UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
INDUSTRIALES**

**CARACTERIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE
ESTRUCTURAS BIOFOTÓNICAS Y TÉCNICAS
AVANZADAS DE INTERROGACIÓN PARA
DESARROLLO DE BIOSENSORES ÓPTICOS**

TESIS DOCTORAL

Álvaro Lavín Hueros

Licenciado en Ciencias Físicas

2016

**DEPARTAMENTO FÍSICA APLICADA E INGENIERÍA DE LOS
MATERIALES**

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS INDUSTRIALES

**CARACTERIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE ESTRUCTURAS
BIOFOTÓNICAS Y TÉCNICAS AVANZADAS DE INTERROGACIÓN
PARA DESARROLLO DE BIOSENSORES ÓPTICOS**

REALIZADA POR

ALVARO LAVÍN HUEROS

LICENCIADO EN CIENCIAS FÍSICAS

DIRIGIDA POR

MIGUEL HOLGADO BOLAÑOS

DOCTOR INGENIERO INDUSTRIAL

2016

TRIBUNAL

Presidente:

D. Jesús de Vicente y Oliva

Secretario:

Dña. María Fe Laguna Heras

Vocales:

D. Francisco Meseguer Rico

D. Alberto Álvarez Herrero

Dña. Inmaculada Leyva Callejas

Suplentes:

D. Ángel Maquieira Catalá

Dña. María José Bañuls Polo

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas han contribuido a que pueda presentar este trabajo pero ninguna más que a Miguel Holgado, director de esta tesis, al que tengo que agradecer, por una parte, su interés y amable insistencia en que este tesis doctoral llegara a buen fin, y por otra, para mí mucho más importante, la integración de mi trabajo en un proyecto global de investigación que está produciendo resultados útiles y tangibles a los que me enorgullezco en contribuir.

Estoy especialmente agradecido a María Fe Laguna, Rafael Casquel y Javier Sanza por todas las ocasiones en que me han explicado pacientemente detalles de la fabricación de celdas biosensoras, desarrollo de inmunoensayos y experimentos, y por las críticas a mi trabajo, intercambios de opinión y discusiones que han contribuido a mejorarlo. De la misma manera, tengo que agradecer especialmente, la cuidadosa lectura realizada por el profesor Jesús de Vicente del modelo metrológico que se describe en el capítulo segundo de esta tesis.

Sé que cada resultado experimental que se menciona en esta tesis es el fruto de muchas horas de trabajo meticuloso y paciente. Quisiera por tanto constatar mi inmenso agradecimiento a todas las personas involucradas en este trabajo, entre las que se encuentran algunas de las personas ya mencionadas, además de estudiantes de máster y doctorado que han realizado o están realizando proyectos en el grupo y personal de apoyo técnico. Mi más sincero agradecimiento, por tanto, a Ana López, María Victoria Maigler, Beatriz Santamaría, Javier Soler, Manuel Vicente, Martín Muñoz y Álvaro Otón. Finalmente, quiero agradecer a la ETSII, al Centro Láser de la UPM y al Laboratorio de Óptica, Fotónica y Biofotónica del Centro de Tecnología Biomédica de la UPM, los medios puestos a mi disposición para la realización de esta tesis doctoral.

Si ellos saberlo, mis hijos Clara, Alejandro y Víctor, y mi mujer Consuelo han sido un continuo estímulo para la realización de este trabajo, a la vez que un maravilloso y divertido obstáculo.

Este trabajo se lo dedico a mis padres.

Madrid 15 de enero de 1016

RESUMEN

El núcleo fundamental de esta tesis doctoral es un modelo teórico de la interacción de la luz con un tipo particular de biosensor óptico. Este biosensor se compone de dos regiones: en la región inferior puede haber capas de materiales con diferentes espesores y propiedades ópticas, apiladas horizontalmente; en la zona superior, sobre la que incide directamente el haz de luz, puede haber estructuras que hacen que las propiedades ópticas cambien tanto en el plano horizontal como en la dirección vertical. Estos biosensores responden ópticamente de forma diferente al ser iluminados dependiendo de que su superficie externa esté, en mayor o menor medida, recubierta con diferentes tipos de material biológico. En esta tesis se define un modelo analítico aproximado que permite simular la respuesta óptica de biosensores con estructuras en su región más externa.

Una vez comprobada la validez práctica del modelo mediante comparación con medidas experimentales, éste se utiliza en el diseño de biosensores de rendimiento óptimo y en la definición de nuevas técnicas de interrogación óptica. En particular, el sistema de transducción IROP (*Increased Relative Optical Power*), basado en el efecto que produce la presencia de material biológico, en la potencia total reflejada por la celda biosensora en determinados intervalos espectrales, es uno de los sistemas que ha sido patentado y es objeto de desarrollo por la empresa de base tecnológica BIOD [www.biod.es/], estando ya disponibles en este momento varios dispositivos de diagnóstico basados en esta idea. Los dispositivos basados en este sistema de transducción han demostrado su eficiencia en la detección de proteínas y agentes infecciosos como los rotavirus y el virus del dengue.

Finalmente, el modelo teórico desarrollado se utiliza para caracterizar las propiedades ópticas de algunos de los materiales de los que se fabrican los biosensores, así como las de las capas de material biológico formadas en las diferentes fases de un inmunoensayo. Los parámetros ópticos de las capas mencionadas se obtienen mediante el método general de ajuste por mínimos cuadrados a las curvas experimentales obtenidas en los inmunoensayos.

ABSTRACT

The core of this thesis is the theoretical modeling of the interaction of light with a particular type of optical biosensor. This biosensor consists of two parts: in the lower region may have layers of materials with different thicknesses and optical properties, stacked horizontally; at the top, on which directly affects the light beam, there may be structures that make optical properties change in both, the horizontal and in the vertical direction. These biosensors optically respond differently when illuminated depending on its external surface is greater or lesser extent, coated with different types of biological material. In this thesis an approximate analytical model to simulate the optical response of biosensors with structures in its outer region is defined.

After verifying the practical validity of the model by comparison with experimental measurements, it is used in the design of biosensors with optimal performance and the definition of new optical interrogation techniques. In particular, the transduction system IROP (Increased Relative Optical Power) based on the effect of the presence of biological material in the total power reflected from the biosensor cell in certain spectral ranges, has been patented and is under development by the startup company BIOD [www.biod.es/], being already available at this time, several diagnostic devices based on this idea. Devices based on this transduction system have proven their efficiency in detecting proteins and infectious agents such as rotavirus and virus of dengue.

Finally, the developed theoretical model is used to characterize the optical properties of some of the materials from which biosensors are fabricated, as well as the optical properties of the biological material layers formed at different stages of an immunoassay. The optical parameters of the layers above are obtained by the general method of least squares fit to the experimental curves obtained in immunoassays.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	CELDA BIOSENSORAS: CARACTERÍSTICAS, PROCEDIMIENTOS DE FABRICACIÓN, LECTURA E INTERPRETACIÓN	5
2.1	Incertidumbre, sensibilidad y límite de detección de biosensores	6
2.2	La celdas biofotónicas BICELL	15
2.3	Tipos de celdas biosensoras y su fabricación	18
2.4	Inmunoensayos	22
2.5	Inmovilización de biorreceptores sobre el biosensor	25
2.6	Tipos de interrogación de las celdas biosensoras	29
2.7	Lectura e interpretación de datos de biosensores basados en desplazamiento de máximos o mínimos	34
2.7.1	Lectura de datos: LeoDat	35
2.7.2	Procesado de datos: ProcDat	37
3	INTERACCIÓN DE ONDAS ELECTROMAGNÉTICAS MONOCROMÁTICAS PLANAS CON MEDIOS ESTRATIFICADOS	45
3.1	Ecuaciones de Maxwell	45
3.2	Ecuaciones de onda y sus soluciones	47
3.2.1	Caso de medio dieléctrico	48
3.2.2	Caso de medio conductor o semiconductor	50
3.3	Condiciones que deben satisfacer los campos electromagnéticos en la frontera de dos medios de conductividad arbitraria	52
3.4	Reflexión y refracción de una onda electromagnética plana en la frontera entre dos medios dieléctricos	53
3.5	Cálculo de la reflectancia en la frontera entre un medio dieléctrico y uno conductor	57
3.6	Reflexión por una capa que recubre otro medio	59
3.7	Reflexión en sistemas de múltiples capas planas	66
3.8	Polarización de la luz y elipsometría	69
4	APLICACIÓN DE MODELOS DE MEDIO ESTRATIFICADO A LA SIMULACIÓN DE LA RESPUESTA ÓPTICA DE BIOSENSORES BICELLS PARA SU OPTIMIZACIÓN	77
4.1	Modelo volumétrico de capas equivalentes	80

4.1.1	Espesor e índice de refracción equivalente de la capa externa de una BICELL de pilares cilíndricos sin recubrimiento.....	80
4.1.2	Espesor e índice de refracción equivalente de la capa externa de una BICELL de pilares cilíndricos con recubrimiento	83
4.1.3	Diferencia de índices equivalentes.....	87
4.2	Validación del modelo volumétrico de capas equivalentes	89
4.2.1	Comparación de las predicciones del modelo con la respuesta de redes de pilares resonantes	89
4.2.2	Comparación con la respuesta de BICELLS de pilares de composición uniforme.....	93
4.3	Optimización de biosensores ópticos BICELL	97
4.3.1	Números de Mérito de un biosensor (Figures of Merit)	97
4.3.2	Diseño eficiente y optimización de celdas biofotónicas de pilares cilíndricos.....	102
5	NUEVAS TÉCNICAS DE INTERROGACIÓN BASADAS EN SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN ALTERNATIVAS.....	111
5.1	Antecedentes: la función de transducción M_d de residuo medio	111
5.2	Método de detección óptica interferométrica (Interferometric Optical Detection Method: IODM).....	116
5.2.1	La función de transducción PTPSA (Peak To Peak Signal Amplitude)	117
5.2.2	La función de transducción IROP (Increased Relative Optical Power)...	119
5.3	Validación experimental de los modelos teóricos de cálculo de señales de transducción PTPSA e IROP.....	123
5.3.1	Inmunoensayo indirecto BSA/Anti-BSA.....	124
5.3.2	Inmunoensayo indirecto Rotavirus/Anti-rotavirus	126
6	APLICACIÓN DE MODELOS DE MEDIO ESTRATIFICADO A LA OBTENCIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS ESTRATOS A PARTIR DE CURVAS EXPERIMENTALES $R(\lambda)$ Y $R(\theta)$	133
6.1	El problema de ajuste por mínimos cuadrados: características generales ...	134
6.2	Resolución de problemas de determinación de propiedades ópticas de capas de material en el entorno Matlab.....	137
6.3	Ejemplo de caracterización de propiedades físicas de sistemas de capas apiladas a partir de curvas de espectrometría en inmunoensayos.....	138
6.3.1	Estimación del espesor de la capa de proteína Anxa1B en la fase de inmovilización del inmunoensayo.....	143

6.3.2	Estimación de la fracción de área ocupada por la proteína Anxa1A en la fase de inmovilización del inmunoensayo	144
6.3.3	Estimación del espesor de la capa de anticuerpo Anti-Anxa1B en la fase de reconocimiento del inmunoensayo	144
6.4	Ejemplo de caracterización de propiedades físicas de sistemas de capas apiladas a partir de curvas de espectrometría y reflectometría de perfiles de haz.	146
6.4.1	Caracterización de capas de SU-8 de los biosensores a partir de curvas de espectrometría y reflectometría	151
6.4.2	Análisis de los inmunoensayos indirectos BSA/AntiBSA	153
7	CONCLUSIONES GENERALES	157
8.	BIBLIOGRAFÍA	161

1 INTRODUCCIÓN

El núcleo fundamental de esta tesis doctoral es un modelo teórico de la interacción de la luz con un tipo particular de biosensor óptico. Diferentes variantes de este biosensor vienen siendo estudiadas por los miembros del Grupo de Investigación en Óptica Micro-Nano-Fotónica y Biofotónica dirigido por el profesor D. Miguel Holgado Bolaños desde 2007 [Holgado, 2007]. Este biosensor se compone de dos regiones: en la región inferior puede haber capas de materiales con diferentes espesores y propiedades ópticas, apiladas horizontalmente; en la zona superior, sobre la que incide directamente el haz de luz, puede haber estructuras que hacen que las propiedades ópticas cambien tanto en el plano horizontal como en la dirección vertical. Estos biosensores responden ópticamente de forma diferente al ser iluminados dependiendo de que su superficie externa esté, en mayor o menor medida, recubierta con diferentes tipos de material biológico.

Figura 1.1: Esquema conceptual de la tesis

Si se pretende comprender la respuesta óptica de este tipo de biosensores es esencial tener un modelo que describa la propagación de ondas electromagnéticas en apilamientos de capas o medios estratificados. La descripción de este modelo físico se encuentra en el capítulo 3 de esta tesis. En este capítulo se muestran simulaciones de sistemas de capas con configuraciones de materiales habituales en la construcción de este tipo de biosensores. Estas simulaciones analíticas se realizan a partir de un conjunto de programas y funciones escritos para el entorno matemático de

programación Matlab® y muestran variaciones de la reflectancia con la longitud de onda y con el ángulo de incidencia para diferentes estados de polarización de la luz, así como los giros de los ángulos elipsométricos Δ y Ψ en diferentes sistemas. Aunque el proyecto inicial de realizar medidas de elipsometría sobre biosensores aún no se ha podido realizar, se ha mantenido esta sección, en la que se comprueba que el modelo reproduce, también al simular estos parámetros, resultados que se han podido recopilar en la bibliografía básica.

En el capítulo 4 de esta tesis se define un modelo aproximado, que se ha denominado modelo de índices equivalentes, que permite simular el comportamiento de biosensores con estructuras en su región más externa. El modelo de índices equivalentes se valida por comparación con datos experimentales propios de espectrometría obtenidos por nuestro grupo de investigación [Holgado, 2010], [Casquel, 2011], [López, 2015]. Una vez comprobada la validez práctica del modelo, éste se utiliza para simular cómo varía la sensibilidad de los biosensores con los diferentes parámetros que los definen: materiales, tipo de estructuras, dimensiones, etc. La rapidez que caracteriza a un modelo analítico permite realizar simulaciones masivas para encontrar los parámetros que optimizan la respuesta del biosensor [Lavín, 2012], [Lavín, 2013A]. En este capítulo se considera que la señal de transducción que permite detectar la presencia de material biológico en el biosensor es el desplazamiento de la posición de un mínimo o máximo espectral con respecto a la señal del sensor sin recubrimiento.

Las discrepancias entre las predicciones de desplazamientos de picos espectrales suministradas por el modelo y las medidas experimentales, llevaron a plantear hasta que punto estas discrepancias eran asumibles por estar dentro del margen de incertidumbre de las medidas experimentales. El replanteamiento del problema de la determinación de la incertidumbre conduce a la colaboración con el profesor D. Jesús de Vicente y Oliva en dos aspectos: en primer lugar, el estudio en profundidad de la relación de la incertidumbre en la determinación de la posición de los picos espectrales con el ruido característico de la señal y la anchura de los mismos [de Vicente, 2014]; en segundo lugar, la definición de un nuevo protocolo de actuación para la adquisición de datos procedentes de un inmunoensayo para su posterior lectura y procesado, que se aplica actualmente para cualquier medida realizada por nuestro grupo de investigación.

Siendo esenciales, en la investigación sobre biosensores, los parámetros metrológicos que los caracterizan, en la primera sección del capítulo 2 se revisan los procedimientos de obtención del límite de detección y se propone un método para su obtención. En la última sección de este capítulo se describe un sistema unificado de lectura y procesado de datos procedentes de diferentes instrumentos de medida basados en desplazamiento de máximos o mínimos, cuyo fin es predecir, tras la realización de un

inmunoensayo en un biosensor y analito concretos, la sensibilidad, límite de detección e incertidumbre en la determinación de la concentración de dicho analito. Este sistema de lectura y procesado se implementó como un conjunto de programas y funciones en el entorno matemático de programación Matlab®, y, como se mencionó anteriormente, se vienen utilizando sistemáticamente desde mediados de 2014. Por otra parte, las funciones de lectura de datos procedentes de diferentes instrumentos de medida, son imprescindibles en caracterización de propiedades de capas por ajustes de mínimos cuadrados que se realizan en el capítulo 6. El resto del capítulo 2, se dedica a la descripción de las celdas biosensoras de las que trata esta tesis: su fabricación y funcionalización; los tipos de inmunoensayos que se realizan sobre las mismas y los modos de interrogación óptica. Algunos de estos temas se tratan de manera muy básica y sólo se pretende establecer unos conceptos y vocabulario básicos que faciliten la lectura de este trabajo a investigadores con diferente formación, en un área de investigación multidisciplinar como la de los biosensores. Para mí ha resultado un placer hacer pequeños “descubrimientos” en ámbitos de conocimiento que me eran ajenos como la biología o la química y plasmarlos en estas secciones. En este capítulo también se realiza una revisión de las técnicas de biosensado por reflexión que se han encontrado en la bibliografía.

Si en el capítulo 4 nos basamos en la premisa de que la señal de transducción del biosensor es el desplazamiento relativo de un máximo o mínimo de la reflectancia medida, en el capítulo 5 se proponen formas alternativas de procesar las curvas de reflectancia para obtener una señal de transducción. Estas formas alternativas se basan en el aprovechamiento de la información disponible sobre la reflectancia en un intervalo amplio de valores, ya sea espectral o angular. El capítulo comienza con la descripción de la función de transducción de residuo medio, que es proporcional a la diferencia absoluta de valor de dos funciones en un intervalo espectral o angular. Los estudios de optimización de celdas biosensoras realizados con esta función, que fueron comunicados en 2013 [Lavín, 2013B], se consideran antecedentes de los sistemas de transducción PTPSA e IROP que se presentan en secciones posteriores. Estos sistemas de transducción han sido objeto de patente de invención [Holgado, 2014A] y su descripción y demostración de validez experimental fueron publicadas en la revista *Sensors* [Holgado, 2014B]. En particular, el sistema de transducción IROP (*Increased Relative Optical Power*), basado en el efecto que produce la presencia de material biológico, en la potencia total reflejada por la celda biosensora en determinados intervalos espectrales, ha sido objeto de desarrollo por la empresa de base tecnológica BIOD [www.biod.es/], estando ya disponibles en este momento varios dispositivos de diagnóstico basados en esta idea (figura 1.2) [Maigler, 2015]. Los dispositivos basados en este sistema de transducción han demostrado su eficiencia en la detección de proteínas y agentes infecciosos como los rotavirus y el virus del dengue [Holgado, 2014A], [Laguna, 2014A].

Figura 1.2: [A, B] Prototipos VirBioPoC y [C,D] prototipo de monitor de lágrima e interfaz de usuario desarrollados por la empresa de base tecnológica BioD

Podría decirse que el capítulo 6 continúa la línea emprendida en el capítulo 5, en el sentido de que aquí, como en el capítulo anterior, utilizamos la información contenida en las curvas de reflectancia en un amplio intervalo espectral o angular. En este caso, se recorre el camino inverso que va desde los resultados experimentales hasta los parámetros que los producen a través de los ajustes por mínimos cuadrados (véase figura 1.1.). En este proceso se utiliza el modelo físico de interacción de la luz con el sensor para, fijando algunos parámetros y dejando variar otros, ajustar lo mejor posible el modelo teórico con la curva experimental. El resultado de este proceso es la caracterización de las propiedades físicas de capas a través del cálculo de parámetros como el espesor o los coeficientes de Cauchy que determinan la variación del índice de refracción con la longitud de onda.

Tras una breve introducción teórica a los métodos de ajuste por mínimos cuadrados y su implementación en el entorno de programación Matlab®, en primer lugar, se utilizan datos experimentales de espectrometría utilizados en el estudio de antígenos marcadores de patologías del ojo, adquiridos y publicados por el grupo de investigación [Laguna, 2014B], [Laguna, 2015], para estimar propiedades de las capas biológicas obtenidas. Finalmente, se aplica el método a conjuntos de curvas de reflectancia procedentes de la técnica clásica de espectrometría y de la novedosa técnica de reflectometría sub-micrométrica aplicada a celdas biosensoras [Casquel, 2015], obtenidas y publicadas recientemente por el grupo de investigación. Como paso previo a la estimación de las propiedades de las capas de material biológico en los estudios mencionados, se realiza la caracterización de las capas de resina SU-8 con las que se fabrican las celdas biosensoras. Este estudio es especialmente importante, ya que debido a la variabilidad de los procedimientos de fabricación, las propiedades ópticas de estas capas pueden variar significativamente aunque estén compuestas por el mismo material.

2 CELDAS BIOSENSORAS: CARACTERÍSTICAS, PROCEDIMIENTOS DE FABRICACIÓN, LECTURA E INTERPRETACIÓN

Un biosensor se define como un tipo específico de sensor químico constituido por dos partes integradas:

- un biorreceptor que es capaz de reconocer específicamente la biomolécula objetivo de la medida fijándola y en algunos casos provocando una reacción química.
- un transductor que es capaz de traducir la presencia de la molécula objetivo en algún fenómeno físico medible.

El biorreceptor puede ser de diferentes tipos como enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, receptores químicos de membrana celular o moléculas sintéticas. También pueden ser tejidos, orgánulos celulares, células o virus.

Figura 2.1: Esquema fundamental de un biosensor

Los transductores se clasifican según el fenómeno físico en el que basan su señal. Los transductores electroquímicos miden corrientes o diferencias de potencial entre electrodos producidas por reacciones químicas enzimáticas producidas tras el proceso de inmovilización de la molécula objetivo. Los transductores termométricos miden pequeñas variaciones de temperatura en las mismas circunstancias. Se puede medir también la masa de las moléculas ancladas en el biorreceptor registrando la flexión sobre pequeñas láminas de material producida por su peso, o bien observando la influencia de esta masa en la propagación de ondas acústicas. El anclaje de las moléculas objetivo sobre el biorreceptor produce variaciones del índice de refracción que pueden registrarse y cuantificarse mediante diferentes métodos. Este último tipo de biosensor se denominaría biosensor óptico. Las diferentes señales de transducción

en los biosensores pueden originarse o en algunos casos reforzarse mediante marcadores radiactivos, fluorescentes o de algún otro tipo. En caso de no recurrir a estas técnicas, los sensores se denominan como sin marcado o sin etiquetado (*label-free*). Una completa revisión de los principios de transducción de biosensores sin etiquetado con una comparación de las principales características de los sistemas comerciales disponibles puede encontrarse en [O'Malley, 2008] y [Nirshl, 2011].

El fenómeno físico producido en el transductor, se convierte en una señal electrónica digital proporcional a la concentración de la molécula objetivo. Esta última operación puede requerir de otro sensor que capta el fenómeno físico producido por el transductor y lo traduce a una señal electrónica (Figura 2.1). El objetivo de un biosensor es cuantificar la concentración de un analito específico.

En este capítulo se presentan características generales de los biosensores comenzando con el estudio teórico de las curvas de calibración que permiten asignar valores de concentración de analito a una señal dada. En esta primera sección se presenta un modelo general, por tanto aplicable a cualquier biosensor, que permite atribuir incertidumbres a estas medidas de concentración y estimar límites de detección. Posteriormente se describen las celdas biosensoras ópticas que son el objeto de posteriores capítulos en cuanto a la modelización teórica de su respuesta y su lectura. En esta sección se realiza una revisión bibliográfica de otros sistemas biosensores ópticos de configuraciones geométricas o físicas semejantes, haciendo especial énfasis en los límites de detección reportados. En las secciones 2.3, 2.4 y 2.5 se describen brevemente: los procedimientos de fabricación; los experimentos llamados inmunoensayos que permiten calibrarlas para la detección de bioanalitos específicos y los procedimientos de funcionalización de la superficie de las celdas biosensoras. Aunque estos temas no son objetivo de esta tesis, se ha considerado imprescindible la introducción, a través de estas secciones, de conceptos y vocabulario a los que se hace referencia en posteriores capítulos. En la sección 2.6 se describen los diferentes tipos de interrogación óptica a los que puede someterse una celda biosensora. Finalmente, en la sección 2.7, se describe un sistema unificado de lectura y procesamiento de datos procedentes de diferentes instrumentos de medida basados en desplazamiento de máximos o mínimos, en cuyo diseño y programación el autor de esta tesis doctoral ha tenido un papel importante. En esta sección, a través del análisis de un caso real, se pone a prueba el modelo metrológico descrito en la sección 2.1.

2.1 Incertidumbre, sensibilidad y límite de detección de biosensores

La capacidad de detectar trazas de moléculas disueltas en una disolución utilizando cualquier método analítico o mediante algún tipo de biosensor se cuantifica a través

del límite de detección. El límite de detección se expresa en alguna de las unidades de concentración e indica la mínima concentración de soluto que un sistema analítico dado es capaz de detectar distinguiéndola con fiabilidad razonable de una muestra sin analito presente. [IUPAC, 1997 (p 839)]

La concentración es una proporción entre la cantidad de soluto y la cantidad de disolvente en la disolución. Es habitual, en el área de investigación de los biosensores ópticos, la utilización de la concentración expresada como una proporción entre la masa del soluto y el volumen de la disolución, por ejemplo, mg/mL, µg/mL o ng/mL. También se utilizan, para concentraciones pequeñas, las unidades ppm (partes por millón) y ppb (partes por billón). Un ppm equivale a 1 mg de soluto por cada kg de disolución. Si el disolvente es agua, teniendo en cuenta que en estos casos el peso del soluto en la disolución es despreciable, un ppm equivale a 1mg de soluto por cada litro de disolución. La unidad ppb se refiere al billón americano (10^9) y en este caso un ppb equivale a 1 µg de soluto por cada kg de disolución, o bien, 1 µg de soluto por cada litro. Las unidades ppm y ppb están desaconsejadas por la IUPAC, que recomienda utilizar las unidades equivalentes:

$$1\text{ppm} \equiv \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \equiv \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \equiv \frac{\text{ng}}{\text{mg}} \equiv \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$1\text{ppb} \equiv \frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \equiv \frac{\text{ng}}{\text{g}} \equiv \frac{\text{pg}}{\text{mg}} \equiv \frac{\text{ng}}{\text{mL}}$$

Los métodos que permiten la detección de analitos por biosensores o por cualquier procedimiento analítico requieren la construcción de una curva de calibración que relacione la concentración con algún tipo de variable que constituya la señal.

Figura 2.2: Curva de calibración teórica

La curva de calibración se obtiene reiterando n_i medidas de la señal en cada punto de la curva de calibración. Este conjunto de lecturas, a través de una regresión lineal, nos conducen a la ecuación:

$$y = m C + y_I \quad \text{Ecuación 2.1}$$

donde y es la intensidad de la señal, C la concentración, m la pendiente de la curva e y_I es la ordenada en el origen o la señal de lectura para concentración nula. Asumimos en el resto de la sección que el sensor tiene un comportamiento totalmente lineal o que la posible no linealidad es despreciable frente a la falta de repetibilidad.

La pendiente de la curva es la sensibilidad analítica (analytical sensitivity) [IUPAC, 1997 (p 1364)]. Una vez determinada la curva de calibración, un valor de intensidad de señal del sensor y puede ser asociado a una concentración C .

La incertidumbre en la determinación de C dependerá, entre otras causas, de la incertidumbre con la que determinemos cada uno de los puntos de la curva de calibración y de la posible falta de linealidad de los datos a partir de los cuales se construye.

La incertidumbre de la medida de nuestra señal y sólo puede ser determinada si se reiteran una cantidad suficientemente grande de observaciones. Asumimos como simplificación que la representación de las medidas seguirá una distribución normal o de Gauss alrededor de un valor medio central. La función matemática que describe este comportamiento ideal de una serie de experimentos es:

$$F_d = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{y-\mu}{\sigma}\right)^2} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

donde μ y σ son, respectivamente, la coordenada y del máximo de la función y la desviación típica.

En la figura 2.3 se representa esta función simétrica con respecto al valor medio μ . A partir de la función F_d , mediante integración en un intervalo, se obtiene la probabilidad de encontrar la variable en el mismo. Si las medidas de un fenómeno físico se aproximan a esta ley de densidad de probabilidad se cumple: que en el intervalo entre $[-\sigma+\mu, \mu+\sigma]$ se encuentra el 68,26 % de la distribución; en el intervalo entre $[-2\sigma+\mu, \mu+2\sigma]$ se encuentra el 95,44 % de la distribución y en el intervalo entre $[-3\sigma+\mu, \mu+3\sigma]$ se encuentra el 99,74 % de la distribución. Como hemos indicado anteriormente, el parámetro σ es la desviación *standard* o típica.

Figura 2.3: Función densidad de probabilidad normal o gaussiana para $\mu=4$ y $\sigma=1$

Cuando se realiza un conjunto discreto de medidas en número suficientemente alto, en el punto i -ésimo de una curva de calibración se pueden utilizar como estimadores estadísticos de μ y σ las siguientes expresiones:

$$y_i = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} y_{ij}}{n_i} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

$$s_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

El límite de detección de un sistema de medida de concentraciones se puede calcular reiterando un número de medidas sobre una muestra de concentración nula. Si la fluctuación de los valores medidos sigue una distribución normal podremos estimar la media y la desviación típica a partir de la ecuación 2.3 y la ecuación 2.4.

La probabilidad de que la menor concentración que es capaz de medir nuestro sistema provenga de una fluctuación de la señal de concentración cero depende del número de desviaciones típicas que nos alejemos de esa señal. Siempre en la suposición de distribución gaussiana: existe un 15.87 % de posibilidades de que una señal situada a una distancia de una desviación típica provenga de una fluctuación de la señal de cero; 2.56 % a dos desviaciones típicas y sólo 0.13 % a tres desviaciones típicas de la señal de cero. Si elegimos como criterio las tres desviaciones típicas, parece claro que podemos tener un nivel de confianza muy alto en que un valor de señal correspondiente a una concentración muy baja $y \cong 3s$, no provenga de una fluctuación de una concentración nula. En la figura 2.4 se representa gráficamente este criterio.

Figura 2.4: Representación gráfica del criterio $k=3$ del límite de detección para la señal de calibración (curvas gaussianas de $\sigma=1$ y señal nula asociada a la concentración cero). La probabilidad de que una señal $y > 3$ provenga de una fluctuación de cero es el área debajo de la curva verde entre 3 e infinito

Si llamamos y_{LoD} al límite de detección en la señal de calibración, y_I al valor asociado a la concentración cero (figura 2.2) en la curva de calibración y s_I a su desviación típica; la IUPAC establece [IUPAC, 1997 (p 839)]:

$$y_{LoD} = y_I + k s_I \quad \text{Ecuación 2.5}$$

donde k es un factor numérico elegido de acuerdo con el nivel de confianza deseado al que llamamos factor de incertidumbre.

En la ecuación 2.5 el subíndice “I” se refiere a la intersección con el eje de ordenadas de la curva de calibración y por tanto a la señal con concentración cero. En las referencias en inglés, a la situación de concentración nula se la suele denominar “blank”, asociándole a las variables que la describen el subíndice “B”.

Si llamamos C_{LoD} al límite de detección en concentraciones, en adelante, límite de detección simplemente, o LoD:

$$C_{LoD} = \frac{y_{LoD} - y_I}{m} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

donde m es la pendiente de la curva de calibración o sensibilidad analítica. Por tanto:

$$C_{LoD} = \frac{k s_I}{m} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

En el caso de usar este modelo, IUPAC recomienda que el factor no baje de 3. En este modelo no se consideran algunas fuentes de incertidumbre que influirían en la determinación del límite de detección; entre otras, que la pendiente de la curva de calibración tenga incertidumbre, tampoco se tiene en cuenta la resolución o división de escala del instrumento de medida de la señal y , entre otros.

Observando la ecuación 2.7 y la curva de calibración de la figura 2.2, se hace evidente que el límite de detección es inversamente proporcional a la sensibilidad analítica, de forma que cuanto mayor sea la sensibilidad analítica menor será el límite de detección. La figura 2.5 pone de manifiesto gráficamente esta situación.

Figura 2.5 : Relación entre las incertidumbre de la señal, la pendiente de las curvas de calibración y el límite de detección

A partir del aparentemente sencillo concepto de límite de detección que acabamos de ver se han generado múltiples aproximaciones para su cálculo [Long, 1983], así como conceptos adicionales como el límite de cuantificación que no tratamos aquí [Currie, 1995] [Currie, 1999], [Armbruster, 2008].

Con respecto a la determinación del límite de detección se han propuesto modelos con valores inferiores a tres para la constante de incertidumbre. También han sido propuestos modelos en los que se sustituye la desviación típica por otros estimadores como la desviación típica de la media, desviaciones típicas combinadas con las de los otros puntos de la curva de calibración o la desviación típica relativa [Long, 1983].

Por otra parte, existen modelos que tienen en cuenta la incertidumbre asociada a la determinación de la sensibilidad analítica, que en el modelo de la IUPAC, ecuación 2.7, se considera exacta o sin incertidumbre. En la práctica, cuando determinamos una recta de calibración, los datos distan de ajustarse exactamente a la recta. Además, la

determinación de cada punto lleva asociada cierta incertidumbre que contribuirá tanto a la incertidumbre de la pendiente m , como a la incertidumbre del punto de intersección de la recta con el eje de ordenadas y_I .

Cuando se utiliza la curva de calibración descrita en la ecuación 2.1 para determinar la concentración C atribuible a la señal y de un sensor, despejamos el valor de C en la misma:

$$C = \frac{y - y_I}{m} \quad \text{Ecuación 2.8}$$

Para atribuir una incertidumbre a la medida de la concentración podemos aplicar la Ley de Propagación de Incertidumbres para magnitudes independientes:

$$s_C^2 = \left(\frac{\partial C}{\partial y}\right)^2 s_y^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial y_I}\right)^2 s_{y_I}^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial m}\right)^2 s_m^2 \quad \text{Ecuación 2.9}$$

Obteniéndose:

$$s_C^2 = \left(\frac{1}{m}\right)^2 s_y^2 + \left(\frac{1}{m}\right)^2 s_{y_I}^2 + \left(\frac{y_I - y}{m^2}\right)^2 s_m^2 \quad \text{Ecuación 2.10}$$

En la expresión anterior, el factor s_{y_I} se refiere a la incertidumbre con que se determina el punto de corte. Es un parámetro característico del ajuste por mínimos cuadrados que se realiza para determinar la recta de calibración y no debe confundirse con s_I que es la desviación típica para la concentración nula.

Despejando s_C y multiplicando por un factor de incertidumbre adecuado al nivel de confianza deseado para nuestro intervalo de incertidumbre, obtenemos:

$$U_C = k \left[\frac{1}{m} \sqrt{s_y^2 + s_{y_I}^2 + \left(\frac{y_I - y}{m}\right)^2 s_m^2} \right] \quad \text{Ecuación 2.11}$$

La expresión anterior permite el cálculo de la incertidumbre en el valor de la concentración obtenido a partir de la ecuación 2.8, y tiende al modelo de la IUPAC de la ecuación 2.7 para la determinación de límite de detección, si entendemos que tanto la pendiente como el punto de corte de la curva de calibración son determinados sin incertidumbre y la aplicamos al punto de concentración nula donde $s_y=s_I$ e $y=y_I$.

En caso de considerar que la pendiente y el punto de corte de la curva de calibración tienen incertidumbre, en $y=y_I$ con $s_y=s_I$, obtenemos:

$$C_{LoD} = k \left[\frac{1}{m} \sqrt{s_I^2 + s_{y_I}^2} \right] \quad \text{Ecuación 2.12}$$

Los parámetros m y y_I de la ecuación 2.1 se obtienen a partir de un conjunto de mediciones reiteradas n_i de la señal y_{ij} $\{j=1,.. n_i\}$ para diferentes concentraciones C_i . Supondremos que las mediciones sobre la señal y_i tienen una distribución normal de forma que esta dispersión es caracterizada por su desviación típica s_{y_i} y una media y_i . En lo que sigue, se supone que la incertidumbre en la determinación de las concentraciones C_i puede despreciarse, lo que sería cierto si se cumple la condición:

$$s_{y_i} \gg s_{C_i} m \quad \text{Ecuación 2.13}$$

Si se cumple la condición anterior, y dadas N ternas $\{C_i, y_i, s_{y_i}\}$ con los que determinamos la recta de calibración se cumple, para el eje de abscisas asociado a las concentraciones [Bevington, 2013]:

$$y_I = \frac{1}{\Delta} \left| \begin{array}{cc} \sum_{i=1}^N \frac{y_i}{s_{y_i}^2} & \sum_{i=1}^N \frac{C_i}{s_{y_i}^2} \\ \sum_{i=1}^N \frac{C_i y_i}{s_{y_i}^2} & \sum_{i=1}^N \frac{C_i^2}{s_{y_i}^2} \end{array} \right| \quad \text{Ecuación 2.14}$$

$$m = \frac{1}{\Delta} \left| \begin{array}{cc} \sum_{i=1}^N \frac{1}{s_{y_i}^2} & \sum_{i=1}^N \frac{y_i}{s_{y_i}^2} \\ \sum_{i=1}^N \frac{C_i}{s_{y_i}^2} & \sum_{i=1}^N \frac{C_i y_i}{s_{y_i}^2} \end{array} \right| \quad \text{Ecuación 2.15}$$

donde...

$$\Delta = \left| \begin{array}{cc} \sum_{i=1}^N \frac{1}{s_{y_i}^2} & \sum_{i=1}^N \frac{C_i}{s_{y_i}^2} \\ \sum_{i=1}^N \frac{C_i}{s_{y_i}^2} & \sum_{i=1}^N \frac{C_i^2}{s_{y_i}^2} \end{array} \right| \quad \text{Ecuación 2.16}$$

Siendo las incertidumbres asociadas a los parámetros y_I y m :

$$s_{y_I} = \sqrt{\frac{1}{\Delta} \sum_{i=1}^n \frac{C_i^2}{s_{y_i}^2}} \quad \text{Ecuación 2.17}$$

$$s_m = \sqrt{\frac{1}{\Delta} \sum_{i=1}^n \frac{1}{s_{y_i}^2}} \quad \text{Ecuación 2.18}$$

Finalmente, es posible utilizar como mejor estimador de la dispersión de los datos la desviación típica de la media que se obtiene dividiendo entre $\sqrt{n}$ a la desviación típica muestral [JCGM/BIPM, 2008, p.10], y además, es recomendable la introducción de la incertidumbre por corrección de división de escala o resolución del instrumento utilizado E [JCGM/BIPM, 2008, p.13].

$$u_d = \frac{E}{\sqrt{12}} \quad \text{Ecuación 2.19}$$

Por lo que la ecuación 2.12 se reescribe como:

$$C_{LoD} = k \left[\frac{1}{m} \sqrt{\frac{s_I^2}{n} + \frac{E^2}{12} + s_{y_I}^2} \right] \quad \text{Ecuación 2.20}$$

Cuando utilizamos la curva de calibración para determinar una concentración C a partir de una señal y ; la incertidumbre de C , depende de la incertidumbre en la pendiente y de la diferencia entre la señal correspondiente a la concentración cero y la de la señal concreta y . La incertidumbre, por tanto, crecerá proporcionalmente al valor absoluto de $y_I - y$. Manteniendo los criterios que acabamos de aplicar en la obtención de la ecuación 2.20, la ecuación 2.11 se reescribe como:

$$U_C = k \left[\frac{1}{m} \sqrt{\frac{s_y^2}{n} + \frac{E^2}{12} + s_{y_I}^2 + \left(\frac{y_I - y}{m} \right)^2 s_m^2} \right] \quad \text{Ecuación 2.21}$$

En esta última expresión s_y^2 se refiere a la desviación típica muestral asociada a la medida en una determinada concentración. En el caso de que el sensor estudiado derive en un diseño comercial, dado que el usuario final realiza una sola medida, la ecuación 2.21 con $n=1$ puede darnos una estimación de la incertidumbre de dicho instrumento. En ese caso, s_y^2 podría sustituirse por la media o el máximo de las desviaciones típicas en la calibración dependiendo del nivel de confianza deseado. De la misma manera, el término $\left(\frac{y_I - y}{m} \right)^2 s_m^2$ podría sustituirse por su valor máximo en el intervalo de concentraciones con el fin de atribuir a U un valor numérico único.

En la sección 2.7 de este capítulo se describe la implementación de un conjunto de funciones y programas escritos para el entorno matemático de programación Matlab®, a partir de los cuales se puede estudiar, para una curva de calibración de un experimento, los límites de detección e incertidumbres calculados con este modelo metrológico bajo diferentes aproximaciones.

2.2 La celdas biofotónicas BICELL

En esta tesis se presentan diferentes trabajos relacionados con un tipo específico de biosensor óptico, las Biophotonic Sensing Cells o BICELLs [Holgado, 2007], [Holgado, 2010]. Una parte de estos trabajos tiene que ver con la lectura de datos procedentes de estos biosensores, su procesado e interpretación. Por otra parte, se realiza la modelización teórica de su respuesta, lo que ha conducido a la optimización de algunos de los parámetros que los definen e incluso a la propuesta de un nuevo método de lectura y la construcción de un aparato basado en el mismo [Holgado, 2014A], [Holgado, 2014B].

Un biosensor BICELL (Figura 2.6) consta de dos regiones claramente diferenciadas desde el punto de vista físico-matemático. La región más profunda o sustrato, puede ser un apilamiento de capas planas de diferentes materiales o bien un material uniforme. La región más externa, donde incide directamente la luz, consiste en una red de pilares caracterizados por su disposición sobre el plano, su altura y su forma. La superficie de la región externa se tapiza de biorreceptores específicos del agente biológico a detectar. En su versión más sencilla, cuando la superficie biorreceptora es un plano, el biosensor se convierte en un interferómetro Fabry-Perot. En cualquiera de sus versiones, buscaremos las pequeñas variaciones en la respuesta óptica del sensor provocadas por la captura del analito por parte de los biorreceptores.

Figura 2.6: Biosensor BICELL conceptual

Los biosensores BICELL son dispositivos en los que los agentes biológicos o las biomoléculas son detectadas sin modificarlas ni etiquetarlas (*label-free*). Existe una completa revisión de las características de dispositivos biosensores ópticos sin etiquetado [Fan, 2008]. En ella se clasifican los biosensores en función de las estructuras y fenómenos ópticos en los que se basan. Según esta clasificación los biosensores ópticos “label-free” se basan en alguno de los siguientes fenómenos físicos o estructuras:

1. Resonancia de plasmones de superficie.
2. Interferómetros
3. Guías de onda
4. Anillos resonantes
5. Fibras ópticas
6. Cristales fotónicos

Las celdas biofotónicas BICELLS que se estudian en este trabajo son un tipo de interferómetro. En el trabajo mencionado anteriormente [Fan, 2008] se clasifican los biosensores basados en interferómetros en cuatro tipos:

1. Mach-Zehnder
2. Young
3. Hartman
4. Interferometría de reflexión o backscattering

Las BICELLS, en relación a las cuales se han realizado las contribuciones científicas y técnicas de esta tesis, pueden considerarse interferómetros del último tipo. En este tipo de sistemas un haz de luz es enfocado en una pequeña zona sensora y la luz reflejada es analizada en un detector. La superficie de la zona sensora está definida por estructuras cuyas dimensiones características son del orden o están por debajo de la longitud de onda de la luz incidente. La captura de proteínas sobre la superficie sensora produce algún tipo de cambio en la intensidad reflejada por el sensor, este cambio constituye la señal de transducción. En este tipo de biosensores la zona biosensora es plana lo que supone una ventaja en los procesos de manufactura de los mismos. Por ejemplo, el depósito de diferentes recubrimientos puede realizarse mediante técnicas de deposición en vacío habituales en la industria de la microelectrónica; o bien, pueden fabricarse mediante técnicas de fotolitografía estructuras con la que incrementar la sensibilidad [Robinson, 1995].

Enumeramos y describimos brevemente a continuación las características de algunos de estos biosensores:

- El sensor de silicio poroso [Lin, 1997], [de Stefano, 1997] es básicamente un interferómetro Fabry-Perot en el que la superficie sensora está formada por silicio en el que se han generado profundos poros mediante grabado electrolítico. Las características franjas de interferencia que se obtienen al iluminar el interferómetro con luz visible, efectúan un desplazamiento cuando las biomoléculas a detectar se enlazan con la superficie produciendo un cambio de índice de refracción del sistema. Los autores de primer artículo trabajan sobre silicio con cavidades de 200 nm de diámetro y entre 1 y 5 μm de profundidad con las que consiguen aumentar la superficie de interacción con las biomoléculas. En este artículo se reportan límites de detección de 10^{-12} moles/L con cadenas de ADN

de 16 nucleótidos. Límites de detección en el mismo orden para la molécula de biotina de peso molecular 244 en el orden de la décima de picogramo por mL.

- Los sensores basados en CD's [Varma, 2004], [Peng, 2005], [Zhao, 2006] aprovechan la bien conocida técnica de muestreo sobre CD's rotatorios. En los CD's disponibles comercialmente están grabados concéntricamente en espiral caminos de surcos (*pits*) discontinuos con diferentes longitudes, de una anchura aproximada de media micra y con una separación lateral entre pistas de 1,6 micras. La profundidad de los surcos es un cuarto de la longitud de onda de la luz con la que se muestrea el disco, lo que produce una diferencia de fase de π entre la luz reflejada en el fondo de un surco y la que se refleja en la superficie (*land*); y por tanto, una interferencia constructiva o destructiva, que nos permite leer la información codificada. Los BioCD's tienen una estructura diferente [Varma, 2004], consistente en estructuras radiales de oro de 20 μm de ancho depositadas sobre la superficie del CD (*land*) hasta los 79,1 nm que es $1/8$ de la longitud de onda del láser de He-Ne incidente 632,8 nm. Los autores indican que la inmovilización de biomoléculas sobre los radios produce un cambio de señal máximo para esta interferencia en cuadratura. Posteriormente se desarrollan otros tipos de estructuras [Peng, 2005], [Zhao, 2006] reportándose límites de detección de proteínas hasta 0,1 ng/mL.
- Se ha construido un sensor basado en una rejilla de difracción realizada adhiriendo a una superficie reflectante bandas periódicas formadas por pequeñas esferas de poliestireno recubiertas de estreptavidina (streptavidin beads) [Chang, 2007]. La superficie de estas pequeñas esferas permite fijar biorreceptores de proteínas específicas y estudiar el efecto sobre los patrones de difracción de la captación de estas proteínas.
- El biosensor BIRC (Backscattering Interferometry in Rectangular Channels) [Marcov, 2004], [Bornhop, 2007] estudia el patrón de franjas originado al incidir un haz laser sobre un canal microfluídico rectangular moldeado sobre un polímero llamado polidimetilsiloxano. El fondo y las paredes del canal se tapizan de biorreceptores que capturarán de la disolución los bioanalitos objetivo. Este biosensor es el primer sin marcado ("label-free") con capacidad para detectar la interacción biomolecular de analitos directamente en una solución. Posteriormente, el mismo grupo de investigación realizan estudios de la luz dispersada por capilares cilíndricos por los que circula la disolución a analizar, y cuyo interior es la superficie biorreceptora [Sorensen, 2006]. Estos estudios tienen sus antecedentes en el estudio de las variaciones relativas de índice de refracción en disoluciones circulando en capilares y microcanales de sección cilíndrica [Bornhop, 1995], [Tarigan, 1996], [Swinney, 2000]. Con el biosensor BIRC se

reportan límites de detección de $2 \cdot 10^{-15}$ y $47 \cdot 10^{-15}$ mol/L para inmunoglobulina humana y biotina respectivamente, que corresponden a 3 decimas de nanogramo por mililitro y la centésima de nanogramo por mililitro.

En una revisión más reciente [Kussrow, 2012] se analizan en particular los métodos interferométricos aplicados a la implementación de sistemas biosensores. Esta revisión, uno de cuyos autores es el autor de los primeros estudios de *backscattering* en capilares y canales rectangulares, es particularmente interesante por la revisión de los últimos logros de esta técnica en cuanto a sensibilidad y límite de detección.

Una descripción del proceso de construcción de un biosensor basado en nanopilares de SiO₂ ha sido publicada recientemente [Chen, 2013]. Este autor ha aplicado su biosensor, aún más recientemente [Chen, 2014], a la detección de similitudes entre fragmentos de ADN mediante hibridación. En este trabajo se informa de la detección de la reacción de hibridación a través de un desplazamiento de la respuesta espectral de la red de difracción que produce una variación de color del azul al rojo.

2.3 Tipos de celdas biosensoras y su fabricación

Las celdas biosensoras BICELL (Figura 2.6) tienen una región externa sobre la que se construyen, mediante diferentes técnicas, estructuras cuyo objetivo básico es aumentar la sensibilidad con respecto a la de un interferómetro Fabry-Perot. Las estructuras pueden ser en altorrelieve o bajorrelieve. En ambos casos formarán una red bidimensional periódica. Todas las estructuras de las celdas biosensoras a las que se referirá este trabajo serán altorrelieves en forma de columnas con diferentes secciones. Nos centramos, por tanto en esta sección, en este tipo de fabricación.

En la mayor parte de las celdas biosensoras a que hará referencia en este trabajo las estructuras se construyen con la fotorresina epoxi negativa llamada SU-8, cuya primera formulación fue patentada en 1989 [Gelorme, 1989], y que actualmente se comercializa en diferentes variedades [www.microchem.com]. Cuando la resina es iluminada por luz ultravioleta, expuesta a un haz de electrones, o a rayos X; tras una serie de procesos térmicos y químicos, las zonas iluminadas o expuestas permanecerán, mientras que las no expuestas serán eliminadas (Figura 2.7). Este proceso permite construir estructuras con una alta relación de aspecto [Lorentz, 1998]. La fabricación de estructuras con SU-8 se realiza a través de las siguientes etapas:

Pretratamiento: El proceso para conseguir las estructuras comienza con un pretratamiento de la superficie del sustrato sobre el que se fijarán. El pretratamiento se realiza para garantizar una mejor adherencia del SU-8 consiste en una limpieza mediante procedimientos químicos y un calentamiento para eliminar la humedad.

Recubrimiento o spin-coating: Una vez preparada la superficie se procede a extender la resina mezclada con un disolvente que le dará la viscosidad adecuada. Para conseguir un recubrimiento con el espesor adecuado, el sustrato y un cierto volumen de resina girarán en un plato de forma que la fuerza centrífuga extenderá la mezcla. El proveedor de SU-8 suministra tablas o gráficos en el que se relacionan las velocidades angulares de rotación del plato con los espesores de recubrimiento para diferentes resinas caracterizadas por su densidad y viscosidad para que el usuario consiga aproximadamente el espesor deseado. Este sistema permite recubrimientos de hasta 250 μm . Espesores entre 250 μm y 1 mm pueden obtenerse mediante sucesivos recubrimientos, mientras que espesores superiores a 1 mm tendrían que obtenerse mediante moldeo [del Campo, 2007]. La técnica del moldeo se ha utilizado para fabricar celdas biosensoras con nanopilares de diámetros entre 250 y 1000 nm con alturas de 1000 nm utilizando nanomoldeo de alta relación de aspecto con otros polímeros [Kuwabara, 2004].

Tratamiento térmico suave o soft bake: El objetivo de esta fase del proceso es eliminar el disolvente utilizado en el proceso anterior y mejorar la adhesión al sustrato. Para ello se somete la pieza a la temperatura de 65 °C durante algunos minutos.

Exposición: Tras conseguir una capa uniforme de SU-8 sobre el sustrato, ésta es irradiada en determinadas zonas por un tiempo, en el orden de magnitud de los minutos, que varía con el espesor de la capa [del Campo, 2007 (Tabla 2)]. El método más habitual para conseguir la irradiación de zonas escogidas es la interposición de una máscara (Figura 2.7) La irradiación del producto produce una pequeña concentración de ácido que actuará como catalizador del proceso posterior de entrelazamiento o entrecruzamiento del polímero (*cross-linking*) que se desencadenará con un tratamiento térmico posterior.

Tratamiento térmico post-exposición o post-exposure bake: Tras la exposición, un calentamiento a 95 °C durante varios minutos produce el enredado o *cross-linking* de las moléculas de resina irradiadas. Este proceso supone un cambio en las propiedades químicas, térmicas y mecánicas de las zonas de material tratado en el sentido de endurecerlas y hacerlas más resistentes a ataques químicos.

Revelado: Tras el tratamiento térmico post-exposición, el baño con un disolvente adecuado disolverá las zonas no expuestas a radiación, quedando solamente las estructuras deseadas. Finalmente se procederá a un secado y limpieza de la pieza.

Opcionalmente se pueden someter las piezas a un proceso térmico a mayor temperatura o *hard bake* que garantiza mejores comportamientos termo-mecánicos en piezas cuya futura temperatura de servicio sea alta. Este proceso se realiza calentando la resina a 200 °C durante varios minutos.

Figura 2.7 : A> Fabricación de estructuras de SU-8 mediante máscara. B> Estructura remanente tras el tratamiento térmico y el ataque químico

Figura 2.8 : Imágenes de estructuras de celdas biofotónicas realizadas con microscopio electrónico [Sanza, 2015]

Figura 2.9: Celdas biofótónicas con alta relación de aspecto realizadas por exposición con haz de electrones

Detalles del resultado del proceso, pueden observarse en las fotografías de microscopio electrónico de barrido de la figura 2.8. Se han escogido entre los múltiples motivos que pueden grabarse, el pilar cilíndrico y el de sección de estrella para mostrar una gradación de complejidad. En la figura se muestran los tamaños aproximados de las estructuras, en este caso submicrométricas. Por último, las imágenes cenitales muestran la típica red bidimensional hexagonal que permite una mayor compactación de los pilares.

Mediante la exposición con haz de electrones se han conseguido estructuras basadas en pilares con relación de aspecto de 3,8:1 (Figura 2.9) [Holgado, 2010], [López-Romero, 2010]. Se han construido también celdas biosensoras por métodos alternativos a la habitual iluminación por luz ultravioleta, fotoactivando la resina con láser de excímero [Sanza, 2011B].

En el caso de querer construir estructuras de pilares materiales dieléctricos no poliméricos como SiO_2 y Si_3N_4 , el proceso es mucho más complejo y comenzará con la deposición sobre un sustrato de silicio de capas de material con el espesor deseado. Esta deposición de material puede realizarse a través del proceso denominado PECVD (Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition) con el que se pueden depositar espesores de material con incertidumbres inferiores a 10 nm [Casquel, 2012]. Posteriormente se extiende una fotoresina negativa sobre la superficie. En la resina se construye un patrón con la sección de las columnas que se quieren construir, por ejemplo sobre el SiO_2 , mediante las técnicas litográficas que se han explicado anteriormente. En esta técnica, la resina sirve como protección del material no polimérico para el siguiente proceso que será de grabado en seco con bombardeo de iones (Dry-Etching). Una descripción del proceso de construcción de un biosensor basado en nanopilares de SiO_2 ha sido publicada recientemente [Chen, 2013].

La construcción patrones periódicos en forma bajorrelieves o agujeros; así como las técnicas para construir estructuras complejas sobre materiales dieléctricos no poliméricos como SiO_2 y Si_3N_4 ; junto con métodos alternativos basados en la ablación de material con láser pulsado, están extensamente descritos en Tesis Doctorales previas [Casquel, 2012] [Sanza, 2015].

2.4 Inmunoensayos

El sistema inmunitario de los vertebrados, y en particular de los seres humanos, los defiende contra otros organismos invasores o patógenos, así como contra células anormales del organismo que puedan convertirse en cancerosas. La evolución ha dotado a los seres vivos con dos tipos de defensas que contrarrestan estas amenazas. La primera de ellas, llamada inmunidad innata, está presente antes de la exposición a cualquier patógeno y resulta efectiva desde el nacimiento. Las defensas innatas son inespecíficas y reconocen y responden a un gran espectro de microorganismos, independientemente de su identidad precisa. El segundo tipo de defensa es la inmunidad adquirida, también llamada inmunidad adaptativa. Se desarrolla sólo después de la exposición a agentes inductores como microorganismos, células anormales del organismo, toxinas u otras sustancias extrañas. Las defensas adquiridas son muy específicas y pueden distinguir un inductor de otro aunque sólo difieran ligeramente. Este reconocimiento lo logran las células llamadas linfocitos a través de unas moléculas proteicas llamadas anticuerpos o inmunoglobulinas que sobresalen de su membrana plasmática anclados a la misma. Las células que derivan de los linfocitos B secretan los anticuerpos de marcado, que se unen a los microorganismos y los marcan para su eliminación. Cualquier molécula extraña que sea reconocida en forma específica por los linfocitos, y genere una respuesta en ellos, se llama antígeno. La mayor parte de los antígenos son moléculas grandes, proteínas o polisacáridos, que sobresalen de la superficie de los organismos patógenos. Los linfocitos, a través de sus anticuerpos, reconocen y se unen a una pequeña región accesible de un antígeno denominada epítipo o determinante antigénico. En la figura 2.10 se representa un modelo atómico del anticuerpo más abundante en la sangre, la IgG, y la representación esquemática de sus partes. Aunque existen cinco clases de inmunoglobulinas, en este trabajo siempre se utilizará ésta para representar el proceso de reconocimiento antígeno anticuerpo. Las inmunoglobulinas son glicoproteínas de un alto peso molecular en el orden de los centenares de miles de dalton. La secuenciación completa de los aminoácidos de la IgG se realizó en la década de los 60 del siglo XX [Golub, 1987].

Las celdas biosensoras que se han descrito en la sección 2.3 adquieren su capacidad de biosensado ideal cuando conseguimos anclar sobre su superficie anticuerpos receptores del antígeno a detectar. Cuando conseguimos esto, decimos de la superficie que está biofuncionalizada. Los procesos que permiten que las superficies de los diferentes materiales con los que pueden fabricarse los biosensores sean capaces de anclar biomoléculas se discutirán en la siguiente sección. En esta sección, daremos por hecho la capacidad de la superficie del biosensor para anclar biomoléculas y orientarlas espacialmente en forma ideal, lo cual, no es en absoluto sencillo.

Figura 2.10 : Anticuerpo IgG de la clase más abundante y su representación esquemática

Los inmunoensayos son experimentos en los que se mide la capacidad real del biosensor para detectar una biomolécula. Idealmente, la superficie del sensor debería estar inicialmente tapizada de anticuerpos receptores del antígeno a detectar. Este tipo de inmunoensayo se llama directo. Los inmunoensayos tienen dos etapas que llamadas inmovilización y reconocimiento.

Durante la etapa de inmovilización, si el inmunoensayo es directo, la superficie del biosensor se recubre de anticuerpos hasta la saturación. La saturación espacial del recubrimiento superficial se observará en el biosensor como saturación de la señal cuando el recubrimiento se realiza a partir de concentraciones progresivamente mayores de anticuerpo. Tras la etapa de inmovilización de los anticuerpos ya podemos decir que tenemos un biosensor específico para un determinado tipo de antígeno. Sometiendo éste a concentraciones progresivamente mayores de antígeno, obtendremos la curva de reconocimiento. En la figura 2.11 se han representado gráficamente las fases de un inmunoensayo directo.

La región de variación lineal que lleva de la saturación de la etapa de inmovilización a la saturación de la etapa de reconocimiento es la recta de calibración del biosensor que se definió en la sección 2.1 de este capítulo. La pendiente es su sensibilidad analítica; y el inverso de la pendiente, junto con la incertidumbre que atribuimos a nuestras medidas de señal, nos informa sobre las concentraciones mínimas de antígeno que podemos apreciar con nuestro sensor o límite de detección, también definido en la sección 2.1 . Los valores de la señal en la saturación se utilizarán más adelante para estimar las propiedades ópticas y el espesor del recubrimiento de material biológico.

Figura 2.11: Etapas de un inmunoensayo directo

Figura 2.12: Etapas de un inmunoensayo indirecto

Una forma alternativa de medir el efecto físico de la presencia del complejo antígeno-anticuerpo en una muestra es realizar las etapas indicadas anteriormente intercambiando antígeno por anticuerpo. Este tipo de experimento es el inmunoensayo indirecto. En la etapa de reconocimiento de este inmunoensayo, se tapiza la superficie del biosensor con los antígenos a detectar hasta la saturación. Posteriormente, la reacción del sensor a diferentes concentraciones de anticuerpo nos proporcionará la curva de reconocimiento hasta alcanzar la saturación (Figura 2.12).

Los párrafos anteriores junto con la figura 2.11 y la figura 2.12 describen los inmunoensayos de forma idealizada. Los detalles prácticos de su realización están extensamente descritos en trabajos anteriores [Casquel, 2012], [Sanza, 2011C], [Sanza, 2015]. Es importante señalar, sin embargo, que entre las etapas de inmovilización y reconocimiento, hay un procedimiento importante que es el bloqueo. El objetivo del procedimiento de bloqueo es recubrir químicamente la superficie del sensor que, tras la etapa de inmovilización, aún no está ocupada por antígenos o anticuerpos, según sea el ensayo indirecto o directo.

El bloqueo impide que en la etapa de reconocimiento queden pegadas proteínas sobre estas superficies libres en forma inespecífica. Esta etapa es especialmente importante cuando los biomarcadores son de pequeño peso molecular. En biosensores fabricados con el polímero SU-8 el bloqueo se realiza, entre otras sustancias, con etanolamina. La etanolamina desactiva los grupos funcionales amino e hidroxilo disponibles sobre la superficie para que no puedan unirse a los biomarcadores de forma inespecífica, [Sanza, 2015]. Recientemente se ha demostrado la importancia de este proceso en el sensado de biomarcadores de las enfermedades de ojo seco con sensores BICELL [Laguna, 2015].

2.5 Inmovilización de biorreceptores sobre el biosensor

La superficie de las estructuras, cuyos métodos de fabricación se han descrito en el apartado 2.3, y sobre las que se realizan los inmunoensayos que se han descrito en la sección 2.4, tiene que tener la capacidad de inmovilizar biomoléculas. Tanto en los inmunoensayos directos como en los indirectos, las moléculas que actúan como biorreceptores, y que deben recubrir la superficie del transductor son de carácter proteico. Para que la superficie del biosensor tenga la capacidad de inmovilizar algún tipo de proteína tendrá que ser químicamente modificada de forma que haya grupos funcionales capaces de unirse a las proteínas preferentemente mediante enlaces covalentes.

Todas las proteínas son macromoléculas formadas a partir del mismo conjunto de 20 aminoácidos. Los polímeros compuestos por cadenas de aminoácidos se llaman polipéptidos. La secuencia en la que se encadenan los aminoácidos de una proteína es única y constituye su estructura primaria. Los aminoácidos son moléculas orgánicas portadoras de los grupos funcionales amino y carboxilo. Los enlaces peptídicos se forman por reacciones de deshidratación que conectan el grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo amino del siguiente. En la figura 2.13 se representa esquemáticamente el aminoácido fundamental y el enlace peptídico [Campbell, 2007].

Figura 2.13 : Estructura fundamental de un aminoácido y enlace peptídico

Las cadenas de aminoácidos pueden formar cadenas plegadas y en hélice, lo que constituye las dos formas de estructura secundaria. Por otra parte, las cadenas variables de los aminoácidos pueden interactuar entre sí, produciendo plegamientos que dan a la proteína una forma única que constituye su estructura terciaria. Estas interacciones pueden ser enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, puentes disulfuro o enlaces iónicos. Finalmente algunas proteínas se componen de dos o más cadenas polipeptídicas agregadas en una macromolécula funcional. La estructura cuaternaria es la estructura proteica global que resulta de agregar estas subunidades polipeptídicas [Campbell, 2007].

Las moléculas orgánicas pueden adherirse a la superficie de los materiales sin necesidad de ningún tratamiento específico. Este proceso se suele denominar adsorción física y es originado por interacciones electrostáticas débiles entre las biomoléculas y superficie. Los mecanismos más habituales para este tipo de interacciones son las fuerzas de van der Waals, originadas por los momentos dipolares de las moléculas, y los enlaces de puente de hidrógeno. La adsorción física tiene la principal ventaja de ser fácil y barata de realizar, junto con la de ser reversible y no alterar el material. Sin embargo, tiene el inconveniente principal de que las moléculas no quedan ancladas ni fuerte ni direccionalmente y es escasamente reproducible.

Para que las biomoléculas; por ejemplo, los anticuerpos en un inmunoensayo directo, se anclen en la forma en que habitualmente representamos un biosensor ideal (figura 2.11), tendremos que modificar la superficie del biosensor para que forme enlaces covalentes fuertes con las biomoléculas.

La capacidad de la superficie de los biosensores para inmovilizar biomoléculas se incrementa mediante diferentes tratamientos químicos, que de forma general se han descrito en trabajos anteriores [Sanza, 2011C], [Sanza, 2015], [Casquel, 2012].

Para las estructuras fabricadas con SU-8, el método más habitual es la catálisis ácida. La catálisis ácida es un procedimiento que simplemente activa grupos funcionales ya presentes en el material. En este procedimiento se baña la superficie en una disolución de ácido sulfúrico que abre los anillos epoxi del SU-8. Como resultado se generan grupos hidroxilo que quedan disponibles para formar enlaces covalentes con los grupos funcionales amino de las proteínas.

La superficie del SU-8 puede activarse también mediante procedimientos “secos” como la disociación pirolítica de amoníaco para el implante de grupos amino sobre su superficie [Joshi, 2007A] o la exposición a luz ultravioleta en atmosfera de amoníaco con el mismo objetivo.

Figura 2.14 : Apertura de anillos epoxi del SU-8 mediante ataque con ácido sulfúrico [Tao, 2008]

La superficie de biosensores construidos con SiO_2 , pero también la de los construidos con SU-8 [Joshi, 2007B][Bagloi, 2008], puede someterse a un proceso químico llamado silanización en el que los grupos hidrolizables del silano forman enlaces con los grupos hidroxilo de una superficie.

En la figura 2.15 se representa la estructura general de un silano [Hermanson, 2013]. La figura 2.17 representa las fases que conducen al recubrimiento superficial de un

sustrato. Como resultado se obtendrá una monocapa enlazada sólidamente al sustrato en cuyo extremo opuesto habrá el grupo funcional elegido para actuar como receptor de las proteínas. Entre los silanos más habituales para realizar este procedimiento está el 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS) (figura 2.16). Este silano contiene un grupo funcional amino que actúa como biorreceptor.

Figura 2.15: Estructura general de un silano

Figura 2.16: Molécula de 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS)

Figura 2.17: Fases que conducen al recubrimiento polimérico de la superficie de un sustrato con un organosilano [Hermanson, 2013]

2.6 Tipos de interrogación de las celdas biosensoras

En las secciones 2.4, 2.5 y 2.6 se han descrito: las formas de fabricar las estructuras de las celdas biosensoras; cómo biofuncionalizarlas; y cómo, a través de los inmunoensayos, medimos la capacidad real de un biosensor para detectar una biomolécula objetivo. En la descripción de los inmunoensayos, se hablaba de una señal genérica cuya variación nos permitirá calibrar nuestro sensor. En esta sección se describen los métodos que se utilizan en este trabajo para obtener las señales.

Todas las técnicas de interrogación óptica *label-free* se basan en la interacción de un haz de luz con la celda biosensora y la medición de los cambios de señal originados en el proceso de reconocimiento de los inmunoensayos. Aunque pueden construirse biosensores en los que se analiza la luz transmitida a través de la celda biosensora, en este trabajo nos centramos en el estudio de la luz reflejada sobre su superficie (Figura 2.6), tal como se indicó en la sección 2.2.

Cuando un haz de luz incide sobre un medio estratificado se produce un fenómeno interferencial, como consecuencia del cual, tendremos máximos y mínimos de intensidad reflejada dependiendo fundamentalmente de la longitud de onda, el ángulo de incidencia y de las propiedades ópticas y configuraciones dimensionales de los medios. Una descripción detallada de este fenómeno se encuentra en el capítulo 3 de esta tesis. En lo que sigue, se alude al concepto físico de reflectancia, ya mencionado e intuitivo para cualquier lector, pero además, se discuten sistemas de transducción y análisis basados en el estado de polarización de la luz y su orientación relativa a la superficie incidente. Estos conceptos se describen en la sección 8 del capítulo 3 y constituyen el fundamento de las técnicas llamadas de elipsometría.

El haz de luz que incide sobre el biosensor puede incluir luz de diferentes longitudes de onda con una determinada composición espectral, o bien, ser monocromático.

Sin entrar en detalle en la descripción de las técnicas que nos permiten generar las diferentes respuestas, podemos clasificar las técnicas basadas en el análisis de la reflectancia en dos tipos:

- Variación de la intensidad reflejada con la longitud de onda para un ángulo fijo y un haz policromático o espectrometría
- Variación de la intensidad reflejada con el ángulo para un haz monocromático o reflectometría.

La figura 2.18 es una simulación de respuesta espectrométrica de un interferómetro a una interrogación óptica. Generalmente no se utiliza la intensidad absoluta reflejada sino el cociente entre la intensidad reflejada y la intensidad que reflejaría un sustrato de silicio. Como las intensidades reflejadas son proporcionales a las reflectancias de las superficies, el cociente entre las intensidades anteriormente mencionado es igual al cociente de las reflectancias. En la gráfica pueden observarse dos curvas cuyas posiciones difieren ligeramente. La curva azul representa la respuesta del sensor antes de producirse el proceso de biorreconocimiento (véase sección 2.4). La curva roja representa un estado en el que el biorreconocimiento se ha realizado (saturación).

Podemos definir diferentes señales de transducción aprovechando las diferencias entre las dos curvas. Lo más habitual es definir el desplazamiento de un máximo o un mínimo como señal de transducción. Este sistema se ha utilizado con biosensores basados en microagujeros [Holgado, 2007], cavidades resonantes basadas en pilares [Casquel, 2008] y en distribuciones de pilares [Holgado, 2010], [Casquel, 2007 y 2011], [Sanza 2011A]. Adicionalmente, se han realizado estudios sistemáticos de optimización de parámetros para la obtención de las sensibilidades y límites de detección de estos dispositivos [Lavín, 2013A].

Figura 2.18: Interrogación óptica con un haz compuesto de un espectro de longitudes de onda (espectrometría).

En este trabajo se describirán otras formas de definir la diferencia de las curvas, y por tanto, de definir señales de transducción. Recientemente se ha propuesto un método de transducción basado la variación de la intensidad integrada para un intervalo concreto de longitudes de onda producida por el proceso de biorreconocimiento [Holgado, 2014 A y B]. Este método será descrito en detalle en un capítulo posterior al ser una de las contribuciones originales de esta tesis.

Entre las técnicas que aprovechan la variación de la reflectancia con el ángulo la más utilizada y efectiva es la reflectometría de perfiles de haz (Beam Profile Reflectometry o BPR). En principio, la obtención de un perfil dependiente del ángulo para diferentes estados de polarización de la luz requeriría de un complejo experimento, en el que tanto la fuente de luz como el detector de intensidad reflejada tendrían que moverse para cada ángulo medido. Este conjunto de medidas tendrían que repetirse para cada estado de polarización del que se quiera sacar información. La técnica BPR fue introducida por primera vez en 1993 para medir pequeños espesores de capas dieléctricas y semiconductoras para la industria de fabricación de dispositivos de microelectrónica [Gold, 1991B], [Rosencwaig, 1992], [Fanton, 1993B] y permite la obtención, en una sola medida, de la reflectancia de diferentes estados de polarización de la luz para diferentes ángulos. La figura 2.19 esquematiza los principios de esta técnica. Un esquema más detallado se encuentra en el artículo de J. T. Fanton de 1993. La idea fundamental consiste en hacer incidir un haz linealmente polarizado

sobre una lámina semiespejada que lo desvía y lo hace incidir sobre una lente que lo hace converger en un punto de la muestra. Mediante este proceso obtenemos un haz de rayos que inciden con diferentes ángulos sobre la muestra. El campo eléctrico de la luz linealmente polarizada, vibra en el plano de incidencia de los rayos en uno de los ejes (figura 2.19) y por tanto tiene polarización relativa P con respecto al plano de la muestra. En cambio, en el eje perpendicular, el campo eléctrico de la luz vibra perpendicular al plano de incidencia, por lo que tiene polarización relativa S con respecto al plano de la muestra. Tras reflejarse, la luz llega a un detector. En las primeras patentes la luz es recogida por disposiciones lineales de detectores [Gold, 1991B] o disposiciones que integran la luz recogida en cuadrantes completos [Fanton, 1993A]. Actualmente, los instrumentos basados en esta técnica (n-GaugeTM metrology tool) recogen la luz en arrays bidimensionales CCD [Morris, 2010].

Diferentes técnicas de ajuste por mínimos cuadrados permiten inferir a partir de las curvas de reflectancia P y S combinadas con curvas de espectrometría, los parámetros ópticos, espesores e índices de refracción de las capas de material de la muestra a analizar [Leng, 1998B].

En reflectometría de perfiles de haz, la luz que incide sobre los ejes x e y de la figura 2.19, de polarizaciones lineales P y S puras, respectivamente, no cambian su estado de polarización en la reflexión (véase capítulo 3). Sin embargo, la luz incidente sobre un eje que forma 45° con el eje x, cambiará su estado de polarización al reflejarse. El cambio de estado de polarización está relacionado con las propiedades ópticas del medio.

Tanto el desplazamiento de posición de máximos o mínimos de las curvas de reflectividad [Casquel, 2015] como la de los parámetros que definen el estado de polarización pueden ser señales de transducción para un biosensor. En capítulos posteriores se analizará la viabilidad de utilizar alguno de estos sistemas, u otros procedimientos alternativos en los biosensores que son objeto de estudio de esta tesis.

En la figura 2.20 se representa una simulación analítica de cómo cambian las curvas de de variación de la reflectancia con el ángulo con la adición de una capa de material biológico de 20 nm. Para el mismo caso, se representan los ángulos delta y psi (véase capítulo 3), que definen el estado de polarización de la luz tras la reflexión en la diagonal del primer cuadrante para múltiples ángulos de incidencia. Se puede observar que, para ángulos concretos, delta experimenta cambios radicales que modifican el estado de polarización de la luz pasando de lineal a elíptica. Se ha demostrado que las variaciones de los ángulos elipsométricos delta y psi pueden ser medidas directamente a partir de las señales de un sistema de reflectometría de perfiles de haz; a partir de las señales medidas en los ejes x e y de la figura 2.19, y las de las diagonales del primer y cuarto cuadrante [Gold, 1991A].

Figura 2.19: Interrogación óptica con un haz monocromático: reflectometría de perfiles de haz

Figura 2.20: Interrogación óptica con un haz monocromático y posibles señales de transducción

Combinando datos de reflectometría, espectrometría pueden averiguarse las propiedades de apilamientos de capas de materiales [Leng, 1998A], [Leng, 1999] mediante métodos de ajuste por mínimos cuadrados. El proceso de caracterización de propiedades ópticas de apilamientos de capas se ha realizado también a partir del estudio de los ángulos elipsométricos Δ y Ψ , y su variación en la interacción con el apilamiento con la longitud de onda para diferentes ángulos de incidencia [Woolam, 1999], [Johs, 1999]. En una sección posterior se aplicarán algunas de estas técnicas a la caracterización de propiedades ópticas de los materiales de los que se fabrican las celdas biosensoras, así como las de las capas de material biológico que las recubren en los inmunoensayos.

2.7 Lectura e interpretación de datos de biosensores basados en desplazamiento de máximos o mínimos

En la sección 2.4 se han descrito las fases fundamentales de los inmunoensayos. En la figura 2.11 y figura 2.12 se muestran las relaciones entre las concentraciones de antígeno y anticuerpo, y una señal genérica asociada a un determinado tipo de biosensor. La pendiente de la región de la curva que une las zonas de señal uniforme asociadas a la saturación de antígeno o anticuerpo va a definir la sensibilidad y el límite de detección del biosensor, definidas en la sección 2.1. Estos parámetros nos permiten comparar el rendimiento de diferentes biosensores; ya sean del mismo tipo, o incluso basados en señales de transducción diferentes. En la sección 2.6 se han descrito diferentes señales de transducción para biosensores ópticos basados en interferómetros de reflexión. Una de las estrategias utilizadas habitualmente consiste en utilizar como señal de transducción el desplazamiento de la posición de un máximo o mínimo. La utilización de esta técnica conlleva de inmediato el problema de la medición de las posiciones de los máximos, la atribución de incertidumbre a estas medidas y la definición de modelos que permitan, a partir de estas medidas e incertidumbres, atribuir sensibilidades y límites de detección a las curvas de calibración construidas a partir de estas medidas.

A principios de 2014 se planteó la conveniencia de construir un sistema unificado de lectura y procesamiento de datos procedentes de diferentes instrumentos de medida basados en desplazamiento de máximos o mínimos, utilizados por el Grupo de Óptica, Micro-Nano Fotónica y Biofotónica. El autor de esta tesis fue uno de los responsables de construir un conjunto de programas y funciones en el entorno de programación Matlab que realizan este objetivo. El sistema está actualmente en funcionamiento y se utiliza sistemáticamente para la lectura e interpretación de los datos del tipo antes

mencionado. A continuación se realiza una descripción del sistema. En esta descripción se hace referencia a características técnicas y funciones de Matlab cuya descripción completa puede encontrarse en internet en la página oficial de MathWorks[®], empresa que comercializa este entorno matemático de programación [MathWorks].

Figura 2.21: Diagrama de flujo en el procesamiento de datos de biosensores basados en desplazamiento de máximos o mínimos.

En la figura 2.21 se representa en diagrama de flujo de datos desde la lectura de datos brutos procedentes de diferentes instrumentos de medida a la generación de informes en diferentes formatos y su almacenamiento tras el procesamiento. Se han construido dos programas principales para realizar esta tarea, *LeoDat* y *ProcDat*. En las siguientes secciones se describen sus principales características.

2.7.1 Lectura de datos: LeoDat

LeoDat lee los conjuntos de datos procedentes de diferentes instrumentos. Estos datos son los necesarios para construir la curva característica de un inmunoensayo, por tanto contienen un conjunto de curvas de reflectancia para cada una de las diferentes concentraciones. Para cada concentración se realizan un número n de medidas, con el objetivo de realizar un análisis metrológico posterior de la incertidumbre en la determinación de las posiciones de los máximos o mínimos. Con el objetivo de ordenar los datos se decidió almacenar los datos de cada inmunoensayo en una carpeta con un nombre característico. Dentro de la carpeta de cada inmunoensayo hay subcarpetas asociadas a cada concentración. El nombre de estas carpetas comienza por A, B, C,... en orden de concentración creciente. Además, en el nombre de la carpeta se escribe el valor de la concentración comenzando en una posición fija. Finalmente, dentro de las

subcarpetas asociadas a cada concentración están los archivos de reflectancia correspondientes a las n repeticiones.

Figura 2.22: Organización de directorios para los datos brutos de un inmunoensayo

El programa *LeoDat* solicita del usuario el *path* en el que se encuentran los datos brutos del inmunoensayo y con este dato realiza dos acciones principales:

- Lee, en el nombre de las carpetas, las concentraciones.
- Lee, en los archivos que están dentro de las carpetas, los datos de las n repeticiones de las curvas de reflectancia.

Además, el programa solicita del usuario datos acerca del tipo de instrumento del cual va a leer los datos, ya que éstos tienen diferentes formatos de archivo dependiendo del mismo y representan la reflectancia en función de diferentes magnitudes físicas, longitud de onda, número de onda o ángulo de incidencia.

Tras leer los datos, éstos se convierten en variables matriciales del entorno de programación Matlab. Estas variables se almacenan en forma de archivo *.mat* de Matlab de forma que quede disponible para su posterior procesado y, opcionalmente, se guardan en forma de libro de Excel para su posible procesado en otros entornos de programación (figura 2.21).

Finalmente, el programa *LeoDat*, muestra a usuario en forma gráfica los datos leídos con un doble objetivo: por una parte, la posible detección de anomalías en los datos; y por otra, la anotación de los intervalos de abscisa en los que se deslizan los máximos o mínimos para su posterior búsqueda y procesado. La figura 2.23 y la figura 2.24 muestran las salidas gráficas mencionadas. En la primera se agrupan los datos para todas las concentraciones agrupándolas de nueve en nueve. En la segunda se representan las curvas para la mínima y máxima concentración del experimento.

Figura 2.23: Salida gráfica con resultados agrupados

Figura 2.24: Salida gráfica de primera y última curva y ampliación de un intervalo

2.7.2 Procesado de datos: ProcDat

El programa *ProcDat*, en primer lugar, solicita del usuario, el *path* en el que se encuentran los datos del inmunoensayo almacenados en forma de variables

matriciales de Matlab en un archivo *.mat*. El programa de procesamiento de datos *ProcDat* es independiente del de lectura *LeoDat* porque un mismo conjunto de datos puede requerir la ejecución de procesos con diferentes parámetros, que conducen a resultados diferentes en cuanto a la incertidumbre de la curva de calibración y el límite de detección. Esta variabilidad está asociada, fundamentalmente, a los parámetros de suavizado de los datos (véase figura 2.25).

Tras solicitar el archivo para procesar, pregunta al usuario si quiere volver a ver la representación de los datos brutos, figura 2.23 y figura 2.24. Esta vista sería innecesaria si *LeoDat* y *ProcDat* se ejecutan secuencialmente. Posteriormente se solicita al usuario si quiere guardar los resultados de procesamiento en formato Excel, y en caso afirmativo se le pide un nombre para este archivo.

Finalmente, el programa solicita al usuario, a través de una ventana de diálogo, los siguientes parámetros de procesamiento:

- *Extremos del intervalo de abscisas en los que el programa busca el máximo o mínimo.* El usuario define estos extremos a la vista de los resultados del experimento, figura 2.23 y figura 2.24. Este intervalo es en el que se realiza el proceso de suavización de la curva. La experiencia de procesamiento del usuario le permite decidir sobre la conveniencia de hacerlo mayor o menor.
- *Factor de interpolación.* El factor de interpolación permite redefinir un nuevo conjunto de datos de abscisa mayor que el original entre los extremos elegidos por el usuario. El nuevo número de puntos es el original multiplicado por el factor de interpolación. El programa asigna valores de ordenada al nuevo conjunto de datos mediante interpolación que puede ser lineal o de mayor orden (actualmente cúbica).
- *Factor de Span.* Las curvas procedentes de los experimentos siempre están afectadas, en mayor o menor medida según el procedimiento experimental de obtención, por algún tipo de ruido de alta frecuencia, como consecuencia, es imprescindible el suavizado de las curvas para estimar la posición de un máximo o mínimo. Si no se realiza la suavización la búsqueda de los máximos o mínimos estaría afectada por las fluctuaciones aleatorias asociadas al ruido. Esta situación se pone de manifiesto en la figura 2.25.

El programa *ProcDat* suaviza los datos brutos en el intervalo elegido por el usuario a través de una función de la *ToolBox* de ajuste de curvas de Matlab llamada *smooth*, uno de cuyos parámetros posibles es un valor numérico entero llamado *span*. La función *smooth*, por defecto, realiza un suavizado basado en una media móvil, en la que el número de puntos utilizados para calcular la media es el valor almacenado en la variable *span*. El usuario no introduce directamente el valor de esta variable sino que la determina indirectamente a través del Factor de Span, que es un número entero, que dividirá el número de puntos en el intervalo, de forma

que la variable *span* será el número entero más cercano al cociente: [Número de Puntos en el Intervalo]/[Factor de Span].

Figura 2.25: Ampliación centrada en el máximo de un conjunto de curvas para una concentración. Datos brutos y curvas suavizadas.

Figura 2.26: Un factor de span 3 divide el intervalo entre 17000 y 20000 cm^{-1} en tres partes. Si en este intervalo hubiera 3000 puntos el span sería 1000.

- *Puntos de la curva de inmovilización y puntos de la curva de reconocimiento.* El inmunoensayo tiene, tal como se vio en la sección 2.4, dos fases: inmovilización y reconocimiento. El programa solicita del usuario información sobre los puntos de cada curva para separarlas correctamente en su procesamiento y representación posterior.

- *Tipo de extremo.* El programa solicita información sobre si el extremo que tiene que procesar es un máximo o un mínimo.

Una vez establecidos los parámetros de proceso el programa calcula:

- La resolución de los datos E entendiéndose ésta como el intervalo de abscisa entre los mismos. La resolución es uniforme en todo el campo de medida de los instrumentos utilizados.
- Las posiciones del máximo o mínimo de la suavización de los datos en el intervalo elegido y con los parámetros de procesado elegidos para cada una de las concentraciones y tantas veces como repeticiones se hayan realizado en cada concentración. Todos estos datos se guardan en un archivo de resultados en formato Excel.
- Para cada concentración se calcula y guarda en un archivo de resultados en formato Excel: la media de las posiciones de los máximos para cada repetición, la desviación típica (Véase sección 2.1, ecuación 2.4), el desplazamiento relativo de las posiciones medias de los máximos con respecto a la de concentración nula en la curva de reconocimiento, y finalmente, la incertidumbre de la señal entendida como la del desplazamiento relativo, según la expresión (véase sección 2.1):

$$U = k \left[\sqrt{\frac{s_y^2}{n} + \frac{E^2}{12}} \right] \quad \text{Ecuación 2.22}$$

en la que s_y es la desviación típica, n el número de repeticiones de la medida, E la resolución y k el factor de incertidumbre (actualmente 3) . Estos valores de U se utilizan para las barras de error de cada señal cuando se representa gráficamente los resultados de los inmunoensayos.

El programa proporciona al usuario diferentes salidas gráficas de Matlab para que pueda comprobar el resultado del experimento de inmunoensayo. Entre estas salidas gráficas están:

- Los datos brutos del experimento, junto a las suavizaciones de los mismos, para cada una de las concentraciones de las fases de inmovilización y reconocimiento, en el entorno de abscisa elegido por el usuario. Estas figuras son modificables en el entorno Matlab y pueden ser ampliadas (figura 2.27).
- Las curvas de inmovilización y reconocimiento con las incertidumbres representadas en forma de barras de error. En la figura 2.28 se puede observar un ejemplo de representación conjunta de los resultados de un inmunoensayo con sus curvas de inmovilización y reconocimiento. En la figura 2.29 se representa sólo la de reconocimiento.

Figura 2.27: Representación datos de repeticiones, suavizaciones y ampliación de la región del máximo para una de las concentraciones de un inmunoensayo

Figura 2.28: Ejemplo de representación de fases de inmovilización y reconocimiento.

Los desplazamientos de la fase de inmovilización, en este caso sólo uno, están referidos a la celda biosensora tras la catálisis ácida (véase sección 2.5). Los desplazamientos de la fase de reconocimiento están referidos a la señal de saturación de antígeno (inmunoensayo indirecto)

Figura 2.29: Ejemplo de representación de fase reconocimiento. Los desplazamientos son negativos cuando se representa reflectancia frente al número de onda k

Tal como se indicó en la sección 2.4 la región de variación lineal que lleva de la saturación de la etapa de inmovilización a la saturación de la etapa de reconocimiento es la recta de calibración del biosensor. Tras mostrar al usuario la curva de reconocimiento que se muestra en la figura 2.29, el programa solicita del mismo la concentración en la que considera que comienza la saturación. Con los puntos de concentraciones pertenecientes al intervalo entre cero y este punto, se realiza un ajuste por mínimos cuadrados a una recta, cuya pendiente es una estimación de la sensibilidad del sensor en el experimento, y que, como regla general, no corta al eje de ordenadas en cero (ecuación 2.14 a ecuación 2.16 de la sección 2.1). Puede considerarse directamente la recta de ajuste como recta de calibración, o bien, realizar un ajuste de cero desplazando toda la recta verticalmente hasta que pase por el punto de concentración cero y señal cero. La figura representa la salida gráfica del programa en la que se observan estas dos posibilidades.

El programa calcula, además de la pendiente y el punto de corte de la recta de ajuste, las incertidumbres asociadas a estos parámetros (ecuación 2.16 a ecuación 2.18 de la sección 2.1). Con estos datos y los de las desviaciones típicas muestrales en los puntos experimentales del inmunoensayo, calcula, utilizando tres modelos diferentes, estimaciones del límite de detección con la ecuación 2.7, ecuación 2.12 y ecuación 2.20, nombrándolas como LoD_0, LoD_1, LoD_2 respectivamente.

$$C_{LoD_0} = \frac{k_{S_I}}{m} \quad \text{Ecuación 2.23}$$

$$\frac{\Delta k}{k} = \frac{\Delta k}{k} + \frac{\Delta k}{k} + \frac{\Delta k}{k}$$

Ecuación 2.24

$$\frac{\Delta k}{k} = \frac{\Delta k}{k} + \frac{\Delta k}{k} + \frac{\Delta k}{k}$$

Ecuación 2.25

Figura 2.30: Ejemplo de salida para medidas experimentales y ajustes

Figura 2.31: Ejemplo de salida para curva de calibración y su incertidumbre

Finalmente, si utilizamos la curva de calibración generada para, a partir de una señal, determinar una concentración de analito en un instrumento de medida, tenemos que asignar una incertidumbre a dicha concentración. En la sección 2.1 se propone un

modelo para estimar este valor a partir de la ecuación 2.21 que volvemos a reproducir aquí, para la comodidad del lector.

$$U_c = k \sqrt{\frac{1}{m} \left(\frac{s_y^2}{n} + \frac{E^2}{12} + s_{y_I}^2 + \left(\frac{y_I - y}{m} \right)^2 s_m^2 \right)}$$

Esta ecuación asigna incertidumbre al proceso de medida de una concentración a partir de una señal y . Esta incertidumbre depende de s_y . Si las condiciones de medida son similares a las condiciones en las que se ha obtenido la curva de calibración podemos suponer que las desviaciones típicas serán parecidas. Bajo esta suposición se calculan, utilizando los valores medio o máximo de las desviaciones típicas de calibración y bajo la hipótesis de una sola medida, diferentes aproximaciones a la fiabilidad de nuestro sensor. La figura 2.31 es una salida del programa ProcDat que pretende poner de manifiesto visualmente esta fiabilidad. En ella aparecen representadas en forma de límites alrededor de la curva de calibración los valores de la incertidumbre utilizando los valores medio o máximo de las desviaciones típicas de calibración; y utilizando en valor medio con $n=1$.

C:\biodat\biodatxls\anxa11_B_Figtesis										
Conc(ppm)	0	0,2	0,5	1,5	2,5	5	10	20	50	100
Max/Min(cm ⁻¹ -1)	14622,63842	14627,1851	14647,0593	14474,253	14411,3235	14232,5928	14071,0841	14074,1841	14097,5717	14101,0505
DesvEst(cm ⁻¹ -1)	16,8681213	12,4461505	11,9130485	22,7366924	27,2132023	44,3989732	19,5995932	8,91762273	17,1830667	12,6771034
Despla (cm ⁻¹ -1)	0	4,54662878	24,4209076	-148,38543	-211,314906	-390,045639	-551,554293	-548,454318	-525,066736	-521,587876
U(cm ⁻¹ -1)	19,13120863	14,1187835	13,5145788	25,7843668	30,8596958	50,3454349	22,2277717	10,1202507	19,4882396	14,3805469
Nrep	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Mink(cm ⁻¹ -1)	13500									
Maxk(cm ⁻¹ -1)	15500									
Puntos	4148									
SpanFact	20									
SPAN	414									
InterpFact	2									
InterpPuntos	8296									
MAX/MIN	MAX									
Kincert	3									
Resolución(cm ⁻¹ -1)	0,482130164									
Sens_Bruta((cm ⁻¹ -1)/	-89,87275397									
Cort_Bruto(cm ⁻¹ -1)	31,52450861	U_Med(n=1)	0,80511393	0,80512265	0,80514882	0,80519243	0,80525348			
sigmapend((cm ⁻¹ -1)/	7,338588496	U_Max(n=1)	1,50857362	1,50857827	1,50859224	1,50861552	1,5086481			
sigmacort(cm ⁻¹ -1)	8,435548817	U_Min(n=1)	0,48726335	0,48727776	0,487321	0,48739305	0,48749391			
LoD_0(ppm)	0,563066799	U_Med	0,40073035	0,40074788	0,40080045	0,40088805	0,40101066			
LoD_1(ppm)	0,629550037	U_Max	0,62697455	0,62698575	0,62701936	0,62707536	0,62715375			
LoD_2(ppm)	0,352990997	U_Min	0,31922022	0,31924222	0,31930821	0,31941816	0,31957204			
CondxMax((ppm)	-0,494020392									
CondxMed((ppm)	-0,251422488									
CondxMin((ppm)	-0,132554617									
CortCurvCalib(ppm)	9									
Bppm0 ppm	0	14589,8131	14631,7661	14634,4183	14634,1772	14612,2363	14620,6751	14635,3828		
Cppm0.2 ppm	0,2	14620,1929	14616,094	14626,9439	14645,7505	14613,2007	14626,2206	14641,8927		
Dppm0.5 ppm	0,5	14653,2248	14625,0151	14650,8137	14654,4304	14650,5726	14636,5883	14658,7703		
Eppm1.5 ppm	1,5	14464,6775	14479,3852	14497,4684	14427,7878	14483,9662	14487,1007	14479,3852		
Fppm2.5 ppm	2,5	14387,7637	14365,0995	14425,6178	14449,0054	14420,7957	14416,6968	14414,2857		
Gppm5 ppm	5	14143,5202	14214,4063	14238,2761	14265,7625	14261,1814	14232,2483	14272,7547		
Hppm10 ppm	10	14049,4876	14080,1085	14089,2706	14049,0054	14059,3731	14070,9464	14099,3972		
Ippm20 ppm	20	14059,8553	14072,8752	14069,4997	14071,9108	14082,0374	14075,5274	14087,5829		
Jppm50 ppm	50	14093,8517	14110,006	14087,824	14093,8517	14069,9819	14123,9904	14103,4961		
Kppm100 ppm	100	14094,8162	14128,0892	14095,7806	14099,8794	14101,085	14099,3972	14088,3062		

Figura 2.32: Ejemplo de salida Excel proporcionada por ProcDat

3 INTERACCIÓN DE ONDAS ELECTROMAGNÉTICAS MONOCROMÁTICAS PLANAS CON MEDIOS ESTRATIFICADOS

Un medio cuyas propiedades permanecen invariantes en cada plano perpendicular a una dirección dada se considera un medio estratificado. Para el estudio de la respuesta de los biosensores que nos ocupan, es fundamental conocer las características más importantes del fenómeno de la propagación de ondas electromagnéticas en este tipo de medios. En particular, interesa en nuestro estudio el caso más general en el que las diferentes capas que constituyen la estratificación pueden ser alternativamente materiales dieléctricos y conductores. Lo que sigue ha sido extraído y adaptado de las obras de electromagnetismo y óptica de Reitz/Milford/Christy, [Reitz, 1984], Lorrain/Corson, [Lorrain, 1990], Hecht, [Hecht, 2000] y Born/Wolf, [Born, 1991]. El marco teórico que se expone a continuación es el fundamento de los métodos de simulación que se desarrollan en el siguiente capítulo.

En este capítulo se realizan cálculos analíticos de respuestas en reflectancia de algunas configuraciones de capas compuestas por combinaciones de materiales habituales en el ámbito de la microelectrónica como el silicio y el dióxido de silicio. El objetivo es señalar algunas respuestas ópticas características de apilamientos de materiales y validar el modelo. Las constantes ópticas de estos medios se han extraído de las referencias generales anteriormente mencionadas para algunos casos sencillos. Cuando se ha tenido en cuenta la variación de las constantes ópticas con la longitud de onda se ha recurrido a manuales de propiedades ópticas de materiales [Weber, 2003] y referencias en la red [<http://refractiveindex.info>]. Para el silicio se utilizan constantes ópticas obtenidas de medidas de elipsometría espectroscópica [Aspnes, 1983], [Vuye, 1993] u otras técnicas [Green, 1995]. En el caso del dióxido de silicio y el nitruro de silicio se utiliza la referencia [<http://refractiveindex.info>] que recoge estudios experimentales de diferentes autores [Malitson, 1965], [Baak, 1982].

3.1 Ecuaciones de Maxwell

La Ley de Inducción de Faraday relaciona la circulación de un campo eléctrico en una curva cerrada con el flujo de la derivada temporal del campo magnético sobre una superficie cualquiera limitada por esa curva:

$$\oint_C \vec{E} \cdot d\vec{l} = - \iint_A \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \cdot d\vec{S}$$

Ecuación 3.1

La Ley circuital de Ampère relaciona la circulación de un campo magnético en una curva cerrada con el flujo de la suma de la derivada temporal del desplazamiento eléctrico más la densidad de corriente sobre una superficie cualquiera limitada por esa curva:

$$\oint_C \vec{B} \cdot d\vec{l} = \mu \iint_A \left(\vec{J} + \epsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \right) \cdot d\vec{S} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Las ecuaciones anteriores definen a la derivada temporal del campo magnético como fuente de campo eléctrico y a la derivada temporal del campo eléctrico como fuente del campo magnético. Esta interdependencia es la clave de la descripción de las ondas electromagnéticas. Además de estas ecuaciones, completan la descripción de los campos electromagnéticos, las que se mencionan a continuación.

La Ley de Gauss para el campo eléctrico relaciona el flujo de campo eléctrico en una superficie cerrada con la carga encerrada dentro de la superficie, estableciendo la relación entre el campo eléctrico y la carga eléctrica como fuente.

$$\oiint_A \vec{E} \cdot d\vec{S} = \frac{1}{\epsilon} \iiint_V \rho \cdot dV \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Finalmente, la Ley de Gauss para el campo magnético establece la inexistencia de fuentes puntuales de campo magnético.

$$\oiint_A \vec{B} \cdot d\vec{S} = 0 \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Cuando se estudia la propagación de la luz en un medio se puede considerar que no existen, en aproximación macroscópica, densidades de carga. Sin embargo, para nuestro estudio de medios estratificados, no podemos olvidar que si un material es conductor o semiconductor tenemos que tener en cuenta el término de densidad de corriente, que se relaciona con el campo eléctrico mediante la Ley de Ohm:

$$\vec{J} = \sigma \vec{E} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

En consecuencia las ecuaciones de Maxwell toman la forma:

$$\begin{aligned}
 \oint_C \vec{E} \cdot d\vec{l} &= - \iint_A \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \cdot d\vec{S} \\
 \oint_C \vec{B} \cdot d\vec{l} &= \mu \iint_A \left(\sigma \vec{E} + \epsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \right) \cdot d\vec{S} \\
 \oiint_A \epsilon \vec{E} \cdot d\vec{S} &= 0 \\
 \oiint_A \vec{B} \cdot d\vec{S} &= 0
 \end{aligned}$$

Ecuación 3.6

Las ecuaciones de Maxwell anteriores se expresan en forma diferencial mediante los operadores, rotacional y divergencia:

$$\begin{aligned}
 \vec{\nabla} \times \vec{E} &= - \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \\
 \vec{\nabla} \times \vec{B} &= \mu \sigma \vec{E} + \mu \epsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \\
 \vec{\nabla} \cdot [\epsilon \vec{E}] &= 0 \\
 \vec{\nabla} \cdot \vec{B} &= 0
 \end{aligned}$$

Ecuación 3.7

3.2 Ecuaciones de onda y sus soluciones

Las ecuaciones de Maxwell de la sección anterior pueden transformarse mediante la aplicación del operador rotacional a las dos primeras y teniendo en cuenta la divergencia nula del campo eléctrico y magnético en nuestro estudio, obteniéndose las ecuaciones:

$$\begin{aligned}
 \nabla^2 \vec{E} - \mu \epsilon \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} - \mu \sigma \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} &= \vec{0} \\
 \nabla^2 \vec{B} - \mu \epsilon \frac{\partial^2 \vec{B}}{\partial t^2} - \mu \sigma \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} &= \vec{0}
 \end{aligned}$$

Ecuación 3.8

Estas ecuaciones rigen la propagación de un campo electromagnético en un medio lineal y homogéneo en el cual la densidad de carga es cero, sea este conductor o no.

Una forma de abordar la determinación de los campos eléctrico y magnético es solucionar la ecuación del campo eléctrico, a continuación, aplicando el rotacional a la solución para el campo eléctrico, se obtiene la derivada temporal del campo magnético. Por eso, a partir de este momento, al hablar de las posibles soluciones para la propagación de las ondas electromagnéticas nos referiremos sólo al campo eléctrico. De las posibles soluciones de la ecuación de onda del campo eléctrico, es de

particular interés en nuestro estudio la onda monocromática. La onda monocromática se expresa en forma compleja como:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}(\vec{r})e^{-i\omega t} \quad \text{Ecuación 3.9}$$

En la expresión anterior, $\vec{E}(\vec{r})$ es una función compleja. El verdadero campo físico se obtiene calculando la parte imaginaria de la función compleja.

Una simplificación adicional es la suposición de que el campo eléctrico varía solamente en una dirección, a lo que se denomina aproximación de onda plana. En ese caso, la solución de la ecuación de onda se escribe:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}(\vec{r} \cdot \vec{u})e^{-i\omega t} \quad \text{Ecuación 3.10}$$

En la expresión anterior el vector unitario $\vec{u}$ tiene la dirección de propagación de la onda. Los planos perpendiculares a vector unitario tienen en un instante dado el mismo valor del campo eléctrico, por eso se denomina onda plana. Como caso particular que utilizaremos para la discusión que viene a continuación, supongamos que $\vec{u}$ es el tercer vector de la referencia cartesiana ortogonal. Entonces la solución es una onda plana propagándose en la dirección z .

$$\vec{E}(z, t) = \vec{E}(z)e^{-i\omega t} \quad \text{Ecuación 3.11}$$

Si se introduce esta forma de solución en la ecuación de onda del campo eléctrico. Se obtiene:

$$e^{-i\omega t} \left[\frac{d^2 \vec{E}(z)}{dz^2} + \mu\epsilon\omega^2 \vec{E}(z) + i\mu\sigma\omega \vec{E}(z) \right] = \vec{0} \quad \text{Ecuación 3.12}$$

La ecuación entre corchetes rige la variación espacial del campo eléctrico.

3.2.1 Caso de medio dieléctrico

Cuando el medio no es conductor la ecuación diferencial se convierte la del oscilador armónico.

$$\frac{d^2 \vec{E}(z)}{dz^2} + \left(\frac{\omega}{\frac{1}{\sqrt{\mu\epsilon}}} \right)^2 \vec{E}(z) = \vec{0} \quad \text{Ecuación 3.13}$$

La magnitud entre paréntesis es el número de onda κ .

$$\kappa = \frac{\omega}{\frac{1}{\sqrt{\mu\varepsilon}}} = \frac{\omega}{v_p} \quad \text{Ecuación 3.14}$$

En la expresión anterior, v_p es la velocidad de propagación de la onda plana.

Si se define el índice de refracción de un medio dieléctrico como $n = \frac{c}{v_p}$ donde c es la velocidad de la luz en el vacío, el número de onda toma la forma:

$$\kappa = \frac{n\omega}{c} \quad \text{Ecuación 3.15}$$

La solución de la ecuación diferencial para la variación espacial del campo eléctrico es:

$$\vec{E}(z) = \vec{E}_0 e^{\pm i\kappa z} \quad \text{Ecuación 3.16}$$

La solución que describe la propagación del campo eléctrico plano y monocromático en un medio no conductor es:

$$\vec{E}(z, t) = \vec{E}_0 e^{-i(\omega t \mp \kappa z)} = \vec{E}_0 e^{-i\omega \left(t \mp \frac{z}{v_p} \right)} \quad \text{Ecuación 3.17}$$

Con respecto a la ecuación anterior, es conveniente definir las magnitudes; periodo temporal, T , y periodo espacial o longitud de onda, λ .

$$T = \frac{2\pi}{\omega} \quad \lambda = \frac{2\pi}{\kappa} \quad \text{Ecuación 3.18}$$

Sustituyendo el valor de κ en la definición de la longitud de onda, se obtiene la relación entre frecuencia, longitud de onda y velocidad de propagación de la onda plana.

$$v_p = \lambda f \quad \text{Ecuación 3.19}$$

Podemos volver a una descripción más general del campo eléctrico propagándose en una dirección cualquiera dada por un vector unitario $\vec{u}$ sustituyendo $z = \vec{r} \cdot \vec{u}$.

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 e^{-i(\omega t - \kappa \vec{u} \cdot \vec{r})} \quad \text{Ecuación 3.20}$$

En esta expresión más general, se define el vector de onda $\vec{k} = \kappa \vec{u}$, de forma que el campo eléctrico queda como:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 e^{-i(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{r})} \quad \text{Ecuación 3.21}$$

3.2.2 Caso de medio conductor o semiconductor

En este caso la variación espacial del campo eléctrico vendrá dada por la ecuación diferencial completa, ya que no podemos eliminar el término de la conductividad:

$$\frac{d^2 \vec{E}(z)}{dz^2} + \mu \epsilon \omega^2 \vec{E}(z) + i \mu \sigma \omega \vec{E}(z) = \vec{0} \quad \text{Ecuación 3.22}$$

Agrupando términos y factores de forma diferente, la ecuación anterior puede reescribirse como:

$$\frac{d^2 \vec{E}(z)}{dz^2} + \mu \omega^2 \left[\epsilon + \frac{\sigma}{\omega} i \right] \vec{E}(z) = \vec{0} \quad \text{Ecuación 3.23}$$

Multiplicando y dividiendo el segundo término por la permitividad eléctrica del vacío y teniendo en cuenta que la permeabilidad magnética de la mayor parte de los materiales es muy cercana a la del vacío la ecuación se describe como:

$$\frac{d^2 \vec{E}(z)}{dz^2} + \epsilon_0 \mu_0 \omega^2 \left[\frac{\epsilon}{\epsilon_0} + \frac{\sigma}{\omega \epsilon_0} i \right] \vec{E}(z) = \vec{0} \quad \text{Ecuación 3.24}$$

En la expresión anterior, la relación en el interior del corchete es la permitividad relativa compleja o constante dieléctrica compleja.

$$\epsilon_r^* = \frac{\epsilon}{\epsilon_0} + \frac{\sigma}{\omega \epsilon_0} i \quad \text{Ecuación 3.25}$$

A partir de esta definición, la ecuación diferencial puede reescribirse, buscando la analogía con la del medio no conductor, como:

$$\frac{d^2 \vec{E}(z)}{dz^2} + \left(\frac{\omega \sqrt{\epsilon_r^*}}{\sqrt{\mu_0 \epsilon_0}} \right)^2 \vec{E}(z) = \vec{0} \quad \text{Ecuación 3.26}$$

La expresión entre paréntesis asume el papel del número de onda, que en este caso será complejo.

$$\kappa^* = \frac{\omega \sqrt{\epsilon_r^*}}{c} \quad \text{Ecuación 3.27}$$

Comparando la expresión anterior con la definición de número de onda real podemos definir un índice de refracción complejo que cumple la relación:

$$n^{*2} = \epsilon_r^* \quad \text{Ecuación 3.28}$$

Sustituyendo en la ecuación anterior el índice de refracción complejo $n^* = n + ki$ e igualando las partes real e imaginaria en la ecuación, se puede obtener las relaciones entre n y k , llamadas habitualmente constantes ópticas, con las magnitudes físicas que definen la permitividad relativa compleja.

$$n = \sqrt{\frac{1}{2} \left[\frac{\epsilon}{\epsilon_0} + \sqrt{\left(\frac{\epsilon}{\epsilon_0} \right)^2 + \left(\frac{\sigma}{\omega \epsilon_0} \right)^2} \right]}$$

$$k = \sqrt{\frac{1}{2} \left[-\frac{\epsilon}{\epsilon_0} + \sqrt{\left(\frac{\epsilon}{\epsilon_0} \right)^2 + \left(\frac{\sigma}{\omega \epsilon_0} \right)^2} \right]} \quad \text{Ecuación 3.29}$$

En lo que se refiere al campo electromagnético que se propaga en el medio conductor la solución del apartado 3.2.1 es formalmente válida siempre que sustituyamos el vector de onda real por la magnitud compleja:

$$\vec{\kappa}^* = \frac{\omega n^*}{c} \vec{u} \quad \text{Ecuación 3.30}$$

En función de las constantes ópticas del medio el campo eléctrico propagándose en una dirección definida por el vector unitario $\vec{u}$ queda como:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 e^{-\frac{k\omega}{c} \vec{r} \cdot \vec{u}} e^{-i\omega \left(t - \frac{n}{c} \vec{r} \cdot \vec{u} \right)} \quad \text{Ecuación 3.31}$$

La ecuación anterior describe un campo eléctrico que se propaga a la vez que se atenúa según avanza. Se obtiene a partir de la solución de la ecuación 3.22 cuando no pueden despreciarse ninguno de los términos. Esta es la situación que más se adapta al tipo de estratificaciones que se estudian en este trabajo en la que se intercalan medios dieléctricos y semiconductores.

3.3 Condiciones que deben satisfacer los campos electromagnéticos en la frontera de dos medios de conductividad arbitraria

Las condiciones que deben satisfacer los campos electromagnéticos en la zona interfacial entre dos medios se deducen de las leyes de Maxwell.

A partir de la ecuación $\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0$, calculando el flujo a través de una superficie cilíndrica de dimensiones infinitesimales con áreas circulares situadas a ambos lados de la frontera de los medios, se puede deducir que las componentes del campo magnético normales a la superficie de separación entre dos medios deben ser iguales.

$$B_{1n} = B_{2n} \quad \text{Ecuación 3.32}$$

A partir de la ecuación $\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}$, calculando la circulación en un rectángulo de dimensiones infinitesimales en el que dos de los segmentos están en diferentes lados de la frontera de los medios, se puede deducir que las componentes del campo eléctrico paralelas a la superficie de separación entre dos medios deben ser iguales.

$$E_{1t} = E_{2t} \quad \text{Ecuación 3.33}$$

A partir de la ecuación $\vec{\nabla} \cdot [\epsilon \vec{E}] = 0$, calculando el flujo a través de una superficie cilíndrica de dimensiones infinitesimales con áreas circulares situadas a ambos lados de la frontera de los medios, se puede deducir que las componentes del campo eléctrico normales a la superficie de separación entre dos medios cumplen la relación:

$$\left[\epsilon_1 + \frac{\sigma_1}{\omega} i \right] E_{1n} = \left[\epsilon_2 + \frac{\sigma_2}{\omega} i \right] E_{2n} \quad \text{Ecuación 3.34}$$

Finalmente, a partir de la ecuación $\vec{\nabla} \times \vec{B} = \mu \sigma \vec{E} + \mu \epsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t}$, calculando la circulación en un rectángulo de dimensiones infinitesimales en el que dos de los segmentos están en diferentes lados de la frontera de los medios, despreciando la posible variación de la permeabilidad magnética entre los medios y considerando nula la densidad de corriente superficial que atraviesa el rectángulo, se puede deducir que la componente del campo magnético paralela a la superficie de separación de los medios es la misma a ambos lados.

$$B_{1t} = B_{2t} \quad \text{Ecuación 3.35}$$

3.4 Reflexión y refracción de una onda electromagnética plana en la frontera entre dos medios dieléctricos

Cuando un campo electromagnético plano incide oblicuamente sobre la frontera de separación de dos medios, en la descripción más general del fenómeno, es en parte reflejado y en parte refractado hacia el segundo medio. Las direcciones de los campos electromagnéticos reflejados y refractados, así como los coeficientes que definen las amplitudes de los campos electromagnéticos reflejados y refractados se obtienen a partir de las condiciones de frontera enumeradas en la sección 3.3. La necesidad de que se satisfagan las condiciones de continuidad de las componentes tangenciales de los campos eléctrico y magnético, a lo largo de toda la frontera de separación entre los dos medios y en cualquier instante de tiempo, imponen que los campos electromagnéticos incidente, reflejado y refractado sean funciones idénticas del tiempo, y además funciones idénticas de la posición sobre la frontera.

Como consecuencia de la condición sobre el tiempo, las frecuencias de las ondas incidente reflejada y refractada serán iguales y podemos expresar los campos electromagnéticos mediante la expresión:

$$\begin{aligned}\vec{E}_1(\vec{r}, t) &= \vec{E}_1 e^{-i(\omega t - \vec{k}_1 \cdot \vec{r})} \\ \vec{E}_1'(\vec{r}, t) &= \vec{E}_1' e^{-i(\omega t - \vec{k}_1' \cdot \vec{r})} \\ \vec{E}_2(\vec{r}, t) &= \vec{E}_2 e^{-i(\omega t - \vec{k}_2 \cdot \vec{r})}\end{aligned}\tag{Ecuación 3.36}$$

Figura 3.1: Plano de incidencia: vectores de onda y ángulos de incidencia de los campos incidente, reflejado y refractado

Como consecuencia de que $\vec{k}_1 \cdot \vec{r} = \vec{k}'_1 \cdot \vec{r} = \vec{k}_2 \cdot \vec{r}$, sobre la frontera de separación entre los dos medios, puede demostrarse que:

- Los vectores de onda de las ondas incidente, reflejada y refractada son coplanarios siendo el plano a que pertenecen el plano de incidencia
- Son iguales los ángulos de incidencia y reflexión. $\theta_1 = \theta_1'$
- Los ángulos de incidencia y de refracción se relacionan mediante la ley de Snell

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad \text{Ecuación 3.37}$$

El campo eléctrico de la onda electromagnética vibra en una dirección perpendicular su correspondiente vector de onda. La geometría del problema nos obliga a definir un sistema de referencia sobre el que podamos proyectar cualquier campo eléctrico, de forma que las componentes del campo eléctrico y del campo magnético asociado tengan relación con las condiciones de frontera enunciadas en la sección 3.3.

Las direcciones de este sistema de referencia son:

- La paralela al plano de incidencia y perpendicular al vector de onda
- La perpendicular al plano de incidencia

A la componente del campo eléctrico paralela al plano de incidencia se le llama componente P y a la componente perpendicular al plano de incidencia se le llama componente S. Si el campo eléctrico sólo tiene componente P, polarización lineal P, el campo magnético asociado tendrá sólo componente paralela a la superficie de separación entre los medios pudiendo aplicarse la condición de la ecuación 3.35. Si el campo eléctrico sólo tiene componente S, polarización lineal S, será aplicable la condición de la ecuación 3.33. Cualquier estado de polarización de los campos puede expresarse en este sistema de referencia.

Aplicando las condiciones de continuidad de las componentes paralelas a la superficie de separación entre los medios de los campos eléctrico y magnético. Se obtienen los coeficientes de Fresnel que relacionan las amplitudes de los campos eléctricos incidente, reflejado y refractado.

Para la componente S:

$$E'_{1s} = r_{12s} E_{1s} \quad E_{2s} = t_{12s} E_{1s} \quad \text{Ecuación 3.38}$$

donde:

$$r_{12s} = \frac{n_1 \cos \theta_1 - n_2 \cos \theta_2}{n_1 \cos \theta_1 + n_2 \cos \theta_2} \quad \text{Ecuación 3.39}$$

$$t_{12s} = \frac{2n_1 \cos \theta_1}{n_1 \cos \theta_1 + n_2 \cos \theta_2} \quad \text{Ecuación 3.40}$$

Para la componente P:

$$E'_{1p} = r_{12p} E_{1p} \quad E_{2p} = t_{12p} E_{1p} \quad \text{Ecuación 3.41}$$

donde:

$$r_{12p} = \frac{n_2 \cos \theta_1 - n_1 \cos \theta_2}{n_2 \cos \theta_1 + n_1 \cos \theta_2} \quad \text{Ecuación 3.42}$$

$$t_{12p} = \frac{2n_1 \cos \theta_1}{n_2 \cos \theta_1 + n_1 \cos \theta_2} \quad \text{Ecuación 3.43}$$

El flujo de energía por unidad de área perpendicular a la dirección de propagación que transporta la onda electromagnética es igual al vector de Poynting, que para una onda electromagnética es proporcional a la amplitud del campo eléctrico elevada al cuadrado. Para una incidencia oblicua, al ser iguales los ángulos incidente y reflejado, es sencillo demostrar que la fracción de energía reflejada en la interfaz entre dos medios es igual al correspondiente coeficiente de Fresnel elevado al cuadrado. Este cociente es la reflectancia R .

$$R_p = r_{12p}^2 \quad R_s = r_{12s}^2 \quad \text{Ecuación 3.44}$$

La condición de conservación de la energía aplicada a la interfaz entre los materiales permite concluir que la fracción de energía transmitida T sumada a la reflejada es la unidad.

$$R_p + T_p = 1 \quad R_s + T_s = 1 \quad \text{Ecuación 3.45}$$

La reflectancia R_s sólo se anula bajo la condición de que los índices de refracción sean iguales, que equivale a que no haya interfaz efectiva. La reflectancia R_p se anula en un único ángulo denominado ángulo de Brewster que existe para cualquier combinación de índices de refracción entre dos dieléctricos.

$$\text{tg} \theta_B = \frac{n_2}{n_1} \quad \text{Ecuación 3.46}$$

Figura 3.2: Reflectancia en una interfaz aire vidrio $n_1=1$, $n_2=1,5$ en la que se observa el ángulo de Brewster

Figura 3.3: Reflectancia en una interfaz vidrio aire $n_1=1,5$, $n_2=1$ en la que se observa el ángulo de Brewster y el ángulo crítico

La figura 3.2 muestra las reflectancias R_p y R_s en la incidencia sobre una interfaz aire vidrio y el fenómeno del ángulo de Brewster que en este caso vale $56,3^\circ$.

Cuando el índice de refracción del segundo medio es menor que el del primero la ley de Snell predice un ángulo de refracción mayor que el de incidencia. El ángulo de refracción toma un valor de 90° en el ángulo que se denomina crítico.

$$\text{sen}\theta_c = \frac{n_2}{n_1} \quad \text{Ecuación 3.47}$$

Incidencias por encima del ángulo crítico producen reflexión total de la energía en la interfaz. En la figura 3.3 se puede ver un ejemplo de este fenómeno para la interfaz vidrio-aire para la que en ángulo crítico es de 41,8°. Se observa también el ángulo de Brewster en un ángulo de incidencia de 33,7°.

3.5 Cálculo de la reflectancia en la frontera entre un medio dieléctrico y uno conductor.

En la sección 3.2.2 se describieron las principales características de la propagación de ondas electromagnéticas en medios conductores. En esta sección se introduce el índice de refracción complejo que caracteriza a un medio conductor y el vector de onda complejo que caracteriza la propagación de la onda electromagnética. Las condiciones que se establecen en la frontera de los dos medios implican el mismo tipo de manipulaciones algebraicas independientemente del carácter complejo de las magnitudes mencionadas. En conclusión, las leyes de la reflexión y de la refracción de Snell, junto con los coeficientes de Fresnel de la sección anterior, son formalmente válidos. La ley de Snell es válida pero al ser el índice de refracción complejo, el ángulo de refracción también es un complejo.

$$n_1 \text{sen}\theta_1 = n_2^* \text{sen}\theta_2^* \quad \text{Ecuación 3.48}$$

Los coeficientes de Fresnel pasan a ser complejos y como consecuencia los campos reflejado y refractado se desfazan con respecto al incidente. Esta circunstancia no influye, sin embargo, en el cálculo de las reflectancias R_p y R_s , que se calculan de forma similar, a partir de los módulos de los coeficientes complejos de Fresnel al cuadrado.

$$R_p = |r_{12p}^*|^2 \quad R_s = |r_{12s}^*|^2 \quad \text{Ecuación 3.49}$$

donde:

$$r_{12p}^* = \frac{n_2^* \cos\theta_1 - n_1 \cos\theta_2^*}{n_2^* \cos\theta_1 + n_1 \cos\theta_2^*} = \frac{(n_2^*)^2 \cos\theta_1 - n_1 n_2^* \cos\theta_2^*}{(n_2^*)^2 \cos\theta_1 + n_1 n_2^* \cos\theta_2^*} \quad \text{Ecuación 3.50}$$

$$r_{12s}^* = \frac{n_1 \cos\theta_1 - n_2^* \cos\theta_2^*}{n_1 \cos\theta_1 + n_2^* \cos\theta_2^*} \quad \text{Ecuación 3.51}$$

Los coeficientes de Fresnel quedan expresados en función de cantidades conocidas y del número complejo $n_2^* \cos \theta_2^*$. Si expresamos este número complejo como:

$$n_2^* \cos \theta_2^* = u_2 + v_2 i \quad \text{Ecuación 3.52}$$

Si elevamos al cuadrado la última expresión sustituyendo $n_2^* = n_2 + k_2 i$ y aplicamos la ley de Snell obtenemos las condiciones:

$$\begin{aligned} u_2^2 - v_2^2 &= n_2^2 - k_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_1 \\ u_2 v_2 &= n_2 k_2 \end{aligned} \quad \text{Ecuación 3.53}$$

Solucionando el sistema de ecuaciones se obtienen los valores de u_2 y v_2 que introducidos en las ecuaciones 3.50, 3.51 y 3.52 nos dan los coeficientes de Fresnel complejos.

$$\begin{aligned} u_2 &= \sqrt{\frac{1}{2} \left[(n_2^2 - k_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_1) + \sqrt{(n_2^2 - k_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_1)^2 + 4n_2^2 k_2^2} \right]} \\ v_2 &= \sqrt{\frac{1}{2} \left[-(n_2^2 - k_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_1) + \sqrt{(n_2^2 - k_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_1)^2 + 4n_2^2 k_2^2} \right]} \end{aligned} \quad \text{Ecuación 3.54}$$

Figura 3.4: Reflectancias en interfaces aire-metal para plata y cobre

Mediante las expresiones 3.49, 3.50, 3.51, 3.52 y 3.54 se pueden obtener las reflectancias R_p y R_s en la interfaz entre un medio dieléctrico y uno conductor. Además las expresiones permiten generalizar los casos en el que la interfaz sea dieléctrico-

dieléctrico o dieléctrico-conductor ya que la expresión 3.52 se convierte en $n_2 \cos \theta_2$ cuando k_2 es nulo.

La figura 3.4 muestra las reflectancias R_p y R_s para una longitud de onda de 589.3 nm para buenos conductores como la plata ($n=0,20$, $k=3,44$) y el cobre ($n=0,62$, $k=2,57$), [Born, 1991, pag 621]. Las curvas de reflectancia de materiales conductores muestran valores altos y no se observa ángulo de Brewster para R_p .

Son de particular interés las reflectancias R_p y R_s del silicio, que es un material semiconductor caracterizado por tener un valor bajo de su índice de refracción complejo $k=0,008$. Las reflectancias para la interfaz aire-silicio se utilizan como referencia en diferentes métodos metrología óptica basados en la medida de la reflectancia de medios estratificados. La parte real del índice de refracción varía con la longitud de onda en el intervalo del espectro visible correspondiente a la luz roja, entre 600 y 750 nm, tomando valores en los puntos extremos entre 3.9 y 3.6. En la figura 3.5 se representan las reflectancias R_p y R_s del silicio para un índice de refracción $n=3,8+0,008i$.

Figura 3.5: Reflectancia en interfaz aire-silicio para $n=3,8+0,008i$

3.6 Reflexión por una capa que recubre otro medio

Abordamos a continuación el problema de la reflexión y transmisión de una onda plana por una capa que recubre otro medio (figura 3.6). La solución de este problema es la base para la generalización del problema de la reflexión de una onda plana en un medio estratificado con un número arbitrario de capas.

Cuando la onda plana incide sobre la capa es en parte reflejada y en parte absorbida en la primera interfaz n_1/n_2 , de forma que la onda electromagnética absorbida viaja por el interior de la capa hasta encontrar la interfaz n_2/n_3 en la que de nuevo se refleja, para posteriormente abandonar la capa en otro punto de la interfaz n_1/n_2 . Se produce, por tanto un fenómeno de interferencia entre la onda que no penetra en la capa y la que la recorre sufriendo una reflexión interna. El desfase originado por la diferencia de camino óptico viene dado por la expresión:

$$\beta^* = 2\vec{\kappa}_2^* \cdot \vec{OA} - \vec{\kappa}_1^* \cdot \vec{O'C}$$

Expresando los vectores $\vec{OA}$ y $\vec{O'C}$ como:

$$\vec{OA} = \frac{|\vec{OC}|}{2}\vec{t} + e_2\vec{n}$$

$$\vec{O'C} = \vec{O'O} + |\vec{OC}|\vec{t}$$

Figura 3.6: Fenómeno interferencial en una capa que recubre a otro medio

Se obtiene:

$$\beta^* = 2\vec{\kappa}_2^* \cdot \left(\frac{|\vec{OC}|}{2}\vec{t} + e_2\vec{n} \right) - \vec{\kappa}_1^* \cdot (\vec{O'O} + |\vec{OC}|\vec{t})$$

$$\beta^* = |\vec{OC}|(\vec{\kappa}_2^* \cdot \vec{t} - \vec{\kappa}_1^* \cdot \vec{t}) + 2e_2\vec{\kappa}_2^* \cdot \vec{n}$$

$$\beta^* = |\vec{OC}|(\kappa_2^* \sin\theta_2^* - \kappa_1^* \sin\theta_1^*) + 2e_2\kappa_2^* \cos\theta_2^*$$

El paréntesis que multiplica a $|\vec{OC}|$ es nulo por la ley de Snell por lo que finalmente se obtiene para el desfase:

$$\beta^* = 2e_2\kappa_2^* \cos\theta_2^*$$

Ecuación 3.55

Con el valor del número de onda dado por la ecuación 3.27 y la ecuación 3.28 se obtiene:

$$\beta^* = 2e_2 \frac{\omega}{c} n_2^* \cos \theta_2^* \quad \text{Ecuación 3.56}$$

En función de la longitud de onda:

$$\beta^* = 2e_2 \frac{2\pi}{\lambda} n_2^* \cos \theta_2^* \quad \text{Ecuación 3.57}$$

En la última expresión $n_2^* \cos \theta_2^*$ se obtiene a partir de la ecuación 3.52 y la ecuación 3.54.

Para calcular la reflectancia de la capa hay que tener en cuenta la energía que sale a través de la interfaz n_1/n_2 procedente de reflexiones internas múltiples, con desfases correspondientes a múltiplos enteros de β^* .

$$r^* = r_{12}^* + t_{12}^* r_{23}^* t_{21}^* e^{i\beta^*} + t_{12}^* r_{23}^* r_{21}^* r_{23}^* t_{21}^* e^{i2\beta^*} + t_{12}^* r_{23}^* r_{21}^* r_{23}^* r_{21}^* t_{21}^* e^{i3\beta^*} + \dots$$

$$r^* = r_{12}^* + t_{12}^* r_{23}^* t_{21}^* e^{i\beta^*} \left(1 + r_{21}^* r_{23}^* e^{i\beta^*} + (r_{21}^* r_{23}^* e^{i\beta^*})^2 + \dots \right)$$

La serie geométrica de la expresión anterior converge si el módulo del complejo que se eleva a diferentes potencias es menor que la unidad, dado que los módulos de los coeficientes de Fresnel cumplen esta condición la expresión se convierte en:

$$r^* = r_{12}^* + \frac{t_{12}^* r_{23}^* t_{21}^* e^{i\beta^*}}{1 - r_{21}^* r_{23}^* e^{i\beta^*}} = \frac{r_{12}^* + r_{23}^* (t_{12}^* t_{21}^* - r_{12}^* r_{21}^*) e^{i\beta^*}}{1 - r_{21}^* r_{23}^* e^{i\beta^*}}$$

Teniendo en cuenta que $r_{21}^* = -r_{12}^*$ y que la suma de la reflectancia y transmitancia en la interfaz n_1/n_2 es la unidad, obtenemos el coeficiente complejo:

$$r^* = \frac{r_{12}^* + r_{23}^* e^{i\beta^*}}{1 + r_{12}^* r_{23}^* e^{i\beta^*}} \quad \text{Ecuación 3.58}$$

El módulo al cuadrado del coeficiente complejo de la ecuación 3.58 es la reflectancia del sistema de tres capas en el que la capa intermedia tiene un espesor D . Para un sistema de tres capas como el descrito por la figura 3.6, la figura 3.7 es un ejemplo de la variación de la reflectancia con la longitud de onda. La reflectancia varía entre un valor máximo de 0.04 que corresponde a la interfaz 1/3 sin capa intermedia hasta un valor mínimo que puede ser tan pequeño como queramos. El valor mínimo es cero si el índice de refracción de la capa intermedia toma el valor $n_2 = \sqrt{n_1 n_3}$. Esta situación se muestra en la figura 3.8. Este efecto se aprovecha para construir elementos ópticos antirreflejantes para determinadas longitudes de onda.

Figura 3.7: Variación de la reflectancia con la longitud de onda de luz que incide normal a un sistema de tres capas donde $n_1=1$, $n_2=1,3$ y $n_3=1,5$

Figura 3.8: Variación de la reflectancia con la longitud de onda de luz que incide normal a un sistema de tres capas donde $n_1=1$, $n_2 = \sqrt{n_1 n_3}$ y $n_3=1,5$

En la figura 3.9 se muestra la variación de la reflectancia con la longitud de onda de luz que incide normal a un sistema de tres capas formado por aire, una capa de SiO_2 de una micra y un substrato de silicio. En este sistema, más parecido a los problemas reales que se dan en metrología óptica, los índices de refracción de los materiales dependen la longitud de onda incidente (las variaciones se muestran en la figura) y la curva de reflectancia es un sucesión de máximos y mínimos con valores distintos. La distancia entre dos máximos o mínimos sucesivos aumenta para longitudes de onda

más grandes. En la figura 3.7 y la figura 3.8 las distancias entre máximos o mínimos sucesivos no cambian porque la escala del eje de abscisas no es la longitud de onda sino el número adimensional D/λ donde D es el espesor de la capa.

En la figura 3.10 se muestra lo mismo para el caso en que la capa intermedia la constituya nitruro de silicio, Si_3N_4 . Se observa que los máximos alcanzan valores semejantes como corresponde al hecho señalado anteriormente de que estos máximos coinciden con la reflectancia de una interfaz aire-silicio, sin capa intermedia, para esas longitudes de onda. Para el nitruro de silicio los mínimos se acercan más a cero debido a que el valor de su índice de refracción es más cercano a la raíz cuadrada del índice de refracción del silicio. Si el espesor de la capa intermedia aumentara, se observaría un mayor número de ciclos para el mismo intervalo de longitudes de onda y este efecto se observa en la figura 3.11.

Figura 3.9: Variación de la reflectancia con la longitud de onda de luz que incide normal a un sistema de tres capas formado por aire- SiO_2 (1000nm)-Si, en azul; y el de la interfaz aire-Si, en negro discontinuo. Se muestran las variaciones de índice de refracción con la longitud de onda para los materiales involucrados

La figura 3.12 y figura 3.13 muestran la variación de de la reflectancia con en ángulo de incidencia para sistemas de tres capas constituidos respectivamente por aire- SiO_2 -Si y aire- Si_3N_4 -Si, con dos espesores diferentes de capa intermedia. En estas figuras se puede observar que ocurre algo semejante a lo que ocurría en las curvas de variación de la reflectancia con la longitud de onda: el número de máximos y mínimos en las curvas aumenta conforme aumenta el espesor de la capa intermedia.

Figura 3.10: Variación de la reflectancia con la longitud de onda de luz que incide normal a un sistema de tres capas formado por aire-Si₃N₄ (1000nm)-Si, en azul; y el de la interfaz aire-Si, en negro discontinuo. Se muestran las variaciones de índice de refracción con la longitud de onda para los materiales involucrados.

Figura 3.11: Variación de la reflectancia con la longitud de onda de luz que incide normal a un sistema de tres capas formado por aire-SiO₂-Si, en azul; y el de la interfaz aire-Si, para dos espesores de capa intermedia.

Figura 3.12: Variación de la reflectancia con el ángulo de incidencia para una longitud de onda incidente de 633 nm en un sistema de tres capas formado por aire-SiO₂-Si, para dos espesores de capa intermedia

Figura 3.13: Variación de la reflectancia con el ángulo de incidencia para una longitud de onda incidente de 633 nm en un sistema de tres capas formado por aire-Si₃N₄-Si, para dos espesores de capa intermedia.

3.7 Reflexión en sistemas de múltiples capas planas

La ecuación 3.58 puede utilizarse recursivamente para obtener la reflectancia de sistemas de capas planas con más de tres regiones diferenciadas. Para ello se comienza por el cálculo del coeficiente de reflectancia complejo correspondiente a las tres últimas capas del fondo capas N-1/N/Aire (figura 3.14), este coeficiente sirve como reflectancia de la interfaz N-1/N en el siguiente cálculo en el que intervienen las capas N-2/N-1/N. De esta forma, iterando hasta llegar a la cúspide del apilamiento, la última reflectancia calculada será la del sistema global.

Figura 3.14: Apilamiento de capas planas

Para poder simular las propiedades ópticas de apilamientos de capas se han construido programas en el entorno matemático de programación Matlab® que simulan las variaciones de la reflectancia con el ángulo de incidencia para una longitud de onda dada y con la longitud de onda para un ángulo dado. Con el objetivo de validar el modelo y código informático construido se compararon inicialmente los resultados del modelo con algunos resultados experimentales publicados.

La tabla 3.1 lista los espesores y e índices de refracción de un sistema de seis capas sobre un substrato de silicio. Se ha obtenido a partir de un artículo de J. M. Leng y otros autores [Leng, 1998] en el que se miden los espesores de las seis capas mencionadas de forma indirecta a partir tres curvas experimentales: las reflectancias de las polarizaciones P y S en su variación angular y la variación de la reflectancia con la longitud de onda. A partir de estas curvas, a través de ajustes por mínimos cuadrados, solucionan el problema inverso que les conduce al espesor de las capas. Los autores del artículo utilizan valores de índice de refracción constantes para cada capa sin tener en cuenta la variación con la longitud de onda.

Espesor(nm)	Índice de refracción
Indefinido	1
170,8±0,2	3,88+0,008i
253,4±0,7	1,456
441,3±1,3	3,89+0,021i
8,4±0,5	2,02
115,1±0,7	3,98+0,017i
14103±1	1458
Indefinido	3,88+0,008i

Tabla 3.1: Listado de espesores e índices de refracción para un sistema de seis capas sobre sustrato de silicio

En la figura 3.15 se muestra la variación teórica de la reflectancia con la longitud de onda para el apilamiento de materiales descrito en la Tabla 3.1 calculada con el código de simulación de Matlab. En la figura 3.16 se muestra la variación teórica de las reflectancias P y S con el ángulo de incidencia para el mismo sistema de capas calculada con el código de simulación de Matlab. En ambos casos los resultados coinciden apreciablemente con los del artículo mencionado que son reproducidos en la figura 3.18. La figura 3.17 muestra la gran sensibilidad del sistema al cambio de la longitud de onda en unos pocos nanómetros. Los sistemas de apilamientos de capas planas serán, asimismo, extraordinariamente sensibles, en cuanto a su reflectancia, a pequeños cambios tanto de los espesores de las capas como de los índices de refracción de las mismas.

Figura 3.15: Variación de la reflectancia con la longitud de onda de luz que incide formando 10° con la normal del sistema de seis capas de la tabla 3.1

Figura 3.16: Variación de la reflectancia relativa al silicio P y S con el ángulo de la luz incidente para el sistema de seis capas de la tabla 3.1. La longitud de onda de la luz incidente es 675 nm.

Figura 3.17: Variación de la reflectancia relativa al silicio P y S con el ángulo de la luz incidente para el sistema de seis capas de la tabla 3.1. La longitud de onda de la luz incidente es 666 nm.

Figura 3.18: Reflectancias en el sistema de seis capas del artículo de Leng de 1998.

3.8 Polarización de la luz y elipsometría

En la sección 3.4 se definió el plano de incidencia para un haz plano que incide sobre una superficie como el plano que forman el vector de propagación del campo y el vector normal a la superficie. A su vez, tomando como referencia este plano, podemos definir la referencia cartesiana ortogonal a derechas $\{\vec{i}_1, \vec{j}_1, \vec{k}_1\}$ en la que el último vector de la referencia tiene la dirección de propagación, el primero es perpendicular a la dirección de propagación y pertenece al plano de incidencia, y el segundo es perpendicular al plano de incidencia. Una de las dos posibles posiciones de esta referencia se muestra en la figura 3.19. Un haz de luz monocromático que incide sobre la superficie puede adquirir cualquier estado de polarización de se requiera mediante un elemento polarizador y una lámina retardadora. En el sistema de referencia que acabamos de definir el vector campo eléctrico vendría descrito por la expresión:

$$\vec{E}(z, t) = E_{0x} e^{i(\kappa z - \omega t + \phi_x)} \vec{i}_1 + E_{0y} e^{i(\kappa z - \omega t + \phi_y)} \vec{j}_1 \quad \text{Ecuación 3.59}$$

En la anterior expresión las amplitudes de campo eléctrico son reales. La diferencia de fase $\phi_x - \phi_y$ y los valores de las amplitudes de campo eléctrico van a definir las diferentes naturalezas de la luz polarizada. Los diferentes tipos de luz polarizada

reciben su nombre de las trayectorias que describe el extremo del vector campo eléctrico en cualquier plano perpendicular a la dirección de propagación.

Figura 3.19: Referencias relativas al plano de incidencia

Para la descripción sistemática de los diferentes estados de polarización así como sus posibles cambios, se definen las magnitudes angulares reales Δ y ψ .

La primera es la diferencia relativa de fase entre las oscilaciones de los campos eléctricos en los ejes x e y, que toma cualquier valor en el intervalo $[-\pi, \pi]$:

$$\Delta = \phi_x - \phi_y \quad \text{Ecuación 3.60}$$

La segunda es el arco tangente del cociente de las amplitudes de los campos eléctricos en los ejes x e y, que toma valores en el intervalo $[0, \pi/2]$:

$$\tan \psi = \frac{E_{0x}}{E_{0y}} \quad \text{Ecuación 3.61}$$

El estado más general de un campo electromagnético es el de polarización elíptica. En la figura 3.20 se pueden observar dos ejemplos del caso más general para un valor de psi de 60° y dos valores del desfase delta de 60° y 120° . El valor de psi representa la proporcionalidad entre los máximos valores de los campos en las direcciones P y S. Cuando el valor de delta es 0° o 180° obtenemos polarización lineal. En la figura 3.21 se representan los dos estados de polarización lineal para un psi de 60° . En el estado correspondiente a desfase delta nulo el plano de polarización del campo eléctrico forma un ángulo psi con la dirección S del sistema de referencia dibujado en la figura 3.19. Cuando delta toma valores 90° o 270° la polarización será elíptica pero en este

caso los ejes de la elipse coincidirán con los ejes coordenados P y S. En la figura 3.22 se representa un ejemplo de esta situación. En este caso las elipses son idénticas en forma y sólo se diferencian por el sentido de rotación del campo eléctrico.

Figura 3.20: Polarización elíptica para $\psi=60^\circ$, $\Delta=60^\circ$ y $\Delta=120^\circ$

Figura 3.21: Polarización lineal para $\psi=60^\circ$, $\Delta=0^\circ$ y $\Delta=180^\circ$

Figura 3.22: Polarización elíptica para $\psi=60^\circ$, $\Delta=90^\circ$ y $\Delta=270^\circ$

Figura 3.23: Polarización elíptica para $\psi=45^\circ$, $\Delta=90^\circ$ y $\Delta=270^\circ$

En la figura 3.23 se representan los dos estados de polarización circular para la que ψ tiene que tomar el valor de 45° . En este caso, como en el elíptico de la figura 3.22, tenemos dos circunferencias idénticas para valores de δ de 90° y 270° que se diferencian en el sentido de rotación del campo eléctrico.

Finalmente, indicaremos que con la referencia definida en la figura 3.19 y los parámetros definidos en la ecuación 3.60 y la ecuación 3.61, la polarización lineal en el plano de incidencia, polarización P, se corresponde al valor ψ de 90° y δ de 0° o 180° , mientras que la polarización lineal S, perpendicular al plano de incidencia, corresponde a ψ de 0° y los mismos valores de δ .

Cuando un haz de luz con un estado de polarización definida incide oblicuamente sobre una superficie bajo la que existe una región estratificada con diferentes medios electromagnéticos, la luz reflejada tendrá un estado de polarización diferente. Mediante el estudio de estos cambios de estado de polarización se pueden determinar las características del apilamiento de medios en cuanto a sus espesores, índices de refracción y coeficientes de extinción. La elipsometría aborda las diferentes técnicas que permiten medir las variaciones o giros de los ángulos elipsométricos δ y ψ para extraer información del sistema [Tompkins, 2005]. Todas las técnicas de elipsometría se basan en la ecuación fundamental de la elipsometría:

$$\tan \psi e^{i\Delta} = \frac{r_p}{r_s} \quad \text{Ecuación 3.62}$$

Cuando la luz incidente es linealmente polarizada con δ de 0° y ψ de 45° la ecuación 3.62 nos suministra el estado de polarización de la luz reflejada. En la ecuación r_p y r_s son las reflectividades complejas P y S del sistema de capas apiladas cuya obtención se describe en la sección 3.7.

A continuación se muestra la variación de los parámetros δ y ψ con el ángulo de incidencia para casos sencillos, que comienzan con estructuras de dos capas. Las curvas se han construido a través del código de Matlab® que se utilizó para generar reflectancias en las secciones anteriores. En esta ocasión se validan las funciones del código a nivel fundamental, comparando sus resultados con los publicados en un libro de referencia en elipsometría [Tompkins, 2005 p78-79].

La figura 3.24 muestra las curvas características en la reflexión en un medio de mayor índice de refracción [Tompkins, 2005 p78]. La curva δ presenta forma de escalón en el que a partir de un cierto ángulo, que coincide con el valor nulo de R_p o ángulo de Brewster (véase figura 3.5), δ cambia de 0 a 180° . Para el ángulo de Brewster la curva ψ toma valor nulo y tiene un pico o discontinuidad en su pendiente.

La figura 3.25 muestra el efecto de un coeficiente de extinción k creciente en el modelo [Tompkins, 2005 p79]. Los escalones de la curva δ se suavizan

progresivamente según crece k . Como con coeficientes de extinción apreciables desaparece el ángulo de Brewster la curvas ψ no llegan a cero, a la vez que se suavizan y dejan de tener picos.

Figura 3.24: Valores de Δ y ψ en la reflexión en el límite de dos medios de índices de refracción $n_1=1$ y $n_2=3$

Figura 3.25: Valores de Δ y ψ en la reflexión en el límite de dos medios de índices de refracción $n_1=1$ y $n_2=3+ki$

Figura 3.26: Valores de Δ y ψ en la reflexión en el límite de dos medios de índices de refracción $n_1=2$ y $n_2=1$

En la figura 3.26 se analiza la reflexión entre dos medios para el caso en el que el segundo medio tiene un índice de refracción menor [Tompkins, 2005 p79]. Se han representado las reflectancias P y S sobre las curvas delta y psi para poner de manifiesto la relación entre los ángulos de Brewster y crítico con las formas características de las curvas. Como en el caso de la figura 3.24, el ángulo de Brewster se manifiesta como una discontinuidad en escalón de 180° en delta y un valor nulo y un pico en psi. Hasta llegar al ángulo crítico el parámetro delta se mantiene en 180° formando una pequeña meseta. Entre el ángulo de Brewster y el crítico el parámetro psi pasa de 0° a 45° . En el ángulo crítico, el campo eléctrico no cambia por tanto su estado de polarización. A partir del ángulo crítico, a pesar de que el parámetro psi no cambia, el estado de polarización varía porque cambia delta. Este cambio no es consecuencia de los valores de las curvas de reflectancia reales que se observan en la figura 3.26 sino de los valores complejos r_p y r_s de los que se derivan estas curvas.

4 APLICACIÓN DE MODELOS DE MEDIO ESTRATIFICADO A LA SIMULACIÓN DE LA RESPUESTA ÓPTICA DE BIOSENSORES BICELLS PARA SU OPTIMIZACIÓN

Un biosensor BICELL consta de dos regiones claramente diferenciadas desde el punto de vista físico-matemático. La región más profunda puede ser un apilamiento de capas planas de diferentes materiales o bien un material uniforme. La región más externa, donde incide directamente la luz, consiste en una red de pilares caracterizados por su disposición sobre el plano, su altura y su forma. En cuanto a la disposición periódica sobre el plano existen cinco posibles redes de Bravais bidimensionales posibles, de las que, por simplicidad en cuanto a fabricación y modelización matemática, se han elegido las redes hexagonal y cuadrada. Tanto la red hexagonal como la cuadrada caracterizan su celda unitaria por un solo parámetro de red a , y se diferencian en el parámetro angular que será de 120° en la hexagonal y 90° en la cuadrada. En la figura 4.1 se representan estas dos posibles configuraciones.

Figura 4.1: Celdas unitarias de las redes bidimensionales hexagonal y cuadrada

Los pilares pueden construirse con diferentes materiales. En la mayor parte de las aplicaciones y publicaciones que se mencionan en este trabajo los pilares están formados por la fotorresina epoxy negativa llamada SU8, con propiedades físico-químicas que permiten la construcción de estructuras y la biofuncionalización de su superficie. En el capítulo 2, secciones 2.3 y 2.5 de este trabajo, pueden encontrarse referencias, así como una descripción básica de los procesos de fabricación y biofuncionalización de estos biosensores.

Las estructuras pueden construirse con diferentes formas. En la figura 4.2 se pueden observar algunos ejemplos de estructuras bidimensionales que podrán construirse con diferentes alturas. Para el caso de pilares cilíndricos el diámetro del pilar, junto con su

altura y el parámetro de red definen la región externa del biosensor. Para estructuras más complejas se requieren más parámetros.

Figura 4.2: Ejemplos de BICELLS de red hexagonal simple con estructuras bidimensionales de cilindros, tubos, estrellas y cruces [Sanza, 2015].

Aunque en la fabricación se pretende generar estructuras cuya sección no varíe con la cota, en la práctica resulta difícil conseguirlo. En los modelos matemáticos que se describen en este capítulo se supondrá que existe esta regularidad en la fabricación.

La figura 4.3 representa de forma esquemática las diferentes zonas de la BICELL que se mencionan en el primer párrafo de este capítulo para el caso en el que los pilares se construyen sobre un apilamiento de capas o una capa simple. La introducción de capas intermedias modifica los patrones de las curvas en el sensado óptico; ya sea cuando se realizan experimentos de tipo espectrométrico, variación de la respuesta con la longitud de onda, o reflectométrico, variación de respuesta con el ángulo de incidencia; modificando la amplitud, posición y anchura de los máximos y mínimos.

La construcción de modelos teóricos que permiten predecir la respuesta óptica de estos biosensores es esencial en la optimización de su respuesta. Puede interesar tener máximos o mínimos en determinadas zonas del espectro o en determinados ángulos en los que los instrumentos se comportan de forma óptima; puede que interese tener máximos o mínimos con determinados factores de calidad que reducen la incertidumbre de las medidas, o bien, podemos querer garantizar un mínimo de

sensibilidad de sensor BICELL. En cualquiera de los casos mencionados, más aún si queremos optimizar diferentes parámetros a la vez, resultará inviable la construcción y comprobación experimental de centenares de biosensores para encontrar el más adecuado.

Figura 4.3: Ejemplos de BICELLs con estructura interna con o sin apilamiento de capas

Una posible opción a la hora de simular computacionalmente la interacción un haz de luz con los sensores es utilizar programas comerciales de diferencias finitas. El grupo de investigación de Óptica, Micro-Nano-Fotónica y Biofotónica utiliza como sistema de simulación el programa Rsoft®[Rsoft], basado en el algoritmo de propagación de haz (Beam Propagation Method, BPM) y el método de las diferencias finitas en el dominio del tiempo (Finite Difference Time Domain Method, FDTD) Esta última técnica es capaz de proporcionar soluciones en geometrías que donde el método de propagación de haz no puede aplicarse; como contrapartida, los tiempos de computación serán extremadamente largos [Scarmozzino, 2000]. Aun en el caso de utilizar el algoritmo BPM; y un modelo simplificado bidimensional de las estructuras basado en índices de refracción efectivos de la zona externa, la simulación de la respuesta óptica de una sola estructura puede durar decenas de minutos [Casquel, 2011]. En el artículo citado en la frase anterior, se describe cómo, utilizando este modelo, en vez de el modelo tridimensional FDTD, el tiempo de computación disminuye del orden de días al de minutos, obteniéndose además, una buena correlación entre el modelo bidimensional, el tridimensional y los datos experimentales que se aportan en el artículo.

La duración de decenas de minutos por cada simulación de una respuesta óptica sigue, a pesar de todo, siendo excesiva si lo que se pretende es optimizar los parámetros de los que depende la respuesta de un biosensor BICELL. En 2010, el Grupo de Investigación de Óptica, Micro-Nano-Fotónica y Biofotónica, planteó la conveniencia de elaborar un modelo computacional analítico que proporcionara de forma aproximada pero casi instantánea la respuesta óptica de un biosensor BICELL para cualquier tipo de interrogación óptica.

En la siguiente sección se describe un modelo analítico que permite simular la respuesta óptica de las BICELLS de forma rápida. El modelo ha generado predicciones muy ajustadas de las observaciones experimentales a pesar de su relativa sencillez conceptual y ha resultado ser de extraordinaria utilidad en la comprensión de la respuesta óptica de estas estructuras y en la optimización del diseño de las mismas. Un artículo describiendo el modelo, junto con la aplicación del mismo a la optimización de la respuesta óptica de biosensores BICELL fue publicado a principios de 2013 [Lavín, 2013A].

4.1 Modelo volumétrico de capas equivalentes

Con el objetivo de modelizar la respuesta de las BICELLS analíticamente, se sustituye la capa más externa, caracterizada por poseer propiedades ópticas lateralmente heterogéneas, por una o varias capas uniformes lateralmente, definidas por espesores e índices que designamos como equivalentes. El índice de refracción equivalente se obtendrá mediante la ponderación volumétrica de las permitividades dieléctricas relativas correspondientes al material de los pilares, el aire u otra sustancia que se encuentre entre ellos y, en su caso, del material biológico que los impregne. La viabilidad de esta aproximación a sido evaluada por diferentes autores para la obtención de propiedades ópticas de materiales con nanoporos [Braum, 2006], [Garahan, 2007], [Hutchinson, 2010].

Podemos decir que la BICELL puede estar en dos posibles estados: sin o con material biológico adherido, cuya diferente respuesta óptica nos permite la detección de una sustancia. El estudio que se desarrolla en las siguientes secciones se referirá a BICELLS compuestas por redes de pilares cilíndricos, aunque algunas de las conclusiones finales se generalizarán a pilares con diferentes secciones. El caso de BICELL sin material biológico adherido es más sencillo y comenzamos por él.

4.1.1 Espesor e índice de refracción equivalente de la capa externa de una BICELL de pilares cilíndricos sin recubrimiento

En la figura 4.4 se han representado las celdas unitarias hexagonal y cuadrada para un parámetro de red que designamos por a_{cel} . Los arcos de circunferencia representan los perfiles de pilares cilíndricos de radio R_{pil} que tienen altura H_{pil} . El espesor equivalente coincide con la altura de los pilares. Las áreas de las celdas unitarias hexagonal y cuadrada responden a las expresiones:

$$A_{cel} = a_{cel}^2 \frac{\sqrt{3}}{2} \rightarrow \text{Hexagonal} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

$$A_{cel} = a_{cel}^2 \rightarrow \text{Cuadrada} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

Figura 4.4: Celdas unitarias de las redes bidimensionales hexagonal y cuadrada de BICELLS de pilares cilíndricos

Los pilares ocupan una fracción de la superficie de la celda unitaria. En ambos casos, la superficie de los cuatro sectores de pilar corresponde al de un solo pilar completo. Definimos el cociente entre esta superficie y la superficie total de la celda:

$$F_{sc} = \frac{A_{pil}}{A_{cel}} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

Este cociente ya es la ponderación volumétrica del volumen de los pilares frente al de una celda de altura H_{pil} ya que, obviamente, para convertir la expresión en una relación de volúmenes hay que multiplicar en el numerador y el denominador de la fracción por la misma altura. La ecuación 4.3 es también un posible parámetro que nos indica el grado de compactación de los pilares. Cuanto menor sea la distancia entre pilares mayor será F_{sc} . En secciones posteriores se verá que la sensibilidad analítica de un biosensor BICELL (véase capítulo 2, sección 2.1) se relaciona con este parámetro u otros que definen el grado de compactación de los pilares.

Un procedimiento alternativo para definir la compactación en redes de pilares cilíndricos podría ser definir el cociente entre el diámetro del pilar y el parámetro de red:

$$F_{lc} = \frac{2R_{pil}}{a_{cel}} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

Este parámetro puede tomar valores “teóricos” entre 0, para un pilar muy pequeño frente al parámetro de red, y 1, para pilares que se tocan entre sí. Sin embargo, estos

valores extremos se alcanzan independientemente de que la red sea hexagonal o cuadrada. Además, no es generalizable a pilares de sección diferente a la circular.

El parámetro F_{sc} , no toma los mismos valores para la situación de máxima compactación de pilares reflejando que la red hexagonal de pilares cilíndricos puede construirse más compacta en el sentido de que se puede dejar menos aire entre los pilares.

$$F_{sc} = \frac{A_{pil}}{A_{cel}} = \frac{2\pi R_{pil}^2}{a^2\sqrt{3}} \rightarrow \text{Hexagonal} \quad \text{Ecuación 4.5}$$

$$F_{sc} = \frac{A_{pil}}{A_{cel}} = \frac{\pi R_{pil}^2}{a^2} \rightarrow \text{Cuadrada} \quad \text{Ecuación 4.6}$$

Para los valores extremos de compactación mencionados en el párrafo anterior, el cociente de compactación superficial varía de 0 a $\frac{\pi}{2\sqrt{3}} \approx 0,9069$ en la red hexagonal y de 0 a $\frac{\pi}{4} \approx 0,7854$ en la red cuadrada. En secciones posteriores se demostrará que la sensibilidad analítica del biosensor aumenta con la compactación, por lo que, a partir de estos valores, se puede obtener como conclusión que es mejor construir las BICELLS siguiendo una red hexagonal.

La fracción de volumen de la celda que ocupa el aire entre los pilares es $1 - F_{sc}$. Definimos en nuestro modelo la permitividad relativa equivalente como:

$$\varepsilon_{eq} = F_{sc}\varepsilon_{pil} + (1 - F_{sc})\varepsilon_{air} \quad \text{Ecuación 4.7}$$

La expresión anterior se convierte (véase sección 3.2.2 Ec 3.28), en función de los índices de refracción, y asumiendo el índice de refracción del aire muy cercano a la unidad, en:

$$n_{eq}^2 = F_{sc}n_{pil}^2 + (1 - F_{sc}) \quad \text{Ecuación 4.8}$$

o bien:

$$n_{eq} = \sqrt{1 + F_{sc}(n_{pil}^2 - 1)} \quad \text{Ecuación 4.9}$$

En la figura 4.5 se muestra la variación del índice de refracción equivalente con el cociente de compactación superficial para un índice de refracción de pilares de 1.6, indicando los valores extremos para las redes hexagonal y cuadrada.

Figura 4.5: Índice de refracción equivalente de una red de pilares cilíndricos con $n=1.6$ en función del cociente de compactación superficial y valores máximos para red hexagonal (triángulo rojo) y red cuadrada (triángulo verde)

4.1.2 Espesor e índice de refracción equivalente de la capa externa de una BICELL de pilares cilíndricos con recubrimiento

Cuando las BICELLs están recubiertas con material biológico suponemos, de cara a la modelización, que una capa uniforme de espesor d_{bio} e índice de refracción n_{bio} constante recubre la superficie de la celda. Suponemos que la superficie del sensor está totalmente recubiertas formándose una capa de espesor y constante dieléctrica uniforme, es decir que el sensor está en estado de saturación.

4.1.2.1 Cocientes de superficie real y de superficie efectiva

La superficie real de una celda disponible para los procesos de biofuncionalización, inmovilización y biorreconocimiento depende del área que ocupan los pilares A_{pil} , del perímetro de los pilares P_{pil} , de la altura de los pilares H_{pil} y del área de la celda A_{cel} . Dividiendo por el área de la celda obtenemos un parámetro al que llamaremos cociente de superficie real.

$$F_{sr} = \frac{A_{pil} + (P_{pil} \cdot H_{pil}) + (A_{cel} - A_{pil})}{A_{cel}}$$

$$F_{Sr} = 1 + \frac{P_{pil}}{A_{cel}} H_{pil} \quad \text{Ecuación 4.10}$$

Este parámetro puede utilizarse como indicador del rendimiento de la BICELLS ya que, en principio, el aumento de superficie de contacto aumenta la capacidad de captación de material biológico. Este cociente es proporcional a la altura de los pilares lo que puede llevarnos a la conclusión falsa de que el rendimiento puede incrementarse sin límite aumentándola. Más adelante veremos que esto no es así por varias razones.

Como las moléculas de material biológico ocupan espacio y volumen, la superficie efectiva de la celda, entendida como la superficie disponible para el anclaje de material biológico, es inferior a la superficie real. De cara al cálculo de índice de refracción equivalente es necesario definir un cociente que tenga en cuenta este efecto. Para obtener la superficie efectiva restamos a la superficie real el área de una corona circular de radios interior y exterior R_{pil} y $R_{pil}+d_{bio}$ respectivamente. Llamamos a este cociente F_{se} , cociente de superficie efectiva.

$$F_{se} = \frac{A_{pil} + P_{pil}H_{pil} + (A_{cel} - A_{pil}) - (P_{pil}d_{bio} + \pi d_{bio}^2)}{A_{cel}}$$

$$F_{se} = 1 + \frac{P_{pil}}{A_{cel}} (H_{pil} - d_{bio}) - \frac{\pi d_{bio}^2}{A_{cel}} \quad \text{Ecuación 4.11}$$

Restando la unidad a F_{se} y multiplicando por 100 se obtiene el incremento porcentual de superficie de la BICELL con respecto a un sensor plano. Este incremento es proporcional a la altura de los pilares. El incremento porcentual de superficie de la BICELL con respecto a un sensor plano por unidad de altura de los pilares $(F_{se} - 1)/H_{pil}$ es un parámetro que describirá mejor cómo la compactación de los pilares afecta a la variación de índice de refracción equivalente. Su valor cuando las dimensiones de los pilares son mucho mayores que la del espesor de material biológico es aproximadamente el cociente P_{pil}/A_{cel} . Como la celda hexagonal es $\sqrt{3}/2$ veces más pequeña que la cuadrada, se consigue más superficie efectiva con la hexagonal en las redes de pilares cilíndricos, ya que el perímetro es el mismo en ambos tipos de red. Esta última conclusión es generalizable a redes de pilares con secciones que no sean cilíndricos.

La figura 4.6 representa el incremento de superficie efectiva por unidad de altura para una red hexagonal de pilares cilíndricos con diferentes radios y parámetros de red. Las curvas corresponden a diferentes radios de pilar de 25, 50, 150, 250 y 500 nm. Estas curvas se representan desde el valor mínimo teórico del tamaño de la celda $a_{cel} = 2R_{pil} + 2d_{bio}$ hasta $a_{cel}=3000\text{nm}$. El mínimo teórico de la celda impone un límite al

crecimiento de la superficie efectiva. Este mínimo teórico es, además, con toda probabilidad, inalcanzable por problemas prácticos relacionados con los métodos de fabricación de las estructuras. Se observa en la figura que para un parámetro de red dado, el incremento de superficie efectiva crece con el radio del pilar. La figura muestra también que para un radio de pilar dado, el incremento de superficie efectiva crece cuando disminuye el tamaño de la celda hasta el valor mínimo posible. Se observa que los pilares de radio menor permiten acceder a través de la disminución del tamaño de celda a incrementos de superficie efectiva superiores al 1000 % que equivalen incrementar la superficie efectiva con respecto al área de la celda unitaria por factores superiores a 10.

Figura 4.6: Incremento de superficie efectiva por unidad de altura de pilar en tanto por ciento por micrómetro para diferentes radios de pilar y una capa de material biológico de 10 nm en una red hexagonal

4.1.2.2 Índices de refracción y espesores equivalentes

La comparación de las respuestas ópticas reales con los diferentes modelos teóricos ha llevado a la definición de dos posibles aproximaciones a la capa externa de las BICELLS cuando éstas están recubiertas de material biológico. En la figura 4.7 se presentan visualmente.

En el modelo de una capa, la parte superior de la BICELL se sustituye por una sola capa de espesor equivalente $H_{pil} + d_{bio}$ y se definen los volúmenes de la celda, los pilares, el material biológico y el aire según las expresiones:

$$V_{cel} = A_{cel}(H_{pil} + d_{bio}) \quad \text{Ecuación 4.12}$$

$$V_{pil} = A_{pil}H_{pil} \quad \text{Ecuación 4.13}$$

$$V_{bio} = A_{cel}d_{bio} + (H_{pil} - d_{bio})(P_{pil}d_{bio} + \pi d_{bio}^2) \quad \text{Ecuación 4.14}$$

$$V_{air} = V_{cel} - V_{pil} - V_{bio} \quad \text{Ecuación 4.15}$$

Figura 4.7: Modelos de la capa externa de la BICELL propuestos

En el modelo de dos capas, cuya utilización se justifica por un mejor ajuste con los datos experimentales [Casquel, 2011], se define una capa inferior con el espesor y constante dieléctrica de la capa biológica y una superior con un espesor igual a la altura de los pilares. Para esta última capa se obtendrá el índice equivalente a partir de la ponderación de los volúmenes:

$$V_{cel} = A_{cel}H_{pil} \quad \text{Ecuación 4.16}$$

$$V_{pil} = A_{pil}H_{pil} \quad \text{Ecuación 4.17}$$

$$V_{bio} = H_{pil}(P_{pil}d_{bio} + \pi d_{bio}^2) \quad \text{Ecuación 4.18}$$

$$V_{air} = V_{cel} - V_{pil} - V_{bio} \quad \text{Ecuación 4.19}$$

Es habitual que el perímetro de las estructuras que forman la BICELL sea superior al tamaño típico de una proteína, del orden de la decena de nanómetros, en un par de órdenes de magnitud. En este caso la ecuación 4.14 y la ecuación 4.18 se pueden

simplificar eliminando el término πd_{bio}^2 . Cuando se elimina este término, los volúmenes expresados desde la ecuación 4.12 a la ecuación 4.19, sólo dependen de cinco parámetros A_{cel} , H_{pil} , P_{pil} , A_{pil} y d_{bio} , que caracterizan, no sólo a los pilares cilíndricos sino a pilares de cualquier sección como los mostrados en la figura 4.2.

Tal como hicimos en la sección 4.1.1, a partir de la ponderación volumétrica de la constante dieléctrica en las diferentes regiones se puede obtener la constante dieléctrica equivalente:

$$\varepsilon_{eq} = \frac{V_{pil}}{V_{cel}} \varepsilon_{pil} + \frac{V_{bio}}{V_{cel}} \varepsilon_{bio} + \frac{V_{air}}{V_{cel}} \varepsilon_{air} \quad \text{Ecuación 4.20}$$

En términos de índice de refracción obtenemos la expresión:

$$n_{eq} = \sqrt{\left(\frac{V_{pil}}{V_{cel}}\right) n_{pil}^2 + \left(\frac{V_{bio}}{V_{cel}}\right) n_{bio}^2 + \left(\frac{V_{air}}{V_{cel}}\right)} \quad \text{Ecuación 4.21}$$

4.1.3 Diferencia de índices equivalentes

La sensibilidad de la BICELL, entendida como su capacidad de dar diferentes respuestas a una interrogación óptica con y sin recubrimiento, es proporcional a la diferencia entre los índices equivalentes dados por la ecuación 4.9 y la ecuación 4.21. La ecuación 4.21 tiende a la ecuación 4.9 cuando la fracción volumétrica debida a la capa de proteínas es nula. La diferencia de índice equivalente aumenta con el volumen relativo de material biológico.

En el modelo de dos capas (figura 4.7) el índice equivalente de la capa exterior es independiente de la altura de los pilares. La diferencia de índices equivalentes entre la BICELL con y sin recubrimiento aumenta cuando el tamaño de la celda unitaria se acerca al mínimo teórico $2R_{pil} + 2d_{bio}$. En la figura 4.8 se representa esta variación para diferentes radios de pilar y parámetros de red. Se observa que el aumento del radio del pilar aumenta la variación del índice equivalente para un parámetro de red dado. Sin embargo, radios más pequeños permiten alcanzar a través de la disminución del parámetro de red valores cada vez más altos de la variación del índice equivalente. En la figura 4.9 se puede observar la variación de índice de refracción equivalente para la misma combinación de parámetros de radio y diámetro de los pilares, pero en este caso la altura de los pilares es la mitad. Es evidente que el cambio de altura no influye de forma significativa en la variación del índice de refracción obtenida para los mismos casos. En secciones posteriores se estudiará cómo, a pesar de este resultado, la altura de los pilares afecta a la señal de transducción a través de su influencia sobre la periodicidad del patrón interferencial producido por los biosensores.

Figura 4.8: Variación de los índices de refracción equivalentes de la zona superior de una BICELL de red hexagonal de pilares cilíndricos de SU8 en el modelo de una capa para ($H_{pil}=2000$ nm, $d_{bio}=10$ nm , $R_{pil}=250, 150, 100, 50$ y 25 nm)

Figura 4.9: Variación de los índices de refracción equivalentes de la zona superior de una BICELL de red hexagonal de pilares cilíndricos de SU8 en el modelo de una capa para ($H_{pil}=1000$ nm, $d_{bio}=10$ nm , $R_{pil}=250, 150, 100, 50$ y 25 nm)

4.2 Validación del modelo volumétrico de capas equivalentes

Con el objeto de validar los modelos descritos en la sección 4.1 se realizarán, en esta sección, diferentes comparaciones de los resultados del modelo con respuestas experimentales de biosensores obtenidas por el Grupo de Investigación de Óptica, Micro-Nano-Fotónica y Biofotónica. Todos ellos han sido obtenidos con el espectrómetro del grupo (Bruker FT-IR). Aunque el grupo posee instrumentación para la realización de experiencias de reflectometría, a la fecha de elaboración de este documento, aún no se han realizado sobre biosensores en los que se pueda aplicar el modelo volumétrico de capas equivalentes.

En primer lugar se comparan los resultados del modelo con los de un trabajo publicado muy recientemente por el grupo de investigación [López, 2015], en el que se analizan redes de pilares caracterizados por poseer una alternancia vertical de capas de dos materiales diferentes. En segundo lugar realizarán comparaciones con respuestas de biosensores BICELLS configurados según se ha descrito en la sección anterior. En este último caso se utilizan resultados publicados anteriormente [Casquel, 2011], [Lavín, 2013].

4.2.1 Comparación de las predicciones del modelo con la respuesta de redes de pilares resonantes

La figura 4.10 muestra una fotografía lateral de la red de pilares. Esta red de pilares se utiliza para medir las variaciones relativas de índice de refracción de un líquido infiltrado en el espacio entre pilares. Los pilares se construyen a partir de una estructura inicial de capas alternadas que constituye un reflector de Bragg. Esta estructura tiene la propiedad de ser totalmente reflectante para determinados intervalos de longitudes de onda. En esta ocasión, las capas que se alternan son de SiO_2 y Si_3N_4 de 110 y 80 nm respectivamente con una capa central de SiO_2 de 210 nm

Figura 4.10: Fotografía de red de pilares resonantes con microscopio (SEM) y representación esquemática de la alternancia vertical de capas [López, 2015].

En la figura 4.11 se muestra la reflectancia teórica del reflector de Bragg de capas planas antes de realizar la es estructuración de pilares.

Figura 4.11: Señal teórica del reflector de Bragg de capas planas

Sobre el apilamiento de capas se fabrica una estructura de pilares que conservan, individualmente, la estructura periódica de capas. En el caso que discutimos los pilares forman una red hexagonal con parámetro de red de 400 nm, los pilares tienen una altura total de 2110 nm, y un diámetro aproximado de 180 nm. En la figura 4.10 se observa que los pilares no tienen un diámetro uniforme sino que son más estrechos en la zona central.

Figura 4.12: Representación esquemática de la metodología para la medición de las variaciones de índice de refracción de líquidos infiltrados entre los pilares resonantes

En esta ocasión se utilizan los pilares resonantes para determinar índices de refracción de líquidos infiltrados. En la figura 4.12 se muestra un esquema de la metodología: se trata de medir la respuesta espectroscópica del sistema con líquidos con diferentes índices de refracción, en este caso, disoluciones de etanol en agua desionizada con diferentes concentraciones .

En la figura 4.13 se muestran los resultados experimentales obtenidos para mediciones realizadas con una mezcla de agua desionizada con etanol con concentraciones entre 0% y 40%. Los índices de refracción de las concentraciones extremas varían entre 1,330 para el agua pura y 1,342 para la disolución al 40% de etanol.

Figura 4.13: Resultados experimentales para el desplazamientos de un mínimo de la curva de respuesta espectrométrica [López, 2015]

Las simulaciones que se muestran en la figura 4.14 se realizan con un modelo de índices de refracción equivalentes por capas. Para cada capa se utiliza el índice de compactación superficial ya definido (ecuación 4.3):

$$F_{sc} = \frac{A_{pil}}{A_{cel}}$$

que para una celda hexagonal (ecuación 4.5) toma el valor:

$$F_{sc} = \frac{A_{pil}}{A_{cel}} = \frac{2\pi R_{pil}^2}{a^2\sqrt{3}}$$

donde a es el parámetro de red y R_{pil} el radio de los pilares.

En función de este índice, se define el índice de refracción equivalente de una capa con líquido infiltrado, modificando la ecuación 4.7 que habíamos particularizado para el caso de aire entre los pilares:

$$n_{eq}^2 = F_{sc}n_{pil}^2 + (1 - F_{sc})n_{liq}^2$$

Ecuación 4.22

Calculando el índice de refracción equivalente para cada una de las 21 capas que conforman el reflector se obtiene la respuesta teórica del sistema de capas planas equivalente.

Figura 4.14: Señales teóricas de sistemas de pilares resonantes en el que la capa del fondo es líquida y el mismo líquido de índice de refracción 1,330 (curva superior) y 1,342 (curva inferior) infiltra el espacio entre los pilares

Las curvas de la figura 4.14 se han obtenido para un parámetro de red de la estructura de pilares de 400nm y un diámetro de pilar de 200 nm. El desplazamiento de la posición del mínimo que se observa entre los números de onda 18000 y 20000 cm^{-1} es de 115 cm^{-1} para los valores extremos de índice de refracción. Si se utiliza como diámetro de pilar 180 nm el desplazamiento aumenta hasta llegar a 122 cm^{-1} . Ambos datos calculados están en el entorno de los resultados experimentales que se observan en la figura 4.13.

4.2.2 Comparación con la respuesta de BICELLS de pilares de composición uniforme

Comparamos, en esta sección, datos experimentales de respuesta de BICELLS, como las definidas en el comienzo de este capítulo (figura 4.3). En este concepto más “clásico” de BICELL, una estructura periódica de pilares reposa sobre un apilamiento de capas planas de diferentes materiales o bien un material uniforme.

Dos diferentes estados fueron medidos y calculados: uno con la superficie sensora libre de proteínas y otro en el que la superficie sensora estuvo completamente recubierta de material biológico. El material biológico procede de un inmunoensayo indirecto en el que se utiliza la proteína BSA y su anticuerpo anti-BSA [Casquel, 2011]. La estructura consiste en una red hexagonal de pilares de SU-8, sobre una capa de 1000 nm de SiO_2 depositada sobre un sustrato de silicio. Un promedio de mediciones realizadas a través de microscopía confocal llevan a la definición de las siguientes dimensiones para la región nanoestructurada exterior: 420 nm de altura, 200 nm de diámetro y 800 nm de parámetro de red [Casquel, 2011]. La fabricación de este tipo de estructuras de alta relación de aspecto se describió someramente en el capítulo 2 y está detalladamente explicada en la bibliografía [López-Romero, 2010]. La superficie del biosensor es interrogada ópticamente por un haz incidente no polarizado inclinado 17° con respecto a la dirección normal. El haz cubre un rango espectral de longitudes de onda entre 400 y 1100 nm.

Figura 4.15: Fotografía de los pilares cilíndricos [López-Romero, 2010]

En la figura 4.16 se representan esquemáticamente las situaciones que se modelizan y los modelos de capas equivalentes que se utilizarán en la modelización. En este caso, entre las estructuras de pilares y el sustrato de silicio existe una capa de SiO_2 de una micra de espesor.

Figura 4.16: Sensores reales y sus modelos de capas equivalentes [Lavín, 2013]

Figura 4.17: Comparación de los resultados del modelo de capas equivalentes con mediciones sobre redes de nano-pilares de $H=420\text{nm}$, $D=200\text{nm}$, $a=800\text{nm}$

En la figura 4.17 permite comparar las predicciones del modelo para redes de nano-pilares descritas anteriormente y las medidas experimentales de reflectancia. En color negro se observan las medidas y las predicciones del modelo para el biosensor sin recubrimiento de material biológico y en color azul las mismas magnitudes tras el proceso de biorreconocimiento. En el modelo se utilizó como espesor de capa material biológico 16,5 nm a la que se asignó índice de refracción de 1,42. El tamaño de los anticuerpos está en el orden de las decenas de nanómetros. Con más exactitud, diferentes referencias lo acotan entre 10 y 15 nm [Reth, 2013], [Saerens, 2008]. En

cuanto a índice de refracción elegido estaría cercano a los valores medidos para capas de proteínas de parecido peso molecular [Voros, 2004][Cross, 2003].

En primer lugar se observa un ajuste muy bueno en el caso de los mínimos que se encuentran alrededor de los 820 nm. Para estos mínimos, el modelo ajusta tanto la posición de la abscisa del máximo como su ordenada, particularmente importante es también la predicción del desplazamiento del mínimo, ya que éste se utiliza como señal de transducción. El desplazamiento de este mínimo fue medido experimentalmente, siendo su valor 12,2 nm [Casquel, 2011 (figura 3)], mientras que la predicción del modelo es de 12 nm (figura 4.18).

En la figura 4.17 se observa también que la predicción teórica del modelo sobre las reflectancias absolutas de los otros puntos extremos empeora. Entendemos que es esperable que un modelo tan sencillo en el que no se tiene en cuenta la dispersión lateral de energía producida por las estructuras proporcione valores de reflectancia anómalos.

Figura 4.18: Salida gráfica del programa de modelización donde se indican los desplazamientos de las posiciones de los máximos y mínimos (R_+ representa la reflectancia del sensor adherido y R_- la del sensor sin recubrimiento)

En el caso del mínimo que se observa alrededor de los 640 nm el desplazamiento medido de 10,1 nm [Casquel, 2011 (figura 3)]. En la figura 4.18 se pueden observar las predicciones del modelo para los desplazamientos de todos los máximos y mínimos redondeadas al nanómetro. La predicción para el segundo mínimo es de 10 nm lo que coincide notablemente con lo observado en el experimento.

Figura 4.19: Variación de índices de refracción con la longitud de onda para SU-8, Si y capas equivalentes sin y con material biológico adherido utilizadas en la simulación

En la figura 4.19 se representan las variaciones de índice de refracción (curvas de Cauchy) utilizadas en dos de las capas uniformes del modelo y las calculadas para las capas equivalentes con o sin recubrimiento.

Figura 4.20: Respuesta de un sensor tipo Fabry-Perot de capas planas apiladas SU-8 420nm/SiO₂ 1000nm/Si

En la figura 4.20 se observa la respuesta teórica de un biosensor consistente en un apilamiento de capas planas, SU-8/SiO₂/Si, en el que la primera capa de SU-8 tiene dimensiones coincidentes con la altura de las columnas del biosensor que estamos estudiando en esta sección. La capa de SiO₂ igualmente reproduce el espesor del

biosensor mencionado. En la parte superior de la figura aparecen los desplazamientos teóricos predichos por el modelo tanto para los máximos como para los mínimos. Se observa que los desplazamientos son aproximadamente la mitad de los medidos y obtenidos teóricamente para el biosensor nano-estructurado en columnas.

4.3 Optimización de biosensores ópticos BICELL

El objetivo final de este capítulo es la aplicación del modelo de capas equivalentes a la optimización de la respuesta de los biosensores ópticos BICELL. Optimizar un biosensor es ajustar los parámetros de los que pueda depender su respuesta para que su rendimiento sea el mejor posible. La forma más general y aceptada de medir el rendimiento de un biosensor es el límite de detección. Un biosensor será mejor, tendrá mayor rendimiento, o mayor calidad, cuanto menor sea el límite de detección.

En el capítulo 2 se propuso un modelo de cálculo del límite de detección y de la incertidumbre de las medidas proporcionadas por un biosensor cuyas mediciones se basan en una determinada curva de calibración. Se reproducen estas ecuaciones en esta sección para comodidad el lector:

$$C_{LoD} = k \left[\frac{1}{m} \sqrt{\frac{s_l^2}{n} + \frac{E^2}{12} + s_{y_l}^2} \right] \quad \text{Ecuación 4.23}$$

$$U_c = k \left[\frac{1}{m} \sqrt{\frac{s_y^2}{n} + \frac{E^2}{12} + s_{y_l}^2 + \left(\frac{y_l - y}{m} \right)^2 s_m^2} \right] \quad \text{Ecuación 4.24}$$

En las ecuaciones anteriores se observa el parámetro m o sensibilidad analítica en el denominador, lo que implica que una mayor sensibilidad conduce a un menor límite de detección, mejorando el biosensor. Por otra parte, aparece obviamente, la incertidumbre en la determinación de la señal de transducción como factor de empeoramiento del límite de detección.

4.3.1 Números de Mérito de un biosensor (Figures of Merit)

Los números de mérito, *figures of merit* en la literatura técnico-científica anglosajona, son un conjunto de cantidades que caracterizan el rendimiento de un dispositivo, sistema o método en comparación con sus alternativas [Berini, 2006]. En esta sección se proponen tres números, obtenidos a partir de simulaciones analíticas, que nos

permiten encontrar el conjunto de parámetros que producen mejor rendimiento en un biosensor.

Dado que la sensibilidad analítica tiene un carácter esencialmente experimental, es necesario proponer, de cara a la optimización, un parámetro sencillo que se comporte en el modelo teórico de manera análoga. Este parámetro será el factor de sensibilidad (Sensing Quality Factor), y se define como el cociente de la variación de la señal de transducción de los estados sin y con capa de material biológico de un espesor dado, entre el espesor de material biológico.

$$S_{QF} = \frac{\Delta y}{d_{bio}} \quad \text{Ecuación 4.25}$$

En la figura 4.21 se observa el comportamiento teórico de la señal de transducción en un conjunto de simulaciones con espesor de material biológico creciente sobre el biosensor de pilares cilíndricos cuyo comportamiento se analizó en la sección anterior. Dado que la relación entre el espesor de la capa de material biológico y la señal es lineal, el factor de sensibilidad S_{QF} es la pendiente de la recta en la figura 4.21. Por otra parte, la pendiente puede encontrarse a partir de la simulación teórica de un solo espesor debido a la mencionada linealidad. Suponemos, de cara a la optimización, que las estructuras con valores mayores del factor de sensibilidad S_{QF} serán las que tengan mayor valor de sensibilidad analítica m , es decir, que existe una correspondencia entre estos dos parámetros. Cuando la señal de transducción se define como la variación de la posición de un máximo o mínimo de una curva de espectrometría en la que la variable del eje de abscisas es la longitud de onda el factor de sensibilidad S_{QF} es adimensional.

Figura 4.21: Variación de la señal de transducción con el espesor de la capa de material biológico para el biosensor de nano-pilares de $H=420\text{nm}$, $D=200\text{nm}$, $a=800\text{nm}$

Figura 4.22: Representación gráfica del desplazamiento y la anchura de pico

Nos ocupamos a continuación del efecto de la incertidumbre en la determinación de la posición de los máximos y mínimos para la definición de la calidad del biosensor, y en particular, de hasta qué punto podemos predecirlo de manera teórica. El objetivo es definir un parámetro, de cálculo sencillo, a partir de las respuestas teóricas simuladas con el modelo de capas equivalentes, que nos permita comparar el rendimiento de diferentes diseños de biosensores de tipo BICELL.

Diferentes autores [White, 2008], [de Vicente, 2014] han establecido que la incertidumbre en la determinación de la posición de un máximo o mínimo depende, entre otros factores, de la relación señal ruido, SNR (Signal to Noise Ratio), y la anchura espectral del pico definida como la anchura espectral a media altura del pico, FWHM (Full Width Half Maximum/Minimum). En la figura 4.22 se representa esta cantidad para uno de los mínimos en una señal teórica. La figura 4.23 pretende mostrar, a través de una imagen, el efecto del ruido sobre la incertidumbre en la determinación de la posición de un máximo o mínimo. En ella se muestra una señal experimental y una ampliación de la zona de los mínimos. Se puede decir que en esta imagen “apreciamos” la incertidumbre a simple vista. Por otra parte, es bastante intuitivo concluir que cuanto más “plano” sea el mínimo, o ancho sea el pico, la incertidumbre se ensanchará.

En la figura 4.24 se representan los espectros teóricos calculados para dos biosensores de los que uno es el descrito en la sección anterior, y en el otro variamos el espesor de la capa intermedia de SiO_2 , dejándolo en la mitad, es decir 500 nm. Analizamos el desplazamiento y la anchura de un máximo en el entorno de los 700 nm. Se observa

que el biosensor de 500 nm de SiO₂ tiene un mayor factor de sensibilidad S_{QF} , multiplicando prácticamente por dos al del biosensor de 1000 nm de SiO₂. Si sólo tenemos en cuenta el comportamiento del factor de sensibilidad tenemos que concluir que el segundo sensor es de mejor calidad que el primero. Sin embargo, atendiendo al efecto del ruido sobre la incertidumbre, creciente sobre los picos anchos, observaríamos que el segundo biosensor duplica la anchura del primero en ese máximo.

Es necesario, por tanto, elegir un parámetro que tenga en cuenta el efecto de la anchura del pico en el rendimiento o la calidad del biosensor. Este parámetro, ya definido en otras áreas de la física, es el factor de calidad. Para un espectro dependiente de la longitud de onda tiene la forma:

$$Q = \frac{\lambda_{max/min}}{FWHM}$$

Ecuación 4.26

Figura 4.23: Señales experimentales y efecto del ruido sobre la incertidumbre en la determinación de la posición de un mínimo.

En la ecuación 4.26, λ es la longitud de onda del pico. Valores crecientes de la anchura del pico disminuyen proporcionalmente la calidad del biosensor debido a que se espera que tengan mayor incertidumbre asociada a la determinación de su posición. Valores decrecientes del factor de calidad de los picos utilizados para construir la curva de calibración conducirían a un mayor límite de detección.

Figura 4.24: Efecto del espesor de la capa intermedia de SiO₂ sobre la el desplazamiento y la anchura de pico

Finalmente se considera como indicio de calidad de un biosensor la amplitud de la señal en el sentido de la diferencia entre sus valores extremos, máximos y mínimos sucesivos.

$$A_F = (R_{Max} - R_{Min}) \times 100$$

Ecuación 4.27

En la ecuación 4.27, R representa la reflectancia referida al silicio.

El factor de amplitud depende fundamentalmente del sustrato que sirva como soporte a los pilares de la BICELL. También depende del método de medida. En espectrómetros que miden con respecto a una referencia de silicio como el que utiliza el grupo de investigación de Óptica, Micro-Nano-Fotónica y Biofotónica, la señal tendrá poco contraste cuando el sustrato es de silicio. En la figura 4.25 se observa un ejemplo donde se pone de manifiesto este efecto.

Figura 4.25: Efecto del tipo de sustrato en el factor de amplitud

4.3.2 Diseño eficiente y optimización de celdas biofotónicas de pilares cilíndricos

En esta sección se muestra parte del trabajo realizado en optimización de celdas biofotónicas de pilares cilíndricos. Los resultados de este trabajo fueron comunicados en el congreso internacional, *E-MRS 2012 (Spring Meeting)* [Lavín, 2012] y publicados en la revista *Sensors and Actuators B* a principios de 2013 [Lavín, 2013A]. Se estudiaron diferentes configuraciones en cuanto a la combinación de materiales del sustrato y los pilares (figura 4.26). Para cada una de estas configuraciones se estudiaron un conjunto de valores de los parámetros que definen la red de pilares: parámetro de red a , altura H y radio R . Se eligió la configuración de red hexagonal, ya que, tal como se mostró en la sección 4.1, en este tipo de red podemos dejar menos espacio entre las estructuras, y podemos esperar mayor sensibilidad. Para cada una de las combinaciones de materiales y parámetros se calcularon los valores de los tres *números de mérito* definidos en la sección anterior.

Figura 4.26: Combinaciones de materiales estudiadas

Para realizar este proceso se construyó un programa en el entorno matemático de programación Matlab® que simula la respuesta en reflectancia de BICELLS sin y con recubrimiento de material biológico y realiza automáticamente el análisis de posición, anchura y amplitud de los máximos o mínimos. Este programa calcula de forma prácticamente instantánea los parámetros mencionados, lo que permite la realización de simulaciones múltiples con diferentes parámetros hasta encontrar los parámetros que conducen a una respuesta óptima.

En la figura 4.27 se muestra una de las tablas generadas con los datos de entrada (α , H , R) y salida (S_{QF} , Q_F , A_F), así como una de las salidas gráficas del programa. Para generar las tablas se elegía el pico de mayor desplazamiento en un intervalo espectral definido entre 500 y 1000 nm. En algunos casos, fundamentalmente para estructuras de poca altura la respuesta del sensor, no tiene suficientes ciclos de máximos y mínimos para que se puedan definir los factores de calidad y amplitud.

Con el objetivo de presentar el comportamiento de los números de mérito se realizaron mapas de contorno para cada una de las configuraciones de materiales estudiadas (figura 4.26). Los datos de entrada de las tablas se generaron de forma que los diámetros de las estructuras varían entre 0.1 y 5 μm . La relación de aspecto H/D toma solamente valores 1 o 2 asumiendo los límites técnicos inherentes a la fabricación de las estructuras. Finalmente, la relación entre el tamaño de las estructuras, a través de D , y el parámetro de red a , a/D toma valores 2 o 4. Se muestran y discuten a continuación los resultados obtenidos para las configuraciones de materiales de más interés.

N	Biolayer	D	R	H	a	Shift	SQ-factor	Wavelength	FWHM	Q-factor	A-factor	Wavelength interval	Extremal
1	20	100	50	100	200	137	6,85	932	0	-	0	600-1000	Minimal
2	20	100	50	100	400	96	4,80	676	0	-	0	500-1000	Minimal
3	20	100	50	200	200	81	4,05	866	0	-	0,306	500-1000	Maximal
4	20	100	50	200	400	0	-	0	0	-	0	500-1000	0
5	20	250	125	250	500	45	2,25	709	264	2,69	0,325	600-1100	Minimal
6	20	250	125	250	1000	63	3,15	688	0	-	0	500-1000	Maximal
7	20	250	125	500	500	32	1,60	828	173	4,79	0,308	600-1100	Minimal
8	20	250	125	500	1000	32	1,60	674	182	3,70	0,192	500-1000	Maximal
9	20	500	250	500	1000	28	1,40	824	172	4,79	0,31	500-1100	Minimal
10	20	500	250	500	2000	39	1,95	906	0	-	0,208	500-1100	Minimal
11	20	500	250	1000	1000	17	0,85	902	101	8,93	0,31	600-1100	Minimal
12	20	500	250	1000	2000	21	1,05	883	152	5,81	0,198	600-1100	Maximal
13	20	1000	500	1000	2000	14	0,70	810	82	9,88	0,323	500-1000	Maximal
14	20	1000	500	1000	4000	17	0,85	758	110	6,89	0,182	500-1000	Maximal
15	20	1000	500	2000	2000	8	0,40	846	45	18,80	0,316	600-1000	Minimal
16	20	1000	500	2000	4000	10	0,50	873	73	11,96	0,19	600-1000	Maximal
17	20	2000	1000	2000	4000	7	0,35	845	44	19,20	0,316	600-1000	Minimal
18	20	2000	1000	2000	8000	10	0,50	873	74	11,80	0,189	600-1000	Maximal
19	20	2000	1000	4000	4000	4	0,20	914	26	35,15	0,307	700-1000	Minimal
20	20	2000	1000	4000	8000	5	0,25	906	40	22,65	0,188	700-1000	Minimal
21	20	5000	2500	5000	10000	3	0,15	951	23	41,35	0,307	700-1000	Maximal
22	20	5000	2500	5000	20000	5	0,25	964	36	26,78	0,189	700-1100	Minimal
23	20	5000	2500	10000	10000	2	0,10	961	12	80,08	0,301	800-1000	Minimal
24	20	5000	2500	10000	20000	2	0,10	944	17	55,53	0,187	800-1000	Minimal

Figura 4.27: Tabla de resultados de *números de mérito* para la configuración de pilares de silicio sobre sustrato de silicio y detalle salida del programa de análisis de puntos extremos para una combinación de parámetros

4.3.2.1 Pilares de SU-8

La figura 4.28 muestra los resultados para los números de mérito para el caso de sustrato de SiO_2 . Los mayores valores del factor de sensibilidad S_{QF} se dan para las situaciones de mayor compactación, menores diámetros y parámetros de red. Sin embargo, los valores extremos del factor de sensibilidad se corresponden con valores no definidos del factor de calidad Q_F . Se observa una zona de interés para pilares de media micra de diámetro y en las que el factor de calidad toma valores entre 5 y 10 mientras que oscila alrededor de 1. El factor de amplitud A_F toma valores bajos debido

al bajo contraste de índice de refracción producido por el sustrato de vidrio, aumentando cuando disminuye el parámetro de red.

Figura 4.28: Pilares de SU-8 sobre sustrato de SiO_2 ($H/D=2$)

La figura 4.29 muestra los resultados para los números de mérito para el caso de sustrato de silicio. Tomando como referencia de comparación los pilares de media micra de diámetro, se observan en este sustrato valores mejores del factor de sensibilidad S_{QF} , alcanzándose 1,4 para el parámetro de red de $1\ \mu\text{m}$. Los factores de calidad Q_F son parecidos pero el factor de amplitud crece notablemente. Es de reseñar que la zona de factor de sensibilidad 1 se extiende a estructuras mayores, con diámetros cercanos al micrómetro. Por la forma en la que se generan las tablas de datos, los mayores diámetros y parámetros de red significan mayores alturas. Las mayores alturas llevan a más ciclos y mayores factores de calidad. Por tanto encontramos una zona de interés para estructuras de dimensiones micrométricas con altos valores para los tres números de mérito propuestos.

Figura 4.29: Pilares de SU-8 sobre sustrato de silicio ($H/D=2$)

La figura 4.30 muestra los resultados para los números de mérito para el caso de sustrato de silicio con una capa intermedia de 500 nm de SiO_2 . La inclusión de la capa intermedia aumenta el factor de calidad, y muy notablemente el factor de amplitud. Se observa una disminución del factor de sensibilidad en la zona de tamaños micrométricos. Sin embargo, la zona cercana a la media micra de diámetro, tiene valores de factor de sensibilidad cercanos a la unidad, con valores altos de los factores de calidad y amplitud.

Figura 4.30: Pilares de SU-8 sobre sustrato de silicio con una capa intermedia de 500 nm de SiO_2 ($H/D=2$)

Figura 4.31: Variación de los números de mérito con el espesor de una capa intermedia de SiO_2 para una red de pilares $D=1000\text{nm}$ $H=2000\text{nm}$ $a=2000\text{nm}$

La figura 4.31 muestra un ejemplo representativo de la variación de los números de mérito con el espesor de la capa intermedia de SiO_2 . Como regla general, mayores espesores de capa intermedia disminuyen el factor de sensibilidad y aumentan el factor de calidad. El factor de amplitud, sin embargo, no parece tener cambios significativos.

4.3.2.2 Pilares de silicio

La figura 4.32 muestra los resultados para los números de mérito para el caso de sustrato de SiO_2 . Se observa que para pilares de media y una micra el factor de sensibilidad toma valores mayores que en el caso de los pilares de SU-8 y los factores de calidad son parecidos, siendo lo más destacable es que el factor de amplitud mejora notablemente comparado con el caso de los pilares de SU-8 sobre SiO_2 .

La figura 4.33 muestra los resultados para los números de mérito para el caso de sustrato de silicio. Con respecto al caso anterior el factor de sensibilidad aumenta, mientras que, como suele ser habitual, el factor de calidad disminuye. Esta combinación de materiales es capaz de producir factores de sensibilidad por encima de 2 con valores definidos del factor de calidad. En particular, la configuración $D=250\text{nm}$, $H=500\text{nm}$, $a=500\text{nm}$, proporciona un factor de sensibilidad de 2,7 con un factor de calidad 4,78 y factor de amplitud 35%.

Figura 4.32: Pilares de silicio sobre sustrato de SiO_2 ($H/D=2$)

Figura 4.33: Pilares de silicio sobre sustrato de silicio ($H/D=2$)

La figura 4.34 muestra los resultados para los números de mérito para el caso de sustrato de silicio con una capa intermedia de 500 nm de SiO_2 . La adición de la capa intermedia hace que el factor de calidad esté definido con valores entre 5 y 10 para todos los tamaños de estructura propuestos. Se tienen valores altos del factor de amplitud y se mantienen altos los del factor de sensibilidad. Aunque no tan altos como en el caso anterior.

Figura 4.34: Pilares de silicio sobre sustrato de silicio con una capa intermedia de 500 nm de SiO_2 ($H/D=2$)

Aprovechando la circunstancia de que la inclusión de la capa intermedia hace que los tres números de mérito estén definidos para todos los tamaños de estructura, estudiaremos estas magnitudes en un conjunto de parámetros con mismas relaciones de aspecto en superficie a/D y altura H/D , mostrando las tendencias en una disminución progresiva de tamaño respetando las proporciones iniciales.

En la figura 4.35 se observa cómo la disminución del tamaño de las estructuras, respetando las proporciones a/D y H/D , conduce a un aumento del factor de sensibilidad y una disminución del factor de calidad.

Figura 4.35: Variación teórica de los números de mérito con el tamaño de las estructuras con una capa intermedia de SiO_2 de 1000 nm cuando se cambia el tamaño de las estructuras manteniendo las proporciones a/D y H/D

En la figura 4.36 se observa un ejemplo de cómo la compactación de las estructuras manteniendo las dimensiones de altura conduce, sin embargo, a un aumento del factor de sensibilidad manteniéndose los valores de los factores de calidad y amplitud.

Figura 4.36: Variación teórica de los números de mérito con el tamaño de las estructuras para estructuras de SU-8 sobre silicio cuando se cambia el tamaño de las estructuras manteniendo la proporción a/D pero manteniendo la altura de las columnas constante ($H=1000\text{nm}$).

4.3.2.3 Discusión de los resultados

Se observa que tanto para estructuras construidas de pilares de SU-8 como para las construidas con pilares de silicio se pueden obtener buenos resultados para los números de mérito propuestos. Pueden obtenerse factores de sensibilidad altos, en el entorno de dos y superiores, para estructuras de dimensiones submicrométricas, media micra o cuarto de micra.

Las estructuras de SU-8 con sustrato de SiO_2 proporcionan bajos valores tanto del factor de amplitud como del de calidad debido al bajo contraste de índices de refracción. La inevitable aparición de ruido en la señal, aumentaría la incertidumbre en la determinación de la posición de los máximos o mínimos, o los haría indetectables, por lo que esta combinación de materiales no parece recomendable. Sin embargo, las estructuras de silicio con sustrato de SiO_2 proporcionan valores aceptables de los números de mérito, probablemente debido al alto índice de refracción del silicio comparado con el del vidrio.

Para los casos de sustrato de silicio se observan buenos resultados tanto con pilares de SU-8 como con pilares de silicio, siendo mejores los resultados teóricos con pilares de silicio, especialmente con respecto a los factores de amplitud y calidad.

La introducción de capas intermedias de vidrio sobre sustrato de silicio produce una ganancia en el factor de calidad y el factor de amplitud para las estructuras de SU-8.

Como contrapartida se observa una reducción del factor de sensibilidad. Podemos aumentar el factor de sensibilidad disminuyendo el espesor de la capa intermedia pero entonces el factor de calidad decrece. El factor de amplitud permanece estable cuando se cambia el espesor de la capa intermedia. Éste parece estar fundamentalmente ligado al contraste de índices de refracción en el límite de las dos primeras capas de material. La elección de un adecuado espesor de la capa intermedia puede servir para hacer que los máximos o mínimos aparezcan en determinados intervalos espectrales y para equilibrar los valores de los factores de sensibilidad y calidad.

Cuando las estructuras son de silicio y se introduce una capa intermedia de vidrio sobre el sustrato de silicio, las mejoras en el factor de calidad y amplitud no son tan grandes comparadas con el caso anterior de estructuras de SU-8. El factor, de sensibilidad, sin embargo, empeora, lo que aparentemente hace que la introducción de una capa intermedia no sea recomendable. Sin embargo, el mapa del factor de sensibilidad para este caso tiene una característica única, su variación con los valores de diámetro y parámetro de red es bastante suave. Esta característica es muy deseable cuando se pretende que pequeñas desviaciones de los valores nominales en el proceso de fabricación no conduzcan a grandes cambios en el rendimiento del biosensor.

Una conclusión general para todas las configuraciones es que la reducción de tamaño respetando las proporciones a/D y H/D conduce a la mejora del factor de sensibilidad y el empeoramiento del de calidad. Como se mencionó anteriormente, el factor de amplitud no parece depender del tamaño de las estructuras sino del contraste de índices de refracción de las primeras capas.

Sin embargo, la reducción de tamaño respetando las proporciones a/D y manteniendo la altura de los pilares conduce a la mejora del factor de sensibilidad y manteniendo invariantes los factores de calidad y amplitud.

Parece, por tanto, que la mejora del rendimiento de los biosensores BICELL está ligada a los avances en los procesos de fabricación que nos permitan construir estructuras cada vez más pequeñas y compactas, con altas relaciones de aspecto H/D , avanzando hacia las dimensiones nanométricas. En contraste, para las estructuras “supermicrométricas”, se obtienen valores más bajos del factor de sensibilidad: en todos los casos estudiados en los mapas $S_{QF} < 0,4$. Algunas estructuras de tamaño micrométrico tienen sensibilidades cercanas a la unidad, y buenos factores de calidad y amplitud, por lo que no deberían ser necesariamente descartadas en determinadas aplicaciones.

5 NUEVAS TÉCNICAS DE INTERROGACIÓN BASADAS EN SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN ALTERNATIVAS

En el capítulo 2 se describieron diferentes técnicas ópticas a partir de las cuales, podemos definir una señal de transducción para un biosensor. En el capítulo 4 se ha estudiado la forma optimizar el rendimiento de un biosensor a través del estudio del desplazamiento de las posiciones máximos o mínimos, que se considera nuestra señal de transducción, y las proporciones de estos máximos y mínimos, que se relacionan con la incertidumbre en la determinación de sus posiciones. En este capítulo se proponen señales de transducción alternativas a la clásica del desplazamiento de las posiciones de máximos o mínimos. Estas técnicas alternativas han sido objeto de una patente europea (*Interferometric Detection Method*) [Holgado, 2014A]. La descripción y demostración de validez práctica de las mismas, en un amplio rango de aplicaciones que incluye desde la detección de anticuerpos hasta la de virus, ha sido, así mismo, publicada en forma de artículo en revista [Holgado, 2014B]. Anteriormente a las publicaciones mencionadas, en el año 2013, se realizaron estudios teóricos sobre la posibilidad de definir señales alternativas de transducción para técnicas de reflectometría y elipsometría. Las conclusiones de estos estudios se comunicaron mediante una ponencia en el congreso *Third International Congress on Bio-Sensing Technology* celebrado en Sitches en mayo de 2013 [Lavín, 2013B].

5.1 Antecedentes: la función de transducción M_d de residuo medio

En el congreso de mayo de 2013 mencionado anteriormente, se continúa con el trabajo de simulación teórica que tiene como objetivo encontrar conjuntos de parámetros que optimicen el rendimiento de los biosensores ópticos BICELL. En este caso se pone el énfasis en nuevas formas de interrogación óptica asociadas a los nuevos instrumentos de medida reflectométrica que próximamente adquiriría el Grupo de Óptica Micro-Nano-Fotónica y Biofotónica. Con este objetivo, se adaptan los sistemas de simulación teórica basados en el modelo de capas equivalentes que se describió en el capítulo anterior, y que se habían utilizado principalmente en la simulación de señales de espectrometría $R(\lambda)$ o $R(k)$, a la simulación de curvas $R(\theta)$ de reflectometría de perfiles de haz (BPR). En particular, se simulan las reflectancias teóricas $R_p(\theta)$ y $R_s(\theta)$ que se observarían en dos ejes perpendiculares, así como los parámetros $\Delta(\theta)$ y $\Psi(\theta)$ que definen el estado de polarización del haz para distintos ángulos en un eje que forme 45° con los anteriores. Una explicación de esta técnica así como referencias bibliográficas pueden encontrarse en la sección 2.6.

INFORME (Curvas de reflectancia)
 Datos red en nm (Parred, RadPil, HPil, Recubio)+ TipRed ,MatPil y Longonda
 500 125 1000 20
 HEXA SU8 6.37e-007
 Espesores Sin/Con (nm) e índices efectivos Sin/Con
 1000 1000 1.159 1.1929

Máximos y mínimos de las curvas P
 Mínimos P- => 20.1675 52.31
 Mínimos P+ => 26.037 54.1268
 Desplazamientos de mínimos P => 5.8695 1.8168
 Máximos P- => 35.54 58.3193
 Máximos P+ => 39.6626 65.5164
 Desplazamientos de máximos P => 4.1226 7.1971

Máximos y mínimos de las curvas S
 Mínimos S- => 17.093 57.4808
 Mínimos S+ => 24.5696 63.0009
 Desplazamientos de mínimos S => 7.4766 5.5201
 Máximos S- => 43.4359
 Máximos S+ => 47.9079
 Desplazamientos de máximos S => 4.472

Figura 5.1: Ejemplo de salidas gráficas del programa de simulación de reflectancias

En la figura 5.1 podemos observar un ejemplo de las salidas gráficas del programa para una estructura de SU-8 sobre silicio. En este caso, el programa busca las posiciones de los máximos y mínimos en las curvas, así como los desplazamientos de los mismos cuando se añade una capa de material biológico. Adicionalmente al estudio de los desplazamientos de los máximos o mínimos, en este trabajo, se propone el estudio de una magnitud que tenga en cuenta la diferencia de las curvas sin y con material biológico en todo el intervalo de ángulos en los que se tiene señal. En particular se propone:

$$M_d = \frac{\sum_1^N |R_{+i} - R_{-i}|}{N}$$

Ecuación 5.1

En la ecuación 5.1 M_d es el residuo medio (Mean Difference) que se calcula en forma teórica restando los valores discretos de las predicciones para R_+ y R_- y dividiendo por el número de puntos. Aunque en esta sección se mostrarán ejemplos con simulaciones de reflectometría para mostrar alguna de las características de esta magnitud el residuo medio puede definirse para señales de espectroscopía $R(\lambda)$ o $R(k)$.

La utilización del residuo medio tiene algunas ventajas con respecto al método de seguimiento de máximos o mínimos.

En primer lugar, es más simple desde el punto de vista computacional, ya que se sustituyen los procedimientos de búsqueda de máximos por simples diferencias de señal. Desde un punto de vista experimental, el residuo medio como señal de transducción, en principio, parece un método robusto que eliminaría algunos los problemas asociados a la determinación de la posición de los máximos o mínimos y la incertidumbre asociada a la relación entre la anchura de los máximos y la relación señal ruido (Véase capítulo anterior).

En segundo lugar, dado que las reflectancias definen el valor de la intensidad que se refleja, si se definen residuos medios en determinados intervalos angulares o espectrales, donde $R_+ > R_-$ o bien $R_+ < R_-$ para gran parte del intervalo, el residuo medio es proporcional a la diferencia de intensidad total que captaría un sensor en esos intervalos. Esto abre la posibilidad de implementación práctica de sistemas de transducción basados las variaciones de intensidad reflejada sobre la superficie del biosensor. En secciones posteriores se describirá en detalle una aplicación práctica basada en este sistema de transducción que ha sido desarrollada y patentada por el Grupo de Óptica Micro-Nano-Fotónica y Biofotónica.

La figura 5.2 y la figura 5.3 muestran las señales $R_S(\theta)$ calculadas para dos biosensores BICELL de pilares cilíndricos de SU-8 sobre silicio que se diferencian por la altura de los pilares; en el primer caso de 500 nm y en el segundo caso de 1000 nm. En las figuras se dibujan las señales para el pilar sin recubrimiento de material biológico y con recubrimientos de material biológico de diferente espesor. De forma análoga a lo que ocurre en espectrometría observamos que las curvas correspondientes a la mayor altura de pilares tienen más máximos y mínimos. Sin embargo, la forma de las oscilaciones no es tan regular como en las curvas de señal espectrométrica, en este caso se parte del valor de la reflectancia con incidencia normal con pendiente nula y tras una o varias oscilaciones de diferente amplitud la curva tiende a la reflectancia unidad característica de la incidencia rasante.

Para estos dos posibles biosensores se va a comparar la señal de transducción de residuo medio asociada a la respuesta teórica con la típica señal de transducción de desplazamiento de un mínimo.

Figura 5.2: Curvas teóricas de variación de reflectancia S con el ángulo para una estructura de pilares de SU-8 sobre silicio $a=500\text{nm}$, $D=250\text{nm}$, $H=500\text{nm}$

Figura 5.3: Curvas teóricas de variación de reflectancia S con el ángulo para una estructura de pilares de SU-8 sobre silicio $a=500\text{nm}$, $D=250\text{nm}$, $H=1000\text{nm}$

Se sigue el único mínimo de la curva de la figura 5.2 cuya posición se desplaza en el entorno de 40° a 50° . Con respecto a la figura 5.3, se sigue el mínimo que se desplaza alrededor de 60° .

Figura 5.4: Comparación dos de señales de transducción basadas en las curvas teóricas de variación de reflectancia S con el ángulo para una estructura de pilares de SU-8 sobre silicio $a=500\text{nm}$, $D=250\text{nm}$, $H=1000\text{nm}$

En la figura 5.4 se comparan las dos señales de transducción mencionadas para dos biosensores con diferentes parámetros estructurales. Se observa, en primer lugar, la linealidad de la respuesta en ambos casos para el intervalo de espesores de material biológico característicos de un inmunoensayo. Como consecuencia, podemos utilizar el factor de sensibilidad, definido en el capítulo anterior, para discriminar los biosensores de mayor rendimiento, siendo este la pendiente de las rectas de la figura 5.4.

$$S_{QF} = \frac{\Delta y}{d_{bio}} \quad \text{Ecuación 5.2}$$

Se observa que, si bien los factores de sensibilidad basados en desplazamiento de mínimos son muy parecidos en dos biosensores muy diferentes, los factores de sensibilidad basados en el residuo medio cambian radicalmente de un sensor a otro. En particular, vemos que el efecto de que haya varias subidas y bajadas de reflectancia en las curvas de la figura 5.3, incrementa la diferencia media efectiva, haciendo que el factor de sensibilidad teórico basado en este sistema de transducción aumente en un 100 % al aumentar la altura de los pilares. Dado que la sensibilidad real del biosensor y su factor de sensibilidad teórico están directamente relacionados, podemos obtener como conclusión que la sensibilidad real en un biosensor depende del método de lectura que se utilice en el procedimiento de interrogación óptica. Esta observación abre la posibilidad de incrementar el rendimiento de un biosensor físico determinado a través de la implementación de sistemas de lectura basados en señales de transducción diferentes.

Figura 5.5: Variación teórica del residuo medio de las señales P y S con el factor a/D para biosensores $D=250\text{nm}$ y dos alturas $H=[500, 1000]\text{nm}$ ($d_{\text{bio}}=20\text{nm}$)

En la figura 5.5 se observa la variación del residuo medio cuando las columnas de las estructuras se acercan para dos alturas y para las señales P y S. Se observa que la respuesta S siempre es superior a la P. La compactación de las columnas, valores de a/D bajos, llevan a un aumento de la señal de un orden de magnitud tanto en la señal P como en la S. Es necesario, sin embargo, indicar que los factores a/D más bajos serían difícilmente alcanzables desde el punto de vista de la fabricación de las estructuras. Por otra parte, en caso de poder ser fabricadas, las estructuras muy compactas podrían presentar problemas de mojabilidad. Por tanto, aunque, como se indicaba en el capítulo anterior, se pueda afirmar que estructuras más pequeñas y compactas ofrecen mayor sensibilidad, siempre habrá que tener en cuenta los límites antes mencionados.

5.2 Método de detección óptica interferométrica (Interferometric Optical Detection Method: IODM)

El método de detección óptica interferométrica se caracteriza por el uso simultáneo de dos señales interferométricas. Uno de los interferómetros proporciona una señal que se denomina de referencia I_{REF} . La superficie de este interferómetro nunca está recubierta con material biológico. Sobre el otro interferómetro se realiza un inmunoensayo o se recubre con la sustancia biológica a detectar. Este interferómetro proporciona la señal de salida que a la que nos referiremos con el símbolo I_{OUT} . Las señales I_{REF} e I_{OUT} pueden ser tomadas a la vez o secuencialmente. Las señales de estos

dos interferómetros pueden ser procesadas y combinadas de diferentes formas para proporcionar una única señal de transducción (figura 5.6 y figura 5.9). En las próximas secciones se describen y analizan en profundidad dos de ellas. Además se pone a prueba su rendimiento práctico sometiéndolas a diferentes validaciones experimentales.

Los valores que se han denominado como señal y denotado simbólicamente con la letra “ I ” son irradiancias espectrales captadas por algún tipo de sensor óptico tras la reflexión de la luz sobre la superficie del biosensor. Dependiendo del sistema utilizado podrían tener unidades de potencia por unidad de superficie y unidad de longitud de onda λ o potencia por unidad de superficie y unidad de número de onda k . Las irradiancias I_{REF} e I_{OUT} están afectadas por las reflectancias de los interferómetros que se han denominado como de referencia y de salida, de forma que, considerando que ambos interferómetros se iluminan con luz de idéntica composición espectral, en las simulaciones teóricas se considera:

$$\frac{I_{OUT}}{I_{REF}} = \frac{R_+}{R_-} \quad \text{Ecuación 5.3}$$

donde R_+ y R_- denotan respectivamente las reflectancias teóricas de los interferómetros de salida y de referencia.

5.2.1 La función de transducción PTPSA (Peak To Peak Signal Amplitude)

La figura 5.6 describe esquemáticamente la idea fundamental del IODM, que consiste en combinar las señales de dos interferómetros que miden simultáneamente. En particular, para obtener la función de transducción PTPSA se realizan dos procedimientos; en primer lugar, se realiza el cociente de las señales I_{OUT} e I_{REF} ; en segundo lugar, se mide la diferencia de valor entre un máximo y un mínimo contiguos de la función cociente en un intervalo espectral elegido.

En la figura 5.7 se representa la simulación teórica de la función cociente I_{OUT}/I_{REF} , que es igual al cociente de las reflectancias R_+ y R_- , para diferentes espesores de material biológico. Se representa también la magnitud PTPSA para un caso particular y las reflectancias para el biosensor con y sin recubrimiento de material biológico, con el típico desplazamiento lateral de la señal. La idea fundamental de este sistema de transducción consiste en aprovechar, a través del cociente, las diferencias absolutas de las señales en un intervalo espectral elegido.

Figura 5.6: Descripción esquemática del método de detección óptica interferométrica para función de transducción PTPSA

Figura 5.7: Simulación teórica de la función de transducción combinada PTPSA para un biosensor Fabry-Perot de 1000 nm de SiO_2 sobre Si

Véase por ejemplo que en el intervalo espectral que va desde los 14000 cm^{-1} hasta los 17000 cm^{-1} existen dos zonas contiguas en las que la señal del interferómetro sin recubrimiento sería mayor que la del interferómetro con recubrimiento por ser mayor su reflectancia y viceversa. Al hacer el cociente de las señales se obtienen mínimos y máximos sucesivos cuya diferencia de cota puede utilizarse como señal de transducción. Tanto en este caso, como en que se describirá en la siguiente sección, resultará crítica la elección de un intervalo espectral adecuado que maximice el valor de las funciones de transducción.

La figura 5.8 muestra el comportamiento de la función PTPSA con el cambio de espesor para un biosensor FP de 1000 nm de SiO_2 sobre Si en el intervalo espectral $[14000, 17000]\text{ cm}^{-1}$. Se observa que el comportamiento es lineal en el intervalo de espesores típicos de las capas de material biológico formadas en los inmunoensayos antígeno anticuerpo o los ensayos con biomoléculas pequeñas. Puede decirse que el comportamiento de la función es bastante lineal desde cero hasta el entorno de los 100 nm , lo que permitiría utilizar esta configuración de biosensor en la detección de grandes biomoléculas y algunos virus.

Figura 5.8: Simulación teórica del comportamiento de la función de transducción PTPSA con el aumento de espesor de material biológico para un biosensor FP de 1000 nm de SiO_2 sobre Si en el intervalo espectral $[14000, 17000]\text{ cm}^{-1}$

5.2.2 La función de transducción IROP (Increased Relative Optical Power)

En la figura 5.9 se observa una descripción esquemática del método de detección óptica interferométrica para la función de transducción IROP. En este caso se utiliza algún sistema de integración de la irradiancia espectral en un intervalo de números o longitudes de onda.

$$P = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} I(\lambda) d\lambda \quad \text{Ecuación 5.4}$$

$$P = \int_{k_1}^{k_2} I(k) dk \quad \text{Ecuación 5.5}$$

En la práctica esto puede realizarse mediante un detector que sólo capte señal en la banda espectral requerida. Tras este proceso, tendremos las potencias P_{REF} y P_{OUT} . A partir de estas potencias se define la función de transducción $IROP$.

$$IROP = 100 \cdot \left(\frac{P_{OUT}}{P_{REF}} - 1 \right) \quad \text{Ecuación 5.6}$$

Figura 5.9: Descripción esquemática del método de detección óptica interferométrica para la función de transducción IROP

A partir de este párrafo utilizaremos la integración sobre intervalos de número de onda para justificar el método utilizado para determinar teóricamente los valores de $IROP$. El razonamiento para longitudes de onda sería el mismo cambiando la variable de integración. Según acabamos de decir, el cociente P_{OUT} / P_{REF} puede expresarse como:

$$\frac{P_{OUT}}{P_{REF}} = \frac{\int_{k_1}^{k_2} I_{OUT}(k) dk}{\int_{k_1}^{k_2} I_{REF}(k) dk} \quad \text{Ecuación 5.7}$$

En la ecuación anterior las irradiancias I_{OUT} e I_{REF} que llegan al sensor óptico dependen de las reflectancias R_+ y R_- de los biosensores de salida y de referencia, así como de la

composición espectral de la luz incidente. Suponiendo que la función que describe esta composición espectral sea, con suficiente aproximación, constante en el intervalo de integración, la ecuación 5.7 puede sustituirse por:

$$\frac{P_{OUT}}{P_{REF}} = \frac{\int_{k_1}^{k_2} R_+(k) dk}{\int_{k_1}^{k_2} R_-(k) dk} \quad \text{Ecuación 5.8}$$

donde R_+ y R_- denotan respectivamente las reflectancias teóricas de los interferómetros de salida y de referencia.

Sustituyendo en la definición de $IROP$ de la ecuación 5.6:

$$IROP = 100 \cdot \left(\frac{\int_{k_1}^{k_2} R_+(k) dk}{\int_{k_1}^{k_2} R_-(k) dk} - 1 \right) \quad \text{Ecuación 5.9}$$

Esta expresión permitirá realizar predicciones teóricas que conduzcan a la optimización de la respuesta del sistema.

Figura 5.10: Reflectancias teóricas de los interferómetros de referencia y de salida de capa de 1000 nm de SiO₂ sobre silicio para diferentes espesores de capa de material biológico de 5, 10, 15 y 20 nm. Se representan con líneas verticales verdes los límites de integración de la función $IROP$ en este caso [11890,13192] cm⁻¹.

La figura 5.10 ilustra la idea fundamental de la función $IROP$ de transferencia. Si se define un intervalo de integración adecuado para cada interferómetro de referencia, idealmente entre un mínimo y un máximo, los cambios de reflectancia producidos por

el recubrimiento de material biológico en un inmunoensayo harán que las potencias captadas por el interferómetro de salida y referencia sean diferentes. Si se utiliza una señal $I(k)$ en un intervalo de pendiente positiva como el de la figura 5.10 la señal $I_{OUT}(k)$, al desplazarse hacia la izquierda quedará por encima de la señal $I_{REF}(k)$ proporcionando un $IROP$ positivo. En caso de elegir una región de pendiente negativa, el $IROP$ sería negativo, lo cual no representaría ningún problema ya que en este caso lo importante son las variaciones absolutas de la magnitud. Si no existiera ningún desplazamiento, el $IROP$ sería nulo. Todas las afirmaciones que se realizan en este párrafo son válidas en la suposición de que los interferómetros de referencia y de salida son idénticos excepto por el posible recubrimiento de material biológico. En principio, son posibles configuraciones en las que los interferómetros sean diferentes. En ese caso, la señal cuando el interferómetro de salida no tenga recubrimiento tendrá un valor $[IROP]_0$. La definición de $IROP$ y el método para determinarlo teóricamente se pueden modificar añadiendo una corrección de cero.

$$IROP = \left[100 \cdot \left(\frac{P_{OUT}}{P_{REF}} - 1 \right) \right] - [IROP]_0 \quad \text{Ecuación 5.10}$$

$$IROP = \left[100 \cdot \left(\frac{\int_{k_1}^{k_2} R_+(k) dk}{\int_{k_1}^{k_2} R_-(k) dk} - 1 \right) \right] - [IROP]_0 \quad \text{Ecuación 5.11}$$

Figura 5.11: Variación teórica de la función de transducción de $IROP$ con el espesor de material biológico para un interferómetro de capa de 1000 nm de SiO_2 sobre silicio con un intervalo de integración $[11890, 13192] \text{ cm}^{-1}$

En la figura 5.11 se pueden observar los valores de la señal de $IROP$ teóricos para las curvas de la figura 5.10 en el intervalo de integración $[11890, 13192] \text{ cm}^{-1}$ y para señales diferenciales producidas por espesores crecientes de material biológico al que

se asigna el índice de refracción habitual de 1,42. En la gráfica grande se representan los valores teóricos para los primeros valores de espesor hasta 20 nm con el objetivo de mostrar la linealidad de esta señal de transducción en el entorno de tamaño de biomoléculas pequeñas. En la gráfica pequeña se muestra la falta de linealidad de la respuesta cuando los espesores superan los 100 nm. La figura 5.12 ilustra la razón por la que esta gráfica tiende a cero para valores grandes de espesor. Debido a cuasi-periodicidad de la respuesta espectrométrica de los interferómetros, cuando el desfase de señales corresponda aproximadamente a un semiperiodo, la señal de IROP tenderá a cero.

Figura 5.12: Reflectancias teóricas de los interferómetros de referencia y de salida de capa de 1000 nm de SiO₂ sobre silicio para diferentes espesores de capa de material biológico de 50, 100, 150 y 200 nm. Se representan con líneas verticales verdes los límites de integración de la función *IROP* en este caso [11890,13192] cm⁻¹.

5.3 Validación experimental de los modelos teóricos de cálculo de señales de transducción PTPSA e IROP

En esta sección van a mostrar los resultados de dos inmunoensayos con objetivo de validar el modelo de obtención de las señales de transducción PTPSA e IROP. A través de la comparación de los resultados del modelo con los experimentos se podrán además inferir propiedades del sistema físico que se estudia, en particular, el tamaño e índice de refracción de las capas de material biológico que se adhieren a la superficie del biosensor. En la descripción de los experimentos nos limitaremos a los detalles imprescindibles en la definición física del biosensor a través de los cuales lo relacionamos con el modelo. En un artículo publicado en la revista *Sensors* en 2014

están ampliamente tratados los aspectos relacionados con la fabricación de los biosensores y la funcionalización de su superficie, así como los detalles bioquímicos particulares de cada inmunoensayo [Holgado, 2014B].

Ambos experimentos se realizan sobre un apilamiento de capas sencillo, formado por una capa de 1012 nm de SiO₂ sobre silicio. El primero de los experimentos es un inmunoensayo indirecto BSA-AntiBSA, donde el antígeno, en la etapa de inmovilización, queda adsorbido por la superficie de SiO₂ del biosensor (Sección 2.5). En el segundo experimento es un inmunoensayo Antirotavirus-Rotavirus. En este caso, para inmovilizar los antígenos, se recubre la superficie de SiO₂ con una fina lámina de SU-8 de 18 nm tratada cuya superficie es atacada con ácido sulfúrico y posteriormente lavada favorecer la formación de enlaces covalentes con los biorreceptores (Sección 2.5). En ambos experimentos el método óptico de interrogación es espectroscópico, realizado con el equipo Bruker FT-IR Vertex 70 del Grupo de Investigación de Óptica, Micro-Nano-Fotónica y Biofotónica. Este equipo proporciona una señal $R(k)$ en el intervalo espectral de 10000 a 20000 cm⁻¹.

5.3.1 Inmunoensayo indirecto BSA/Anti-BSA

En la figura 5.13 se puede observar la respuesta experimental en el inmunoensayo BSA/AntiBSA para las dos señales de transducción propuestas en la sección anterior. En la figura 5.14 se representan los valores teóricos calculados de las señales de transducción IROP y PTPSA para espesores de material biológico entre 0 y 18 nm. Estas simulaciones se han realizado suponiendo un índice de refracción 1,4 para esta capa, utilizando los estudios experimentales disponibles para este tipo de moléculas [Voros, 2004], así como la experiencia del grupo en la simulación de respuestas ópticas en inmunoensayos.

Las respuestas ópticas experimentales obtenidas tras el proceso de inmovilización del antígeno BSA fueron IROP=2,8 y PTPSA=0,09. Estas respuestas serían proporcionadas en el modelo teórico por una capa de espesor ligeramente superior a 2,5 nm. Esta medida es compatible con las dimensiones reportadas para moléculas de este tipo en varias referencias bibliográficas, [Foley, 2007], [Peters, 1996], [Ferrer, 2001], [Sugio, 1999]. En particular, en [Ferrer, 2001], se modeliza la molécula del antígeno BSA, con su característica forma acorazonada [Foley, 2007], como un lámina cuya sección tiene forma de triángulo equilátero y espesor de 3 nm (figura 5.15).

La respuesta del biosensor se estudia a continuación para valores de concentración crecientes del anticuerpo anti-BSA. La saturación en la curva de reconocimiento se encuentra para una concentración de anti-BSA de 20 µg/mL.

Figura 5.13: Especificación del sensor para el inmunoensayo indirecto BSA/Anti-BSA y respuestas experimentales de las señales de transducción PTPSA e IROP

Figura 5.14: Simulaciones teóricas de las señales de transducción IROP y PTPSA para el inmunoensayo indirecto BSA/Anti-BSA

Con esta concentración las señales de transducción toman valores $IROP=19,7$ y $PTPSA=0,602$. Las simulaciones teóricas alcanzan estos valores cuando la capa de material biológico alcanza un espesor alrededor de 17 nm. Teniendo en cuenta el espesor calculado para el antígeno, obtendríamos una estimación para el espesor de la capa de anticuerpos entre 14 y 15 nm. Estos valores son compatibles con las dimensiones obtenidas experimentalmente para este tipo de moléculas [Sarma, 1971]. La figura 5.16 es una adaptación de la figura 8 del artículo mencionado, en el que se miden unas dimensiones máximas de 14,2 nm entre las zonas variables de reconocimiento del antígeno.

Figura 5.15: A> Modelo en forma de capa triangular del antígeno BSA con dimensiones (Adaptado de [Ferrer, 2001]) B> Modelo de antígeno HSA derivado de su estructura atómica (Adaptado de [Ferrer, 2001], a su vez adaptado de [Sugio, 1999])

Figura 5.16: Dimensiones de la molécula del anticuerpo $\gamma G1$ según el modelo trilobulado (contorno azul discontinuo) de Sarma et al [Sarma, 1971] obtenido a partir de difracción de rayos X

5.3.2 Inmunoensayo indirecto Rotavirus/Anti-rotavirus

En la figura 5.17 se muestra el esquema del biosensor que en este caso varía ligeramente con respecto al anterior debido a la inclusión de una fina capa de resina SU-8. Esta circunstancia provoca una diferencia de señal entre el interferómetro de

referencia y el de salida que podemos tener en cuenta como ajuste de cero. Los valores medidos para esta diferencia son IROP=29,6 y PTPSA=0,99. El modelo teórico predice valores ligeramente diferentes de las señales de transducción IROP=33,4 PTPSA=0,96. Esta discrepancia puede ser atribuida claramente a las incertidumbres existentes en las variables de espesor e índice de refracción del SU-8. En el caso del índice de refracción puede variar de forma importante con el espesor y el tipo de procesado que se realice para establecer la capa [Parida, 2009]. En la figura 5.18 se representa la función $n(\lambda)$ utilizada en el modelo teórico para determinar los valores de reflectancia.

Figura 5.17: Especificación del sensor para el inmunoensayo indirecto rotavirus/anti-rotavirus y respuestas experimentales de las señales de transducción PTPSA e IROP

El siguiente paso consiste en realizar un recubrimiento de la superficie de SU-8. Tras realizar este proceso se mide experimentalmente un aumento de la señal PTPSA de 0,89 y de la señal IROP de 21,3. Estos aumentos llevan a definir las siguientes señales de transducción con respecto a la referencia, PTPSA=1,88 IROP=50,9.

Figura 5.18: Índice de refracción del SU-8 utilizado en las simulaciones teóricas (www.microchem.com Processing Guidelines for SU-8 2000)

Figura 5.19: Simulaciones teóricas de la respuesta de la capa de material biológico de diferentes espesores e índices de refracción equivalentes para las funciones de transducción IROP y PTPSA

En la figura 5.19 se representan los datos de simulaciones del modelo teórico para diferentes espesores de capa de material biológico y diferentes índices de refracción. Una primera observación de las gráficas, nos lleva darnos cuenta de que el habitual índice de 1,42 que utilizamos para simular capas de proteínas lleva; para el caso de una capa de rotavirus cuyo espesor sería su diámetro característico, alrededor de 70 nm; a una respuesta de las señales de transducción muy superior a las medidas experimentalmente.

La interpretación que vamos a dar a esta discrepancia tiene que ver con dos circunstancias: por una parte, con el tamaño y forma muy diferente que tienen estas dos estructuras biológicas, y por otra, con la posibilidad de que tras el inmunoensayo la superficie del sensor no esté por completo cubierta de virus. Las dos van a ser tenidas en cuenta en el modelo a través del cambio de índice de equivalente de la capa.

En la figura 5.19 se representan también las curvas de variación de señal con el espesor para los índices de refracción equivalentes de 1,2 y 1,15. En el caso del índice de refracción 1,15, el incremento teórico de las funciones de transducción para $\Delta d_{bio}=70\text{nm}$ es $\Delta(\text{PTPSA})_{\text{Teo}}=0,67$ y $\Delta(\text{IROP})_{\text{Teo}}=18,5$, que no llega a los valores experimentales medidos, que recordemos que eran $\Delta(\text{PTPSA})_{\text{Exp}}=0,89$ y $\Delta(\text{IROP})_{\text{Exp}}=21,3$. Para el caso del índice de refracción 1,2, el incremento teórico de las funciones de transducción para $\Delta d_{bio}=70\text{nm}$ es $\Delta(\text{PTPSA})_{\text{Teo}}=0,94$ y $\Delta(\text{IROP})_{\text{Teo}}=25,5$, que sobrepasa los valores experimentales medidos. Para índice de refracción 1,175 $\Delta(\text{PTPSA})_{\text{Teo}}=0,8$ y $\Delta(\text{IROP})_{\text{Teo}}=21,9$.

Las sucesivas aproximaciones teóricas al modelo nos van a permitir, a través de un modelo volumétrico de definición de índices efectivos, estimar la densidad de virus adheridos a la superficie por unidad de área. Con este fin se realizan algunas hipótesis simplificadoras. En primer lugar supondremos que los virus se distribuyen uniformemente sobre los nodos de una red hexagonal con parámetro de red a , como la descrita en la sección 4.1. Aprovechamos la feliz circunstancia de que los rotavirus son esféricos para definir:

El volumen de una celda hexagonal como:

$$V_{cel} = \frac{\sqrt{3}}{2} a D_v \quad \text{Ecuación 5.12}$$

donde D_v es el diámetro del virus que actúa como altura de la celda.

El volumen del virus como:

$$V_v = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{D_v}{2} \right)^3 \quad \text{Ecuación 5.13}$$

El índice de refracción equivalente como:

$$n_{eq} = \sqrt{\left(\frac{V_v}{V_{cel}} \right) n_{bio}^2 + \left(\frac{V_{cel} - V_v}{V_{cel}} \right) n_{air}^2} \quad \text{Ecuación 5.14}$$

Se considera que n_{bio} es el índice de refracción de la esfera que constituye el virus. Sustituyendo el índice de refracción del aire por 1 la ecuación anterior se convierte fácilmente en:

$$n_{eq} = \sqrt{\left(\frac{V_v}{V_{cel}}\right)(n_{bio}^2 - 1) + 1} \quad \text{Ecuación 5.15}$$

Si consideramos conocidos el volumen del virus, su índice de refracción y el índice de refracción equivalente de la capa que forma podemos despejar el volumen de la celda en función de estos valores:

$$V_{cel} = \left(\frac{n_{bio}^2 - 1}{n_{eq}^2 - 1}\right) V_v \quad \text{Ecuación 5.16}$$

A partir de esta ecuación se obtiene el área de la celda hexagonal, simplemente dividiendo por el diámetro del virus que daba su espesor a la celda.

$$A_{cel} = \left(\frac{n_{bio}^2 - 1}{n_{eq}^2 - 1}\right) \frac{V_v}{D_v} \quad \text{Ecuación 5.17}$$

El parámetro de red o la distancia entre los centros de dos virus en nuestro modelo sería:

$$a_{cel} = \sqrt{\frac{2}{\sqrt{3}} \left(\frac{n_{bio}^2 - 1}{n_{eq}^2 - 1}\right) \frac{V_v}{D_v}} \quad \text{Ecuación 5.18}$$

Si sustituimos en la ecuación 5.18 el índice de refracción utilizado habitualmente para el material biológico 1,42, el diámetro de virus por 70 nm y los índices de refracción equivalentes por los que ajustan los datos experimentales, obtenemos para el índice de refracción de 1,15 una distancia entre virus de 96,6 nm y para índice de refracción de 1,2 una distancia entre virus de 82,7 nm. Los valores obtenidos reflejan que la superficie quedó prácticamente tapizada de rotavirus, quedando entre virus distancias de aproximadamente 20 nm.

Finalmente, se analizó la respuesta experimental en el inmunoensayo de reconocimiento del anticuerpo anti-AgR. Se observó saturación con concentraciones por encima de 10 µg/mL. En este nivel, los incrementos de las señales de transducción $\Delta(\text{PTPSA})_{\text{Exp}}=0,49$ y $\Delta(\text{IROP})_{\text{Exp}}=7,1$.

En la figura 5.20 se muestra una representación idealizada del proceso de reconocimiento de los anticuerpos, así como dos posibles modelizaciones del proceso.

Figura 5.20: Dos posibles modelizaciones teóricas de la fase de reconocimiento de anticuerpo

Cuando se utiliza el modelo A, en el que la capa que representa a los anticuerpos se superpone a la que representa a los virus, el cálculo teórico de las señales de transducción da resultados demasiado bajos y no reproducen los experimentales. Sin embargo, utilizando el modelo B, en el que la capa de anticuerpos está debajo de la que representa los virus, los resultados se acercan a los medidos, $\Delta(\text{PTPSA})_{\text{Teo}}=0,4022$ y $\Delta(\text{IROP})_{\text{Teo}}=10,5$. Aunque parece que en este caso habría que utilizar modelos más complejos para reproducir los datos experimentales, de estos resultados puede deducirse la existencia de una apreciable adsorción inespecífica de anticuerpos sobre la superficie de SU-8, ya que el modelo B se acerca más a lo observado.

5.3.2.1 Estimación de los límites de detección alcanzados en los experimentos

El límite de detección es la mínima concentración de soluto que un sistema analítico dado es capaz de detectar, distinguiéndola con fiabilidad razonable de una muestra sin analito presente (Véase sección 2.1.) En los experimentos descritos en las secciones anteriores, se realizó una estimación del valor del límite de detección de la señal de transducción IROP a través de la ecuación:

$$C_{LoD} = \frac{ku}{m} \quad \text{Ecuación 5.19}$$

donde u es la incertidumbre de la señal de transducción, k el factor de incertidumbre y m la sensibilidad analítica.

La incertidumbre en la señal de IROP se calculó a partir de la relación señal ruido siendo su valor estimado de $5,48 \cdot 10^{-4}$ unidades de IROP. Este valor se ensancha mediante el factor de incertidumbre $k=3$ (Véase sección 2.1.) de forma que en el numerador de la ecuación 5.19 se tiene el valor redondeado $17 \cdot 10^{-4}$ IROP. Esta cantidad se mantiene en todos los cálculos.

En la detección del anticuerpo anti-BSA se obtiene una sensibilidad analítica de 1,2 IROP/($\mu\text{g/mL}$) lo que conduce a través de la ecuación 5.19 a un límite de detección de 1,4 ng/mL.

En la detección del anticuerpo anti-rotavirus se obtiene una sensibilidad analítica de 0,9 IROP/($\mu\text{g/mL}$) lo que conduce a través de la ecuación 5.19 a un límite de detección de 1,8 ng/mL.

6 APLICACIÓN DE MODELOS DE MEDIO ESTRATIFICADO A LA OBTENCIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS ESTRATOS A PARTIR DE CURVAS EXPERIMENTALES $R(\lambda)$ Y $R(\theta)$

En los capítulos 4 y 5 se ha utilizado el modelo analítico de propagación de ondas electromagnéticas en medios estratificados, descrito en el capítulo 3, de forma directa, con el objetivo de realizar predicciones relativas al comportamiento de diferentes sistemas de biosensado óptico. El problema, hasta este momento, consiste en encontrar las curvas de reflectancia de un sensor, o la intensidad que refleja en un intervalo espectral, a partir de un conjunto de parámetros conocidos, básicamente espesores e índices de refracción de materiales. En los capítulos mencionados se extrapolan propiedades ópticas del sistema mediante ensayos sucesivos de parámetros hasta alcanzar los mejores ajustes con las respuestas experimentales.

En este capítulo se utiliza el citado modelo analítico en la resolución del problema inverso: la obtención de un conjunto de parámetros que caracterizan al biosensor a través de las curvas experimentales que suministra; en nuestro caso, las reflectancias $R(\lambda)$ y $R(\theta)$. Los parámetros a averiguar son los índices de refracción y espesores que caracterizan a determinadas capas de material.

La solución del problema inverso puede facilitar, por ejemplo, las características ópticas en cuanto a espesor e índice de refracción de las capas externas de resina SU-8 de los biosensores, que pueden variar con los diferentes procesados o espesores [Parida, 2009]. Con datos experimentales de suficiente calidad, la solución del problema inverso permitiría caracterizar la capa de material biológico que detecta el biosensor en cuanto a su espesor y parámetros ópticos.

La técnica para solucionar este problema, el ajuste por mínimos cuadrados, es conocida, y existen funciones dentro del entorno de programación Matlab® que se ha utilizado en esta Tesis, que lo resuelven a través de diferentes algoritmos. En la siguiente sección se describen someramente algunas características del método con el objetivo de aclarar el tipo de problema que queremos resolver y las características que tendrá esta solución.

En las secciones 6.3 y 6.4 se analizan conjuntos reales de curvas de espectrometría y reflectometría de perfiles de haz procedentes de diferentes inmunoensayos para mostrar la capacidad de la técnica de ajuste por mínimos cuadrados para caracterizar propiedades de las capas de material biológico formadas en los mismos.

6.1 El problema de ajuste por mínimos cuadrados: características generales

En los ajustes por mínimos cuadrados tratamos de encontrar una función continua que ajuste lo mejor posible a unos datos experimentales. En nuestro caso, estos datos son reflectancias; que pueden variar con la longitud de onda de la luz incidente para un haz de luz que incide con ángulo fijo; o bien, con el ángulo de incidencia en un haz monocromático.

Tenemos por tanto un conjunto de n puntos (x_i, R_i) en los que R es la única variable dependiente cuyo valor se encuentra por observación. Nuestro objetivo es encontrar los valores de un conjunto de parámetros $\bar{\beta}$ tales que, introducidos en una función $f_R(x, \bar{\beta})$, ésta ajuste lo mejor posible a los valores experimentales (x_i, R_i) . La función f_R representa el conjunto de operaciones que realizamos para obtener la reflectancia de un medio estratificado según nuestro modelo descrito en el capítulo 3, es decir, es una función conocida salvo por un conjunto de parámetros. En resumen, la variable x representa longitud de onda o ángulo de incidencia y $\bar{\beta}$ representa un conjunto de m variables del modelo cuyo valor se pretende determinar para que la función ajuste a los datos experimentales. Estos parámetros son básicamente espesores y constantes ópticas que caracterizan a las capas.

En el método de los mínimos cuadrados se define el ajuste óptimo a través de la minimización de la cantidad llamada residuo:

$$S = \sum_{i=1}^n (R_i - f_R(x_i, \bar{\beta}))^2 \quad \text{Ecuación 6.1}$$

La condición de minimización del residuo se impone anulando la derivada con respecto a los diferentes parámetros obteniéndose m ecuaciones:

$$-2 \sum_{i=1}^n (R_i - f_R(x_i, \bar{\beta})) \frac{\delta f_R(x_i, \bar{\beta})}{\delta \beta_j} = 0 \quad j = 1, 2, \dots, m \quad \text{Ecuación 6.2}$$

Las condiciones expresadas en la ecuación 6.2 son comunes a todos los problemas de mínimos cuadrados. A partir de aquí, encontramos una primera división entre los métodos de mínimos cuadrados lineales y no lineales

Cuando podemos expresar la función f como una combinación lineal de funciones en la que los coeficientes son los parámetros a ajustar tenemos un problema de ajuste lineal por mínimos cuadrados.

$$f(x, \bar{\beta}) = \sum_{j=1}^m \beta_j \phi_j(x) \quad \text{Ecuación 6.3}$$

En un ajuste lineal por mínimos cuadrados; la solución es única, los métodos no son iterativos y no son necesarios un conjunto de valores iniciales para comenzar la solución del problema. La solución se obtiene generalmente a través de la resolución de un sistema de ecuaciones algebraico.

Este tipo de ajuste por mínimos cuadrados tiene aplicación en el análisis de datos de experimentos, en los que se relaciona la sensibilidad de un sensor con el desplazamiento de la posición de determinados extremos de la curva. La determinación de la posición de estos puntos en una curva experimental afectada por cierto ruido se puede realizar ajustando polinomios de diferente orden a las zonas donde se observan los máximos o mínimos locales.

Sin embargo, en el caso que nos ocupa en este capítulo, queremos ajustar variables de unas funciones, $R(\lambda)$ y $R(\theta)$, cuya dependencia con los parámetros de espesor e índice de refracción no siguen la ecuación 6.3, por lo que tenemos que utilizar técnicas de ajuste por mínimos cuadrados no lineales.

Existen diferentes algoritmos que permiten resolver el problema del ajuste no lineal por mínimos cuadrados. Sin embargo, todos estos algoritmos tienen en común la elección de unos valores iniciales para el conjunto de parámetros $\bar{\beta}$. Estos valores se refinan posteriormente de forma iterativa por sucesivas aproximaciones.

$$\beta_j \approx \beta_j^{k+1} = \beta_j^k + \Delta\beta_j^k \quad \text{Ecuación 6.4}$$

En la expresión anterior k se refiere al número de iteración. En los algoritmos de ajuste no lineal por mínimos cuadrados más utilizados (Gauss-Newton, Levenberg-Marquardt), en cada iteración, los incrementos de la función del modelo se linealizan mediante una aproximación de Taylor de primer orden en cada punto del conjunto de datos.

$$f_R(x_i, \bar{\beta}) = f_R(x_i, \bar{\beta}^k) + \sum_{j=1}^m \frac{\delta f_R(x_i, \beta^k)}{\delta \beta_j} (\beta_j^{k+1} - \beta_j^k) \quad \text{Ecuación 6.5}$$

o bien:

$$f_R(x_i, \bar{\beta}) = f_R(x_i, \bar{\beta}^k) + \sum_{j=1}^m J_{ij} \Delta\beta_j^k \quad \text{Ecuación 6.6}$$

donde:

$$J_{ij} = \frac{\delta f_R(x_i, \beta^k)}{\delta \beta_j} \quad \text{Ecuación 6.7}$$

Sustituyendo la ecuación 6.6 en la ecuación 6.2 se obtiene:

$$-2 \sum_{i=1}^n \left(R_i - f_R(x_i, \beta^k) - \sum_{j=1}^m J_{ij} \Delta \beta_j^k \right) \frac{\delta f_R(x_i, \bar{\beta})}{\delta \beta_j} = 0 \quad j = 1, 2, \dots, m \quad \text{Ecuación 6.8}$$

o bien:

$$-2 \sum_{i=1}^n J_{ij} \left(\Delta R_i - \sum_{j=1}^m J_{ij} \Delta \beta_j^k \right) = 0 \quad j = 1, 2, \dots, m \quad \text{Ecuación 6.9}$$

donde:

$$\Delta R_i = R_i - f_R(x_i, \beta^k) \quad \text{Ecuación 6.10}$$

La ecuación 6.9 permite construir un conjunto de ecuaciones algebraicas que pueden resolverse para conseguir los valores de las incógnitas $\Delta \beta_j^k$ correspondientes a cada iteración. Para ello necesitamos suministrar un conjunto de valores iniciales de los parámetros $\bar{\beta}^k$ que nos permitan calcular J_{ij} y ΔR_i . Conocidos $\bar{\beta}^k$ y $\Delta \beta_j^k$ la ecuación 6.4 nos conduce al conjunto de parámetros $\bar{\beta}^{k+1}$. Este proceso se repite, en el caso de que las iteraciones converjan, hasta alcanzar la solución. En este caso, el proceso de iteración tiene que ser interrumpido mediante algún tipo de criterio de convergencia relacionado, bien con la progresiva disminución de los incrementos relativos de los valores de los parámetros $\bar{\beta}^k$, bien con la estabilización del valor de residuo cuadrático definido en la ecuación 6.1. La convergencia es más probable si los valores iniciales de los parámetros a determinar están cercanos a la solución. Es importante señalar que en un ajuste no lineal por mínimos cuadrados existe la posibilidad de que diferentes conjuntos de parámetros conduzcan a la solución, es decir a un ajuste óptimo sobre los datos experimentales.

6.2 Resolución de problemas de determinación de propiedades ópticas de capas de material en el entorno Matlab

La implementación práctica la resolución de los problemas que se describirán en las próximas secciones ha sido realizada en el entorno matemático de programación Matlab®, como se indicó en la introducción de este capítulo. La función utilizada es `lsqcurvefit`, que resuelve el problema no lineal de la minimización de la función de residuo definida en la ecuación 6.1. Se escribe a continuación su forma más sencilla:

```
x=lsqcurvefit(fun,x0,xdata,ydata)
```

Se observa que la función requiere, como mínimo, cuatro parámetros de entrada:

- “*fun*” representa el nombre de la función pre-programada que tiene que ajustarse a los datos experimentales. Posteriormente se describen los requerimientos en la construcción de esta función.
- “*x0*” representa el conjunto de valores iniciales que dan inicio a la resolución del problema.
- “*xdata*” “*ydata*” representan las coordenadas del conjunto de datos experimentales a que hay que ajustar la función.

Cuando se aborda el problema de determinar espesores y propiedades ópticas de capas, generalmente se tiene información sobre los valores aproximados de los espesores e índices de refracción de las mismas, de forma que pretendemos es determinar estos parámetros con mayor precisión. No se ha observado en los problemas abordados que haya dificultades en la convergencia a una solución, sin embargo, lo que si se observa es la existencia de varias combinaciones posibles de espesores e índices de refracción que ajustan satisfactoriamente a los datos experimentales, es decir la existencia de varias soluciones. El dominio de existencia de soluciones puede restringirse mediante dos parámetros de entrada adicionales que imponen que la solución esté dentro de determinados intervalos.

```
x=lsqcurvefit(fun,x0,xdata,ydata,lb,ub)
```

Estos parámetros son:

- “*lb*” *lowerbounds* o mínimos valores de los parámetros de la solución.
- “*ub*” *upperbounds* o máximos valores de los parámetros de la solución.

Adicionalmente, a través de la variable de tipo estructura “*options*” y la función `optimset` pueden especificarse otros parámetros que fijan la forma utilizada por la función para encontrar la solución.

Con respecto a los parámetros de salida, en su forma más sencilla, “x” es la solución del problema, y representa el conjunto de parámetros que hacen que la función ajuste de forma óptima. Además de la solución, como argumentos de salida, la función puede suministrar una serie de parámetros relacionados con la forma en la que ésta se ha obtenido; como los valores del residuo, “*Residual*”; o la razón por la que se han interrumpido las iteraciones, “*Exitflag*”. Este último parámetro es particularmente importante, ya que nos informa sobre si se han interrumpido las iteraciones debido a algún criterio de convergencia, o por otras razones, por ejemplo porque se han superado un máximo número de iteraciones establecidas.

La función `lsqcurvefit` requiere la construcción de una función específica de Matlab para cada problema que se resuelve. Su cabecera es:

```
function F = myfun(x,xdata)

F = ...

% Compute function values at x
```

En la función aparecen como argumentos de entrada:

- “x” que representa al conjunto de parámetros que se pretende averiguar, que en la primera iteración serían “x0”.
- “xdata” que representa la variable independiente de la función, en nuestro caso, si la función es una reflectancia, los ángulos o las longitudes de onda de que depende.

Para utilizar `lsqcurvefit`, la función que se construye, y con la se realizan las iteraciones tiene que tener como únicos argumentos de entrada los mencionados. El vector “x” de los datos que queremos averiguar se refiere a un número limitado de parámetros de los que depende la función real. El resto de parámetros de los que depende la función serán definidos en la programación como constantes. Por esta razón, cada problema que se aborda, requiere de la construcción de una función particular.

6.3 Ejemplo de caracterización de propiedades físicas de sistemas de capas apiladas a partir de curvas de espectrometría en inmunoensayos

En esta sección se van a utilizar dos conjuntos de curvas de espectrometría que corresponden a dos inmunoensayos indirectos realizados con proteínas marcadoras de la enfermedad de ojo seco ANXA1A y ANXA1B y sus anticuerpos. Estos inmunoensayos

son parte de un estudio más amplio de los biomarcadores de esta enfermedad que están siendo realizados por el Grupo de Óptica Micro-Nanofotónica y Biofotónica [Laguna, 2014 y 2015]. Las curvas de espectrometría se adquirieron con el equipo Bruker-FTIR del grupo referido en otros puntos de este trabajo (Sección 2.6) y se realizaron sobre un apilamiento de capas consistente en una capa de SU-8 de aproximadamente 200 nm sobre silicio. Cada una de las curvas corresponden las diferentes fases del inmunoensayo que incluye: una curva de referencia de la respuesta del sistema tras la catálisis ácida (Sección 2.5), una curva de referencia de la respuesta del sistema una vez alcanzada la saturación en el proceso de inmovilización de una proteína antígeno específico, y finalmente, las curvas de respuesta para diferentes saturaciones de concentración de anticuerpo. Con el fin de plantear más claramente el problema, sólo se realiza una medición para cada una de las situaciones expuestas anteriormente, es decir, solo hay una curva asociada a cada una de ellas. El objetivo es determinar, a través de estas curvas, propiedades físicas del sistema físico formado por estas capas.

En la figura 6.1 se pueden observar los resultados de estos experimentos. Las curvas obtenidas están referidas o normalizadas a la reflectancia del silicio.

En la figura 6.2 se observan las curvas de respuesta para los dos tipos de parejas proteína/anticuerpo. En una de ellas, el desplazamiento de la señal es muy inferior. Dado que las dos proteínas tienen características muy similares, el hecho de que el desplazamiento sea menor no puede atribuirse al tamaño de la proteína. Demostraremos, a través del estudio que se muestra a continuación, que esta señal tan baja puede atribuirse a un insuficiente recubrimiento de la misma en la fase de inmovilización.

En primer lugar se caracteriza la capa de SU-8 tras la catálisis ácida con el objetivo de determinar su espesor y dos parámetros de caracterizan la dependencia de su índice de refracción con la longitud de onda según la ecuación 6.11, que es una aproximación por truncamiento a la ecuación empírica de Cauchy.

$$n(\lambda) = B + \frac{C}{\lambda^2} \quad \text{Ecuación 6.11}$$

Figura 6.1: Curvas de espectrometría de los inmunoensayos indirectos realizados con los anticuerpos pares Anxa1A / Anti-Anxa1A y Anxa1B /Anti-Anxa1B

Figura 6.2: Curvas de respuesta en la fase de reconocimiento del inmunoensayo con Anti-Anxa1A (superior) y Anti-Anxa1B (inferior)

Además de los parámetros mencionados, se ajusta un cuarto factor que permite adaptarse al hecho de que los máximos de los datos experimentales toman valores diferentes. Este factor multiplica a la reflectancia teórica relativa al silicio, que de otro modo, para una monocapa de cualquier material sobre silicio, tendría sus máximos en el valor unidad (véase sección 3.6).

Con el fin de que los ajustes por mínimos cuadrados tomen un tiempo de computación razonable, estos ajustes se realizan sobre curvas suavizadas sobre las que se realiza una interpolación para reducir el número de datos.

Figura 6.3: Ajuste a los datos experimentales suavizados para curva “Ref” del inmunoensayo con Anxa1A

Los ajustes se realizaron para las curvas de referencia “Ref” correspondientes a los dos experimentos de la figura 6.1. En ninguno de los casos se constriñe excesivamente el intervalo en que el ajuste busca la solución, dejando, por ejemplo, este intervalo en cuanto a espesores entre 150 y 250 nm, y en cuanto a valores de B entre 1.5 y 1.8. En cuanto a los valores iniciales que se introducen en el ajuste, se realizan varias pruebas que conducen a soluciones ligeramente diferentes, pero que mantienen las tres primeras cifras significativas tanto del espesor como de la constante B. La constante C varía más, pero conduce a variaciones muy pequeñas del índice de refracción con la longitud de onda. Se indican a continuación los valores de los ajustes mencionados para cada uno de los experimentos. En figura 6.3 se observa la calidad del ajuste para una de las proteínas.

- Curva Anxa1A: $D_{SU8} = 196,4\text{nm}$, $B = 1,623$ y $C = 1816$
- Curva Anxa1B: $D_{SU8} = 198,6\text{nm}$, $B = 1,615$ y $C = 1423$

Estos resultados permiten afirmar que el método ajuste por mínimos cuadrados permite determinar las pequeñas variaciones de espesor en las capas de SU-8 de los biosensores en el entorno de nanómetro, así como las tres primeras cifras significativas de su índice de refracción. Los parámetros obtenidos sirven para definir las funciones específicas que nos permitirán, a partir de las otras curvas del experimento, averiguar características de las capas biológicas que impregnen el biosensor.

6.3.1 Estimación del espesor de la capa de proteína Anxa1B en la fase de inmovilización del inmunoensayo

Ahora se trata de estudiar la curva referida como “RefProte” en la figura 6.1. Esta curva corresponde al proceso de inmovilización de la proteína por adsorción sobre la superficie de SU-8.

Supondremos que la superficie está saturada de proteínas. En este caso, en principio, trataríamos de averiguar el espesor e índice de refracción de esta capa proteica, y por tanto, estas son las variables a encontrar en el ajuste de mínimos cuadrados. Se utilizan para la capa de SU8 los resultados obtenidos en la sección anterior para los experimentos con esta proteína.

Figura 6.4: Conjunto de pares de valores matemáticamente válidos para el ajuste por mínimos cuadrados del espesor e índice de refracción de una capa de proteínas

Se utilizan como restricción a los datos, valores razonables del espesor de la capa, relacionados con las dimensiones típicas de las proteínas, 2 a 9 nm, e índices de refracción, prácticamente sin restricción, 1 a 1,6. Finalmente se procede a la búsqueda de parámetros de ajuste partiendo de diferentes valores iniciales. El resultado puede observarse en la figura 6.4. Existen múltiples soluciones que conducen a un ajuste perfecto con la curva de los datos experimentales. En estas soluciones, los aumentos de espesor se traducen en disminución del índice de refracción y viceversa. Sin embargo, no todos los índices de refracción son posibles para una proteína de estas características. Existen estudios experimentales [Voros, 2004] que indican que una proteína de este peso molecular (37 kD) debe formar capas con un índice de refracción entre 1,42 y 1,47. Esta limitación conduce a que el espesor la capa solo pueda tomar

valores en la mitad superior del intervalo entre 5 y 6 nm. En la figura 6.4 se señalan gráficamente estos intervalos.

6.3.2 Estimación de la fracción de área ocupada por la proteína Anxa1A en la fase de inmovilización del inmunoensayo

Como se indicó anteriormente, aparentemente, la señal que produce la el anticuerpo Anti-Anxa1A en el inmunoensayo es anómalamente baja. Cuando se realizan ajustes por mínimos cuadrados a la curva referida como “RefProte” de la Anxa1A, fijando el espesor de la capa proteica en el rango definido en la sección anterior, se obtienen valores de índice de refracción bajos. Por ejemplo, cuando se fuerza al ajuste por mínimos cuadrados a que la capa de proteína tenga 5.5 nm el índice de refracción que ajusta a la curva es de 1.306. Este índice está muy por debajo del esperable para una capa saturada proteína de este peso molecular. Podemos utilizar el concepto de índice de refracción equivalente definido en el capítulo 4 para tratar de estimar la fracción de área ocupada por las proteínas.

$$n_{eq}^2 = \frac{A_+}{A} n_+^2 + \left(1 - \frac{A_+}{A}\right) n_{air}^2 \quad \text{Ecuación 6.12}$$

En la ecuación 6.12, A_+/A representa la fracción de superficie ocupada por las proteínas, n_+ es el índice de refracción de una capa saturada (típicamente 1.45) y n_{eq} el índice de refracción medido a través del ajuste por mínimos cuadrados. Despejando la fracción de superficie ocupada:

$$\frac{A_+}{A} = \frac{n_{eq}^2 - 1}{n_+^2 - 1} \quad \text{Ecuación 6.13}$$

Introduciendo los valores mencionados en los últimos párrafos en última ecuación obtenemos 64% para la fracción de superficie ocupada por la proteína en este experimento. Recordemos que para una red hexagonal de círculos la máxima compactación sería del 90 %. Si los cálculos se repiten para diferentes espesores de proteína en el entorno del tamaño estimado en la sección anterior se obtiene: 58% en el caso de 6 nm de espesor de capa de proteína y 70% en el caso de 5 nm.

6.3.3 Estimación del espesor de la capa de anticuerpo Anti-Anxa1B en la fase de reconocimiento del inmunoensayo

En las secciones anteriores se han utilizado las dos primeras curvas experimentales de los inmunoensayos de la figura 6.1. La primera ha sido utilizada para caracterizar la

capa de SU-8 del biosensor en cuanto a su espesor e índice de refracción. La segunda, dada la multiplicidad de pares índice/espesor que son soluciones matemáticas del ajuste por mínimos cuadrados, ha sido utilizada para estimar el espesor, acotando el índice de refracción de la capa en valores razonables y suponiendo que ésta está completamente saturada para el caso de la proteína Anxa1B. En el caso de la proteína Anxa1A, el estudio sirve para atribuir la baja respuesta en el inmunoensayo a un insuficiente recubrimiento de proteína.

En esta sección, utilizamos las curvas de espectrometría correspondientes a la fase de reconocimiento del inmunoensayo para el anticuerpo Anti-Anxa1B. Estas curvas corresponden a la respuesta del biosensor a seis diferentes concentraciones (2, 5, 10, 20, 50, 100 ppm) de anticuerpo hasta observar saturación. El objetivo es determinar el espesor de la capa de anticuerpo. Como en el caso de la capa de antígeno, existen múltiples pares índice/espesor que ajustan perfectamente las curvas del modelo a los datos experimentales. En este caso se utiliza como estrategia el forzar un valor de espesor, a través de los parámetros *lowerbounds/upperbounds*, para que el ajuste encuentre libremente un índice de refracción equivalente para cada una de las curvas asociadas a las concentraciones. Este índice de refracción debería tender a un valor razonable cuando se alcanza la saturación.

En la figura 6.5 se representan los índices de refracción equivalentes obtenidos en el ajuste para cada concentración y para cuatro diferentes espesores de capa de anticuerpo.

Se observa que los índices equivalentes van creciendo hasta llegar a la saturación. Se ha señalado con una franja azul el intervalo de índices de refracción medidos en capas saturadas de anticuerpo IgG de peso atómico 150 kD [Voros, 2004]. Se observa que los espesores de 7 y 8 nm conducen a índices que en la saturación sobrepasan los límites superiores del intervalo mencionado. Cuando se fuerza al ajuste por mínimos cuadrados a que la capa tenga 10 nm, el índice máximo calculado yace justo en mitad del intervalo.

Con estos resultados puede concluirse que el espesor de esta segunda capa de material biológico podría ser de 10 u 11 nm. Sumados a los 5 o 6 nm del antígeno, calculados en la sección anterior, obtenemos unas dimensiones para la capa de material biológico tras el inmunoensayo entre 15 y 17 nm, similares con las estimadas en la sección 5.3.1 para en sistema antígeno anticuerpo BSA/Anti-BSA, con el método IROP.

Estas dimensiones son compatibles con las dimensiones de este tipo de moléculas que se han podido encontrar en la bibliografía (figura 5.15 y figura 5.16).

Figura 6.5: Determinación de índices de refracción equivalentes para diferentes concentraciones en la fase de reconocimiento del inmunoensayo con Anti-Anxa1B y diferentes espesores de capa de material biológico

6.4 Ejemplo de caracterización de propiedades físicas de sistemas de capas apiladas a partir de curvas de espectrometría y reflectometría de perfiles de haz

En esta sección se van a utilizar dos conjuntos de curvas de espectrometría y dos conjuntos de curvas de reflectometría de perfiles de haz para las polarizaciones P y S (véase sección 2.6), que corresponden a dos inmunoensayos indirectos realizados con proteína BSA y su anticuerpo. La espectrometría fue realizada con el instrumento Bruker-FTIR mencionado en la sección anterior. La reflectometría de perfiles de haz se realizó con el instrumento n-Gauge construido por la empresa Nightingale-EOS (<http://www.n-eos.com/>) adquirido recientemente por Grupo de Óptica Micro-Nanofotónica y Biofotónica. En este instrumento de medida, un haz láser de 637 nm de longitud de onda es enfocado sobre la muestra mediante un objetivo Leica 150x, de apertura numérica 0.95, produciendo un haz reflejado de 70° de apertura angular que es recogido por un detector CCD de alta resolución. El diámetro del punto focal donde incide el haz es sub-micrométrico del orden de 600 nm. Pueden encontrarse más detalles técnicos de este instrumento en un Proyecto Fin de Master [Soler, 2014] y en un artículo publicado recientemente, [Casquel, 2015] en el que se analiza la viabilidad de utilizar esta técnica para el biosensado.

Figura 6.6: Datos de espectrometría en un inmunoensayo indirecto BSA/AntiBSA sobre una capa de aproximadamente 1200 nm de SU-8 sobre Si

Figura 6.7: Datos de espectrometría en un inmunoensayo indirecto BSA/AntiBSA sobre una capa de aproximadamente 1700 nm de SU-8 sobre Si

El ensayo se realizó sobre dos apilamientos de capas diferentes consistentes en capas de SU-8 sobre silicio. La capa de SU-8 tenía un espesor que, en principio, se considera en el entorno de 1200 nm y 1700 nm para cada uno de los dispositivos detectores. Es uno de los objetivos de esta sección determinar con precisión los espesores e índices de refracción en ambos casos. Se utilizarán datos de los dos instrumentos

mencionados y se compararán los resultados obtenidos en cuanto a la caracterización del espesor de la capa SU-8.

En este caso la espectrometría se realizó mediante la repetición de 7 medidas para cada concentración. Para realizar el ajuste por mínimos cuadrados las medidas brutas del instrumento se suavizaron y se calculó una señal media de las 7 repeticiones. La figura 6.6 y la figura 6.7 muestran estos conjuntos de curvas.

La reflectometría también se realiza mediante la repetición de 7 medidas para cada concentración. En la figura 6.8 se observa un ejemplo de salida bruta (promediada para las 7 medidas) del instrumento n-gauge para la polarización P y el biosensor 1700. Con la configuración óptica actual del instrumento, éste se ve afectado por un ruido de *speckle* entre otros. El ruido de *speckle* es consecuencia de la monocromaticidad y coherencia del haz láser y es originado por la mutua interferencia de los frentes de onda originados por las reflexiones difusas sobre las superficies. Además del ruido, las posibles faltas de perpendicularidad de la muestra con respecto al eje óptico del sistema tienen como consecuencia que las señales reflejadas no sean simétricas. Afortunadamente, el instrumento de medida n-gauge suministra, además de la señal bruta, una señal suavizada en la que desaparece el ruido de *speckle* y corregida por el efecto de la falta de perpendicularidad.

El resultado final de estas correcciones puede apreciarse en la figura 6.9. Las curvas corregidas calculadas por el programa interno del instrumento son prácticamente simétricas y no se aprecia en ellas ningún tipo de ruido. Los cálculos que se realizarán en esta sección se harán utilizando estas curvas.

La figura 6.10 y la figura 6.11 son las salidas de instrumento para la polarización S del biosensor 1700. Las salidas para el biosensor 1200 se han condensado en la figura 6.12.

Un extenso estudio sobre los diferentes tipos de filtrado y suavizado que pueden realizarse sobre este instrumento de medida puede encontrarse en el Trabajo Fin de Máster que ya ha sido mencionado [Soler, 2014].

El tamaño sub-micrométrico del *spot* focal hace que en la ejecución de un inmunoensayo sea difícil medir siempre sobre el mismo punto del sensor para las diferentes concentraciones. Como consecuencia, las medidas se pueden verse afectadas por las variaciones laterales de espesor de SU-8 o de recubrimiento de material biológico.

Figura 6.8: Medidas brutas del instrumento n-gauge en un inmunoensayo indirecto BSA/AntiBSA sobre una capa de aproximadamente 1700 nm de SU-8 sobre Si para la polarización P

Figura 6.9: Medidas corregidas del instrumento n-gauge en un inmunoensayo indirecto BSA/AntiBSA sobre una capa de aproximadamente 1700 nm de SU-8 sobre Si para la polarización P

Figura 6.10: Medidas brutas del instrumento n-gauge en un inmunoensayo indirecto BSA/AntiBSA sobre una capa de aproximadamente 1700 nm de SU-8 sobre Si para la polarización S

Figura 6.11: Medidas corregidas del instrumento n-gauge en un inmunoensayo indirecto BSA/AntiBSA sobre una capa de aproximadamente 1700 nm de SU-8 sobre Si para la polarización S

Figura 6.12: Medidas corregidas del instrumento n-gauge en un inmunoensayo indirecto BSA/AntiBSA sobre una capa de aproximadamente 1200 nm de SU-8 sobre Si

6.4.1 Caracterización de capas de SU-8 de los biosensores a partir de curvas de espectrometría y reflectometría

Para caracterizar físicamente las capas de SU-8 de los biosensores se analizan las curvas correspondientes a la catálisis ácida de los experimentos.

Cuando se utilizan los datos de espectrometría, se obtienen los mejores ajustes para espesores alrededor de 1288 nm y 1872 nm, respectivamente, para los biosensores de menor y mayor espesor. Durante el ajuste se determina además los parámetros de la función que define el índice de refracción en el intervalo de longitudes de onda del ajuste. En la figura 6.13 y la figura 6.14 puede observarse el resultado de los ajustes mencionados. La diferencia de índices de refracción calculados en los biosensores puede atribuirse pequeñas diferencias en el procesado de los biosensores o al diferente efecto del mismo tipo de procesado (Véase sección 2.3) sobre capas de diferentes espesores. Los resultados, en cuanto a índice de refracción, son compatibles con las medidas experimentales de este parámetro que se han encontrado en la bibliografía [Borreman, 2002], [Parida, 2009], [www.microchem.com], si bien, en el caso del biosensor de más espesor, parecen un poco bajas.

Con los datos de reflectometría, cuando se permite el ajuste libre de las variables de espesor e índice de refracción, se obtienen los siguientes resultados:

Figura 6.13: Ajustes e índice de refracción calculado para la curva de espectroscopia en el biosensor de aproximadamente 1200 nm de SU-8 sobre Si

Figura 6.14: Ajustes e índice de refracción calculado para la curva de espectroscopia en el biosensor de aproximadamente 1700 nm de SU-8 sobre Si

- En el biosensor de menor espesor, el mejor ajuste para la polarización P ocurre para espesor de 1247 nm e índice de refracción 1,597, mientras que para la polarización S el espesor sería de 1262 nm e índice de 1,579.
- En el biosensor de mayor espesor, el mejor ajuste para la polarización P ocurre para espesor de 1743 nm e índice de refracción 1,632, mientras que para la polarización S el espesor sería de 1770 nm e índice de 1,606.

Existe una discrepancia importante entre los valores de espesor e índice de refracción obtenidos a partir del análisis de las curvas de espectrometría y reflectometría. En el caso del biosensor de menor espesor, entre dos y cuatro decenas de nanómetros. En el caso del biosensor de mayor espesor la discrepancia llega a 100 nm. Los índices de refracción son altos ya que para la longitud de onda 637 nm en ningún caso el índice de refracción el valor 1,6 en las medidas experimentales a que se ha tenido acceso y que se mencionaron anteriormente. Se considera que la discrepancia observada es debida a que, en las curvas de reflectancia, estamos ajustando a una curva corregida que a su vez es un ajuste en el que se fijó el índice de refracción en un valor cercano a 1,6. El aumento de índice de refracción produce una infraestimación del valor de espesor de la capa.

6.4.2 Análisis de los inmunoensayos indirectos BSA/AntiBSA

En esta sección se analizarán los resultados de las medidas realizadas en los inmunoensayos mediante ajustes por mínimos cuadrados que siguen diferentes estrategias adaptadas a las características de los datos adquiridos.

En el análisis de los datos de espectrometría se ajustan las curvas a un modelo de tres capas, que de arriba abajo son: Material Biológico / SU-8 / Silicio. En este modelo, los valores de espesor e índice de refracción de la capa de SU-8 se fijan en los valores calculados en la sección anterior para la curva de catálisis ácida. Con respecto a la capa de material biológico, se fija su espesor en 20 nm, y se permite que el programa determine el índice de refracción que optimiza el ajuste con la curva. Debido a que la calidad de los datos del experimento no es tan buena como los de la sección 6.3, no se analiza por separado la fase de inmovilización, y se toma como referencia para las dos fases la curva de catálisis ácida. De esta forma construimos unas curvas de inmovilización/reconocimiento basadas en un índice de refracción equivalente.

Los resultados pueden observarse en la figura 6.15 y la figura 6.16 para los biosensores de menor y mayor espesor de capa de SU-8, respectivamente. En ambas gráficas se observa una tendencia a un índice de refracción en las concentraciones de saturación entre 1,40 y 1,45. La curva de reconocimiento tiene subidas y bajadas para

concentraciones bajas en ambos casos, siendo éstas más pronunciadas para el biosensor de mayor espesor de SU-8.

Figura 6.15: Variación de índice de refracción equivalente de una capa de material biológico de 20 nm en las etapas de inmovilización y reconocimiento del inmunoensayo indirecto BSA/AntiBSA, obtenido a partir de curvas de espectrometría para el biosensor con capa de 1288 nm de SU-8. (Se ha representado el incremento de concentración en la etapa de inmovilización a escala 10 veces menor)

Figura 6.16: Variación de índice de refracción equivalente de una capa de material biológico de 20 nm en las etapas de inmovilización y reconocimiento del inmunoensayo indirecto BSA/AntiBSA, obtenido a partir de curvas de espectrometría para el biosensor con capa de 1872 nm de SU-8. (Se ha representado el incremento de concentración en la etapa de inmovilización a escala 10 veces menor)

Debido a que en el proceso de adquisición de los datos de reflectometría, los ajustes que suministran la señal suavizada y corregida se realizaron a partir de un modelo sencillo de dos capas, en el análisis de los datos de reflectometría se tendrá que utilizar un modelo análogo. En este modelo se supone que sólo hay SU-8 sobre el silicio, y que el índice de refracción del SU-8 es el determinado para la curva de catálisis ácida en la sección anterior. La presencia de material biológico es delatada porque cuando se calcula el espesor de SU-8 para una curva asociada con una determinada concentración, éste será mayor que el calculado en la curva de catálisis ácida. Se ha denominado a esta diferencia de espesores anomalía de espesor, Δd_{bio} , y con esta notación se ha representado en las siguientes figuras.

En la figura 6.17 se muestra la mencionada anomalía de espesor para el inmunoensayo sobre el biosensor con menor espesor de SU-8. Se observan anomalías positivas con valor aproximado de 12 nm tras la fase de inmovilización y máximas en el entorno de 17 nm para la concentración de 10 ppm en la fase de reconocimiento. Para concentraciones bajas, la señal permanece por debajo del máximo de la fase de inmovilización, y sólo la supera para la concentración 10 ppm. Para concentraciones bajas de anticuerpo se observan las subidas y bajadas que ya se observaban en las curvas de espectrometría pero ahora su variación relativa es mayor. Esta situación puede ser originada por el tamaño sub-micrométrico de la región que explora ópticamente el instrumento de medición n-Gauge que lleva aparejada la dificultad de medir siempre sobre el mismo punto.

Figura 6.17: Anomalía de espesor producida por la presencia de material biológico en las etapas de inmovilización y reconocimiento del inmunoensayo indirecto BSA/AntiBSA, obtenido a partir de curvas corregidas de reflectometría para las polarizaciones P y S, y para el biosensor con capa de 1288 nm de SU-8. (Se ha representado el incremento de concentración en la etapa de inmovilización a escala 10 veces menor)

Figura 6.18: Anomalía de espesor producida por la presencia de material biológico en las etapas de inmovilización y reconocimiento del inmunoensayo indirecto BSA/AntiBSA, obtenido a partir de curvas corregidas de reflectometría para las polarizaciones P y S, y para el biosensor con capa de 1288 nm de SU-8. (Se ha representado el incremento de concentración en la etapa de inmovilización a escala 10 veces menor)

En la figura 6.18 se muestra la anomalía de espesor para el inmunoensayo sobre el biosensor con mayor espesor de SU-8. Como en el biosensor anterior, la presencia de material biológico produce anomalías de espesor positivas. En este caso, tanto la anomalía tras el proceso de inmovilización, como el valor a que tiende este parámetro en la saturación de la fase de reconocimiento, son más bajas que en el biosensor de menor espesor. Este hecho puede ser explicado porque el efecto relativo de la capa de material biológico es menor cuando mayor sea el espesor de la capa de SU-8 subyacente.

7 CONCLUSIONES GENERALES

- Se ha construido un conjunto de funciones y programas que permiten simular analíticamente en el entorno matemático de programación Matlab® la interacción de ondas electromagnéticas planas monocromáticas con medios compuestos por apilamientos horizontales de capas con diferentes espesores y constantes ópticas. El modelo de simulación se ha validado extensamente a lo largo de toda esta tesis comparando los valores de reflectancia teórica calculados con resultados experimentales propios del Grupo de Óptica Micro-Nanofotónica y Biofotónica obtenidos bajo diferentes tipos de interrogación óptica y sobre una amplia variedad de celdas biofotónicas. Además, mediante comparación con datos bibliográficos, se ha comprobado que el modelo, además de tener capacidad predictiva en lo que respecta a la reflectancia, también la tiene con respecto a las fases de las reflectancias complejas que predicen las variaciones de los ángulos elipsométricos.
- Se ha propuesto e implementado en el entorno matemático de programación Matlab® un modelo volumétrico de capas equivalentes que permite aproximar, combinándolo con el modelo mencionado en el punto anterior, la respuesta óptica espectral en cuanto a reflectancia y desplazamiento de máximos y mínimos para celdas biosensoras con estructuras recubiertas o no recubiertas con material biológico. El modelo y el conjunto de programas que lo implementa permite simular la respuesta de celdas biosensoras con diferentes composiciones, tipos de red bidimensional, parámetros de red, alturas o radios en el caso de que los pilares sean cilíndricos. El sistema permite además simular la respuesta de redes de pilares de secciones no cilíndricas.
- Se ha validado la capacidad predictiva del modelo mediante comparación con resultados experimentales propios del Grupo de Óptica Micro-Nanofotónica y Biofotónica para dos casos representativos. El primero es un sensor basado en redes de pilares resonantes en los que se alternan 21 capas de dióxido de silicio con nitruro de silicio que se ha utilizado como detector de variación de índice de refracción en el líquido que rellena el espacio entre pilares. El segundo sensor consiste en pilares de composición uniforme contruidos con SU-8 de los que se mide la respuesta sin ningún tipo de recubrimiento y tras alcanzar la saturación en un inmunoensayo. En ambos casos se consiguen coincidencias notables entre las medidas experimentales y las predicciones del modelo.
- La capacidad del modelo para realizar simulaciones rápidas y acertadas de la respuesta de celdas biosensoras ha sido utilizada para encontrar los

parámetros de fabricación que producen una respuesta óptima en sensores de pilares cilíndricos. Se ha caracterizado el rendimiento del biosensor a partir de las magnitudes factor de sensibilidad, factor de calidad y factor de amplitud; y se han relacionado con los parámetros de fabricación: distancia entre pilares a , altura H y radio R , o con parámetros adimensionales obtenidos a partir de estos. Estos estudios se han realizado para pilares y sustratos compuestos por diferentes materiales.

- Los estudios realizados permiten afirmar, como conclusión general, que la mejora del rendimiento de los biosensores BICELL está ligada a los avances en los procesos de fabricación que nos permitan construir estructuras submicrométricas cada vez más pequeñas y compactas, con altas relaciones de aspecto H/D , avanzando hacia las dimensiones nanométricas en los que se refiere a los valores de D y a .
- Las estructuras de tamaño supermicrométrico tienen valores más bajos del factor de sensibilidad, sin embargo, algunas estructuras de tamaño micrométrico tienen sensibilidades cercanas a la unidad, y buenos factores de calidad y amplitud, por lo que no deberían ser necesariamente descartadas en determinadas aplicaciones.
- Se ha propuesto un nuevo método de biodetección óptica interferométrico basado en el procesado de las señales de dos interferómetros, uno de los cuales se utiliza como referencia. El método incluye varias formas de procesar estas dos señales para construir señales de transducción alternativas al desplazamiento de máximos o mínimos utilizado habitualmente.
- Se ha adaptado el modelo interacción de ondas electromagnéticas con celdas biosensoras a la simulación en el entorno matemático de programación Matlab® de la respuesta del nuevo biosensor. La comparación de las predicciones teóricas del modelo con los resultados experimentales permiten extrapolar propiedades razonables de las capas de material biológico como espesores, índices de refracción equivalentes o densidades de recubrimiento. El modelo teórico permite optimizar los parámetros de diseño de nuevos biosensores basados en esta idea.
- Se ha demostrado experimentalmente la viabilidad de utilizar el método de biodetección óptica interferométrico en un amplio rango de aplicaciones de detección de agentes biológicos, como anticuerpos (IgGs), proteínas biomarcadoras de enfermedades oculares, antígenos virales, entre otras.

- Se ha patentado el método de biodetección óptica interferométrica y se han desarrollado, a partir de esta idea, varios prototipos que lo implementan utilizando como señal de transducción la función IROP (*Increased Relative Optical Power*). Estos prototipos tienen un diseño sencillo y compacto que evita la necesidad de utilizar un espectrómetro. Debido a que no están basados en el seguimiento de las posiciones de máximos o mínimos, se mejora el límite de detección al eliminarse la contribución a la incertidumbre asociada a la determinación de las mismas.
- Se ha construido un conjunto de funciones y programas en el entorno matemático de programación Matlab® que permiten, a través del método de ajuste por mínimos cuadrados, determinar los parámetros físicos que caracterizan a las capas que componen las celdas biosensoras, así como los de los materiales biológicos que las recubren.
- El ajuste por mínimos cuadrados ha permitido determinar, para celdas biosensoras consistentes en apilamientos de capas planas en los que la capa más externa es de polímero SU-8, las propiedades físicas de esta última capa. Para estimar las propiedades de esta capa se utiliza la respuesta de la celda en espectrometría lo que permite encontrar a la vez, y de forma rápida, el espesor y los parámetros de Cauchy que determinan la variación de su índice de refracción con la longitud de onda. Dado que las capas de SU-8 se obtienen tras realizar algunos procesos químicos y térmicos de los que pueden depender sus propiedades físicas finales, se considera que la caracterización óptica de estas capas es importante para predecir la respuesta de las celdas biosensoras.
- Para inmunoensayos realizados sobre celdas biosensoras como las descritas en el punto anterior a partir de respuestas espectrométricas, los ajustes por mínimos cuadrados permiten estimar propiedades de las capas biológicas depositadas en cada fase del inmunoensayo. En este tipo de problema es determinante el hecho de que la solución del problema inverso no es única, sin embargo, realizando algunas hipótesis complementarias basadas en estudios previos publicados, se puede extraer información importante de lo que está ocurriendo a lo largo del inmunoensayo; como espesores de capas o densidades de recubrimiento superficial.
- Se ha aplicado el método ajuste por mínimos cuadrados a inmunoensayos de los que se tiene información de espectrometría y reflectometría submicrométrica. El objetivo inicial de resolver el problema de la multiplicidad de posibles soluciones que ajustan a una curva no ha podido satisfacerse, fundamentalmente por problemas aún no resueltos con las medidas en

reflectometría del instrumento n-Gauge. Se está trabajando en la reducción del ruido de *speckle* y en la delimitación de la zona de medida, de forma que la resolución espacial submicrométrica del tamaño del punto de enfoque, no produzca una variabilidad asociada a que no medimos exactamente sobre el mismo punto, ya que el sistema es capaz de medir pequeñas variaciones debidas a la topografía de la superficie. Aún con las limitaciones indicadas, se ha demostrado la capacidad de caracterizar la evolución de las propiedades de las capas de material biológico en un inmunoensayo a través de ajustes por mínimos cuadrados a curvas de reflectancia procedentes de experimentos de reflectometría submicrométrica.

- Se ha creado un sistema de lectura y procesado de curvas de reflectancia obtenidas en inmunoensayos en los que la señal de transducción está basada en desplazamiento de máximos o mínimos. El sistema se ha implementado como un conjunto de programas y funciones en el entorno matemático de programación Matlab®. El fin de este sistema es determinar, tras la realización de un inmunoensayo en un biosensor y analito concretos: la sensibilidad, límite de detección e incertidumbre en la determinación de la concentración de dicho analito. El sistema se utiliza habitualmente en el procesado e interpretación de los ensayos realizados por el grupo de investigación en Óptica Micro-Nanofotónica y Biofotónica en su laboratorio del Centro de Tecnología Biomédica de la Universidad Politécnica de Madrid.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] **Armbruster, D.A. , Pry, T. ,** *Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation* Clin Biochem Vol 29 Supl (i) S49-S52 2008
- [2] **Aspnes, D.E. , Studna, A.A. ,** *Dielectric functions and optical parameters of Si, Ge, GaP, GaS, GaSb, InP and InAs from 1.5 to 6 eV* Physica Review B Vol 27 No2 1983
- [3] **Baak, T.** *Silicon oxynitride; a material for GRIN optics* Applied Optics 21 Vol 27 (1982) 1069-1072
- [4] **Bagloi, G. , Keller, S. , Johansson, A. , Boisen, A. , Dufva, M.** *Functionalization of SU-8 photoresist surfaces with IgG proteins* Applied Surface Science 255 (2008) 2896-2902
- [5] **Berini, P.** *Figures of merit for surface plasmon wave guides*, Optics Express, Vol. 14, No. 26 13030-13042 (December 2006)
- [6] **Bevington , P.R. , Robinson, D. K.** *Data reduction and error analysis for the physical Sciences* Mc Graw Hill 2003
- [7] **Born, M, Wolf, E.** *Principles of Optics* Pergamon Press 1991
- [8] **Bornhop, D.** *Microvolume index of refraction determinations by interferometric backscatter* Applied Optics Vol.34 No18 (1995) 3234-3239
- [9] **Bornhop, D.J , Latham, J.C. , Kussrow, A. , Marcov, D.D , Jones, R. D. , Sorensen, H.S.** *Free solution label-free molecular interactions studied by back-scattering interferometry* Science 317 (2007) 1732-1736
- [10] **Borreman, A. , Musa, S. , Kok, A. , Diemer, M. , Driesen, A. ,** *Fabrication of polymeric multimode waveguides and devices in SU-8 photoresist using selective polymerization* Proceedings Symposium IEE/LEOS (2002) Amsterdam 83-86
- [11] **Braum, M.M. , Pilon, L.** *Effective optical properties of non-absorbing nanoporous media* Thin Solid Films 496 No.2 (2006) 505-514

- [12] **Campbell , N. , Reece, J.** *Biología (Septima Edición)* Editorial Médica Panamericana 2007
- [13] **Casquel, R, Holgado, M, Lavín, A, Barrios, CA, Molpeceres, C, Morales, M, Ocaña, JL.** *Vertical resonant microcavities based on pillars analyzed by beam profile ellipsometry and reflectometry* Proceeding of Eurosensors XXII Sept. 2008
- [14] **Casquel, R, Holgado, M, Molpeceres, C, Morales, M, Ocaña, JL.** *Photonic sensors based on integrated reflectivity, ellipsometry and spectrometry measurements in submicron size geometries* IEEE 2007 336-339
- [15] **Casquel, R, Holgado, M, Sanza, F.J. , Laguna, M. F. , Barrios, C.A , López-Romero, D. , Ortega, F.J. , Bañuls, M.J. , Puchades, R. , Maquieira, A.** *Optimization of a label-free biosensor vertically characterized based on a periodic lattice of high aspect ratio SU-8 nano-pillars with a simplified 2D theoretical model* Physica Status Solidi (2011) 1087-1092
- [16] **Casquel, R, Soler, J. A. , Holgado, M, López, A. , Lavín, A. , de Vicente, J. , Sanza, F.J. , Laguna , Bañuls, M.J. , Puchades, R.** *Sub-micrometric reflectometry for localized label-free biosensing* Optics Express Vol.23 No.10 (2015) 12544-12554
- [17] **Casquel, R.** *Biosensors based on vertically interrogated optofluidic sensing cells* Tesis Doctoral UPM 2012
- [18] **Chang, C.L. , Acharya, G. , Savran, C.A.** *In situ assembled diffraction for biomolecular detection* Applied Physics Letters 90 (2007) 233901
- [19] **Chen, J-K. , Zhou, G-Y. , Chang, Ch-J. , Cheng, Ch-Ch.** *Label-free detection of DNA hybridization using nanopillar arrays based optical biosensor* Sensors and Actuators B 194 (2014) 10-18
- [20] **Chen, J-K. , Zhou, G-Y. , Huang, C-F. , Ko, F-H.** *Using nanopillars of silicon oxide as a versatile platform for visualizing a selective immunoabsorbent* Applied Physics Letters 102 (2013) 251903

- [21] **Cross, H.G. , Reeves, A. A. , Brand, S. , Popplewell, F. J. , Peel, L.L. , Swann, M.J. , Freeman, N. J.** *A new quantitative optical biosensor for protein characterization* Biosensors and Bioelectronics 18 (2003) 383-390
- [22] **Currie, L. A.** *Detection and quantification limits: origins and historical over view* Analytica Chimica Acta 391 (1999) 127-134
- [23] **Currie, L. A.** *Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities* Pure and Applied Chemistry 67 No 10 (1995) 1699-1723
- [24] **de Stefano, L. , Arcari, P. , Lamberti, A. , Sanges, C. , Rotiroti, L. , Rea, I. , Rendina, I.** *DNA optical detection based on porous silicon technology: from biosensors to biochips* Sensors 7 214-221 (2007)
- [25] **de Vicente, J. , Holgado, M. , Lavín, A. , Sanza, F.J. , Casquel, R. , Laguna, M.F.** *Uncertainty in optical bio-sensors due to the spectral displacement of the interference modes of the transduction signal* Óptica Pura y Aplicada 47 (1) (2014) 27-34
- [26] **del Campo, A. , Greiner, C.** *SU-8: a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography* Journal of Micromechanics and Microengineering 17 (2007) R81-R-95
- [27] **Fan, X , White, IM , Shopova, SI , Zhu, H, Suter, JD, Sun, Y** *Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review* Analytica Chimica Acta, 620 (2008) 8-26
- [28] **Fanton, JT, Opsal, J, Rosencwaig, A.** *Method and apparatus for evaluating the thickness of thin films* U.S. Patent 5181080 (1993A)
- [29] **Fanton, JT, Opsal, J, Willeborg, DL, Kelso, SM, Rosencwaig, A.** *Multiparameter measurements of thin films using beam-profile reflectometry* J. Appl. Phys. 73 (11) (1993B)
- [30] **Ferrer, M.L. , Duchowicz, R. , Carrasco, B. , Garcia de la Torre, J. , Acuña, U.** *The conformation of serum albumin in solution: a combined phosphorescence*

depolarization-hydrodynamic modeling Biophysical Journal 80 (5) (2001) 2422-2430

- [31] **Foley, J.A. , Nelson, K. , Mashadi-Hosseini, A. , Finlayson, B.A. , Yager, P.** *Concentration gradient immunoassay (CGIA) II. Computational model for analysis and optimization* Anal Chem 79 (10) (2007) 3549-3553
- [32] **Graham, A. , Pilon, L. , Yin, J. , Saxena, I.** *Effective optical properties of absorbing nanoporous and nanocomposite thin-films* Journal of Applied Physics 496 Vol 101, No.11 (2007) 014320
- [33] **Gelorme, JD, Cox, RJ, Gutierrez, AR** *Photoresist composition and printed circuit boards and packages made therewith* U.S. Patent 48882245 (1989)
- [34] **Gold, N. , Willenborg, D. L. , Opsal, J. , Rosencwaig, A.** *High resolution ellipsometric apparatus* U.S. Patent 5042951 (1991A)
- [35] **Gold, N. , Willenborg, D. L. , Opsal, J. , Rosencwaig, A.** *Method and apparatus for measuring thickness of thin films* U.S. Patent 4999014 March 1991B
- [36] **Golub, E. S.** *Base celular de la respuesta inmunológica* Reverté 1987
- [37] **Green, M.A. , Keevers, M.J.** *Optical properties of intrinsic silicon at 300 K* Progress in Photovoltaics: Research and Applications Vol. 3 189-192 (1995)
- [38] **Hecht, E.** *Óptica* Addison Wesley Iberoamericana 2000
- [39] **Hermanson, G.T.** *Bioconjugate techniques (C13: Silane coupling agents)* Academic Press 2013
- [40] **Holgado, M. , Sanza, F. J. , Laguna, M.F. , Lavín, A. , Casquel, R. ,** *Interferometric detection method* European Patent Office Bulletin. 2014 - 06, 02/2014 <<http://www.google.com/patents/EP2693164A1?cl=en>> (2014A)
- [41] **Holgado, M. , Barrios, C. A. , Ortega, F. J. , Sanza, F. J. , Casquel, R. , Laguna, M.F. , Bañuls, M. J. , López-Romero, D. , Puchades, R. , Maquieira, A.** *Label free biosensing by means of periodic lattices of high aspect ratio SU-8 nano-pillars* Biosensors and Bioelectronics 25 (2010) 2553-2558

- [42] **Holgado, M. , Casquel, R. , Sánchez, B. , Molpeceres, C. , Morales, M. Ocaña, J.L.** *Optical characterization of extremely small volumes of liquid in su-micro-holes by simultaneous reflectivity, ellipsometry and spectrometry* Optics Express Vol. 15 No. 20 1 October 2007
- [43] **Holgado, M. , Sanza, F. J. , López, A. , Lavín, A. , Casquel, R. , Laguna, M.F.** *Description of an advantageous optical label-free biosensing interferometric read-out method to measure biological species* Sensors 14 (2014B) 3675-3689
- [44] **Homola, J. , Sinclair, S.Y. ,Gauglitz, G.** *Surface Plasmon resonance sensors: a review* Sensors and Actuators B 54 (1999) 3-15
- [45] <http://refractiveindex.info/>
- [46] <http://www.rsoftdesign.com>
- [47] **Hutchinson, N. , Coquil, T. , Richman, E. , Tolbert, S. , Pilon, L.** *Reflectance of Surfactant-templated mesoporous silica thin films: simulations versus experiments* Thin Solid Films 518 No.2 (2010) 2134-2140
- [48] **IUPAC, Compendium of Chemical Terminology**, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. [doi:10.1351/goldbook](https://doi.org/10.1351/goldbook)
- [49] **JCGM / BIPM, Evaluation of measurement data- Guide to the expresión of uncertainty in measurements**, 2008
- [50] **Johs, B. , Woollam, J.A. , Herzinger, C. M. , Hilfiker, J. , Synowicki, R.A. , Bungay, C. L** *Overview of variable angle spectroscopic ellipsometer (VASE), Part II: Advanced applications* Critical Reviews of Optical Science an Technology Vol. CR72 1999
- [51] **Joshi, M. , Kale, N. , Lal, R. , Rao, R. , Mukherji, S.** *A novel dry method for surface modification of SU-8 for immobilization of biomoléculas in Bio-MEMS* Biosensors and Bioelectronics 22 (2007A) 2429-2435

- [52] **Joshi, M. , Pinto, R. , Rao, R. , Mukherji, S.** *Silanization and antibody immobilization on SU-8* Applied Surface Science 253 (2007B) 3127-3152
- [53] **Kussrow A. , Enders, S.C. , Bornhop, D.** *Interferometric methods for label-free molecular interaction studies* Analytical Chemistry 84 (2) (2012) 779-772
- [54] **Kuwabara, K. , Masahiko, O. , Motowaki, S. , Miyauchi, A.** *Fluorescence measurements of nanopillars fabricated by high-aspect-ratio nanoprint technology* Microelectronics Engineering 73-74 (2004) 752-756
- [55] **Laguna, M.F. , Holgado, M. , Santamaría, B. , López, A. , Maigler, M. , Lavín, A. , de Vicente, J. , Soria, J. , Acera, A. , Suarez, T. , Bardina, C. , Jara, M. , Sanza F.J. , Casquel, R. , Otón, A. , Riesgo, T.** *Performance evaluation for different sensing surface of BICELLS bio-transducers for dry eye biomarkers* Photonics West (2015) Poster
- [56] **Laguna, M.F. , Holgado, M. , Sanza F.J. , Lavín, A. , López, A. , Casquel, R.** *Optimization of dengue immunoassay by label-free interferometric optical detection method* Sensors 14 (2014A) 6695-6700
- [57] **Laguna, M.F. , Holgado, M. , Sanza F.J. , López, A. , Santamaría, B. , Lavín, A. , Soria, J. , Suárez. T. , Bardina, C. , Jara, M. , Sanza, F.J. , Casquel, R.** *Antigen-antibody affinity for dry eye biomarkers by label free bio-sensing. Comparison with the ELISA technique* Sensors 15 (2015) 19819-19829
- [58] **Laguna, M.F. , Sanza F.J. , Soria, J. , Jara, M. , Lavín, A. , Casquel, R. , López, A. , Suarez, T. , Holgado, M.** *Label-free biosensing by means of BICELLS for dry eye* Sensors and Actuators B: Chemical 203 (2014B) 209-212
- [59] **Lavín, A. , Casquel, R. , Sanza, F.J. , Laguna, M.F. , Holgado, M.** *Efficient design and optimization of bio-photonic sensing cells (BICELLS) for label free biosensing* Sensors and Actuators B 176 (2013A) 753-760
- [60] **Lavín, A. , Casquel, R. , Sanza, F.J. , Laguna, M.F. , Holgado, M.** *Label free biosensing optimization on submicrometric reflectometry and ellipsometry optical interrogation for bio-photonic sensing cells (BICELLS)* Third International Congress on Biosensing Technology (Sitches) (2013B) Ponencia

- [61] **Lavín, A. , Holgado, M. , Casquel, R. , Sanza, F.J. , Laguna, M.F.** *A theoretical optimization of advance optical interrogation of bio-photonic sensing cells (BICELLS) for label free biosensing* E-MRS Spring Meeting (2012) Poster
- [62] **Leeds, A.R. , Van Keuren, E.R. , Durst, M.E. , Schneider, T.W. , Currie, J.F. , Paranjape, M.** *Integration of microfluidic and microoptical elements using a single mask photolithographic step* Sensors and Actuators A 115 (2004) 571-158
- [63] **Leng, J.M. , Chen, J. , Fanton, J. , Senko, M. , Ritz, K. , Opsal, J.** *Characterization of titanium nitride (TiN) films on various substrates using spectrophotometry, beam profile reflectometry, beam profile ellipsometry and spectroscopic beam profile ellipsometry* Thin Solid Films 313-314 (1998A) 308-313
- [64] **Leng, J.M. , Opsal, J. , Aspnes, D. E.** *Combined beam profile reflectometry, beam profile ellipsometry and ultraviolet-visible spectrophotometry for the characterization of ultrathin oxide-nitride-oxide films on silicon* J. Vac. Sci. Technol. A 17(2) Mar/Apr 1999
- [65] **Leng, J.M. , Sidorowich, J.J. , Senko, M. , Opsal, J.** *Simultaneous measurement of six layers in a silicon on insulator film stack using visible near infrared spectrophotometry and a single-wavelength beam profile reflectometry* Thin Solid Films 313-314 (1998B) 270-275
- [66] **Liedberg, B. , Nylander, C. , Lundström, I.** *Biosensing by surface plasmon resonance- How it all started* Biosensors and Bioelectronics (Bioanalytical History Report) 10(1995) i-ix
- [67] **Lin, V. S.-Y , Montesharei, K. , Dancil, K.P.S. , Sailos, M.J. , Gharidi, M.R.** *A porous silicon-based optical interferometric biosensor* Science 278 (1997) 840-843
- [68] **Long, G. L. , Winefordner, J. D. ,** *Limit of Detection: A Closer Look at the IUPAC Definition* Analytical Chemistry, 55(7): 712A-724A 1983
- [69] **López, A , Casquel, R. , Holgado, M. , Cornago, I. , Sanza, F. J. ,.Santamaría, B , Maigler, M. , Fernandez, F. , Lavín, A. , Laguna, M.F.** *Arrays of resonant nanopillars for biochemical sensing* Optics Letters Vol. 40 NO. 10 (2015) 2370-2372

- [70] **López-Romero, D. , Barrios, C. A. , Holgado, M. , Laguna, M.F. , Casquel, R.** *High aspect ratio SU-8 resist nano-pillars lattice by e-beam direct writing and its applications for liquid trapping* Microelectronics Engineering 87 (2010) 663-667
- [71] **Lorentz, H. , Despont, M. , Fahrni, N. , Brugger, J. , Vettiger, P. Renaud, P.** *High aspect ratio ultrathick, negative-tone near-UV photoresist and its applications for MEMS Sensors and Actuators A* 64 (1998) 33-39
- [72] **Lorrain, P. , Corson, D. R.** *Campos y ondas electromagnéticos* Selecciones Científicas 1990
- [73] **Maigler, M.V.** *Developing Point-of-Care devices for in-vitro diagnosis* Trabajo Fin de Master UPM (2015)
- [74] **Malitson, I.H.** *Interspecimen comparison of the refractive index of fused silica,* Journal of the Optical Society of America 55, No 10 1205-1209 (October 1965)
- [75] **Marcov, D.D , Swinney, K. , Bornhop, D.J** *Label-free molecular interaction determination with nanoscale interferometry* Journal of the American Chemical Society 126 (2004) 16659-16664
- [76] MathWorks, <http://es.mathworks.com/help/matlab/>
- [77] **Morris S.J.** *Beam Profile Reflectometry- A novel and effective solution for coating quality control* (2010) Disponible en:
<http://www.neos.com/downloads/White%20paper%20June%202010.pdf>
- [78] **Nirshi, M. , Reuter, F. , Vörös, J.** *Review of transducer principles for label-free biomolecular interaction analysis* Biosensors 1 (2011) 70-92
- [79] **O'Malley, S.** *Recent Advances in label-free biosensors applications in protein biosynthesis and HTS screening* In: Protein Biosynthesis Ed. Nova Science Publishers (2008)
- [80] **Parida, O.P. , Bhat, N. , Reigner** *Characterization of optical properties of SU-8 and fabrication of optical components* International Conference of Optics and Photonics (Chandigarh India 2009)

- [81] **Peng, L. , Varma, M.M. , Reigner, E.F. , Nolte, D.D. ,** *Adaptative optical biocompact disk for molecular recognition* Applied Physics Letters 86 (2005) 183902
- [82] **Peters, T** *All about albumin* Academic Press 1996
- [83] **Prieto, F. , Sepulveda, B. ,Calle, A. , Llobera, A. , Dominguez, C. , Lechuga, L M.** *Integrated Mach-Zender interferometer based on ARROW structures for biosensor applications* Sensors and Actuators B 92 (2003) 151-158
- [84] **Reitz, J. R. , Milford, F. J. , Christy, R. W.** *Fundamentos de la teoría electromagnética* Fondo Educativo Interamericano 1984
- [85] **Reth, M.** *Matching cellular dimensions with molecular sizes* Nature Immunology Vo, 14 Number 8 (2013) 765-767
- [86] **Robinson, G.** *The commercial development of planar optical biosensors* Sensors and Actuators B 29 (1995) 31-36
- [87] **Rosencwaig, A. ,Opsal, J. ,Willeborg, D.L. ,Kelso, S.M. Fanton, J. T.** *Beam profile reflectometry: A new technique for dielectric film measurements* Applied Physics Letters 60 (11) 16 March 1992
- [88] **Saerens, D. , Huang, L. , Bonroy, K. , Muyldermans, S.** *Antibody fragments as probe in biosensor development* Sensors 8 (2008) 4669-4686
- [89] **Sanza, F. J. , Holgado, M. , Ortega, F. J. , Casquel, R. , López-Romero, D. , Bañuls, M. J. , Laguna, M.F. , Barrios, C. A. , Puchades, R. , Maquieira, A.** *Biophotonic Sensing Cells over transparent substrates for anti-gestrinone antibodies biosensing* Biosensors and Bioelectronics 26 (2011A) 4842-4847
- [90] **Sanza, F. J. , Laguna, M.F. , Casquel, R. , Holgado, M. , Barrios, C. A. , Ortega, F. J. , López-Romero, D. , García Balesteros, J.J. , Bañuls, M. J. , Maquieira, A. Puchades, R. ,** *Cost-effective SU-8 micro-structures by DUV excimer laser lithography for label free biosensing* Applied Surface Science 257 (2011B) 5403-5407
- [91] **Sanza, F. J.** *Development and fabrication of optical biosensors based on biophotonic sensing cells BICELLS* Tesis Doctoral (2015)

- [92] **Sanza, F. J.** *Fabricación y caracterización de biosensors ópticos basados en redes de micro y nanopilares de SU-8* Trabajo Fin de Master (2011C)
- [93] **Sarma, V.R. , Silverton, E.W. , Davies, D.R. , Terry, W.D.** *The three-dimensional structure at 6 angstrom resolution of a human γ G1 immunoglobulin molecule* The Journal of Biological Chemistry Vol. 246 (11) (1971) 3753-3759
- [94] **Scarmozzino, R. , Gopinath, A. , Pregla, R. , Helfert, S.** *Numerical techniques for modelling guided-wave photonic devices* IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics Vol.6 NO.1(2000) 150-163
- [95] **Seitz, R. , Brings, R. , Geiger, R.** *Protein adsorption on solid-liquid interfaces monitored by laser ellipsometry* Applied Surface Science 252 (2005) 154-157
- [96] **Soler, J.A.** *Lectura de biochips mediante reflectometría submicrométrica de alta resolución* Trabajo Fin de Master UPM (2014)
- [97] **Sorensen, H.S. , Larsen, N.B , Latham, J.C. , Bornhop, D.J , Andersen, P.E.** *Highly sensitive biosensing based on interference from light scattering in capillary tubes* Applied Physics Letters 89 (2006) 151108
- [98] **Sugio, S. , Kashima, A. , Mochizuki, S. , Noda, N. , Kobayashi, K.** *Crystal structure of human serum albumin at 2.5 angstrom resolution* Protein Engineering 12 (1999) 439-436
- [99] **Swinney, K. , Marcov, D.D , Bornhop, D.J** *Chip-scale universal detection based on backscatter interferometry* Analytical Chemistry Vol.72 No 13 (2000) 2690-2695
- [100] **Tao, S.L. , Popat, K.C. , Norman, J.J. , Desai, A.D.** *Surface modification of SU-8 for enhanced biofunctionality and nonfouling properties* Langmuir 24 (2008) 2631-2636
- [101] **Tarigan, H. J. , Neill, P. , Kenmore, K. , Bornhop, D.** *Capillary-scale refractive index detection by interferometric backscatter* Analytical Chemistry Vol.68 No10 (1996) 1762-1770
- [102] **Tompkins, H. G. , Irene, E. A. ,** *Handbook of Ellipsometry* Springer 2005

- [103] **Varma, M.M. , Inerowitz, H.D. , Reigner, E.F. , Nolte, D.D.** *High-speed label-free detection by spinning-disk micro-interferometry* Biosensors and Bioelectronics 19 (2004) 1371-1376
- [104] **Varma, M.M. , Nolte, D.D. , Inerowicz, H.D. , Reigner, E.F.** *Spinning-disk self-referencing interferometry of antigen-antibody recognition* Optics Letters Vol.29 No 9 (2004) 950-952
- [105] **Vörös, J.** *The density and refractive index of adsorbing protein layers* Biophysical Journal 87 (2004) 553-561
- [106] **Vuye, G. , Fisson, S. , Nguyen, V. , Wang, Y. , Rivory, J. , Abeles, F.** *Temperature dependence of the dielectric function of silicon using in situ spectroscopic ellipsometry* Thin Solid Films Vol 233 166-170 (1993)
- [107] **Weber, M.J.** *Handbook of Optical Materials* CRC Press 2003
- [108] **White, I.M. , Fan, X.** *On the performance quantification of resonant refractive index sensors* Optics Express Vol.16 No 2 (2008) 1020-1028
- [109] **Woollam, J.A. , Hilfiker, J. N. , Tiwald, T.E. , Bungay, C. L. , Synowicki, R.A. , Meyer, D. E. , Herzinger, C. M. , Pfeiffer, G.L. , Cooney, G.T. , Green, S.E.** *Variable angle spectroscopic ellipsometry in the vacuum ultraviolet* SPIE Proceeding (July 2000)
- [110] **Woollam, J.A. , Johs, B. , Herzinger, C. M. , Hilfiker, J. , Synowicki, R.A. , Bungay, C. L** *Overview of variable angle spectroscopic ellipsometer (VASE), Part I: Basic theory and typical applications* Critical Reviews of Optical Science and Technology Vol. CR72 1999
- [111] www.biod.es/
- [112] www.microchem.com Processing Guidelines for SU-8 2000
- [113] www.n-eos.com/
- [114] **Zhao, M. , Nolte, D.D. , Cho, W. , Reigner, E.F. , Varma, M.M. , Lawrence, G. , Pasqua, J.** *High-speed interferometric detection of label-free immunoassays on the biological compact disc* Clinical Chemistry 52:11 (2006) 2135-2140