre todos los sensores y luego sale del canal final hacia la bomba. Este tipo de configuración es útil cuando se quiere analizar una muestra en disolución a medida que pasa por diferentes etapas de detección y sólo se cuenta con una bomba de succión. Los sensores se comunican secuencialmente entre ellos de forma que el canal de salida de uno se conecta al entrada del siguiente.
2. **Flujo en paralelo:** los fluidos se dividen en varios canales al mismo tiempo. Pueden provenir de una disolución común o de diferentes. Cada canal recibe una porción del flujo total, y los canales pueden operar de manera independiente con diferentes bombas o estar interconectados en algún punto. Cada canal puede conducir a un sensor o contener un reactivo diferente, permitiendo la detección de múltiples biomoléculas o la realización de múltiples pruebas con la misma muestra de manera eficiente; ya que es imposible que se contamine una muestra con la de otro canal.

El objetivo es que se puedan realizar diferentes tipos de experimentos con un único posicionador de muestras simplemente cambiando el camino formado por los canales y consecuentemente modificando el flujo, según las necesidades y posibilidades del usuario. Este cartucho con los chips será una parte del sistema de microfluídica por donde circularán las disoluciones de los experimentos.

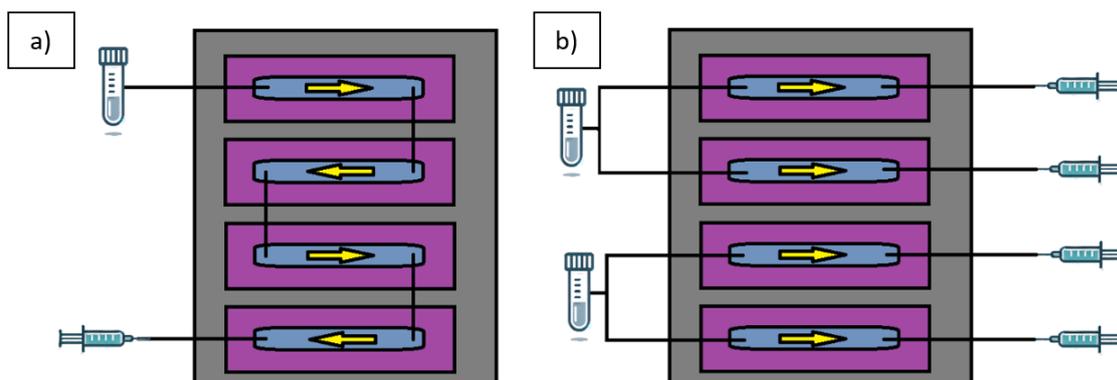


Figura 39. Tipos de flujo a través de las cámaras de microfluídica. (a): en serie. (b): en paralelo.

Como se muestra en la Figura 39, según cómo se dispongan los canales en las celdas de medida se llevará a cabo un flujo en serie (a) o en paralelo (b).

3.1. ELEMENTOS UTILIZADOS PARA EL SISTEMA DE FLUJO

Los componentes utilizados para el sistema de flujo se mencionan a continuación:

1. **Bomba de jeringa.** Aunque no forme parte de la plataforma debido a que no se fija a la base como el resto de las componentes, su presencia es indispensable para el uso del set-up de medida como elemento del sistema de microfluídica. Se debe a que es la encargada de impulsar el movimiento de los reactivos por los canales. La bomba de jeringa utilizada durante las pruebas es una NE-1000 programable, modelo de la Figura

40. Para llevar a cabo el flujo en las pruebas se programa a un flujo de succión entre 20 y 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.



Figura 40. Bomba de jeringa. (Syringe Pump - Advanced Precision Programmable Syringe Pumps - SyringePump.com, 2024)

2. **Tubos Eppendorf.** Son pequeños recipientes especialmente útiles para la manipulación y el almacenamiento de pequeñas cantidades de líquidos, generalmente entre 0.5 y 2 mililitros. Las unidades empleadas dependerán de cada prueba ya que se utilizan para almacenar las disoluciones que se están fluyendo o esperando para ser fluidas, pero generalmente tantos como disoluciones se vayan a incorporar en el experimento. Además, como aparece en la Figura 41, la plancha diseñada para líquidos ha sido impresa con la forma adecuada para que estos recipientes se sostengan en ella.



Figura 41. Tubos Eppendorf acoplados sobre el soporte impreso.

3. **Cartucho de celdas.** Esta pieza, de creación propia, permite que fluya el contenido de los Eppendorf hasta la bomba de jeringa pasando por cada uno de los sensores. Esta especie de posicionador, cuyo proceso de elaboración se detalla a continuación, requirió de los materiales que aparecen en la Figura 42 y es reutilizable si se desmontan los chips de una prueba y se incluyen los de otra.

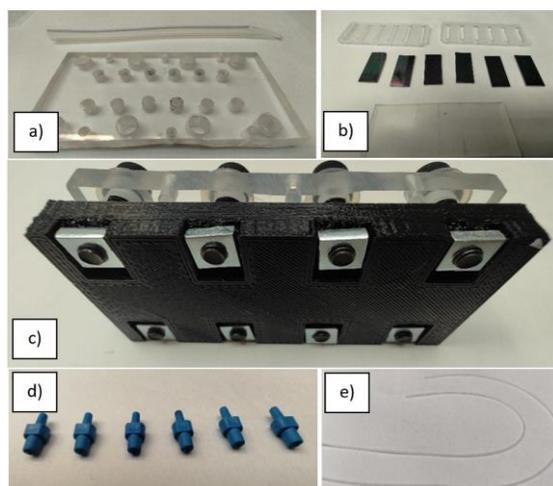


Figura 42. Componentes del cartucho de celdas. (a): Placa PMMA con agujeros para tornillos y canales. (b): Sensores y superficies de solapado. (c): base impresa con agujeros con regiones para compresión con tornillos y tuercas. (d): cabezales canal-celda. (e): micro canales.

3.2. ELABORACIÓN Y MONTAJE DE CARTUCHO DE CELDAS CON SENSORES

El proceso empezó por el montaje de los canales extraíbles. Para fabricar los canales de unión entre chips en serie, se cortaron microtubos con una longitud de aproximadamente 3 centímetros (Figura 43 (a)) y para otorgarle la propiedad de intercambiabilidad se añadieron cabezales a ambos extremos. Para los canales de entrada y salida del posicionador se cortaron tubos más largos con el objetivo de que puedan introducirse fácilmente en las disoluciones y conectarse a la bomba de jeringa, respectivamente (Figura 43 (b)).

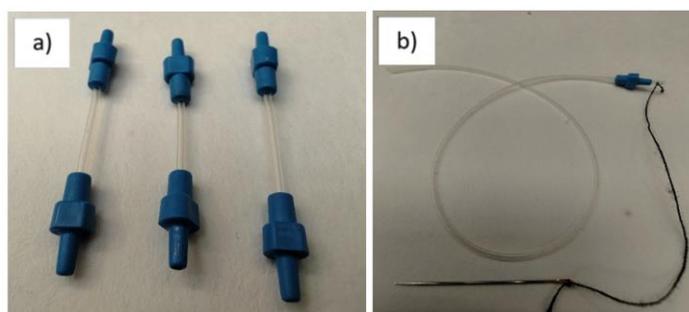


Figura 43. *Elaboración de canales. (a): entre celdas. (b): cartucho-bomba/cartucho-Eppendorf.*

El posicionador sobre el que se crearán las celdas consiste en una placa de metacrilato agujereada por la que se introducirán los canales (Figura 42 (a)) y unos tornillos que hagan presión sobre otra pieza, fabricada con impresora 3D (Figura 42 (c)). Esto tiene como objetivo solapar una región en el centro de cada capa de TiO_2 para crear así las celdas de microfluídica y que solamente puedan entrar y salir sustancias a través de los agujeros para los canales preparados. Para poder hacer los canales intercambiables entre sí y desmontables, se han utilizado las pequeñas piezas que aparecen en la Figura 42 (d), se trata de unos cabezales que favorecen el contacto canal – PMMA.

Para un contacto solapado entre el metacrilato (PMMA) del posicionador y el cabezal del canal se ha utilizado un tubo de silicona cortado a medida para que quede tapado cualquier posible hueco que pueda haber entre la base y el canal (Figura 44).



Figura 44. *Solapamiento del exceso de los agujeros de canales con tubo de silicona.*

Una vez cubiertos todos los agujeros de canales se sitúan los sensores sobre una base de plástico alargada con una disposición en batería y se cubren con otra base que incluye ranuras para posibilitar el flujo a lo largo de la capa porosa (Figura 45).



Figura 45. Posicionamiento de chips sobre la plataforma del cartucho con piezas de silicona para favorecer el solapamiento en las celdas.

Se posiciona sobre la base inferior y se cubre con la de metacrilato. Se añaden los canales y se presiona la celda con tornillos (Figura 46 (a)) hasta que se produzca el flujo, fácilmente comprobable succionando con una jeringa directamente desde un bote con agua destilada. (Figura 46 (b)).

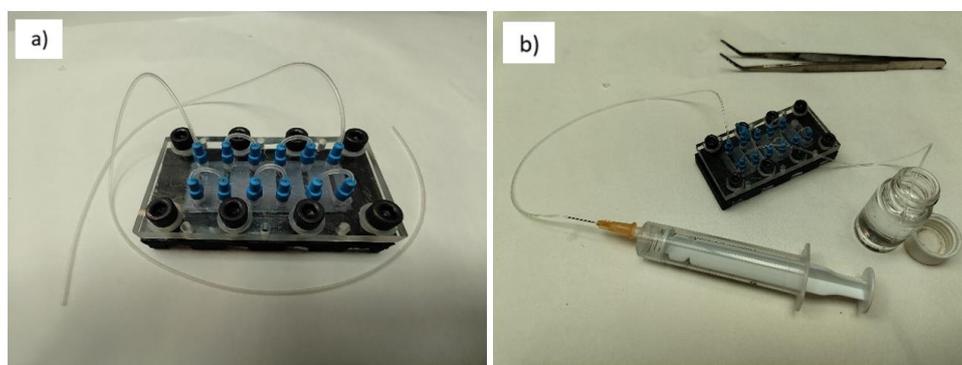


Figura 46. (a): Posicionador de celdas finalizado. (b): prueba preliminar de flujo.

Todos los elementos del cartucho son reutilizables, por lo que para cambiar de chips simplemente se desatornilla la base y se cambian los sensores por los que se vayan a utilizar, sin tener que repetir el proceso de elaboración.

4. METODOLOGÍA SEGUIDA PARA LAS PRUEBAS

Para evaluar el rendimiento de la plataforma de medida desarrollada se han llevado a cabo una serie de pruebas. El objetivo principal es garantizar que el sistema de medidas funcione de manera óptima, eficiente y confiable. Cada tipo de prueba tiene objetivos específicos que, en conjunto, aseguran que el sistema esté preparado para su uso práctico.

En el capítulo 5, que incluye los resultados y la discusión, se detallan los procedimientos y el desenlace de las pruebas:

- ✓ Pruebas iniciales de comprobación y validación del software
- ✓ Pruebas de estabilidad
- ✓ Validación del sistema de flujo
- ✓ Evaluación de la plataforma mediante medidas de índice de refracción
- ✓ Evaluación de la plataforma mediante experimentos de biosensado

CAPÍTULO 5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentan los resultados obtenidos de las pruebas realizadas para evaluar el rendimiento del sistema de medida. Se discutirán los hallazgos más relevantes y se analizarán sus implicaciones en el contexto del desarrollo y aplicación del sistema.

En la Figura 47 se han incorporado vistas de lo que sería la plataforma final desde distintos puntos.

También se presenta la experiencia que se tendría con el software de control cuando se inicia para llevar a cabo una prueba, como evaluación inicial desde la puesta en marcha del sistema.

1. PLATAFORMA Y SOFTWARE DEFINITIVOS: SIMULACIÓN DE EXPERIENCIA DEL USUARIO

Estas pruebas sobre todo buscaron asegurar que cada función del software opere conforme a las especificaciones y requisitos previamente establecidos. Básicamente se busca que los botones incluidos en la interfaz respondan de forma correcta cuando se pulsan y que la aplicación no entre en conflicto en ningún momento. De esta forma, se comprueba que el control y las operaciones del hardware incluido en la plataforma era el correcto y que la parte de cálculo y visualización de resultados también sea correcta.

Para ello se simuló la experiencia que tendría un usuario desde que ejecuta la aplicación hasta que termina una simulación de una prueba de medida. Esta prueba se realizó con la definición de muestras no reales para asegurar la operabilidad básica.

Se evaluaron:

- ❖ **El software responde correctamente a las entradas del usuario a lo largo del proceso de configuración de pruebas**
- ❖ **El hardware funciona de forma correcta: el motor se mueve según las órdenes recibidas y posiciona de forma correcta la plataforma y el espectrómetro captura datos y los transmite correctamente al software**
- ❖ **Mejora de espectro con la adquisición y el preprocesado (correcciones y normalización)**
- ❖ **Procedimiento de búsqueda de chips**
- ❖ **Función de ajuste (*fitting*)**

En la Figura 47 se puede apreciar el aspecto final del set-up de medida diseñado para llevar a cabo pruebas con los sensores ópticos basados en capas mesoporosas de TiO₂ en disolución presentados en el capítulo 2.

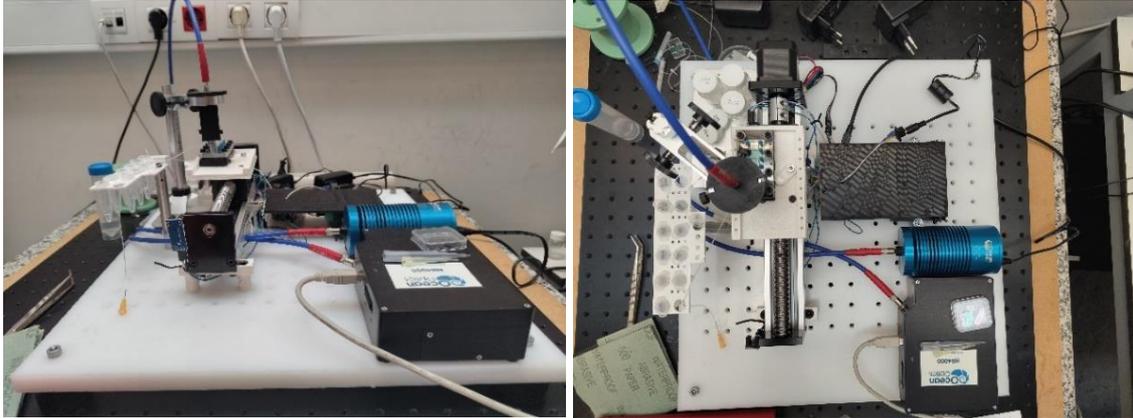


Figura 47. Apariencia final de la plataforma de medida.

Para su alimentación se requiere de dos enchufes: uno para las alimentaciones de la fuente de luz y otro para el driver. Una vez se conecten estos a la red, lo que se deberá alimentar son el espectrómetro y el Arduino, que se conectan mediante USB a puertos del PC como canal de comunicaciones.

Se comprueba que la fuente de luz funciona correctamente observando que se enciende con la activación del interruptor y que el driver se encuentra alimentado con una luz que incorpora como indicador.

Ahora ya se puede arrancar el programa de control de pruebas. Si el espectrómetro se encuentra conectado a un puerto disponible del equipo aparecerá la interfaz principal de configuración. En los ejes del panel de configuración básica de adquisición aparecerá el primer espectro capturado tras el arranque o puesta en marcha.

Se puede activar la opción de visualizado en tiempo real para configurar los parámetros de adquisición. Por ejemplo, los que se han utilizado para la mayoría de las pruebas son: tiempo de integración de 10000 μ s, promediado temporal (*Scans To Average*) de 10 escaneos y promediado espacial (*Boxcar window*) con ventana con semianchura de 3 datos.

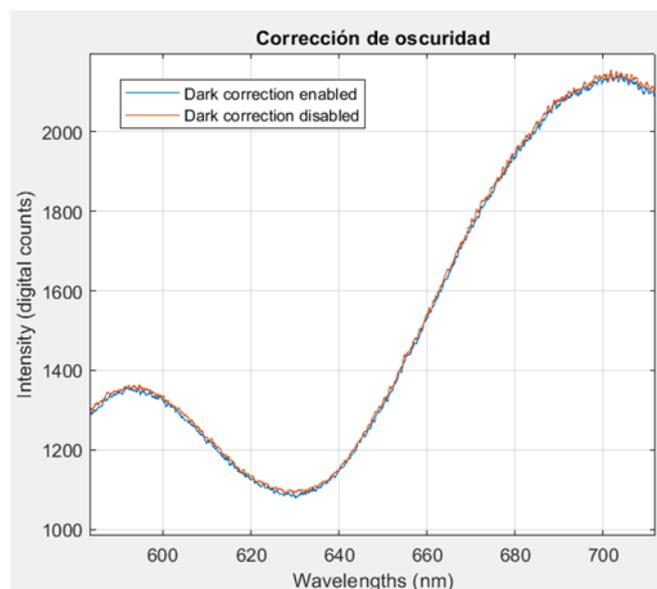


Figura 48. Resultado de algoritmo de corrección de oscuridad.

Se apaga la fuente de luz y se captura el espectro en oscuridad que quedará guardado en el sistema. Si se prefiere, se puede importar. La Figura 48 muestra cómo se ve afectado el espectro adquirido si activamos esta opción de corrección.

El siguiente paso es normalizar el espectro. Capturamos la respuesta espectral de un espejo de aluminio o la importamos del equipo. Se tiene que ajustar el tiempo de integración para que no saturate. En la Figura 49 aparece cómo se ve el espectro de aluminio y el de una muestra porosa una vez se ha normalizado con este.

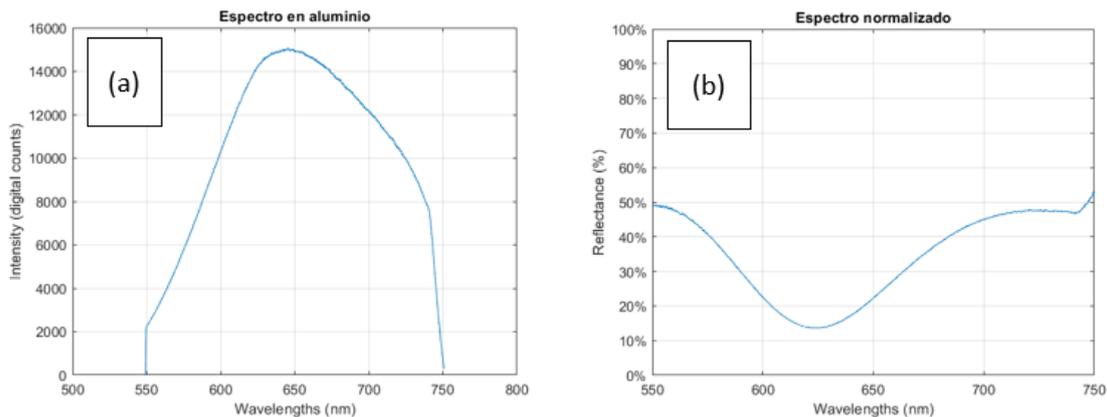


Figura 49. Resultado de algoritmo de normalización. (a): espectro de referencia (aluminio). (b): espectro normalizado.

Ahora se prueba la conexión con el motor. Intentamos establecer la conexión software-motor a través del botón con el símbolo del Arduino. Si el puerto que está seleccionado es al que se ha conectado el circuito del motor y todo funciona correctamente, se actualizará el panel al de la Figura 50 y la plataforma móvil se moverá hasta posicionarse en el origen. De otro modo, por la ventana de información aparecerá un mensaje de conexión fallida y se deberá cambiar de puerto con la apertura de la ventana auxiliar de configuración del motor, y volver a intentarlo.

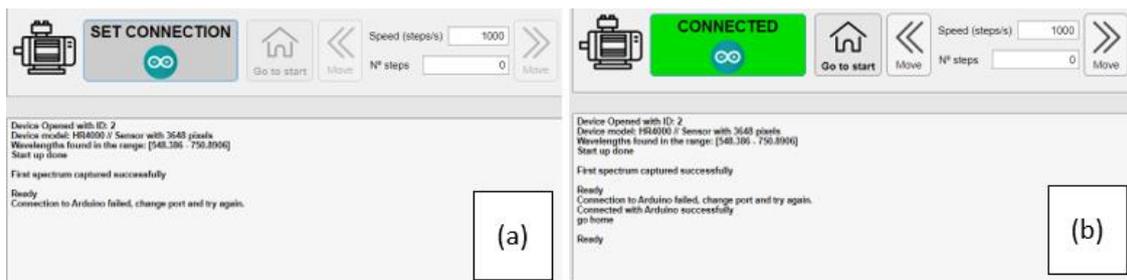


Figura 50. Intentos de establecer conexión con Arduino desde el panel de control del motor. (a): conexión fallida. (b): conexión establecida

El siguiente paso es definir la posición donde se encuentran los sensores en el raíl respecto al origen. Para ayudar a encontrar la posición con más facilidad se puede importar o capturar un espectro y utilizarlo como patrón. Para capturar, desde el panel del control del motor, movemos la plataforma hasta situar uno de los chips debajo de la fibra en la zona de medida y capturamos este espectro como patrón. La diferencia entre una región con chip y una sin se representó en la Figura 35 y se utilizará a favor para encontrar los sensores.

Seleccionamos los límites de búsqueda para acotar el rango en el que se calcularán los parámetros de búsqueda de sensores y, tras introducir un número de pasos totales a mover la plataforma desde el origen, se obtendrán gráficos como los de la Figura 51. El número de pasos a dar dependerá del número de muestras que se hayan incorporado, en el caso de las pruebas iniciales se hizo uso de 6 chips de TiO_2 pegados sobre una placa de metacrilato que simularía ser la celda de medidas empleada en los experimentos, por lo que un número de pasos de 16000 sería suficiente.

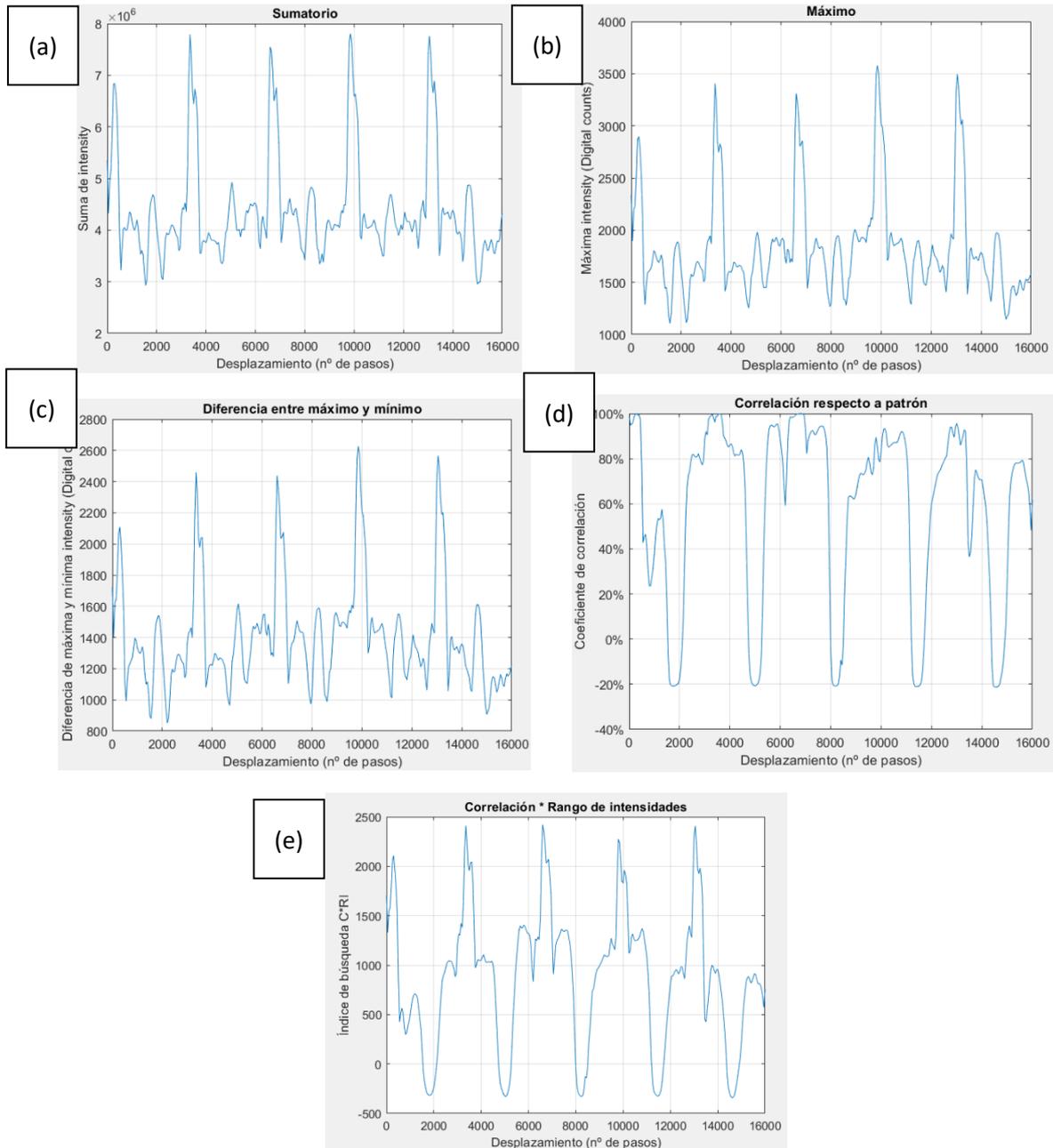


Figura 51. Parámetros de búsqueda de posiciones de sensores. (a): Sumatorio. (b): Máximo. (c): Máximo - mínimo. (d): Correlación respecto a un patrón. (e): Índice con correlación y máx – mín

Analizando los parámetros, se puede afirmar que la mayoría pueden ser útiles para identificar las regiones con los sensores. Según cada prueba uno lo será más que otro: en este caso, la correlación no resulta útil por la elevada similitud de los espectros entre ellos a lo largo del

recorrido, por lo que esta medida resulta algo ambigua. El sumatorio y el máximo son similares entre sí, aunque por lo general se ha observado que el máximo acentúa más los espectros con cambios de intensidad entre longitudes de onda más pronunciadas. Más lo hace todavía la diferencia entre el máximo y el mínimo, que se queda con la amplitud del rango de intensidades presente en cada espectro.

Gracias al parámetro creado mediante la correlación y la diferencia entre máximo y mínimo es posible anular valores de máximos locales que indiquen erróneamente la posición de un sensor; además de acotar la región del sensor donde definir la posición a aquella que contenga el espectro con mayores lóbulos. La desventaja de este parámetro es que para acceder a él se debe almacenar un patrón previo asumiendo que las respuestas espectrales de los sensores serán similares entre ellas.

Seleccionar los máximos desde el parámetro deseado y definirlos como posiciones de sensores, tal y como aparece en la Figura 52.

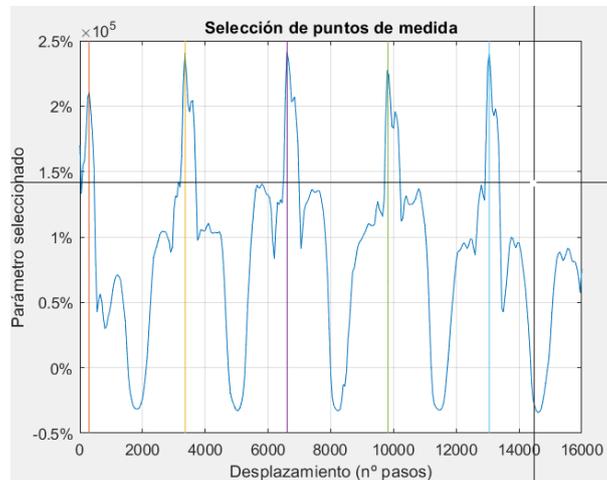


Figura 52. Selección de puntos para definir posiciones a medir. Índice de correlación y rango elegido como parámetro.

Ahora ya se pueden incorporar los valores necesarios para realizar el tracking de picos de los sensores. Para utilizar el tracking seleccionamos si es un máximo o mínimo e indicamos los límites de búsqueda del pico (Figura 53). Aunque esta longitud de onda realmente no es la referencia en la prueba, debido a que se define automáticamente durante los primeros ciclos de experimento, sirve para garantizar que el ajuste se realiza de forma correcta y precisa. Una vez estén definidas las características de todos los chips activos se podrá iniciar la prueba.

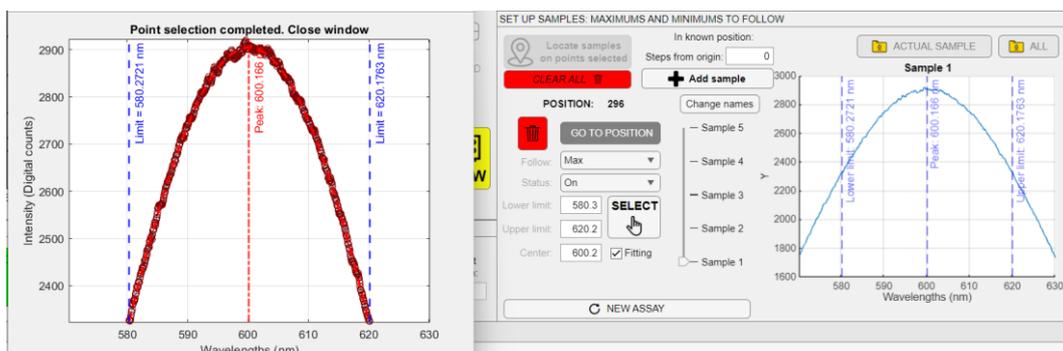


Figura 53. Definición de características de medida para cada sensor. Uso de función fitting.

Se abre la ventana de experimentos, para empezar la prueba de pulsará el botón verde.

A continuación, como resultado final de estas pruebas iniciales se ha incluido una demostración de cómo mejoran los resultados del experimento con la función de *fitting* activada (Figura 54). Por ello se ha empleado para todas las pruebas que proceden, con la evidente mejora de la relación señal ruido que proporciona.

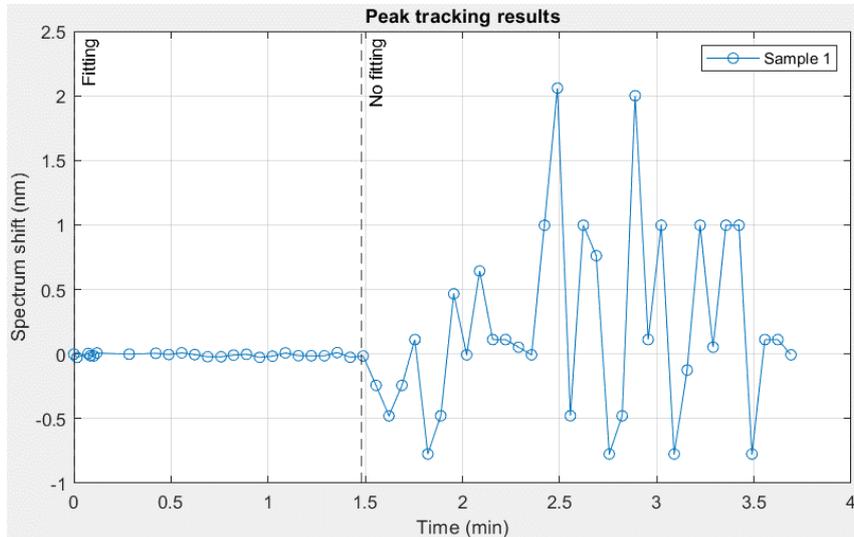


Figura 54. Comparación de precisión en la medida con el *fitting* activado y desactivado a partir de 1 minuto y 30 segundos de experimento

2. PRUEBAS DE ESTABILIDAD DEL SISTEMA DE MEDIDA

El objetivo es evaluar el comportamiento del sistema bajo condiciones de uso prolongadas y cargas de trabajo sostenidas. En cargas sostenidas también se prueba el software porque en cada ciclo se va saturando más la interfaz de resultados con el aumento de datos desde el inicio de la prueba. Se buscan también errores del programa que puedan aparecer con el tiempo, indetectables durante las pruebas iniciales.

De cara al motor, probar movimientos continuos del motor durante un período prolongado para comprobar si hay signos de sobrecalentamiento o desgaste y descartar cualquier posible desviación que pueda existir con el tiempo. Con estas pruebas también se asegura que el espectrómetro no pierda rendimiento en sus operaciones.

Para llevarlas a cabo, se fijan distintas muestras en la plataforma sin ningún flujo y se inicia un experimento durante un largo período de tiempo (2 o 3 horas) con expectativas de que se comporte de forma estable y sin derivas.

Se evaluará así:

- ❖ Operación estable del sistema con usos de tiempo prolongados
- ❖ Comportamiento del software según lo esperado ante grandes cargas de trabajo sostenidas

Se realizaron distintas pruebas de estabilidad en las que se obtuvieron distintos grados de deriva. Se han incluido dos casos donde se midió sin flujo sobre 3 sensores, diferentes entre pruebas. Estos fueron inmovilizados con un metacrilato y se dejaron durante horas.

Aunque se obtuvieron distintos grados de deriva, estas son independientes entre los sensores de la misma prueba, como se observa en los dos resultados presentados en la Figura 55. En particular, en la Figura 55 (b) se puede ver claramente que el espectro de la muestra 1 no muestra una tendencia a desplazarse hacia longitudes de onda mayores tan pronunciada como las demás. En la Figura 55 (a), incluso se observa un caso en el que la deriva no es constante; y en un instante (minuto 80) mientras que en algunas muestras aumenta el índice de refracción, en otras disminuye.

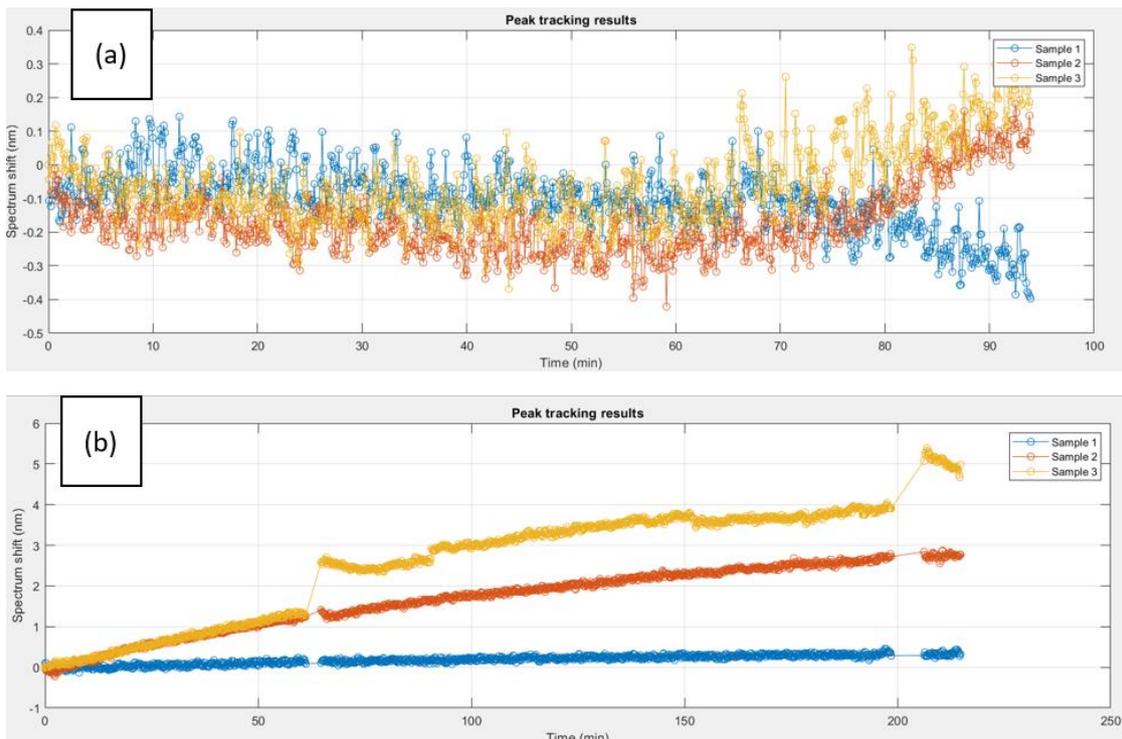


Figura 55. Resultados desplazamiento – tiempo de pruebas de estabilidad.

Esto descarta que sea un problema de cálculo en el algoritmo del seguimiento de los picos, y como principales sospechas se tiene una alta sensibilidad del sistema a cambios de temperatura o inestabilidades presentes según las estructuras porosas.

Por lo demás, se descarta que el software falle llegado a un cierto punto y queda demostrado que cumple los ciclos de forma robusta ante altas cargas de trabajo.

Por otra parte, también se estudió si se iba acumulando retardo entre la toma de un dato y el siguiente. Este parámetro podría ser creciente a lo largo de la prueba debido a que, por ser un proceso en tiempo real, cada vez hay más datos que tener en cuenta a la hora de mostrar los resultados en pantalla. Había que asegurar que el tiempo mínimo necesario para cada ciclo no aumentaba de forma descontrolada.

En la Figura 56 se puede comprobar que, si se observa la diferencia entre los tiempos adyacentes en los que ha tenido lugar cada ciclo, se produce un aumento progresivo con el

tiempo. Sin embargo, no es un tiempo muy elevado ya que durante dos horas se aprecia que aumenta de 0.27 a 0.34 minutos: un total de 4 segundos.

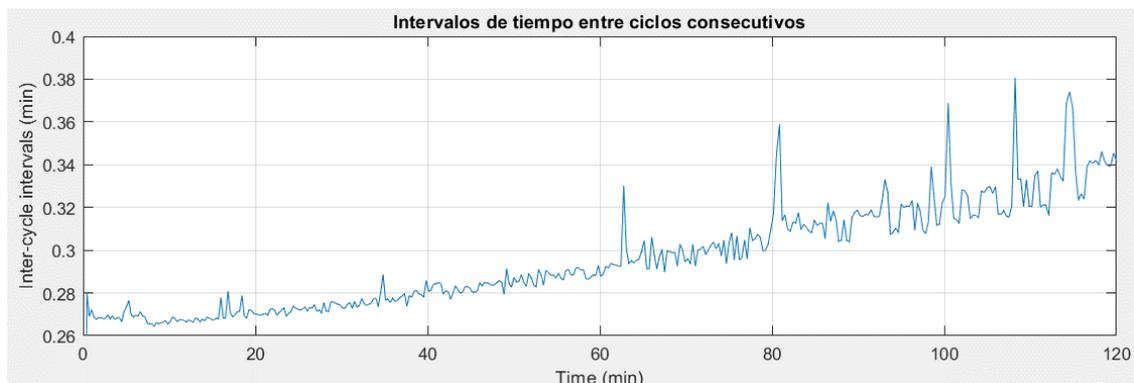


Figura 56. Evolución del intervalo entre un ciclo y el siguiente a lo largo de una prueba.

3. PRUEBAS DE VALIDACIÓN DEL SISTEMA DE FLUJO

En este caso se verifica que el sistema de flujo funcione correctamente. El sistema consiste en los canales y celdas fabricadas para el paso de sustancias disueltas en líquido a través de los sensores, contenidos en los posicionadores. Las disoluciones fluirán desde los tubos Eppendorf hasta la bomba de jeringa como se indica en la Figura 39.

El objetivo es asegurar que se permite el paso adecuado de soluciones a través de los sensores sin bloqueos ni fugas, especialmente a través de las celdas de microfluídica. Además, se analiza el alcance y las limitaciones de los posicionadores creados modificando la distribución de los canales en el cartucho para comprobar la propiedad de canales intercambiables que modifiquen el rumbo del líquido.

Según como se distribuya el líquido a través de los canales estaremos hablando de flujo en serie o paralelo. Como solamente se disponía de una bomba para la succión, se realizaron pruebas en serie tanto en este apartado como en el resto de los casos para la evaluación de la plataforma siguiendo el esquema de la Figura 39 (a).

Las pruebas para validar el sistema de flujo en serie consistieron en el paso a través de este de varios mililitros de DIW a diferentes velocidades: 20 μ L/min - 200 μ L/min. Se conectaban los canales del cartucho de chips a la bomba y se succionaba el agua desde el Eppendorf una vez se habían apretado lo suficiente los tornillos del posicionador y se comprobaba manualmente con una jeringa que se producía flujo.

Los criterios de éxito eran:

- ❖ Flujo de disoluciones a través de celdas continuo
- ❖ Inexistencia de fugas o bloqueos
- ❖ Capacidad de modificar el circuito que lleva a cabo la disolución en el posicionador

Las disoluciones fluyeron de manera continua a través de las celdas de microfluídica sin interrupciones, lo que confirma la eficacia del diseño de los canales y celdas. Tampoco se detectaron fugas ni bloqueos en el sistema durante las pruebas, lo cual es un indicativo de la integridad y calidad del ensamblaje y de los materiales utilizados en los canales y celdas.

Por si no fuera poco, el sistema demostró ser flexible y adaptable, permitiendo modificar la distribución de los canales en el cartucho de manera efectiva. Se comprobó esta propiedad modificando la disposición de los canales de forma que en lugar de pasar en serie por 4 chips pasaran por 3, 5 u otro número entre 1 y 6 (número máximo de sensores en el cartucho). Esta capacidad de ajuste asegura que el sistema puede ser adaptado para diferentes configuraciones de flujo, según se requiera, sin que disminuya la calidad con el tiempo.

La limitación es que no se probó el sistema de flujo con una distribución de canales en paralelo por la falta de otras bombas de succión.

4. EVALUACIÓN DE LA PLATAFORMA MEDIANTE MEDIDAS DE ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Sirven para comprobar la precisión y la exactitud del sistema mediante la evaluación de la reproducibilidad y la sensibilidad en la captura y análisis de datos.

Se evalúa la capacidad del sistema para detectar cambios pequeños en las condiciones de prueba, como ligeras variaciones en la concentración de soluciones. Se realizan pruebas repetidas en serie con las mismas condiciones para verificar la consistencia del sistema y analizar derivas o funciones de pérdida de sensibilidad desde la muestra inicial a la final. También se estudian las fuentes de ruido presentes que contaminan los resultados.

Para realizar este procedimiento, se llevaron a cabo pruebas de sensibilidad utilizando 6 capas mesoporosas de TiO_2 ensambladas en celdas posicionadas en un cartucho fabricado según se detalla en la sección 3 del capítulo 4 tras validar el sistema de flujo. Se midió el desplazamiento del espectro de reflectividad de las capas ante variaciones en la sustancia fluida. En este caso, alternando concentraciones de agua desionizada (DIW) y etanol.

Las disoluciones de etanol fueron preparadas en el laboratorio y se llevaron a cabo repetidos experimentos de flujo en serie con diferentes etapas a diferentes concentraciones de etanol (desde 5% hasta 15% de volumen) para demostrar reproducibilidad, descartar resultados alterados por defectos en los chips y analizar el retardo del escalón y la degradación de la sensibilidad inter-muestra en pruebas de flujo en serie.

Para caracterizar la sensibilidad y el ruido se utilizaron los siguientes parámetros o se evaluó de esta forma:

- ❖ Ruido. Sigma
- ❖ Sensibilidad global del sistema
- ❖ Límite de detección. LOD
- ❖ Análisis de la respuesta instantánea
- ❖ Caída o aumento de la sensibilidad en flujo en serie

Para la primera prueba se montó un cartucho con 6 chips en serie reciclados de los experimentos de estabilidad para ver realmente si se apreciaba el cambio de índice de refracción antes de caracterizar la sensibilidad y el límite de detección.

Para el correcto seguimiento de los picos, se seleccionaron aquellos más pronunciados que se encontraban en el rango de medida del espectrómetro.

El resultado fue el gráfico de la Figura 57 (a) con una deriva presente en todos los sensores que denota cierta inestabilidad en el experimento. La prueba se llevó a cabo fluyendo concentraciones de EtOH de 5%, 10% y 15% aunque con unos desplazamientos espectrales influenciados por esta tendencia general hacia longitudes de onda menores. Aunque a mayores concentraciones de EtOH el desplazamiento relativo es mayor, globalmente resulta incluso menor. En algunas muestras, como es el caso de la 3, puede apreciarse la mala calidad de medida fruto del desgaste presente en las estructuras.

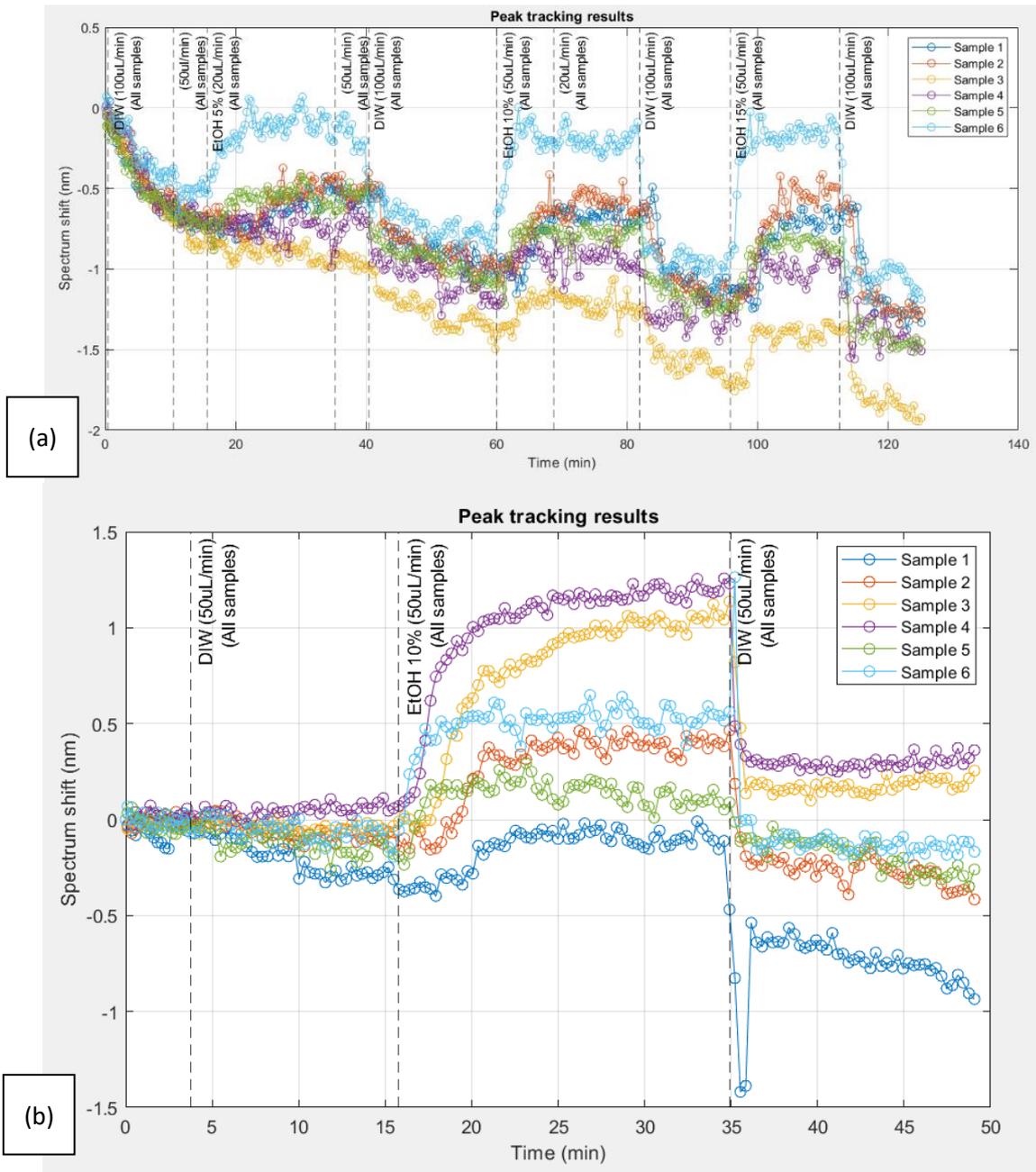


Figura 57. Resultados de primeras pruebas de cambio de índice de refracción. (a): muestras de TiO_2 usadas. (b): prueba con algunas muestras de TiO_2 usadas y algunas nuevas (3 y 4).

Por este motivo, se repitió el experimento cambiando las muestras del centro del cartucho (3 y 4). Con este experimento se confirmó que esto era lo que provocaba la caída constante del índice de refracción en el chip al realizar el experimento con el cartucho conteniendo sensores usados (1, 2, 5 y 6) y sensores nuevos (3, 4). Las diferencias quedan a la vista en el gráfico de desplazamientos de la Figura 57 (b) donde siguió la deriva en las estructuras porosas previas; pero no en las nuevas, donde además el desplazamiento del espectro resultó ser de mayor magnitud.

Este suceso sugirió la necesidad de comparar el espectro de reflectividad entre las estructuras de TiO_2 nuevas y usadas. Como se muestra en la Figura 58, se encontró una diferencia significativa entre ellos. Se puede identificar la variación entre el espectro de una muestra usada ($n^{\circ}1$ del experimento), una nueva ($n^{\circ}3$ del experimento), y el espectro en aire.

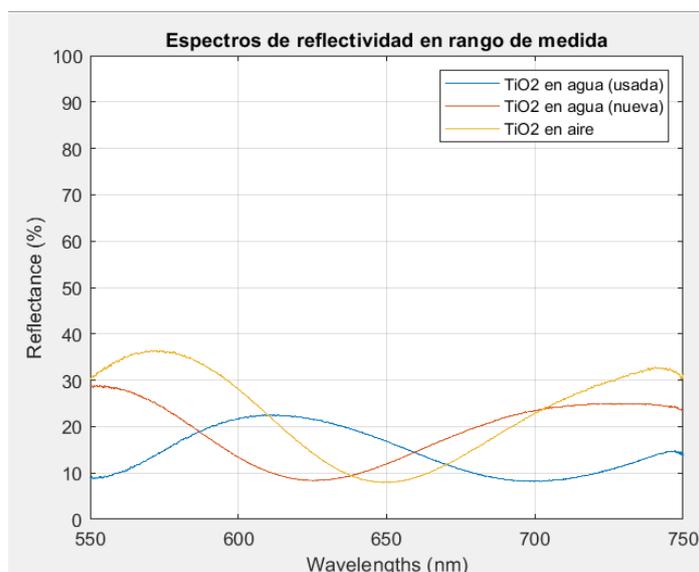


Figura 58. Cambio de respuesta espectral según medio y calidad de la muestra.

Una vez resuelto el problema de la deriva y confirmar que era fruto del estado de los propios chips se inició la prueba de evaluación con la preparación de 4 chips completamente nuevos extraídos directamente de una oblea de TiO_2 .

Se seleccionó el mínimo presente alrededor de los 620 nm en todos los sensores ya que se trata del pico más pronunciado del espectro de las estructuras de TiO_2 en medio acuoso entre las longitudes de onda de 550 y 750 nm.

Se puede observar en la Figura 59 (a) que las moléculas de etanol pueden entrar perfectamente en la superficie porosa ya que se produjo un cambio espectral tan pronto como el líquido fue alcanzando los sensores, además se ve claramente como va llegando de uno a otro con un retardo medible.

Para caracterizar la sensibilidad se midió el desplazamiento de longitud de onda, partiendo desde un medio de DIW ($n_{\text{DIW}} = 1.33316$ RIU), para el cambio del índice de refracción inducido por la solución de EtOH al 10% ($n_{\text{EtOH5\%}} = 1.33795$ RIU) (Scott, 1946). En total un incremento del índice de refracción de $\Delta n = 4.79 \cdot 10^{-3}$. Los desplazamientos de la Figura 59 (b) se representan en la Tabla 1 junto a la sensibilidad de cada sensor, calculada como $\Delta\lambda/\Delta n$.

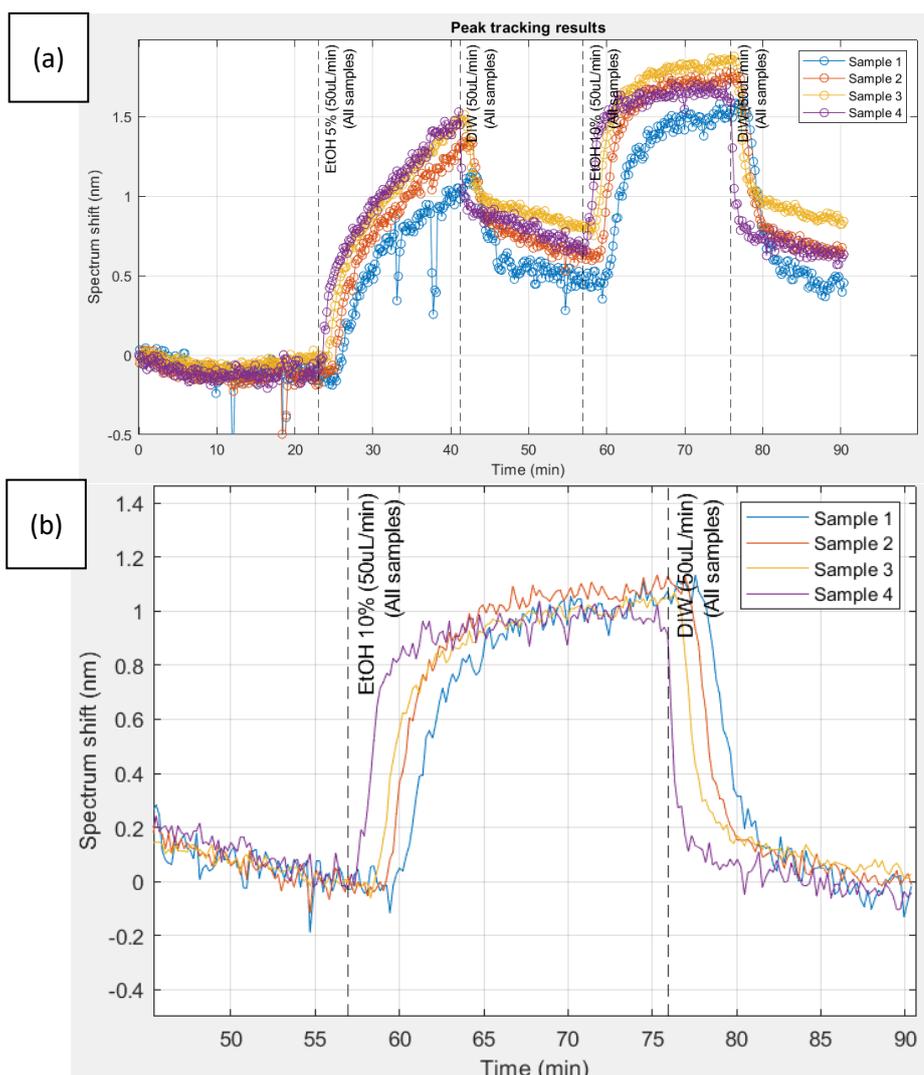


Figura 59. Prueba final de cambio de índice de refracción para caracterizar sensibilidad del sistema. Flujo de EtOH a 5 y 10%. (a): prueba completa. (b): escalón DIW – EtOH 10%.

Cabe destacar que en la prueba de la Figura 59 la disolución entra por el chip más alejado al origen (Sample 4) y los va recorriendo todos hasta el inicial (Sample 1), desde donde irá a la bomba. Para calcular el desplazamiento espectral se toma el momento previo al que se introduce la nueva disolución (líneas discontinuas de la Figura 59 (b)).

Tabla 1. Resultados de sensibilidad obtenidos en la prueba de cambio de índice de refracción

| Chip | Desplazamiento (pm) | Sensibilidad (nm/RIU) |
|---------------|---------------------|-----------------------|
| Sensor 1 | 1134.4 | 237 |
| Sensor 2 | 1134.1 | 237 |
| Sensor 3 | 1065.4 | 222 |
| Sensor 4 | 1017 | 212 |
| GLOBAL | 1087.7 | 227 |

Tras analizar los resultados recogidos en la Tabla 1, se ha determinado una sensibilidad del índice de refracción global ($\Delta\lambda/\Delta n$) de 227 nm/RIU (Unidades de índice de refracción). Sin embargo, los hallazgos obtenidos a partir de la Figura 58 demuestran que la sensibilidad depende, en gran medida, de la calidad de la muestra.

Se puede apreciar un cierto aumento de la sensibilidad en los sensores conectados en serie. Puede intuirse fruto de la acumulación de algunas moléculas y que en el momento de fluir DIW se arrastran de un sensor al siguiente. Sin embargo, este efecto es mínimo por lo que tomaremos como sensibilidad del sistema la media global.

La alta sensibilidad y la rápida respuesta óptica concuerdan con una capa mesoporosa de TiO₂ que muestra una alta porosidad, tamaños de poro suficientemente grandes y una notable interconectividad de poros. A pesar de ser alta, la sensibilidad aparente obtenida es algo menor que la reportada para otros sustratos porosos más típicos cuando se trabaja en el rango de luz visible, como en los casos de silicio poroso (por ejemplo, ~350 nm/RIU (Tsai et al., 2018)) u óxido de aluminio anódico (por ejemplo, ~450 nm/RIU (Lee et al., 2015)).

Además, incluso si lo comparamos con la sensibilidad del set-up original, donde se trabajaba con capas de TiO₂ individualmente, también disminuye la sensibilidad (~260 nm/RIU) si comparamos con experimentos realizados siguiendo este mismo lóbulo espectral (~620 nm) (Ortiz De Zárate et al., 2022). Valor ligeramente menor pero asumible si tenemos en cuenta el aumento de complejidad del nuevo cartucho de celdas, la incorporación del motor y el flujo en serie llevado a cabo. Además, hay que destacar que, con la incorporación de nuevas medidas multiplexadas, en el caso de medidas de cambio de índice de refracción se aumenta la potencia estadística por el aumento del tamaño muestral. La consecuencia es una mayor capacidad para detectar un efecto verdadero y separarlo del ruido incluido en la medida.

Respecto al ruido presente, se ha calculado la sigma y a partir de esta el límite de detección (LOD) definido como $3\sigma/S$, donde S se toma como la sensibilidad del sensor. La región analizada de los resultados ha sido la línea base de DIW tras el flujo de la disolución del 5% de EtOH y los resultados se han recogido en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de límite de detección tras la prueba de cambio de índice de refracción.

| Chip | Sigma (pm) | LOD (RIU) |
|---------------|-------------|--|
| Sensor 1 | 62.3 | $7.88 \cdot 10^{-4}$ |
| Sensor 2 | 33.6 | $4.25 \cdot 10^{-4}$ |
| Sensor 3 | 16.3 | $2.2 \cdot 10^{-4}$ |
| Sensor 4 | 30.6 | $4.33 \cdot 10^{-4}$ |
| GLOBAL | 35.7 | $4.72 \cdot 10^{-4}$ |

Como resultado, se obtienen unos parámetros de ruido muy variables, lo que denota la dependencia de un buen alineamiento de la fibra con el sensor y de la calidad de la estructura porosa. Como resultado global, se ha obtenido $\sigma = 35.7$ pm, valor que en comparación con el del set-up inicial empeora ($\sigma = 9.8$ pm) (Ortiz De Zárate et al., 2022). La razón principal recae en

el ruido que se le ha incorporado a la medida del desplazamiento espectral en consecuencia de algunas de las novedades que tiene la plataforma, teniendo nuevas fuentes de ruido como vibración del motor, gran tamaño de las celdas, imprecisiones en el número de pasos unidos a las anteriores como errores de ajuste (fitting), heterogeneidades en la muestra o ruido en la medida del espectrómetro.

Como consecuencia, tenemos un LOD que aumenta hasta los $4.72 \cdot 10^{-4}$. Si contrastamos con el antiguo, obtenido con el seguimiento del lóbulo de esta misma región, resulta unas 4 veces mayor ($1.13 \cdot 10^{-4}$ RIU) (Ortiz De Zárate et al., 2022). Este resultado, aparentemente inferior, debe considerarse en contexto, ya que se ha obtenido sin aplicar métodos de suavizado posteriores, sin utilizar parámetros de ajuste optimizados, y sin un exhaustivo procedimiento de selección de chips, prácticas que seguramente se emplearon en las fuentes consultadas para la publicación de los artículos.

Finalmente, se estudia el efecto del flujo en serie y el cartucho de celdas sobre la rapidez de respuesta de los sensores al cambio de índice de refracción. Para ello se ha analizado el incremento de longitud de onda en un desplazamiento respecto al tiempo que tarda en completarse ($\Delta\lambda/\Delta t$) dicho escalón, que resulta aproximadamente un 85% del desplazamiento total. Se ha utilizado el cambio de medio de DIW a EtOH 10% (aproximadamente minuto 60 en la Figura 59 (b)) y los resultados figuran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de velocidad de respuesta tras la prueba de cambio de índice de refracción

| Chip | Duración del escalón (min) | Desplazamiento en el escalón (pm) | $\Delta\lambda/\Delta t$ (pm/min) |
|----------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Sensor 1 | 5.72 | 961 | 168 |
| Sensor 2 | 3.92 | 957 | 244 |
| Sensor 3 | 4.27 | 916 | 215 |
| Sensor 4 | 2.85 | 880 | 309 |

Esta pérdida de instantaneidad se incrementa a medida que las disoluciones atraviesan los diferentes sensores. En el primer sensor, la respuesta es más inmediata, pero conforme el flujo avanza hacia los sensores siguientes, la rapidez de respuesta disminuye. Esto se debe a la difusión que ocurre en los canales, cuya sección es relativamente grande en comparación con los tubitos que conectan el cartucho a la bomba/Eppendorfs. Esta diferencia en las secciones provoca que las disoluciones se mezclen entre ellas, resultando en un mayor tiempo para que la disolución anterior desaparezca completamente a medida que se avanza por los sensores. Como consecuencia, se observa un retraso en la respuesta del último sensor en comparación con el primero.

5. EVALUACIÓN DE LA PLATAFORMA MEDIANTE PRUEBAS DE BIOSENSADO

Una vez finalizadas todas las pruebas de validación de la plataforma descritas hasta el momento, se estudió el rendimiento del sistema con experimentos más avanzados basados en aplicaciones específicas de biofuncionalización y detección de proteínas.

Para la realización de este tipo de pruebas, como sustancia disolvente no se ha utilizado DIW a diferencia de las anteriores. Para no comprometer la eficiencia y precisión de estos procesos, se requiere el uso de soluciones con unas propiedades especiales conocidos como *buffers*.

Un buffer es una solución que resiste cambios en su pH cuando se añaden pequeñas cantidades de ácidos o bases. Está compuesto por una mezcla de un ácido débil y su base conjugada, o una base débil y su ácido conjugado. Los buffers son esenciales en muchas aplicaciones biológicas y químicas debido a su capacidad para mantener un pH constante, que es crítico para la actividad y estabilidad de muchas biomoléculas.

Se lleva a cabo una prueba de comparación de técnicas de incubación, jugando con el tipo de buffers y concentraciones, de proteína A/G (intermediaria) para la inmovilización de anticuerpos. La proteína A/G (AGp) como proteína intermediaria proporciona numerosas ventajas debido a su capacidad para orientar adecuadamente los anticuerpos y mejorar la estabilidad y especificidad del sistema.

Por esta razón, interesa introducirla en la superficie de sensado previo al flujo del anticuerpo. La prueba presentada en la Tabla 4 tiene como objetivo optimizar la técnica de incubación de cara a favorecer una superficie con más densidad de biomoléculas receptoras (anticuerpos).

Se lleva a cabo la incubación con 2 tipos de buffers (0.1M MES y PBS 1X) para inmovilizar la proteína A/G (a distintas concentraciones) en el chip y posteriormente se realiza una prueba en flujo de anticuerpos (antiBSA).

La planificación de las condiciones de incubación de los sensores que se colocarán en el posicionador se hizo según la Tabla 4, considerando duplicados.

Tabla 4. Planificación experimento de optimización de inmovilización de anticuerpos con A/G

| Chip | Incubación |
|----------|-----------------------|
| Sensor 1 | AGp 5 ug/ml MES – 2h |
| Sensor 2 | AGp 20 ug/ml MES – 2h |
| Sensor 3 | AGp 20 ug/ml PBS – 2h |
| Sensor 4 | AGp 5 ug/ml MES – 2h |
| Sensor 5 | AGp 20 ug/ml MES – 2h |
| Sensor 6 | AGp 20 ug/ml PBS – 2h |

Se incubó en ambiente húmedo para que no se seque la gota (Figura 60), se enjuaga en su mismo buffer y se seca con la ayuda de una pistola de aire.



Figura 60. Chips reservados en ambiente húmedo durante el proceso de incubación.

Luego se lanzó la prueba donde se fluye el anticuerpo (Ab) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para comprobar con qué condiciones se queda más adherido a la superficie. Para esta única concentración de Ab en un único buffer por los 6 (PBS) los resultados se encuentran en la Figura 61.

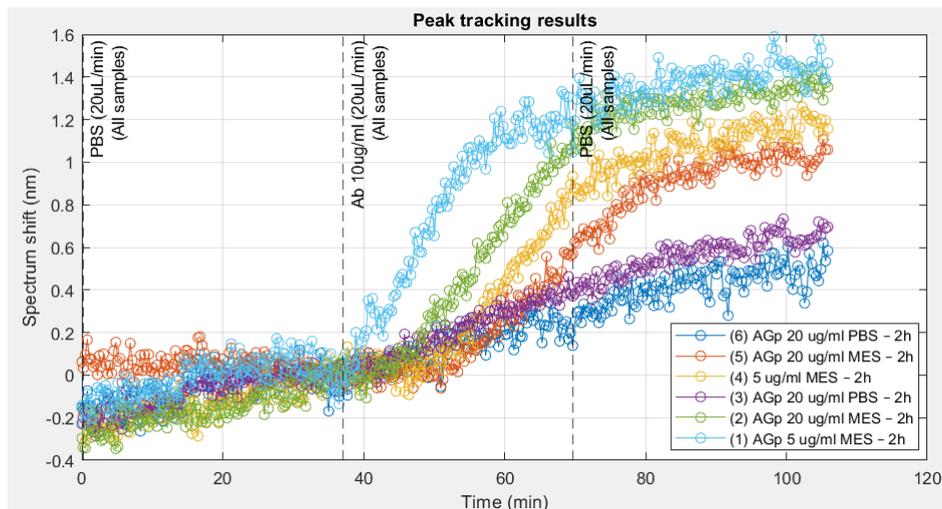


Figura 61. Resultados de la prueba de funcionalización de superficies de sensado con múltiples condiciones de proteína inmovilizadora A/G (flujo del Ab en PBS).

En los sensores donde la AGp ha sido incubada en MES ha habido una mejor inmovilización del anticuerpo. Desde el minuto 40 hasta el 70 donde se vuelve a fluir PBS se va acumulando en la estructura porosa de los sensores 1, 2, 4 y 5. El 3 y el 6, en cambio, no experimentan esta progresiva adhesión del biorreceptor en la superficie.

Adicionalmente, se repite el experimento utilizando MES como buffer en el que tenemos el Ab, obteniendo los resultados de la Figura 62. Estos desplazamientos no son significativos debido a que ya se encontraba, en la mayoría de los sensores, la superficie saturada de anticuerpos. Como consecuencia, no hay demasiado cambio de índice de refracción. Por este motivo, esta segunda parte del experimento no se tuvo en cuenta de cara a futuras pruebas.

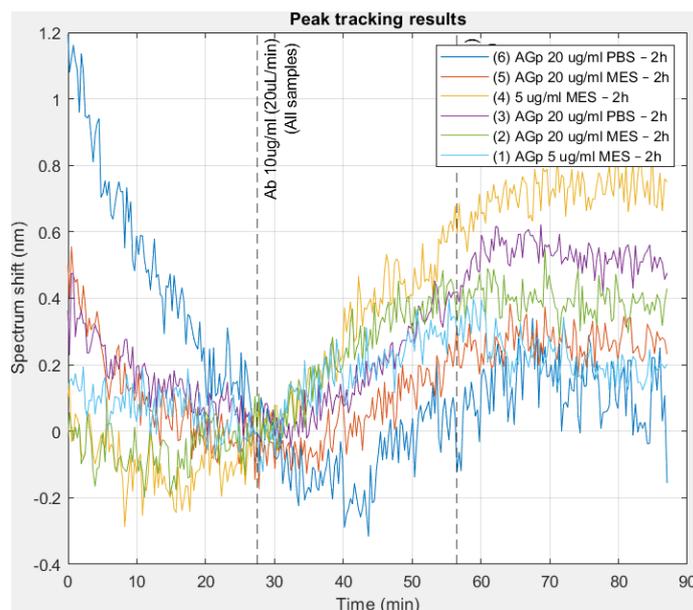


Figura 62. Resultados de la prueba de funcionalización de superficies de sensado con múltiples condiciones de proteína inmovilizadora A/G (flujo del Ab en MES).

Ciñéndonos a los mejores resultados de inmovilización obtenidos en la primera prueba, se planificó una segunda en la que se busca optimizar la cantidad de anticuerpo presente en la superficie de cara a conseguir una mayor sensibilidad en el biosensor como detector de la proteína específica del biorreceptor.

En este experimento se incuban tanto la proteína A/G como el Ab. Las condiciones de la proteína serán las que mejor resultado hayan tenido en el experimento 1 y se probarán condiciones con diferentes concentraciones de anticuerpo, como se indica en la Tabla 5. Se utilizó como buffer de incubación de proteína AGp el MES, debido a sus buenos resultados logrando hasta un desplazamiento del espectro de 1.4 nm en los primeros sensores, tanto para concentraciones de 5 como de 20 $\mu\text{g/ml}$. Como estos excelentes resultados fueron obtenidos fluyendo los Ab en PBS, la incubación de los anticuerpos se llevó a cabo con este mismo buffer siguiendo la planificación de la Tabla 5.

Tabla 5. Planificación experimento de optimización de biofuncionalización de una superficie porosa mediante inmovilizaciones de anticuerpos y AGp en múltiples condiciones. Sensado de BSA diluida en PBS.

| Chip | Incubación 1 | Incubación 2 |
|----------|----------------------|---------------------|
| Sensor 1 | AGp 20ug/ml MES – 2h | Ab 1ug/ml PBS – 2h |
| Sensor 2 | AGp 20ug/ml MES – 2h | Ab 5ug/ml PBS – 2h |
| Sensor 3 | AGp 20ug/ml MES – 2h | Ab 10ug/ml PBS – 2h |
| Sensor 4 | AGp 5ug/ml MES – 2h | Ab 1ug/ml PBS – 2h |
| Sensor 5 | AGp 5ug/ml MES – 2h | Ab 5ug/ml PBS – 2h |
| Sensor 6 | AGp 5ug/ml MES – 2h | Ab 10ug/ml PBS – 2h |

Primero se incubaba la proteína AGp durante 2 horas, como en el caso anterior. Una vez terminado el proceso junto con el enjuagado y secado se repite, pero incubando el anticuerpo a diferentes concentraciones.

Se lanza la prueba donde se fluye la proteína específica del anticuerpo, BSA. Esta proteína se encontraba pura en estado sólido y se diluyó en un buffer (PBS) a baja concentración. Se fluye con PBS únicamente, a diferentes concentraciones de soluto: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

En la Figura 63 se encuentra la gráfica final del experimento tras la estabilización realizada mediante PBS. Hubo un ligero desplazamiento del espectro en el sensor número 3 con el flujo de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BSA. Este sensor tenía incubado 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de A/G y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ab. Sobre el resto de las estructuras porosas no tuvo prácticamente ningún efecto.

Para el caso de la BSA a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, además de el sensor 3 tener de nuevo una respuesta coherente, el nº5 (con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de A/G y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ab) parece ser que tuvo un ligero desplazamiento, aunque menor.

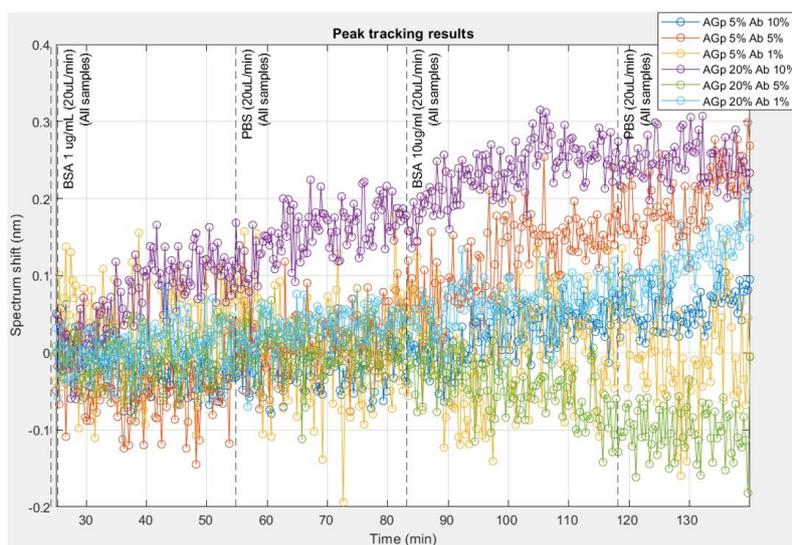


Figura 63. Resultado de biosensado de BSA en múltiples chips en serie con múltiples condiciones de biofuncionalización mediante anti-BSA inmovilizado con A/G.

De alguna forma, en ninguna concentración de Ab funcionaron ambos pares. Tal vez por la diferente concentración de proteína AGp, o directamente por la situación del chip. En el caso de la concentración de Ab de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ningún sensor funcionó pese a ser el que primero estaba situado en el cartucho. Esto significa que la concentración de Ab es demasiado baja para poder adherir correctamente a la superficie su proteína específica, por lo que mínimo deberá ser de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Por tanto, aunque hubo algún desplazamiento en este caso, no se considera como reproducible por el hecho de que no tuvo coherencia en el resto de los chips de la base.

Como experimento final se repite la prueba con chips nuevos desde el inicio (incubaciones incluidas), pero esta vez la proteína a detectar se diluirá y fluirá en MES, con la hipótesis de que los malos resultados del experimento anterior eran por fluir la biomolécula a detectar diluida en PBS. La Tabla 6 resume la planificación con cada una de las condiciones de incubación. En este caso se utilizó únicamente 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína de A/G para igualar las condiciones de los pares, y con la sospecha de que con una alta concentración como 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tras posicionar los

anticuerpos a la proteína intermediaria tal vez no quedaría espacio para la BSA y por eso no se detectaba.

Tabla 6. Planificación experimento sensado de BSA en una superficie porosa con múltiples condiciones de biofuncionalización. BSA diluida en MES.

| Chip | Incubación 1 | Incubación 2 |
|----------|---------------------|---------------------|
| Sensor 1 | AGp 5ug/ml MES – 2h | Ab 1ug/ml PBS – 2h |
| Sensor 2 | AGp 5ug/ml MES – 2h | Ab 5ug/ml PBS – 2h |
| Sensor 3 | AGp 5ug/ml MES – 2h | Ab 10ug/ml PBS – 2h |
| Sensor 4 | AGp 5ug/ml MES – 2h | Ab 1ug/ml PBS – 2h |
| Sensor 5 | AGp 5ug/ml MES – 2h | Ab 5ug/ml PBS – 2h |
| Sensor 6 | AGp 5ug/ml MES – 2h | Ab 10ug/ml PBS – 2h |

Tras las incubaciones, el preparado de las disoluciones de BSA a 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diluidas en MES (0.1M) y el preparado del cartucho se lanzó el experimento obteniendo el gráfico de la Figura 64.

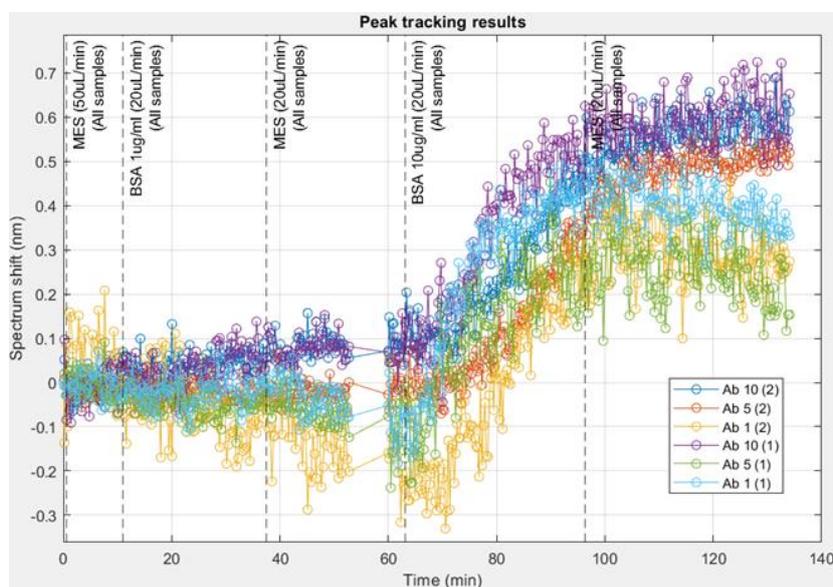


Figura 64. Resultados de prueba de sensado de BSA en MES con múltiples funcionalizaciones.

En la Figura 65, se analizan más en detalle los desplazamientos para cada caso. Se puede comprobar claramente el aumento del desplazamiento respecto al experimento realizado con PBS. Utilizando como buffer el MES, en Figura 65 (a) se ve claramente como la proteína queda adherida a los sensores con mayor cantidad de anticuerpo (Ab 10) donde desplaza el espectro aproximadamente 100 pm. En el resto de los chips el movimiento es prácticamente nulo.

En Figura 65 (a) se lleva a cabo un desplazamiento más elevado fluyendo la disolución de proteína más concentrada (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Esta gran cantidad de biomoléculas provoca que en el

espectro de los sensores se experimente un desplazamiento hacia altas longitudes de onda más que notable, incluso en aquellos con bajos niveles de moléculas biorreceptoras. Sin embargo, en 3 de los sensores con baja cantidad de anticuerpo (Ab 1 [1 y 2] y Ab 5 [1] (*)) una vez se retira la disolución con BSA, vuelve a desplazarse el espectro a longitudes de onda bajas progresivamente, indicando que no se han pegado a la superficie porosa muchas de las proteínas que han fluido por ella y se produce desorción (van soltándose). En cambio, en los otros tres sensores se mantienen pegadas correctamente: ambos son los de 10 $\mu\text{g/ml}$ y el de 5 $\mu\text{g/ml}$ que se encuentra más alejado del inicio del cartucho, probablemente por la gran cantidad de proteína que ha venido arrastrada de los sensores anteriores y que ha sido desorbida una vez fluido el MES.

En resumen, los resultados de desplazamiento para los distintos sensores se ven influenciados por su biofuncionalización, como muestra la Tabla 7. Aunque puede comprobarse que los mayores desplazamientos tienen lugar en aquellos chips con una concentración de anticuerpo mayor, no se ha terminado de demostrar la reproducibilidad en las condiciones de menor concentración.

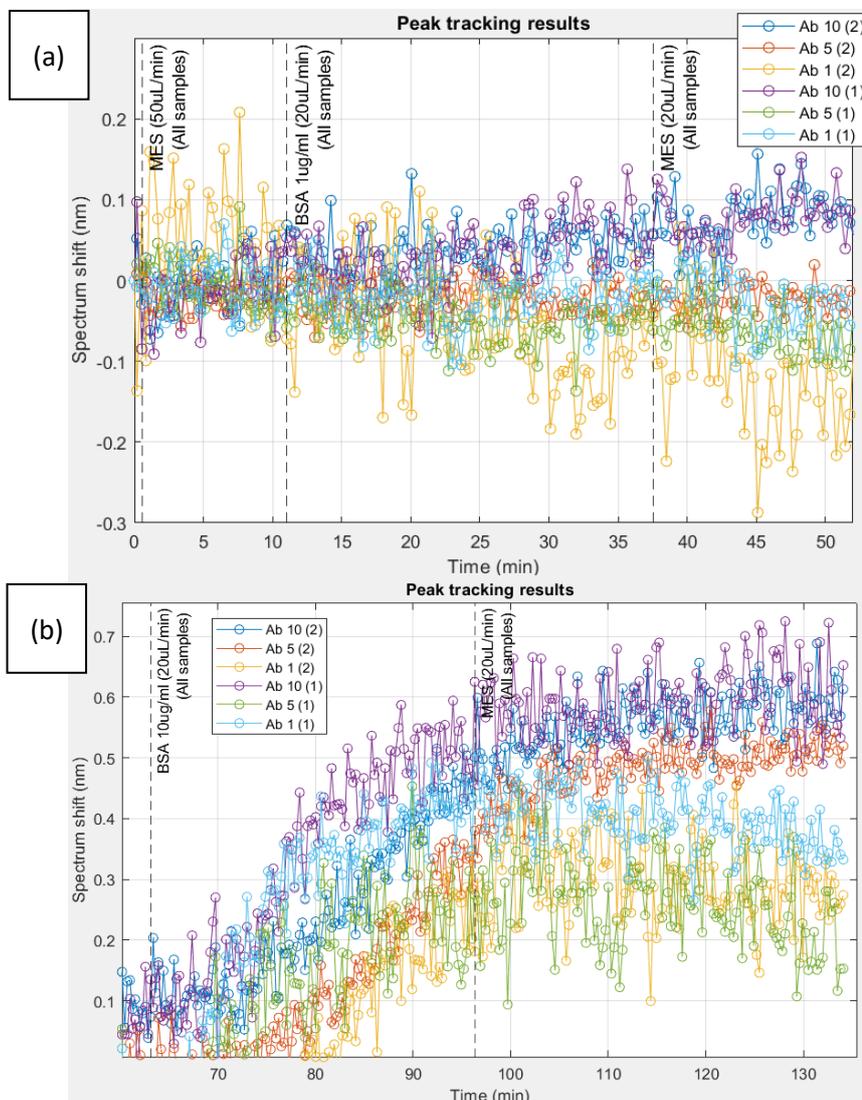


Figura 65. Resultados de experimento de sensado de BSA en MES. (a): desplazamiento por cambio MES – BSA 1 $\mu\text{g/ml}$. (b): desplazamiento por cambio MES – BSA 10 $\mu\text{g/ml}$

Tabla 7. Resultados de desplazamientos parciales para cada concentración (1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ BSA) y totales para cada sensor.

| Chip | Desplazamiento 1 (pm) | Desplazamiento 2 (pm) | TOTAL con sigma (pm) |
|----------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Sensor 1 | 0 | 392 | 392 \pm 43 |
| Sensor 2 | 0 | 242 | 242 \pm 69 |
| Sensor 3 | 83 | 544 | 627 \pm 54 |
| Sensor 4 | 0 | 412 | 412 \pm 67 |
| Sensor 5 | 0 | 540 | 540 \pm 29 |
| Sensor 6 | 88 | 556 | 644 \pm 37 |

Es importante aclarar que el objetivo de estos experimentos no era tanto lograr una detección exitosa, sino validar el funcionamiento de la plataforma. La capacidad de la plataforma para medir varios chips simultáneamente permite realizar pruebas bajo distintas condiciones, facilitando así la determinación del protocolo adecuado de funcionalización y detección. Esto proporciona una base sólida para optimizar y mejorar los experimentos futuros, asegurando que los resultados obtenidos sean confiables y reproducibles.

* [1]: primeros chips por donde pasa el flujo. [2]: últimos chips por donde pasa el flujo

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

En este Trabajo Final de Grado se ha desarrollado y probado una plataforma de medida de bajo coste para sensores fotónicos basados en capas mesoporosas de TiO_2 de forma exitosa, consiguiendo integrar un motor paso a paso controlado por Arduino y un espectrómetro, ambos gestionados por un software de control desarrollado en MATLAB. Para comprobar la calidad del proyecto, se han llevado a cabo múltiples pruebas para evaluar la funcionalidad, precisión, reproducibilidad y aplicabilidad del sistema en diferentes contextos de medición como pueden ser la medida de sustancias a diferentes concentraciones o la funcionalización y sensado de biomoléculas específicas, de las cuales se han sacado las conclusiones que a continuación se presentan.

Entrando en el análisis del rendimiento del sistema, este demostró una alta sensibilidad global, muy similar a la del set-up inicial, confirmando su capacidad para detectar pequeños cambios en el índice de refracción. Las pruebas con soluciones de etanol (EtOH) a diferentes concentraciones mostraron desplazamientos espectrales consistentes, validando también la reproducibilidad del sistema midiendo en diferentes sensores de forma simultánea.

Aunque el objetivo principal no era optimizar los parámetros de rendimiento ni conseguir una excelente evaluación, se detectaron algunas áreas de mejoras que requieren de análisis más profundos y más experimentos. La gran variabilidad en los parámetros de ruido es significativamente mayor comparado con el set-up inicial y puede atribuirse a la calidad del alineamiento de la fibra con el sensor, características de difusión del líquido por las nuevas celdas o vibraciones del motor. El aumento de esta sigma ha supuesto también el del límite de detección. Por todo esto, es necesario optimizar estos factores para reducir el LOD y mejorar la precisión del sistema. Por último, se ha detectado una pérdida de instantaneidad en el desplazamiento espectral ante cambios en el índice de refracción en los últimos sensores del cartucho en configuraciones de flujo en serie. Es crucial investigar formas de minimizar este efecto para mejorar la rapidez de la respuesta del sistema.

Las pruebas de biosensado demostraron que el sistema puede inmovilizar eficazmente los anticuerpos en la superficie de los sensores, proporcionando una respuesta espectral coherente y reproducible. Esto valida la eficacia del sistema para la detección específica de biomoléculas. Además, el sistema funcionó correctamente como herramienta para optimizar las condiciones de incubación, permitiendo comprobar de forma simultánea diferentes densidades de biomoléculas receptoras y diferente buffer.

Como inconveniente, los resultados de las situaciones con bajas concentraciones de anticuerpos mostraron que la adhesión de las proteínas a la superficie porosa no fue reproducible y presentó resultados divergentes. Es necesario seguir optimizando las condiciones de incubación y flujo para asegurar una inmovilización uniforme y efectiva que permita identificar la presencia del analito de forma más robusta.

1. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Para continuar con el desarrollo y la optimización de la plataforma de medida, es fundamental llevar a cabo pruebas de validación cada vez más complejas. Estas pruebas deben incluir una gama más amplia de condiciones experimentales y variables de ensayo para asegurar que el sistema puede manejar la diversidad de aplicaciones a las que podría ser sometido en un entorno de diagnóstico real. Algunas áreas clave no incluidas en el presente trabajo son:

- **Validación en muestras biológicas reales:** es necesario realizar pruebas con muestras biológicas reales, como sueros y plasmas humanos, para evaluar la capacidad del sistema para manejar matrices complejas y la posible interferencia de otros componentes biológicos.
- **Pruebas de robustez y reproducibilidad:** Realizar pruebas de robustez bajo diferentes condiciones de analito debido a que en un entorno real las biomoléculas pueden tener comportamientos diferentes. Además, se deben llevar a cabo pruebas de repetibilidad para asegurar que el sistema puede proporcionar resultados consistentes en múltiples ejecuciones y condiciones.
- **Evaluación del flujo en paralelo:** Introducir un sistema de flujo en paralelo para comparar su eficacia con el flujo en serie actual. Esto puede ayudar a mejorar la precisión y reducir la variabilidad entre los sensores, proporcionando resultados más fiables y rápidos.

Una vez finalizada la extensa etapa de validación podría irse más allá. Una de las aplicaciones más prometedoras de esta plataforma es la capacidad de realizar multisensado, es decir, la detección simultánea de múltiples antígenos, ADN, ARN, enzimas, entre otras moléculas; utilizando diferentes anticuerpos específicos en cada sensor. Para lograr esto, se propone funcionalizar cada sensor en el cartucho con un anticuerpo específico para un antígeno particular. Para la funcionalización es clave continuar optimizando las condiciones de inmovilización para cada tipo de anticuerpo, utilizando diferentes buffers y protocolos de incubación para maximizar la densidad y la actividad de los anticuerpos en la superficie de los sensores con el objetivo de aumentar la especificidad. Finalmente, realizar pruebas de multisensado con mezclas de antígenos para evaluar la capacidad del sistema para detectar múltiples biomarcadores de manera simultánea y sin interferencias cruzadas.

Esta propuesta de líneas futuras no solo permitiría seguir mejorando la precisión y la versatilidad del sistema, sino que también demostrará su aplicabilidad en un contexto de diagnóstico real. La capacidad de realizar multisensado con diferentes anticuerpos específicos, junto con el bajo coste de desarrollo y operación, posicionaría el sistema como una herramienta poderosa para la detección y el análisis de múltiples biomarcadores en una sola muestra, que aplicado al entorno médico podría ser de sangre.

La accesibilidad económica, combinada con su capacidad técnica avanzada, podría revolucionar la forma en que se realizan los diagnósticos médicos, proporcionando una solución eficaz y eficiente para la detección temprana y el monitoreo de diversas condiciones de salud.

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

- 13.1B: Estructura de anticuerpos. (2022, octubre 29). LibreTexts Español. [https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A_Microbiolog%C3%ADa_\(Kaiser\)/Unit_6%3A_Inmunidad_adaptativa/13%3A_Inmunidad_humoral/13.1%3A_Anticuerpos_\(inmunoglobulinas\)/13.1B%3A_Estructura_de_anticuerpos](https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A_Microbiolog%C3%ADa_(Kaiser)/Unit_6%3A_Inmunidad_adaptativa/13%3A_Inmunidad_humoral/13.1%3A_Anticuerpos_(inmunoglobulinas)/13.1B%3A_Estructura_de_anticuerpos)
- Befenybay—Actuador lineal de viaje con rieles lineales cuadrados con motor paso a paso NEMA17 para piezas de router CNC DIY eje X Y Z : Amazon.es: Industria, empresas y ciencia. (2024, junio 28). <https://www.amazon.es/Befenybay-Actuador-lineal-lineales-cuadrados/dp/B085TG12D1/?th=1>
- Bysameyee Soporte de aleación de Aluminio para microscopio Digital USB/Wi-Fi, Montaje de Metal de diámetro Universal con Estuche de Transporte para microscopio: Amazon.es: Industria, empresas y ciencia. (2024, junio 28). <https://www.amazon.es/aleaci%C3%B3n-Aluminio-microscopio-Universal-Bysameyee/dp/B07VFNQ8MM/?th=1>
- Cables tipo DuPont Macho—Macho (40 cm / 40 unidades) BricoGeek | BricoGeek.com. (2024, junio 28). <https://tienda.bricogeek.com//cables/1578-cables-dupont-macho-macho-40-cm-40-unidades.html>
- Caroselli, R., Martín Sánchez, D., Ponce Alcántara, S., Prats Quilez, F., Torrijos Morán, L., & García-Rupérez, J. (2017). Real-Time and In-Flow Sensing Using a High Sensitivity Porous Silicon Microcavity-Based Sensor. *Sensors*, 17(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/s17122813>
- Chamorro-Garcia, A., & Merkoçi, A. (2016). Nanobiosensors in diagnostics. *Nanobiomedicine*, 3, 1849543516663574. <https://doi.org/10.1177/1849543516663574>
- Controlador de motores paso a paso 3.5A (TB6600) DFRobot DRI0043 | BricoGeek.com. (2024, junio 28). <https://tienda.bricogeek.com//controladores-motores/992-controlador-de-motores-paso-a-paso-35a-tb6600.html>
- COVVY TB6600 4A DC 9-42V controlador de motor paso a paso controlador CNC 32 segmentos 2/4 fase híbrido paso a paso del motor placa del conductor: Amazon.es: Industria, empresas y ciencia. (2024, junio 28). https://www.amazon.es/COVVY-TB6600-Controlador-segmentos-Conductor/dp/B07SBZ9SM5/ref=sr_1_5?mk_es_ES=%C3%85M%C3%85%C5%BD%C3%95%C3%91&sr=8-5
- Harraz, F. A. (2014). Porous silicon chemical sensors and biosensors: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, 897-912. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.06.048>

- Jauregui-Vazquez, D., Gutierrez-Rivera, M. E., Garcia-Mina, D. F., Sierra-Hernandez, J. M., Gallegos-Arellano, E., Estudillo-Ayala, J. M., Hernandez-Garcia, J. C., & Rojas-Laguna, R. (2021). Low-pressure and liquid level fiber-optic sensor based on polymeric Fabry-Perot cavity. *Optical and Quantum Electronics*, 53(5), 237. <https://doi.org/10.1007/s11082-021-02871-6>
- Lee, J., Bae, K., Kang, G., Choi, M., Baek, S., Yoo, D., Lee, C.-W., & Kim, K. (2015). Graded-lattice AAO photonic crystal heterostructure for high Q refractive index sensing. *RSC Advances*, 5(88), 71770-71777. <https://doi.org/10.1039/C5RA15890G>
- Martínez-Pérez, P., Ponce-Alcántara, S., Murillo, N., Pérez-Márquez, A., Maudes, J., Peraile, I., González-López, L., Gil-García, M., Lorenzo-Lozano, P., & García-Rupérez, J. (2020). Label-Free Optical Biosensing Using Low-Cost Electrospun Polymeric Nanofibers. *Chemosensors*, 8(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/chemosensors8040119>
- Morris, R. (2022, junio 28). Setting Data Acquisition Parameters. *Ocean Optics*. <https://www.oceanoptics.com/blog/faq-of-the-month-setting-data-acquisition-parameters/>
- Nowakowska, J. (s. f.). *The Refractive Indices of Ethyl Alcohol and Water Mixtures*.
- Oiyagai 5pcs LM393 Chip Motor Comparador de medición Sensor de Velocidad Módulo de Ranura Tipo de optoacoplador IR para MCU Arduino: Amazon.es: Informática. (2024, junio 28). <https://www.amazon.es/Oiyagai-Comparador-medici%C3%B3n-Velocidad-optoacoplador/dp/B0776RHKB1/>
- Ortiz De Zárate, D., Serna, S., Ponce-Alcántara, S., & García-Rupérez, J. (2022). Evaluation of Mesoporous TiO₂ Layers as Glucose Optical Sensors. *Sensors*, 22(14), Article 14. <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), Article 12. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9120329>
- Placa de desarrollo Arduino Nano V3.0 ATMEGA328P CH340 MINI USB, nueva—AliExpress 502. (2024, junio 28).
- Protoboard placa de 400 pines. (2024, junio 28). *Kumótica*. <https://kumotica.es/componentes-robotica/102-protoboard-placa-de-400-pines.html>
- Scott, T. A. (1946). Refractive Index of Ethanol–Water Mixtures and Density and Refractive Index of Ethanol–Water–Ethyl Ether Mixtures. *The Journal of Physical Chemistry*, 50(5), 406-412. <https://doi.org/10.1021/j150449a003>
- Soler, M. (2015). *Nanoplasmonic Biosensors for Clinical Diagnosis at the Point of Care*.
- Spectrometers & Accessories Glossary. (2024, junio 28). *Ocean Optics*. <https://www.oceanoptics.com/resources/glossary/>
- Syringe Pump—Advanced Precision Programmable Syringe Pumps—SyringePump.com. (2024, junio 28). <https://www.syringepump.com/NE-1000.php>

Tsai, W.-T., Nguyen, M.-H., Lai, J.-R., Nguyen, H.-B., Lee, M.-C., & Tseng, F.-G. (2018). Ppb-level heavy metal ion detection by electrochemistry-assisted nanoPorous silicon (ECA-NPS) photonic sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 265, 75-83. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.232>

Tungsten Halogen Light Source. (2024, junio 28). Spectrecolgy. <https://spectrecolgy.com/product/tungsten-halogen-light-source/>

Vázquez-Guardado, A., Ramirez-Flores, J. A., Lopez-Galmiche, G., Escobedo-Alatorre, J. J., Sánchez-Mondragón, J. J., Vázquez-Guardado, A., Ramirez-Flores, J. A., Lopez-Galmiche, G., Escobedo-Alatorre, J. J., & Sánchez-Mondragón, J. J. (2019). Detection of Ethanol Concentration using a Generic Optical Sensor Platform. *Computación y Sistemas*, 23(1), Article 1. <https://doi.org/10.13053/cys-23-1-3138>

ANEXOS

CAPÍTULO 1. PRESUPUESTO

En esta sección, el propósito es calcular la inversión económica aproximada requerida para llevar a cabo este trabajo con el objetivo de estimar tanto el coste del proyecto en su conjunto como el de la plataforma. Esto permitirá demostrar que realmente tiene un precio bajo, algo que supone una gran ventaja. Diferenciamos entre los costos de personal, correspondientes a los salarios de las personas implicadas, costos de ejecución, costos de materiales y relacionados con la tecnología empleada.

Gastos como aquellos asociados con electricidad o desplazamientos, no han sido considerados. Los precios están expresados en euros.

1. COSTE DE MANO DE OBRA

En este apartado consideramos todas las personas implicadas en la realización de este trabajo de fin de grado. En este caso, la mano de obra en un ingeniero biomédico estudiante, autor del proyecto, y un catedrático de universidad, que se ha encargado de supervisar y proporcionar toda la ayuda necesaria al estudiante. Para los salarios mensuales se tendrán en cuenta las tablas retributivas de la UPV, con un salario de 1.300,88 € al mes, con dos pagas extra, para el ingeniero estudiante. Para el catedrático de universidad el sueldo será de 3.469,29 € al mes, también con dos pagas extra. Considerando una jornada laboral de ocho horas al día y descontando los fines de semana, los treinta días de vacaciones y los quince días festivos se obtienen las horas trabajadas al año, que serán unas 1800 h.

Cabe considerar, además, las cotizaciones a la seguridad social, siendo estas del 33.4% en su totalidad en España a fecha de enero de 2024.

Los costes por hora serán, en bruto, de 9,56 €/h y 26,38 €/h, respectivamente. Si a esta cantidad se le añade el 33.4% correspondiente a los costes de la empresa sobre la base de cotización, nos queda un total de 12,43 €/h para el estudiante y 35,19 €/h para el catedrático de universidad. Se calcula el coste total para la mano de obra en la Tabla 8.

Tabla 8. Coste mano de obra desglosado y total

| Denominación mano de obra | Precio por hora | Nº de horas | Total |
|------------------------------------|-----------------|-------------|-------------------|
| Ingeniero estudiante | 12,43 € | 360 | 4.474,80 € |
| Ingeniero catedrático | 35,19 € | 40 | 1.407,60 € |
| COSTE TOTAL DE MANO DE OBRA | | | 5.882,40 € |

2. COSTE DE MAQUINARIA

Para los equipos utilizados se ha calculado la amortización según la Ecuación 4, considerando un periodo de amortización según se indica en la Tabla 9.

$$C_a = \frac{C_{eq} \times t_{uso}}{Per_{amort}} \quad (4)$$

Las variables de la ecuación son:

- C_{eq} : Coste del equipo adquirido
- t_{uso} : Tiempo de uso
- Per_{amort} : Periodo de amortización

Tabla 9. Coste maquinaria desglosado y total

| Maquinaria | Precio unitario | Duración Vida útil | Periodo de uso | Factor de amortización | Total |
|----------------------------------|-----------------|--------------------|----------------|------------------------|-----------------|
| Portátil MSI | 990,00 € | 7 años | 12 meses | 12/84 | 141,43 € |
| Matlab Student R2024a | 69,00 € | 1 año | 10 meses | 10/12 | 57,50 € |
| Microsoft Office 365 | 149,00 € | 1 año | 10 meses | 10/12 | 12,17 € |
| Dibac CAD | 295,00 € | 1 año | 1 mes | 1/12 | 24,58 € |
| Impresora 3D | 800,00 € | 10 años | 1 mes | 1/120 | 6,67 € |
| Máquina CNC | 5.000,00 € | 20 años | 1 día | 1/7300 | 0,68 € |
| Bomba de jeringa | 1100,00 € | 5 años | 3 meses | 3/60 | 55,00 € |
| Driver OceanDirect* | 583,75 € | 5 años | 10 meses | 10/60 | 97,29 € |
| Espectrómetro * | 4295 € | 10 años | 10 meses | 10/120 | 357,92 € |
| Fuente de luz * | 862 € | 1000 horas | 180 horas | 180/1000 | 155,16 € |
| Fibra óptica bifurcada * | 176 € | 5 años | 10 meses | 10/60 | 29,33 € |
| COSTE TOTAL DE MAQUINARIA | | | | | 937,73 € |

Se han considerado como despreciables los costes de maquinaria de herramientas del laboratorio como las micropipetas, la báscula, la centrifugadora, la pistola de aire o el vortex. A pesar de ello, cabe destacar su uso.

** Son componentes de la propia plataforma. Sin embargo, el hecho de que no se han obtenido únicamente para el desarrollo de la misma hace que, para el cálculo del presupuesto general del Trabajo de Final de Grado, se tomen como maquinaria y no como materiales. De todos modos, se incluirán para el cálculo del coste de la plataforma, presentado en la sección 3.*

3. COSTE DE MATERIALES

Este apartado recoge todos aquellos costes relacionados con el material fungible empleado, englobando tanto los costes de la plataforma (morado) como el material de las pruebas (azul), siendo estos colores cómo se representan en la Tabla 10.

El coste de cada chip se calcula partiendo del total de la oblea que contiene 120 estructuras de TiO₂. El coste de la base fabricada con la máquina CNC se ha estimado partiendo del precio actual del policarbonato. Para el resto de los componentes, se han consultado las facturas.

Tabla 10. Coste materiales desglosado y total

| Material | Precio unitario | Cantidad | Total |
|--|-----------------|----------|-----------------|
| Placa protoboard | 1,95 € | 1 | 1,95 € |
| Arduino NANO | 6,50 € | 1 | 6,50 € |
| Sensor óptico de final de carrera | 1,96 € | 2 | 3,92 € |
| Driver TB6600 | 36,99 € | 1 | 36,99 € |
| Motor con guía lineal | 98,76 € | 1 | 98,76 € |
| Soporte fibra óptica (holder) | 21,99 € | 1 | 21,99 € |
| Base de policarbonato | 11,25 € | 1 | 11,25 € |
| Chips TiO₂ | 0,71 € | 30 | 21,18 € |
| Tubos Eppendorf | 0.14 € | 100 | 13,90 € |
| COSTE TOTAL DE EJECUCIÓN | | | 216,44 € |

Esta tabla de costes desglosada no incluye materiales utilizados cuyo precio es difícilmente estimable y altamente despreciable. Sin embargo, se debe mencionar la utilización de cables para el circuito electrónico, las pequeñas piezas que han sido impresas en 3D, los elementos de unión y anclaje de la plataforma como tornillos, postes o tuercas, las puntas de las micropipetas empleadas durante las pruebas y los reactivos o sustancias utilizadas en experimentos. Estas son: agua desionizada, etanol, anticuerpo anti-BSA; buffers PBS y MES; y proteínas AGp y BSA.

Conociendo esto podemos saber el coste de la plataforma, que supone la suma de las celdas moradas, sumando un total de 216,44 €. Sin embargo, como se ha explicado antes, para saber realmente el coste de una plataforma completa se tendrán que obtener también componentes que para el TFG se han tomado como maquinaria: espectrómetro, fibra, fuente de luz, y además tener acceso al driver Ocean Direct, ascendiendo hasta un total de 6.133,19 €.

4. COSTE TOTAL DEL PROYECTO

En el siguiente apartado se presenta el presupuesto de ejecución material, por contrata y total del proyecto. Para calcular el presupuesto de ejecución material, se debe incorporar los costes indirectos que suponen un 25% de los costes directos, incluidos en la Tabla 11.

Tabla 11. Coste de ejecución material

| Presupuesto de ejecución material | |
|--|------------|
| Presupuesto parcial Mano de obra | 5.882,40 € |
| Presupuesto parcial Maquinaria | 937,73 € |
| Presupuesto parcial Material | 216,44 € |
| Coste total parcial | 7.036,57 € |
| Costes indirectos (25%) | 1.759,14 € |
| COSTE TOTAL DE EJECUCIÓN MATERIAL | 8.795,71 € |

El coste de ejecución material asciende a un total de ocho mil setecientos noventa y cinco euros con setenta y un céntimos.

El presupuesto de ejecución por contrata (Tabla 12) resulta de la suma del presupuesto de ejecución material y los gastos generales aplicables a este presupuesto (13% del presupuesto de ejecución material).

Tabla 12. Coste de ejecución por contrata

| Presupuesto de ejecución por contrata | |
|--|------------|
| Coste de ejecución material | 8.795,71 € |
| Gastos generales (13%) | 1.143,44 € |
| COSTE TOTAL DE EJECUCIÓN POR CONTRATA | 9.939,15 € |

En total, sumando un coste de ejecución por contrata de nueve mil novecientos treinta y nueve euros con quince céntimos.

Por último, para obtener el presupuesto total del proyecto se debe aplicar el porcentaje de IVA (21%) sobre este último presupuesto de ejecución por contrata, y se representa en la Tabla 13.

Tabla 13. Coste total del proyecto

| Presupuesto total del proyecto | |
|--|-------------|
| Coste de ejecución por contrata | 9.939,15 € |
| IVA (21%) | 2.087,22 € |
| COSTE TOTAL DEL PROYECTO | 12.026,37 € |

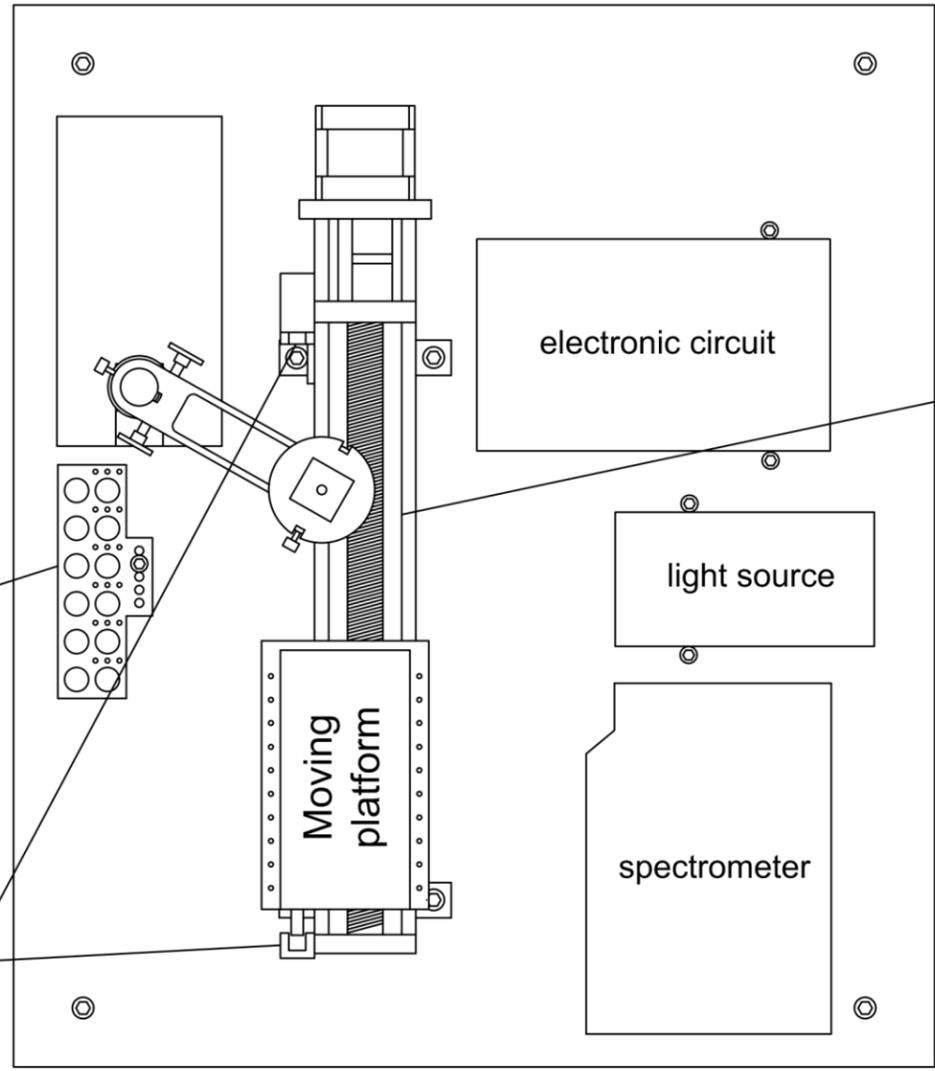
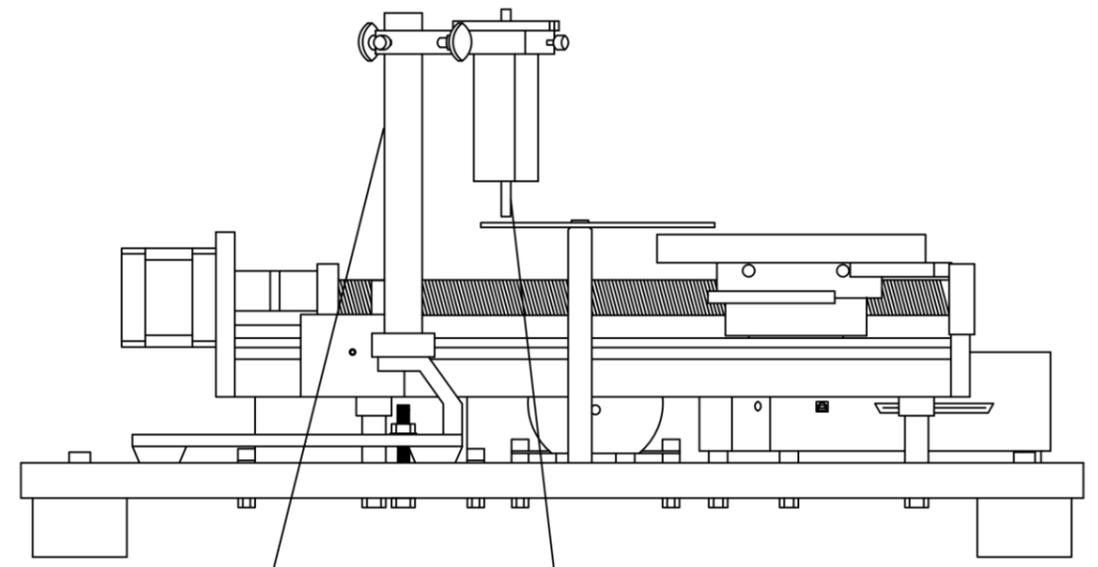
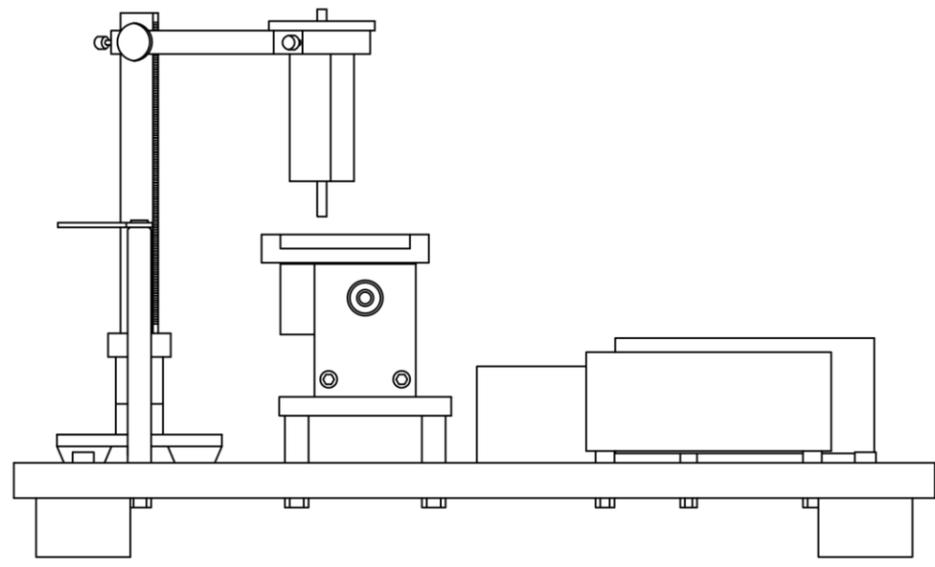
Con un coste total del proyecto de doce mil veintiséis euros con treinta y siete céntimos.

CAPÍTULO 2. PLANOS

A continuación, se presenta un plano detallado con la planta, el alzado y el perfil de la plataforma de medida desarrollada. Estas vistas han sido incorporadas con el objetivo de clarificar la disposición final de los componentes y el diseño general del sistema. El plano incluye representaciones visuales de todos los elementos principales, tales como el motor con el módulo lineal, la plataforma móvil, los sensores origen y final de carrera, el sistema de flujo y la representación de dónde se han colocado algunos componentes clave como la fuente de luz, el circuito electrónico o el espectrómetro. Toda la información se encuentra acompañada de etiquetas que favorecen la comprensión.

Es importante destacar que este plano no incluye cotas ni dimensiones específicas. La ausencia de estas medidas se ha realizado deliberadamente para facilitar la comprensión del diseño general y la relación entre los diferentes componentes sin sobrecargar el dibujo con información técnica detallada. De esta manera, se ofrece una visión clara y accesible de cómo se ha materializado la plataforma, permitiendo una mejor apreciación de su estructura y funcionalidad. De todos modos, las medidas y la escala se han desarrollado con precisión.

Este enfoque simplificado permite centrar la atención en la configuración y disposición de la plataforma, proporcionando una referencia visual útil que complementa la información técnica y experimental presentada en el resto del documento.



Eppendorf holder

Limit switch sensors

Moving platform

electronic circuit

light source

spectrometer

Step motor + linear actuator

Optical fiber

Holder

CAPÍTULO 3. ELEMENTOS AUXILIARES DE LA INTERFAZ

En este apartado se van a explicar los elementos de apoyo introducidos en la interfaz principal. La misión principal de estos es facilitar el proceso de preparación y configuración de medidas, hacer posible la implementación de funciones secundarias y mejorar la experiencia informando con más detalle al usuario del estado de la aplicación.

1. BARRA DE MENÚS

La barra de menús se sitúa en la parte superior de la pantalla principal y se conforma de tres desplegables que dan acceso al usuario a funciones secundarias.

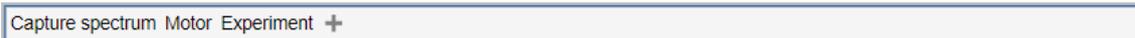


Figura 66. Barra con menús desplegables

Los desplegables se comentan a continuación:

1. **Captura de espectros.** Incluye las funciones de la Figura 67 relacionadas con la adquisición y preprocesado de espectros. Permite la importación y exportación de los espectros de oscuridad, de referencia o patrón. Abre menús de selección de directorio. También se puede almacenar en la memoria el espectro actual o acceder a la interfaz de configuración de guardado de espectros.

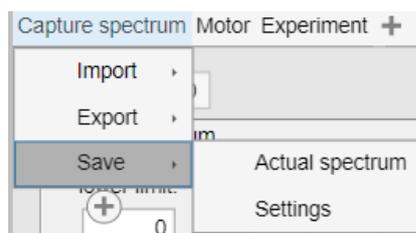


Figura 67. Menú desplegado de captura de espectros

2. **Motor.** Las funciones secundarias del motor se encuentran en una interfaz auxiliar accesible desde el botón *Motor settings* del desplegable de la Figura 68.

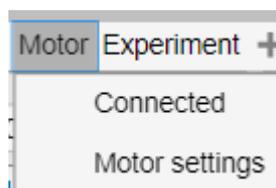


Figura 68. Menú desplegado de configuración de motor

3. **Experimentos.** El último desplegable (Figura 69) tiene opciones que afectan directamente a los resultados de los experimentos. Con la casilla de *Fitting* activaremos o desactivaremos por defecto el ajuste en las pruebas. Lo mismo se puede hacer con el guardado de espectros en los experimentos. Esta última opción, además, cuenta con una ventana de configuración auxiliar accesible desde la casilla *Settings*.

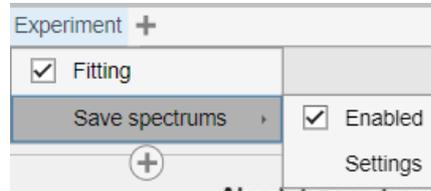


Figura 69. Menú desplegado de configuración de experimentos

2. VENTANA DE SALIDAS E INFORMACIÓN DE ERRORES

Para que el usuario sea conocedor de los procesos que se están llevando a cabo y se le notifique de errores que pueden suceder dentro de la aplicación para que los tenga en cuenta, se han diseñado dos elementos que aportan este tipo de mensajes, puramente informativos y de alerta:

1. **Notificador de errores de comunicación con espectrómetro:** en ocasiones el driver puede ejecutar funciones sobre el espectrómetro y que resulten fallidas. El identificador del error se recoge y a través del cuadro numérico de la Figura 70 se informa al usuario del código.



Figura 70. Indicador de códigos de errores

2. **Ventana de salidas:** es un cuadro de texto situado en la parte inferior de la pantalla principal (Figura 71). A través de él se informa al usuario cada vez que se ejecuta una acción o un proceso interno en el programa, por tanto; sirve como guía para el usuario por la aplicación.



Figura 71. Ventana de información de estados y acciones

3. INTERFACES SECUNDARIAS

En el siguiente punto se explicarán las ventanas secundarias o auxiliares que se han incorporado al controlador del sistema de medidas. Se llaman a partir de la principal ya que necesitan datos de esta para ser inicializadas.

3.1. MENÚ DE CONFIGURACIÓN ADICIONAL DEL MOTOR

Se accede mediante la barra de menús de la parte superior de la interfaz principal y aporta configuración extra para configurar la comunicación software-motor. Tiene un desplegable por el cual se puede cambiar el puerto serie por el que se establecerá la conexión. Además, desde este menú también se puede modificar el tamaño de paso y la velocidad empleados en el barrido de posiciones para la búsqueda de muestras.

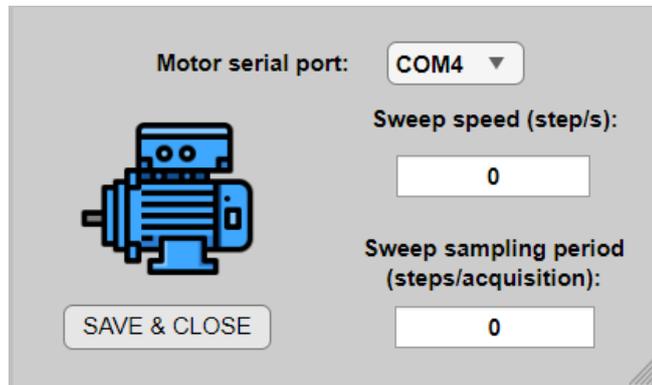


Figura 72. Ventana con interfaz auxiliar para configuración adicional del motor

3.2. MENÚ DE CONFIGURACIÓN DE GUARDADO DE ESPECTROS

El menú descrito a continuación contiene configuración para el guardado de aquellos espectros que no estén relacionados con los experimentos, cuya configuración tiene una ventana específica. Tampoco se incluyen los espectros que queramos guardar en la memoria para el preprocesado o búsqueda de muestras (espectro de oscuridad, referencia o patrón) ya que estos se exportan, creando estructuras que MATLAB lee de forma óptima.

Los espectros en este caso son los que queramos almacenar de forma puntual, o bien desde el botón *Save >> Actual Spectrum* en la Figura 67, o con el guardado de muestra/s de la Figura 36. Cuando se almacena un espectro con estas opciones se crea un archivo con dos columnas numéricas: longitudes de onda e intensidades.

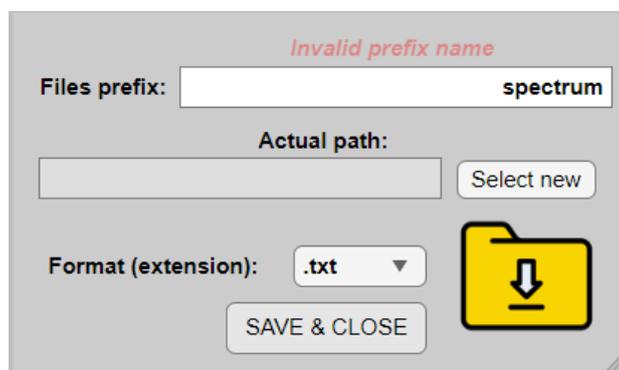


Figura 73. Ventana con interfaz auxiliar para configuración de guardado de espectros

En la ventana (Figura 73) puede modificarse el prefijo con el que se almacenará el espectro, la ruta del equipo donde se almacenarán y la extensión que tendrá el archivo. Las que se han incorporado en el sistema son *txt*, *dat* y *mat*. Por defecto, se selecciona *txt*.

3.3. MENÚ DE CONFIGURACIÓN DE GUARDADO DE EXPERIMENTOS

El menú específico de los espectros almacenados durante las pruebas es el representado en la Figura 74. Guarda bastante analogía con el del guardado general de espectros. Sin embargo, en este caso, la ruta se especifica antes de empezar un experimento. Lo que se define en esta ventana, además de la extensión y el prefijo, es si los espectros se almacenarán dentro de una nueva carpeta, creada automáticamente, con el nombre de la prueba.

También se accede a esta ventana desde la barra de menús.

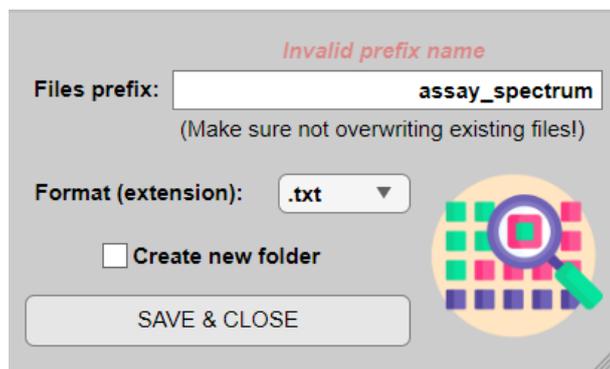


Figura 74. Ventana con interfaz auxiliar para configuración de guardado de espectros de los experimentos

3.4. MENÚ DE CAMBIO DE NOMBRE DE MUESTRAS

El menú que se muestra a continuación se accede desde la configuración de muestras (Figura 36). Para que aparezca tienen que haber muestras creadas y pulsar el botón *CHANGE NAMES*. La ventana que aparecerá será la de la Figura 75.

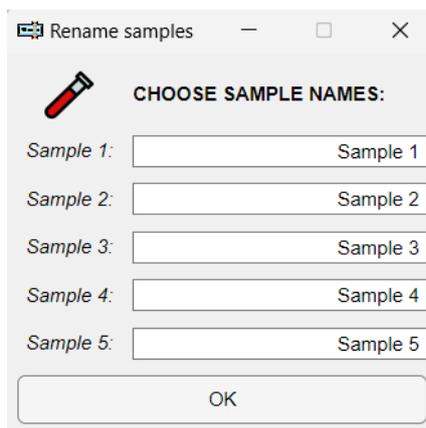


Figura 75. Ventana con interfaz auxiliar para renombrar los sensores

Una vez se actualizan los nombres, se pulsa el botón *OK*. Los nombres aparecerán cambiados en la interfaz principal y, por ende; en los gráficos de las pruebas.

CAPÍTULO 4. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE

Tabla 14. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible.

| Objetivos de Desarrollo Sostenible | Alto | Medio | Bajo | No procede |
|---|------|-------|------|------------|
| 1. Fin de la pobreza | | | | |
| 2. Hambre cero | | | | |
| 3. Salud y bienestar | | | | |
| 4. Educación de calidad | | | | |
| 5. Igualdad de género | | | | |
| 6. Agua limpia y saneamiento | | | | |
| 7. Energía asequible y no contaminante | | | | |
| 8. Trabajo decente y crecimiento económico | | | | |
| 9. Industria, innovación e infraestructuras | | | | |
| 10. Reducción de desigualdades | | | | |
| 11. Ciudades y comunidades sostenibles | | | | |
| 12. Producción y consumo responsables | | | | |
| 13. Acción por el clima | | | | |
| 14. Vida submarina | | | | |
| 15. Vida de ecosistemas terrestres | | | | |
| 16. Paz, justicia e instituciones sólidas | | | | |
| 17. Alianzas para lograr objetivos | | | | |

El desarrollo de la plataforma automatizada para la medida multiplexada de sensores fotónicos basados en capas porosas toca varios puntos relevantes de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). A continuación, se explican cuáles son estos puntos y cómo el proyecto contribuye a cada uno de ellos:

- ✓ **Salud y bienestar (ALTO).** La plataforma permite la detección simultánea de múltiples biomarcadores en una única muestra, lo que mejora significativamente la eficiencia y precisión de los diagnósticos médicos. Esto es crucial para la detección temprana de enfermedades, mejorando así los resultados de los tratamientos y la salud general de la población.
- ✓ **Agua limpia y saneamiento (MEDIO).** La capacidad de realizar análisis precisos y en tiempo real de la calidad del agua puede contribuir significativamente a la gestión de recursos hídricos y al saneamiento, ayudando a prevenir enfermedades relacionadas con el agua contaminada.
- ✓ **Industria, innovación e infraestructuras (ALTO).** El desarrollo de sensores fotónicos avanzados y la integración de sistemas automatizados representa un avance significativo en la tecnología de detección y análisis. Este proyecto fomenta la innovación en el campo de la biofotónica y la ingeniería de sensores.
- ✓ **Producción y consumo responsables (MEDIO).** La plataforma emplea tecnologías avanzadas que maximizan la eficiencia de los recursos, minimizando el desperdicio de reactivos y muestras. La capacidad de realizar múltiples análisis con volúmenes reducidos de muestra promueve prácticas de producción más eficientes. Sin embargo, para alcanzar un consumo realmente responsable, es necesario continuar investigando en la reutilización de los chips que se ve obstaculizada por la alta degradación de los mismos. Abordar este desafío es crucial para optimizar el uso de recursos y reducir el impacto ambiental a largo plazo.
- ✓ **Acción por el clima (ALTO).** La plataforma automatizada puede contribuir a la investigación en áreas relacionadas con el cambio climático, como la monitorización de contaminantes y el estudio de la calidad del agua. Además, la eficiencia del sistema en el uso de recursos, el bajo costo y el empleo de tecnologías sostenibles también ayudan a minimizar el impacto ambiental.
- ✓ **Alianzas para lograr objetivos (MEDIO).** El proyecto tiene el potencial de fomentar colaboraciones entre instituciones académicas, centros de investigación y organizaciones de salud a nivel internacional. Estas alianzas son esenciales para el intercambio de conocimientos, el desarrollo de nuevas tecnologías y la implementación de soluciones innovadoras a escala global.