ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE TELECOMUNICACIÓN (ETSIT)
INSTITUTO DE SISTEMAS OPTOELECTRÓNICOS Y MICROTECNOLOGÍA (ISOM)
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID (UPM)

**CAMPUS
DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL**

TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO DE SUPERFICIES NANOESTRUCTURADAS PARA
BIOSENSORES ÓPTICOS Y SENSORES BIOMIMÉTICOS**

Víctor Canalejas Tejero

2016

Agradecimientos

Lo primero es agradecer a Carlos Angulo Barrios la oportunidad que me dio para realizar la tesis doctoral en el ISOM. Si en algún momento llegué a imaginar cómo me gustaría que fuese mi tesis, seguramente fue muy parecido a como ha sido en realidad, aprendiendo continuamente y con mucho trabajo de laboratorio. Gracias Carlos por la oportunidad y la confianza, por haber dirigido mi tesis, por toda la ayuda y por las continuas ideas y sugerencias.

A quien doy las gracias también, y mucho, por toda la ayuda, consejos y trabajo que hay detrás, es al grupo de técnicos con los que he podido trabajar en la sala blanca: Alicia, David, Fernando, Óscar y especialmente Maika, sin vuestra ayuda no habría logrado hacer todo este trabajo, y con todos he aprendido algo, o mucho. Y por supuesto, gracias Montse por haber llevado todo tipo de trámites con cercanía y una sonrisa. Y gracias también a Isidoro, y a Juan Antonio por la ayuda informática.

Muchas gracias también a aquellos de fuera del ISOM sin cuya colaboración no hubiera sido posible obtener un trabajo tan fructífero. Sergio Carrasco, Sonia Herranz, Elena Benito-Peña, Riikka Peltomaa, Fernando Navarro, Javier Urraca y MariCruz Moreno-Bondi de Química de la UCM. Rafa Casquel, Ana López, Javi Sanza, Betxu, Álvaro, MariFé Laguna y Miguel Holgado del CTB (y antes Centro Láser) de la UPM. Miquel Avella-Oliver, Rosa Puchades y Ángel Maquieira del IDM de la UPV. María del Carmen Cápel y José Luis García Fierro del ICP del CSIC.

También gracias a todos aquellos compañeros del ISOM y del despacho B039.1 que en algún momento me han prestado su ayuda: Antonio U, Ana B, Steven, Mariajo, Manu, Alejandro, Alberto, Víctor, Dong Joo, Ana P, Tomasso, Antonio LG, Alicia, Miguel, Amalia, Noemí, Paul, Javier, Alyssa, Marco, MariMar y también al resto porque, de una forma u otra han sido parte de esta aventura.

Gracias especialmente a mis padres por toda la ayuda durante estos años, facilitando en gran medida haber llegado hasta el final.

Finalmente, si no estás entre los anteriores y estás leyendo parte de esta tesis, gracias por el interés, espero que algo de lo que aquí se recoge te sirva para seguir avanzando en este mundo de Ciencia.

Víctor Canalejas Tejero.

I. Resumen.

La presente Tesis Doctoral es de carácter tecnológico y está enfocada al desarrollo de nuevos biosensores y sensores biomiméticos ópticos. El trabajo ha consistido en la fabricación y caracterización de películas micro/nano-estructuradas en distintos materiales para (bio)detección óptica, empleándose como herramienta principal de nanoestructuración la litografía por haz de electrones (EBL). El objetivo general es lograr mejoras y novedades en el campo de los biosensores ópticos, tanto en lo referente a las prestaciones de los dispositivos como al coste de fabricación de los mismos. Este trabajo se puede dividir en tres partes.

En la primera parte se expone el trabajo realizado para lograr sensores biomiméticos basados en polímeros de impronta molecular (MIP), micro y nanoestructurados directamente mediante EBL, algo no realizado con anterioridad a esta Tesis, y con fotolitografía UV. Se ha conseguido demostrar que el copolímero P(MAA-*co*-MAAEMA) se comporta simultáneamente como MIP y resina de EBL, permitiendo la nanoestructuración directa de películas de este material MIP mediante EBL. En el proceso previo a la consecución de esta demostración, se han obtenido otros resultados de relevancia relacionados con las propiedades ópticas (fotoluminiscencia) y tecnológicas (resinas de alta sensibilidad y doble comportamiento) de resinas comerciales de PMMA y PMMA/MA y del copolímero P(HEMA-*co*-MAAEMA).

El segundo bloque contiene el trabajo desarrollado para obtener (bio)sensores plasmónicos sin marcado basados en redes de nanoagujeros realizadas en aluminio, susceptibles de ser interrogados ópticamente y capaces de detectar variaciones muy pequeñas de índice de refracción en el medio circundante. La novedad ha consistido en proteger eficazmente la superficie de aluminio frente a medios acuosos tamponados, frecuentes en bioensayos, obteniendo dispositivos competitivos frente a los fabricados habitualmente con oro, un metal miles de veces más costoso que el aluminio. Las prestaciones y la estabilidad de los dispositivos fabricados se estudiaron con diferentes pruebas de resistencia, experimentos de determinación de la sensibilidad volumétrica al índice de refracción empleando disolventes, y con ensayos de biodetección realizados como prueba de concepto. Las redes de nanoagujeros han sido fabricadas sobre dos tipos de sustratos: vidrio y policarbonato procedente de CDs y DVDs, esto último con el fin de desarrollar una tecnología que permita la integración de estos dispositivos en discos ópticos comerciales. Además, se ha investigado la transferencia de películas metálicas nanoestructuradas fabricadas sobre policarbonato a una cinta adhesiva flexible de uso común, estudiándose la sensibilidad refractométrica de la estructura resultante.

En la tercera y última parte se muestra el trabajo realizado destinado a obtener (bio)sensores sin marcado basados en redes de nanopilares de resina comercial SU-8 fabricados con EBL sobre una película de aluminio depositada en sustratos de silicio, tratando de mejorar las prestaciones de estructuras similares previamente publicadas. Para ello, se ha propuesto e investigado una configuración consistente en redes de nanopilares con forma de neiloide truncado obtenidos tras la aplicación de cierto grado de desenfoque durante la litografía. Los nanopilares resultantes presentan un ensanchamiento en la base, creando una capa delgada de resina entre ellos, originando un efecto de resonancia de modo guiado. Este efecto produce una respuesta óptica espectral que cuenta con una resonancia de alto factor de calidad y muy sensible a los cambios de índice de refracción del medio circundante. Considerando tanto la sensibilidad como la calidad de la resonancia, se ha demostrado que el factor de mérito de la estructura propuesta mejora hasta en dos órdenes de magnitud el de dispositivos similares anteriores con mayor superficie sensora, sin añadir mayor coste o complejidad al proceso de fabricación.

Abstract

The present Doctoral Thesis is a technology-based work focused on the development of novel optical biosensors and biomimetic sensors. The work has consisted of the fabrication and characterization of micro/nano-structured thin films made with different materials for optical (bio)detection, using electron beam lithography (EBL) as the main fabrication tool. The general goal is to achieve improvements and innovations in the optical biosensors field, considering both performance and production cost. This work can be divided in three parts.

The first part of the Thesis describes the work performed to achieve biomimetic sensors based on molecularly imprinted polymers (MIP), directly micro and nanostructured using EBL, which has not been done before this Thesis, and also UV photolithography. The copolymer P(MAA-co-MAAEMA) has been demonstrated as a MIP capable of direct nanostructuration with EBL. Other relevant results related with optical (photoluminescence) and technological (high sensitivity, dual tone resists) properties of the copolymer P(HEMA-co-MAAEMA), and also PMMA and PMMA/MA commercial resists, were obtained in the previous works which led to the MIP based biomimetic sensor.

The second block contains the work related with the development of label-free plasmonic (bio)sensors based on nanoholes arrays fabricated in aluminium films, subject to optical interrogation and capable of detecting very small refractive index variations in the surrounding environment. The novelty has consisted of achieving an efficient protection of the aluminium surface against buffered aqueous solutions, thus obtaining competitive devices without the need of using gold, usually applied to similar purposes, which is thousands of times more expensive than aluminium. The performance and the stability of the devices were studied by different endurance tests, also with experiments of acquisition of the volumetric sensitivity to refractive index using solvents, and with biosensing experiments as proof of concept tests. The nanoholes arrays have been fabricated using two different substrates: glass and polycarbonate from CDs and DVDs, opening the door to the development of a technology which allows for the integration of the devices on commercial optical discs. In addition, the transfer of the metallic nanostructures fabricated on polycarbonate to common use, flexible stick tape, was investigated, as well as the refractometric sensitivity of the transferred devices.

The third and last part shows the work related with the development of label-free biosensors based on SU-8 nanopillars arrays made with EBL onto an aluminium film deposited on silicon substrate, trying to improve the performance of similar architectures previously published. With this purpose, a new nanostructure consisting of truncated neiloid shape pillars, made by applying out-of-focus electron beam exposition during the lithography, has been investigated. The resultant nanopillars present a base widening, creating a resist thin film among them, and producing a guided-mode resonance effect. This effect produces an optical reflectance spectrum featuring a high quality resonance, which is very sensitive to refractive index variations of the environment in contact with the nanostructure surface. Considering both the sensitivity and the quality of the studied resonance, the developed (bio)sensors have demonstrated that the figure of merit of the proposed structure improves in two orders of magnitude comparing with previously published architectures, without adding extra cost or complexity during the manufacture process.

II. Tabla de contenidos.

Agradecimientos.....	3
I. Resumen – Abstract.....	5
II. Tabla de contenidos.	7
III. Introducción y objetivos.....	11
1. Conceptos generales.....	11
2. Tipos de biosensores.....	12
2.1. Biosensores ópticos.	
2.1.1. Biosensores plasmónicos.	
2.1.2. Biosensores basados en el efecto MaGMR.	
3. Receptores biomiméticos.....	18
4. Nanoestructuración de biosensores.....	19
4.1. Litografía por haz de electrones (EBL).	
4.2. Estado del arte de la fabricación de las superficies nanoestructuradas estudiadas en la tesis.	
4.2.1. Nanoestructuración de polímeros de impronta molecular (MIPs).	
4.2.2. Red de nanoagujeros en películas metálicas.	
4.2.3. Red de nanopilares poliméricos.	
5. Objetivos de la Tesis.....	23
IV. Sección experimental.....	24
1. Técnicas e instrumentación.....	26
a. Litografía por haz de electrones.	
b. Fotolitografía.	
c. Ataque húmedo.	
d. Ataque seco (ICP y RIE).	
e. Microscopio óptico.	
f. Microscopio electrónico.	
g. Microscopio de fuerzas atómicas.	
h. Perfilómetro mecánico.	
i. Interferómetro óptico.	
j. Analizador de capas delgadas.	
k. Espectrofotómetro UV–VIS.	
l. Espectrómetro FT–VIS–IR.	
2. Materiales.....	34
2.1. Polímeros de impronta molecular (MIPs).	
2.1.1. PMMA y PMMA/MA.	
2.1.2. P(HEMA- <i>co</i> -MAAEMA).	
2.1.3. P(MAA- <i>co</i> -MAAEMA).	
2.2. Red de nanoagujeros en película de aluminio.	
2.3. Red de nanopilares poliméricos.	
3. Fabricación de los dispositivos.....	37
3.1. Películas micro–nano–estructuradas de MIPs.	
3.1.1. PMMA y PMMA/MA.	
3.1.2. P(HEMA- <i>co</i> -MAAEMA).	
3.1.3. P(MAA- <i>co</i> -MAAEMA).	
3.2. Red de nanoagujeros en película de aluminio.	

3.2.1. Dispositivos sobre sustratos de vidrio.	
3.2.2. Dispositivos sobre sustratos de policarbonato.	
3.2.3. Dispositivos transferidos a sustratos flexibles.	
3.2.4. Pasivación del aluminio.	
a. Pasivación de dispositivos sobre sustrato de vidrio.	
b. Pasivación de dispositivos sobre sustrato de policarbonato.	
3.3. Red de nanopilares poliméricos.	
4. Caracterización de los dispositivos.....	48
4.1. Películas micro–nano–estructuradas de MIPs.	
4.2. Caracterización morfológica de redes de nanoagujeros en aluminio.	
4.3. Caracterización morfológica de redes de nanopilares de SU–8.	
4.4. Experimentos de sensibilidad volumétrica.	
4.4.1. Redes de nanoagujeros.	
4.4.2. Redes de nanopilares de SU–8.	
4.5. Biodetección y protocolo de bioensayo.	
4.5.1. Dispositivos sobre sustrato de vidrio.	
4.5.2. Dispositivos sobre sustrato de policarbonato.	
4.5.3. Redes de nanopilares de SU–8.	

V. Resultados.

1. MIPs.....	54
1.1. PMMA y PMMA/MA.....	54
1.2. P(HEMA- <i>co</i> -MAAEMA).....	58
1.2.1. Contraste y sensibilidad.	
1.2.2. Resolución.	
1.2.3. Caracterización XPS.	
1.2.4. Resistencia química y selectividad al ataque.	
1.2.5. Propiedades ópticas.	
1.2.6. Ejemplos de aplicabilidad.	
1.2.7. Comportamiento dual de la P(HEMA- <i>co</i> -MAAEMA).	
1.3. P(MAA- <i>co</i> -MAAEMA).....	76
1.3.1. Comportamiento dual, contraste y sensibilidad.	
1.3.2. Efecto de la irradiación electrónica (EBL) sobre la molécula plantilla.	
1.3.2.1. Estructuras fabricadas mediante EBL.	
1.3.3. Estructuras fabricadas mediante fotolitografía.	
1.3.3.1. Sensores biomiméticos de P(MAA- <i>co</i> -MAAEMA).	
2. Nanoagujeros en aluminio.....	84
2.1. Características estructurales y espectrales.....	84
2.1.1. Dispositivos sobre sustratos de vidrio.	
2.1.2. Dispositivos sobre sustratos de policarbonato.	
2.1.3. Dispositivos transferidos a cinta PSA Scotch®.	
2.2. Efecto del tratamiento de pasivación.....	99
2.2.1. Sustratos de vidrio.	
2.2.2. Sustratos de policarbonato.	
2.3. Sensibilidad volumétrica.....	103
2.3.1. Sustratos de vidrio.	
2.3.2. Muestras transferidas a cinta Scotch®.	
2.4. Biodetección.....	109
2.4.1. Sustratos de vidrio.	
2.4.2. Sustratos de policarbonato.	
3. Nanopilares de SU–8.....	114
3.1. Morfología de las estructuras fabricadas.....	114

3.2. Características espectrales.....	126
3.3. Sensibilidad volumétrica.....	132
3.4. Sensibilidad superficial y biodetección.....	135

VI. Conclusiones y trabajo futuro.141

1. MIPs.
2. Biosensores plasmónicos basados en redes de nanoagujeros en aluminio.
3. Sensores basados en redes de nanopilares de SU-8 y efecto MaGMR.
4. Tabla resumen de los dispositivos desarrollados.

VII. Publicaciones y otros eventos relacionados con la Tesis.....146

1. Publicaciones directamente relacionadas con la Tesis.
2. Otras publicaciones relacionadas con la Tesis.
3. Congresos.
4. Patentes.

VIII. Bibliografía.154

III. Introducción y objetivos.

1. Conceptos generales.

Actualmente, la demanda de herramientas para detectar cualitativa y cuantitativamente sustancias químicas es cada vez mayor debido al amplio abanico de aplicaciones y necesidades existentes. En este sentido, una de las herramientas analíticas más potentes y eficaces son los biosensores,¹⁻⁸ con aplicaciones tan variadas y relevantes como las siguientes:

- Diagnóstico clínico y prevención sanitaria: detección de moléculas de origen biológico relacionadas con la salud⁹ (por ejemplo, niveles de glucosa,¹⁰ ácido úrico,¹¹ colesterol¹² y otros componentes de la química sanguínea) y las enfermedades (virus,¹³ bacterias¹⁴ y otros patógenos), reconocimiento de secuencias de ADN,¹⁵ etc.
- Control medioambiental:¹⁶ sustancias contaminantes y nocivas para la salud que llegan al medio natural.
- Control de la calidad de alimentos y bebidas: consumo seguro y sin peligro de intoxicación por pesticidas,^{17,18} toxinas,¹⁹ bacterias y sustancias nocivas en general, así como antibióticos²⁰ y hormonas,^{21,22} lucha contra el fraude de alimentos y bebidas²³ con denominación de origen, etc.
- Seguridad y defensa:²⁴⁻²⁷ detección de agentes biológicos con potencial nocivo o letal, drogas, explosivos, etc.

Los biosensores constan, esencialmente, de dos elementos conectados entre sí. Por una parte existe un componente biológico que actúa como receptor, capaz de interactuar con una sustancia objetivo, o analito, generalmente mediante una reacción de afinidad. Por otra parte está el transductor, esto es, un elemento que convierte los cambios físico-químicos originados por las interacciones receptor-objetivo en una señal mensurable y cuantificable (Figura 1).

Fig. 1. Diagrama esquemático de un biosensor genérico y de su funcionamiento. Al receptor se une selectivamente el analito mediante una reacción de afinidad, produciendo un cambio físico-químico que el transductor convierte en una señal susceptible de ser medida y cuantificada.

Las principales características de un biosensor son la sensibilidad (relacionada con la capacidad de detectar cantidades muy pequeñas de analito) y la selectividad (capacidad de discriminación del analito objeto sobre otras moléculas). Otras propiedades deseables para aumentar su versatilidad y número de aplicaciones son: posibilidad de detección multianalito, robustez física y química, viabilidad de producción en masa empleando tecnologías ya establecidas²⁸ (bajo coste de fabricación), y posibilidad de reutilización.

2. Tipos de biosensores.

Los biosensores pueden clasificarse de diferentes maneras. Una de ellas es según la técnica de transducción empleada, pudiendo ser eléctrica,^{29,30} óptica,^{31,32} mecánica^{33,34} y magnética,^{35,36} principalmente. La elección del tipo de transductor dependerá de criterios tales como requisitos de sensibilidad, medio en el que operará el sensor, tamaño, integración e interacción con otros componentes, y coste.

Otra forma de clasificar los biosensores es según el modo de detección: indirecto o directo. La detección indirecta implica el etiquetado o marcado de los analitos con determinadas biomoléculas o partículas (radioactivas, fluorescentes, magnéticas, etc.), que actúan a modo de etiqueta (*label*), y que son las que realmente son detectadas. En la detección directa no existe tal marcado, reduciéndose así la complejidad y el coste de los ensayos. Por esta razón, existe en la actualidad una clara tendencia hacia el desarrollo de biosensores sin marcado³⁷ (*label-free*) fiables y de altas prestaciones.

2.1. Biosensores ópticos.

Los biosensores ópticos,³⁸ es decir, aquellos que utilizan técnicas de transducción óptica para biodetección, presentan características especialmente interesantes, tales como:

- Posibilidad de aprovechar múltiples propiedades de la luz (longitud de onda, intensidad, fase, polarización) como señal de respuesta.
- Uso de dispositivos y tecnologías propias de la industria de las comunicaciones ópticas y de la micro y optoelectrónica (fibras ópticas, láseres, fotodetectores, guías de onda, etc.), lo cual facilita la miniaturización e integración con otros componentes y tecnologías.
- Posibilidad de realizar multiensayos en un solo chip (multiplexado) mediante la interrogación en paralelo utilizando configuraciones del tipo matriz.
- Coincidencia de ciertas longitudes de onda con propiedades físicas de las biosustancias a analizar.

Existen biosensores ópticos capaces de realizar tanto detección indirecta como directa. Ejemplos de métodos indirectos de biodetección óptica son aquellos basados en la detección de luz emitida o absorbida por nanopartículas (o por moléculas), que operan como etiquetas fluorescentes o absorbentes, respectivamente. Por otro lado, los biosensores ópticos capaces de detectar moléculas de forma directa se basan principalmente en técnicas de refractometría (medida del índice de refracción) y/o espectrometría (medida de espectros de absorción, dispersión molecular, fotoemisión).

2.1.1. Biosensores plasmónicos.

De particular importancia para esta Tesis son los biosensores ópticos plasmónicos. Se basan en la posibilidad de generar oscilaciones colectivas de electrones libres en la superficie de un metal en contacto con un medio dieléctrico. Estas oscilaciones electrónicas se denominan plasmones de superficie (SPs, *surface plasmons*) y producen una onda electromagnética de superficie –polaritón de plasmón de superficie (SPPs, *surface plasmon polariton*)– en la interfaz entre el metal y el medio dieléctrico. La interacción de esta onda con la materia próxima a la superficie del metal constituye el principio de operación de este tipo de sensores.

Los SPs pueden ser generados en una superficie metálica plana haciendo incidir luz sobre la misma bajo determinadas circunstancias. Cuando la frecuencia y el momento lineal de la luz incidente coinciden con las del SP, se produce una situación de resonancia del plasmon (SPR, *surface plasmon resonance*). Para conseguir esta condición de resonancia (acoplamiento entre el fotón incidente y el SP) se utilizan diversas configuraciones. Las soluciones de acoplo más conocidas son: sistemas basados en prismas^{39,40} (siendo el más habitual la configuración de Kretschmann), sistemas basados en rejilla sinusoidal,⁴¹ fibras ópticas,^{42,43} y nanoagujeros de diámetro inferior a la longitud de onda de excitación y practicados en películas metálicas, pudiendo ser los nanoagujeros tanto individuales⁴⁴ como dispuestos en redes ordenadas (matrices o redes). El método de generación de SPs basado en el uso de redes de nanoagujeros es especialmente atractivo para su uso en biosensores debido a la posibilidad de fabricar redes de tamaño muy pequeño (permitiendo una alta densidad de sensores por unidad de área) mediante técnicas convencionales de micro y nano fabricación, lo cual facilita tanto la integración con componentes fluídicos y/o optoelectrónicos en un mismo chip así como la capacidad de ensayo multianalito o multiplexado. En esta Tesis se han desarrollado biosensores plasmónicos basados en redes de nanoagujeros en metal.

El índice de refracción (RI, *refractive index*) de un medio es el cociente de las velocidades de la luz en el vacío y en el medio. Los cambios del índice de refracción de un medio dieléctrico en contacto con una superficie metálica (producidos por ejemplo por la adsorción de biomoléculas sobre la misma) se traducen en una variación de la constante de propagación (velocidad) de la onda electromagnética de superficie asociada a los SPs y de la condición de SPR. La variación de la condición de resonancia se suele utilizar por tanto como la respuesta de un sensor plasmónico refractométrico, y puede ser monitorizada, bien como desplazamientos espectrales o angulares característicos de los SPPs, bien como variaciones en la intensidad óptica de un haz de interrogación a una determinada longitud de onda. Así, una gran variedad de dispositivos ópticos basados en SPR han demostrado su viabilidad en aplicaciones de biodetección sin marcadores.^{45,46} Esta circunstancia permite ensayos en tiempo real para detectar la interacción entre una molécula anclada y un analito sin necesidad de etiquetar o purificar previamente un marcador, todo ello debido a la alta sensibilidad de las resonancias SPP ante la presencia de biomoléculas en contacto con la superficie metálica, es decir, ante las variaciones de índice de refracción.

La elección de metales como materiales plasmónicos se debe a la gran disponibilidad de electrones libres que presentan, por lo que los metales con mayor conductividad eléctrica serían, a priori, los mejores candidatos. El metal que presenta mayor conductividad es la plata, seguido del cobre, el oro y el aluminio. Independientemente de la configuración utilizada, los metales empleados en la inmensa mayoría de los biosensores plasmónicos son metales nobles,⁴⁷⁻⁴⁹ principalmente plata⁵⁰

y oro,⁵¹ predominando este último debido a su gran estabilidad química (baja reactividad). Sin embargo, estos metales presentan un coste elevado, representando un inconveniente para la fabricación a gran escala, así como para la comercialización y rentabilidad de biosensores basados en los mismos. Por tanto, es de gran interés la exploración de las posibilidades que ofrecen otros metales más baratos y de gran aplicación tecnológica, como el aluminio y el cobre.

El aluminio posee propiedades plasmónicas muy interesantes,^{48,52-54} además de un coste considerablemente inferior al de los metales nobles: es 25 000 veces más barato que el oro y 425 veces más económico que la plata, aproximadamente, según datos de septiembre de 2013.⁵⁵ El aluminio ocupa, de hecho, el tercer lugar entre los elementos más abundantes de la corteza terrestre. No obstante, el aluminio apenas se ha empleado como componente de biosensores plasmónicos debido a las dificultades provenientes de su oxidación y corrosión⁵⁶⁻⁵⁸ en contacto con medios acuosos, especialmente importantes en capas delgadas de aluminio, no habiendo constancia para el autor de esta Tesis de ningún trabajo que lo haya utilizado como sensor plasmónico para aplicaciones en biodetección con anterioridad a este trabajo.

El óxido de aluminio (Al_2O_3) nativo, es decir, el que se forma espontáneamente cuando el aluminio entra en contacto con el oxígeno del aire y la humedad, presenta una estructura cristalina cúbica centrada en las caras,⁵⁹ que es una de las dos estructuras cristalinas más densas conocidas. La otra estructura cristalina más densa es la hexagonal compacta, presente en el óxido de aluminio cristalino (corindón). La densidad de ambas estructuras cristalinas ejerce de eficaz barrera frente a la penetración de oxígeno del aire, ralentizando significativamente la posterior oxidación del aluminio cuando es expuesto a ambientes oxidantes. Por ello, además de por la buena adherencia que existe con el aluminio metálico, la alta transparencia que presenta en el intervalo visible del espectro y la alta estabilidad química que posee, es un material idóneo para proteger el aluminio en medios acuosos, habituales en los bioensayos.

Por otra parte, el cobre es otro gran candidato a metal plasmónico, de hecho es el segundo metal con mayor conductividad eléctrica, y es solamente unas tres veces más costoso que el aluminio. Sin embargo, reacciona con el oxígeno del aire para formar óxido cuproso (Cu_2O), de color rojo y estructura cristalina cúbica, menos compacta que las estructuras que presenta el Al_2O_3 . La baja transparencia del Cu_2O reduce la aplicabilidad del cobre en biosensores plasmónicos, y la porosidad del óxido no favorece la reducción de una oxidación progresiva del metal. Además, con el tiempo, el Cu_2O se ennegrece por la formación de CuO , que posee estructura monoclinica, de baja densidad, y en presencia de humedad se forma una capa verde e impermeable de carbonato cúprico, empeorando la situación. Sin embargo, se han logrado proteger eficazmente nanopartículas de cobre con una capa de Al_2O_3 , y sus propiedades plasmónicas proporcionaron resultados comparables a los conseguidos con oro y plata⁶⁰ a pesar de que el cobre presenta pérdidas mayores por transición interbanda (principalmente debidas a transiciones electrónicas entre la banda de valencia y la de conducción que son responsables del color de los metales y de su reflectividad, interacciones electrón-electrón y electrón-fonón, y dispersión por los defectos de la red cristalina⁴⁸) que esos dos metales nobles, aunque el método para proteger el cobre implica el uso de un costoso equipo de depósito de capas atómicas (ALD, *atomic layer deposition*).

Debido a estas razones, el aluminio se presenta química, tecnológica y económicamente como el mejor candidato para formar parte de biosensores plasmónicos.

Respecto a los sustratos habituales con propósitos de biodetección, el uso de materiales inorgánicos como silicio, vidrio y cuarzo está muy extendido. Sin embargo, la tecnología basada en discos compactos (CDs, DVDs, etc.), hechos de policarbonato, ofrece una plataforma viable y de bajo coste para estos propósitos⁶¹⁻⁶⁴ que podría ser utilizada como soporte para fabricar redes de nanoagujeros, pudiendo ser analizados con un lector convencional.⁶⁵ Este sistema de lectura facilitaría la automatización y la simplificación de los análisis en los lugares donde fuere necesario, permitiendo examinar múltiples muestras biológicas por disco porque el tamaño de los sensores es muy pequeño, con el añadido de que esta tecnología está plenamente desarrollada, es portátil, se produce en masa y significaría un coste drásticamente inferior comparado con otros equipos de análisis y diagnóstico. A pesar de las inherentes ventajas que ello ofrece, el trabajo realizado al respecto es escaso,^{66,67} sin haberse estudiado las posibilidades que ofrecen las nanoestructuras metálicas.

Aparte, derivado del uso de sustratos de policarbonato, en esta Tesis se describe un método descubierto por el Dr. Carlos Angulo Barrios (supervisor del autor de esta Tesis) para transferir las matrices de nanoagujeros a sustratos flexibles (cinta adhesiva Scotch®). Este tipo de estructuras plasmónicas en aluminio sobre sustratos flexibles podría encontrar aplicación en una gran variedad de áreas. La flexibilidad y la capacidad de adhesión las hacen especialmente interesantes como etiquetas plasmónicas adhesivas de seguridad, como acopladores ópticos, y como sensores adhesivos y componentes ópticos «de quita y pon» que podrían ser aplicados sobre muchos tipos de superficies y formas, como el propio cuerpo humano⁶⁸ o lentes hemisféricas.⁶⁹ Así, no sería necesario tratar la superficie de un objeto, algo que podría ser difícil o imposible, para adherir el dispositivo de manera conformal.

2.1.2. Biosensores basados en el efecto MaGMR.

La resonancia de modo guiado (GMR, *guided mode resonance*) es un efecto ampliamente utilizado en biodetección,⁷⁰⁻⁷³ fundamentado en una estructura multicapa de materiales transparentes que combina una guía de onda y una red de difracción (Figura 2). Esta última puede consistir tanto en una red 1D (por ejemplo, tiras de un material dieléctrico espaciadas periódicamente) como 2D (como, por ejemplo, el caso estudiado en esta Tesis: una red cuadrada de nanopilares poliméricos). Cuando la red de difracción es iluminada tal como se muestra en la Figura 2, se generan un número de haces (órdenes de difracción) en transmisión según distintos ángulos de difracción. Si el ángulo de un haz difractado coincide con el ángulo de un modo guiado, se produce el fenómeno GMR. Bajo incidencia normal, la condición GMR se da a determinadas longitudes de onda (de resonancia), a las que la luz incidente es acoplada a la guía de onda y ésta es re-emitida (desacoplada de la guía) a la región superior (Figura 2) debido a su interacción con la red. Esto resulta en un máximo de luz reflejada a las longitudes de onda de resonancia. Por otro lado, en condiciones de no resonancia, la luz incidente no es acoplada a la guía de onda y atraviesa la estructura transparente, resultando en una reflectividad muy baja. De este modo, la reflectancia espectral que mostraría una estructura del tipo GMR sería como la mostrada en la Figura 4. La condición (longitud de onda) de resonancia depende del índice de refracción del material en contacto con la red de difracción debido a la presencia del campo evanescente del modo guiado en dicha región. La monitorización de la longitud de onda de resonancia representaría, por tanto, una respuesta adecuada de la estructura GMR como sensor refractométrico.

Fig. 2. Diagrama esquemático del principio de funcionamiento del efecto GMR. La estructura transmite toda la luz incidente excepto a la longitud de onda correspondiente a la condición de resonancia (ángulo difractado = ángulo de propagación), en la que la luz acoplada a la guía es re-emitida debida a su interacción con la red de difracción, originando un máximo en reflectancia.

Una variante de esta estructura consiste en sustituir el dieléctrico que actúa de recubrimiento (*cladding*) inferior de la guía (Figura 2) por una película metálica (Figura 3), originando un efecto GMR asistido por metal (MaGMR, *metal assisted guided mode resonance*).

Fig. 3. Diagrama esquemático del principio de funcionamiento del efecto MaGMR. El metal refleja toda la luz excepto a la longitud de onda de resonancia, en la que el modo guiado es atenuado por el metal, originando un mínimo en reflectancia. El campo evanescente se concentra exclusivamente en la región superior de la guía (la región sensible), aumentando la sensibilidad de biodetección con respecto a un dispositivo GMR.

A diferencia de la estructura de la Figura 2, en un dispositivo basado en MaGMR, en condiciones de resonancia, la luz guiada no experimenta reflexión total interna (TIR, *total internal reflection*) en la interfaz con el metal, sino que sufre atenuación debido a la interacción con el mismo. Este hecho hace que la emisión de luz

a la región superior debido a la interacción con la red de difracción se reduzca en situación de resonancia. Por otro lado, fuera de resonancia, la reflectividad será muy alta debido al metal. Por tanto, la reflectancia espectral que presentaría una estructura del tipo MaGMR sería como la ilustrada en la Figura 4. Obsérvese que es inversa a la exhibida por un dispositivo basado en el efecto GMR.

Las principales ventajas como biosensor óptico de una estructura tipo MaGMR frente a una GMR son: i) en un dispositivo GMR el índice de refracción del recubrimiento inferior de la guía debe ser menor que el del núcleo, lo cual no siempre es sencillo de implementar dependiendo del sistema material utilizado, mientras que una estructura MaGMR ofrece una mayor flexibilidad a la hora de seleccionar el metal y el método de depósito del mismo. ii) En la arquitectura MaGMR, el campo evanescente que interacciona con el material biológico es mejor aprovechado puesto que el campo resonante es asimétrico (el campo eléctrico no puede penetrar en un metal ideal), extendiéndose exclusivamente a la parte superior de la estructura, que es donde está la superficie sensible. Por el contrario, en un dispositivo GMR, el campo evanescente del modo guiado se extiende a ambos lados del núcleo, resultando inútil aquella componente que aparece en la interfaz con el recubrimiento inferior. iii) La condición de resonancia en un dispositivo GMR es muy sensible al ángulo de propagación del modo, mientras que en una estructura MaGMR la película metálica refleja la luz en cualquier dirección debido a su alta reflectividad, con lo que la condición de resonancia puede alcanzarse a cualquier ángulo de propagación. Por otro lado, un dispositivo GMR suele ofrecer un mayor factor de calidad (menor anchura del pico de resonancia) que uno basado en MaGMR debido a las pérdidas ópticas introducidas por el metal.

La posición del mínimo de reflectancia relacionado con el efecto MaGMR depende de cómo es la guía de onda (índice de refracción, espesor), de cómo es la red de difracción dispuesta sobre ella (periodo, índice efectivo y profundidad de la red) y del ángulo de la luz incidente.⁷⁴ De esta manera, un aumento del índice efectivo por adsorción de material en la superficie de la red de difracción provocará un desplazamiento de la resonancia MaGMR a mayores longitudes de onda.

Fig. 4. Esquema genérico de la respuesta espectral (reflectancia) de un dispositivo GMR y otro MaGMR similares. La resonancia GMR (negro) es un máximo de reflectancia proveniente de la energía re-emitida por la estructura, mientras que la resonancia MaGMR (gris) es un mínimo de reflectancia debido a la disipación de la energía del modo guiado causada por el metal.

3. Receptores biomiméticos.

Por definición, los receptores⁷⁵ de un biosensor son de naturaleza biológica (anticuerpos, antígenos, ADN, enzimas, etc.). El elemento de reconocimiento de un biosensor determina la selectividad del mismo, y los receptores biológicos o naturales presentan, habitualmente, una gran afinidad por la molécula objetivo. Sin embargo, los receptores biológicos suelen requerir unas condiciones de almacenamiento, procesamiento y uso muy restringidas, necesarias para evitar su degradación.

Una alternativa a los receptores biológicos son los receptores sintéticos biomiméticos, es decir, que mimetizan –imitan– la función de los bio-receptores. Así, los sensores que utilizan este tipo de receptores artificiales se denominan biomiméticos.

Uno de los tipos de receptores biomiméticos más interesantes, tanto por sus características físico-químicas como por sus aplicaciones, son los polímeros de impronta molecular (MIPs, *molecularly imprinted polymers*). Un MIP⁷⁶⁻⁷⁹ es, en esencia, una matriz polimérica estable y porosa que contiene cavidades a escala molecular que funcionan como sitios de reconocimiento de moléculas,⁸⁰ mimetizando el proceso de reconocimiento encontrado en la naturaleza.

El proceso de síntesis de un MIP (Figura 5) consiste en el entrecruzamiento de una mezcla de prepolimerización que contiene las moléculas de analito a modo de plantillas. Tras el proceso de entrecruzamiento, las moléculas plantilla son extraídas del polímero entrecruzado mediante un proceso que depende del tipo de unión de las moléculas plantilla con la matriz (covalente o no covalente) y basado en factores como la porosidad del material, pH y tensiones mecánicas (hinchamiento del polímero en contacto con un disolvente). La extracción de las plantillas deja cavidades capaces de capturar posteriormente moléculas de analito con alta afinidad y selectividad.^{81,82}

Fig. 5. Diagrama esquemático de la síntesis de un MIP.

Los MIPs han encontrado aplicaciones en campos diversos tales como la catálisis, cromatografía, inmunoensayos, sensores químicos y preparación de muestras,⁸³⁻⁸⁷ y actualmente son comercializados por distintas empresas.⁸⁸

Las principales ventajas de los MIPs frente a los receptores biológicos son: robustez química y física, posibilidad de extensa reutilización, fácil síntesis y procesabilidad, compatibilidad con disolventes orgánicos, posibilidad de almacenamiento durante largo tiempo y de fabricar receptores no disponibles en la naturaleza. Estas ventajas hacen de los MIPs materiales funcionales especialmente indicados para implementar biochips multianálisis de bajo coste basados en matrices de sensores biomiméticos utilizando técnicas convencionales⁸⁹⁻⁹² de microfabricación.

4. Nanoestructuración de biosensores.

En el campo de los biosensores existe una tendencia general hacia la miniaturización, y en concreto, al desarrollo de superficies sensoras estructuradas a escala nanométrica.^{37,66,68,72-74,77, 83,89,115-118}

Entre las principales ventajas que la nanoestructuración conlleva está la obtención de una gran relación superficie-volumen, que facilita el acceso de las moléculas de interés a los elementos de reconocimiento, pudiendo repercutir, a su vez, tanto en un aumento de la sensibilidad como en una mayor velocidad de respuesta. La reducción del tamaño del dispositivo sensor implica, además, la posibilidad de utilizar volúmenes muy reducidos de muestras y un bajo consumo energético del dispositivo. Otras ventajas destacadas de la reducción de tamaño son el incremento de la densidad espacial de sensores y, por tanto, de la capacidad de multiplexado, así como la portabilidad de equipos sensores que permitan análisis in-situ donde fuere necesario.

La micro/nano estructuración de biosensores se puede realizar mediante dos tipos de aproximaciones tecnológicas:¹⁰³⁻¹⁰⁶ *bottom-up* y *top-down*. Las técnicas *bottom-up* («de abajo a arriba») persiguen ordenar componentes pequeños en ensamblados más complejos, por ejemplo, mediante depósito¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ o crecimiento^{110,111} de material, o también por autoensamblado molecular^{112,113} o de nanopartículas.¹¹⁴ Las técnicas *top-down* («de arriba hacia abajo») buscan crear componentes pequeños a partir de materiales volumétricos mediante la utilización de herramientas que dirijan su ensamblado y den forma a la nanoestructura, siendo ejemplos típicos la litografía por haz de electrones (EBL, *electron beam lithography*)¹¹⁵⁻¹¹⁸ y la técnica de haces de iones enfocados¹¹⁹ (FIB, *focused ion beam*). En ambas aproximaciones se persigue el desarrollo de tecnologías que cumplan los requisitos de simplicidad, bajo coste, alta reproducibilidad y alto rendimiento.

En esta Tesis se ha utilizado la técnica EBL como herramienta básica de nanoestructuración para crear tres tipos de superficies nanoestructuradas sensoras basadas en los conceptos, materiales y principios de (bio)detección descritos en los apartados anteriores. Estas configuraciones son: 1) películas nanoestructuradas de MIP, 2) redes plasmónicas de nanoagujeros en aluminio, y 3) estructuras del tipo MaGMR basadas en redes de difracción 2D de nanopilares poliméricos. Es conveniente, por tanto, hacer una breve descripción tanto de la técnica de EBL como del estado del arte de los procesos de fabricación utilizados habitualmente para crear nanoestructuras sensoras de los tipos considerados en esta Tesis.

4.1. Litografía por haz de electrones (EBL).

La herramienta de nanoestructuración utilizada en el desarrollo de esta Tesis ha sido la EBL, técnica con la que es posible obtener nanopatrones de diseño arbitrario mediante la exposición de resinas a un haz de electrones altamente enfocado. Los equipos de EBL son una evolución de los microscopios electrónicos de barrido (SEM, *scanning electron microscope*) con un programa informático capaz de representar diseños y dibujarlos con el haz de electrones en las coordenadas y en las condiciones fijadas, y el origen de su desarrollo se remonta a finales de la década de 1960.^{120,121}

Las ventajas que ofrece la técnica EBL para la investigación son enormes, pues es posible definir nanopatrones de muy diversas geometrías con gran resolución, alta densidad, excelente uniformidad y gran reproducibilidad. A diferencia de la litografía por nanoimpresión (*nanoimprint lithography*, NIL),¹²²⁻¹²⁴ no precisa de un molde pues es una técnica de «no contacto», y ofrece mayores velocidades de escritura que la litografía FIB^{119,125-127} además de no presentar el inconveniente derivado de la contaminación por iones de esta última. Las principales limitaciones de la técnica EBL son el elevado coste del equipo y los tiempos prolongados que puede requerir para obtener estructuras grandes o complejas, por lo que esta técnica no es la más apropiada para producción en masa.

Durante el proceso de escritura (irradiación) electrónica, la mayor parte de los electrones atraviesa la resina sin interacción alguna y penetran en el sustrato. Entre las posibles interacciones del haz de electrones con la resina se encuentran las colisiones elásticas de baja energía que desvían ligeramente las trayectorias de los electrones, produciendo un ensanchamiento efectivo del haz. Otra fracción de los electrones colisionan y son repelidos o desviados con un cambio de dirección importante (retrodispersión). Y otra fracción colisiona de forma inelástica con la resina, rompiendo enlaces químicos y, por ionización, produciendo electrones secundarios de baja energía. Finalmente, si el sustrato o la estructura sustrato+resina es aislante se cargará electrostáticamente, y como la carga no puede ser disipada afectará al enfoque y a la resolución del haz de electrones.

Cuanto menor es la energía del haz y/o mayor espesor tiene la resina depositada sobre el sustrato, existirán mayor dispersión y efectos de proximidad, es decir, exposición del material a electrones en posiciones adyacentes a las expuestas de manera directa. También, cuanto mayor es la energía del haz, mayor distancia pueden alcanzar en el plano del sustrato los electrones retrodispersados. Todos estos efectos reducen y limitan la resolución de la técnica EBL, aunque los efectos de proximidad pueden compensarse hasta cierto punto con un diseño adecuado del patrón de exposición.

La dosis electrónica recibida por la resina modifica sus propiedades químicas, lo cual se traduce en un cambio en la solubilidad del material irradiado en determinados disolventes líquidos (reveladores). Si la región expuesta es eliminada durante el revelado, permaneciendo la parte no irradiada, la resina se denomina positiva. En caso contrario, es decir, cuando la parte expuesta es la que permanece y la región no irradiada es eliminada tras el revelado, se trata de una resina negativa.

Las resinas positivas son comúnmente utilizadas en EBL, especialmente la PMMA (polimetilmetacrilato).¹²⁰ Sin embargo, hay una serie de aplicaciones, tales como la fabricación de nanoestructuras poliméricas permanentes en microfluídica¹²⁸ y óptica integrada,^{129,130} en las que el uso de resinas de comportamiento negativo es especialmente indicado.^{115,131-133}

Las resinas negativas que ofrecen mayor sensibilidad y, por tanto, requieren menos tiempo de exposición al haz de electrones, son las amplificadas químicamente (CARs, *chemically amplified resists*), que contienen un generador fotoácido (PAG, *photo acid generator*) que reacciona (se activa) al ser expuesto, ya sea a luz ultravioleta o a un haz de electrones, y actúa como catalizador para el posterior entrecruzamiento de la resina mediante un tratamiento térmico (normalmente calentamiento en horno o placa calefactora). Las regiones no entrecruzadas se disolverán en el revelador, permaneciendo las entrecruzadas (irradiadas). Aunque las CARs suelen ofrecer mayor sensibilidad, la existencia y difusión de radicales provenientes del PAG pueden limitar la resolución de las nanoestructuras. Además, el precio de las CARs es mayor que el de las resinas que no hacen uso de un PAG y requieren un paso extra en el proceso litográfico (entrecruzamiento térmico). Por ello, la síntesis de resinas no amplificadas químicamente con alta sensibilidad al haz de electrones es deseable con objeto de reducir lo máximo posible el tiempo de exposición.

4.2. Estado del arte de la fabricación de superficies nanoestructuradas estudiadas en la Tesis.

A continuación se exponen los métodos empleados habitualmente para la creación de sensores biomiméticos basados en MIPs, de redes periódicas de nanoagujeros en películas metálicas y de redes de nanopilares de material polimérico.

4.2.1. Nanoestructuración de películas de MIP.

Diversas técnicas¹³⁴ han sido utilizadas para lograr la micro/nanoestructuración de MIPs debido a las ventajas ya comentadas que ofrece la miniaturización. Éstas pueden clasificarse en técnicas de «contacto» y «sin contacto», en función de si requieren un contacto físico con la mezcla de prepolimerización o no. Las técnicas de contacto más relevantes demostradas hasta la fecha son: el depósito de material con una micropunta,¹³⁵ litografía blanda¹³⁶ (*soft-lithography*) y nanoimpresión^{137–139} (*nanoimprinting*). Debido al contacto físico que implican, estas técnicas pueden presentar diferentes inconvenientes, como la incompatibilidad química de las superficies que interaccionan, el deterioro del material debido al propio contacto y la posibilidad de contaminación.

Por tanto, son preferibles técnicas sin contacto para evitar estos problemas. Ejemplos de estas técnicas son la micro-estereo litografía por haz láser,⁹⁰ la fotolitografía UV,^{89,92} y la microestructuración mediante un haz láser de CO₂.¹⁴⁰ Sin embargo, todas estas técnicas suelen presentar una resolución lateral superior a una micra. Sería deseable, pues, el desarrollo de una técnica de no contacto que permitiese obtener resoluciones laterales inferiores a una micra. En este sentido, la escritura directa mediante EBL se presenta como una candidata ideal ya que cumple ambos requisitos aunque, hasta la realización de esta Tesis, nunca antes había sido usada para nanoestructurar MIPs de forma directa.

4.2.2. Red de nanoagujeros en películas de metal.

Varios métodos litográficos^{98,103,104} son susceptibles de definir agujeros de diámetro inferior a una micra, llegando a tan sólo unas decenas de nanómetros. Entre ellos se encuentran la EBL,¹⁴¹ utilizada en este trabajo, FIB,^{96,142} litografía DUV (*deep ultraviolet*),¹⁴³ litografía por interferencia u holográfica,¹⁴⁴ nanoimpresión,^{100,145} litografía coloidal a partir de nanoesferas,^{141,146} etc. Tal es la variedad de técnicas que desde hace más de una década se han desarrollado multitud de dispositivos plasmónicos

basados en redes de agujeros submicrométricos realizados en películas metálicas, principalmente de oro y plata.^{51,95–98,147–153} Cada uno de los métodos litográficos enumerados tiene sus ventajas e inconvenientes, y su elección está condicionada por factores tales como su empleo para investigación o prototipado –para lo cual EBL y FIB son adecuadas– o su potencial uso para producción en masa –para lo que las técnicas de nanoimpresión UV,⁹⁹ nanoimpresión por transferencia^{100,145} o litografía DUV¹⁴³ serían más idóneas.

4.2.3. Red de nanopilares de material polimérico.

Otra aplicación de la técnica EBL con relación directa con esta Tesis es la capacidad para definir nanopilares mediante el empleo de resinas negativas. En los últimos años se han publicado numerosos trabajos basados en redes de nanopilares aplicados a la biodetección empleando diferentes técnicas y materiales,^{154–158} y las técnicas litográficas mencionadas anteriormente ofrecen la posibilidad de nanoestructurar resinas poliméricas y crear, en un número reducido de etapas, nanocolumnas con alta resolución y relación de aspecto.^{128,159,160} Un ejemplo relevante es la demostración de redes periódicas de nanopilares de SU–8 mediante EBL sobre sustratos de SiO₂/Si¹⁵⁹ e ITO (*indium tin oxide*, óxido de indio y estaño)/SiO₂,¹⁶⁰ con funcionalidad demostrada como biosensores ópticos sin marcadores basados en medidas TF–RIS (*thin–film reflectance interference spectroscopy*, espectroscopía de interferencia de reflectancia de lámina delgada). Estas plataformas dieron como resultado límites de detección de ~10 ng mL⁻¹ para antiBSA (*anti bovine serum albumin*, anticuerpo de la albúmina de suero bovino)¹⁵⁹ y de anticuerpos antigestrinona¹⁶⁰ a través del control de los desplazamientos espectrales de las resonancias características monitorizadas. Sin embargo, con el fin de aumentar el número de aplicaciones a aquellos que requieren límites de detección más pequeños y/o que permitan el uso de equipos económicos como espectrofotómetros (que suelen poseer resoluciones de longitud de onda modestas), sería necesario mejorar la sensibilidad y la calidad de la respuesta espectral. En concreto, una estructura sensora de nanopilares que podría ofrecer unas prestaciones superiores a las basadas en TF–RIS sería una que presentase el efecto de MaGMR,⁷⁴ no habiéndose demostrado hasta esta Tesis, de acuerdo al conocimiento del autor, ningún dispositivo de este tipo basado en redes de nanopilares poliméricos.

5. Objetivos de la Tesis.

El objetivo principal de esta Tesis es el desarrollo (fabricación y caracterización) de superficies biosensoras nanoestructuradas de altas prestaciones basadas tanto en receptores naturales como sintéticos. Para ello se han investigado aproximaciones novedosas relativas al procesado, a los materiales involucrados y a las arquitecturas de las nanoestructuras fabricadas. Se ha perseguido que la realización de los dispositivos basados en películas delgadas nanoestructuradas se pueda llevar a cabo mediante técnicas convencionales de micro y nanofabricación con el fin de facilitar su posterior desarrollo y optimización con vistas a una potencial comercialización de los dispositivos estudiados.

Los objetivos particulares de la Tesis son tres:

- 1) Desarrollo de una nueva ruta tecnológica para fabricar sensores biomiméticos basados en películas de polímeros de impronta molecular (MIPs) nanoestructurados mediante escritura directa con EBL.
- 2) Desarrollo de procesos tecnológicos que permitan la incorporación de nuevos materiales, en concreto aluminio y policarbonato, en plataformas biosensoras plasmónicas basadas en matrices de nanoagujeros.
- 3) Desarrollo de nuevas arquitecturas de superficies biosensoras de redes de nanopilares poliméricos basadas en nuevos efectos ópticos.

IV. Sección experimental.

En esta sección se describen los métodos y materiales involucrados en el desarrollo de biosensores ópticos y sensores biomiméticos basados en superficies nanoestructuradas, así como las técnicas empleadas para su caracterización.

La mayor parte de la presente Tesis, correspondiente a la fabricación y optimización de los dispositivos y también a parte de la caracterización de los mismos, se realizó en el Instituto de Sistemas Optoelectrónicos y Microtecnología (ISOM) de la UPM, que cuenta con una sala blanca (Figura 6) con equipos de micro/nanofabricación tales como: equipos de fotolitografía y EBL para la micro/nanoestructuración de películas poliméricas, evaporadoras (Joule y de haz de electrones) para depositar capas delgadas de metales, y equipos y técnicas de ataque, tanto húmedo en sala química, como seco, contando para ello con una máquina de ataque reactivo por iones (RIE, *reactive ion etching*) y otra de plasma acoplado inductivamente (ICP, *inductively coupled plasma*).

Fig. 6. Plano de la sala blanca del ISOM. Durante esta Tesis se utilizaron de manera habitual las siguientes salas: tecnología (A), fotolitografía (C), vestuario (E), química (F), metalización (G) y procesado (H). Rodeando la sala blanca se encuentran las salas auxiliares y de caracterización.

La sala blanca del ISOM, climatizada a 20 °C y accesible únicamente con mono integral con capucha, es de clase 10 000 (ISO 7) para todas las salas excepto para la que contiene los equipos de fotolitografía y EBL, que es de clase 1000 (ISO 6) en la mitad de la sala donde se sitúan tales equipos y de clase 100 (ISO 5) en la otra mitad, en la que están instaladas las campanas de extracción para manipulación química. La clase se refiere al número máximo de partículas por metro cúbico de aire (Tabla 1).

Clase ISO	Límites máximos de concentración (partículas por m ³ de aire) para las partículas de tamaño igual o superior al indicado						Categoría de la sala
	≥ 0,1 μm	≥ 0,2 μm	≥ 0,3 μm	≥ 0,5 μm	≥ 1,0 μm	≥ 5,0 μm	
ISO 1	10	2,37	1,02	0,35	0,083	0,0029	
ISO 2	100	23,7	10,2	3,5	0,83	0,029	
ISO 3	1000	237	102	35	8,3	0,29	1
ISO 4	10 000	2370	1020	352	83	2,9	10
ISO 5	100 000	23 700	10 200	3520	832	29,3	100
ISO 6	1,0×10 ⁶	237 000	102 000	35 200	8320	293	1000
ISO 7	1,0×10 ⁷	2,37×10 ⁶	1,02×10 ⁶	352 000	83 200	2930	10 000
ISO 8	1,0×10 ⁸	2,37×10 ⁷	1,02×10 ⁷	3,5×10 ⁶	832 000	29 300	100 000
ISO 9	1,0×10 ⁹	2,37×10 ⁸	1,02×10 ⁸	3,5×10 ⁷	8,3×10 ⁶	293 000	Aire sin filtrado

Tabla 1. Límites máximos de concentración (partículas por metro cúbico de aire) para las partículas de tamaño igual o superior al indicado y su clasificación correspondiente. En color gris se señalan las categorías existentes en la sala limpia del ISOM.

Además, el ISOM dispone de laboratorios de caracterización óptica y estructural con equipos de última generación en los que se ha llevado a cabo la caracterización y estudio de los dispositivos y estructuras fabricadas.

Aparte, durante el desarrollo de la Tesis se colaboró con otros grupos de investigación, lo cual permitió el empleo de técnicas de caracterización adicionales y síntesis de materiales no disponibles en el ISOM. En concreto, la caracterización mediante resonancia magnética nuclear (NMR, *nuclear magnetic resonance*), la funcionalización de superficies nanoestructuradas, bioensayos y ensayos con MIPs, así como la caracterización de fotoluminiscencia se llevaron a cabo gracias al Grupo de Sensores Químicos Ópticos y Fotoquímica Aplicada (GSOLFA) de la Universidad Complutense de Madrid (responsable: Profesora María Cruz Moreno-Bondi), dentro del ámbito del Campus de Excelencia Internacional CEI-Moncloa. Parte de los bioensayos también se realizaron gracias a la colaboración con el Grupo SYM (Señal y medida en Química) del Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universidad Politécnica de Valencia (responsable: Profesor Ángel Maquieira Catalá). La caracterización óptica de los sensores basados en redes de nanopilares y diversos ensayos para evaluar la sensibilidad de las estructuras se llevó a cabo en los laboratorios del Grupo de Micro-nano Fotónica y Biofotónica (responsable: Profesor Miguel Holgado Bolaños) del Centro de Tecnología Biomédica (CTB) de la UPM. La caracterización de superficies mediante espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS, *X-ray photoelectron spectroscopy*) y espectroscopía micro-Raman se realizó gracias al Grupo de Energía y Química Sostenibles (EQS) del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC (responsable: Profesor José Luis G. Fierro).

A continuación se detallan los materiales, métodos, equipos y técnicas de caracterización principales empleados en la presente Tesis.

1. Técnicas e instrumentación.

a. Litografía por haz de electrones.

El equipo utilizado de EBL durante toda la Tesis es un equipo de alta resolución CRESTEC CABL-9000C (voltaje de aceleración = 50 kV, corriente del haz = 50 pA – 2 nA) (Figura 7). Cuenta con un filamento de ZrO/W como fuente de electrones de emisión de campo (TFE, *thermal field emission*). Ajustado a 50 kV de voltaje de aceleración, el haz es capaz de alcanzar anchuras de línea por debajo de 2 nm. El interior del equipo trabaja en vacío (presiones del orden de 10^{-5} Pa en el interior de la cámara donde se efectúa la litografía, y de 10^{-7} Pa en la columna que contiene el filamento) para reducir la dispersión de electrones al chocar con el gas atmosférico.

Fig. 7. Fotografía del equipo EBL utilizado durante la Tesis, en la sala de fotolitografía y EBL con luz amarilla con filtración UV de la sala limpia del ISOM. Esta sala es de clase 1000 (ISO 6) en la mitad de la sala donde se sitúa el equipo EBL, y de clase 100 (ISO 5) en la zona en la que están instaladas las campanas de extracción para manipulación química y preparación de muestras.

Inicialmente las muestras son emplazadas en el portamuestras, con la cara superior en contacto con él mediante una pieza metálica cuyo rol es el de toma de tierra y que sirve también para inmovilizar la muestra, algo que también puede hacerse empleando cinta adhesiva conductora específica para esta finalidad (no emite vapores provenientes del adhesivo). A continuación, el portamuestras es introducido a una cámara previa en la que se hace vacío hasta que se iguala la presión con la que hay en la cámara donde se realiza la litografía. La compuerta entre ambas cámaras se abre automáticamente y se puede introducir el portamuestras, extrayendo el brazo que va atornillado a él y cerrando la compuerta intermedia.

La profundidad de enfoque del haz de electrones suele ser muy reducida en equipos EBL, de varias micras solamente, por lo que las muestras deben ser planas y

quedar perpendiculares al haz. Para mantener el enfoque, el equipo cuenta con un sensor láser que mantiene adecuadamente la distancia del haz a la superficie de la muestra durante la litografía.

Primero es necesario seleccionar las condiciones de campo en las que trabajará el equipo, que determina el tamaño máximo de escritura (campo cuadrado, generalmente entre 60 y 1200 μm de lado) y la densidad de puntos de escritura (entre 4000 y 240 000). Fijados estos parámetros, es posible diseñar e importar en el programa patrones en los que previamente se ha determinado el espaciado de los disparos a realizar, espaciado que depende de tales parámetros.

Por ejemplo, unos parámetros habituales en esta Tesis para patrones 2D fueron 300 μm de campo y 240 000 puntos, que implica una red cuadrada de puntos posibles de disparo de periodo 1,25 nm, por lo que puede considerarse que un píxel tendrá exactamente 1,5625 nm². Teniendo en cuenta que $D = Q \times A^{-1}$ y $I = Q \times t^{-1}$, donde D es la dosis aplicada, Q es la carga recibida (C, culombio), A es el área expuesta (cm²), I es la intensidad de la corriente (A, amperios), y t es el tiempo (s) de exposición que se fija en el programa, resulta $D = I \times t \times A^{-1}$, obteniéndose una dosis de 3,2 mC cm⁻² para un tiempo de exposición de 1 μs . Con esta equivalencia, es posible determinar la densidad de carga de un patrón periódico (como en el caso de las redes de nanoagujeros y nanopilares de esta Tesis) espaciando los disparos, teniendo en cuenta para ello que una longitud de 1000 nm contiene 800 divisiones (240 000 puntos / 300 000 nm). En estas condiciones, un valor de espaciado igual a 400 divisiones, por ejemplo, introducido en el diseño de un patrón, equivaldría a una separación entre disparos, o motivos, de 500 nm.

Una vez seleccionada la corriente de trabajo y después de un tiempo prudencial para que se estabilice (al menos 20 minutos, según la experiencia con el equipo), la corriente es ajustada manualmente para que su valor sea exactamente el deseado.

A continuación es necesario ajustar cuidadosamente el enfoque y el astigmatismo del haz de electrones, también el brillo y el contraste, y ejecutar las correcciones automáticas de comprobación de marcas (comprobación de la alineación del haz y la columna que contiene al filamento, calibración del campo de escritura). Cuando acaban los ajustes es posible lanzar la litografía, normalmente tomando como referencia un borde de la muestra en el que se ha comprobado de nuevo el enfoque y se ha ajustado la altura a la que se expondrá la muestra, o utilizando marcas de alineación previamente realizadas, asegurando así el correcto posicionamiento del patrón expuesto en la superficie de la muestra y evitando exponer la zona de interés.

La descripción de la fabricación con EBL de los diferentes tipos de dispositivos (nanoMIPs, redes de nanoagujeros en aluminio, y matrices de nanopilares de SU-8) se detalla en las secciones correspondientes posteriores.

b. Fotolitografía.

Esta técnica, ampliamente extendida, está basada en la exposición de una película delgada de resina a luz UV, que modificará la solubilidad de la zona expuesta debido a roturas de enlaces y/o de cadenas poliméricas. Para definir estructuras se utilizan máscaras transparentes (p.ej. de cuarzo) con motivos opacos (p.ej. de cromo) realizados habitualmente con EBL. La principal ventaja es la posibilidad de producir microestructuras en gran cantidad empleando poco tiempo. Sin embargo, no es posible conseguir los tamaños y la resolución que permite obtener la técnica EBL.

Durante esta Tesis, en el trabajo relacionado con MIPs se utilizó una alineadora SUSS MicroTec MJB4 equipada con una lámpara de luz DUV de 255 nm de Xe-Hg y 650 W de potencia, cuya resolución es menor de 500 nm. Estos parámetros producen una intensidad de 20 mW cm^{-2} , según el fabricante.

c. Ataque húmedo.

El ataque húmedo es un método habitual en microelectrónica para eliminar material y transferir estructuras fabricadas con técnicas litográficas, permitiendo un procesamiento rápido de obleas enteras. La muestra es sumergida en una disolución química que ataca y disuelve el material expuesto, sin alterar o atacando más despacio otro material que actúa como máscara, generalmente la resina que conforma las estructuras provenientes de la litografía.

Un aspecto esencial a tener en cuenta es la isotropía del proceso direccional (Figura 8). Si el material es amorfo o policristalino será atacado en todas las direcciones, y si es cristalino puede presentar diferentes velocidades de ataque dependiendo del plano cristalino. Y otro aspecto fundamental es la selectividad del ataque, es decir, la relación entre la velocidad de ataque de distintos materiales, en concreto entre el material objetivo y el que actúa de máscara, que debe ser suficiente para permitir definir la estructura deseada.

El ataque húmedo se empleó durante esta Tesis para estudiar la selectividad de ataque de algunos polímeros estudiados durante el trabajo con MIPs.

Fig. 8. Diagrama esquemático de un ataque húmedo isotrópico.

d. Ataque seco (ICP y RIE).

El ataque seco mediante ICP es una variación del ataque por RIE. En ambos se genera un plasma compuesto de radicales reactivos a partir de un flujo de gas a baja presión. Si la química es la adecuada, este plasma reaccionará y atacará un material expuesto a él. La diferencia entre ambos radica en el método para generar el plasma: un campo electromagnético en el RIE y un campo magnético activado por una fuente de radiofrecuencia (RF) en el ICP.

La tecnología ICP data de la década de 1960,¹⁶¹ y es empleada desde entonces para ionizar átomos y moléculas mediante excitaciones por colisión provocadas por el campo magnético. Los radicales formados se emplean para bombardear la superficie a atacar, eliminando átomos químicamente, mecánicamente o mediante ambos mecanismos, aunque también encuentran aplicación en técnicas espectrométricas.

Además de la potencia RF aplicada para generar el plasma, es posible aplicar un voltaje adicional al plato donde se depositan las muestras que dirige y concentra un plasma de alta densidad hacia ellas, logrando un ataque direccional (anisotrópico) y más rápido (Figura 9).

Fig. 9. Diagrama esquemático de un ataque seco direccional.

El ataque de los dispositivos se realizó con un equipo NGP80 ICP65 de 13,56 MHz de frecuencia de Oxford Instruments (Figura 10), empleando un plato portamuestras circular y conductor de grafito, y fue controlado de manera visual mediante un monitor de televisión y también mediante un detector de punto final (láser de 670 nm Global Laser Technology Solutions, Intellevation LEP 400). Este último consiste en un láser que incide perpendicularmente sobre la superficie, registrándose en tiempo real las variaciones de reflectividad en materiales transparentes o traslúcidos, obteniéndose resonancias características Fabry–Pérot. Introduciendo los valores de los índices de refracción de los materiales involucrados en el programa del equipo, es posible monitorizar el proceso y hallar la tasa de ataque. Aparte, el equipo cuenta con un plato portamuestras cuya temperatura puede ser regulada (se empleó una temperatura de 20 °C en todos los ataques realizados en esta Tesis).

Fig. 10. Dos vistas del equipo ICP, ampliamente utilizado durante esta Tesis. El equipo consta, principalmente, del equipo ICP en sí (que se muestra abierto en la imagen derecha), la instalación de conducciones de gases de la pared, los ordenadores de control de proceso y el monitor de televisión.

El ataque ICP fue empleado principalmente durante la fabricación de biosensores plasmónicos basados en redes de nanoagujeros en aluminio. Las otras dos finalidades emplearon plasma de oxígeno, primero una etapa suave para eliminar los restos de resina^{162,163} una vez que la transferencia de nanoagujeros fue completa, y finalmente una etapa más larga y a mayor potencia para pasivar la superficie de aluminio, método que se describe en el punto 3.2.4 de la sección experimental.

En cuanto al ataque con RIE, se utilizó un equipo Plasmalab μ 80 para atacar sustratos de silicio (100) con diversas resinas depositadas sobre ellos con el fin de determinar la selectividad del ataque.

e. Microscopio óptico.

Microscopio óptico Leica Leitz DMRX con diversos filtros, polarizadores, atenuadores, un cubo de fluorescencia y objetivos con aumentos disponibles entre 2,5× y 1000× para verificar las estructuras fabricadas y los resultados de cada proceso. Con este microscopio fue posible ver y fotografiar muestras tanto en reflexión como en transmisión, además de comprobar cualitativamente la fotoluminiscencia (PL, *photoluminescence*) de determinadas muestras.

f. Microscopio electrónico.

Microscopio electrónico FEI Inspect F50, capaz de tomar imágenes de alta resolución, incluso de materiales dieléctricos, debido a la capacidad de trabajar a voltajes muy reducidos, del orden de 1 kV y hasta 30 kV.

Con él se estudiaron multitud de muestras durante la Tesis, comprobando la geometría, tamaño y periodo de las redes de nanoagujeros y nanopilares fabricados. Se utilizó ampliamente la posibilidad de inclinar el portamuestras para ver las redes de nanopilares tanto desde una vista cenital como desde un punto de vista casi paralelo al sustrato. La sección transversal de la nanoestructura completa de SU-8 (nanopilares y material entrecruzado entre ellos) fue estudiada después de tratar algunas muestras con disolución acuosa de KOH (10 g L^{-1}) con objeto de disolver y eliminar el aluminio depositado inicialmente.

g. Microscopio de fuerzas atómicas.

Microscopio de fuerzas atómicas AFM (*atomic force microscope*) Digital Instruments MultiMode Scanning Probe Microscope Model MMAFM-2, equipado con puntas (cantiléver) Veeco fabricadas en silicio dopado con antimonio (n) de 0,01–0,025 $\Omega \text{ cm}$ (Figura 11), y con cámara de video para controlar la posición de la punta respecto a la muestra.

Fig. 11. AFM empleado en la presente Tesis (laboratorios del ISOM).

Se empleó el modo de contacto intermitente (*tapping mode*), en el que la punta, flexible y piezoeléctrica, contacta muy levemente con la superficie, vibrando en la frecuencia de resonancia de la punta o muy cerca de ella, evitando de esta forma alterar de forma significativa la superficie de materiales blandos, como algunos materiales poliméricos estudiados durante esta Tesis. En modo de contacto intermitente, las medidas topográficas vienen determinadas por la interacción de la punta con la superficie mediante fuerzas de Van der Waals.

Este equipo emplea un láser para iluminar la parte superior de la punta, y la luz reflejada es recogida por un fotodiodo sensible a la posición. Las variaciones del reflejo del láser que recoge el fotodiodo son convertidas en el mapa topográfico de la superficie medida.

Esta técnica permite realizar medidas topográficas a escala nanométrica con la ventaja de no necesitar trabajar en vacío. Además, también es posible realizar medidas de rugosidad superficial mediante el análisis de las imágenes con el programa de gestión de imágenes del equipo (Nanoscope V531r1). El valor obtenido de RMS (*Root Mean Square*, raíz cuadrada media o media cuadrática), tal como su nombre indica, se obtiene del valor medio cuadrático de las desviaciones del perfil considerando la profundidad de las irregularidades de la superficie.

h. Perfilómetro mecánico.

Perfilómetro mecánico Alpha-Step IQ. Fue usado ampliamente para medir la altura de los motivos fabricados y los espesores de resinas o metales depositados, y en algunos para monitorizar el transcurso de un ataque químico realizado en diferentes etapas. Los barridos son individuales y lineales, hasta de 10 mm de longitud, desde 80 Å hasta 2 mm en espesor, y pueden realizarse a velocidades desde 2 hasta 200 $\mu\text{m s}^{-1}$. La punta del equipo tiene un radio de 5 μm , por lo que existen limitaciones para que el barrido reproduzca fielmente contornos definidos perfectamente con ángulos rectos, que quedarán ligeramente redondeados en la representación gráfica.

Las ventajas principales es que trabaja sin necesidad de vacío, de un modo muy rápido, y es capaz de discernir espesores con varios nanómetros de diferencia solamente. De hecho, la resolución proporcionada por el fabricante está por debajo del angstrom.

i. Interferómetro óptico.

Interferómetro óptico Ambios Xi-100 3D para medir superficies con estructuras 3D, equipado con objetivos de 10 $\times$ y 50 $\times$. Fue empleado de manera similar al perfilómetro mecánico con la ventaja principal de que las medidas de espesor se realizaron en áreas 2D seleccionables con el programa del equipo, no en barridos lineales, y que las medidas son extremadamente rápidas.

Este equipo también es capaz de realizar medidas de rugosidad, como el AFM pero sin contacto con la muestra, aunque los motivos debían ser micrométricos.

Este equipo se usó principalmente para medir espesores y rugosidad de microestructuras fabricadas en materiales como silicio, cuenta con una resolución de hasta 0,2 nm, y permite la visualización de las estructuras en 3D.

j. Analizador de capas delgadas.

Equipo Filmetrics Thin-Film Analyzer F20, con una fuente UV-VIS acoplada a una fibra óptica Hamamatsu L10290. Este equipo se utilizó principalmente para caracterizar ópticamente materiales poliméricos y evaluar procesos de oxidación y pasivación de películas de aluminio mediante la determinación del espesor y del índice de refracción. El intervalo de espesores que es capaz de medir es 15 nm – 70 μm , empleando un intervalo de longitudes de onda entre 380 y 1050 nm proveniente de dos lámparas, una halógena y otra de deuterio.

Cada medida produce un espectro de reflectancia cuya amplitud y periodicidad viene determinada por el espesor y composición del material. La reflexión medida contiene luz reflejada por la superficie y luz que atravesó el material y que se reflejó de vuelta, creando un patrón de interferencias constructivas y destructivas. La fracción de la luz reflejada por la intercara entre diferentes medios queda determinada por las discontinuidades del índice de refracción y del coeficiente de extinción (k), que son constantes ópticas características de cada material, y describen cómo se propaga la luz a través de una capa delgada. El índice de refracción es la relación entre la velocidad de la luz en el vacío respecto a la velocidad de la luz dentro del material ($RI = 1$ para el aire), y en materiales reales el índice de refracción varía con la longitud de onda debido a la dispersión existente. La constante k es una medida de cuánta luz es absorbida por el material.

Teniendo en cuenta estos factores, midiendo una capa delgada de un material conocido es posible determinar su espesor, y también es posible determinar el índice de refracción si previamente se conoce el espesor de la película.

k. Espectrofotómetro UV-VIS.

La transmitancia óptica (fracción de luz incidente que atraviesa un medio) se midió con un espectrofotómetro Jasco V-650 de intervalo UV-VIS. Cuenta con dos lámparas: una de deuterio (190–350 nm) y otra halógena (330–900 nm). Las muestras son expuestas a luz monocromática después de que la luz haya pasado por un monocromador (rejilla de 1200 líneas por milímetro) que separa y selecciona luz, y la intensidad de luz transmitida es recogida y medida por un tubo fotomultiplicador como detector. Las medidas pueden realizarse mediante un barrido espectral o fijando la longitud de onda.

Fig. 12. Vista cenital del interior de la parte accesible del espectrofotómetro empleado durante la Tesis, configurado con la esfera integradora. La línea blanca muestra esquemáticamente la trayectoria del haz de luz visible.

En la mayoría de las ocasiones se utilizó una esfera integradora ISV-722 instalada (Figura 12) de 60 mm de diámetro. La esfera integradora es una esfera hueca recubierta en su interior de material altamente reflectante (sulfato de bario) que genera reflexión difusa, y recoge toda la luz transmitida por una muestra situada en la entrada independientemente de que se trate de transmisión directa o dispersión. La luz, procedente de las reflexiones en las paredes internas de la esfera, sale por otra abertura y es conducida al detector sin haber perdido apenas potencia. Para determinadas medidas se empleó la configuración estándar de doble haz, habitual cuando se miden propiedades ópticas de líquidos en cubetas o cuando la pérdida de potencia y de información por luz dispersada no es importante.

Aparte del uso puntual para estudiar diversos polímeros y sustratos transparentes, principalmente se usó para interrogar los biosensores plasmónicos basados en redes de nanoagujeros en aluminio.

El procedimiento habitual consiste en permitir que la lámpara del equipo estabilice su temperatura una vez encendido el equipo, para adquirir, inicialmente, espectros de referencia, tanto con el haz bloqueado (medida en oscuridad) como con nada que interfiera su camino (medida del espectro de la lámpara).

1. Espectrómetro FT-VIS-IR.

Al contrario que en el espectrofotómetro, la luz no es dispersada para separar y seleccionar las longitudes de onda que la componen, sino que pasa a través de un interferómetro que desdobra el haz de luz y forma un patrón de interferencia mediante una configuración de espejos (uno de ellos móvil) que superponen ambos haces, permitiendo medidas muy precisas de las longitudes de onda de los haces. La señal (interferograma) es recogida por un fotodetector y convertida mediante transformada de Fourier en reflectancia o transmitancia en función de la longitud de onda. Es un equipo más voluminoso y caro que un espectrofotómetro, aunque permite obtener medidas con una mayor relación señal/ruido (mejor resolución), realizar medidas en la región espectral infrarroja, y es posible emplear un microscopio para medir áreas de pequeño tamaño.

Esta técnica se empleó para estudiar las redes de nanopilares debido a la capacidad de interrogar ópticamente áreas submilimétricas. Los espectros de reflexión fueron adquiridos con un espectrómetro visible-infrarrojo de transformada de Fourier (FT-VIS-IR) Bruker Vertex 70 adaptado al intervalo visible con detector de diodo de silicio, y unido a un microscopio Hyperion 2000, con una resolución de 20 cm^{-1} y medidas de 3000 barridos (10 000 para tomar el espectro de referencia). Los dispositivos fueron caracterizados ópticamente con un objetivo de baja apertura numérica ($4\times$, $NA = 0,1$) para iluminar cada red de nanopilares y recolectar la luz reflejada. El ángulo de la apertura fue $5,7^\circ$, lo cual restringe la detección de luz a la difracción de orden cero. La Figura 13 muestra este equipo, emplazado en el laboratorio del Grupo de Micro-nano Fotónica y Biofotónica del CTB.

Fig. 13. Izq: Espectrómetro FT-VIS-IR utilizado para medir las muestras. Dcha: detalle de una muestra de nanopilares iluminada por el objetivo $4\times$, en la que se aprecia la difracción de la red, de tan solo $150\times 150\text{ }\mu\text{m}$.

2. Materiales.

2.1. Polímeros de impronta molecular (MIPs).

A continuación se describen los polímeros estudiados. En el primer punto se detalla el trabajo previo realizado con dos resinas comerciales de EBL (PMMA y PMMA/MA), y los otros dos puntos están referidos a las mezclas copoliméricas desarrolladas expresamente con la finalidad de encontrar un MIP con las características deseadas y susceptible de ser nanoestructurado mediante EBL. Se debe señalar que la síntesis y parte de la caracterización estructural de los copolímeros señalados, así como la caracterización óptica de la fluorescencia, fueron realizadas principalmente por Sergio Carrasco, del grupo GSOLFA, como parte de su Tesis.

2.1.1. PMMA y PMMA/MA.

La resina PMMA y el copolímero entre PMMA y ácido metacrílico (PMMA/MA) son materiales de uso común como resinas en EBL debido a las propiedades que ofrecen: alta resolución, estabilidad, buena adhesión a gran variedad de sustratos y compatibilidad con las etapas frecuentes de procesado.

Generalmente, estas resinas son usadas como resinas positivas (las zonas expuestas son reveladas, es decir, eliminadas de la estructura), siendo las dosis necesarias bajas ($80\text{--}100\ \mu\text{C cm}^{-2}$), aunque a dosis altas es posible utilizarlas como resinas negativas (la zonas expuestas son entrecruzadas y permanecen tras el revelado), ofreciendo resoluciones muy altas que llegan por debajo de los 10 nm.¹⁶⁴ Debido a la sencillez de procesado requerida, este comportamiento dual encuentra aplicaciones en la producción de máscaras para litografía,¹⁶⁵ componentes mecánicos¹⁶⁶ y creación de capas delgadas de material dieléctrico.¹⁶⁷

Inicialmente estas resinas fueron evaluadas como MIPs, empleando rodamina 6G como molécula plantilla. En concreto, se utilizaron las resinas comerciales PMMA (peso molecular 950 kDa en clorobenceno) y PMMA/MA (en 2-metoxietanol), ambas de Allresist GmbH (Am Biotop 14, 15344 Strausberg, Germany).

2.1.2. P(HEMA-*co*-MAAEMA).

Esta resina supuso la primera aproximación para sintetizar un MIP susceptible de ser nanoestructurado. El polímero, abreviado P(HEMA-*co*-MAAEMA), es el poli(2-hidroxietil metacrilato-*co*-2-metacrilamidoetil metacrilato), disuelto en metanol (MeOH), y fue sintetizado mediante polimerización de radicales libres¹⁶⁸ de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) y 2-aminoetil metacrilato (AEM), tal como se muestra en la Figura 14.

Esta mezcla polimérica fue fabricada con objeto de lograr una alta sensibilidad al haz de electrones sin recurrir a un PAG, es decir, esta mezcla no es una resina amplificada químicamente. El diseño de los copolímeros se realizó para que tuvieran diversos grupos y cadenas susceptibles de ser entrecruzados para favorecer la polimerización a bajas dosis de exposición, en concreto dobles enlaces, llegándose a un 50% de ellos en la cadena polimérica. Se realizaron pruebas como MIP empleando acridona como molécula plantilla fluorescente.

Fig. 14. Esquema de síntesis del copolímero P(HEMA-*co*-MAAEMA).

2.1.3. P(MAA-*co*-MAAEMA).

El copolímero poli(ácido metacrílico-*co*-2-metacrilamidoetil metacrilato), abreviado P(MAA-*co*-MAAEMA), es una variante del descrito en el punto anterior. La resina, que también emplea MeOH como disolvente, contiene tanto grupos de reconocimiento específico (—COOH) para interacciones no covalentes con una molécula plantilla que contenga grupos funcionales complementarios (en este caso se escogió la molécula fluorescente rodamina 123 ó R123) como grupos desencadenantes de entrecruzamiento.¹⁶⁹ El esquema de síntesis se muestra en la Figura 15.

Fig. 15. Esquema de síntesis del copolímero P(MAA-*co*-MAAEMA).

El copolímero multifuncional P(MAA-*co*-MAAEMA) permitió la preparación de MIPs con alta viscosidad, facilitando el depósito de capas delgadas sobre sustratos planos con objeto de realizar patrones empleando EBL y fotolitografía DUV. Tales estructuras fueron entrecruzadas posteriormente mediante tratamiento térmico en ausencia de iniciador químico alguno.

2.2. Red de nanoagujeros en película de aluminio.

Los sensores refractométricos sin marcado desarrollados, basados en SPR, contienen matrices de nanoagujeros realizados en capas delgadas de aluminio (Unaxis Balzers Aktiengesellschaft, 99,98% de pureza, empleado en la evaporadora de haz de electrones), sobre sustratos de vidrio (portaobjetos de vidrio flotado transparente de 1 mm de grosor VWR 631–1550) y de policarbonato proveniente de discos compactos sin capa reflectante (MPO Ibérica, Madrid, España).

La cinta adhesiva sensible a la presión (PSA, *pressure sensitive adhesive*) empleada para la transferencia fue cinta transparente de uso común #550 de Scotch® (3M, St. Paul, MN, USA). Esta cinta adhesiva, de buena calidad, económica y disponible comercialmente, tiene un espesor total de 50 μm y un índice de refracción de 1,45, datos confirmados con medidas del perfilómetro mecánico y del analizador de capas delgadas. Según datos del fabricante, esta cinta está compuesta por una película de 30 μm de espesor de polipropileno biorientado (BOPP, *biaxially oriented polypropylene*), material que le confiere alta uniformidad, resistencia y transparencia, y un adhesivo acrílico sintético.

2.3. Red de nanopilares poliméricos.

Los dispositivos están compuestos de una matriz cuadrada de nanopilares de resina SU–8 (MicroChem) fabricada sobre una película opaca de aluminio (Unaxis Balzers Aktiengesellschaft, 99,98% de pureza, empleado en la evaporadora de haz de electrones).

La resina negativa SU–8 2000 es una resina epoxídica ampliamente utilizada en microelectrónica y microfluídica, y en esta Tesis se empleó exactamente SU–8 2000.5 (disuelta en ciclopentanona), que proporciona un espesor aproximado de 500 nm mediante métodos de centrifugación habituales, para fabricar redes de nanopilares.

La resina SU–8 2000.5 posee un elevado contraste (el contraste influye directamente en la resolución, que es la capacidad de la resina de generar motivos de pequeño tamaño. Así, valores altos de resolución permiten la fabricación de motivos con paredes definidas, es decir, verticales), y es especialmente apropiada para crear estructuras con una relación de aspecto muy alta debido a la alta rigidez estructural existente a nivel molecular una vez que el material está entrecruzado. También es biocompatible, altamente transparente por encima de 360 nm, y con un índice de refracción de aproximadamente 1,6, valor dependiente del procesado que haya recibido y de la temperatura y tiempo de curado. Además, posee alta robustez mecánica y gran estabilidad química (resistencia frente a ácidos y bases), y es susceptible a la biofuncionalización.^{155,170–172} Estas características hacen de la resina SU–8 2000.5 un material idóneo para implementar estructuras basadas en nanopilares en aplicaciones de biodetección.

Esta resina negativa puede ser micro y nanoestructurada^{173–175} de manera directa mediante exposición de patrones con luz UV, electrones o rayos-X, y la dosis que requiere para su entrecruzamiento es baja debido a que está amplificada químicamente. En esta Tesis, las estructuras de nanopilares creadas se fabricaron con EBL.

3. Fabricación de los dispositivos.

3.1. Películas micro–nano–estructuradas de MIPs.

3.1.1. PMMA y PMMA/MA.

Se depositaron por centrifugado (*spin-coating*) películas de espesor 500 ± 10 nm de PMMA (peso molecular 950 kDa, en clorobenceno) y de 300 ± 10 nm de PMMA/MA (en 2-metoxietanol) sobre sustratos de silicio (100), y se calentaron las muestras durante 2 minutos a 160°C sobre placa calefactora para eliminar el disolvente y conseguir una superficie uniforme.

Mediante EBL se expusieron áreas cuadradas de $50\ \mu\text{m}$ de lado en un intervalo de dosis de 7 a $25\ \text{mC cm}^{-2}$, y también rejillas de líneas perpendiculares (periodo = 500 nm) con dosis entre 100 y $200\ \text{nC cm}^{-1}$. Después de exponer las muestras, éstas fueron reveladas en AR 600–55 de Allresist GmbH, es decir, IPA:MIBK (metil-isobutilcetona), a temperatura ambiente durante 2 minutos, enjuagadas en IPA y secadas con pistola de nitrógeno.

3.1.2. P(HEMA-co-MAAEMA).

En la preparación de muestras, tarea de la presente Tesis, la mezcla P(HEMA-co-MAAEMA) fue depositada por centrifugado a 5000 rpm sobre sustratos de silicio (100). Previamente, dichos sustratos fueron sometidos a un proceso de limpieza consistente en inmersión en disolución piraña (H_2SO_4 96% + H_2O_2 30% 3:1 a 130°C durante 10 minutos). Una vez enjuagados con agua desionizada, los sustratos se sumergieron en ácido fluorhídrico (HF) al 40% durante 1 minuto, en vaso de teflón, para eliminar la capa de SiO_2 nativo. Finalmente fueron enjuagados en agua desionizada, después en IPA, y fueron secadas con pistola de nitrógeno. Variando la concentración del copolímero en MeOH, se obtuvieron espesores entre 50 nm y $1,5\ \mu\text{m}$.

La litografía mediante haz de electrones se realizó ajustando la corriente del haz a 10 pA y 100 pA para motivos 2D y 1D, respectivamente. Después del proceso de escritura con haz de electrones, las muestras fueron reveladas inmediatamente en MeOH durante un minuto a temperatura ambiente, con agitación suave, y secadas con pistola de nitrógeno.

Para caracterizar la resina (curva de contraste y resistencia química), se expusieron rectángulos de tamaños $5\times 5\ \mu\text{m}$, $20\times 50\ \mu\text{m}$ y $50\times 100\ \mu\text{m}$ a dosis crecientes entre 0,1 y $70\ \mu\text{C cm}^{-2}$. Y con el fin de estudiar la resolución, se fabricaron patrones compuestos de líneas con dosis entre 5 y $500\ \text{pC cm}^{-1}$.

Se realizó ataque húmedo usando una disolución HNA, compuesta por 5,5 mL de AcOH 100% + 3,5 mL de HNO_3 65% + 2 mL de HF 40%. Una vez atacadas con HNA, las muestras se lavaron bien en agua desionizada (resistividad $\approx 18\ \text{M}\Omega\ \text{cm}^{-1}$), después se enjuagaron en isopropanol (IPA, *isopropyl alcohol*) y se secaron con pistola de nitrógeno. También se realizó ataque seco (RIE), empleando hexafluoruro de azufre (SF_6) como gas reactivo (flujo = 26 sccm) y 107 W de potencia RF.

3.1.3. P(MAA-co-MAAEMA).

Se prepararon dos mezclas de prepolimerización conteniendo 3 y 30 μg de R123 (molécula plantilla del MIP) en 1 mL de disolución de 20 g L^{-1} de P(MAA-co-MAAEMA) en MeOH para EBL y fotolitografía UV, respectivamente. Una disolución similar fue preparada en ausencia de R123 para obtener un polímero sin plantilla, o NIP

(*non-imprinted polymer*). Las mezclas de prepolimerización se depositaron por centrifugado sobre sustratos de silicio (100), limpiados previamente con disolución piraña (H_2SO_4 96 % + H_2O_2 30 % 3:1 v/v a 130 °C durante 10 minutos) a 5000 rpm. El espesor resultante de las películas de resina fue de aproximadamente 100 nm, y fueron estructuradas mediante EBL y fotolitografía DUV de la siguiente manera.

Usando el equipo de EBL con un voltaje de aceleración de 50 kV y corrientes del haz de electrones de 10 pA y 1 nA, se expusieron motivos rectangulares de 40×60 y $20 \times 50 \mu\text{m}$ con dosis entre $0,05 \mu\text{C cm}^{-2}$ y 20 mC cm^{-2} . Inmediatamente después de la litografía, las muestras fueron reveladas durante 1 minuto en THF a temperatura ambiente y secadas con pistola de nitrógeno. Los patrones resultantes fueron entrecruzados térmicamente sobre una placa calefactora a 170 °C durante 30 minutos.

Mediante fotolitografía DUV se fabricaron microestructuras. La mezcla polimérica se depositó sobre sustratos de silicio (100) y se definieron micropatrones de $300 \times 300 \mu\text{m}$, aproximadamente, con una máscara de litografía de Cr/cuarzo (transparente al DUV) en modo de no contacto, situándola muy próxima a la superficie de la película de P(MAA-*co*-MAAEMA). La exposición fue de 30 minutos, correspondiente a una dosis total de 36 J cm^{-2} , y las zonas expuestas a la luz UV fueron eliminadas (comportamiento positivo) revelando las muestras en tetrahidrofurano (THF) durante 1 minuto, secadas después con pistola de nitrógeno. El espesor de los motivos obtenidos fue de unos 100 nm. Al igual que en caso anterior, los patrones obtenidos también fueron entrecruzados térmicamente en una placa calefactora a 170 °C durante 30 minutos. Esto representa una novedad respecto a la estructuración de MIPs mediante fotolitografía, ya que trabajos anteriores demostraron la fotopolimerización de áreas expuestas a la radiación, es decir, empleando mezclas de prepolimerización como resinas negativas. Sin embargo, la exposición directa del MIP puede conllevar la degradación de la molécula plantilla, por lo que el trabajo realizado en esta Tesis representa una gran ventaja. La Figura 16 muestra esquemáticamente el proceso de fabricación tanto por EBL como con litografía DUV.

Fig. 16. a) Esquema de fabricación de nanopatrones mediante EBL. b) Esquema de fabricación de micropatrones mediante litografía DUV.

Para la evaluación de las micro y nanoestructuras fabricadas como MIPs con P(MAA-co-MAAEMA), inicialmente fueron bien lavadas durante 1 hora en una mezcla 10% v/v de etanol (EtOH) y ácido trifluoroacético (TFA, *trifluoroacetic acid*). Los experimentos de absorción se llevaron a cabo incubando los sensores basados en MIPs, o las muestras de referencia (NIPs), durante 3 horas bajo agitación suave, todo protegido de la luz, en disoluciones de 5 mL de R123 20 nM en acetonitrilo. Se estudió la reactividad cruzada con disoluciones equivalentes que contenían rodamina 6G (R6G) o rodamina B (RB), rodaminas de estructura similar a la R123. Los sensores fueron finalmente enjuagados en 10 mL de acetonitrilo y secados durante 3 minutos con corriente de argón. A continuación fueron realizadas las medidas de fluorescencia.

3.2. Red de nanoagujeros en película de aluminio.

3.2.1. Dispositivos sobre sustratos de vidrio.

Se cortaron sustratos de aproximadamente 1 cm² de vidrio de 1 mm de grosor y se lavaron a fondo con agua y detergente, frotándolos a mano con guantes de vinilo y pasándolos varios minutos por un baño de ultrasonidos, seguido de una limpieza con disolución piraña (H₂SO₄ 96% + H₂O₂ 30% 3:1 a 130 °C durante 10 minutos), lavándolos bien. A continuación fueron enjuagados en agua desionizada, después en propanol para desplazar el agua de la superficie, y fueron secados con pistola de nitrógeno. Finalmente fueron calentados sobre una placa a 100 °C durante 10 minutos para eliminar los restos del disolvente.

Inmediatamente después, se depositó una capa de 100 nm de espesor de aluminio utilizando una evaporadora de haz de electrones (velocidad de depósito = 10 Å s⁻¹), cuyo espesor fue comprobado posteriormente con un perfilómetro mecánico. El resultado a simple vista es una película opaca de aluminio ópticamente especular de buena calidad, aunque la observación con un microscopio óptico revela la presencia de nano y microdefectos (normalmente poros), fácilmente visibles en transmisión. Se escogió 100 nm como espesor de aluminio para que fuera precisamente opaco (por debajo de 60–70 nm comienza a ser traslúcido) y para compatibilizar el posterior ataque ICP con una película de resina de espesor similar.

Se depositó por centrifugado a 5000 rpm una capa de resina positiva ZEP-520 1:1 en ZEP-A (anisol), ambos de Zeon Chemicals, sobre cada muestra, obteniendo espesores alrededor de 120 nm. Se limpiaron los restos de resina que habitualmente quedan en la cara inferior de los chips (superficie de vidrio) con un bastoncillo humedecido con acetona. La resina ZEP-520 consiste en cadenas poliméricas muy largas, y la exposición al haz de electrones las rompe y las hace más solubles en el revelador adecuado, mostrando, por tanto, un comportamiento positivo.

Seguidamente, los chips se calentaron sobre una placa a 120 °C durante 10 minutos con objeto de eliminar los restos de disolvente y mejorar la uniformidad de la capa de resina y su adhesión al sustrato. Cabe señalar que, inicialmente, las primeras series de muestras fueron sometidas a etapas de 2 minutos a 180 °C, parámetros habituales en este punto, aunque la mayoría de las muestras se procesaron en esta etapa a 120 °C durante 10 minutos para suavizarla y hacerla compatible con la fabricación sobre sustratos de policarbonato descrita en el punto 3.2.2, a continuación de esta sección.

Mediante EBL se escribieron matrices bidimensionales (red cuadrada) con disparos individuales punto a punto a 1 nA de corriente y 200 µs de tiempo de

exposición en un campo de 300 μm y 240 000 puntos, que implica que cada píxel de disparo de $1,25 \times 1,25 \text{ nm}$, es decir, cada futuro nanoagujero, recibe una dosis de $12,8 \text{ C cm}^{-2}$. Típicamente, la litografía de 1 mm^2 de matriz llevaba aproximadamente 18 minutos, y la mayoría de las muestras fabricadas contenían una red cuadrada de lado comprendido entre 1 y 2 mm, un tamaño adecuado para su futura caracterización óptica. Posteriormente a la exposición al haz de electrones se llevó a cabo el revelado con ZED-N50 (acetato de n-amilo), de Zeon Chemicals, a 0°C durante 40 segundos bajo intensa agitación, seguido de secado con pistola de nitrógeno ajustada con flujo alto. En este punto es posible observar difracción (cambios de color según el ángulo de observación), característica que confirma la creación de la red de nanoagujeros en la resina.

Para transferir los nanoagujeros existentes en la película de resina, que actúa como máscara, al aluminio localizado debajo, se realizó un ataque seco con ICP. Cabe señalar que el procedimiento previo a su utilización para fabricar estos dispositivos consiste en una limpieza de la cámara y del plato portamuestras durante 20 minutos con un plasma de SF_6 (20 sccm) y O_2 (40 sccm), con una potencia RF de 100 W, más 250 W de voltaje adicional (DC Bias, o voltaje aplicado para regular la potencia $\approx 320\text{--}340 \text{ V}$), 50 mTorr de APC (*automatic pressure controller*, controlador automático de la presión), y de 60 mTorr de LPS (*low pressure strike*, presión para activación del plasma), más 2 minutos del proceso a realizar, sin muestras dentro de la cámara, para estabilizar el funcionamiento.

La transferencia de los nanoagujeros a la capa subyacente de aluminio se realizó empleando una mezcla de gases compuesta de Cl_2 (10 sccm) y BCl_3 (20 sccm),¹⁷⁶ aplicando 100 W tanto de potencia RF como de potencia adicional para dirigir el plasma hacia las muestras (DC Bias $\approx 325\text{--}400 \text{ V}$). Otros parámetros fueron APC = 10 mTorr y LPS = 30 mTorr, valores de presión reducidos que ayudan a que el ataque sea direccional y relativamente lento, y permite obtener paredes verticales. El tiempo de ataque habitual es de 35 segundos, aproximadamente.

El BCl_3 actúa principalmente eliminando la capa de óxido nativo del aluminio, que apenas es atacado por un plasma compuesto únicamente por Cl_2 , y es debido a la reactividad de los radicales BCl_x formados. Como apunte, el uso de BCl_3 requiere cierta atención debido a su tendencia a condensarse en las vías de conducción que llevan el compuesto al equipo: su punto de ebullición es de $12,6^\circ \text{C}$ y el gas está almacenado en un búnker anexo. La función principal del Cl_2 es eliminar el metal, pues ataca rápidamente el aluminio incluso sin plasma. El producto de reacción formado es AlCl_3 , que es relativamente volátil. Aparte, el plasma también ataca la resina que hace de máscara formando compuestos clorados volátiles, además de que el producto de reacción con el aluminio AlCl_3 es un ácido de Lewis que ataca las resinas orgánicas.

El ataque fue observado con el monitor de video, controlando visualmente el oscurecimiento de la región con nanoagujeros, cambio que implica que estos se han transferido exitosamente al aluminio. La Figura 17 muestra el cambio visible que sufre una muestra al completarse el ataque: parte de la luz es dispersada y parte es capaz de atravesar la superficie nanoestructurada, es decir, el área metálica deja de ser únicamente especular, y como consecuencia deja de reflejar toda la luz y se oscurece.

Fig. 17. Red de nanoagujeros antes (izq) y después del ataque ICP (dcha). El oscurecimiento indica la transferencia completa de los nanoagujeros practicados en resina con EBL a la capa de aluminio bajo ella. El punto luminoso es el haz láser con el que se controla el ritmo de ataque.

Después del ataque se observa el mismo tipo de difracción proveniente de la red de nanoagujeros que tras el revelado, aunque ahora con mayor intensidad y en las dos caras del chip.

Una vez finalizado el ataque ICP, las muestras fueron sumergidas inmediatamente en agua desionizada durante 5 minutos para disolver y eliminar de las muestras los residuos de AlCl_3 (y otros posibles restos de diferentes productos de reacción clorados) con el fin de evitar posibles efectos ulteriores de corrosión. El empleo de ultrasonidos es plausible para este fin, pues las muestras demostraron suficiente robustez como para resistir este proceso.

Para sortear los indeseables efectos que tendrían la oxidación y corrosión del aluminio en el funcionamiento adecuado de los dispositivos, se efectuó un tratamiento para pasivar la superficie de aluminio y así protegerla frente a la degradación (punto 3.2.4 de la sección de fabricación). Dicho tratamiento se evaluó con experimentos de inmersión en agua desionizada y con los propios ensayos de biodetección. En estos ensayos, como prueba de concepto, se estudió el reconocimiento competitivo de moléculas de biotina por conjugados dextrano–lipasa funcionalizados con biotina e inmovilizados sobre la superficie de óxido de aluminio del transductor. El proceso de fabricación se muestra en la Figura 18.

Fig. 18. Esquema de fabricación de redes de nanoagujeros en películas de aluminio empleadas como biosensores plasmónicos.

3.2.2. Dispositivos sobre sustratos de policarbonato.

El proceso de fabricación fue muy similar al empleado con sustratos de vidrio, aunque con algunas diferencias debido a las características del policarbonato, procedente de CDs comerciales (Figura 19).

Fig. 19. Discos compactos de policarbonato empleados durante esta Tesis, en ausencia de la habitual capa reflectante de los discos comerciales.

Con una cortadora automática refrigerada con agua a presión Loadpoint MicroAce, se cortaron sustratos de 12×12 mm de CDs estándar de policarbonato de 1,2 mm de espesor. Como particularidad, los discos no tenían las habituales capas reflectantes, es decir, los chips eran únicamente de policarbonato, con una cara lisa y otra con la correspondiente región de pozos y llanos que conforman la pista donde se graban datos. Previamente al corte se extremaron las precauciones para mantener los CDs limpios y sin arañazos, y la cinta adherente (Loadpoint 7042/200) usada para fijar el disco en la cortadora fue pegada a la cara lisa para preservarla de la leve abrasión que sufre con el agua a presión (realmente debido a las partículas que hay en ella y en la cortadora). Una vez cortados, la cinta adherente se retiró sin que dejara restos visibles.

A continuación, los sustratos fueron lavados con agua y detergente de igual manera que en el caso de sustratos de vidrio, seguidamente fueron bien enjuagados con agua desionizada primero, después con IPA, y al final secados con pistola de nitrógeno.

Como diferencia con los sustratos de vidrio, los de policarbonato no fueron calentados sobre una placa a 100 °C una vez limpios, algo que posibilitó la ampliación de la investigación con estas muestras al permitir el despegue de la película de aluminio, tal como se expone en el punto 3.2.3 siguiente.

Una vez limpios, se depositó una capa de 100 nm de espesor de aluminio sobre la cara lisa (sin surco) de los sustratos utilizando la evaporadora de haz de electrones (velocidad de depósito = 10 Å s^{-1}). El aluminio depositado demostró buena adherencia a los sustratos de policarbonato. De hecho, este metal se emplea habitualmente para metalizar los CDs disponibles comercialmente.

La formación de la película de ZEP-520 sobre el aluminio depositado fue idéntica al caso del vidrio, con la salvedad de que se protegió la cara inferior con cinta Loadpoint 7042/200 para evitar que se manchara durante el proceso, pues la limpieza habitual con acetona, que elimina eficazmente los habituales restos de resina que succiona el centrifugador y que ocasionalmente acaban pegados a la cara inferior del sustrato, degrada el policarbonato.

Antes de calentar las muestras sobre una placa calefactora (10 minutos a 120 °C) la cinta adherente fue retirada. Se empleó una temperatura de 120 °C para evitar el reblandecimiento del policarbonato, observado a partir de 130–140 °C, debido a que la temperatura de transición vítrea del policarbonato es de unos 147 °C.

Las condiciones de EBL y revelado posteriores fueron idénticas a las usadas con sustratos de vidrio, excepto por un detalle: nuevamente, se adhirió cinta Loadpoint 7042/200 en la parte inferior de las muestras antes de revelarlas con el fin de evitar cierta degradación química del policarbonato que reduciría en gran medida su transparencia, impidiendo obtener una respuesta espectral normal. Una vez finalizado el revelado y el secado con pistola de nitrógeno, se retiró la cinta de la cara inferior.

El ataque ICP con el que se transfirieron las redes de nanoagujeros de la resina al aluminio y la limpieza de restos de resina con plasma de oxígeno fueron exactamente iguales que en el procesado con sustratos de vidrio. La Figura 20 muestra varias docenas de chips de policarbonato en diferentes etapas del procesado.

Fig. 20. Izq: muestras de policarbonato con aluminio y resina ZEP-520 depositados sobre ellas colocadas en el portamuestras del equipo EBL. Los trozos de cinta plateada fijan las muestras y conducen la carga eléctrica fuera de las muestras. Dcha: grupo de muestras en la cámara del equipo ICP tras el ataque para transferir las redes de nanoagujeros al aluminio, razón por la que exhiben difracción.

3.2.3. Dispositivos transferidos a sustratos flexibles.

Las muestras de partida se fabricaron de idéntica manera a las descritas en el apartado previo 3.2.2, y la transferencia de las películas metálicas con nanoagujeros se realizó de la siguiente forma.

Inicialmente, con objeto de una manipulación apropiada, cada muestra fue fijada sobre un portaobjetos de vidrio con pegamento basado en cianocrilato (Loctite, Henkel, USA). Una porción de cinta adhesiva de varios centímetros de largo y 19 mm de ancho se aplicó sobre la superficie de la muestra, aplicando a continuación presión con un dedo durante 1 minuto. Finalmente, tirando de la cinta de manera continua y con cierta suavidad para despegarla, se realizó la transferencia de la película de aluminio a la cinta. La Figura 21 muestra este proceso.

Fig. 21. Izq: esquema del proceso de transferencia directa de una red de nanoagujeros en aluminio a cinta adhesiva. Dcha: fotogramas del proceso en una muestra de 1×1 cm de CD que contiene dos redes. El despegue se realiza eficazmente en el lado en el que se aplica la cinta.

3.2.4. Pasivación del aluminio.

Con el fin de poder aprovechar las buenas propiedades plasmónicas del aluminio es necesario proteger su superficie frente a fenómenos de degradación cuando entra en contacto con medios acuosos y biológicos. La estrategia seguida para ello fue aprovechar la propia capacidad del aluminio para oxidarse con facilidad cuando es expuesto a la atmósfera (reacción con el oxígeno del aire), humedad o agua. En estas situaciones se origina una fina capa de óxido de aluminio sobre la superficie, con la peculiaridad de que la estructura de dicha película de óxido nativo es lo suficientemente compacta como para aislar del medio exterior el metal que hay bajo ella y que evita que continúe deteriorándose, al contrario de lo que ocurre con otros metales que también se oxidan en las mismas condiciones, por ejemplo el hierro, cuyo óxido es poroso y no evita que todo el metal termine oxidado.

Dependiendo de la pureza del aluminio y de las condiciones a los que esté expuesto, la capa de óxido de aluminio nativo puede medir desde varios nanómetros⁵⁶ hasta decenas de micras de espesor (en condiciones que se dan, por ejemplo, en lugares costeros), y conserva en buena medida las propiedades ópticas del metal.¹⁷⁷ Este fenómeno, denominado pasivación, es bien conocido y protege químicamente al aluminio de reacciones de oxidación y corrosión con agua, oxígeno o ácidos.⁵⁹

Sin embargo, la capa de óxido nativo no es una barrera lo bastante resistente como para evitar una oxidación progresiva de películas delgadas de aluminio (≤ 100 nm, depositadas típicamente sobre sustratos con técnicas de evaporación o pulverización catódica), en las que la existencia de micro y nanodefectos (por ejemplo nanoporos) es frecuente y conducen a que el material sufra corrosión completa al enfrentarse a medios acuosos, tal como se comprobó con experimentos durante esta Tesis.

a. Pasivación de dispositivos sobre sustrato de vidrio.

Mediante un plasma de oxígeno (15–20 sccm, potencia RF 80 W, APC = LPS = 80 mTorr, Dc Bias $\approx$ 270–310 V), la pasivación de la superficie metálica de aluminio fue considerablemente mejorada, engrosando la capa de óxido nativo con el fin de robustecer la resistencia a la oxidación y corrosión en medio acuoso.

Según la literatura, el óxido obtenido es Al_2O_3 estequiométrico,¹⁷⁸ y las reacciones que ocurren dentro del plasma de oxígeno son muy complejas y variadas.^{179,180} La reacción de transferencia de carga, por la que un ion positivo captura un electrón de una molécula neutra, está entre las reacciones más importantes. Los iones de oxígeno atómico experimentan rápidamente este intercambio con moléculas de oxígeno, produciendo iones moleculares y radicales atómicos neutros.¹⁸¹ Normalmente existe una proporción muy superior de iones moleculares respecto a iones atómicos (aproximadamente 30:1).¹⁸² Además, los iones positivos predominan debido a que los negativos son más pesados y existen en bajas concentraciones con respecto a los electrones, por lo que normalmente quedan confinados a la región del plasma, teniendo un efecto muy pequeño sobre la superficie de reacción. Sin embargo, la composición y distribución de las especies químicas generadas a partir de moléculas diatómicas de oxígeno son tan complejas que el grado de disociación puede variar desde una pequeña fracción hasta el 20%, dependiendo de la potencia y de la presión. Además, la presencia de impurezas habituales (vapor de agua, nitrógeno, hidrógeno...) puede aumentar la proporción de disociación de oxígeno molecular debido a la formación de otras especies neutras o cargadas.

Teniendo en cuenta la composición y las características del plasma, múltiples especies mono, di y triatómicas, cargadas y neutras, interaccionan con la superficie de aluminio. Las especies más pequeñas penetran con mayor facilidad y reaccionan con el aluminio metálico, oxidándolo y, por tanto, engrosando la capa de óxido nativo.

En cualquier caso, el contacto con la superficie promueve la recombinación atómica para formar oxígeno molecular,¹⁸³ que se desorberá en caso de no encontrar átomos de aluminio metálico con los que reaccionar y formar Al_2O_3 . Por tanto, puede asumirse que, para unas condiciones dadas de plasma, y conociendo las características de la capa de óxido, dicha capa se engrosará con el tiempo hasta que el espesor dificulte o impida la penetración de especies radicáticas o neutras de oxígeno, alcanzando un espesor máximo, aunque el estudio de esta hipótesis está fuera de los objetivos de la presente Tesis.

Para evaluar la validez del proceso, se aplicaron tiempos desde 5 a 60 minutos de plasma a muestras con redes de nanoagujeros, y las muestras fueron sumergidas en etapas de 30 minutos, hasta una máximo de 16 horas, en agua desionizada (pH = 5,7). Después de cada inmersión, las muestras fueron secadas por completo con pistola de nitrógeno, midiéndose sus espectros ópticos de transmisión para estudiar su comportamiento.

El objetivo de este proceso se centró en mejorar las características protectoras de la capa nativa y reducir significativamente la tasa de oxidación, por lo que no se aplicaron condiciones más fuertes o mayores tiempos de plasma de oxígeno. Esto se debe a que una capa de óxido demasiado gruesa sería un inconveniente desde el punto de vista de la sensibilidad al índice de refracción del medio circundante del dispositivo, pues la máxima sensibilidad se da en la intercara metal–dieléctrico y decrece exponencialmente hacia el exterior y, por tanto, cuanto mayor sea el espesor del óxido de aluminio, más lejos del metal quedará el material o medio a estudiar mediante

interrogación óptica. Además, un engrosamiento excesivo de la capa de óxido originaría que la película de aluminio comenzase a ser traslúcida, hecho que ocurre por debajo de 60–70 nm, aproximadamente.

Debido a la necesidad de usar disoluciones tamponadas acuosas para realizar ensayos de biodetección, con la finalidad de que mantengan constante el pH tal como ocurre en medios fisiológicos, y teniendo en cuenta la vulnerabilidad química del aluminio frente al ión cloruro, inicialmente se realizaron pruebas de resistencia a distintos tampones debido a la presencia de dicho ión en los medios tamponados habituales. Estos experimentos incluyeron muestras pasivadas y sin pasivar, con y sin redes de nanoagujeros en aluminio. El método seguido consistió en inmersiones secuenciales de 15 y 30 minutos las primeras, después de 1 hora, llegando a tiempos totales de 6 horas (tiempo superior al habitual en muchos bioensayos) y, en ocasiones, dejando sumergidas las muestras varios días.

Los tampones empleados fueron PBS (tampón fosfato salino, *phosphate buffered saline*), SSC (tampón salino de citrato de sodio o tampón citrato, *saline sodium citrate*), carbonato/bicarbonato, Tris (tampón salino tris(hidroximetil)aminometano), y HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico), ajustados a valores de pH entre 7 y 8,5 (el pH fisiológico del plasma sanguíneo es 7,4).

b. Pasivación de dispositivos sobre sustrato de policarbonato.

El tratamiento con plasma de oxígeno para pasivar las muestras no fue igual al aplicado a las muestras soportadas en vidrio debido a que una exposición prolongada al plasma producía cierta degradación¹⁶² del policarbonato que empeoraba mucho la respuesta óptica.

Así, se realizaron cinco etapas sucesivas de 3 minutos de plasma de oxígeno (15 sccm, 80 W), acumulando un total de 15 minutos, evitando además cierto calentamiento que sucede en el interior del reactor del equipo ICP al realizar un proceso de varias decenas de minutos, y demostrando ser suficiente para proteger el metal durante el bioensayo realizado como prueba de concepto.

3.3. Red de nanopilares poliméricos.

Para la fabricación de las redes de nanopilares, inicialmente se limpiaron sustratos de silicio (100) con disolución piraña (H_2SO_4 96 % + H_2O_2 30 % 3:1 v/v a 130 °C durante 10 minutos), después fueron bien enjuagados con agua desionizada, y a continuación fueron sumergidos en IPA para ser finalmente secados con pistola de nitrógeno. Seguidamente, se depositó una capa de aluminio de 100 nm de espesor en una evaporadora de haz de electrones (velocidad de depósito = $10 \text{ \AA s}^{-1}$).

A continuación se depositó resina SU-8 2000.5 por centrifugado a 3000 rpm sobre, calentándolos a 110 °C durante 1 minuto sobre placa calefactora para eliminar disolventes y conseguir una superficie uniforme.

La litografía mediante EBL consistió en la exposición de una red cuadrada de nanocírculos de 5 nm de diámetro con 600 nm de período a 50 kV y 50 pA en el equipo habitual utilizado durante esta Tesis, con la peculiaridad de que la exposición contó con un grado controlado de desenfoque, ajustado manualmente contando vueltas completas con el mando analógico del equipo, siempre a los mismos aumentos y cerca del máximo de magnificación. Los efectos de proximidad debidos a la dispersión de electrones

procedente de la litografía fueron aprovechados como una ventaja para exponer levemente las zonas inmediatamente adyacentes a los patrones expuestos, siendo el resultado una capa delgada de resina SU-8 entrecruzada en las regiones existentes entre nanopilares. Así, para un patrón de EBL que genere una red de nanopilares poliméricos de un periodo y una geometría dados, el desenfoque y la dosis empleados determinarán tanto el diámetro y la forma de los nanopilares (y por consiguiente, el índice efectivo de la red) como el espesor de la película de resina entrecruzada entre ellos.

La razón por la que se emplearon patrones circulares desenfocados y no impactos individuales es la búsqueda de nanopilares cuyo diámetro sea igual a la mitad del periodo. Esta relación dimensional fue la que mayor sensibilidad superficial producía según simulaciones numéricas realizadas por el Dr. Carlos Angulo Barrios.

El intervalo de dosis empleado fue de $32\text{--}96\text{ mC cm}^{-2}$, correspondiente a tiempos de exposición de entre 10 y 30 μs , con unas condiciones de escritura para obtener impactos del haz de electrones cada 1,25 nm.

Con el fin de optimizar la fabricación de las redes, se exploró la posibilidad de utilizar nanopatrones con geometrías diferentes a la circular debido a los parámetros de escritura seleccionados en el equipo EBL, para los que cada píxel corresponde con un área de $1,25 \times 1,25\text{ nm}$ (se empleó un campo de $300\text{ }\mu\text{m}$ de lado y 240 000 puntos), es decir, en las mismas condiciones que se aplicaron con nanopatrones circulares. Para ello se diseñaron patrones de forma rectangular, triangular y en forma de cruz (dos rectángulos cruzados), tratando de que el área de cada patrón fuese del mismo orden que en el caso estándar (nanocírculos de 5 nm de diámetro).

Una vez terminada la litografía, las muestras fueron calentadas a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 minutos con objeto de entrecruzar las regiones expuestas al haz de electrones. A continuación, una vez enfriadas las muestras a temperatura ambiente, fueron reveladas con revelador MicroChem de SU-8 a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 segundos, aplicando agitación muy suave, secándolas a continuación con pistola de nitrógeno ajustada con un flujo muy bajo y dirigida perpendicularmente a la superficie del chip. Finalmente fueron calentadas a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos sobre placa calefactora, aplicando una rampa de temperatura desde $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para entrecruzar por completo la estructura resultante y lograr una robustez estructural elevada. El esquema de fabricación se muestra en la Figura 22.

Fig. 22. Esquema de fabricación de las redes de nanopilares poliméricos desarrolladas en esta Tesis.

4. Caracterización de los dispositivos.

4.1. Películas micro–nano–estructuradas de MIPs.

En este punto se detallan las técnicas empleadas para caracterizar químicamente las resinas sintetizadas, también para obtener sus propiedades más relevantes, así como las de las estructuras creadas con ellas, tanto en lo referente a sus dimensiones y topografía como a las propiedades ópticas.

4.1.1. PMMA y PMMA/MA.

La altura de los cuadrados sólidos fabricados mediante EBL fue medida con el perfilómetro mecánico. La morfología superficial de las rejillas fue caracterizada con AFM y con microscopio óptico. Las imágenes de PL fueron medidas a temperatura ambiente con un microscopio confocal de fluorescencia (Olympus X51, Japan). Se adquirieron espectros Raman a temperatura ambiente con un espectrómetro Renishaw in Via Raman Microscope.

Las caracterizaciones por PL y espectroscopía Raman fueron realizadas por el grupo GSOLFA y el del Prof. José Luis G. Fierro, respectivamente.

4.1.2. P(HEMA-*co*-MAAEMA).

Se estudiaron y determinaron las características clave de la resina como la composición (estudio XPS realizado por el grupo del Prof. José Luis G. Fierro, y estudio NMR llevado a cabo por el grupo GSOLFA), sensibilidad, resolución y contraste, así como sus posibilidades como máscara para ataques húmedo y seco de silicio. También se estudiaron y caracterizaron sus propiedades ópticas, como la transmitancia, el índice de refracción y la fotoluminiscencia.

Para estudiar la resistencia química y posibilidades de usar la resina como máscara, se fabricaron mesetas rectangulares en sustratos de silicio (100) mediante ataque seco y húmedo. Las estructuras resultantes se caracterizaron morfológicamente con microscopio óptico y con AFM. Las medidas de espesor de la resina se llevaron a cabo con un perfilómetro mecánico, mientras que la altura de las mesetas de silicio se midió con un interferómetro óptico de superficie Ambios Xi-100 3D usando 10× y 50× aumentos.

La caracterización óptica se llevó a cabo con el analizador de capas delgadas Filmetrics. La transmitancia óptica se midió con el espectrofotómetro, con la esfera integradora instalada. Se realizaron medidas PL (en los laboratorios del grupo GSOLFA) a temperatura ambiente con un microscopio confocal de fluorescencia (Olympus X51, Japan).

4.1.3. P(MAA-*co*-MAAEMA).

Se estudiaron y determinaron las características clave del copolímero (composición y sensibilidad) con la finalidad de crear MIPs nanoestructurados para biodetección molecular. Para ello, el grupo GSOLFA llevó a cabo estudios de NMR y de cromatografía de permeación en gel, y el grupo del Prof. José Luis G. Fierro realizó la caracterización MicroRaman.

Las estructuras resultantes se caracterizaron morfológicamente con un microscopio óptico y con un AFM de idéntica manera al caso de la mezcla P(HEMA-co-MAAEMA). También se caracterizaron con un equipo SEM JEOL JSM 7600 F, en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica.

El grupo GSOLFA realizó medidas PL a temperatura ambiente con un microscopio confocal de fluorescencia (Olympus X51, Japan) equipado con una cámara CCD (Infinity 3, Lumera Corporation), para evaluar la respuesta de los sensores (fluorescencia emitida por los patrones a longitudes de onda superiores a 600 nm).

4.2. Caracterización morfológica de redes de nanoagujeros en aluminio.

La morfología de las redes de nanoagujeros, tanto sobre vidrio como sobre policarbonato, fue estudiada con equipos SEM y AFM. Asimismo, se estudió con las mismas técnicas la morfología de la superficie metálica nanoestructurada de las muestras despegadas con cinta adhesiva, anteriormente en contacto con el sustrato de policarbonato. La posibilidad de trabajar a muy bajo voltaje (1–20 kV) con el equipo SEM permitió obtener buenas imágenes a pesar de los sustratos aislantes de vidrio o poliméricos (policarbonato o cinta adhesiva), siendo necesario realizar un buen contacto con cinta adhesiva conductora entre la película metálica y el portamuestras. Además, el uso del microscopio óptico para comprobar la uniformidad y el aspecto general de las redes también fue habitual.

4.3. Caracterización morfológica de redes de nanopilares de SU–8.

El microscopio óptico fue empleado para comprobar el aspecto general de las redes de nanopilares, y el equipo SEM fue utilizado ampliamente para estudiar la morfología de los nanopilares, aplicando voltajes por debajo de 30 kV para evitar la degradación de los mismos.

4.4. Experimentos de sensibilidad volumétrica.

Estos experimentos determinan la sensibilidad volumétrica al índice de refracción, es decir, cómo varía la respuesta espectral (transmitancia en el caso de redes de nanoagujeros en aluminio, reflectancia para redes de nanopilares de SU–8) de los sensores ópticos fabricados en función de la variación del índice de refracción de un medio homogéneo que llene por completo el volumen sobre la superficie sensora de los dispositivos.

4.4.1. Redes de nanoagujeros.

Los dispositivos fueron caracterizados ópticamente con el espectrofotómetro UV–VIS descrito en el punto (k) de la sección que habla de técnicas e instrumentación. Las medidas fueron realizadas en transmisión empleando la esfera integradora del equipo. Generalmente, se midió en el intervalo de longitudes de onda de 450–900 nm, con una resolución espectral de 0,2 nm y una velocidad de 400 nm min⁻¹. El haz tiene unas dimensiones aproximadas de 4×7 mm en la entrada de la esfera integradora, por lo que se ajustó el tamaño de las redes de nanoagujeros para que fuesen completamente interrogadas (redes de tamaños comprendidos, generalmente, entre 1×1 y 2×2 mm). Los espectros adquiridos fueron tratados en el programa del equipo (Jasco Spectra Analysis

software versión 1.53.04) con un suavizado que aplicó el método de movimiento medio (anchura de convolución = 13–15).

Utilizando dispositivos fabricados sobre vidrio se llevaron a cabo experimentos de sensibilidad volumétrica, sumergiendo muestras pasivadas en cubetas de cuarzo que contenían los siguientes disolventes: MeOH (RI = 1,3303), agua desionizada (RI = 1,3334), acetona (RI = 1,3602), EtOH (RI = 1,3624), IPA (RI = 1,3777), THF (RI = 1,4085), ciclohexano (RI = 1,4277), y tolueno (RI = 1,4972). Los valores del índice de refracción de cada disolvente fueron medidos experimentalmente con un refractómetro portátil Krüss DR201–95.

Además, también se realizó un estudio de la sensibilidad volumétrica con dispositivos transferidos a cinta PSA. Para ello no se emplearon disolventes porque algunos deterioran la cinta. En su lugar se utilizaron disoluciones de ácido cítrico en agua: 0% (sólo agua desionizada), 10% w/w (RI = 1,346) y 20% w/w (RI = 1,359). La caracterización óptica se llevó a cabo de igual forma que en los dispositivos sin despegar, excepto por el hecho de que se optó por la configuración estándar de doble haz para recolectar la transmisión directa y evitar recoger la luz dispersada por la cinta, y en lugar del portamuestras habitual se empleó una cubeta de cuarzo para medir los dispositivos, que fueron fijadas contra el interior de una de las paredes planas de la cubeta.

4.4.2. Redes de nanopilares de SU–8.

Los espectros de reflexión fueron adquiridos con el espectrómetro visible–infrarrojo de transformada de Fourier (FT–VIS–IR) descrito en el punto (I) de la sección Técnicas e instrumentación.

Se realizaron experimentos con distintos disolventes para determinar la sensibilidad volumétrica. El test con disolventes se llevó a cabo con la muestra sumergida en un recipiente de vidrio y metal con un cubreobjetos de vidrio encima para que la superficie del medio líquido quedase plana y perpendicular al haz de interrogación.

La medida inicial, en aire, se realizó inmediatamente después de activar la superficie de SU–8 con una inmersión de 1 minuto en H₂SO₄ (96%) para abrir anillos epoxídicos y crear grupos –OH con objeto de que exista afinidad química superficial por disolventes polares. A continuación el dispositivo se enjuagó muy suavemente en agua desionizada y se calentó a 120 °C durante 5 min para eliminar la humedad adsorbida y/o absorbida. Para pasar de un disolvente a otro, la muestra fue lavada y enjuagada abundantemente con el siguiente disolvente para evitar usar la pistola de aire comprimido de secado, capaz de deteriorar la red si no se aplica un flujo muy suave.

Finalmente, al terminar con los disolventes, la muestra fue enjuagada con IPA, secada con pistola de aire muy suave y en placa a 100 °C durante 5 min, y fue medida de nuevo en aire. La red estaba en buenas condiciones, y el mínimo se desplazó de 655 nm a 658 nm, por lo que podría indicar material adsorbido o precipitado proveniente de los disolventes, o quizá hinchamiento de los nanopilares. Los disolventes utilizados fueron los mismos que los empelados con redes de nanoagujeros, excepto EtOH y tolueno. La secuencia seguida fue de más a menos polar con el fin de lograr que los disolventes mojasen eficazmente la red de nanopilares, inicialmente hidrofílica con el tratamiento con H₂SO₄ descrito anteriormente.

4.5. Biodetección y protocolo de bioensayo.

Estos experimentos se basaron en la sensibilidad de la respuesta óptica de los dispositivos fabricados (matrices de nanoagujeros y redes de nanopilares) a la presencia de una película de (bio)moléculas sobre su superficie. Esta sensibilidad es consecuencia de la interacción del campo óptico evanescente generado en la superficie sensora de estos dispositivos con la película adsorbida.

Las tareas relacionadas con los bioensayos concernientes a redes de nanoagujeros en aluminio fueron realizadas principalmente por la Dra. Sonia Herranz en los laboratorios del grupo GSOLFA.

La caracterización óptica fue llevada a cabo por el autor de esta Tesis del mismo modo descrito en el punto anterior 4.4 (experimentos de sensibilidad volumétrica).

4.5.1. Dispositivos sobre sustrato de vidrio.

Se funcionalizaron muestras pasivadas conteniendo matrices de nanoagujeros previamente activadas (hidrofilizadas) con una corta etapa de plasma de oxígeno (normalmente 5 minutos a 30 W) con 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS), adquirido en Sigma (St. Louis, MO, USA) situando una gota de 10 μL en hexano ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$) sobre la matriz y colocando un cubreobjetos de vidrio limpio sobre ella para evitar la evaporación, creando una capa delgada y homogénea de HMDS entre la superficie de la muestra y el cubreobjetos de vidrio. La hidrofilización con plasma y la funcionalización con HDMS modifica la química de la superficie, alterando la afinidad química, la adhesión y la capacidad de adsorber agua, y por tanto la reactividad química (Figura 23).

Fig. 23. Diagrama esquemático de los procesos de activación de la superficie de aluminio con plasma de oxígeno y su posterior funcionalización con HDMS.

Después de 16 horas a temperatura ambiente, los cubreobjetos de vidrio fueron retirados y las muestras se enjuagaron tres veces en hexano para eliminar los restos de HMDS no enlazados a la superficie, secándolo al final con flujo de argón.

Colocando las muestras boca abajo sobre pequeños contenedores de polipropileno, en contacto con 150 μL de disolución del conjugado ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), conjugados biotina-dextrano-lipasa¹⁸⁴ (BTL2) fueron adsorbidos hidrofóticamente sobre las matrices de nanoagujeros en aluminio silanizadas con HDMS. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguida de tres inmersiones en agua Milli-Q para retirar los restos de conjugado sin enlazar, finalmente secando con flujo de argón. Adicionalmente, se prepararon muestras de control reemplazando la disolución biotina-dextrano-BTL2 por otra de dextrano-BTL2 de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ con el fin de evaluar el efecto que producen los medios de incubación sin que exista proceso de reconocimiento.

El principio de medida del bioensayo con el que se evaluó el funcionamiento de las matrices de nanoagujeros como biosensores fue un ensayo de inhibición competitivo entre los conjugados biotina–dextrano–BTL2 inmovilizados sobre la superficie pasivada de aluminio y la biotina presente en la disolución respecto a un número limitado de posiciones para combinarse con anticuerpos (Ab, *antibody*) anti–biotina.

En los ensayos directos, una disolución de concentración $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Ab anti–biotina (150 μL , en tampón HEPES 10 mM a pH 7,4) se incubó con la matriz de nanoagujeros derivatizada con el conjugado durante 60 minutos a temperatura ambiente. En los ensayos competitivos, 140 μL de disolución estándar de biotina a alta concentración en HEPES 10 mM a pH 7,4 (concentración final de biotina = $2 \mu\text{g mL}^{-1}$) fue mezclada con 10 μL de disolución de Ab anti–biotina con una concentración de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentración final de Ab = $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$), preincubada 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de una incubación con la matriz de nanoagujeros durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Paralelamente, se destinó una muestra como control negativo con lipasa–dextrano sin biotina inmovilizada, que fue incubada con el anticuerpo anti–biotina ($0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) en ausencia, por tanto, de biotina, para determinar si existe adsorción inespecífica en la etapa final de reconocimiento. Con el mismo fin, y como segundo control, se estudió el efecto del medio HEPES al incubar una muestra simplemente silanizada, en ausencia de anticuerpo y biotina.

Finalmente, las muestras se lavaron tres veces en agua Milli–Q, evaluándose la cantidad de anticuerpo anti–biotina unido a la superficie de las matrices de nanoagujeros mediante la adquisición de los correspondientes espectros de transmisión en el intervalo visible. Con el fin de estudiar la reproducibilidad del proceso, los ensayos directo y competitivo se llevaron a cabo por triplicado.

4.5.2. Dispositivos sobre sustrato de policarbonato.

El protocolo seguido fue muy similar al empleado con dispositivos sobre sustratos de vidrio, utilizando también biotina y su anticuerpo. Así, la silanización fue realizada casi de idéntica manera, empleando en esta ocasión una disolución $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de HDMS, con la particularidad de que fue repetida por segunda vez para asegurar la eficacia de esta etapa.

La etapa de adsorción hidrofóbica de los conjugados biotina–dextrano–BTL2 también se realizó de la misma manera, con la única diferencia de que la incubación a temperatura ambiente fue de 30 minutos.

En los ensayos directos, una disolución de concentración $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Ab anti–biotina (150 μL , en HEPES 10 mM a pH 7,4) se incubó con la matriz de nanoagujeros derivatizada con el conjugado durante 60 minutos a temperatura ambiente. En los ensayos competitivos, 140 μL de disolución estándar de biotina a alta concentración en HEPES 10 mM a pH 7,4 (concentración final de biotina = $2 \mu\text{g mL}^{-1}$) fue mezclada con 10 μL de disolución de Ab anti–biotina con una concentración de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentración final de Ab = $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$), preincubada 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de una incubación con la matriz de nanoagujeros durante 60 minutos a temperatura ambiente. De forma paralela, también se llevaron a cabo incubaciones de ensayo directo y competitivo con disoluciones de Ab anti–biotina ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante 20 minutos a temperatura ambiente, es decir, con una concentración cinco veces superior y reduciendo el tiempo de incubación a un tercio.

Al finalizar el bioensayo, las muestras fueron lavadas tres veces en agua Milli-Q, evaluándose la cantidad de anticuerpo anti-biotina unido a la superficie de las matrices de nanoagujeros mediante la adquisición de los correspondientes espectros de transmisión en el intervalo visible.

4.5.3. Redes de nanopilares de SU-8.

Se monitorizó la evolución espectral (medidas de reflexión) proveniente de la adsorción de agua, de HEPES (molécula orgánica de tamaño pequeño, aproximadamente 238 Da, disolución 10 mM, pH 7,4) y de BSA (proteína de gran tamaño,¹⁸⁵ aproximadamente 66,4 kDa) para estudiar la sensibilidad superficial, evaluando como figura de mérito el cociente de la sensibilidad y la anchura espectral del pico de resonancia utilizado como respuesta del sensor con objeto de comparar las prestaciones del dispositivo con las de otras arquitecturas sensoras similares.

Para estudiar el efecto del agua se realizó un test de humedad exponiendo los dispositivos a vapor de agua en una cámara cerrada a 36 °C durante 2 minutos, sin que se produjera condensación de agua apreciable a simple vista. La primera etapa de adsorción se realizó después de calentar las muestras sobre una placa calefactora a 120 °C durante 10 minutos, y los procesos de desorción de agua se llevaron a cabo de la misma manera.

Para ello, todas las muestras fueron tratadas inicialmente con H₂SO₄ 96% durante 1 minuto para activar la superficie de resina mediante la apertura de anillos epoxídicos, proceso que deja la superficie de SU-8 altamente hidrófila,¹²⁸ permitiendo que las disoluciones acuosas mojen por completo la estructura. Seguidamente fueron sumergidas y enjuagadas en agua y secadas con pistola de aire, siendo importante realizar el secado con un flujo de aire suave para evitar dañar la red de nanopilares.

Para estudiar la adsorción de BSA se preparó una disolución 20 ppm en HEPES 10 mM, ajustado a pH 7,4, depositando una gota de 50 µL sobre una red de nanopilares de SU-8 durante 30 minutos. A continuación, la muestra se enjuagó, se secó y se repitió el proceso con otra gota de BSA, aunque a mayor concentración (50 ppm) con el fin de saturar la superficie con moléculas de BSA.¹⁵⁹ Se realizó el mismo proceso con disoluciones similares pero en ausencia de BSA con objeto de investigar el efecto de la adsorción de moléculas de HEPES. Además, se estudió la biodetección incubando finalmente con gotas de diferentes concentraciones de aBSA (anti BSA, 69 kDa), en etapas de 30 minutos: 1, 1,5, 2,5, 5, 7,5, 10, 20 y 50 ppm en HEPES. En todos los casos las incubaciones se realizaron a 36,5 °C en ambiente saturado de humedad para evitar la evaporación de la gota depositada.

También se realizaron medidas con muestras sumergidas en diferentes disolventes. Para ello se fabricó un recipiente que contuviera el dispositivo y el líquido, colocando un cubreobjetos de vidrio encima, en contacto con la superficie del disolvente, para lograr una incidencia del haz de luz siempre igual.

V. Resultados.

1. MIPs.

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante esta Tesis con el fin de lograr MIPs nanoestructurados mediante EBL. El primer bloque detalla el trabajo realizado con las resinas comerciales PMMA y PMMA/MA, que constituyó un estudio preliminar de las posibilidades ofrecidas por un material comercial basado en derivados acrílicos. La segunda parte contiene los resultados cosechados con el copolímero P(HEMA-*co*-MAAEMA), primera aproximación para obtener un MIP funcional, y material con propiedades muy atractivas y variadas que lo hacen apropiado y versátil como resina para EBL. El bloque final recoge los resultados logrados con el copolímero P(MAA-*co*-MAAEMA) y su validez como MIP susceptible de ser micro y nanoestructurado mediante EBL y fotolitografía UV.

La motivación principal de este trabajo es conseguir depositar películas delgadas de MIPs con objeto de nanoestructurarlas para aprovechar las ventajas que ofrece la miniaturización, descritas en el punto 4 de la sección III de esta Tesis.

1.1. PMMA y PMMA/MA.

Estas resinas comerciales fueron estudiadas como punto de partida para llegar a obtener un copolímero útil diseñado específicamente como MIP. Estas resinas de EBL se utilizan habitualmente como resinas positivas, aunque a altas dosis se comportan como resinas negativas. Aunque las pruebas dirigidas a comprobar la utilidad de las estructuras de PMMA y PMMA/MA entrecruzadas mediante EBL como MIP no fueron concluyentes –debido, posiblemente, al excesivo grado de entrecruzamiento (poca porosidad) de los motivos resultante de los altos valores de dosis electrónica empleada– se consiguieron ciertos resultados de interés durante los test realizados. Así, se logró obtener una aplicación novedosa de estas resinas basadas en PMMA: la fabricación en un único paso¹⁸⁶ de nanoestructuras orgánicas fotoluminiscentes a partir de PMMA como resina negativa, estudiando el efecto de la exposición al haz de electrones y su relación con la PL observada mediante espectroscopía Raman.

En este sentido, cabe destacar que un resultado similar ya fue reportado empleando poliestireno¹⁸⁶ (PS) para fabricar nanoestructuras fotoluminiscentes con EBL. Sin embargo, existen tres aspectos que dan relevancia a los resultados obtenidos con PMMA: (i) a diferencia del PS, la PMMA no posee anillos aromáticos que hagan evidente el origen de la PL; (ii) la PMMA es una resina ampliamente utilizada en EBL, no como el PS, cuyo uso en EBL es anecdótico; (iii) el comportamiento dual (resina positiva–negativa según la dosis empleada) de la PMMA permite diseñar y fabricar una amplia gama de nanoestructuras.

Las Figuras 24a y 24b muestran imágenes de microscopio de campo claro de cuadrados de PMMA y PMMA/MA, respectivamente, expuestos a diferentes dosis con haz de electrones. Los cuadrados expuestos permanecen tras el revelado (comportamiento negativo) debido a las altas dosis empleadas. Por otro lado, los efectos de proximidad se observan muy bien en la forma de zonas sin resina alrededor de los motivos, provocados por la dispersión de electrones, cuyo efecto es el de haber expuesto esas zonas ausentes a dosis bajas de electrones, comportándose la resina de manera positiva. Este comportamiento está descrito en la Figura 25, que muestra la curva de contraste para ambas resinas, es decir, la representación del espesor medido de los cuadrados expuestos por el haz de electrones en función de la dosis. El contraste de una

resina (γ) está relacionado con la fracción de los enlaces rotos de las cadenas poliméricas y las variaciones de solubilidad que ello provoca, y se define como

$$\gamma = [\log (D_{100}/D_0)]^{-1} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde D_0 (dosis umbral, es decir, la dosis en la que la resina expuesta comienza a disolverse en el revelador) y D_{100} son los valores correspondientes a la intersección de la línea de mayor pendiente de la curva de calibración con las líneas correspondientes a los espesores cero y total, respectivamente.

Fig. 24. Fotografías tomadas a través de un microscopio de áreas cuadradas de $50 \times 50 \mu\text{m}$ de PMMA (a) y PMMA/MA (b) expuestas a diferentes dosis con haz de electrones. La dosis aumenta en sentido de las agujas del reloj desde 7 mC cm^{-2} (abajo-derecha) hasta 25 mC cm^{-2} (arriba-derecha) en incrementos de 2 mC cm^{-2} . Las imágenes de abajo muestran PL azul de PMMA (c) y PMMA/MA (d) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$).

Fig. 25. Espesor de las áreas cuadradas expuestas de PMMA (puntos cuadrados) y PMMA/MA (puntos circulares) después del revelado frente a la dosis de electrones empleada, conformando las respectivas curvas de contraste.

Los valores de contraste obtenidos fueron $\gamma_{\text{PMMA}} = 4,4$ y $\gamma_{\text{PMMA/MA}} = 3,1$, mientras que las dosis umbrales para PMMA y PMMA/MA fueron $D_0^{\text{PMMA}} = 6,2 \text{ mC cm}^{-2}$ y $D_0^{\text{PMMA/MA}} = 4,9 \text{ mC cm}^{-2}$, respectivamente, valores acordes a los publicados por otros autores.¹⁶⁴

Las Figuras 24c y 24d muestran imágenes de microscopía de fluorescencia correspondientes, respectivamente, a las Figuras 24a y 24b. Los cuadrados irradiados con electrones, tanto de PMMA como de PMMA/MA, exhiben PL visible muy significativa, mientras que las regiones no expuestas no la muestran.

La Figura 26a muestra el espectro de emisión de los cuadrados de PMMA expuestos. Los picos de PL están centrados aproximadamente en 485 nm, y su intensidad aumenta de forma bastante lineal con la dosis aplicada (Figura 26b). El aumento de la dosis no resultó en desplazamientos espectrales hacia el rojo del pico ni tampoco en aumentos de la anchura del pico a mitad de altura (FWHM, *full width at half maximum*), al contrario que lo reportado en el trabajo del PS irradiado con haz de electrones,¹⁸⁶ el cual fue atribuido al aumento del tamaño medio de los agrupamientos de hidrocarburos aromáticos policíclicos generados por la exposición, sugiriendo un origen diferente de la PL en las estructuras basadas en PMMA.

Fig. 26. (a) Espectro de PL de los cuadrados de PMMA expuestos a diferentes dosis de electrones. (b) Variación de la intensidad de la emisión PL en función de la dosis.

Los espectros Raman de PMMA expuesta y sin exponer se muestran en la Figura 27, mostrando con detalle la región entre 1200 y 2000 cm^{-1} para cada dosis. Los datos experimentales contienen un fondo ancho sin estructura que se corresponde con la contribución de la PL, que aumenta con la dosis. La banda que aparece alrededor de 1636 cm^{-1} cuya intensidad aumenta según aumenta la dosis confirma la presencia de dobles enlaces carbono-carbono ($\text{C}=\text{C}$).¹⁸⁷ Normalmente se relaciona la PL visible mostrada por materiales orgánicos con la presencia de dobles enlaces conjugados, ya sean cadenas olefínicas o anillos aromáticos.

Fig. 27. Espectros Raman de PMMA sin exponer y de los cuadrados expuestos a diferentes dosis (dentro del recuadro).

Por tanto, debido al diferente comportamiento espectral con la dosis empleada en la exposición de la PMMA y del PS, y a la ausencia de vibraciones de enlaces $\text{C}-\text{H}$ aromáticos en el espectro Raman de la PMMA, es posible atribuir la PL observada a la generación de cadenas olefínicas y no a anillos aromáticos.

Se fabricaron nanoestructuras con EBL tanto de PMMA como de PMMA/MA. En particular, se fabricaron rejillas de líneas perpendiculares de 500 nm de periodo. La Figura 28a muestra una medida con AFM y una parte representativa de una rejilla

fotografiada con microscopio óptico, mientras que la Figura 28b y 28c muestran imágenes de microscopio de campo claro y fluorescencia, respectivamente, de seis rejillas de PMMA fabricadas con diferentes dosis de haz de electrones.

Tanto las rejillas de PMMA como las de PMMA/MA mostraron PL visible de manera significativa, cuya intensidad estaba correlacionada con la dosis empleada, demostrando por primera vez emisión PL proveniente de nanoestructuras de PMMA creadas de forma directa con haz de electrones.

Fig. 28. (a) Imagen AFM de una zona representativa de una rejilla de PMMA nanoestructurada con EBL. En el recuadro: fotografía de microscopio óptico de una esquina de una rejilla. (b) Fotografía tomada con microscopio óptico de seis rejillas de $50 \times 50 \mu\text{m}$ de PMMA producidas a diferentes dosis con EBL. La dosis aumenta en sentido de las agujas del reloj desde 100 nC cm^{-1} (abajo-derecha) hasta 200 nC cm^{-1} (arriba-derecha) en incrementos de 20 nC cm^{-1} . (c) Imagen PL azul de las rejillas a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$).

1.2. P(HEMA-co-MAAEMA).

En esta sección se muestran los resultados obtenidos con el copolímero P(HEMA-co-MAAEMA), que fue la primera aproximación a la síntesis *ad-hoc* de un polímero MIP susceptible de ser directamente nanoestructurado mediante EBL. A pesar de que la resina se diseñó para que tuviera una dosis de entrecruzamiento menor que la PMMA y PMMA/MA que favoreciera tanto el lavado de la plantilla como una posterior incubación, no se obtuvieron resultados concluyentes de las pruebas realizadas usando acridona como molécula plantilla. A pesar de ello, estas pruebas aportaron información

para el desarrollo del copolímero P(MAA-*co*-MAAEMA), que sí resultó exitoso. Además, el estudio del material aportó gran cantidad de resultados muy relevantes, listados a continuación.

1.2.1. Contraste y sensibilidad.

La curva de contraste para dosis bajas de EBL del copolímero P(HEMA-*co*-MAAEMA), comportándose como una resina negativa, es mostrada en la Figura 29. El espesor de la resina sin irradiar es de aproximadamente 1100 nm, y el espesor que queda después de la exposición al haz de electrones suele estar en torno al 73% del inicial. El contraste resultó en un valor de 1,2, del mismo orden que el ofrecido por algunas resinas comerciales de bajo contraste como mr-EBL 6000 y AR-N 7720 (ver Tabla 2), señalando que la resina P(HEMA-*co*-MAAEMA) es apropiada para litografía 3D, que es capaz de realizar contornos suaves en pendiente.

Fig. 29. Curva de contraste del copolímero P(HEMA-*co*-MAAEMA) expuesto a diferentes dosis de haz de electrones a 50 kV y revelado en MeOH a temperatura ambiente.

La dosis umbral para la que la curva comienza a subir (D_0) es de $0,14 \mu\text{C cm}^{-2}$. El umbral de entrecruzamiento en el punto en el que el espesor de la resina es la mitad del inicial se denomina D_{50} , y resultó ser $0,52 \mu\text{C cm}^{-2}$. Este valor es un orden de magnitud inferior a los valores habituales que poseen las CARs de alta sensibilidad. Algunos ejemplos de CARs negativas comerciales de uso extendido son la MicroChem SU-8^{188,189} y la Microresist mr-EBL 6000,¹³¹ las cuales tienen dosis umbrales de entrecruzamiento relativamente bajas, con valores entre 1 y $4 \mu\text{C cm}^{-2}$. La alta sensibilidad de la P(HEMA-*co*-MAAEMA) es atribuida a la presencia de grupos funcionales colgantes entrecruzables en la cadena polimérica que favorecen la polimerización a dosis bajas. Esta gran sensibilidad de una resina no amplificada químicamente, junto con la ausencia de etapas de calentamiento, reducen el tiempo de procesamiento de manera muy significativa en comparación con CARs comerciales.

1.2.2. Resolución.

Para estudiar la resolución de la resina se preparó una muestra con una capa de 60 nm de espesor de P(HEMA-*co*-MAAEMA) con objeto de reducir los efectos de capilaridad durante el secado y los efectos de proximidad por la dispersión de electrones.

La Figura 30 muestra una imagen AFM de un patrón compuesto por líneas de P(HEMA-*co*-MAAEMA) escritas a 300 pC cm^{-1} de dosis. La altura de las líneas está comprendida en el intervalo de 50–60 nm, es decir, próxima al espesor inicial. El ancho de las líneas es de 125 nm, aproximadamente, y la resolución observada a mitad de periodo es de 100 nm. Estos valores son mayores que los ofrecidos por algunas resinas disponibles comercialmente, tales como HSQ (11,5 nm de resolución a mitad de periodo)¹⁹⁰ o mr-EBL 6000 (55 nm de resolución a mitad de periodo),¹⁹¹ algo esperable debido a que las resinas de alta sensibilidad suelen mostrar baja resolución. Sin embargo, cabe señalar que la resolución de la resina P(HEMA-*co*-MAAEMA) podría ser mejorada optimizando el proceso de revelado,¹⁹² también con una capa más delgada de resina,¹⁹³ y muy probablemente reduciendo el voltaje empleado en EBL.¹⁹⁴

Fig. 30. Imagen AFM de líneas del copolímero P(HEMA-*co*-MAAEMA) fabricadas a 300 pC cm^{-1} . La separación varía entre 100 y 300 nm de izquierda a derecha. La sección transversal correspondiente se muestra sobre la imagen AFM. El espesor de la resina es de 50–60 nm, y la anchura de línea 125 nm, aproximadamente.

La Tabla 2 muestra propiedades relevantes de algunas de las resinas negativas disponibles comercialmente y más usadas en EBL con objeto de compararlas con las de P(HEMA-*co*-MAAEMA), señaladas en la última fila. Destaca especialmente la enorme sensibilidad de P(HEMA-*co*-MAAEMA), es decir, una dosis umbral de entrecruzamiento muy baja.^{115,131–133}

	Sensibilidad (Dosis umbral de entrecruzamiento) ($\mu\text{C cm}^{-2}$)	Contraste	Resolución (nm)	CAR	Tratamiento térmico	Proceso optimizado
HSQ ¹³²	5500–25000	2,2	2–10	No	Sí	Sí
ma-N 2400 ¹³¹	60–160	1,7–2,8	< 30	No	Sí	Sí
AR-N 7720 ¹³³	50	~1	40–100	Sí	Sí	Sí
AR-N 7500 series ¹³³	25–50	> 5	< 30	No	Sí	Sí
AR-N 7700 ¹³³	8	> 5	40–100	Sí	Sí	Sí
mr-EBL 6000 ¹³¹	2–20	0,7	6–10	Sí	Sí	Sí
SU-8 ¹¹⁵	1–20	0,7–1,7	< 30	Sí	Sí	Sí
P(HEMA-co-MAAEMA) (Esta Tesis)	0,5	1,2	100–200	No	No	No

Tabla 2. Propiedades destacadas de diversas resinas negativas comerciales y de P(HEMA-co-MAAEMA) ordenadas según su dosis umbral de entrecruzamiento, de menor a mayor sensibilidad. CAR = *chemically amplified resist*.

1.2.3. Caracterización XPS.

La Figura 31 muestra el espectro de fotoelectrones del nivel C1s del copolímero P(HEMA-co-MAAEMA) sin exponer y expuesto a una dosis de $10 \mu\text{C cm}^{-2}$. Se observa un componente muy significativo a 284,8 eV debido a enlaces C–C/C–H, otro a 286,4 eV originado por enlaces C–O, y otro a 288,5 eV asociado a enlaces del grupo –COO.¹⁹⁵ Mientras que la forma y el área de los tres picos son similares, el valor de FWHM de los picos es de 2,17 eV para la resina entrecruzada con electrones y de 1,94 eV para la no expuesta. Este hecho evidencia un cambio en el entorno electrónico de los átomos de carbono inducido por la exposición al haz de electrones, concretamente la formación de nuevos enlaces. De manera similar, el espectro para el nivel O1s muestra dos componentes a 532,2 y 533,4 eV asociados a enlaces C=O y C–O.¹⁹⁵ La relación C/O para la resina sin exponer y expuesta resultó 0,31 y 0,30, respectivamente, indicando que el efecto del haz de electrones sobre la composición del copolímero no es significativo.

Fig. 31. Espectro XPS [C1s (izq) y O1s (dcha)] de una capa delgada de P(HEMA-co-MAAEMA) sin exponer (arriba) y expuesta (abajo) a una dosis de $10 \mu\text{C cm}^{-2}$.

1.2.4. Resistencia química y selectividad al ataque.

La primera prueba consistió en sumergir durante 6 horas en MeOH rectángulos de P(HEMA-*co*-MAAEMA) entrecruzados mediante EBL, no observándose cambios apreciables en su integridad, indicando buena resistencia al disolvente que contiene al propio copolímero y buena adherencia al sustrato de silicio. En este sentido, es destacable que no se usó ninguna sustancia suplementaria que facilitase la adhesión.

Se midieron los espesores de los rectángulos antes y después de la prueba, observándose cambios insignificantes excepto para aquellas dosis próximas a la dosis umbral. En tales casos sí se observó una reducción del espesor debido al entrecruzamiento incompleto de la resina.

Empleando la resina P(HEMA-*co*-MAAEMA) como máscara, se llevó a cabo un ataque húmedo isotrópico (no direccional) con HNA. La Figura 32 representa la tasa de ataque de la resina (R_{Resina}) y del silicio (R_{Si}) para diferentes dosis de haz de electrones. R_{Resina} muestra valores negativos para dosis bajas ($< 8 \mu\text{C cm}^{-2}$), algo que puede asociarse a un hinchamiento de la resina en medio acuoso debido al bajo grado de entrecruzamiento. Para dosis inferiores a $10 \mu\text{C cm}^{-2}$ se midieron valores inconsistentes para R_{Si} , quizás debido a la difusión de la disolución HNA a través de la fina y parcialmente entrecruzada película de resina. Para dosis por encima de $10 \mu\text{C cm}^{-2}$ las velocidades de ataque para ambos materiales se vuelven aproximadamente constantes, resultando en una relación $R_{\text{Si}}:R_{\text{Resina}}$ de 9,4:1, lo cual permite la fabricación de estructuras de silicio de gran relación de aspecto.

Fig. 32. (a) Velocidad de ataque de silicio, R_{Si} (puntos circulares), y de P(HEMA-*co*-MAAEMA), R_{Resina} (puntos cuadrados) en disolución HNA para diferentes dosis de EBL. Los valores negativos de R_{Resina} a bajas dosis indican hinchamiento de la resina. La tasa de ataque selectivo $R_{\text{Si}}:R_{\text{Resina}}$ resultó $\sim 9,4:1$ para dosis mayores de $10 \mu\text{C cm}^{-2}$. (b) R_{Si} (puntos circulares) y R_{Resina} (puntos cuadrados) frente a un ataque RIE para varias dosis de EBL. $R_{\text{Si}}:R_{\text{Resina}} \sim 1:2$.

Usando nuevamente la resina P(HEMA-*co*-MAAEMA) como máscara, se realizó un ataque seco de sustratos de silicio mediante RIE. Las velocidades de ataque correspondientes se muestran en la Figura 32b, resultando en una relación $R_{Si}:R_{Resina}$ de 1:2, aproximadamente. Por tanto, a diferencia del ataque húmedo, el ataque seco exhibió una selectividad muy baja para la receta de ataque empleada. Sin embargo, este ataque con el equipo RIE, usando la resina como máscara, sí podría ser usado para procesos que requieran un ataque poco profundo y para fabricar perfiles en silicio como los ilustrados en la Figura 33a, que muestran las imágenes en vista cenital tomadas con perfilómetro óptico y sus correspondientes secciones transversales, de mesetas de silicio provenientes de cuadrados de resina expuestos a dosis de $0,3 \mu C cm^{-2}$ (Figura 33a izquierda) y $50 \mu C cm^{-2}$ (Figura 33a derecha), después de ataque seco RIE y lavado con disolución piraña para eliminar los restos orgánicos de resina.

Fig. 33. (a) Imágenes tomadas con un perfilómetro óptico de las mesetas de silicio fabricadas con RIE usando P(HEMA-*co*-MAAEMA) como máscara. Las dosis empleadas con la resina para las imágenes de la izquierda y la derecha fueron $0,3 \mu C cm^{-2}$ y $50 \mu C cm^{-2}$, respectivamente. (b) Perfiles de espesor correspondientes a las líneas indicadas en (a).

El bajo contraste con el que cuenta la resina sirvió, por tanto, para crear contornos 3D suavizados, una propiedad útil para construir elementos ópticos refractantes o reflectantes, como microlentes y microespejos. Por consiguiente, la pendiente de los patrones de resina puede ser fácilmente controlado mediante la dosis empleada: dosis bajas producen pendientes abruptas, mientras que dosis altas generan contornos más suavizados.

1.2.5. Propiedades ópticas.

En la Figura 34 está representada la transmitancia (T) espectral de una capa de P(HEMA-*co*-MAAEMA) depositada por centrifugado sobre un sustrato de cuarzo para el intervalo de longitudes de onda entre 200 y 900 nm, siendo la transmitancia observada aproximadamente un 90% para longitudes de onda superiores a 380 nm. El valor del índice de refracción medido a 633 nm fue de 1,53.

Fig. 34. Espectro de transmisión óptica de una capa delgada de P(HEMA-*co*-MAAEMA) depositada por centrifugación sobre un sustrato de cuarzo.

La Figura 35 muestra imágenes de microscopio de campo claro (izquierda) y de PL (derecha) de cuadrados de resina de 50 μm de lado. Las dosis EBL aplicadas fueron 0,5 $\mu\text{C cm}^{-2}$ (Figura 35a) y 3 $\mu\text{C cm}^{-2}$ (Figura 35b). Se observa claramente PL visible incluso para la dosis umbral de entrecruzamiento. La mayor intensidad exhibida por el cuadrado expuesto a mayor dosis podría deberse a un mayor espesor de la resina y/o a un mayor grado de entrecruzamiento. La resina no entrecruzada con haz de electrones no mostró emisión PL. Normalmente, la emisión de luz visible proveniente de materiales orgánicos expuestos a radiación o haces de partículas es asociado a la generación de especies radicálicas que llevan a la formación de dobles enlaces $\text{C}=\text{C}$ conjugados. Sin embargo, un estudio en profundidad de los mecanismos exactos queda fuera de los objetivos de esta Tesis.

Fig. 35. Cuadrados de 50 $\times$ 50 μm de P(HEMA-*co*-MAAEMA) fabricados con dosis de (a) 0,5 $\mu\text{C cm}^{-2}$ (dosis umbral de entrecruzamiento) y 3 $\mu\text{C cm}^{-2}$ (b). Las imágenes de la izquierda muestran imágenes de campo claro, mientras que las de la derecha son de PL.

Al igual que en el caso anteriormente visto de las resinas de PMMA y PMMA/MA, la emisión de luz visible por parte del copolímero P(HEMA-*co*-MAAEMA) entrecruzado ofrece la posibilidad de fabricar en un único paso nanoestructuras multipropósito, orgánicas y fotoluminiscentes.¹⁸⁶ Además, a título de comparación, cabe señalar que la resina P(HEMA-*co*-MAAEMA) muestra PL visible cuando es expuesta a dosis de haz de electrones varios órdenes de magnitud inferiores que las requeridas para obtener estructuras fotoluminiscentes con PS irradiado con electrones.¹⁸⁶

1.2.6. Ejemplos de aplicabilidad.

Para demostrar las posibilidades de estructuración mediante EBL que ofrece la P(HEMA-*co*-MAAEMA) como resina negativa de bajo contraste, se realizaron diversos motivos basados en las especiales características que exhibe este material polimérico. Un ejemplo ilustrativo se muestra en la imagen AFM de la Figura 36 (derecha). La estructura, del tipo microcúpula, fue creada exponiendo secuencialmente círculos con diferentes dosis. La secuencia empleada, siendo la primera cifra el diámetro (μm) y la segunda la dosis ($\mu\text{C cm}^{-2}$), fue como sigue: 20–0,5, 16–2, 12–8, 8–20 y 5–50. El patrón diseñado se muestra también en la figura (izquierda). La altura de la microestructura resultante fue de 1,3 μm . En todas las microestructuras fabricadas, el tamaño real (diámetro) fue mayor que el de los patrones debido a efectos de proximidad y al bajo contraste de la resina.

Fig. 36. Izq: diseño compuesto de círculos concéntricos superpuestos de 20, 16, 12, 8 y 5 μm de diámetro, a los que se aplicaron dosis de 0,5, 2, 8, 20 y 50 $\mu\text{C cm}^{-2}$, respectivamente. Dcha: imagen AFM de la microcúpula de P(HEMA-*co*-MAAEMA) resultante, de 1,3 μm de altura (escala horizontal = 10 μm).

Este proceso para fabricar microestructuras poliméricas tipo microlente, junto a la alta transparencia que la resina demuestra en todo el intervalo visible, podría encontrar aplicaciones en micro óptica, por ejemplo para obtener microlentes. Como apunte, la capacidad de de las microcúpulas fabricadas para enfocar luz visible se comprobó satisfactoriamente con un microscopio óptico en modo de transmisión mientras se variaba el enfoque (distancia del objetivo del microscopio a la muestra).

Una variación del ejemplo anterior se muestra en la Figura 37. Consiste en una microcúpula corrugada cuyos patrones circulares miden 40, 32, 24, 16 y 8 μm , aplicando las mismas dosis que para el caso anterior, y con una matriz de líneas

perpendiculares de 400 pC cm^{-1} y $1 \text{ }\mu\text{m}$ de periodo escrita al término de la litografía de círculos. Este tipo de corrugación puede servir para reducir la reflectividad de la estructura y favorecer la extracción o absorción de luz a través de las microlentes.

Fig. 37. Izq: patrón de micro círculos con una matriz de líneas de $1 \text{ }\mu\text{m}$ de periodo superpuesta. Dcha: imagen AFM de la estructura corrugada resultante. El diámetro mayor del patrón es de $40 \text{ }\mu\text{m}$, mientras que el resultante es de $65 \text{ }\mu\text{m}$. La altura es de $1,3 \text{ }\mu\text{m}$.

En la Figura 38 se muestra una red hexagonal de microlentes de pequeño tamaño. El patrón repetido consistió en 5 círculos concéntricos de diámetros comprendidos entre 5 y $1 \text{ }\mu\text{m}$, con incrementos de $1 \text{ }\mu\text{m}$ y con dosis de $0,1$, $0,3$, $0,9$, 2 y $5 \text{ }\mu\text{C cm}^{-2}$, respectivamente. La distancia entre microlentes se fijó en $7 \text{ }\mu\text{m}$, dejando una fina capa de material entrecruzado entre los motivos por efectos de proximidad, que también produjeron los contornos superior e inferior observados en la imagen tomada con microscopio óptico. El máximo diámetro del patrón es de $5 \text{ }\mu\text{m}$, aunque el diámetro real es de $6,75 \text{ }\mu\text{m}$ también por efectos de proximidad. La altura de las microlentes respecto al sustrato es de $0,74 \text{ }\mu\text{m}$, y el espesor de la capa de resina entrecruzada entre ellas es de $0,15 \text{ }\mu\text{m}$.

Fig. 38. Arriba izq: imagen de microscopio óptico de parte de la estructura. Arriba dcha: imagen AFM que muestra la uniformidad de la red de microlentes. Abajo: perfil de dicha red. El mayor diámetro del patrón es de $5 \text{ }\mu\text{m}$, aunque el diámetro real es de $6,75 \text{ }\mu\text{m}$. La altura de las microlentes respecto al sustrato es de $0,74 \text{ }\mu\text{m}$, y el espesor de la capa de resina entrecruzada entre ellas es de $0,15 \text{ }\mu\text{m}$.

La Figura 39 muestra una red hexagonal similar a la anterior, pero con microlentes algo más grandes. El patrón consistió en 5 círculos concéntricos de diámetros comprendidos entre 10 y 2 μm , cada 2 micras, con dosis de 0,05, 0,2, 0,8, 2 y 5 $\mu\text{C cm}^{-2}$, respectivamente. La distancia entre microlentes fue de 11 μm . El diámetro máximo del patrón es de 10 μm , y el diámetro real máximo es de 10,8 μm , muy próximo al del patrón. La altura de las microlentes desde el sustrato es de 0,93 μm , y la altura desde el material entrecruzado existente entre las microlentes es de 0,23 μm .

Fig. 39. Arriba: imagen de microscopio óptico de la matriz hexagonal completa de 30×10 microlentes. Centro: imagen AFM de una zona de la red. Abajo: perfil de la red. El mayor diámetro del patrón es de 10 μm , y el diámetro real máximo es de 10,8 μm , muy próximo. La altura de las microlentes desde el sustrato es de 0,93 μm , aunque la altura desde el material entrecruzado existente entre las microlentes es de 0,23 μm .

En la Figura 40 se muestra un caso parecido, pero las microlentes son mayores. El patrón consta de 5 círculos concéntricos de diámetros comprendidos entre 40 y 8 μm , reduciéndose de 8 en 8 micras, con dosis de 0,5, 2, 8, 20 y 50 $\mu\text{C cm}^{-2}$, respectivamente. La distancia entre microlentes fue de 50 μm . El mayor diámetro del patrón es de 40 μm , mientras que el diámetro real máximo es de 47 μm . La altura de las microlentes desde el sustrato es de 1,50 μm , y la altura desde el material entrecruzado existente entre las microlentes es de 1,45 μm .

Fig. 40. Arriba izq: patrón hexagonal 4×5 de los motivos de círculos concéntricos empleados. Arriba dcha: imagen de microscopio óptico de una región de la matriz hexagonal, que muestra el patrón de interferencia concéntrico habitual en microlentes. Abajo: imagen AFM que muestra un detalle de la matriz. El mayor diámetro del patrón es de 40 μm , mientras que el diámetro real máximo es de 47 μm . La altura de las microlentes desde el sustrato es de 1,50 μm , y la altura desde el material entrecruzado existente entre las microlentes es de 1,45 μm .

La Figura 41 muestra una red 20×20 muy parecida a la anterior, aunque con el periodo optimizado para lograr una matriz más compacta. Las microlentes son idénticas, y el periodo se redujo a 44 μm .

Fig. 41. Arriba: imágenes tomadas con microscopio óptico de una región de la matriz hexagonal. Abajo: imagen AFM que muestra un detalle de la matriz. Se observa que las microlentes solapan ligeramente con las adyacentes.

La Figura 42 muestra una microestructura compuesta por un mayor número de círculos concéntricos, en total 20, con objeto de lograr una pendiente más suave, algo que puede conseguirse optimizando el diseño y las dosis empleadas. Sin embargo, en este ejemplo se logró fabricar un micro meseta de bordes suavizados. El patrón consistió en un diámetro máximo de 40 μm , reduciéndolo de 2 en 2 micras hasta 2 μm . Las dosis respectivas aplicadas fueron las siguientes: 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 40 y 60 $\mu\text{C cm}^{-2}$. El diámetro real máximo es de 53 μm , y la altura de la microestructura alcanza 1,32 μm .

Fig. 42. Arriba izq: patrón de 20 círculos concéntricos comprendidos entre 40 y 2 μm . Arriba dcha: imagen de microscopio óptico. La zona central evidencia la ausencia del típico patrón de interferencia concéntrico, señalando que esa zona es relativamente plana. Abajo: imagen AFM de la micro meseta. El diámetro real máximo es de 53 μm , y la altura de la microestructura alcanza 1,32 μm .

Dejando a un lado los patrones circulares, también se investigaron estructuras compuestas por rectángulos, como la mostrada en la Figura 43. La finalidad inicial consistió en intentar replicar las microestructuras quitinosas que recubren el abdomen de una especie de luciérnaga, responsables en parte de la alta eficiencia lumínica que poseen.^{196,197} La estructura lograda exhibe la capacidad de efectuar litografía 3D con P(HEMA-co-MAAEMA).

El patrón consistió en una secuencia de 10 rectángulos consecutivos de 1,5 μm de anchura, y longitud comprendida entre 1,5 y 15 μm , con incrementos de 1,5 μm . Las dosis aplicadas fueron 0,2, 0,5, 1, 2, 4, 8, 15, 25, 35 y 50 $\mu\text{C cm}^{-2}$, respectivamente. La longitud del patrón es de 15 μm , mientras que la longitud real resultante es de 12 micras porque los rectángulos más largos apenas recibieron dosis. La altura máxima es de 1 μm .

Fig. 43. Arriba izq: patrón de escritura de EBL. Arriba dcha: imagen tomada con microscopio óptico de cuatro microestructuras de este tipo. Abajo izq: imagen AFM de la microestructura lograda aplicando una estrategia de litografía 3D y aprovechando el bajo contraste de la resina. Abajo dcha: perfil de la estructura. La longitud del patrón es de 15 μm , mientras que la longitud real resultante es de 12 micras ya que los rectángulos más largos apenas recibieron dosis. La altura máxima es de 1 μm .

1.2.7. Comportamiento dual de la P(HEMA-*co*-MAAEMA).

Hasta aquí, únicamente se ha considerado el comportamiento de la P(HEMA-*co*-MAAEMA) como resina negativa, cuya alta sensibilidad (dosis de exposición requeridas muy bajas) ofrece tiempos de EBL reducidos.

Sin embargo, cuando es expuesta a dosis más altas, la resina tiene un comportamiento dual. Concretamente, la resina tiene comportamiento positivo (las zonas expuestas son eliminadas en MeOH, permaneciendo las no expuestas) en el intervalo de dosis correspondiente a 5–10 mC cm^{-2} . Este comportamiento podría atribuirse a la disociación de enlaces C–C de las cadenas principales del copolímero sometido a una alta exposición de electrones, dando lugar a una degradación en unidades más pequeñas y/o monómeros, facilitando el revelado en el disolvente.

Para dosis más altas aún, superiores a 15 mC cm^{-2} , la resina sobreexpuesta muestra comportamiento negativo de nuevo, siendo una probable explicación un proceso de carbonización¹⁹⁸ y/o la formación de un material extremadamente entrecruzado, originando un material insoluble en MeOH.

Por tanto, existen dos cambios de comportamiento de la resina según se incrementa la dosis recibida: primero de negativo a positivo, y después de positivo a negativo.

La Figura 44 muestra una imagen de microscopio óptico en la que se ilustra este comportamiento dual. Consiste en una matriz de círculos de 5 μm de diámetro de

P(HEMA-*co*-MAAEMA) expuesta a dosis entre $50 \mu\text{C cm}^{-2}$ y $87,05 \text{ mC cm}^{-2}$. Las regiones más claras se corresponden con la ausencia de material, mientras que las zonas oscuras indican presencia de la resina. Esta propiedad dual de la resina podría tener aplicación en la fabricación de estructuras complejas para aumentar la densidad de patrones,¹⁹⁹ combinando diferentes intervalos de comportamiento negativo/positivo y el uso de determinados disolventes como reveladores.

Fig. 44. Imagen de microscopio óptico de una matriz de círculos de $5 \mu\text{m}$ de P(HEMA-*co*-MAAEMA) expuestos con dosis crecientes. Abajo izquierda corresponde a una dosis inicial de $50 \mu\text{C cm}^{-2}$. La secuencia de exposición varía horizontalmente y en zigzag con incrementos de 3 mC cm^{-2} hasta alcanzar los $87,05 \text{ mC cm}^{-2}$ (arriba dcha). Las zonas claras y oscuras se corresponden con la ausencia y la presencia de resina, respectivamente. La barra de escala es de $20 \mu\text{m}$.

Se realizaron además varias estructuras 3D más complejas aprovechando el comportamiento dual de la resina, empleando el primer intervalo de dosis (comportamiento negativo), el segundo (comportamiento positivo) y también el tercero (nuevamente negativo). Los patrones utilizados constan de círculos concéntricos, similares a los empleados para crear microlentes.

Fig. 45. Izq: imagen AFM de la microestructura que combina el comportamiento negativo y positivo de la P(HEMA-*co*-MAAEMA). Dcha: detalle de la cima que muestra con claridad la concavidad existente, creada en el intervalo positivo. El diámetro del patrón es de $40 \mu\text{m}$, el diámetro final es $57,5 \mu\text{m}$, y el diámetro de la microlente cóncava central es de $14 \mu\text{m}$. La altura máxima es de $1,37 \mu\text{m}$, y desciende hasta $0,56 \mu\text{m}$ en el centro.

En el primer ejemplo, mostrado en la Figura 45, la secuencia empleada de diámetros fue 40–5 μm , con incrementos de 5 μm , y las dosis empleadas fueron 0,5, 5, 10, 20, 50, 200, 500 y 800 $\mu\text{C cm}^{-2}$. La altura máxima de la microestructura resultante fue de 1,37 μm . Se observa claramente el efecto del comportamiento positivo de la resina en la cima de la microestructura, en la que existe un hundimiento. La estructura es una microlente convexa con una microlente cóncava y más pequeña en el centro, y podría servir de máscara para transferir dicha estructura a un sustrato o para retener líquido (microdepósito), por ejemplo. El diámetro del patrón es de 40 μm , el máximo diámetro real es 57,5 μm , y el diámetro de la microlente cóncava central es de 14 μm . La altura máxima es de 1,37 μm , y desciende hasta 0,56 μm en el centro.

La Figura 46 es una nueva variante del ejemplo anterior, aunque se emplearon más círculos en el diseño. Se emplearon círculos de entre 40 y 2 μm de diámetro con incrementos de sólo 2 μm . Las dosis fueron 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 180, 250, 500, 750, 1000 y 1500 $\mu\text{C cm}^{-2}$, respectivamente. En el centro del motivo se alcanzó el segundo intervalo de dosis en el que la resina se comporta de forma negativa. La estructura resultante es similar a un microtoroide. El diámetro del patrón es de 40 μm , el diámetro real es de 53,5 μm , y la altura máxima es de 1,15 μm .

Fig. 46. Arriba izq: imagen tomada con microscopio óptico. . Arriba dcha: perfil de la microestructura. El diámetro del patrón es de 40 μm , el diámetro real es de 53,5 μm , y la altura máxima es de 1,15 μm . Abajo izq: imagen AFM de la microestructura, mostrando un aspecto toroidal (comportamiento negativo de la resina a dosis bajas). Las limitaciones del barrido del AFM ocultan el auténtico aspecto de la zona central. Abajo dcha: concavidad de la región central (comportamiento positivo), en cuyo fondo se aprecia una leve microestructura convexa (comportamiento negativo a dosis muy altas)

Finalmente, se fabricó una microestructura empleando el mismo patrón que en el caso anterior, pero aplicando dosis superiores: 0,5, 5, 10, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 y 1500 $\mu\text{C cm}^{-2}$, respectivamente, para los círculos comprendidos entre 40 y 2 μm de diámetro con incrementos de 2 μm . El efecto que produce entrar en el intervalo de dosis muy altas, en el que la resina tiene comportamiento negativo de nuevo, es notable, tal como se observa en la Figura 47. El diámetro del patrón es de 40 μm , el diámetro real es de 63 μm , y la altura máxima es de 1,26 μm .

Fig. 47. Arriba izq: imagen tomada con microscopio óptico. Abajo: perfil de la microestructura. El diámetro del patrón es de 40 μm , el diámetro real es de 63 μm , y la altura máxima es de 1,26 μm . Abajo izq: imagen AFM de la microestructura, mostrando un aspecto toroidal (comportamiento negativo de la resina a dosis bajas). Las limitaciones del barrido del AFM ocultan el aspecto real del centro. Abajo dcha: concavidad de la región central (comportamiento positivo), mostrando en el centro una microlente convexa (comportamiento negativo a dosis muy altas).

Adicionalmente, se realizaron medidas de PL de estas estructuras, mostrando todas ellas emisión en el intervalo visible del espectro, como se apuntó anteriormente. La Figura 48 muestra diversas microestructuras correspondientes a algunas de las pruebas de fabricación descritas anteriormente considerando el comportamiento dual de la P(HEMA-*co*-MAAEMA), destacando una mayor emisión en las zonas centrales, entrecruzadas a dosis muy altas en el segundo intervalo de comportamiento negativo. La emisión PL mostrada corresponde a tiempos de adquisición de 1, 5 y 10 segundos.

Fig. 48. Diversas microestructuras fabricadas empleando el comportamiento dual de la P(HEMA-*co*-MAAEMA), y su emisión PL con tiempos de adquisición de 1 s (arriba dcha.), 5 s (abajo izq.) y 10 s (abajo dcha.).

1.3. P(MAA-co-MAAEMA).

En este apartado se encuentran los resultados más relevantes obtenidos con el copolímero P(MAA-co-MAAEMA), especialmente en su aplicación como MIP.

1.3.1. Comportamiento dual, contraste y sensibilidad.

De manera similar a lo que ocurre con la resina P(HEMA-co-MAAEMA), el copolímero P(MAA-co-MAAEMA) también presenta un comportamiento dual (Figura 49) frente a la exposición al haz de electrones, existiendo dos cambios en el comportamiento de la resina en función de la dosis aplicada.

A dosis bajas ($0,05\text{--}100\ \mu\text{C cm}^{-2}$) se comporta como una resina negativa (la región expuesta permanece tras el revelado), hecho atribuido a la presencia de grupos funcionales colgantes entrecruzables en la cadena polimérica que favorecen la polimerización a dosis bajas.²⁰⁰ La desaparición de la banda de tensión $\text{C}=\text{C}$, situada a $1657\ \text{cm}^{-1}$, como resultado del entrecruzamiento, fue confirmada mediante espectroscopía Raman (Figura 50, en rojo).

Fig. 49. Imágenes de microscopio óptico de rectángulos de P(MAA-co-MAAEMA) de $20\times 50\ \mu\text{m}$, escritos a diferentes dosis (50 kV. Corriente EBL de 10 pA para (a) y 1 nA para (b)). (a) El primer cambio de comportamientos se observa a $100\ \mu\text{C cm}^{-2}$, aproximadamente. (b) El segundo cambio se produce aproximadamente a $8\ \text{mC cm}^{-2}$.

Fig. 50. Espectro micro-Raman correspondiente al copolímero P(MAA-co-MAAEMA) depositado sobre un sustrato de silicio y no expuesto al haz de electrones (negro); nanoestructura expuesta a $53\ \mu\text{C cm}^{-2}$ (rojo); nanoestructura expuesta a $20\ \text{mC cm}^{-2}$ (azul).

En el intervalo de dosis entre $100 \mu\text{C cm}^{-2}$ y 8 mC cm^{-2} el copolímero muestra comportamiento positivo (las zonas expuestas son eliminadas en el revelado) como consecuencia de la degradación de las cadenas, rotas en fragmentos pequeños bajo las altas dosis de exposición facilitando que las regiones expuestas se disuelvan en THF, que actúa como revelador.

A dosis superiores a 8 mC cm^{-2} , aproximadamente, el copolímero recupera el comportamiento negativo, algo que podría achacarse a la carbonización del material y/o a un grado extremadamente elevado de entrecruzamiento. Sin embargo, al contrario que lo observado por otros autores en un trabajo con PMMA,¹⁹⁸ los espectros Raman (Figura 50, en azul) no evidenciaron un proceso de carbonización, por lo que el comportamiento negativo puede relacionarse con un gran entrecruzamiento de las cadenas poliméricas.

La Figura 51 muestra la curva de contraste para dosis bajas de EBL de P(MAA-co-MAAEMA). En el intervalo representado, se comporta como resina negativa de manera similar a P(HEMA-co-MAAEMA). El contraste resultó en un valor de 2, es decir, también es de bajo contraste.

Fig. 51. Curva de contraste de la resina P(MAA-co-MAAEMA) expuesta a 50 kV.

La dosis umbral para la que la curva comienza a subir (D_0) es de $0,7 \mu\text{C cm}^{-2}$. El umbral de entrecruzamiento en el punto en el que el espesor de la resina es la mitad del inicial se denomina D_{50} , y resultó ser $1,5 \mu\text{C cm}^{-2}$. Este valor es un orden de magnitud inferior a los valores habituales que poseen las CARs de alta sensibilidad, y únicamente unas 3 veces superior al valor obtenido para P(HEMA-co-MAAEMA).

La Figura 52 muestra los motivos fabricados con dosis por debajo de $8 \mu\text{C cm}^{-2}$ para realizar la curva de contraste, consistente en una matriz de rectángulos de $40 \times 60 \mu\text{m}$ (10×7 filas). La litografía EBL se llevó a cabo a 50 kV y 10 pA. La muestra fue revelada durante 1 minuto en THF, después 1 minuto en MeOH, y finalmente secada con pistola de nitrógeno. En estas condiciones, la reducción de espesor fue aproximadamente del 50% para las dosis más altas, partiendo de un espesor inicial de 90 nm.

Fig. 52. Fotografía de microscopio óptico de la matriz de rectángulos de $40 \times 60 \mu\text{m}$ fabricada para obtener la curva de contraste para dosis inferiores a $8 \mu\text{C cm}^{-2}$. La dosis inicial aplicada en la esquina inferior izquierda (por debajo de la dosis umbral de entrecruzamiento, por lo tanto no existe un rectángulo) corresponde a $55,5 \text{ nC cm}^{-2}$. La secuencia de exposición varía en zigzag horizontal en incrementos de 111 nC cm^{-2} hasta un máximo de $7,715 \mu\text{C cm}^{-2}$. La barra de escala equivale a $100 \mu\text{m}$.

La Figura 53 muestra el intervalo de dosis altas entre 2 y 20 mC cm^{-2} , correspondiente al segundo intervalo de comportamiento negativo, después de la exposición EBL y las etapas de revelado correspondientes. La primera etapa, en THF, disuelve la resina expuesta a la baja dosis proveniente de los efectos de proximidad (región circundante a los rectángulos, con comportamiento de resina positiva), debido a la rotura de cadenas poliméricas y un consecuente aumento de la solubilidad de los fragmentos de menor tamaño. La segunda etapa de revelado, en MeOH (su disolvente original), redissuelve el material no expuesto a los efectos del haz de electrones, dejando únicamente los expuestos a muy alta dosis del segundo intervalo de comportamiento negativo.

Fig. 53. Izq: Imagen de microscopio óptico de una matriz de rectángulos de $20 \times 50 \mu\text{m}$ de P(MAA-*co*-MAAEMA) después de 1 minuto de revelado en THF. La dosis más baja corresponde a abajo izquierda (2 mC cm^{-2}), la secuencia de exposición va horizontalmente en zigzag en incrementos de 2 mC cm^{-2} hasta 20 mC cm^{-2} . Dcha: Misma imagen después de 1 minuto de revelado en MeOH.

1.3.2. Efecto de la irradiación electrónica (EBL) sobre la molécula plantilla.

Los experimentos indicaron una eficiencia de reconocimiento nula o extremadamente baja en patrones creados con EBL en los dos intervalos de dosis en los que el copolímero tiene comportamiento negativo: la exposición directa del motivo final empleando el intervalo negativo de dosis bajas no logró producir nanoestructuras bien definidas debido al bajo contraste de la resina, y la exposición a las altas dosis electrónicas correspondientes al segundo intervalo de comportamiento negativo degradaba la plantilla fluorescente utilizada, no observándose emisión PL. Debido a ello se optó por emplear el copolímero P(MAA-*co*-MAAEMA) como resina positiva.

Aunque se fabricaron motivos con EBL para demostrar la capacidad del copolímero P(MAA-*co*-MAAEMA) para producir MIPs nanoestructurados, debido a la necesidad de exponer áreas grandes que requerirían mucho tiempo de exposición mediante EBL, fue más práctico utilizar la fotolitografía DUV para definir microestructuras de espesor nanométrico, facilitando, además, las medidas de fluorescencia debido al mayor tamaño de los motivos.

1.3.2.1 Estructuras fabricadas mediante EBL.

La Figura 54, que representa el logo institucional del Campus de Excelencia Internacional Moncloa, muestra una imagen AFM de una nanoestructura de P(MAA-*co*-MAAEMA) fabricada con EBL empleando una dosis de $750 \mu\text{C cm}^{-2}$ (intervalo positivo). El análisis de rugosidad dio un valor RMS de 30 nm.

La imagen SEM correspondiente se muestra en la Figura 55a. Este patrón fue realizado, por tanto, exponiendo al haz de electrones las regiones que quedan en el exterior del motivo, tal como se muestra gráficamente en la Figura 55b, conformando el primer MIP nanoestructurado mediante escritura directa con EBL en la literatura científica. Las zonas expuestas al haz de electrones fueron eliminadas revelando en THF durante 1 minuto, secando después con pistola de nitrógeno. Los motivos obtenidos fueron entrecruzados térmicamente a 170°C durante 30 minutos.

Fig. 54. Arriba: imagen AFM de una nanoestructura de P(MAA-*co*-MAAEMA) fabricada mediante EBL a $750 \mu\text{C cm}^{-2}$. Abajo: sección transversal de la línea verde mostrada en la imagen AFM.

La longitud del motivo es de 4 μm aproximadamente, la anchura de los segmentos es de 300 nm y el espesor es 100 nm. La imagen SEM correspondiente se muestra en la Figura 55, y revela un acabado superficial menos rugoso que el observado en las imágenes AFM.

Fig. 55. a) Imagen SEM de la nanoestructura MIP fabricada a $750 \mu\text{C cm}^{-2}$. La barra de escala equivale a $1 \mu\text{m}$. b) Esquema de escritura del patrón de P(MAA-co-MAAEMA) que representa el logo institucional del Campus de Excelencia Internacional Moncloa. La zona azul fue expuesta con EBL en el intervalo positivo de la resina para ser eliminada a continuación. Por tanto, la zona sin exponer (en blanco) conformó la nanoestructura final.

1.3.3. Estructuras fabricadas mediante fotolitografía.

Las películas de P(MAA-co-MAAEMA) mostraron un comportamiento positivo como resina de fotolitografía (DUV), para las condiciones de irradiación utilizadas: 30 minutos de exposición y dosis total de 36 J cm^{-2} . Tras la exposición, las zonas irradiadas se eliminaron revelando las muestras en THF durante 1 minuto, y fueron secadas después con pistola de nitrógeno. Los micropatrones obtenidos (material no expuesto a luz DUV), de los que algunos ejemplos pueden observarse en la Figura 56, fueron entrecruzados térmicamente a 170°C durante 30 minutos. Debido al comportamiento positivo del material polimérico, la molécula plantilla R123 no es expuesta a la radiación UV y así se evita su posible degradación. Es importante resaltar que la temperatura utilizada durante la etapa de entrecruzado térmico (170°C) tampoco degrada la R123, cuyo punto de fusión es 235°C .

Fig. 56. Imagen tomada con microscopio óptico de algunas de las microestructuras fabricas mediante fotolitografía DUV. Las estructuras y las moléculas plantilla R123 que contienen no fueron irradiadas con luz UV.

1.3.3.1. Sensores biomiméticos de P(MAA-co-MAAEMA).

En el proceso de impronta molecular del copolímero P(MAA-co-MAAEMA) con moléculas fluorescentes de R123 como plantillas, los grupos amino primarios de la R123 interaccionan mediante uniones no covalentes con los grupos carboxílicos del copolímero, generando lugares de unión de alta afinidad en la estructura polimérica entrecruzada. De la misma manera, aunque en ausencia de moléculas plantilla de R123, se fabricaron muestras de referencia (*non-imprinted polymers*, NIPs) para ser sometidas a idénticos procesos de extracción e incubación.

Una vez fabricados los motivos mediante fotolitografía DUV, la eficiencia de la extracción de las moléculas plantilla de R123 se comprobó mediante medidas de fluorescencia, demostrando la extracción cuantitativa (es decir, la señal del motivo no difiere de forma estadísticamente significativa respecto al fondo sin MIP y no varía al ser sometida a más lavados, considerándose que la plantilla está totalmente extraída) después de 1 hora de lavado tal como se señala en el punto 3.1.3 de la Sección de Materiales.

Fig. 57. (a) Cinética de reconocimiento (intensidad de emisión PL en función del tiempo de incubación) de R123 para el MIP y el NIP de P(MAA-co-MAAEMA). [R123] = 20 nM, $n = 9$. La intensidad para un tiempo de 0 horas corresponde a un motivo no incubado aún. (b) Intensidad de emisión PL para MIP y NIP incubados con concentraciones crecientes de R123 (0,1 – 1,0 μM) ($n = 9$).

La Figura 57a (cinética de unión a concentración constante) muestra que el MIP reconoce el analito a concentraciones nanomolares y que la intensidad de emisión alcanza un nivel constante después de 3 horas de incubación. Este largo tiempo hasta alcanzar la situación de equilibrio es atribuido a un alto entrecruzamiento de la estructura polimérica, lo cual resulta en una lenta difusión de las moléculas de R123 hacia los huecos de reconocimiento. Además, a concentraciones altas de R123, los patrones MIP mostraron reconocimiento mientras que los patrones sin plantilla (NIPs) mostraron una señal despreciable (Figura 57b). Esto último revela que el proceso de impronta molecular fue exitoso, es decir, se crearon cavidades de reconocimiento específico de R123 en la estructura polimérica que conformaba los patrones.

La selectividad del sensor fue estudiada comparando la capacidad de reconocimiento de la molécula plantilla con otras moléculas estructuralmente análogas, lo cual indica la reactividad cruzada del MIP frente a moléculas seleccionadas. Así, se efectuaron experimentos de reconocimiento con sensores conteniendo patrones de P(MAA-co-MAAEMA) improntados con moléculas de R123, enfrentados a pruebas de reconocimiento de R123, R6G y RB (Figura 58), tres rodaminas altamente fluorescentes que comparten la misma estructura carbonada, con la diferencia de que contienen aminas primarias, secundarias y terciarias, respectivamente.

Fig. 58. Estructura química de R123 (a), R6G (b) y RB (c).

Fig. 59. Demostración de la alta selectividad del sensor MIP frente a R123 y dos moléculas estructuralmente análogas (5 μ M). Imagen insertada: imágenes de fluorescencia de una microestructura MIP incubada con (a) R123, (b) R6G y (c) RB. $n = 9$. La barra de escala es igual a 100 μ m.

Después de 3 horas de incubación en acetonitrilo, los sensores incubados con los análogos R6G y RB no mostraron fluorescencia de manera significativa, mientras que R123 evidenció un reconocimiento altamente eficiente (Figura 59), demostrando una alta selectividad por parte del MIP. Este resultado es un apoyo adicional al mecanismo de reconocimiento propuesto basado en la formación de un complejo unido mediante enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxílicos del P(MAA-co-MAAEMA) y la amina primaria de R123.

El límite de detección (LOD, *limit of detection*), determinado por Sergio Carrasco (grupo GSOLFA) en el ámbito de su Tesis, fue calculado a partir de la desviación estándar (σ) del blanco ($n = 132$) y del valor de la pendiente del calibrado (b), obteniéndose $LOD = 3\sigma b^{-1} = 92 \text{ nM}$ ($32 \mu\text{g L}^{-1}$), mientras que el límite de cuantificación resultante es $LOQ = 10\sigma b^{-1} = 306 \text{ nM}$ ($105 \mu\text{g L}^{-1}$).

Como apunte final en esta sección, este trabajo dio lugar a la Patente Nacional 201330947, titulada Método de obtención de una estructura de polímero de impronta molecular (MIP), cuyos inventores son (p.o. de firma): Carlos Angulo Barrios, Víctor Canalejas Tejero, Sergio Carrasco Garrido, María Cruz Moreno Bondi y Fernando Navarro Villoslada. Fue tramitada a mediados de 2013 y concedida el 14/08/2015, siendo entidades titulares la Universidad Complutense de Madrid (50%) y la Universidad Politécnica de Madrid (50%).

2. Nanoagujeros en aluminio.

A continuación se detallan los resultados que muestran la viabilidad de producir biosensores plasmónicos basados en redes de nanoagujeros fabricados en aluminio, tanto en sustratos de vidrio como en policarbonato procedente de CDs.

La motivación de esta investigación es la ausencia de trabajos que hayan considerado el aluminio en lugar de oro como componente de biosensores plasmónicos basados en redes de nanoagujeros. Además, este trabajo también es impulsado por lograr la integración de este tipo de biosensores en equipos de lectura de CDs, por lo que se ha desarrollado un método de fabricación empleando sustratos de policarbonato de CDs.

2.1. Características estructurales y espectrales.

2.1.1. Dispositivos sobre sustratos de vidrio.

La tasa de ataque ICP del aluminio frente a la resina usada como máscara bajo las condiciones detalladas en la sección de materiales y métodos fue 1,18:1. Es decir, el plasma ataca a ambos materiales a velocidades similares, lo que conduce a que el aluminio sea atacado por completo en el fondo de los nanoagujeros en resina (hasta llegar al vidrio) mientras que un pequeño espesor de la máscara de resina permanece, siendo fácilmente eliminable posteriormente mediante un corto proceso de plasma de oxígeno.

Macroscópicamente, la propiedad óptica que caracteriza a estos dispositivos es la difracción de luz visible procedente del ordenamiento periódico de los nanoagujeros en la película de aluminio. La Figura 60 muestra este fenómeno en una muestra de 4×4 mm que contiene una red de nanoagujeros de periodo 500 nm.

Fig. 60. Fotografía que muestran la fuerte difracción óptica de una red de nanoagujeros de 4 mm de lado y 500 nm de periodo. La muestra está situada bajo el microscopio óptico, con luz visible en transmisión.

La colección de imágenes de la Figura 61 muestra fotografías de una red de nanoagujeros uniforme y con buena respuesta espectral (resonancias definidas), tomadas con el microscopio óptico a diferentes aumentos. Destaca la baja cantidad de microdefectos y poros, aunque siempre existe cierta cantidad de ellos procedentes de la fabricación. Si la presencia de estos defectos es baja o moderada, se ha comprobado que su efecto sobre la respuesta espectral (transmitancia) es ínfima. La imagen tomada en

transmisión revela cómo la red de nanoagujeros permite pasar cierta cantidad de luz, al contrario que el aluminio que la rodea, sin nanoagujeros. Además, se aprecian claramente las fronteras entre dominios escritos individualmente con EBL. Cada dominio mide $200 \times 200 \mu\text{m}$ debido a las condiciones de fabricación empleadas en el equipo EBL, y las fronteras se observan debido a que los dominios tienen una separación ligeramente superior al periodo de la red.

Fig. 61. Imágenes de microscopio óptico de una red de $2 \times 2 \text{ mm}$ de nanoagujeros. Fila superior: imágenes tomadas a $2,5\times$ en reflexión (izquierda) y transmisión (derecha). Fila central, izq-dcha: imágenes de una esquina de la red tomadas a 100, 200 y 500 aumentos. La fotografía inferior, tomada a $1000\times$, permite apreciar ligeramente la estructura periódica de la red de nanoagujeros.

Debido a que la continuidad entre dominios adyacentes no siempre es uniforme y perfecta (debido al efecto del *stitching*, es decir, a variaciones y/o errores en la correcta alineación de motivos expuestos con EBL), los dispositivos fueron fabricados con dominios ligeramente separados, normalmente 1 ó 2 μm (Figura 62a), para evitar solapamientos o la creación de dominios separados menos que el periodo de la red. El solapamiento entre dominios resulta en nanoagujeros de diámetro ligeramente mayor en las zonas de solapamiento debido a que algunos reciben más de un impacto del haz de electrones (Figura 62b). Aun con todo, se ha comprobado experimentalmente que los solapamientos y errores leves de alineación entre dominios no tienen un efecto apreciable en la respuesta espectral porque afectan a una proporción de nanoagujeros extremadamente baja.

Fig. 62. Izq: Imagen SEM de la intersección entre cuatro dominios de nanoagujeros de periodo 500 nm separados 2 μm , evitando así problemas de solapamiento. Barra de escala = 10 μm . Dcha: Imagen SEM que muestra el solapamiento de la intersección de cuatro redes adyacentes en los que la última fila o columna de una red coincide con la primera fila o columna del siguiente, respectivamente. Los nanoagujeros situados en las esquinas son producto de un solo impacto del haz de electrones ($\varnothing = 147 \text{ nm}$), los situados en el centro de cada lado recibieron dos impactos ($\varnothing = 215 \text{ nm}$), y el nanoagujero central recibió cuatro ($\varnothing = 304 \text{ nm}$). Barra de escala = 0,5 μm .

La Figura 63 muestra imágenes SEM de dispositivos con periodo 500 nm que cuentan con buena uniformidad, si bien es cierto que los nanoagujeros no siempre quedan perfectamente circulares debido al enfoque y al ajuste del astigmatismo del haz de electrones, que deben ser perfectos, y a los procesos químicos necesarios para fabricarlos (revelado después de la litografía y ataque ICP). Respecto al tamaño de los nanoagujeros, la mayoría de las muestras fabricadas en las condiciones señaladas en la correspondiente sección experimental contaron con nanoagujeros cuyo diámetro estaba normalmente en el intervalo 200–250 nm, tamaño que habitualmente ha permitido obtener respuestas espectrales de transmisión óptica de buena calidad, es decir, con las resonancias bien definidas. Sin embargo, variando levemente las condiciones de EBL, y optimizando el enfoque del haz y el posterior revelado (tiempo, agitación, y temperatura del revelador por debajo de 0 $^{\circ}\text{C}$), es posible fabricar nanoagujeros de menos de 100 nm

de diámetro, reduciéndose la transmisión de luz un orden de magnitud aproximadamente.

La Figura 64a y 64b muestran imágenes AFM de un nanoagujero fabricado en aluminio. La sección transversal del nanoagujero (Figura 64c) prueba que posee paredes inclinadas, hecho debido a las distintas etapas del procesado.

Fig. 63. Arriba: imágenes SEM de una muestra representativa de la mejor calidad estructural obtenida durante la Tesis. El periodo es 500 nm y el diámetro de los nanoagujeros es 220 nm. Abajo: imagen SEM de nanoagujeros de diámetro igual o inferior a 100 nm.

Fig. 64. Imágenes AFM de un nanoagujero en aluminio (a y b). La sección transversal (c) muestra claramente las paredes inclinadas que posee.

En cuanto a la respuesta óptica, la Figura 65 (abajo) muestra la transmitancia espectral en el visible de una matriz (red cuadrada) de nanoagujeros (periodo = 500 nm) en aluminio sobre un sustrato de vidrio. En la misma figura (arriba) se representa el espectro simulado numéricamente (todas las simulaciones de los dispositivos ópticos tratados en esta Tesis fueron realizadas por el Dr. Carlos Angulo Barrios) correspondiente a un dispositivo sin capa de óxido (espesor de la capa de óxido, $t_{ox} = 0$), mientras que la curva experimental pertenece a una muestra sin pasivar. Se observa que ambos espectros, el calculado y el experimental, son muy parecidos, hecho que apoya la validez del modelo aplicado.

La ecuación de acoplamiento SPP de la red de difracción que corresponde con la matriz cuadrada de nanoagujeros es la siguiente:

$$\lambda_{SPP} \approx \frac{a}{\sqrt{i^2 + j^2}} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

En esta ecuación, a es el periodo de la red, i y j son los órdenes de la red, y ϵ_m y ϵ_d son las constantes dieléctricas del metal y del medio dieléctrico, respectivamente. Esta ecuación predice las posiciones de las resonancias SPP para $i = \pm 1, j = 0$ (o viceversa) para la intercara metal/aire, y para $i = \pm 1, j = \pm 1$, y para $i = \pm 1, j = 0$ (o viceversa), para la intercara metal/vidrio, lo que permite relacionar determinadas resonancias espectrales con la excitación de SPPs.

En el intervalo de longitudes de onda estudiado destacan tres características espectrales, denominadas S, P y Q, referidas a los tres mínimos observados: λ_S (~507 nm), λ_P (~550 nm) y λ_Q (~770 nm).

Fig. 65. Espectros de la transmisión óptica experimental (abajo) y calculada (arriba) de una red de nanoagujeros en aluminio sobre vidrio. Periodo = 500 nm, espesor de la capa de aluminio = 100 nm, diámetro de nanoagujero = 220 nm.

La Ecuación 2 predice las posiciones de las resonancias SPP en 507 nm para $i = \pm 1, j = 0$ (o viceversa) para la intercara metal/aire, y en 553 nm para $i = \pm 1, j = \pm 1$, y 771 nm para $i = \pm 1, j = 0$ (o viceversa), para la intercara metal/vidrio, valores que se ajustan muy bien tanto a los picos (mínimos) experimentales como a los simulados, y por tanto puede atribuirse su origen a la excitación de SPPs. Considerando, pues, que el mínimo λ_S es dependiente de la constante dieléctrica del aire y, por tanto, de cualquier medio que esté en contacto con la matriz reemplazando el aire, la medida de los desplazamientos del pico λ_S puede ser utilizada como respuesta del sensor refractométrico. Un incremento del índice de refracción del medio (debido, por ejemplo, a la adsorción de una capa delgada de material sobre la superficie) debería producir un desplazamiento de λ_S hacia el rojo, es decir, hacia longitudes de onda mayores, mientras que una reducción del índice del medio (por ejemplo, debido a la eliminación de material o reducción del espesor de una capa existente sobre la superficie del dispositivo) debería conducir a un desplazamiento de λ_S hacia el azul (hacia longitudes de onda menores). Además, ha de considerarse la relación de los desplazamientos espectrales resultantes con el espesor de las biopelículas que los causan (biomoléculas de distinto tamaño) debido al decaimiento exponencial con la distancia de la intensidad del campo evanescente proveniente del efecto SPR, por el que biomoléculas muy pequeñas interaccionarán únicamente con la región del campo evanescente que presenta mayor intensidad (la intercara metal/dieléctrico), y especies de mayor tamaño interaccionarán con la superficie y con una región en la que la intensidad del campo evanescente decrece con la distancia.

La incertidumbre de la medida del espectro debida a la colocación de la muestra en el espectrofotómetro se estudió midiendo una muestra fijada en el soporte habitual usado para medir los dispositivos, retirándolo del equipo, recolocando la misma muestra y midiéndola de nuevo, repitiendo el proceso sucesivamente varias veces. La Figura 66 muestra diez espectros adquiridos de esta manera, obteniendo un valor medio de $\lambda_S = 504,663$ nm, con SD (desviación estándar) = 0,092 nm. Por tanto, puede asumirse que el error de la posición de λ_S es menor a $\pm 0,1$ nm, valor que necesariamente ha de tenerse en cuenta al considerar el límite de detección de una sustancia.

Fig. 66. Espectros adquiridos consecutivamente en el espectrofotómetro después de retirar y recolocar la misma muestra en el soporte empleado. La desviación estándar de la posición de λ_S es menor de 0,1 nm.

2.1.2. Dispositivos sobre sustratos de policarbonato.

A diferencia de los sustratos de vidrio, tal como se expone en la sección experimental, uno de policarbonato requiere condiciones de fabricación que protejan el material polimérico que lo compone frente a la degradación química, ya que el policarbonato es susceptible de ser atacado por los disolventes empleados tanto en la resina como en el revelador, además de que también sufre ataque durante los procesos de plasma aplicados (ICP y pasivación). Ésta es la razón de la presencia habitual de microporos procedentes del procesado, aunque la caracterización óptica de los dispositivos fabricados indican que estos defectos no afectan de forma significativa a la respuesta espectral de los mismos. La Figura 67 muestra el aspecto frecuente de una red de nanoagujeros en aluminio sobre policarbonato. La fotografía tomada en transmisión delata los microporos existentes como puntos luminosos.

Fig. 67. Fotografías de microscopio óptico tomadas a 50× de una red cuadrada de nanoagujeros en una película de aluminio sobre un sustrato de policarbonato, en reflexión (izq) y transmisión (dcha). El área cuadrada nanoestructurada tiene 1,2 mm de lado. Los defectos procedentes del procesado químico aparecen como microporos blancos en transmisión debido a que dejan pasar la luz.

Con todo, la calidad estructural general es bastante buena, tal como se muestra en las imágenes SEM de la Figura 68, que muestran una red de nanoagujeros (de periodo 500 nm) en aluminio sobre policarbonato, observándose nuevamente buena uniformidad. El diámetro de los nanoagujeros es de 225 nm, aproximadamente. No se observó ningún signo de degradación con respecto a los materiales involucrados, y fue debido a que (i) el calentamiento de los chips antes de la litografía (10 minutos a 120 °C) permitió evaporar el disolvente de la resina a una temperatura inferior a los 147 °C correspondientes a la temperatura de transición vítrea del policarbonato, que reblandecería el material, (ii) la cinta adhesiva empleada para proteger el sustrato en diferentes etapas evitó la degradación química del policarbonato, que hubiese resultado en una superficie deteriorada y/o traslúcida u opaca, y (iii) el pasivado llevado a cabo mediante etapas de 3 minutos evitó la degradación del policarbonato observada en el caso de aplicar los tiempos habituales con sustratos de vidrio.

Fig. 68. Imágenes SEM representativas de una red de nanoagujeros de 500 nm de periodo. Destacan la buena uniformidad y homogeneidad que habitualmente se obtienen.

La Figura 69 muestra un espectro simulado y uno experimental, en aire, para redes cuadradas de nanoagujeros (500 nm de periodo) en aluminio sobre sustratos de policarbonato. Ambos espectros exhiben tres resonancias principales referidas a los tres mínimos destacados: λ_S (~510 nm), λ_P (~575 nm) y λ_Q (~800 nm).

Fig. 69. Espectro medido (abajo) y calculado (arriba) de una red de nanoagujeros (periodo = 500 nm) en aluminio sobre policarbonato. Los mínimos característicos S, P y Q están situados en ~510, ~575 y ~800 nm, respectivamente.

Según la Ecuación 2, los valores calculados de las posiciones de las resonancias SPP son 507 nm para $i = \pm 1, j = 0$ (o viceversa) para la intercara metal/aire, y 575 nm para $i = \pm 1, j = \pm 1$ y 803 nm para $i = \pm 1, j = 0$ (o viceversa) para la intercara metal/policarbonato. Por tanto, las resonancias observadas experimentalmente pueden ser atribuidas a los SPPs, por lo que nuevamente los desplazamientos del mínimo λ_S

fueron utilizados para monitorizar la respuesta de detección. Cabe señalar que la posición experimental de λ_S está levemente desplazada hacia el rojo comparándola con la simulación, que no tuvo en cuenta la fina capa de unos pocos nanómetros de espesor de óxido de aluminio que existe sobre la superficie del metal.²⁰¹

Comparando con las posiciones espectrales provenientes de los dispositivos fabricados sobre vidrio, con policarbonato era esperable encontrar la resonancia característica SPP sustrato/metal a mayores longitudes de onda debido a la diferencia de índice de refracción del sustrato ($\sim 1,52$ para vidrio, $\sim 1,58$ para policarbonato). La Figura 70 manifiesta esta diferencia al comparar espectros experimentales de redes de nanoagujeros en aluminio sobre ambos sustratos: el dispositivo sobre policarbonato presenta posiciones desplazadas hacia el rojo para λ_P y λ_Q . Además, la leve diferencia de posición del mínimo λ_S de los espectros mostrados es atribuida a la diferencia en el diámetro de los nanoagujeros (220 nm en los fabricados sobre sustratos de vidrio, 250 nm en los soportados sobre policarbonato), proveniente del procesado realizado a cada muestra.

Fig. 70. Espectros de transmisión de dispositivos con redes de nanoagujeros (periodo = 500 nm) en aluminio sobre policarbonato (negro) y vidrio (gris). El mínimo S, asociado a la resonancia SPP de la intercara metal/aire, queda en una posición similar para ambos casos, mientras que los mínimos P y Q, asociados a la resonancia SPP de la intercara metal/sustrato, están situados a mayor longitud de onda para el policarbonato.

El portamuestras del equipo EBL permitió la litografía de varias docenas de muestras en una sola tanda. El revelado fue realizado de una en una por las condiciones de tiempo, agitación y temperatura necesarias. El ataque ICP demostró ser eficaz en pequeños grupos (4–8 muestras), aunque el procesado individual aseguraba mejores resultados debido a las pequeñas diferencias de diámetro de nanoagujeros entre dispositivos, a leves inconsistencias del equipo ICP entre diferentes ataques y al tiempo requerido por cada muestra para una transferencia óptima de la red de nanoagujeros, que era de 28 ± 8 segundos, aproximadamente, para las mismas condiciones aplicadas.

Los espectros de transmisión adquiridos posteriormente con el espectrofotómetro delataban rápidamente a los dispositivos cuyos nanoagujeros eran especialmente pequeños, también los que habían sufrido un ataque excesivamente corto (transferencia incompleta) y los que habían recibido una etapa de revelado escasa. En estos casos la transmitancia medida era en general muy baja y/o con resonancias poco definidas.

De igual manera, las muestras ligeramente sobreatacadas o que contenían nanoagujeros de mayor diámetro y/o un mayor número de microdefectos mostraban una intensidad transmitida superior a la media, en ocasiones acompañada de una pérdida de definición de las resonancias S, P y Q.

La mayoría de los dispositivos fabricados durante esta Tesis se realizaron con redes de nanoagujeros de periodo 500 nm con objeto de aprovechar el intervalo visible que era posible medir con el espectrofotómetro al llevar a cabo experimentos de sensibilidad superficial y volumétrica, debido a que la posición de la resonancia S, sensible a los cambios de índice de refracción del medio circundante, cae alrededor de 500 nm, y la respuesta óptica causada por la variación del índice de refracción del medio circundante debería producir un desplazamiento del mínimo S hacia mayores longitudes de onda. Sin embargo, también se exploraron las posibilidades de integración de estos dispositivos con lectores comerciales de discos ópticos, en concreto CD y DVD, con la idea de utilizar el propio láser del lector como fuente óptica de interrogación, razón por la que fabricaron dispositivos con periodos diferentes con el fin de adaptarlos a las longitudes de onda de las fuentes de interrogación (láseres de semiconductor) de los lectores de discos ópticos.

Un lector de CDs posee un láser de $\lambda = 780$ nm que barre un surco en espiral (la pista de grabación) compuesto de hoyos y mesetas, de $1,6 \mu\text{m}$ de ancho. En un lector de DVDs el láser es de $\lambda = 650$ nm y el surco tiene una anchura de $0,74 \mu\text{m}$. Así, asumiendo fija la longitud de onda de interrogación, se fabricaron dispositivos con un periodo de red adecuado para aprovechar la variación de intensidad existente en la pendiente ascendente del espectro de transmitancia que parte de λ_S hacia el máximo adyacente situado a mayor longitud de onda.

Fig. 71. Espectros experimentales de dispositivos con redes de nanoagujeros en aluminio sobre policarbonato. La línea gris corresponde a la longitud de onda de un láser de un lector de CD (a) y DVD (b). El periodo de la red de nanoagujeros es 750 nm para (a) y 620 nm para (b). La adhesión de material a la superficie provocaría un desplazamiento hacia el rojo de λ_S , registrándose una importante disminución en la intensidad transmitida.

La Figura 71a muestra un espectro experimental correspondiente a un periodo de red de 750 nm, que resulta en $\lambda_S \approx 761$ nm, con el máximo adyacente situado en ~ 791 nm, es decir, el dispositivo es adecuado para ser interrogado con un lector de CDs (láser de 780 nm). Para este caso en particular, al aumentar el índice de refracción del medio en contacto con la superficie, sería posible registrar una reducción de la intensidad transmitida en un intervalo espectral de 21 nm debido al desplazamiento hacia el rojo. La Figura 71b corresponde a un periodo de 620 nm, con $\lambda_S \approx 628$ nm y el máximo adyacente situado en ~ 663 nm, por lo que este dispositivo es apto para ser interrogado ópticamente con el láser de 650 nm de un lector de DVDs. Para esta muestra en concreto, el desplazamiento hacia el rojo de la longitud de onda hasta llegar al mínimo de intensidad transmitida (λ_S) corresponde a 22 nm.

En la Figura 72 se muestra la transmisión espectral calculada numéricamente por el Dr. Carlos Angulo Barrios de una red de nanoagujeros de 630 nm de periodo en aluminio sobre policarbonato, con una biocapa de 10 nm de espesor (en rojo) y sin ella (en negro). Para estas características existe una gran variación de la intensidad transmitida a 650 nm, por lo que la interrogación con un equipo de DVD sería, en principio, factible.

Fig. 72. Espectros de transmisión calculados de una red de nanoagujeros de 630 nm de periodo en aluminio sobre sustrato de policarbonato con una biocapa de 10 nm de espesor (gris) y sin ella (negra). La imagen insertada muestra esquemáticamente la sección transversal de la red simulada a lo largo del centro de una fila de nanoagujeros (t_{bio} = espesor de la biocapa).

2.1.3. Dispositivos transferidos a cinta PSA Scotch®.

La posibilidad de transferir las películas nanoestructuradas de aluminio sobre sustratos de policarbonato a cinta adhesiva convencional, según el método de «pegar y tirar» descrito en la Sección Experimental, fue descubierta por el Dr. Carlos Angulo Barrios. La transferencia exitosa de la capa de aluminio demuestra que la fuerza de unión entre el sustrato de policarbonato y el metal es más débil que la existente entre la cinta adhesiva y el metal. Este hecho era inesperado debido a la buena adherencia que demuestra el aluminio evaporado sobre una gran variedad de sustratos, incluyendo

polímeros. De hecho, el aluminio es precisamente el metal utilizado como capa reflectante en discos compactos.

Puesto que no se aplicó de forma intencionada ninguna capa ni material antiadherente durante la fabricación de los dispositivos transferidos a cinta flexible, ni se realizó ningún tratamiento deliberado buscando ese fin durante la fabricación, se decidió investigar la influencia de las diferentes etapas del procesado en la adhesión entre el metal y el policarbonato.

Inicialmente se consideró que la respuesta podría hallarse en la etapa de 10 minutos a 120 °C sobre placa calefactora inmediatamente posterior al depósito de resina para eliminar restos de disolvente y uniformizar la superficie. Para estudiar esta posibilidad, se limpiaron varios sustratos de la manera habitual tal como se describe en la correspondiente sección experimental, terminando con un enjuague con IPA y un secado con pistola de nitrógeno. A continuación se depositó una capa de 100 nm de aluminio sobre ellos, y cada uno fue expuesto a diferentes temperaturas sobre placa calefactora durante 10 minutos (20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 °C), y se procedió al despegue con cinta adhesiva. La Figura 73 muestra una foto con los resultados obtenidos, demostrando el importante papel de la temperatura en la fortaleza de adhesión entre el metal y el sustrato de policarbonato. Hasta 60 °C no se consiguió despegar el metal, a 80 °C se despegó parcialmente, y a 100 y 120 °C se transfirió por completo. A 140 °C no se despegó, un resultado probablemente relacionado con la temperatura de transición vítrea del policarbonato (~147 °C), que estaría provocando un reblandecimiento del sustrato y un aumento de la fuerza de unión con el metal.

Fig. 73. Serie de fotografías de películas de aluminio sin estructurar depositadas sobre sustratos de policarbonato antes (fila superior) y después (fila inferior) de pegar cinta Scotch® y despegarla. Todos los sustratos fueron enjuagados con IPA y secados con pistola de nitrógeno antes de depositar el aluminio. Después de ello, las muestras fueron sometidas a distintas temperaturas (izq-dcha): temperatura ambiente, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 °C.

Para obtener más información sobre este fenómeno, se limpiaron sustratos de la forma habitual, incluyendo un enjuague final con IPA más secado con pistola de nitrógeno, y en esta ocasión, una etapa adicional de 10 minutos sobre placa calefactora a

80 °C para eliminar los restos de IPA, cuyo punto de ebullición es 82,6 °C. Después se depositó aluminio sobre las muestras y fueron sometidas a la etapa habitual de 10 minutos a 120 °C. Cuando se intentó despegar el aluminio con cinta adhesiva no se obtuvieron resultados positivos, de hecho no se transfirió nada de aluminio.

Por tanto, estos resultados sugieren la existencia de una capa adsorbida de IPA sobre la superficie de policarbonato antes de depositar aluminio. La rugosidad de la superficie de policarbonato podría favorecer la adsorción de moléculas de IPA, y la temperatura superior a 80 °C una vez depositado el metal estaría promoviendo la desorción de las moléculas de IPA en la intercara aluminio/policarbonato resultando en un debilitamiento de la fuerza de unión entre ambos materiales, de acuerdo con los resultados obtenidos a 80, 100 y 120 °C.

Otra posibilidad considerada para explicar la desaparición de la capa adsorbida de IPA es la formación, promovida por la temperatura, del alcóxido metálico correspondiente, en este caso isopropóxido de aluminio, según la reacción siguiente:

Sin embargo, considerando la relación directa observada entre despegue del metal y temperatura aplicada, parece mucho más plausible achacar el fenómeno a la desorción de una capa adsorbida de IPA, independientemente de que se forme isopropóxido o no.

Así, el enjuague final con IPA de los sustratos de policarbonato (secados únicamente con pistola de nitrógeno, ajustada incluso con flujo alto) como parte del proceso de limpieza aplicado, antes de depositar la película de aluminio, y una etapa de calentamiento alrededor de 100 °C una vez depositada, parecen ser las condiciones necesarias y suficientes para despegar la película de aluminio empleando cinta adhesiva. La técnica de transferencia estudiada puede ser el punto de partida para desarrollar una técnica de litografía adhesiva para estructurar capas delgadas de aluminio sobre CDs a gran escala. Mediante experimentos adicionales (presión sobre la cinta, ángulo de despegue, temperatura...) y estudios de la superficie podría optimizarse y entenderse por completo el proceso.

Por tanto, la fuerza de unión conseguida entre el aluminio y el policarbonato es suficientemente débil como para lograr el despegue de la película metálica, y lo bastante fuerte como para permitir la fabricación de nanoestructuras mediante técnicas convencionales *top-down* (EBL y ataque en seco con plasma) como se demostró en el trabajo derivado de esta Tesis.

La Figura 74 muestra el resultado de la transferencia completa a cinta PSA Scotch® de una película de aluminio de 100 nm de espesor previamente soportada sobre un sustrato de policarbonato, en la que se fabricaron dos redes de nanoagujeros de 1 mm de lado. La flexibilidad de la cinta adhesiva hace posible doblar el dispositivo y acoplarlo a diferentes geometrías.

Las Figuras 75 y 76 muestran imágenes SEM y AFM, respectivamente, de redes de nanoagujeros en aluminio despegadas y soportadas en cinta adhesiva Scotch®. La eficacia de la transferencia queda reflejada en la excelente uniformidad de la estructura despegada. Los surcos distribuidos aleatoriamente que se observan provienen de la superficie de policarbonato del disco donde se depositó aluminio inicialmente.

Fig. 74. Fotografías que ilustran la flexibilidad de los dispositivos transferidos a cinta adhesiva y su capacidad de adaptarse a objetos que no sean planos mientras conservan la difracción que les caracteriza. Izq: muestra adherida a una pipeta de vidrio. Dcha: muestra sujeta y doblada con pinzas.

Fig. 75. Imágenes SEM de una red de nanoagujeros de 625 nm de periodo en aluminio, transferida a cinta PSA Scotch®. La superficie demuestra ser muy uniforme en áreas extensas.

Fig. 76. Imágenes AFM que muestran la topografía superficial de la cara sin surco de un CD de policarbonato (a), de aluminio depositado sobre esa cara (b) y de aluminio despegado con cinta adhesiva (c). (a) y (c) muestran una rugosidad similar, es decir, el aluminio despegado posee una rugosidad que replica la de la superficie de policarbonato de la que fue despegada.

La caracterización con AFM aportó valores de rugosidad RMS del sustrato de policarbonato, del aluminio sobre el policarbonato y del aluminio transferido sobre cinta adhesiva de 5,5, 2,3 y 5,4 nm, respectivamente. El valor para el aluminio sobre policarbonato es el obtenido típicamente para películas metálicas delgadas mediante evaporación por haz de electrones. La rugosidad de la superficie despegada de aluminio es una réplica de la rugosidad de la propia superficie de policarbonato, indicando un recubrimiento muy eficaz.

En cuanto a las propiedades ópticas de las redes de nanoagujeros en aluminio transferidas sobre cinta adhesiva, éstas muestran claramente difracción (visible al ojo como colores iridiscentes) tanto en reflexión como en transmisión de la misma manera que se observa en las muestras sin despegar, un hecho que corrobora la eficacia de la transferencia (Figuras 77a y 77b). La Figura 77c muestra los espectros de transmisión medido (abajo) y calculado (arriba) de una red de nanoagujeros (periodo = 500 nm) transferida a una cinta adhesiva Scotch®. Existe buena concordancia entre el espectro real y el simulado, mostrando tres resonancias principales, que referidas a sus respectivos mínimos son λ_S (~510 nm), λ_P (~525 nm) y λ_Q (~750 nm).

Fig. 77. (a) Película de aluminio con dos redes cuadradas de nanoagujeros de periodo 625 nm, transferida a una cinta adhesiva convencional, adherida conformalmente sobre un dedo, observándose cómo cambia la luz difractada (color) al variar el ángulo de observación. (b) Patrón de difracción de transmisión de un dispositivo transferido al ser iluminado con un láser He-Ne de 633 nm. El periodo de la red de nanoagujeros es 730 nm. (c) Espectro de transmisión calculado (arriba) y experimental (abajo) de una red de nanoagujeros en aluminio (periodo 500 nm) transferida a cinta Scotch®. Las resonancias características (S, P y Q) caen muy cerca de las calculadas con la ecuación de acoplamiento SPP (líneas rojas).

Según la Ecuación 2, para una red cuadrada de periodo 500 nm, asumiendo un valor de 1,47 para el índice de refracción del material adhesivo (acrílico sintético) de la cinta Scotch®, los valores calculados de las posiciones de las resonancias SPP son 507 nm para $i = \pm 1, j = 0$ (o viceversa) para la intercara metal/aire, y 533 nm para $i = \pm 1, j = \pm 1$ y 745 nm para $i = \pm 1, j = 0$ para la intercara metal/acrílico (cinta). Estos valores se ajustan aproximadamente a los mínimos de transmitancia espectral observados experimentalmente.

2.2. Efecto del tratamiento de pasivación.

En esta sección se describen los resultados obtenidos del proceso de pasivación desarrollado para proteger la superficie de aluminio frente a disoluciones acuosas.

2.2.1. Sustratos de vidrio.

La Figura 78 muestra el desplazamiento de λ_s en muestras sometidas a distintos tiempos de pasivación, además de una muestra no tratada. Los desplazamientos hacia el azul de λ_s en las muestras sometidas a tiempos cortos de plasma (5–10 minutos) se atribuyen a la eliminación de restos de resina ZEP-520.¹⁶³ Para tiempos de pasivación ≥ 50 minutos se observan desplazamientos de varios nanómetros hacia el rojo, y se relaciona con un aumento del espesor de la capa de óxido de aluminio sobre la superficie metálica.^{202,203} Este hecho está apoyado por las simulaciones, realizadas por el Dr. Carlos Angulo Barrios, que indican una tasa de $\Delta\lambda_s/\Delta t_{ox} = 1 \text{ nm nm}^{-1}$. A efectos de comparación, este valor es consistente con los resultados obtenidos por otros grupos que reportaron la sensibilidad de matrices de nanoagujeros realizados en plata al espesor de una capa de óxido de aluminio depositada sobre las mismas.²⁰⁴

Fig. 78. Desplazamiento de λ_s para tiempos de pasivación de 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos.

Además, volviendo a la Figura 78 anterior, es destacable que no se observen desplazamientos significativos para tiempos de pasivación comprendidos entre 20 y 40 minutos. La existencia de una capa de óxido nativo previa a la pasivación (producto del contacto con el oxígeno y la humedad del aire), actuando como barrera para la difusión de iones de oxígeno, puede explicar este comportamiento. Cuando el tiempo es superior a 40 minutos los iones sí son capaces de atravesar la barrera, reaccionando entonces con

el aluminio a su alcance y formando óxido de aluminio, engrosando la capa superficial oxidada, que aumenta con el tiempo y/o la potencia aplicada.^{202,203}

La colección de fotografías de la Figura 79 ilustra el nivel de degradación del aluminio (100 nm de espesor) sobre sustratos de vidrio en función del tiempo de inmersión en agua desionizada (pH = 5,7). Las muestras fueron sometidas a tiempos de plasma de oxígeno entre 0 y 60 minutos, y sumergidas en agua desionizada durante 8 días completos en recipientes cerrados con el fin de minimizar en lo posible el efecto que tendría la disolución de CO₂ atmosférico en el pH. La muestra sin tratamiento de plasma evidenció que la capa de óxido nativo es claramente insuficiente para proteger la película metálica ante una visible degradación causada tanto por oxidación como por picaduras de corrosión (puntos localizados donde se concentra la oxidación). Para tiempos de plasma ≥ 10 minutos la degradación por picaduras se redujo de manera notable, estableciéndose de esta manera un tiempo mínimo para pasivar estas estructuras, al menos en cuanto a la apariencia visual de la superficie se refiere.

Fig. 79. Test de corrosión después de diferentes tiempos de plasma de O₂ a 80 W y flujo de 15 sccm con el fin de pasivar la superficie. Fila superior: sustratos de vidrio con 100 nm de aluminio depositado sobre ellos; fila inferior: las mismas muestras después de 8 días sumergidas en agua desionizada. Izq-dcha: 0, 1, 3, 6, 10, 30 y 60 minutos de plasma. De 10 minutos en adelante no se observa a simple vista corrosión ni picaduras, mientras que estos fenómenos químicos se aprecian claramente por debajo de 10 minutos de plasma.

La efectividad del tratamiento de pasivación frente a inmersión en agua desionizada se evaluó cuantitativamente mediante la medida de los espectros de matrices de nanoagujeros en aluminio sometidas a distintos grados de pasivación. La Figura 80 muestra la variación de λ_s para distintos tiempos de plasma (grado de pasivación) aplicado a diferentes muestras después de una inmersión de 16 h en agua desionizada. Partiendo de la tasa calculada que describe el proceso de pasivación, $\Delta\lambda_s/\Delta t_{ox} = 1 \text{ nm nm}^{-1}$, las tasas de oxidación medidas fueron 0,249, 0,159, 0,096, 0,084 y 0,022 nm h⁻¹ para tiempos de plasma de oxígeno de 0, 5, 20, 40 y 60 minutos, respectivamente. Por tanto, la tasa de oxidación en agua desionizada se reduce al aumentar el tiempo de pasivación de la muestra, demostrando la función protectora de la superficie pasivada contra el deterioro por oxidación.

Fig. 80. Desplazamiento de λ_s para cinco muestras tratadas con diferentes tiempos de plasma de O₂ después de 16 horas de inmersión en agua desionizada en etapas de inmersión de 30 minutos.

Sin el efecto protector de la capa de Al₂O₃ resultante de una etapa de pasivación efectiva, una inmersión larga en agua desionizada degrada la capa de aluminio oxidándola en exceso, apareciendo corrosión y picaduras. Esto se refleja en el espectro óptico de transmisión, así como de la forma característica de los picos λ_s y λ_p , tal como puede comprobarse en la Figura 81. En ella se muestra el cambio que sufrió el espectro de un dispositivo sin pasivar después de 7 días sumergido en agua desionizada dentro de un vial cerrado. Después de ese periodo de tiempo se originó una capa blanquecina de óxido sobre todo el metal, que quedó traslúcido, con el consiguiente aumento de la transmisión de luz visible y la degradación de la respuesta espectral. Se practicó un arañazo a la capa depositada y se midió el espesor de la capa traslúcida con el perfilómetro mecánico para comprobar si había habido pérdida de material, obteniéndose medidas en torno a 100 nm, es decir, el espesor original del aluminio.

Fig. 81. Espectro de transmisión de una red de nanoagujeros en aluminio y 500 nm de periodo, sin pasivar, antes y después de una inmersión de 7 días en agua desionizada dentro de un vial cerrado. La estructura de picos λ_s y λ_p desapareció para dejar un mínimo ancho situado entre ellos, y la transmisión óptica aumentó considerablemente porque la capa metálica se tornó traslúcida.

Esta muestra oxidada en exceso fue medida con el analizador de capas delgadas Filmetrics, obteniéndose un buen ajuste del espectro resultante (Figura 82) al considerar la presencia de una capa de Al_2O_3 de aproximadamente 53 nm de espesor, lo cual concuerda con el hecho de que el metal restante se aprecie traslúcido, ya que el aluminio presenta esta característica cuando su espesor es inferior a 60–70 nm.

Fig. 82. Espectro adquirido sobre aluminio con un analizador de capas delgadas de una muestra procesada que contiene una red de nanoagujeros, sin pasivar, después de una inmersión de 7 días en agua desionizada dentro de un vial cerrado. En azul se muestra el espectro real, y en rojo el calculado y ajustado por el programa. El espesor indicado (53,31 nm) corresponde al de la capa de óxido formado.

Para biosensores basados en redes de nanoagujeros en metal, los desplazamientos espectrales que muestran las resonancias relacionadas con la capacidad de detección refractométrica son, en general, del orden de 1 nm,^{205–208} y los tiempos de inmersión de estos sensores en disolución acuosa durante las etapas de incubación y reconocimiento no suelen ser superiores a 30 minutos. Por tanto, tiempos de pasivación con plasma de oxígeno de 40 minutos o algo más deberían ser suficientes para asegurar medidas de biodetección fiables en medios tamponados habituales.

Sin embargo, si el tiempo de pasivación es muy superior a 40 minutos el espesor de la capa de óxido aumentaría, produciendo una reducción de la sensibilidad superficial del sensor plasmónico. Esta reducción se debería a que la máxima sensibilidad se da en la intercara metal/medio dieléctrico, donde la intensidad del SPP es mayor (la intensidad decrece de manera exponencial con la distancia), y la adsorción de material (por ejemplo, biomoléculas) ocurriría sobre la capa de óxido, alejada de la superficie del metal. Con todo ello, puede concluirse que debería seleccionarse una etapa de pasivación de 40 a 50 minutos para conseguir tanto buena sensibilidad como buena resistencia a la corrosión y oxidación, tal como demostraron los bioensayos realizados en medios acuosos tamponados cuyos resultados pueden consultarse en la sección posterior 2.4.

2.2.2. Sustratos de policarbonato.

Los tiempos de pasivación de redes de nanoagujeros en aluminio fabricados sobre policarbonato fueron inferiores a los aplicados en chips de vidrio para evitar la degradación del polímero observada en etapas de plasma de 10 minutos o más.

Se comprobó que 15 minutos en cinco etapas de 3 minutos de pasivación, en las mismas condiciones que para los dispositivos en vidrio, protegían eficazmente la

superficie de aluminio. La superficie pasivada obtenida demostró ser apta para su derivatización mediante un proceso bien establecido de silanización de óxidos, y el proceso ofreció una protección adecuada frente a fenómenos de oxidación y corrosión,²⁰¹ siendo suficiente para resistir en buenas condiciones el bioensayo realizado como prueba de concepto.

Este proceso de pasivación, y las precauciones especiales tomadas durante el procesado completo (condiciones de temperatura, protección del policarbonato durante diferentes etapas con una cinta de quita y pon), conservaron la integridad y transparencia de los sustratos procedentes de discos compactos, adaptando exitosamente el método de fabricación sobre vidrio y haciéndolo compatible con el policarbonato, y posibilitando las medidas de los espectros de transmisión sin mermar la calidad de la señal obtenida.

2.3. Sensibilidad volumétrica.

En esta sección se detallan los resultados provenientes de medidas en medio líquido con objeto de determinar la sensibilidad refractométrica en volumen.

2.3.1. Sustratos de vidrio.

En la Figura 83 están representados los espectros correspondientes a un sensor pasivado que contiene una matriz de nanoagujeros en aluminio sobre vidrio, sumergido en disolventes con diferentes índices de refracción. El valor de cada posición del mínimo λ_S en función del índice de refracción está representado en el recuadro insertado, incluyendo el valor para el aire ($RI = 1$). Como ya se ha indicado, la posición de λ_S está relacionada con la resonancia SPP de la intercara entre el aluminio y el medio circundante. Las posiciones de λ_P y λ_Q están asociadas a las resonancias SPP aluminio/sustrato, permaneciendo por ello inmóviles.

Fig. 83. Espectros de transmisión de una red de nanoagujeros de 500 nm de periodo en aluminio, sobre sustrato de vidrio, sumergida en líquidos con diferentes valores de RI. La imagen insertada corresponde a la variación lineal de la posición de λ_S en función de RI, incluyendo el aire ($RI = 1$).

La posición de λ_s se desplaza desde ~ 507 nm, correspondiente al aire, hasta $\sim (650\text{--}750)$ nm, intervalo relacionado con los disolventes en los que se sumergió el dispositivo. Se observa una respuesta del sensor altamente lineal (el coeficiente de correlación ajustado, R^2 , es 0,9998) en un amplio intervalo de valores de RI, siendo la sensibilidad volumétrica $S_B = d\lambda_s/dRI = 487$ nm RIU $^{-1}$ (RIU = *refractive index unit*, unidad adimensional de RI). Las simulaciones indicaron una $S_B = 505$ nm RIU $^{-1}$ para $t_{ox} = 0$, y 501 nm RIU $^{-1}$ para $t_{ox} = 5$ nm, mostrando que una capa delgada de óxido como la formada durante la pasivación con plasma de oxígeno no afecta de manera significativa a la sensibilidad.

La diferencia entre los valores medidos y calculados podría deberse a las imperfecciones del dispositivo real (rugosidad, defectos, paredes de los nanoagujeros no verticales, nanoagujeros que no son perfectamente circulares) y/o diferencias de la dispersión del material entre el material real y el modelado.

A título comparativo, valores del mismo orden de S_B han sido publicados con anterioridad para redes de nanoagujeros de 500 nm de periodo fabricados en plata²⁰⁴ (494 nm RIU $^{-1}$) y de 520 nm de periodo realizados en oro¹⁴⁹ (393 nm RIU $^{-1}$).

Fig. 84. Espectros de un test secuencial de desgaste de resina ZEP-520, depositada sobre una red de nanoagujeros (periodo 500 nm, diámetro 250 nm) en aluminio sobre vidrio, con etapas de 10 s de plasma de O₂.

Además de la sensibilidad volumétrica, y como paso previo al estudio de la sensibilidad superficial aplicable en biodetección, también se estudió el efecto de llenar con material únicamente los nanoagujeros. Los experimentos se realizaron con ZEP-520, la misma resina empleada para fabricar los propios nanoagujeros, depositando una película sobre una red de nanoagujeros en aluminio (periodo 500 nm, diámetro ~ 250 nm) sobre vidrio y procediendo a un ataque secuencial con plasma de oxígeno (20 W) en etapas de 10 s, hasta un total de 300 s. La colección completa de espectros es mostrada en la Figura 84, y comienza con un espectro inicial

correspondiente a la muestra recién fabricada (antes de depositar la película de ZEP-520 que se pretende atacar progresivamente) después de aplicar 5 minutos de plasma de oxígeno (50 W) para eliminar cualquier resto de resina procedente del procesado. Observando la evolución del mínimo λ_S (inicialmente ~ 512 nm), éste retorna a la posición de partida después de 160 s de plasma, aproximadamente, indicando que en la superficie de aluminio pasivado no quedan restos de resina.

La evolución del máximo situado entre las posiciones iniciales de λ_P y λ_Q es atribuida a la presencia de material dentro de los nanoagujeros debido a que a partir de 160 s, momento en el que la resina ha sido eliminada de la superficie metálica, se observa cómo el máximo entre las resonancias P y Q retorna paulatinamente a la posición inicial, comportamiento asociado al vaciado gradual de los agujeros, que contienen ZEP-520. Este comportamiento fue corroborado mediante medidas con AFM y se apoya en simulaciones numéricas (Figura 89 del punto siguiente 2.3.2). Por tanto, a partir de 160 s los mínimos característicos S, P y Q de transmisión conservan sus posiciones iniciales, lo cual indica que la superficie de aluminio pasivado está limpia de resina.

El tiempo necesario para llegar a un espectro similar al inicial es de 250 s, aproximadamente, momento en el que el espectro correspondiente indica que los nanoagujeros han sido vaciados por completo de resina (el máximo entre P y Q es como el original). La Figura 85 muestra una selección de cuatro de los espectros presentes en la Figura 84 anterior, correspondientes al estado inicial sin resina depositada (nanoagujeros vacíos), a la película de 100 nm de espesor de ZEP-520 depositada (λ_S desplazado de 512 a 670 nm), al momento en que se elimina toda la resina de la superficie (nanoagujeros llenos, λ_S prácticamente en la posición inicial), y a la última etapa de plasma de O_2 , cuyo espectro coincide casi por completo con el espectro inicial.

Fig. 85. Espectros del test secuencial de desgaste de resina ZEP-520 correspondientes al estado inicial (negro), película de 100 nm de resina (rojo), resina eliminada de la superficie metálica pero no de los nanoagujeros (azul), y etapa final tras 300 s de plasma de O_2 (verde), coincidente con el estado inicial.

La Figura 86 muestra la evolución de λ_s frente al tiempo de ataque con plasma de O_2 . El hueco existente se debe al solapamiento con λ_p , que impide localizar la posición de λ_s . El ritmo de desgaste es lineal, y a partir de 160 s la posición de la resonancia S, asociada con el índice de refracción del medio en contacto con la superficie de aluminio pasivado, vuelve a la posición inicial previa al depósito de ZEP-520, indicando que la superficie queda libre de resina. Se realizó un ajuste lineal en el intervalo de ataque 20–100 s, resultando en un ritmo de desgaste de ZEP-520 de 5,67 nm por cada etapa de 10 s. Es decir, este dato indica que al cabo de 160 s de plasma de O_2 se eliminaron unos 90 nm de resina, por lo que quedarían restos de ZEP-520 en la superficie hasta llegar a los 180 s de ataque.

Fig. 86. Progreso del proceso de desgaste de ZEP-520 con plasma de O_2 reflejado en la posición de la resonancia S, relacionada con la presencia de material en la superficie de aluminio pasivado. La imagen insertada muestra el ajuste lineal entre 20 y 100 s de ataque, resultando en una tasa de ataque = 5,67 nm por cada etapa de 10 s ($R^2 = 0,9990$). El hueco existente alrededor de $\lambda = 550$ nm se debe al solapamiento de la resonancia S con la P, que impide localizar la posición del mínimo S.

Convirtiendo el tiempo de ataque en espesor (Δt) de ZEP-520 y representándolo frente a la posición de λ_s , es posible determinar la sensibilidad superficial como $S_\lambda = \Delta\lambda/\Delta t$, correspondiente a la pendiente del ajuste lineal mostrado en la Figura 87. El valor obtenido fue $S_\lambda = 1,98 \text{ nm nm}^{-1}$. Considerando el error de la medida de λ_s ($\pm 0,1$ nm), el valor de la incertidumbre debida a la colocación de la muestra en el espectrofotómetro (0,2 nm) y la sensibilidad superficial de estos dispositivos, el espesor de película mínimo detectable es 0,1 nm, evidenciando que los dispositivos fabricados son aptos para registrar límites de detección muy bajos.

Fig. 87. Valor de la longitud de onda asociada a la resonancia S en función del espesor remanente de ZEP-520 durante el ataque gradual con plasma de O_2 . La pendiente del ajuste lineal indica una sensibilidad de 1,98 nm de desplazamiento espectral de la resonancia S por cada variación de 1 nm de espesor de resina.

2.3.2. Muestras transferidas a cinta Scotch®.

De manera similar, dispositivos transferidos sobre cinta adhesiva Scotch®, con redes de nanoagujeros de periodo 500 nm, fueron probados como sensores refractométricos mediante su inmersión en disoluciones de diferente concentración de ácido cítrico (0, 10% y 20% en peso), evitando repetir el experimento con disolventes realizado con dispositivos sobre vidrio para evitar efectos de degradación de la cinta que podrían ocurrir con varios de ellos.

El mínimo λ_s se desliza hacia mayores longitudes de onda al aumentar la concentración de ácido cítrico (Figura 88), es decir, al aumentar el índice de refracción. El ajuste lineal del comportamiento de λ_s frente al índice del medio en contacto con la red de nanoagujeros, incluyendo el caso del aire, resulta en un valor de sensibilidad de 477 nm RIU⁻¹ ($R^2 = 0,9997$), valor similar al obtenido en muestras sobre sustrato de vidrio. Este resultado apoya nuevamente la eficacia del proceso de transferencia y la viabilidad de usar estos dispositivos como sensores plasmónicos flexibles.

Cuando se considera el posible llenado de los nanoagujeros por parte del adhesivo de la cinta, las simulaciones numéricas indican que los mínimos característicos S, P y Q conservan su posición, mientras que la anchura, posición e intensidad de los máximos de transmisión varían con el grado de llenado (Figura 89), lo cual está de acuerdo con el estudio de llenado de nanoagujeros con ZEP-520 en muestras soportadas en vidrio. La curva calculada de la Figura 83 que más se parece al espectro medido corresponde al caso de nanoagujeros parcialmente llenos de adhesivo, un resultado esperable dada la capacidad de penetración del adhesivo dentro de ellos durante la etapa previa al despegue, en la que se ejerce presión sobre la cinta.

Fig. 88. Espectros reales de transmisión de una red de nanoagujeros de 500 nm de periodo en aluminio transferida a cinta adhesiva Scotch®, sumergida en disoluciones acuosas de ácido cítrico (0, 10% y 20% w/w). El incremento de la concentración aumenta el valor del índice de refracción y, por tanto, λ_s se desplaza a mayores longitudes de onda. La imagen insertada corresponde a la variación lineal de la posición de λ_s en función del índice de refracción.

Fig. 89. Espectros de transmisión calculados de una red de nanoagujeros de 500 nm de periodo en aluminio sobre cinta adhesiva Scotch®. Los espectros corresponden a nanoagujeros llenos de aire (negro), llenos de material adhesivo de la cinta PSA (rojo) y parcialmente llenos de adhesivo (azul).

2.4. Biodetección.

Al contrario que en los experimentos de sensibilidad volumétrica, el espesor del material adsorbido en la superficie de aluminio pasivado del dispositivo es inferior al alcance del campo evanescente generado por un SPP en dicha superficie. Así, el espesor de la biocapa depositada en cada experimento está en el intervalo entre varios nanómetros y varias decenas de nanómetros, por lo que las variaciones espectrales debidas a la presencia de tales biocapas se deberán tanto al índice de refracción que poseen como a su espesor.

Se realizaron diferentes bioensayos para evaluar la sensibilidad superficial y comprobar el funcionamiento de los dispositivos como biosensores en colaboración con el grupo GSOLFA de la UCM y el Grupo SYM de la UPV, que llevaron a cabo las incubaciones y lavados de las muestras, además de algunas de las pruebas de resistencia de los dispositivos a diferentes medios tamponados.

2.4.1. Sustratos de vidrio.

Las pruebas con diferentes medios acuosos tamponados demostraron que todas las disoluciones tamponadas ejercen un efecto sobre el metal, desde efectos leves de oxidación por estar en medio acuoso a deterioro grave por corrosión debido a la presencia de determinadas sales (principalmente iones cloruro).

A modo descriptivo, el tampón PBS (10 mM, pH 7,5), ampliamente utilizado en bioensayos, demostró ser el más agresivo. Se observó deterioro del metal a simple vista (picaduras, apariencia degradada), tanto pasivado con plasma de oxígeno como sin pasivar, en un corto espacio de tiempo.

La inmersión en tampón SSC o tampón citrato (15 mM, pH 7) derivó en degradación visible del aluminio.

El tampón carbonato/bicarbonato (10 mM, pH 7,4) condujo a un rápido deterioro del aluminio, registrando un desplazamiento de λ_s hacia el rojo para una red de nanoagujeros de periodo 500 nm de casi 9 nm después de 6 horas, indicativo de una rápida oxidación, y disolviendo completamente el metal después de 2 días.

Otro tampón descartado fue el Tris (20 mM, pH 8,5), que aunque no produjo una degradación evidente a simple vista para incubaciones cortas (λ_s se desplazó 5,2 nm durante 6 horas), el aluminio desapareció casi por completo del sustrato después de 2 días de inmersión.

El tampón HEPES (10 mM, pH 7,4), en una primera prueba, produjo un desplazamiento de λ_s hacia el rojo de 4,8 nm en 6 horas en una muestra sin pasivar con una red de nanoagujeros de periodo 500 nm, observándose el aluminio en aparente buen estado. Después de 2 días de inmersión en tampón HEPES, el aluminio permaneció intacto a simple vista, aunque λ_s sumó 13 nm más de desplazamiento debido a la oxidación, fenómeno al que contribuyeron el medio acuoso y que el metal no estuviera pasivado para estas pruebas, contando únicamente con la capa de óxido nativo. En otra prueba con una muestra pasivada, el desplazamiento de λ_s después de 6 horas de inmersión en HEPES fue de 3,6 nm.

Estos resultados decantaron la elección del HEPES como medio tamponado, cuyo efecto sobre el aluminio pasivado puede englobarse junto al leve efecto que produce el propio agua desionizada, produciendo ambos un desplazamiento muy

pequeño de λ_s (varias décimas de nanómetro por cada hora de inmersión) que puede monitorizarse con una muestra de control. Dicho desplazamiento es significativamente más pequeño que el producido por la adsorción de una biocapa, que suele ser del orden de varios nanómetros, si no mayor, valor que depende del espesor de la capa adsorbida.

En cuanto al bioensayo realizado y descrito en la Sección Experimental (empleando siempre muestras pasivadas), los desplazamientos espectrales de la resonancia λ_s medidos, tanto para las muestras de test como para las muestras de control, están representados en la Figura 90 y prueban la viabilidad de realizar inmunoensayos con estos sensores basados en redes de nanoagujeros en aluminio. La etapa final de reconocimiento resultó en un desplazamiento de λ_s hacia el rojo unas tres veces mayor para el ensayo directo de forma consistente y reproducible.

Fig. 90. Desplazamientos de la resonancia S para cada etapa. Los datos de la silanización y la inmovilización del conjugado provienen de 10 réplicas. Las columnas relativas al inmunoensayo (B_0 y B) representan 3 réplicas cada una. Los desplazamientos hacia el rojo de los ensayos directos triplican, aproximadamente, los medidos en los ensayos competitivos.

Los desplazamientos hacia el rojo correspondientes a las etapas de silanización y de inmovilización del conjugado provienen de la medida de 11 y 10 réplicas, respectivamente (una muestra silanizada fue conservada como control de referencia para las etapas siguientes). En todos los casos se midieron importantes desplazamientos hacia el rojo para ambas etapas, indicando la formación de las correspondientes biocapas sobre la superficie de los dispositivos, conformando los elementos receptores de los biosensores. El compuesto HMDS empleado para la silanización tiene un peso molecular muy bajo (161,39 Da), por lo que el desplazamiento observado puede relacionarse con la formación de una película más gruesa que una monocapa, además de que es precisamente sobre la superficie donde mayor sensibilidad superficial existe, debido a que la intensidad del campo evanescente debido al efecto SPR decrece con la distancia. La biopelícula correspondiente al conjugado biotina–dextrano–lipasa (peso molecular aproximado de 80 kDa) produce un gran desplazamiento de λ_s que puede relacionarse con su tamaño comparativamente mucho mayor al del HMDS, y el reconocimiento del anticuerpo, de similar peso molecular que el conjugado

inmovilizado, produce desplazamientos inferiores. En estos dos casos, teniendo en cuenta que el tamaño del conjugado y del anticuerpo es de aproximadamente 15–20 nm, cabría esperar un desplazamiento notablemente mayor teniendo en cuenta la sensibilidad superficial de $1,98 \text{ nm nm}^{-1}$ obtenida con una película de resina ZEP–520, sin embargo, al no tratarse de una película uniforme de resina y debido, nuevamente, a la reducción de la intensidad del campo evanescente con la distancia, cabe esperar que el desplazamiento espectral resultante del reconocimiento del anticuerpo sea inferior al producido por la inmovilización del receptor.

En los ensayos directos (muestras B_0), el reconocimiento del anticuerpo aparece como un desplazamiento hacia el rojo claramente mayor (aproximadamente el triple) que el obtenido para los ensayos competitivos (muestras B), resultado coherente con lo que cabría esperar.

Después de tres réplicas, procesadas individualmente para cada ensayo, se obtuvieron buenos valores de desviación estándar relativa (RSD): $B_0\text{--RSD} = 12,1\%$ y $B\text{--RSD} = 12,4\%$. Las dos muestras de referencia (un control negativo con lipasa–dextrano sin biotina inmovilizada, y otra simplemente silanizada), mostraron desplazamientos inferiores que los obtenidos con las muestras destinada a ensayos competitivos en la etapa final de reconocimiento (sin Ab presente), concretamente unos 0,3 nm, debido probablemente a la adsorción de moléculas de HEPES.

Además, teniendo en cuenta las numerosas incubaciones realizadas en estos experimentos, cabe destacar que no se apreciaron signos visibles de degradación del aluminio en todo el conjunto de muestras durante toda la batería de experimentos, apoyando la eficacia del tratamiento protector de pasivación desarrollado durante esta Tesis.

2.4.2. Sustratos de policarbonato.

La Figura 91 muestra los desplazamientos espectrales de λ_s después de las etapas de silanización, inmovilización del receptor (biotina–dextrano–BTL2) y reconocimiento del anticuerpo (ensayos directos y competitivos), realizadas por el grupo GSOLFA.

Los ensayos D1 (directo) y B1 (competitivo) corresponden a una concentración de anticuerpo de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y 20 minutos de incubación, mientras que los ensayos D2 (directo) y B2 (competitivo) corresponden a $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anticuerpo y 60 minutos de incubación. Después de las etapas de silanización e inmovilización del receptor se observan con claridad desplazamientos hacia el rojo, evidenciando la formación de biocapas (elemento receptor de los biosensores) sobre la superficie de los dispositivos.

También es clara la diferencia entre los ensayos directos y competitivos, pues los directos muestran desplazamiento hacia el rojo de λ_s como consecuencia de la unión del anticuerpo a la biocapa receptora inmovilizada en la superficie, mientras que los competitivos muestran desplazamientos insignificantes debido a la presencia de biotina libre en la disolución de incubación compitiendo con la biotina inmovilizada sobre el dispositivo. Además, queda patente que concentraciones pequeñas de anticuerpo y tiempos largos de incubación producen resultados similares que concentraciones altas y etapas de incubación cortas, como es de esperar durante un proceso de incubación gobernado por la difusión.

Fig. 91. Desplazamientos de la resonancia S para ensayos directos (D1 y D2) y competitivos (B1 y B2) durante las etapas de silanización, inmovilización del receptor e incubación del anticuerpo. D1: ensayo directo con $[Ab] = 1 \mu\text{m mL}^{-1}$, incubación de 20 min. B1: ensayo competitivo con $[Ab] = 1 \mu\text{m mL}^{-1}$, incubación de 20 min. D2 = ensayo directo con $[Ab] = 0,2 \mu\text{m mL}^{-1}$, incubación de 60 min. B2: ensayo competitivo con $[Ab] = 0,2 \mu\text{m mL}^{-1}$, incubación de 60 min. La imagen insertada muestra gráficamente $\Delta\lambda_s$ antes (negro) y después (gris) de la silanización, observándose un claro desplazamiento de 1,2 nm.

En este caso, al igual que con sustratos de vidrio, tampoco se observaron signos de degradación al término del bioensayo, probando por tanto la efectividad del tratamiento de pasivación aplicado para proteger el aluminio.

Paralelamente, un trabajo llevado a cabo por el Grupo SYM de la UPV con sustratos de policarbonato con aluminio pasivado demostró nuevamente la viabilidad de utilizar esta plataforma para realizar bioensayos. Para ello se funcionalizó la superficie pasivada con APTMS ((3-aminopropil)trimetoxisilano), a continuación se inmovilizaron diferentes concentraciones de BSA mediante adsorción, bloqueando después la superficie con gelatina. Se procedió a incubar primero con anticuerpo anti-BSA IgG (inmunoglobulina G) de conejo, y después con anticuerpo IgG «anti-conejo» de cabra marcado con el fluoróforo Cy5 (cianina 5). Las medidas de escáner de fluorescencia demostraron la capacidad de reconocimiento, con una dependencia clara entre señal y concentración de proteína, creando una curva de crecimiento exponencial hasta saturación de la señal adquirida frente a la concentración inicial de BSA (Figura 92). La tendencia de la curva se corresponde a la isoterma de adsorción que cabe esperar para este experimento, con un máximo de señal en 25 mg L^{-1} de BSA.

Fig. 92. Medidas de escáner de fluorescencia de reconocimiento de BSA sobre aluminio pasivado. El ajuste de los datos experimentales encaja con una curva exponencial hasta saturación en 25 mg L^{-1} de BSA ($R^2 = 0,978$).

3. Nanopilares de SU-8.

A continuación se detallan los resultados obtenidos del trabajo llevado a cabo en esta Tesis para desarrollar una nueva arquitectura sensora fundamentada en redes periódicas de nanopilares de SU-8 con aplicación en (bio)detección óptica sin marcado. Debido a la singular morfología de los nanopilares fabricados, se explotó el efecto MaGMR para dicho fin.

Además, derivado de un estudio de las estructuras con aluminio depositado sobre ellas, se fabricaron redes de nanopilares huecos de aluminio y óxido de aluminio y se estudiaron algunas de sus propiedades.

La motivación inicial de este trabajo es lograr una mejora de la respuesta de biodetección de estructuras desarrolladas anteriormente basadas en nanopilares poliméricos, buscando fabricar redes de nanopilares cilíndricos más compactas y depositar metal sobre la cima de los pilares con el fin de obtener una arquitectura que favorezca la aparición de un efecto SPR localizado (LSPR, *localized Surface plasmon resonance*). Sin embargo, el trabajo realizado con el fin de obtener nanopilares de mayor diámetro que el obtenido en trabajos anteriores produjo resultados inesperados en la forma de nuevos efectos ópticos, redirigiendo la investigación debido a la calidad de la respuesta óptica y al sencillo método de fabricación desarrollado.

3.1. Morfología de las estructuras fabricadas.

Inicialmente se realizaron numerosas pruebas de fabricación variando la dosis y el enfoque del haz de electrones del equipo EBL para obtener nanopilares anchos, con la finalidad de tener mayor superficie sensora. La estrategia seguida fue la realización de un estudio completo de redes cuadradas de nanopilares de distintos periodos considerando, por una parte, nanopilares fabricados por disparos individuales punto a punto, y por otro lado, nanopilares fabricados empleando nanopatrones circulares 2D de 2, 5 y 8 nm de diámetro.

Para un amplio intervalo de tamaños y forma de los nanopilares ambas aproximaciones son capaces de producir resultados similares, cada una de ellas con su propia combinación de parámetros de EBL. Sin embargo, la escritura mediante disparos individuales requiere tiempos de exposición aproximadamente un orden de magnitud mayor que los nanopatrones de 5 y 8 nm de diámetro, dando lugar, además, a estructuras con mayores efectos de proximidad y una mayor influencia de la presencia del PAG, que se traduce en un gran ensanchamiento de la base de los nanopilares y un engrosamiento de la película de SU-8 entrecruzado entre ellos, habitual en muchos casos.

Se comprobó que los nanopatrones circulares de 2 nm de diámetro producen resultados muy similares a los obtenidos mediante disparos individuales, algo esperable porque los disparos que realiza el equipo considera píxeles de $1,25 \times 1,25$ nm en las condiciones que se determinaron para una escritura 2D.

Por el contrario, los nanopatrones de 5 nm requieren tiempos de exposición notablemente menores, ofreciendo formas más definidas y menor efecto de proximidad, siendo mayor el intervalo de parámetros (dosis y enfoque del haz) que produce nanopilares que en el caso de disparos individuales.

Los nanopatrones de 8 nm requieren dosis de exposición similares a los de 5 nm, sin embargo el intervalo de dosis útil que produce nanopilares erguidos es más reducido

porque el haz de electrones está un poco más dispersado para una misma dosis (se efectúan más disparos en un área mayor para llegar a la misma dosis), y obtener nanopilares inclinados o colapsados es habitual para las mismas condiciones de fabricación EBL que dan buenos resultados con nanopatrones de 5 nm. Es posible aumentar ligeramente la dosis con nanopatrones de 8 nm para intentar obtener resultados comparables, aunque el aumento tanto de la difusión del PAG como de los efectos de proximidad no permite obtener estructuras adecuadas.

De esta manera, se escogieron los nanopatrones de 5 nm de diámetro para fabricar redes periódicas de nanopilares. En todos los casos, un ajuste inicial perfecto tanto del enfoque como del astigmatismo demostró ser fundamental para obtener nanopilares de planta circular, especialmente cuando se aplicó desenfoque al haz de electrones.

Después del procesado completo, la altura final, el diámetro y la estructura relacionada con los efectos de proximidad demostraron ser dependientes del tamaño de la red fabricada. Por tanto, la fabricación de nanopilares idénticos requiere dosis de exposición levemente diferentes en función del tamaño de la red. Por este motivo, y también debido a determinadas reparaciones que requirió el equipo de EBL durante esta Tesis y que variaron significativamente el comportamiento del equipo a dosis muy bajas, es posible encontrar cierta falta de uniformidad entre el diámetro de los nanopilares y la dosis aplicada en los resultados expuestos en esta sección.

El barrido de parámetros fue realizado fabricando redes cuadradas de 15×15 nanopilares, el intervalo de periodos fue de 200–1000 nm con incrementos de 100 nm, y el intervalo de dosis fue de 6,4–96 mC cm⁻² con incrementos de 6,4 mC cm⁻². Cada matriz de redes que combinan estos parámetros de periodo y dosis fue fabricada con distintos grados de desenfoque, cuantificado en vueltas completas del control manual del equipo EBL en el intervalo de 0–20 vueltas con incrementos de 2 vueltas. La Figura 93 muestra el aspecto de parte de una de las muestras de prueba.

Fig. 93. Imagen SEM de parte de un test de dosis y desenfoque. El bloque izquierdo corresponde a 8 vueltas de desenfoque, y el derecho a 10 vueltas. Todas las redes son de 15×15 nanopilares sobre una película de aluminio depositada sobre sustrato de silicio, con periodos entre 200 y 1000 nm cada 100 nm (izq-dcha en cada bloque), y dosis EBL entre 6,4 y 96 mC cm⁻², con incrementos de 6,4 mC cm⁻² (arriba-abajo en cada bloque).

El análisis de las imágenes SEM de estas pruebas mostró que es posible fabricar desde nanopilares estrechos y puntiagudos (60–150 nm de diámetro en la punta) para 6 vueltas o menos de desenfoque, hasta nanopilares aproximadamente cilíndricos y ensanchados hacia la base (80–425 nm de diámetro en la cima), simplemente variando los parámetros del equipo EBL y el desenfoque aplicado. A partir de estos resultados, es esperable obtener nanopilares de mayor tamaño y/o altura aumentando el espesor de la resina, la corriente o ampliando el intervalo de dosis para periodos cercanos a 1 μm o más.

La Figura 94 muestra una red de 15×15 nanopilares fabricados a 32 mC cm^{-2} sin desenfoque alguno. El periodo es 300 nm, el mínimo que demostró ser útil dentro del intervalo estudiado para crear una matriz viable, ya que un periodo de 200 nm no permitió suficiente separación entre pilares adyacentes para obtenerlos separados. Este ejemplo es muy ilustrativo, pues muestra la importante influencia de los efectos de proximidad, que permiten que los nanopilares del interior de la red estén erguidos mientras que la mayoría de los situados en la primera y segunda fila están caídos. Este efecto es clave para entender lo que ocurre en redes de mayor tamaño, en las que la zona interior (es decir, a partir de las primeras filas hacia el interior) normalmente presentan nanopilares ensanchados hacia la base y efectos de proximidad materializados como una película delgada de resina entrecruzada entre ellos. Esta película, generalmente de varios nanómetros de espesor hasta varias decenas de nanómetros, es visible en el borde inferior izquierdo de la imagen SEM de la Figura 94, en el que la superficie del sustrato entre los nanopilares se aprecia de color más oscuro que fuera de la red, indicando la existencia de material entrecruzado.

Fig. 94. Red de 15×15 nanopilares de periodo 300 nm fabricado sin desenfoque con dosis = 32 mC cm^{-2} sobre una película de aluminio. Los bordes de nanopilares caídos y la región interior con nanopilares erguidos evidencia la influencia de los efectos de proximidad. La diferencia de color del sustrato dentro (más oscuro) y fuera de la red, visible en la zona inferior izquierda de la imagen, indica la presencia de una película delgada de SU-8 entrecruzada entre los nanopilares.

La Figura 95 muestra el efecto de un mínimo desenfoco (2 vueltas en el control manual) en una red de nanopilares de periodo 500 nm y dosis 32 mC cm⁻², respecto a una red idéntica fabricada sin desenfoco alguno. Con desenfoco, la anchura aumenta aproximadamente un 50% y los nanopilares son menos puntiagudos. La relación [diámetro de la base]/[diámetro de la cima] = $\varnothing_{\text{base}}/\varnothing_{\text{top}}$ indica cuánto se acerca a la forma cilíndrica un nanopilar (1 para un cilindro perfecto), y resulta en 2,03 y 1,81 para el caso sin desenfoco y con él, respectivamente.

Fig. 95. Imagen SEM tomada a 5° respecto el plano horizontal de una red de nanopilares de periodo 500 nm fabricada sin desenfoco (izq) y con 2 vueltas de desenfoco (dcha) sobre una película de aluminio. Para este último caso, el diámetro aumenta alrededor de un 50%.

Fig. 96. Imágenes SEM que muestran redes de nanopilares caídos o inclinados debido a dosis insuficientes, desenfoco excesivo o ambas cosas (fila superior de imágenes), y redes fabricadas con dosis excesivas, en las que los efectos de proximidad produjeron nanopilares unidos y/o estructuras compactadas debido a un gran aumento del material entrecruzado entre pilares (fila inferior de imágenes).

Estos experimentos permitieron confeccionar una tabla de parámetros con los que conseguir nanopilares de determinadas dimensiones. Los límites quedaron establecidos para cada grado de desenfoque por la dosis de electrones mínima necesaria para obtener nanopilares erguidos, y por la dosis máxima capaz de producir nanopilares aislados, es decir, no una masa de nanopilares unidos por exceso de dosis (Figura 96).

Cuando el diámetro de los nanopilares está por encima de 150 ó 200 nm, los nanopilares han sido producidos con desenfoque y las redes son de área reducida (varias micras o decenas de micras), es posible producir nanopilares de paredes verticales (excepto en la base, que estará ensanchada, y en la cima, ligeramente redondeada). Este efecto puede ser observado en la Figura 97, en la que se muestran nanopilares de tamaño especialmente grande con el propósito de apreciarlo mejor. Los nanopilares se fabricaron exponiendo una red cuadrada de nanopatrones circulares de 5 nm de diámetro, periodo 1000 nm, dosis 96 mC cm⁻² y 10 vueltas de desenfoque, resultando en nanopilares de 425 nm de diámetro. Sin embargo, en redes de mayor tamaño con nanopilares de 250–330 nm de diámetro (como las de 150×150 μm fabricadas para los experimentos de detección), la presencia de paredes verticales deja de producirse, obteniéndose normalmente relaciones $\varnothing_{\text{base}}/\varnothing_{\text{top}}$ entre 1,25 y 1,45. Los nanopilares con forma más próxima a la de un cilindro obtenidos mostraron una relación $\varnothing_{\text{base}}/\varnothing_{\text{top}} = 1,17$ gracias a redes de pequeño tamaño (área de varias decenas de micras) escritas mediante una secuencia de nanopatrones alternos, permitiendo que la carga se dispersase durante más tiempo antes de exponer con el haz de electrones zonas adyacentes a las recién expuestas. Esta estrategia permite reducir los efectos de proximidad y, por consiguiente, obtener nanopilares menos ensanchados en la base, aunque de esta manera la litografía consume más tiempo y puede dar problemas de alineación.

Fig. 97. Izq: imagen SEM de una red de 15×15 nanopilares sobre una película de aluminio, periodo 1000 nm (escala = 5 μm), fabricada con una dosis de 96 mC cm⁻² y 10 vueltas de desenfoque. Dcha: imágenes SEM del detalle y vista a 5° respecto al plano horizontal (escala = 500 nm). El diámetro de los nanopilares es 425 nm, y presentan una pendiente aproximadamente vertical exceptuando la base, ensanchada por efectos de proximidad, y la cima, levemente redondeada.

Aunque el objetivo inicial era la consecución de redes de nanopilares de SU-8 compactas sin material entrecruzado entre los mismos (es decir, eliminando o reduciendo al máximo el efecto de proximidad), la caracterización óptica de las redes que presentaban esta circunstancia (película de SU-8 entrecruzado entre los pilares debido a efectos de proximidad) reveló la presencia de un motivo espectral con características ideales para biodetección superficial, tal como se verá posteriormente. Simulaciones numéricas (realizadas por el Dr. Carlos Angulo Barrios) indicaron que dicha figura espectral se debía a un MaGMR. Así pues, se decidió aprovechar el efecto de proximidad para desarrollar biosensores de nanopilares de SU-8 que utilizasen el efecto MaGMR como principio de detección. Además, la presencia de material entrecruzado entre pilares ofrecía una ventaja añadida para aplicaciones de biodetección, la de proteger la película de aluminio subyacente frente a posibles efectos de oxidación y corrosión durante las etapas de incubación en medios tamponados. La Figura 98 muestra una pequeña red de periodo 600 nm con nanopilares muy similares a los existentes en los dispositivos de detección desarrollados en esta Tesis, cuyos nanopilares tienen diámetros entre 280 y 330 nm. En el ejemplo de la Figura 98 los nanopilares son muy uniformes, de 460 ± 5 nm de altura y 325 ± 5 nm de diámetro en la zona superior. Por tanto, como ya se ha comentado, el diámetro de los nanopilares no es constante en su eje vertical (no son cilíndricos), sino que estos se ensanchan hacia la base tal como ocurre con la mayoría de los troncos de los árboles, es decir, tienen forma de neilode truncado.

Fig. 98. Imágenes SEM de una red de 15×15 nanopilares, periodo 600 nm, fabricado con dosis 32 mC cm^{-2} y 10 vueltas de desenfoque sobre una película de 100 nm de espesor de aluminio. A excepción del pequeño tamaño de la red, éste es el aspecto habitual de las redes empleadas en los experimentos de detección llevados a cabo en esta Tesis.

La nanoestructura compuesta de nanopilares de SU-8 unidos por la base por una película delgada del mismo material fue estudiada después de separarla del sustrato. La Figura 99 muestra una red de nanopilares (diámetro ~ 320 nm, altura ~ 380 nm), como las usadas en (bio)detección en esta Tesis, después de eliminar por completo la película de 100 nm de espesor de aluminio que tenía debajo mediante inmersión en disolución de KOH (10 g l^{-1}). Después de manipular cuidadosamente la red con un escalpelo, se observa claramente la película de SU-8 entrecruzado que une los nanopilares por la base. El espesor de dicha película delgada no es uniforme: a lo largo de la diagonal de una celda unidad cuadrada el grosor es de ~ 35 nm, y siguiendo los ejes x e y (que rigen el periodo de 600 nm, en este caso) el espesor alcanza ~ 80 nm. Considerando la película de resina entrecruzada, se estableció un valor de 355 nm como altura efectiva de los nanopilares para cálculos posteriores de sensibilidad.

Fig. 99. Imágenes SEM de una red de nanopilares de SU-8 con geometría de neiloide truncado después de eliminar la película subyacente de aluminio con disolución acuosa de KOH. Los efectos de proximidad se observan como ensanchamiento de la base de los nanopilares, generando una película continua de SU-8 entrecruzado conectándolos.

Empleando nanopatrones con geometrías diferentes a la circular se fabricaron redes cuadradas de $150 \times 150 \mu\text{m}$, como los empleados en (bio)detección, de periodo 600 nm. La geometría de cada patrón fue como sigue: rectángulos de $7,5 \times 2,5$ nm, triángulos equiláteros de 5 nm de lado, y cruces compuestas por dos rectángulos de $8,75 \times 1,3$ nm. El desenfoque se fijó en 9 vueltas, valor habitual empleado con nanopatrones circulares, y que en los nuevos casos estudiados también produjo nanopilares de planta circular

debido, precisamente, al alto grado de desenfoque (Figura 100). La dosis utilizada se varió mínimamente para cada caso entre 64 y 76,8 mC cm⁻² con el fin de obtener nanopilares erguidos y definidos, cerca de la dosis límite que es incapaz de producir nanopilares correctamente.

Fig. 100. Imágenes SEM de redes de nanopilares sobre una película de aluminio de periodo 600 nm fabricados con nanopatrones (a) circulares (diámetro superior de los nanopilares, $\varnothing = 310$ nm), (b) rectangulares ($\varnothing = 336$ nm), (c) triangulares ($\varnothing = 342$ nm) y (d) en forma de cruz ($\varnothing = 348$ nm). La dosis para los tres primeros casos es 76,8 mC cm⁻², y de 64 mC cm⁻² para los nanopilares creados con nanopatrones en forma de cruz. Las imágenes se tomaron sin variar el brillo ni el contraste, evidenciando menos fondo entrecruzando (color más claro) en los casos distintos al que empleó nanopatrones circulares.

Se obtuvieron resultados comparables a los obtenidos con nanopatrones circulares en cuanto a dimensiones de los nanopilares, incluso los diámetros obtenidos eran sensiblemente mayores de manera habitual. Sin embargo, como diferencias más significativas, se obtuvo un fondo visiblemente menos entrecruzado (menor ensanchamiento de las bases de los pilares y menor espesor de la película de SU-8 entre ellos), apreciable en las imágenes SEM, y el tiempo de litografía fue notablemente menor.

Habitualmente, una red como la descrita, fabricada con nanopatrones circulares, requiere 630 s de litografía, mientras que los casos con diferentes geometrías llevan entre 188 s (rectángulos) y 303 s (cruces). Estos resultados indican que es posible

fabricar prácticamente la misma estructura creada con patrones circulares si se utilizan patrones rectangulares, con una reducción hasta del 70% del tiempo de litografía.

Igualmente, se realizó un experimento de fabricación similar (redes cuadradas de 150 μm de lado, 9 vueltas de desenfoque, idéntico intervalo de dosis con el fin de obtener pilares erguidos) fijando el periodo de la red en 700 nm de lugar de 600 nm (Figura 101). En este caso el fondo entrecruzado es más delgado y menos evidente en las imágenes SEM, por lo que el aspecto y la respuesta óptica son muy parecidos en todos los casos. El tiempo de litografía para una red de nanopatrones circulares fue de 460 s, mientras que en los demás casos fue: 140 s (rectángulos), 210 s (triángulos) y 230 s (cruces).

Fig. 101. Imágenes SEM de redes de nanopilares sobre película de aluminio de periodo 700 nm fabricados con nanopatrones (a) circulares (diámetro superior de los nanopilares, $\varnothing = 297$ nm), (b) rectangulares ($\varnothing = 285$ nm), (c) triangulares ($\varnothing = 300$ nm) y (d) en forma de cruz ($\varnothing = 305$ nm). La dosis para los dos primeros casos es $76,8 \text{ mC cm}^{-2}$, 64 mC cm^{-2} para los nanopilares creados con nanopatrones triangulares, y $70,4 \text{ mC cm}^{-2}$ para los fabricados con cruces. Las imágenes se tomaron sin variar el brillo ni el contraste, siendo el aspecto y el diámetro bastante uniformes en los cuatro casos.

Un experimento adicional de fabricación consistió en la creación de redes cuadradas de 150 μm de lado expuestas con 9 vueltas de desenfoque barriendo el intervalo de dosis entre $76,8$ y 96 mC cm^{-2} , con incrementos de $6,4 \text{ mC cm}^{-2}$. De esta forma se fabricaron juegos de cuatro redes empleando nanopatrones circulares (5 nm de diámetro) y rectangulares ($7,5 \times 2,5$ nm). Todas las redes fueron fabricadas en el mismo

chip, por lo que sufrieron el mismo procesado, y pueden verse en las imágenes SEM de la Figura 102. Se aprecia claramente que el fondo entrecruzado es prácticamente igual en ambos casos siempre que la red fabricada con nanopatrones circulares haya sido expuesta con una dosis $6,4 \text{ mC cm}^{-2}$ inferior.

Fig. 102. Redes de $150 \mu\text{m}$ de lado de nanopilares sobre película de aluminio fabricados a partir de nanopatrones circulares de 5 nm de diámetro (fila superior) y nanopatrones rectangulares de $7,5 \times 2,5 \text{ nm}$ (fila inferior). El tiempo de EBL para cada red superior fue de 630 s , y para cada red inferior de 200 s . Dosis (izq-dcha) = $76,8$, $83,2$, $89,6$ y 96 mC cm^{-2} . Diámetros aproximados de la cima, fila superior (izq-dcha): 295 , 313 , 319 y 322 nm . Diámetros aproximados de la cima, fila inferior (izq-dcha): 303 , 309 , 310 y 316 nm . Todas las redes fueron fabricadas en el mismo chip, y el brillo y contraste no fueron modificados durante la adquisición de las imágenes SEM.

Las redes descritas hasta ahora poseen un fondo entrecruzado de resina que comunica las bases ensanchadas de los nanopilares, característica que, tal como se ha mencionado anteriormente, se decidió aprovechar para desarrollar biosensores ópticos basados en MaGMR. No obstante, también se estudió la posibilidad de eliminar la película de SU-8 resultante de los efectos de proximidad. Con esta finalidad se realizaron diversas pruebas con plasma de oxígeno en el equipo ICP. Los resultados indicaron que es posible eliminarla, tal como se aprecia en la Figura 103, en la que se muestra dos zonas de una red de nanopilares de periodo = 600 nm , fabricada con dosis = 80 mC cm^{-2} y 10 vueltas de desenfoque, después de un ataque de 2 minutos con plasma de oxígeno (15 sccm y 20 W). Los nanopilares redujeron su tamaño de 370 nm de altura inicial y 280 nm de diámetro superior a 300 nm de altura final y 250 nm de diámetro en la cima. Los nanopilares de la esquina de la red, expuestos en menor medida a los efectos de proximidad, presentan una geometría más cilíndrica y el espacio entre ellos se observa más limpio.

Fig. 103. Imágenes SEM de una red de nanopilares de periodo 600 nm sobre una película de aluminio, expuestos con 10 vueltas de desenfoque y 80 mC cm⁻² de dosis, después de un ataque de 2 minutos con plasma de oxígeno (15 sccm, 20 W). Este proceso elimina el fondo entrecruzado de SU-8 y reduce el tamaño de los pilares.

Como un trabajo relacionado con la fabricación de las redes de nanopilares reseñadas hasta aquí en esta sección, se estudió el efecto del depósito de aluminio sobre ellos con el fin de fabricar una estructura que exhiba el efecto LSPR en discos de metal depositados sobre las columnas poliméricas, configuración similar a una reciente publicación basada en oro en lugar de aluminio.²⁰⁹ Debido a la forma de neiloide truncado de los nanopilares, es decir, con el diámetro de la base mayor que el de la cima, no se consiguió evitar el depósito de metal sobre las paredes de los pilares mediante la técnica de depósito utilizada incluso con redes de nanopilares tratadas con plasma de oxígeno. Sin embargo, las estructuras resultantes y el posterior tratamiento con plasma de oxígeno produjeron arquitecturas dignas de reseñar por su morfología y características.

Fig. 104. Nanopilar de SU-8 de 400 nm de altura y 300 nm de diámetro perteneciente a una red fabricada sobre una película de aluminio según los parámetros habituales descritos en esta Tesis antes (izq) y después (centro) de depositar verticalmente 40 nm de aluminio. A la derecha se muestra el resultado de aplicar plasma de oxígeno (15 sccm, 50 W, 30 min) para eliminar la resina, dejando una carcasa de aluminio y/o óxido de aluminio.

La Figura 104 muestra un nanopilar de SU-8 con geometría de neiloide de 400 nm de altura y 300 nm de diámetro superior sobre el que se depositaron 40 nm de

aluminio. Posteriormente se atacó con plasma de oxígeno en el equipo ICP (15 sccm, 50 W, 20 min), eliminando el material polimérico que compone la resina gracias a la porosidad de la película de aluminio depositada. El resultado es un nanopilar traslúcido al haz de electrones del SEM, con las paredes casi transparentes y posiblemente oxidadas por completo, coronado con una cubierta de aluminio/ Al_2O_3 de mayor espesor.

Mediante una adecuada orientación de una muestra con nanopilares dentro de la evaporadora, es posible obtener un depósito direccional de aluminio, permitiendo que una parte de la pared de cada nanopilar no quede cubierta con aluminio (Figura 105). Una estructura de este tipo podría facilitar la accesibilidad de ciertos materiales o líquidos al interior de los nanopilares huecos. Como apunte, cabe señalar que los nanopilares huecos resistieron ultrasonidos, procesos de congelación y descongelación sucesivos en agua desionizada, semanas de inmersión en agua desionizada y choques térmicos en placa calefactora a 250 °C, mostrando la elevada robustez química y mecánica de la estructura.

Fig. 105. Nanopilares huecos de aluminio/ Al_2O_3 después de depositar direccionalmente 40 nm de aluminio y aplicar plasma de oxígeno. Se aprecia claramente que el depósito de metal no fue uniforme, dejando una abertura lateral.

Algunas de las redes de nanopilares huecos fueron manipuladas delicadamente con un bisturí con objeto de romper cierto número de pilares y poder estudiarlos mejor. La Figura 106 muestra varios de los resultados de estas pruebas, evidenciando la transparencia de las carcassas huecas. Debido al espesor de la pared y la porosidad que se aprecia, al tratamiento con plasma de oxígeno y a la resistencia a inmersiones muy largas en agua desionizada, cabe la posibilidad de que estas carcassas sean únicamente de óxido de aluminio. Este tipo de estructuras podría encontrar aplicación como moldes, plantillas, nano-recipientes... Además, si se manipulan hasta romper los nanopilares huecos, se originan bordes muy delgados (varios nanómetros, únicamente) de óxido de aluminio que podrían utilizarse para destruir células o bacterias (idea sugerida por el Dr. Carlos Angulo Barrios).

Fig. 106. Imágenes SEM de nanopilares huecos de aluminio/ Al_2O_3 rotos mediante manipulación con un bisturí. Las carcasas huecas poseen paredes porosas muy delgadas (sólo varios nanómetros), y las paredes rotas crean cantos extremadamente afilados. Todas las redes mostradas son de periodo 600 nm.

3.2. Características espectrales.

La Figura 107 muestra la reflectancia medida (arriba) y la calculada (debajo) de una red de nanopilares de SU-8 de periodo 600 nm, diámetro superior ~ 300 nm y altura ~ 400 nm. Ambos espectros poseen dos picos característicos situados a ~ 640 y ~ 840 nm, nombrados D y M, respectivamente. En ambos casos, el valor de la anchura del pico a mitad de altura (FWHM, *full width at half minimum*) del mínimo D es inferior al de M, y fue calculado de acuerdo a la Figura 108. Como dato adicional, cabe señalar que el tiempo de adquisición de un espectro con el equipo FT-IR, tanto para las dimensiones habituales de un dispositivo como para los parámetros de medida introducidos en el equipo, es de alrededor de 10 minutos. Para reducir el tiempo de adquisición de un espectro podría acotarse el intervalo de longitudes de onda al intervalo en el que cabe esperar un desplazamiento, así como emplear un dispositivo con una red de nanopilares de área mayor que permita un menor número de barridos debido a la mejora de la relación señal/ruido.

Fig. 107. Espectros de reflexión medido y calculado de una red cuadrada de nanopilares de SU-8 de periodo 600 nm sobre película de aluminio. Los nanopilares, con geometría de neiloide truncado, miden 400 nm de altura y 300 nm de diámetro (en la cima).

Fig. 108. Método para obtener el valor de FWHM.

El cálculo de la amplitud del campo eléctrico E_x a $\lambda = 640$ nm indica que esta resonancia es del tipo MaGMR, pues la mayoría de la luz incidente se acopla al modo guiado fundamental de la nanoestructura (Figura 109a). Por otro lado, el cálculo de la amplitud del campo magnético H_y a $\lambda = 840$ nm indica que el campo magnético alcanza su máximo en la superficie del metal, por lo que puede asignarse la resonancia M, de mayor anchura, a la excitación de un SPP en la intercara aluminio/SU-8 (Figura 109b).

Fig. 109. Cálculos de las amplitudes del campo E_x (a) y del campo H_y (b) en la sección transversal XZ a lo largo de un eje principal a $\lambda = 640$ nm (resonancia D) y $\lambda = 840$ nm (resonancia M), respectivamente.

Aparte, se comprobó que la posición espectral del mínimo estrecho D puede controlarse mediante la elección del diámetro de los nanopilares en un intervalo entre 250 y 360 nm, intervalo en el que los efectos de proximidad, correlacionados con el diámetro, producen una película de resina entrecruzada entre los pilares suficientemente gruesa para generar el fenómeno MaGMR, siempre de acuerdo al método de fabricación empleado que incluye el desenfoque controlado del haz de electrones. Para patrones circulares de 5 nm de diámetro (que según el periodo, la dosis y el desenfoque aplicados pueden producir nanopilares erguidos de diámetros comprendidos entre 80 y 425 nm de diámetro en la cima) y periodo de 600 nm, produciendo nanopilares de unos 400 nm de altura, el ajuste lineal de la representación de la posición del mínimo D frente al diámetro de los nanopilares con valores provenientes de diversas muestras (Figura 110) resultó en una variación $\lambda_D/\text{diámetro} = 0,45 \text{ nm nm}^{-1}$ para el intervalo de diámetros anteriormente indicado.

Fig. 110. Valor de λ_D en función del diámetro de nanopilar para diferentes redes fabricadas. La línea gris corresponde al ajuste lineal de los valores experimentales.

A modo representativo, la Figura 111 muestra una colección de espectros medidos pertenecientes a redes cuadradas de nanopilares de SU-8 (periodo = 600 nm) fabricadas sobre una película de aluminio de 100 nm de espesor, sobre sustrato de silicio. El diámetro de los nanopilares varía entre 250 y 310 nm. Para este caso, en el que se emplearon nanopatrones circulares, los espectros de redes de nanopilares con diámetros superiores a 300 nm acusaron un gran aumento de FWHm y casi un desdoblamiento de la resonancia λ_D . Los espectros fueron suavizados mediante Savitzky-Golay (puntos de ventana = 10, polinomio de orden = 1).

Del mismo modo, en la Figura 112 se muestran espectros de redes similares con la particularidad de que los nanopilares se fabricaron empleando nanopatrones con formas geométricas diferentes al habitual círculo de 5 nm de diámetro, descritas anteriormente. Con estas condiciones de exposición, fue posible fabricar nanopilares de mayor diámetro (330–360 nm) con poco fondo de SU-8 entrecruzado (observado en imágenes SEM). La respuesta óptica de estas estructuras fue similar, en cuanto a la presencia de dos resonancias (mínimos de reflectancia) se refiere, a la que ofrecen las redes creadas con nanopatrones circulares (diámetros de 290–310 nm), con la ventaja de ofrecer una mayor superficie de detección (pilares de mayor diámetro y película entrecruzada más delgada, es decir, mayor altura de pilar).

Fig. 111. Espectros experimentales de reflexión de redes cuadradas de $150 \times 150 \mu\text{m}$ de nanopilares de SU-8 (periodo = 600 nm) sobre una película de aluminio. Los valores más pequeños de FWHM se obtuvieron para los nanopilares de menor diámetro y que presenten resonancia λ_D , es decir, para diámetros alrededor de 260 nm.

Fig. 112. Espectros experimentales de reflexión de redes cuadradas de $150 \times 150 \mu\text{m}$ de nanopilares de SU-8 (periodo = 600 nm) sobre una película de aluminio creados con nanopatrones de diferentes geometrías, obteniéndose resultados comparables en todos los casos. Los nanopatrones no circulares permiten crear nanopilares de mayor diámetro con menor fondo entrecruzado de resina entre ellos porque requieren tiempos menores de litografía, aumentando así el área para (bio)detección.

La Figura 113 redunda en este tipo de resultados, aunque para redes cuadradas de 700 nm de periodo en lugar de 600 nm, fabricadas de manera similar al caso anterior. En este caso, todos los nanopilares presentan diámetros entre 285 y 310 nm.

Fig. 113. Espectros medidos de reflexión correspondientes a redes cuadradas de $150 \times 150 \mu\text{m}$ de nanopilares de SU-8 (periodo = 700 nm) sobre una película de aluminio fabricados con nanopatrones de diferentes geometrías, obteniéndose resultados similares.

Como experimento adicional, se estudió la influencia en la respuesta óptica de la película de 100 nm de espesor de aluminio depositada sobre el sustrato de silicio. Para ello, se fabricaron redes de nanopilares de 310 nm de diámetro en chips de silicio con y sin esa película de aluminio (Figura 114). Sin la presencia de aluminio bajo la estructura de nanopilares y del fondo de resina entrecruzado, la respuesta óptica es muy diferente, perdiéndose las resonancias D y M asociadas al efecto MaGMR y a la excitación de un SPP en la intercara aluminio/SU-8, respectivamente.

En cuanto al trabajo realizado depositando metal sobre las estructuras, la Figura 115 contiene los espectros de una red de nanopilares (periodo 600 nm, diámetro 270 nm) sobre la que se depositaron 40 nm de aluminio y posteriormente se aplicó plasma de oxígeno para eliminar la resina, dejando únicamente las carcassas traslúcidas de aluminio/ Al_2O_3 . En ambos casos, la resonancia asociada al efecto MaGMR utilizada para experimentos de (bio)detección desaparece, así como la resonancia relacionada con la excitación SPP aluminio/SU-8. Por tanto, el depósito de metal sobre la estructura no mejora la calidad de la respuesta óptica, asociada a la existencia de resonancias estrechas y definidas.

Fig. 114. Arriba, imágenes SEM de una red cuadrada de nanopilares de SU-8 (diámetro = 310 nm) con la habitual película de 100 nm de aluminio sobre el sustrato (izq) y sin ella (dcha). Debajo, espectros medidos para ambos casos (negro: con aluminio; gris: sin aluminio). Sin aluminio sobre el sustrato se pierden las resonancias debidas al efecto MaGMR y a la excitación del SPP de la intercara aluminio/SU-8.

Fig. 115. Espectros de reflexión de una red cuadrada de $150 \times 150 \mu\text{m}$ de nanopilares de SU-8 (periodo = 600 nm, diámetro = 270 nm) sobre una película de aluminio antes de depositar 40 nm de aluminio (negro) y después (gris continuo), sin presentar una mejora en cuanto a la calidad de las resonancias estudiadas. En gris discontinuo se muestra el espectro de la estructura tras eliminar la resina con plasma de oxígeno, dejando únicamente las carcassas huecas de aluminio/ Al_2O_3 .

3.3. Sensibilidad volumétrica

El dispositivo consistió en una red cuadrada de nanopilares de 290 nm de diámetro y periodo 600 nm cuyo espectro de reflexión poseía un pronunciado mínimo sobre 655 nm debido al efecto MaGMR. Los espectros de reflexión resultantes de los experimentos de determinación de la sensibilidad volumétrica con disolventes se muestran en la Figura 116. Cuando un disolvente moja e inunda la red de difracción de nanopilares, el índice efectivo de refracción de la red aumenta, desplazando λ_D hacia mayores longitudes de onda. Además, la distancia entre las resonancias D y M asociadas al efecto MaGMR y a la excitación del SPP de la intercara SU-8/aluminio siempre es de 200 nm, aproximadamente, en aire, independientemente del diámetro de los nanopilares. Tomando esta referencia, y asumiendo una proporcionalidad similar entre $\Delta\lambda_D$ y $\Delta\lambda_M$ frente al índice de refracción efectivo de la red de difracción cuando está en contacto con diferentes medios (debido a la relación lineal del desplazamiento espectral de ambas resonancias con el índice de refracción del medio, y a la proporcionalidad de la posición de las resonancias asociadas con MaGMR y SPP con el periodo de la red), se relacionaron determinadas resonancias de la estructura de picos que aparece entre 750 y 1000 nm en los espectros de las muestras sumergidas en medio líquido, cuya intensidad es menor debido al menor contraste entre el índice de refracción del líquido y el de la nanoestructura de SU-8.

Fig. 116. Espectros de reflexión de una red cuadrada de nanopilares (periodo 600 nm, diámetro 290 nm) en aire y en diferentes disolventes. La localización de λ_D y λ_M derivó de la distancia entre dichas resonancias en el espectro en aire, que siempre es de unos 200 nm independientemente del diámetro de los nanopilares.

Las Figuras 117a y 117b muestran los mismos espectros normalizados respecto al valor de la reflectancia de λ_D para el aire, en los que el desplazamiento debido al índice de refracción de cada disolvente es evidente.

Fig. 117. Espectros de reflexión normalizados respecto al valor de la reflectancia de λ_D para el aire. El desplazamiento asociado al índice de refracción de cada disolvente se observa con claridad.

Tomando las posiciones de la resonancia λ_D asignada en los espectros anteriores y representándolas frente al índice de refracción de cada disolvente se obtuvo la sensibilidad volumétrica mediante un ajuste lineal de los datos (Figura 118). La sensibilidad resultante es $S_B = d\lambda_S/dRI_{\text{(disolvente)}} = 509,3 \text{ nm RIU}^{-1}$.

Fig. 118. Obtención de la sensibilidad volumétrica a partir del ajuste lineal de las posiciones de λ_D respecto al índice de refracción de cada medio, $S_B = d\lambda_S/d_{RI} = 509,3 \text{ nm RIU}^{-1}$.

En el caso de los nanopilares huecos de aluminio/ Al_2O_3 , después de haber eliminado la resina SU-8, se realizó un experimento similar de determinación de la sensibilidad volumétrica con una red de nanopilares huecos de 270 nm de diámetro para evaluar sus posibilidades como (bio)sensor refractométrico. La Figura 119 muestra los espectros de reflexión obtenidos, que aparentemente exhiben un desplazamiento del ancho pico que presenta el espectro en aire, aunque la determinación del origen de esta resonancia quedó fuera del trabajo de esta Tesis.

Fig. 119. Espectros de reflexión de una red cuadrada de nanopilares huecos de aluminio/ Al_2O_3 (periodo 600 nm, diámetro 270 nm) en aire y en diferentes disolventes. El máximo A fue estudiado y relacionado con el desplazamiento observado con cada disolvente.

El ajuste lineal de los datos resultó en una sensibilidad volumétrica de 358,1 nm RIU⁻¹ (Figura 120), un valor notablemente inferior al obtenido con nanopilares de SU-8.

Fig. 120. Sensibilidad volumétrica de una red de nanopilares huecos a partir del ajuste lineal de las posiciones del máximo A respecto al índice de refracción de cada medio, SB = 358,1 nm RIU⁻¹.

3.4. Sensibilidad superficial y biodetección.

A diferencia de los experimentos de sensibilidad volumétrica, el espesor de una película de biomoléculas adsorbida (entre varios nanómetros y varias decenas de nanómetros) en la superficie de la resina SU-8 es inferior al alcance del campo evanescente generado por el efecto MaGMR en redes de nanopilares poliméricas sobre aluminio. Por tanto, las variaciones espectrales debidas a la presencia de tales biocapas se deberán tanto al índice de refracción que poseen como a su espesor.

Las simulaciones indicaron que las dos resonancias características muestran desplazamiento hacia el rojo en presencia de una biocapa adherida al SU-8 de la nanoestructura. Sin embargo, no sólo es importante la sensibilidad superficial en lo que concierne al rendimiento de un sensor óptico de superficie. Así, cuanto más estrecho sea el pico (menor FWHm) mejor resolución de medida se obtendrá. De esta manera, combinando ambos aspectos (sensibilidad superficial y anchura de la resonancia), se empleó como figura de mérito (FOM, *figure of merit*)²¹⁰ el cociente de la sensibilidad superficial (S_A) y FWHm:

$$FOM = \frac{S_A}{FWHM} = \frac{\Delta\lambda/\Delta t_A}{FWHM} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde $\Delta\lambda$ es el desplazamiento de la resonancia y Δt_A es la variación de espesor de una biocapa uniforme adherida.

La Tabla 3 compara los valores de FWHm y FOM de tres redes de nanopilares de SU-8: (i) el dispositivo fabricado y evaluado en la presente Tesis, nombrado como MaGMR en la tabla, (ii) una estructura similar pero con nanopilares cilíndricos de 300 nm de diámetro y sin película de SU-8 en el fondo conectando los pilares, señalado

como SPP, y (iii) una red rómbica de nanopilares de SU-8 (200 nm de diámetro, 420 nm de altura y 800 nm de periodo) sobre SiO₂/Si fabricada para interrogación TF-RIS reportada en un trabajo publicado en 2010.¹⁵⁹

Configuración de la red de nanopilares de SU-8	Parámetro	Calculado	Experimental
<p style="text-align: center;">MaGMR</p>	(FWHm) _D	13,7 nm	13,2 nm
	(FWHm) _M	63,5 nm	66,1 nm
	(FOM) _D	0,131 nm⁻¹	0,127 nm⁻¹
	(FOM) _M	0,031 nm⁻¹	0,021 nm⁻¹
<p style="text-align: center;">SPP</p>	FWHm	15,3 nm	-
	FOM	0,046 nm⁻¹	-
<p style="text-align: center;">TF-RIS*</p>	FWHm	63 nm	55 nm
	FOM	0,005 nm⁻¹	0,009 nm⁻¹

Tabla 3. Comparativa de valores calculados y experimentales de FWHm y FOM para distintas arquitectura basadas en nanopilares.

Lo primero que destaca es que la figura de mérito del mínimo D del dispositivo MaGMR es un orden de magnitud mejor que para la resonancia M, por lo que es deseable que sea el mínimo D el monitorizado en experimentos de sensibilidad superficial. Se observa también que el rendimiento de la estructura MaGMR simulada es claramente superior al de las otras dos estructuras, siendo FOM_D uno y dos órdenes de magnitud mayor que el valor de los dispositivos SPP y TF-RIS, respectivamente. Comparando con el dispositivo SPP, la estructura MaGMR muestra mayor S_A, mientras que si se compara con el dispositivo TF-RIS, el MaGMR muestra a la vez mayor S_A y menor FWHm.

En cuanto a los experimentos de sensibilidad superficial, inicialmente se estudió el efecto del agua sobre una estructura de nanopilares poliméricos tratada con H₂SO₄, lavada a continuación en agua y finalmente secada a 120 °C para eliminar toda el agua. El test se llevó a cabo con sucesivas etapas de adsorción y desorción de vapor de agua (Figura 121). El desplazamiento de λ_D medido para cada etapa (hacia el rojo cuando se trata de adsorción y/o absorción, hacia el azul cuando el agua es eliminada en una placa calefactora) fue de ~1 nm. Asumiendo un espesor de ~1 nm de la película adsorbida de

agua,²¹¹ la sensibilidad superficial resultó ser $(S_A)_D \approx 1 \text{ nm nm}^{-1}$, valor que concuerda bien con los obtenidos en las simulaciones considerando un índice de refracción para el agua de 1,33.

A diferencia del test anterior, los dispositivos empleados en biodetección no fueron calentados a 120 °C después del tratamiento con H_2SO_4 y de su posterior lavado en agua, y registraron un desplazamiento de 11 nm aproximadamente de la resonancia D hacia mayores longitudes de onda. Debido a las dimensiones nanométricas y al alto entrecruzamiento de la resina SU-8 producido por el tratamiento térmico realizado a 250 °C y, por tanto, a la gran afinidad por moléculas de agua debido a la gran cantidad de grupos $-\text{OH}$ generados tanto en el exterior como en el interior de la estructura polimérica,²¹² puede pensarse que durante esta etapa no sólo existe agua adsorbida en la superficie, sino también agua absorbida, posiblemente hasta saturación dado que ésta puede llegar a ocurrir en sólo unas decenas de segundos si el espesor es muy reducido.^{212,213} Esta absorción de agua produce un aumento del índice de refracción efectivo y posiblemente un hinchamiento del material polimérico, principales causantes del desplazamiento de 11 nm de la resonancia D.

Fig. 121. Desplazamientos medidos de λ_D debidos a etapas sucesivas de adsorción/absorción y desorción de moléculas de agua.

Los resultados de los experimentos de biodetección se muestran en la Figura 122, que muestra el desplazamiento espectral del mínimo D de dos muestras MaGMR de nanopilares de SU-8 frente a la incubación en HEPES y en BSA, además de la etapa de reconocimiento de aBSA. El desplazamiento para BSA, correspondiente a una concentración para saturar la superficie, fue de 4,20 nm, mientras que para HEPES fue de sólo 1,24 nm. Estos desplazamientos pueden relacionarse con la gran diferencia de tamaño entre la macromolécula de BSA (~66,4 kDa, ~14 nm de longitud) y la molécula de HEPES (~238 Da, ~1 nm de longitud). Que la diferencia entre ambos desplazamientos no sea aún mayor puede relacionarse, por una parte, con que las moléculas de HEPES compiten por posiciones de adsorción superficial con las

macromoléculas de BSA, además de que las biopelículas formadas pueden no ser uniformes, y por otra parte, con el decaimiento exponencial con la distancia de la intensidad del campo evanescente generado por el efecto MaGMR, que implica que las moléculas de HEPES interaccionan en gran medida con dicho campo evanescente debido a su pequeño tamaño molecular, mientras que la interacción de las macromoléculas de BSA sería menor debido a su mayor tamaño. Estos experimentos fueron una prueba de concepto y no se utilizaron réplicas, por lo que no se llegó a determinar el límite de detección. En ambos casos λ_D se desplaza hacia el rojo, y estos desplazamientos ocurren a partir del desplazamiento de unos 11 nm registrado previamente y asociado a la adsorción y absorción de agua, principalmente a esto último (absorción) debido a que el experimento de exposición a humedad reflejado en la Figura 121 mostró desplazamientos de sólo 1 nm debido a procesos de adsorción y desorción superficial.

Por tanto, el desplazamiento de 1,24 nm puede asociarse a la suma de dos efectos principales: la adsorción de moléculas de HEPES más la adsorción de las moléculas de agua que no hayan sido retiradas tras la etapa de secado con flujo de aire suave. De igual forma, el desplazamiento de 4,20 nm puede asociarse a dichos efectos más la adsorción de moléculas de BSA, que sería la principal causa del desplazamiento en concordancia con el diferente tamaño molecular entre las moléculas de BSA y HEPES.

Fig. 122. Desplazamientos medidos de λ_D correspondientes a la adsorción de moléculas de HEPES y BSA (a). Los desplazamientos hacia el rojo demuestran la viabilidad de las redes de nanopilares de SU-8 como estructura MaGMR para biodetección superficial altamente sensible y sin marcado. Los desplazamientos de λ_D señalados como (b) corresponden al desplazamiento total de las incubaciones de reconocimiento de aBSA (columna derecha) y al desplazamiento debido a incubaciones únicamente con HEPES (columna izquierda).

Después de inmovilizar BSA sobre la superficie polimérica se realizaron incubaciones de reconocimiento de aBSA tal como se detalla en el punto 4.5.3 de esta Tesis, continuando con las incubaciones con HEPES del biosensor que no tenía BSA adsorbida. En ambos casos el tiempo total de incubación fue de 4 horas. Los desplazamientos se muestran en la Figura 122 (b) anterior. El desplazamiento de λ_D relacionado con la adsorción de HEPES fue de 3,16 nm, mientras que el resultante de todas las incubaciones de aBSA fue de 6,12 nm, notablemente superior, considerando el ajuste de la curva.

Fig. 123. Curva de calibración para incubaciones de reconocimiento de aBSA. El ajuste de la curva indica un desplazamiento máximo de λ_D de aproximadamente 6 nm.

Asumiendo un espesor de 2,5 nm para una monocapa uniforme de moléculas de BSA que recubre conformalmente la superficie del dispositivo,²¹⁴ y un desplazamiento de 4,20 nm, la sensibilidad superficial resultante es $(S_A)_D = 1,68 \text{ nm nm}^{-1}$. A modo comparativo, el valor de la sensibilidad obtenido en esta Tesis para los dispositivos basados en redes cuadradas de nanoagujeros en aluminio sobre vidrio fue de $1,98 \text{ nm nm}^{-1}$ para una película de resina ZEP-520, por lo que $(S_A)_D = 1,68 \text{ nm nm}^{-1}$ puede considerarse un valor alto de sensibilidad superficial al tratarse de la adsorción de una biocapa, no de una película altamente uniforme de resina comercial depositada por centrifugado y adelgazada mediante plasma de oxígeno, tal como se realizó en el caso del dispositivo con nanoagujeros, procedimiento inviable con nanopilares de SU-8 debido a que el espesor de la capa de resina depositada no sería uniforme debido a la topografía de la superficie y a que el proceso de desgaste del espesor inicial con plasma de oxígeno atacaría a los propios pilares.

Estos resultados indican que la arquitectura MaGMR desarrollada puede emplearse como biosensor óptico refractométrico sin marcado, aunque este experimento de reconocimiento se empleó solamente como prueba de concepto, igual que la adsorción de HEPES y BSA, observándose que posiblemente se llegó a una situación de

saturación completa de la superficie con el conjunto BSA/aBSA, no así con moléculas de HEPES. Debido al tamaño del conjunto BSA/aBSA (~19 nm), y teniendo en cuenta la sensibilidad calculada, cabría esperar un desplazamiento total de ~32 nm, aproximadamente tres veces mayor al obtenido, un hecho que podría relacionarse con la distribución no uniforme del campo evanescente generado por el efecto MaGMR (Figura 109a), de mayor intensidad en las paredes de los nanopilares que en las cimas (el aumento de espesor de un recubrimiento conformal no produciría un desplazamiento lineal de la posición espectral de λ_D), también con la posibilidad de que la biopelícula formada no sea uniforme, y quizá con detalles experimentales que habría que confirmar, por un parte, con un experimento que contase con réplicas, y por otra parte, con un experimento de selectividad.

La figura de mérito correspondiente al dispositivo caracterizado, considerando el valor de $1,68 \text{ nm nm}^{-1}$, está reflejada en la Tabla 3 ($0,127 \text{ nm}^{-1}$), siendo notable la similitud entre los valores experimentales y simulados. El factor de mérito de la estructura MaGMR es dos órdenes de magnitud mejor que el exhibido por el dispositivo TF-RIS, de similar arquitectura, y su fabricación no añade complejidad ni un aumento del coste en relación a este último.

Además, si se considera un caso típico de dispositivo MaGMR fabricado en esta Tesis: red cuadrada de nanopilares de SU-8 de 320 nm de diámetro y altura efectiva de $380-35 = 355 \text{ nm}$ (los 35 nm corresponden al espesor del fondo entrecruzado de resina), y se compara con la estructura de nanopilares del dispositivo TF-RIS (red rómbica de nanopilares cilíndricos de 200 nm de diámetro, 420 nm de altura y 800 nm de periodo), la relación de área de la pared de los nanopilares por unidad de área del plano x - y (el plano del sustrato), resulta en que el dispositivo MaGMR posee aproximadamente un 30% menos de superficie sensora vertical, y a pesar de ello el valor de FOM es muy superior.

También es destacable que la película de SU-8 entrecruzado como resultado de los efectos de proximidad provenientes de la exposición con desenfoque no sólo favorece la aparición del fenómeno MaGMR, sino que también encapsula el aluminio protegiéndolo frente a la oxidación y la corrosión cuando se emplea como biosensor en medio acuoso, permitiendo el uso de aluminio en dispositivos MaGMR como los desarrollados en esta Tesis frente a metales de mucho mayor coste como el oro.

VI. Conclusiones y trabajo futuro.

A continuación se describen y comentan las conclusiones más importantes y relevantes del trabajo resultante de la realización de esta Tesis.

1. MIPs.

Se han creado por primera vez sensores biomiméticos basados en MIPs nanoestructurados mediante escritura directa con EBL. El material desarrollado, el copolímero P(MAA-*co*-MAAEMA), ha demostrado buenas propiedades como MIP y como resina de EBL. El comportamiento como resina positiva del material es clave pues permite crear micro/nano patrones sin irradiar (dañar) la molécula plantilla. Se concedió una Patente Nacional al fruto de este trabajo y los resultados de mayor relevancia están en la publicación *Journal of Materials Chemistry C (RSC, The Royal Society of Chemistry)*.²¹⁵

También se ha desarrollado el copolímero P(HEMA-*co*-MAAEMA). Aunque no exhibió características de MIP, sí demostró poseer unas propiedades como resina EBL de gran interés tecnológico, como una sensibilidad excepcionalmente alta al haz de electrones, un comportamiento dual en función de la dosis y emisión PL visible de los motivos entrecruzados. Los resultados más importantes de este trabajo se encuentran publicados en *Journal of Materials Chemistry C (RSC, The Royal Society of Chemistry)*.²¹⁶

Previamente al desarrollo de los copolímeros anteriores se investigó la posibilidad de utilizar las resinas comerciales PMMA y PMMA/MA para crear MIPs nanoestructurados mediante escritura directa con EBL, aunque no produjeron resultados concluyentes. No obstante, se observó que los patrones entrecruzados mediante haz de electrones emiten luz visible (azul) cuando son excitados ópticamente (PL). Estos resultados están publicados en la revista *Materials Letters (Elsevier)*.²⁰⁰

Trabajo futuro.

Como trabajo futuro, y desde un punto de vista tecnológico, ampliar la investigación para demostrar el funcionamiento de sensores biomiméticos basados en P(MAA-*co*-MAAEMA) nanoestructurados con EBL, es decir, empleando un equipo de interrogación adecuado capaz de captar la fluorescencia emitida por un nanopatrón, sería lógico, pues en esta Tesis se probó el funcionamiento de sensores que contenían patrones de espesor nanométrico creados con fotolitografía DUV, con una superficie de 300×300 μm, aproximadamente. De esta manera, se probaría la viabilidad de matrices de elevada densidad de sensores basados en capas delgadas de MIPs nanoestructurados para detección múltiple.

Otro trabajo podría dedicarse a probar el funcionamiento de un sensor que contenga el MIP desarrollado u otro similar, aunque con una plantilla no fluorescente. Para ello podría tratarse de implementar el MIP sobre otros tipos de biosensores basados en SPR o MaGMR, por ejemplo, como los desarrollados en esta Tesis, que fuesen sensibles a los cambios de índice de refracción provenientes del reconocimiento de la plantilla. Para ello, inicialmente sería necesario realizar un estudio para comprobar el comportamiento del material polimérico después de los lavados e incubaciones, debido al hinchamiento que suele presentar. Sin embargo, habría que estudiar qué ventajas se

esperan obtener, pues en los últimos años ya se han desarrollado sensores que combinan SPR con MIPs.

En cuanto a las propiedades de las resinas preparadas, enfocar esfuerzos a su optimización con el fin de aprovechar la elevada sensibilidad al haz de electrones como resinas negativas (que conllevaría una gran reducción del tiempo de exposición con EBL frente a otras resinas comerciales) podría dar lugar a una formulación atractiva comercialmente.

Por otra parte, podría aprovecharse la alta sensibilidad que presenta P(HEMA-co-MAAEMA) para investigar la posibilidad de un aumento de la eficiencia de una célula solar cubierta por una red de microlentes, tal como apuntan diversos trabajos publicados.

Por último, el aprovechamiento de la emisión PL que presentan las resinas estudiadas podría dar pie a nuevos trabajos de investigación centrados en aplicaciones concretas. Así, por ejemplo, sería interesante comprobar si es comercialmente atractivo el desarrollo de nanoetiquetas fluorescentes encapsuladas, fabricadas con P(HEMA-co-MAAEMA) o con PMMA mediante EBL, que pudieran aplicarse a productos comerciales como etiquetas antifraude. Otro ejemplo que podría ser de utilidad sería una investigación para determinar cómo afectan determinados tipos de radiación a la estructura química de la P(HEMA-co-MAAEMA) o la PMMA entrecruzadas y sin entrecruzar: la posible alteración en la emisión PL podría aprovechar aplicabilidad en dosímetros de radiación.

2. Biosensores plasmónicos basados en redes de nanoagujeros en Al.

Se han demostrado, por primera vez, biosensores plasmónicos refractométricos sin marcado basados en redes periódicas de nanoagujeros en películas de aluminio, empleando tanto sustratos de vidrio como de policarbonato proveniente de CDs. Para evitar la degradación del aluminio en medios acuosos, se ha desarrollado un proceso de pasivación basado en un tratamiento con plasma de oxígeno. Los sensores fabricados presentan una alta sensibilidad, y los experimentos de biodetección en medio acuoso demostraron la eficacia del método de pasivación y la capacidad de estos dispositivos para ser utilizados como biosensores. Además, empleando cinta adhesiva comercial, se ha demostrado la posibilidad de transferir películas de aluminio nanoestructuradas sobre sustratos de policarbonato, despegándolas eficazmente de dichos sustratos. Los resultados más relevantes relacionados con estos trabajos, reseñados en esta Tesis, están publicados en las siguientes revistas: *ACS Applied Materials & Interfaces* (ACS, American Chemical Society),²⁰¹ *Plasmonics* (Springer),²⁴⁶ *Biosensors* (MDPI, Multidisciplinary Digital Publishing Institute),²¹⁷ y *Nanoscale* (RSC, The Royal Society of Chemistry).²¹⁸

Trabajo futuro.

El trabajo futuro relacionado con los biosensores realizados en policarbonato pasaría por demostrar la viabilidad de su implementación en lectores de CDs o DVDs, ya sean comerciales o adaptados con fuentes de luz visible. Esta demostración, junto al desarrollo de un prototipo, serían los pasos previos a la posible comercialización.

Del mismo modo, siguiendo la línea de algunos dispositivos ya publicados, el desarrollo de un aparato de dimensiones reducidas que adapte este tipo de sensores (por

ejemplo, como chips desechables) a *smartphones* y dispositivos parecidos que posean cámara digital para algún tipo de análisis clínico o medioambiental podría ser comercialmente atractivo.

En relación a la capacidad de transferir películas de aluminio, podría ampliarse la investigación para estudiar qué otros disolventes permiten el despegue y qué otros sustratos son susceptibles de ser utilizados.

También sería útil explorar las posibilidades tecnológicas existentes que permiten la fabricación en masa de áreas grandes de redes de nanoagujeros en aluminio, tales como la nanoimpresión UV, la impresión por transferencia o la litografía UV, con el fin de determinar el método óptimo en cuanto a nanoestructura y buenas prestaciones del dispositivo.

Finalmente, podría ampliarse la investigación a la implementación de los biosensores plasmónicos desarrollados en sistemas de microfluídica que permitan medidas en tiempo real, pues se obtendría mayor información de los procesos de inmovilización y reconocimiento. Además, se evitaría secar el dispositivo, impidiendo una posible degradación, permitiendo a las moléculas implicadas mantener su disposición en medio líquido. También permitiría otro tipo de experimentos no realizables en seco, como el estudio del incremento gradual de la concentración empleando un sólo dispositivo, o un experimento de mayor complejidad que implique numerosas etapas. En relación a los biosensores desarrollados en esta Tesis, el estudio de cómo afectan al aluminio diferentes medios tamponados en tiempo real ayudaría a comprender mejor la influencia de los mismos sobre el metal, además de dar pie a un trabajo que permita mejorar el proceso de pasivación variando parámetros relacionados con el plasma de oxígeno, tales como tiempo, presión, potencia o el propio gas empleado (efecto del ozono o de la incorporación de otros gases como argón).

3. Sensores basados en redes de nanopilares de SU-8 y efecto MaGMR.

Se han desarrollado mediante EBL biosensores ópticos sin marcado basados en el efecto MaGMR. La litografía por haz de electrones produce en un sólo paso, combinando nanopatrones 2D y cierto grado de desenfoque del haz, redes periódicas de nanopilares de SU-8 interconectados por una película del mismo material, todo ello sobre una película de aluminio depositada en sustratos de silicio. Dicha película protege el aluminio frente a la oxidación y la corrosión, y favorece la aparición del efecto MaGMR, que produce una resonancia de alta calidad sensible a los cambios de índice de refracción en el medio en contacto con la superficie de la resina. Los dispositivos fabricados poseen un factor de mérito superior a otras arquitecturas similares y presentan una gran sensibilidad superficial que los hace adecuados para ser utilizados como biosensores sin marcado. Los resultados más destacados derivados de esta investigación están publicados en *Sensors and Actuators B: Chemical (Elsevier)*.²¹⁹

Adicionalmente, durante el estudio de este tipo de estructuras con metal depositado sobre ellas, se han obtenido redes de nanopilares huecos de aluminio y óxido de aluminio que han demostrado gran robustez física.

Trabajo futuro.

Sería interesante ampliar la línea de investigación seguida al estudio de redes más compactas de nanopilares, por ejemplo con geometría hexagonal, para comprobar

si un aumento de la superficie de detección se refleja en un incremento de la sensibilidad. Para ello sería conveniente fabricar redes de nanopilares de mayor área que permitan medidas más rápidas, por lo que sería necesario un trabajo de optimización proveniente de la posibilidad demostrada en esta Tesis de emplear patrones con diversas geometrías que permiten una reducción considerable del tiempo de la litografía con EBL. Esto favorecería la fabricación de redes de mayor tamaño para ser interrogadas mediante equipos portátiles basados en espectrofotómetros de bajo coste y pequeño tamaño. En relación a esto, sería útil investigar la posibilidad de crear áreas grandes de la arquitectura MaGMR desarrollada mediante técnicas como la nanoimpresión, creando previamente una máscara, con objeto de demostrar la viabilidad de la fabricación en masa.

Además, del mismo modo que para lo sugerido con redes de nanoagujeros en aluminio y exponiendo el mismo tipo de casos prácticos, un trabajo de biodetección en tiempo real empleando un sistema de microfluídica sería muy atractivo.

También podría ampliarse la investigación relacionada con la posibilidad de depositar metal únicamente sobre las cimas de los nanopilares, quizá mediante depósito del metal sobre una muestra muy inclinada, para investigar la respuesta de la nueva nanoestructura como biosensor basado en LSPR. Para ello sería necesario optimizar la altura de los nanopilares para estudiar las características necesarias para obtener la mejor sensibilidad del sensor. Sería necesario un estudio de una posible combinación de los efectos LSPR y MaGMR. Además, podría añadirse a la investigación el estudio del efecto de un tratamiento previo o posterior con plasma de oxígeno que reduzca la cantidad de resina, tanto en el fondo como en las paredes de los nanopilares, para estudiar el efecto de la respuesta LSPR y la posible pasivación del metal depositado en caso de haber elegido aluminio.

Por último, podría abrirse una línea de investigación que permita aprovechar alguna de las características estructurales de los nanopilares huecos de aluminio/óxido de aluminio, así como estudiar otras posibles aplicaciones de la técnica empleada, pues podría permitir el desarrollo de diversos tipos de nanoestructuras huecas, como podrían ser circuitos nanofluídicos que permitan trabajar con cantidades extremadamente pequeñas de líquido.

4. Tabla resumen de los dispositivos desarrollados (S_B y S_S denotan la sensibilidad volumétrica y la sensibilidad superficial, respectivamente).

	Sensores biomiméticos	Biosensores plasmónicos (nanoagujeros en Al)	Biosensores MaGMR (nanopilares SU-8)
Sensibilidad / Límite de detección (LOD)	LOD = 92 nM (analito $\rightarrow$ R123)	$S_B = 487 \text{ nm RIU}^{-1}$ $S_S = 1,98 \text{ nm nm}^{-1}$ (película de resina)	$S_B = 509 \text{ nm RIU}^{-1}$ $S_S = 1,68 \text{ nm nm}^{-1}$ (película de BSA)
Selectividad	Muy alta frente a R6G y RB	No investigado	No investigado
Volumen de muestra (esta Tesis)	5 mL	50 – 150 μL	50 – 150 μL
Capacidad de miniaturización del dispositivo	Muy alta	Muy alta	Muy alta
Posibilidad de detección multiplexada	Sí	Sí	Sí
Método de detección óptica	Fluorescencia (esta Tesis)	Refractometría	Refractometría
Estabilidad en medio acuoso	Muy alta	Alta	Muy alta
Tiempo de incubación del analito (esta Tesis)	60 – 180 minutos	60 minutos	30 minutos
Posibilidad de medidas en tiempo real	Difícil (fluorescencia con microscopio confocal = tiempos de integración)	Sí (con celda de flujo)	Sí (con celda de flujo)
Posibilidad de producción en masa	Sí	Sí	Sí
Coste de producción en masa	Medio–alto con EBL. Bajo con fotolitografía.	Bajo con fotolitografía, nanoimpresión u otras técnicas	Medio–bajo (bajo con litografía por nanoimpresión u otras técnicas)
Reutilización	Sí	No investigado	No investigado
Posibilidad de equipos portátiles	Sí	Sí	Sí
Manipulación y uso	Fácil	Fácil	Fácil
Robustez mecánica	Intermedia (polimérico)	Alta	Intermedia (polimérico)
Materiales reciclables	Sí	Sí	Sí

VII. Publicaciones y otros eventos relacionados con la Tesis.

1. Publicaciones directamente relacionadas con la Tesis.

- C.A. Barrios, S. Carrasco, V. Canalejas-Tejero, D. López-Romero, F. Navarro-Villoslada, M.C. Moreno-Bondi, J.L.G. Fierro, and M.C. Capel-Sánchez, Fabrication of luminescent nanostructures by electron-beam direct writing of PMMA resist. *Mater. Lett.* **88**, 93 (2012). DOI: 10.1016/j.matlet.2012.08.035.

En este artículo fueron publicados los resultados del estudio realizado con PMMA y PMMA/MA como paso previo al desarrollo de un polímero con funcionalidad MIP. El resultado más relevante fue la conversión de estas resinas de EBL en material con propiedades fotoluminiscentes tras la exposición al haz de electrones. Medidas de espectroscopía Raman revelaron que la transformación química durante la exposición con EBL causa la luminiscencia observada. Es posible controlar la intensidad de la emisión luminiscente controlando la dosis de electrones aplicada al material.

Coincidiendo con el inicio de la Tesis, el **trabajo del autor de esta Tesis** consistió en la fabricación de algunas de las estructuras con EBL y su caracterización con AFM.

- V. Canalejas-Tejero, S. Carrasco, F. Navarro-Villoslada, J.L. García Fierro, M. del C. Capel-Sánchez, M.C. Moreno-Bondi, and C.A. Barrios, Ultrasensitive non-chemically amplified low-contrast negative electron beam lithography resist with dual-tone behaviour. *J. Mater. Chem. C* **1**, 1392 (2013). DOI: 10.1039/c2tc00148a.

Este artículo presenta el desarrollo y los resultados obtenidos con el copolímero P(HEMA-co-MAAEMA), desarrollado inicialmente como posible candidato para ser utilizado como MIP. Este material se empleó como resina de EBL, mostrando un dosis umbral de entrecruzamiento muy baja ($0,5 \mu\text{C cm}^{-2}$), es decir, exhibiendo una sensibilidad muy alta al haz de electrones. Los motivos entrecruzados mostraron buena adherencia a sustratos de silicio sin tratamientos ni pasos adicionales, demostrando ser útil como máscara tanto en ataque húmedo (HNA) como en seco (RIE con SF_6). Se determinó un valor de 1,2 para el contraste, es decir, un valor bajo que posibilita la fabricación de estructuras de contornos suaves mediante litografía 3D. La resina entrecruzada demostró ser ópticamente transparente, exhibiendo PL y un comportamiento dual dependiente de la dosis de electrones aplicada.

La **contribución del autor de esta Tesis** fue la fabricación con EBL y procesado de todas las muestras, la determinación de propiedades como la sensibilidad, la resolución y el contraste, el estudio de la resistencia y selectividad al ataque, la caracterización topográfica y óptica, y el estudio del comportamiento dual en función de la dosis. El descubrimiento del comportamiento dual fue clave para el estudio del material MIP desarrollado posteriormente.

- S. Carrasco, V. Canalejas-Tejero, F. Navarro-Villoslada, C.A. Barrios, and M.C. Moreno-Bondi, Cross-linkable linear copolymer with double functionality: resist for electron beam nanolithography and molecular imprinting. *J. Mater. Chem. C* **2**, 1400 (2014). DOI: 10.1039/c3tc31499e.

Este trabajo expone la primera demostración de un MIP nanoestructurado mediante EBL. Para ello se desarrolló el copolímero lineal P(MAA-co-MAAEMA). Este material presenta también un comportamiento dual en función de la dosis aplicada, empleándose el intervalo positivo para fabricar MIPs. La mezcla fue desarrollada para emplear la molécula fluorescente R123 como analito, estudiando la capacidad de reconocimiento y la sensibilidad mediante microscopía confocal de fluorescencia, así como la selectividad, reincubando muestras con compuestos estructuralmente análogos.

La **contribución realizada por el autor de esta Tesis** estuvo en la misma línea que la realizada durante el trabajo con el copolímero P(HEMA-co-MAAEMA): optimización y fabricación de micro/nano-estructuras en películas precursoras de MIPs mediante escritura directa con EBL y fotolitografía. La diferencia principal aquí fue la presencia de la molécula utilizada como plantilla (Rodamina 123) en las disoluciones de pre-polimerización, lo cual obligó a considerar el efecto de la energía incidente (de los electrones, en el caso de EBL, o los fotones, en el caso de fotolitografía) sobre la misma.

- V. Canalejas-Tejero, S. Herranz, A. Bellingham, M.C. Moreno-Bondi, and C.A. Barrios, Passivated aluminum nanohole arrays for label-free biosensing applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 1005 (2014). DOI: 10.1021/am404509f.

Esta publicación recoge los resultados más relevantes derivados del desarrollo de biosensores refractométricos basados en redes de nanoagujeros en aluminio sobre sustratos de vidrio. En el artículo se detalla el proceso que pasivación de la superficie de aluminio que permitió resistir a los medios acuosos empleados en los experimentos señalados, basados en la biodetección sin marcado de biotina como prueba de concepto.

El **trabajo llevado a cabo por el autor de esta Tesis** consistió en la fabricación de todos los dispositivos mediante EBL, su procesado, pasivación y caracterización, con todo el trabajo previo y estudios que conllevaron. El estudio del efecto de la pasivación con plasma de oxígeno y el descubrimiento de su capacidad para proteger eficazmente la superficie de aluminio fueron clave para desarrollar los biosensores plasmónicos de esta Tesis. De esta forma, se optimizó la fabricación de las estructuras, se determinó la sensibilidad al índice de refracción volumétrica y superficial de los dispositivos y su resistencia a diferentes tampones acuosos, se realizó un extenso estudio abordando la pasivación efectiva de las muestras, y los dispositivos fueron caracterizados ópticamente durante todos los experimentos.

- C.A. Barrios, V. Canalejas-Tejero, S. Herranz, M.C. Moreno-Bondi, M. Avella-Oliver, R. Puchades, and A. Maquieira, Aluminum Nanohole Arrays Fabricated on Polycarbonate for Compact Disc-Based Label-Free Optical Biosensing. *Plasmonics* **9**, 645 (2014). DOI: 10.1007/s11468-014-9676-5.

En la misma línea que el artículo sobre biosensores refractométricos basados en redes de nanoagujeros en aluminio sobre sustratos de vidrio, éste expone un trabajo similar con la novedad de que los sustratos empleados fueron trozos de policarbonato provenientes de CDs. Los procesos de micro y nanofabricación usados fueron adaptados y optimizados para hacerlos compatibles con el policarbonato. Mediante un experimento de reconocimiento competitivo de biotina usando conjugados dextrano-lipasa inmovilizados sobre la superficie metálica del transductor, fue

demostrada la viabilidad de estos dispositivos como biosensores plasmónicos sin marcado.

El autor de esta Tesis adaptó y optimizó la tecnología desarrollada sobre sustratos de vidrio a sustratos de policarbonato. Caracterizó los sensores de nanoagujeros fabricados, realizó experimentos de resistencia química, determinó la sensibilidad superficial y volumétrica, y colaboró en el desarrollo de los experimentos de biodetección. El estudio para adaptar las condiciones químicas y térmicas de procesado, así como la pasivación con plasma de oxígeno, fueron fundamentales para lograr con éxito la demostración de biosensores plasmónicos sobre policarbonato de CDs.

- C.A. Barrios and V. Canalejas-Tejero, Compact discs as versatile cost-effective substrates for releasable nanopatterned aluminium films. *Nanoscale* **7**, 3435 (2015). DOI: 10.1039/c4nr06271j.

Este trabajo presenta los resultados que demuestran que el policarbonato proveniente de CDs es un material que permite la nanoestructuración de películas de aluminio depositadas sobre él, así como el despegue y transferencia posterior empleando cinta adhesiva Scotch. El proceso de transferencia se llevó a cabo de manera sencilla y sin haber aplicado con anterioridad ninguna capa anti-adherente durante el procesado de las muestras, simplemente pegando la cinta sobre la muestra, aplicando presión con un dedo y procediendo al despegue en condiciones ambientales. Mediante diversas pruebas se indagaron las causas que permiten el a priori inesperado despegue de la película metálica (descubierto por el Dr. Carlos Angulo Barrios), pues el aluminio evaporado normalmente se adhiere muy bien a gran variedad de superficies, entre las que se cuentan los polímeros.

Las redes de nanoagujeros en aluminio transferidas a cinta adhesiva mostraron un buen comportamiento óptico y plasmónico. Esta técnica posibilita la creación de dispositivos con nuevas características y aplicaciones con las que no cuentan los dispositivos sobre sustrato rígido.

La **contribución del autor de esta Tesis** fue la de fabricar las redes de nanoagujeros de Al sobre policarbonato que se utilizaron en las pruebas de transferencia, contribuir al estudio de las circunstancias que permiten la transferencia de la película de aluminio, caracterizar con AFM las muestras despegadas, y determinar la sensibilidad volumétrica al índice de refracción de una red de nanoagujeros transferida a cinta adhesiva con disoluciones de distinta concentración de ácido cítrico.

- V. Canalejas-Tejero, A. López, R. Casquel, M. Holgado, and C.A. Barrios, Sensitive metal layer-assisted guided-mode resonance SU8 nanopillar array for label-free optical biosensing. *Sensors Actuators B Chem.* **226**, 204 (2016). DOI: 10.1016/j.snb.2015.11.114.

En este artículo se detallan los resultados más relevantes de la aplicación en biodetección sin marcado de una novedosa arquitectura basada en una red de nanopilares de SU-8 sobre aluminio que exhibe el efecto MaGMR. Los habitualmente negativos efectos de proximidad de la técnica EBL se utilizaron para crear nanopilares ensanchados en la base y unidos por una película entrecruzada de SU-8. Esta estructura presenta el efecto MaGMR bajo incidencia perpendicular de luz visible, permitiendo

monitorizar eventos de adsorción superficial y detección de biomoléculas mediante medidas de reflectancia. En concreto, se realizaron medidas de adsorción de agua, moléculas de HEPES y de BSA. Como figura de mérito para evaluar la calidad y sensibilidad de la medida se definió el cociente entre la sensibilidad superficial y la anchura de la resonancia espectral monitorizada y relacionada con el efecto MaGMR, obteniendo un aumento de dos órdenes de magnitud ($0,127 \text{ nm}^{-1}$ frente $0,009 \text{ nm}^{-1}$) en comparación con otras estructuras de nanopilares de SU-8.

El autor de esta Tesis desarrolló y optimizó la fabricación y procesado de la estructura de nanopilares de SU-8, fabricó y caracterizó todos los dispositivos con SEM, midió la respuesta espectral de las muestras y las derivadas de los experimentos de detección con un espectrómetro FT-VIS-IR, llevó a cabo los experimentos de adsorción superficial de agua y HEPES, y colaboró en el desarrollo de los experimentos de biodetección de BSA. Además, realizó el estudio de la influencia de depositar aluminio sobre la estructura, y obtuvo la arquitectura basada en nanopilares huecos de aluminio/óxido de aluminio. El desarrollo y el estudio de la nanoestructura creada mediante escritura con haz de electrones desenfocado fueron de vital importancia para la consecución de los resultados obtenidos.

2. Otras publicaciones relacionadas con la Tesis.

- J.L. Urraca, C.A. Barrios, V. Canalejas-Tejero, G. Orellana, and M.C. Moreno-Bondi, Molecular recognition with nanostructures fabricated by photopolymerization within metallic subwavelength apertures. *Nanoscale* **6**, 8656 (2014). DOI: 10.1039/c4nr01129e.

Este trabajo reporta la primera demostración de un MIP con resolución lateral submicrométrica fabricado mediante fotopolimerización local utilizando para ello nanoagujeros realizados en aluminio, con gran capacidad para confinar el campo óptico. Anteriormente se habían fabricado estructuras MIP con resolución lateral micrométrica con técnicas micro-estereo litográficas, UV y de campo evanescente, por ejemplo. Mediante nanoimpresión se habían logrado estructuras submicrométricas, sin embargo, al requerir contacto, esta técnica puede dar lugar a contaminación de la superficie MIP, mientras que la fotopolimerización local empleada en este trabajo es una técnica de no contacto.

El tamaño de las nanoestructuras fue controlado con la dosis aplicada con un láser de 532 nm. Como molécula plantilla fluorescente se usó R123, con la que se comprobó la capacidad de reconocimiento molecular por parte de las nanoestructuras. El proceso fue evaluado con FLIM con medidas de un sólo fotón. Las medidas de vida media mostraron la afinidad de la plantilla fluorescente en etapas de reincubación. La selectividad se comprobó con moléculas estructuralmente análogas a R123. Este método de fabricación ofrece grandes posibilidades para producir en masa matrices de sensores biomiméticos selectivos, de bajo coste y tamaño muy reducido con aplicaciones en control ambiental y análisis clínicos o de comida, por ejemplo.

El autor de la Tesis contibuyó con la fabricación y caracterización topográfica de las redes de nanoagujeros en aluminio sobre vidrio empleadas en este trabajo.

- C.A. Barrios, V. Canalejas-Tejero, S. Herranz, J. Urraca, M.C. Moreno-Bondi, M. Avella-Oliver, Á. Maquieira, and R. Puchades, Aluminum Nanoholes for Optical Biosensing. *Biosensors* **5**, 417 (2015). DOI: 10.3390/bios5030417.

Este artículo repasa los resultados más relevantes aplicados a biodetección óptica obtenidos con arquitecturas compuestas por redes de nanoagujeros en aluminio desarrolladas durante esta Tesis. Tanto como centros de dispersión de luz eficientes para la excitación de SPs o como guías de onda revestidas de metal, estas estructuras son capaces de crear campos ópticos fuertemente localizados que pueden interactuar con biomoléculas y/o nanopartículas. Para ello se utilizó aluminio, metal con buenas propiedades ópticas y eléctricas para estos fines, fácil de obtener y procesar, muy abundante y mucho más económico que el oro y la plata, metales habitualmente empleados para estos fines debido a que el aluminio presenta problemas de oxidación y corrosión en medios acuosos habituales en biodetección. Estos inconvenientes pueden ser altamente minimizados mediante un proceso de pasivación, desarrollado durante esta Tesis, que permite el empleo del aluminio. El resumen de resultados contiene los obtenidos con biosensores plasmónicos fabricados sobre vidrio y policarbonato, con nanoagujeros individuales usados como guías ópticas para fabricar nanoMIPs, y con películas de aluminio nanoestructuradas transferidas a cinta adhesiva.

- C.A. Barrios and V. Canalejas-Tejero, Light coupling in a Scotch tape waveguide via an integrated metal diffraction grating. *Opt. Lett.* **41**, 301 (2016). DOI: 10.1364/OL.41.000301.

Esta publicación recoge la primera demostración de una interconexión óptica con una guía de onda flexible realizada con cinta adhesiva de uso común. Embebidos en la cinta se encuentran, alejados, los elementos de acoplamiento óptico, que son redes de nanoagujeros en aluminio despegadas de sustratos de policarbonato. Estos elementos de difracción permiten que el acoplamiento y desacoplamiento en la cinta en la que están integrados de ciertas longitudes de onda, únicamente. Las pérdidas ópticas y la eficiencia de acoplamiento fueron evaluadas. Los resultados obtenidos mostraron ser prometedores debido a la versatilidad y bajo coste de los materiales empleados, para el desarrollo de interconexiones ópticas de corto alcance listas para usar y a coste reducido.

El autor de esta Tesis contribuyó con la fabricación y procesado de los dispositivos (redes de nanoagujeros de aluminio sobre policarbonato) destinados a ser despegados con cinta adhesiva.

- C.A. Barrios and V. Canalejas-Tejero, Micro-Shaping of Nanopatterned Surfaces by Electron Beam Irradiation. *Micromachines* **7**, 66 (2016). DOI: 10.3390/mi7040066.

Este artículo detalla el proceso por el que la superficie de un sustrato de policarbonato proveniente de un CD, sobre el que ya existe una película metálica nanoestructurada, es microestructurada mediante EBL. La microestructuración proviene del entrecruzamiento y encogimiento del policarbonato debido al impacto del haz de electrones, creando perfiles curvados que dependen de las características del patrón expuesto y de la dosis empleada de manera similar a la litografía 3D.

Como ejemplo, se fabricaron redes 2D de microlentes conformalmente recubiertas de una red de nanoagujeros en aluminio. Además, se demostró que transferir toda la arquitectura metálica micro y nanoestructurada a cinta adhesiva flexible es factible. Los resultados obtenidos abren la puerta a la aplicación de esta técnica a gran variedad de materiales y metales, resultando en una opción muy atractiva de microestructuración y transferencia de estructuras para su implementación en micro/nanosistemas y dispositivos multifuncionales.

El autor de esta Tesis fabricó y procesó las muestras de Al sobre policarbonato, inicialmente nanoestructuradas con redes de nanoagujeros, y posteriormente microestructuradas (micro-deformadas), esto último mediante exposición directa al haz de electrones del equipo EBL sin mediar etapa alguna. También estudió las dimensiones máximas que permite este método de microfabricación sin alterar la integridad de la película metálica. Además, llevó a cabo la caracterización con SEM y otros equipos, y caracterizó ópticamente los dispositivos.

- C. Barrios and V. Canalejas-Tejero, An analysis of the surface-normal coupling efficiency of a metal grating coupler embedded in a Scotch tape optical waveguide. *Opt. Commun.* **382**, 477-484 (2017). DOI: 10.1016/j.optcom.2016.08.037.

Este artículo recoge el trabajo de optimización de las interconexiones ópticas basadas en redes de nanoagujeros en aluminio despegadas con cinta adhesiva. La eficiencia de acoplamiento se mejoró notablemente empleando nanoestructuras diferentes a las redes 2D de nanoagujeros fabricadas durante esta Tesis, que ofrecen únicamente una eficiencia de acoplamiento del 3,6% para cada una de las cuatro direcciones principales. Con este objetivo se extendió la investigación a estructuras de tiras de aluminio y surcos realizados en policarbonato, conformando una red 1D de tiras y surcos, debido a que la difracción existe en un solo eje. Empleando un láser de estado sólido linealmente polarizado de 635 nm se caracterizaron las pérdidas de la guía óptica, la eficiencia de acoplamiento, la alineación del haz y la tolerancia del ángulo de incidencia. La eficiencia máxima de acoplamiento medida fue del 20% para polarización TM a 635 nm, es decir, un 80% de la calculada, aproximadamente, para incidencia normal. Cuando el ángulo de incidencia es de 7° , la potencia acoplada para la polarización TM aumenta un 40% respecto a la incidencia normal, representando una eficiencia del 28%.

La contribución del autor de esta Tesis consistió en el desarrollo y optimización de las redes 1D de nanotiras de aluminio, de 500 nm de periodo y 250 nm de anchura de nanotira, fabricadas de manera similar a las redes de nanoagujeros. La optimización de la fabricación conllevó la aplicación de cierto grado de desenfoque durante la exposición con EBL para obtener la anchura de surco deseada (resina positiva), estrategia utilizada con anterioridad para la fabricación de redes de nanopilares de SU-8. Además, la transferencia exitosa de las redes 1D a cinta adhesiva requirió un elevado número de experimentos debido a que el despegue es prácticamente nulo, al contrario que en el caso de redes de nanoagujeros, porque la dosis aplicada es considerablemente superior. Finalmente, este problema fue sorteado aplicando plasma de oxígeno en el mismo equipo ICP usado para transferir las tiras de aluminio, proceso que permitió despegar la red 1D con la misma facilidad que las redes de nanoagujeros.

3. Congresos.

- Título: Ultrasensitive Non-Chemically Amplified Negative-Tone Electron Beam Lithography Resist.
Autores: **V. Canalejas Tejero**; S. Carrasco; F. Navarro; M. C. Cápel; J. L. García Fierro; M. C. Moreno Bondi; C. Angulo Barrios.
Modalidad: Póster. Nombre del congreso: *Trends in Nanotechnology International Conference* (TNT2012).
Organizado en Madrid, España, 09/2012, por la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales (ETSII Madrid – UPM).
- Título: Biosensado Con Redes De Nanoagujeros En Óxido De Aluminio.
Autores: M. Avella-Oliver; M. J. Bañuls; C. Angulo Barrios; **V. Canalejas Tejero**; R. Puchades; A. Maquieira.
Modalidad: Póster.
Nombre del congreso: *VIII Workshop on Sensors and Molecular Recognition*.
Organizado en Burjassot, España, 07/2014, por el Centro Mixto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (Universitat de Valencia).
- Título: Nanostructuring molecularly imprinted polymers for optical sensing applications.
Autores: M. C. Moreno Bondi; S. Carrasco; E. Benito Peña; J. Urraca; F. Navarro; G. Orellana; A. B. Descalzo; **V. Canalejas Tejero**; C. Angulo Barrios; D. R. Walt.
Modalidad: Ponencia.
Nombre del congreso: *VII WORKSHOP sobre “Nanociencia y Nanotecnología Analíticas”*.
Organizado en Salamanca, España, 07/2015, por la Universidad de Salamanca.
- Título: Molecularly imprinted polymers: New analytical tools for separation and sensing applications.
Autores: M. C. Moreno Bondi; S. Carrasco; E. Benito Peña; J. Urraca; F. Navarro Villoslada; G. Orellana; A. Descalzo; **V. Canalejas Tejero**; C. Angulo Barrios; D. R. Walt; A. Baeza.
Modalidad: Ponencia.
Nombre del congreso: *International Conference Materials Science in the Age of Sustainability*.
Organizado en La Habana, Cuba, 06/2015, por la Universidad de La Habana.
- Título: MIP-based optical sensing strategies: pros and cons.
Autores: S. Carrasco; E. Benito Peña; **V. Canalejas Tejero**; F. Navarro Villoslada; D. R. Walt; C. Angulo Barrios; M. C. Moreno Bondi.
Modalidad: Conferencia.
Nombre del congreso: *8th International Workshop on Molecular Imprinting*.
Organizado en Zhenjiang, China, 09/2014, por la Universidad de Jiangsu.
- Título: Light, MIPs and Nanotechnology: A Sound Medley to Tackle Analytical Challenges.
Autores: A. B. Descalzo; J. L. Urraca; **V. Canalejas Tejero**; C. Angulo Barrios; M. C. Moreno Bondi.
Modalidad: Ponencia.

Nombre del congreso: *8th International Workshop on Molecular Imprinting*.
Organizado en Zhenjiang, China, 09/2014, por la Universidad de Jiangsu.

4. Patentes.

- Título: Método de obtención de una estructura de polímero de impronta molecular (MIP).

Inventores/autores/obtentores: Carlos Angulo Barrios; **Víctor Canalejas Tejero**; Sergio Carrasco Garrido; María Cruz Moreno Bondi; Fernando Navarro Villoslada.

Entidad titular: Universidad Complutense de Madrid (50%) y Universidad Politécnica de Madrid (50%).

Número de solicitud: P201330947.

País de prioridad: España.

Fecha de concesión: 24/06/2013. Plenamente concedida el 14/08/2015.

VIII. Bibliografía.

- ¹ J. Noh, H.C. Kim, and T.D. Chung, Biosensors in microfluidic chips. *Top. Curr. Chem.* **304**, 117 (2011). DOI: 10.1007/128_2011_143.
- ² B.T. Cunningham, Label-Free Biosensors. *Label-Free Biosensors* (Cambridge University Press, Cambridge, 2009). DOI: 10.1017/CBO9780511626531.
- ³ J.H.T. Luong, K.B. Male, and J.D. Glennon, Biosensor technology: technology push versus market pull. *Biotechnol. Adv.* **26**, 492 (2008). DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.05.007.
- ⁴ C. Ziegler and W. Göpel, Biosensor development. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 585 (1998). DOI: 10.1016/S1367-5931(98)80087-2.
- ⁵ R.L. Rich and D.G. Myszka, Survey of the year 2006 commercial optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* **20**, 300 (2007). DOI: 10.1002/jmr.862.
- ⁶ M. Malmqvist, Biospecific interaction analysis using biosensor technology. *Nature* **361**, 186 (1993). DOI: 10.1038/361186a0.
- ⁷ K.E. Sapsford, C. Bradburne, J.B. Delehanty, and I.L. Medintz, Sensors for detecting biological agents. *Mater. Today* **11**, 38 (2008). DOI: 10.1016/S1369-7021(08)70018-X.
- ⁸ F.S. Ligler, K.E. Sapsford, J.P. Golden, L.C. Shriver-Laker, C.R. Taitt, M.A. Dyer, S. Barone, and C.J. Myatt, The Array Biosensor: Portable, Automated Systems. *Anal. Sci.* **23**, 5 (2007). DOI: 10.2116/analsci.23.5.
- ⁹ L.M. Bonanno and L.A. DeLouise, Whole blood optical biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 444 (2007). DOI: 10.1016/j.bios.2007.05.008.
- ¹⁰ K.E. Shafer-Peltier, C.L. Haynes, M.R. Glucksberg, and R.P. Van Duyne, Toward a glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 588 (2003). DOI: 10.1021/ja028255v.
- ¹¹ F. Zhang, X. Wang, S. Ai, Z. Sun, Q. Wan, Z. Zhu, Y. Xian, L. Jin, and K. Yamamoto, Immobilization of uricase on ZnO nanorods for a reagentless uric acid biosensor. *Anal. Chim. Acta* **519**, 155 (2004). DOI: 10.1016/j.aca.2004.05.070.
- ¹² S.K. Arya, M. Datta, and B.D. Malhotra, Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 1083 (2008). DOI: 10.1016/j.bios.2007.10.018.
- ¹³ A.M. Rossi, L. Wang, V. Reipa, and T.E. Murphy, Porous silicon biosensor for detection of viruses. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 741 (2007). DOI: 10.1016/j.bios.2007.06.004.
- ¹⁴ A.-C. Chang, J.B. Gillespie, and M.B. Tabacco, Enhanced Detection of Live Bacteria Using a Dendrimer Thin Film in an Optical Biosensor. *Anal. Chem.* **73**, 467 (2001). DOI: 10.1021/ac000460a.
- ¹⁵ J. Mertens, C. Rogero, M. Calleja, D. Ramos, J.A. Martín-Gago, C. Briones, and J. Tamayo, Label-free detection of DNA hybridization based on hydration-induced tension in nucleic acid films. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 301 (2008). DOI: 10.1038/nnano.2008.91.
- ¹⁶ A.K. Wanekaya, W. Chen, and A. Mulchandani, Recent biosensing developments in environmental security. *J. Environ. Monit.* **10**, 703 (2008). DOI: 10.1039/b806830p.
- ¹⁷ G. Liu and Y. Lin, Biosensor based on self-assembling acetylcholinesterase on carbon nanotubes for flow injection/amperometric detection of organophosphate pesticides and nerve agents. *Anal. Chem.* **78**, 835 (2006). DOI: 10.1021/ac051559q.
- ¹⁸ I. Palchetti, S. Laschi, and M. Mascini, Electrochemical biosensor technology: application to pesticide detection. *Methods Mol. Biol.* **504**, 115 (2009). DOI: 10.1007/978-1-60327-569-9_8.
- ¹⁹ F.S. Ligler, C.R. Taitt, L.C. Shriver-Lake, K.E. Sapsford, Y. Shubin, and J.P. Golden, Array biosensor for detection of toxins. *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, 469 (2003). DOI: 10.1007/s00216-003-1992-0.
- ²⁰ E.V.A. Gustavsson, P. Bjurling, J. Degelaen, and Å. Sternesjö, Analysis of β -Lactam Antibiotics Using a Microbial Receptor Protein-based Biosensor Assay. *Food Agric. Immunol.* **14**, 121 (2010). DOI: 10.1080/09540100220145142.

- ²¹ A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, and A. Ramanavicius, Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibodies against human growth hormone. *Analyst* **134**, 2051 (2009). DOI: 10.1039/b907315a.
- ²² M.H. Mooney, A.A. Bergwerff, J. a van Meeuwen, P.B. Lippa, and C.T. Elliott, Biosensor-based detection of reduced sex hormone-binding globulin binding capacities in response to growth-promoter administrations. *Anal. Chim. Acta* **637**, 235 (2009). DOI: 10.1016/j.aca.2008.08.024.
- ²³ L.F. Capitán-Vallvey, E. Arroyo, C. Berenguer, M.D. Fernández-Ramos, and R. Avidad, Single-use optical sensor for the determination of iron in water and white wines. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **369**, 139 (2001). DOI: 10.1007/s002160000615.
- ²⁴ D. Bhatta, a a Michel, M. Marti Villalba, G.D. Emmerson, I.J.G. Sparrow, E. a Perkins, M.B. McDonnell, R.W. Ely, and G. a Cartwright, Optical microchip array biosensor for multiplexed detection of bio-hazardous agents. *Biosens. Bioelectron.* **30**, 78 (2011). DOI: 10.1016/j.bios.2011.08.031.
- ²⁵ J.G. Reynolds and B.R. Hart, Nanomaterials and their application to defense and homeland security. *JOM* **56**, 36 (2004). DOI: 10.1007/s11837-004-0270-8.
- ²⁶ D. Shankaran, K. Gobi, T. Sakai, K. Matsumoto, T. Imato, K. Toko, and N. Miura, A novel surface plasmon resonance immunosensor for 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) based on indirect competitive immunoreaction: a promising approach for on-site landmine detection. *IEEE Sens. J.* **5**, 616 (2005). DOI: 10.1109/JSEN.2005.848150.
- ²⁷ J.J. Gooding, Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends. *Anal. Chim. Acta* **559**, 137 (2006). DOI: 10.1016/j.aca.2005.12.020.
- ²⁸ C.N. LaFratta and D.R. Walt, Very high density sensing arrays. *Chem. Rev.* **108**, 614 (2008). DOI: 10.1021/cr0681142.
- ²⁹ K.M. Millan, A. Saraullo, and S.R. Mikkelsen, Voltammetric DNA Biosensor for Cystic Fibrosis Based on a Modified Carbon Paste Electrode. *Anal. Chem.* **66**, 2943 (1994). DOI: 10.1021/ac00090a023.
- ³⁰ A.A. Karyakin, E.E. Karyakina, and L. Gorton, Amperometric Biosensor for Glutamate Using Prussian Blue-Based "Artificial Peroxidase" as a Transducer for Hydrogen Peroxide. *Anal. Chem.* **72**, 1720 (2000). DOI: 10.1021/ac990801o.
- ³¹ A.J. Haes and R.P. Van Duyne, A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10596 (2002). DOI: 10.1021/ja020393x.
- ³² V.S. Lin, K. Motesharei, K.P. Dancil, M.J. Sailor, and M.R. Ghadiri, A Porous Silicon-Based Optical Interferometric Biosensor. *Science* (80-.). **278**, 840 (1997). DOI: 10.1126/science.278.5339.840.
- ³³ P.A. Rasmussen, J. Thaysen, O. Hansen, S.C. Eriksen, and A. Boisen, Optimised cantilever biosensor with piezoresistive read-out. *Ultramicroscopy* **97**, 371 (2003). DOI: 10.1016/S0304-3991(03)00063-9.
- ³⁴ S. Hosaka, T. Chiyoma, A. Ikeuchi, H. Okano, H. Sone, and T. Izumi, Possibility of a femtogram mass biosensor using a self-sensing cantilever. *Curr. Appl. Phys.* **6**, 384 (2006). DOI: 10.1016/j.cap.2005.11.024.
- ³⁵ D.R. Baselt, G.U. Lee, M. Natesan, S.W. Metzger, P.E. Sheehan, and R.J. Colton, A biosensor based on magnetoresistance technology. *Biosens. Bioelectron.* **13**, 731 (1998). DOI: 10.1016/S0956-5663(98)00037-2.
- ³⁶ Y.R. Chemla, H.L. Grossman, Y. Poon, R. McDermott, R. Stevens, M.D. Alper, and J. Clarke, Ultrasensitive magnetic biosensor for homogeneous immunoassay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14268 (2000). DOI: 10.1073/pnas.97.26.14268.
- ³⁷ X. Fan, I.M. White, S.I. Shopova, H. Zhu, J.D. Suter, and Y. Sun, Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. *Anal. Chim. Acta* **620**, 8 (2008). DOI: 10.1016/j.aca.2008.05.022.
- ³⁸ M. a Cooper, Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 515 (2002). DOI: 10.1038/nrd838.
- ³⁹ A. Otto, Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift Für Phys.* **216**, 398 (1968). DOI: 10.1007/BF01391532.

- ⁴⁰ E. Kretschmann, Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. *Zeitschrift Für Phys.* **241**, 313 (1971). DOI: 10.1007/BF01395428.
- ⁴¹ W. Lukosz and K. Tiefenthaler, Embossing technique for fabricating integrated optical components in hard inorganic waveguiding materials. *Opt. Lett.* **8**, 537 (1983). DOI: 10.1364/OL.8.000537.
- ⁴² M. Mitsushio, K. Miyashita, and M. Higo, Sensor properties and surface characterization of the metal-deposited SPR optical fiber sensors with Au, Ag, Cu, and Al. *Sensors Actuators A Phys.* **125**, 296 (2006). DOI: 10.1016/j.sna.2005.08.019.
- ⁴³ A.K. Sharma, R. Jha, and B.D. Gupta, Fiber-Optic Sensors Based on Surface Plasmon Resonance: A Comprehensive Review. *IEEE Sens. J.* **7**, 1118 (2007). DOI: 10.1109/JSEN.2007.897946.
- ⁴⁴ F.J. Garcia-Vidal, L. Martin-Moreno, T.W. Ebbesen, and L. Kuipers, Light passing through subwavelength apertures. *Rev. Mod. Phys.* **82**, 729 (2010). DOI: 10.1103/RevModPhys.82.729.
- ⁴⁵ F.A. Tanious, B. Nguyen, and W.D. Wilson, Biosensor-surface plasmon resonance methods for quantitative analysis of biomolecular interactions. *Methods Cell Biol.* **84**, 53 (2008). DOI: 10.1016/S0091-679X(07)84003-9.
- ⁴⁶ S. Roh, T. Chung, and B. Lee, Overview of the characteristics of micro- and nano-structured surface plasmon resonance sensors. *Sensors (Basel)*. **11**, 1565 (2011). DOI: 10.3390/s110201565.
- ⁴⁷ S. Rodrigo, F. García-Vidal, and L. Martín-Moreno, Influence of material properties on extraordinary optical transmission through hole arrays. *Phys. Rev. B* **77**, 075401 (2008). DOI: 10.1103/PhysRevB.77.075401.
- ⁴⁸ P. West, S. Ishii, G. Naik, N.K. Emani, V.M. Shalae, and A. Boltasseva, Searching for better plasmonic materials. *Laser Photon. Rev.* **4**, 795 (2010). DOI: 10.1002/lpor.200900055.
- ⁴⁹ M.A. Ordal, L.L. Long, R.J. Bell, S.E. Bell, R.R. Bell, R.W. Alexander, Jr., and C.A. Ward, Optical properties of the metals Al, Co, Cu, Au, Fe, Pb, Ni, Pd, Pt, Ag, Ti, and W in the infrared and far infrared. *Appl. Opt.* **22**, 1099 (1983). DOI: 10.1364/AO.22.001099.
- ⁵⁰ H. Im, S.H. Lee, N.J. Wittenberg, T.W. Johnson, N.C. Lindquist, P. Nagpal, D.J. Norris, and S.-H. Oh, Template-stripped smooth Ag nanohole arrays with silica shells for surface plasmon resonance biosensing. *ACS Nano* **5**, 6244 (2011). DOI: 10.1021/nn202013v.
- ⁵¹ A.G. Brolo, R. Gordon, B. Leathem, and K.L. Kavanagh, Surface plasmon sensor based on the enhanced light transmission through arrays of nanoholes in gold films. *Langmuir* **20**, 4813 (2004). DOI: 10.1021/la0493621.
- ⁵² N.C. Lindquist, P. Nagpal, K.M. McPeak, D.J. Norris, and S.-H. Oh, Engineering metallic nanostructures for plasmonics and nanophotonics. *Rep. Prog. Phys.* **75**, 036501 (2012). DOI: 10.1088/0034-4885/75/3/036501.
- ⁵³ G.H. Chan, J. Zhao, G.C. Schatz, and R.P. Van Duyne, Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Aluminum Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **112**, 13958 (2008). DOI: 10.1021/jp804088z.
- ⁵⁴ M. Mitsushio, K. Watanabe, Y. Abe, and M. Higo, Sensor properties and surface characterization of aluminum-deposited SPR optical fibers. *Sensors Actuators A Phys.* **163**, 1 (2010). DOI: 10.1016/j.sna.2010.07.003.
- ⁵⁵ Gold, Silver, Precious & Industrial Metals Prices—Bloomberg. <http://www.bloomberg.com/markets/commodities/futures/metals> (consultado el 20 de septiembre de 2013). (n.d.).
- ⁵⁶ C. Langhammer, M. Schwind, B. Kasemo, and I. Zorić, Localized surface plasmon resonances in aluminum nanodisks. *Nano Lett.* **8**, 1461 (2008). DOI: 10.1021/nl080453i.
- ⁵⁷ W. Su, G. Zheng, and X. Li, Design of a highly sensitive surface plasmon resonance sensor using aluminum-based diffraction grating. *Opt. Commun.* **285**, 4603 (2012). DOI: 10.1016/j.optcom.2012.07.026.
- ⁵⁸ S. Yokogawa, S.P. Burgos, and H.A. Atwater, Plasmonic color filters for CMOS image sensor applications. *Nano Lett.* **12**, 4349 (2012). DOI: 10.1021/nl302110z.

- ⁵⁹ N.N. Greenwood and A. Earnshaw, Chemistry of the Elements. in edited by Elsevier, 2nd ed. (1997).
- ⁶⁰ Q.-C. Sun, Y. Ding, S.M. Goodman, H.H. Funke, and P. Nagpal, Copper plasmonics and catalysis: role of electron-phonon interactions in dephasing localized surface plasmons. *Nanoscale* **6**, 12450 (2014). DOI: 10.1039/c4nr04719b.
- ⁶¹ S. Morais, J. Tamarit-López, J. Carrascosa, R. Puchades, and A. Maquieira, Analytical prospect of compact disk technology in immunosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 2837 (2008). DOI: 10.1007/s00216-008-2224-4.
- ⁶² S. Morais, L. a Tortajada-Genaro, T. Arnandis-Chover, R. Puchades, and A. Maquieira, Multiplexed microimmunoassays on a digital versatile disk. *Anal. Chem.* **81**, 5646 (2009). DOI: 10.1021/ac900359d.
- ⁶³ J. Tamarit-López, S. Morais, R. Puchades, and Á. Maquieira, Direct hapten-linked multiplexed immunoassays on polycarbonate surface. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 2694 (2011). DOI: 10.1016/j.bios.2010.08.066.
- ⁶⁴ J.S. Erickson and F.S. Ligler, Analytical chemistry: Home diagnostics to music. *Nature* **456**, 178 (2008). DOI: 10.1038/456178a.
- ⁶⁵ M.-J. Bañuls, V. Gonzalez-Pedro, R. Puchades, and A. Maquieira, PMMA isocyanate-modified digital discs as a support for oligonucleotide-based assays. *Bioconjug. Chem.* **18**, 1408 (n.d.). DOI: 10.1021/bc700194n.
- ⁶⁶ W. Challener, A surface plasmon resonance gas sensor in a “compact disc” format. *Sensors Actuators B Chem.* **56**, 254 (1999). DOI: 10.1016/S0925-4005(99)00194-X.
- ⁶⁷ X. Dou, B.M. Phillips, P.-Y. Chung, and P. Jiang, High surface plasmon resonance sensitivity enabled by optical disks. *Opt. Lett.* **37**, 3681 (2012). DOI: 10.1364/OL.37.003681.
- ⁶⁸ M.C. McAlpine, H. Ahmad, D. Wang, and J.R. Heath, Highly ordered nanowire arrays on plastic substrates for ultrasensitive flexible chemical sensors. *Nat. Mater.* **6**, 379 (2007). DOI: 10.1038/nmat1891.
- ⁶⁹ H.C. Ko, M.P. Stoykovich, J. Song, V. Malyarchuk, W.M. Choi, C.-J. Yu, J.B. Geddes, J. Xiao, S. Wang, Y. Huang, and J.A. Rogers, A hemispherical electronic eye camera based on compressible silicon optoelectronics. *Nature* **454**, 748 (2008). DOI: 10.1038/nature07113.
- ⁷⁰ I.D. Block, L.L. Chan, and B.T. Cunningham, Photonic crystal optical biosensor incorporating structured low-index porous dielectric. *Sensors Actuators B Chem.* **120**, 187 (2006). DOI: 10.1016/j.snb.2006.02.006.
- ⁷¹ C.J. Choi, I.D. Block, B. Bole, D. Dralle, and B.T. Cunningham, Label-Free Photonic Crystal Biosensor Integrated Microfluidic Chip for Determination of Kinetic Reaction Rate Constants. *IEEE Sens. J.* **9**, 1697 (2009). DOI: 10.1109/JSEN.2009.2030666.
- ⁷² M. El Beheiry, V. Liu, S. Fan, and O. Levi, Sensitivity enhancement in photonic crystal slab biosensors. *Opt. Express* **18**, 22702 (2010). DOI: 10.1364/OE.18.022702.
- ⁷³ S.-F. Lin, T.-J. Ding, J.-T. Liu, C.-C. Lee, T.-H. Yang, W.-Y. Chen, and J.-Y. Chang, A guided mode resonance aptasensor for thrombin detection. *Sensors (Basel)*. **11**, 8953 (2011). DOI: 10.3390/s110908953.
- ⁷⁴ S.-F. Lin, C.-M. Wang, T.-J. Ding, Y.-L. Tsai, T.-H. Yang, W.-Y. Chen, and J.-Y. Chang, Sensitive metal layer assisted guided mode resonance biosensor with a spectrum inversed response and strong asymmetric resonance field distribution. *Opt. Express* **20**, 14584 (2012). DOI: 10.1364/OE.20.014584.
- ⁷⁵ J. Davis, D. Huw Vaughan, and M.F. Cardosi, Elements of biosensor construction. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 1030 (1995). DOI: 10.1016/0141-0229(95)00013-5.
- ⁷⁶ K. Haupt, Creating a good impression. *Nat. Biotechnol.* **20**, 884 (2002). DOI: 10.1038/nbt0902-884.
- ⁷⁷ M.C.M. Moreno-Bondi, F. Navarro-villoslada, E. Benito-peña, J.L. Urraca, and E. Benito-Pena, Molecularly Imprinted Polymers as Selective Recognition Elements in Optical Sensing. *Curr. Anal. Chem.* **4**, 316 (2008). DOI: 10.2174/157341108785914925.

- ⁷⁸ G. Guan, B. Liu, Z. Wang, and Z. Zhang, Imprinting of molecular recognition sites on nanostructures and its applications in chemosensors. *Sensors* **8**, 8291 (2008). DOI: 10.3390/s8128291.
- ⁷⁹ O.Y.F. Henry, D.C. Cullen, and S.A. Piletsky, Optical interrogation of molecularly imprinted polymers and development of MIP sensors: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, 947 (2005). DOI: 10.1007/s00216-005-3255-8.
- ⁸⁰ K. Haupt, Peer Reviewed: Molecularly Imprinted Polymers: The Next Generation. *Anal. Chem.* **75**, 376 A (2003). DOI: 10.1021/ac031385h.
- ⁸¹ X. Hu, Q. An, G. Li, S. Tao, and J. Liu, Imprinted photonic polymers for chiral recognition. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 8145 (2006). DOI: 10.1002/anie.200601849.
- ⁸² R.B. Pernites, S.K. Venkata, B.D.B. Tiu, A.C.C. Yago, and R.C. Advincula, Nanostructured, molecularly imprinted, and template-patterned polythiophenes for chiral sensing and differentiation. *Small* **8**, 1669 (2012). DOI: 10.1002/smll.201102331.
- ⁸³ L. Chen, S. Xu, and J. Li, Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 2922 (2011). DOI: 10.1039/c0cs00084a.
- ⁸⁴ A. Servant, K. Haupt, and M. Resmini, Tuning molecular recognition in water-soluble nanogels with enzyme-like activity for the kemp elimination. *Chemistry* **17**, 11052 (2011). DOI: 10.1002/chem.201002747.
- ⁸⁵ P. Çakir, A. Cutivet, M. Resmini, B.T.S. Bui, and K. Haupt, Protein-Size Molecularly Imprinted Polymer Nanogels as Synthetic Antibodies, by Localized Polymerization with Multi-initiators. *Adv. Mater.* **25**, 1048 (2013). DOI: 10.1002/adma.201203400.
- ⁸⁶ E. Rodríguez, F. Navarro-Villoslada, E. Benito-Peña, M.D. Marazuela, and M.C. Moreno-Bondi, Multiresidue determination of ultratrace levels of fluoroquinolone antimicrobials in drinking and aquaculture water samples by automated online molecularly imprinted solid phase extraction and liquid chromatography. *Anal. Chem.* **83**, 2046 (2011). DOI: 10.1021/ac102839n.
- ⁸⁷ A.B. Descalzo, C. Somoza, M.C. Moreno-Bondi, and G. Orellana, Luminescent core-shell imprinted nanoparticles engineered for targeted Förster resonance energy transfer-based sensing. *Anal. Chem.* **85**, 5316 (2013). DOI: 10.1021/ac400520s.
- ⁸⁸ C. Alvarez-Lorenzo and A. Concheiro, editors, *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers. Handbook of Molecularly Imprinted Polymers* (Smithers Rapra Technology Ltd., Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, UK, 2013), p. 24.
- ⁸⁹ S. Guillon, R. Lemaire, A.V. Linares, K. Haupt, and C. Ayela, Single step patterning of molecularly imprinted polymers for large scale fabrication of microbiochips. *Lab Chip* **9**, 2987 (2009). DOI: 10.1039/b905608d.
- ⁹⁰ P.G. Conrad, P.T. Nishimura, D. Aherne, B.J. Schwartz, D. Wu, N. Fang, X. Zhang, M.J. Roberts, and K.J. Shea, Functional Molecularly Imprinted Polymer Microstructures Fabricated Using Microstereolithography. *Adv. Mater.* **15**, 1541 (2003). DOI: 10.1002/adma.200304602.
- ⁹¹ D. Forchheimer, G. Luo, L. Montelius, and L. Ye, Molecularly imprinted nanostructures by nanoimprint lithography. *Analyst* **135**, 1219 (2010). DOI: 10.1039/c0an00132e.
- ⁹² H.C. Huang, C.I. Lin, A.K. Joseph, and Y. Der Lee, Photo-lithographically impregnated and molecularly imprinted polymer thin film for biosensor applications. *J. Chromatogr. A* **1027**, 263 (2004). DOI: 10.1016/j.chroma.2003.08.106.
- ⁹³ J. Homola, S.S. Yee, and G. Gauglitz, Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors Actuators B Chem.* **54**, 3 (1999). DOI: 10.1016/S0925-4005(98)00321-9.
- ⁹⁴ A. Abbas, M.J. Linman, and Q. Cheng, New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 1815 (2011). DOI: 10.1016/j.bios.2010.09.030.
- ⁹⁵ P.R.H. Stark, A.E. Halleck, and D.N. Larson, Short order nanohole arrays in metals for highly sensitive probing of local indices of refraction as the basis for a highly multiplexed biosensor technology. *Methods* **37**, 37 (2005). DOI: 10.1016/j.ymeth.2005.05.006.

- ⁹⁶ A. De Leebeeck, L.K.S. Kumar, V. de Lange, D. Sinton, R. Gordon, and A.G. Brolo, On-chip surface-based detection with nanohole arrays. *Anal. Chem.* **79**, 4094 (2007). DOI: 10.1021/ac070001a.
- ⁹⁷ M.E. Stewart, C.R. Anderton, L.B. Thompson, J. Maria, S.K. Gray, J.A. Rogers, and R.G. Nuzzo, Nanostructured plasmonic sensors. *Chem. Rev.* **108**, 494 (2008). DOI: 10.1021/cr068126n.
- ⁹⁸ D. Sinton, R. Gordon, and A. Brolo, Nanohole arrays in metal films as optofluidic elements: progress and potential. *Microfluid. Nanofluidics* **4**, 107 (2008). DOI: 10.1007/s10404-007-0221-0.
- ⁹⁹ A.H.C. Ng, U. Uddayasankar, and A.R. Wheeler, Immunoassays in microfluidic systems. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 991 (2010). DOI: 10.1007/s00216-010-3678-8.
- ¹⁰⁰ D. Erickson, S. Mandal, A.H.J. Yang, and B. Cordovez, Nanobiosensors: optofluidic, electrical and mechanical approaches to biomolecular detection at the nanoscale. *Microfluid. Nanofluidics* **4**, 33 (2008). DOI: 10.1007/s10404-007-0198-8.
- ¹⁰¹ S. Lal, S. Link, and N.J. Halas, Nano-optics from sensing to waveguiding. *Nat. Photonics* **1**, 641 (2007). DOI: 10.1038/nphoton.2007.223.
- ¹⁰² J. Homola, Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chem. Rev.* **108**, 462 (2008). DOI: 10.1021/cr068107d.
- ¹⁰³ B.D. Gates, Q. Xu, J.C. Love, D.B. Wolfe, and G.M. Whitesides, UNCONVENTIONAL NANOFABRICATION. *Annu. Rev. Mater. Res.* **34**, 339 (2004). DOI: 10.1146/annurev.matsci.34.052803.091100.
- ¹⁰⁴ B.D. Gates, Q. Xu, M. Stewart, D. Ryan, C.G. Willson, and G.M. Whitesides, New approaches to nanofabrication: molding, printing, and other techniques. *Chem. Rev.* **105**, 1171 (2005). DOI: 10.1021/cr030076o.
- ¹⁰⁵ W. Lu and C.M. Lieber, Nanoelectronics from the bottom up. *Nat. Mater.* **6**, 841 (2007). DOI: 10.1038/nmat2028.
- ¹⁰⁶ A. Biswas, I.S. Bayer, A.S. Biris, T. Wang, E. Dervishi, and F. Faupel, Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: techniques, applications & future prospects. *Adv. Colloid Interface Sci.* **170**, 2 (2012). DOI: 10.1016/j.cis.2011.11.001.
- ¹⁰⁷ D. Richard, A. Chad, and R.D. Piner, "Dip-Pen" Nanolithography. *Science* (80-.). **283**, 661 (1999). DOI: 10.1126/science.283.5402.661.
- ¹⁰⁸ D.S. Ginger, H. Zhang, and C.A. Mirkin, The evolution of dip-pen nanolithography. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**, 30 (2004). DOI: 10.1002/anie.200300608.
- ¹⁰⁹ K. Salaita, Y. Wang, and C.A. Mirkin, Applications of dip-pen nanolithography. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 145 (2007). DOI: 10.1038/nnano.2007.39.
- ¹¹⁰ Y. Chen, D.M. Bagnall, H. Koh, K. Park, K. Hiraga, Z. Zhu, and T. Yao, Plasma assisted molecular beam epitaxy of ZnO on c-plane sapphire: Growth and characterization. *J. Appl. Phys.* **84**, 3912 (1998). DOI: 10.1063/1.368595.
- ¹¹¹ A. Reina, X. Jia, J. Ho, D. Nezich, H. Son, V. Bulovic, M.S. Dresselhaus, and J. Kong, Large area, few-layer graphene films on arbitrary substrates by chemical vapor deposition. *Nano Lett.* **9**, 30 (2009). DOI: 10.1021/nl801827v.
- ¹¹² A. Ulman, Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **96**, 1533 (1996). DOI: 10.1021/cr9502357.
- ¹¹³ J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, and G.M. Whitesides, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev.* **105**, 1103 (2005). DOI: 10.1021/cr0300789.
- ¹¹⁴ J. Sun, C. Tang, P. Zhan, Z. Han, Z.-S. Cao, and Z.-L. Wang, Fabrication of centimeter-sized single-domain two-dimensional colloidal crystals in a wedge-shaped cell under capillary forces. *Langmuir* **26**, 7859 (2010). DOI: 10.1021/la9047165.
- ¹¹⁵ A.E. Grigorescu and C.W. Hagen, Resists for sub-20-nm electron beam lithography with a focus on HSQ: state of the art. *Nanotechnology* **20**, 292001 (2009). DOI: 10.1088/0957-4484/20/29/292001.

- ¹¹⁶ G. Whitesides, Nanoscience, nanotechnology, and chemistry. *Small* **1**, 172 (2005). DOI: 10.1002/smll.200400130.
- ¹¹⁷ V. Balzani, Nanoscience and nanotechnology: a personal view of a chemist. *Small* **1**, 278 (2005). DOI: 10.1002/smll.200400010.
- ¹¹⁸ R. Pease and S. Chou, Lithography and Other Patterning Techniques for Future Electronics. *Proc. IEEE* **96**, 248 (2008). DOI: 10.1109/JPROC.2007.911853.
- ¹¹⁹ A. Tseng, Recent developments in micromilling using focused ion beam technology. *J. Micromechanics Microengineering* **14**, R15 (2004). DOI: 10.1088/0960-1317/14/4/R01.
- ¹²⁰ M. Hatzakis, Electron Resists for Microcircuit and Mask Production. *J. Electrochem. Soc.* **116**, 1033 (1969). DOI: 10.1149/1.2412145.
- ¹²¹ H.C. Pfeiffer, T.R. Groves, and T.H. Newman, High-throughput, high-resolution electron-beam lithography. *IBM J. Res. Dev.* **32**, 494 (1988). DOI: 10.1147/rd.324.0494.
- ¹²² S.Y. Chou, P.R. Krauss, and P.J. Renstrom, Imprint of sub-25 nm vias and trenches in polymers. *Appl. Phys. Lett.* **67**, 3114 (1995). DOI: 10.1063/1.114851.
- ¹²³ S.Y. Chou, C. Keimel, and J. Gu, Ultrafast and direct imprint of nanostructures in silicon. *Nature* **417**, 835 (2002). DOI: 10.1038/nature00792.
- ¹²⁴ H. Schiff, Nanoimprint lithography: An old story in modern times? A review. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **26**, 458 (2008). DOI: 10.1116/1.2890972.
- ¹²⁵ H. Morimoto, Y. Sasaki, K. Saitoh, Y. Watakabe, and T. Kato, Focused ion beam lithography and its application to submicron devices. *Microelectron. Eng.* **4**, 163 (1986). DOI: 10.1016/0167-9317(86)90009-2.
- ¹²⁶ S. Matsui, Y. Kojima, and Y. Ochiai, High-resolution focused ion beam lithography. *Appl. Phys. Lett.* **53**, 868 (1988). DOI: 10.1063/1.100098.
- ¹²⁷ J. Melngailis, Focused ion beam lithography. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **80-81**, 1271 (1993). DOI: 10.1016/0168-583X(93)90781-Z.
- ¹²⁸ D. López-Romero, C.A. Barrios, M. Holgado, M.F. Laguna, and R. Casquel, High aspect-ratio SU-8 resist nano-pillar lattice by e-beam direct writing and its application for liquid trapping. *Microelectron. Eng.* **87**, 663 (2010). DOI: 10.1016/j.mee.2009.09.007.
- ¹²⁹ T. Fujita, H. Nishihara, and J. Koyama, Fabrication of micro lenses using electron-beam lithography. *Opt. Lett.* **6**, 613 (1981). DOI: 10.1364/OL.6.000613.
- ¹³⁰ J.-K. Chen, F.-H. Ko, H.-K. Chen, C.-T. Chou, H.-L. Chen, and F.-C. Chang, Fabrication of curved structures with electron-beam and surface structure characterization. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **22**, 492 (2004). DOI: 10.1116/1.1645884.
- ¹³¹ Información y fichas técnicas <http://www.microresist.com> (consultado en marzo de 2012). (n.d.).
- ¹³² Información y fichas técnicas <http://www.allresist.de> (consultado en marzo de 2012). (n.d.).
- ¹³³ Información y fichas técnicas <http://www.microchem.com> (consultado en marzo de 2012). (n.d.).
- ¹³⁴ K. Haupt, editor, Molecular Imprinting. *Molecular Imprinting* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012). DOI: 10.1007/978-3-642-28421-2.
- ¹³⁵ F. Vandevelde, T. Leïchlé, C. Ayela, C. Bergaud, L. Nicu, and K. Haupt, Direct patterning of molecularly imprinted microdot arrays for sensors and biochips. *Langmuir* **23**, 6490 (2007). DOI: 10.1021/la700320n.
- ¹³⁶ M. Yan and A. Kapua, Fabrication of molecularly imprinted polymer microstructures. *Anal. Chim. Acta* **435**, 163 (2001). DOI: 10.1016/S0003-2670(00)01355-6.
- ¹³⁷ M. Jenik, A. Seifner, S. Krassnig, K. Seidler, P.A. Lieberzeit, F.L. Dickert, and C. Jungbauer, Sensors for bioanalytes by imprinting--polymers mimicking both biological receptors and the corresponding bioparticles. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 9 (2009). DOI: 10.1016/j.bios.2009.01.019.

- ¹³⁸ A. V Linares, A. Falcimaigne-Cordin, L.A. Gheber, and K. Haupt, Patterning nanostructured, synthetic, polymeric receptors by simultaneous projection photolithography, nanomolding, and molecular imprinting. *Small* **7**, 2318 (2011). DOI: 10.1002/smll.201100248.
- ¹³⁹ H. Lalo, C. Ayela, E. Dague, C. Vieu, and K. Haupt, Nanopatterning molecularly imprinted polymers by soft lithography: a hierarchical approach. *Lab Chip* **10**, 1316 (2010). DOI: 10.1039/b924315a.
- ¹⁴⁰ O.Y.F. Henry, S.A. Piletsky, and D.C. Cullen, Fabrication of molecularly imprinted polymer microarray on a chip by mid-infrared laser pulse initiated polymerisation. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 1769 (2008). DOI: 10.1016/j.bios.2008.02.010.
- ¹⁴¹ A.R. Hajiaboli, B. Cui, M. Kahrizi, and V.-V. Truong, Optical properties of thick metal nanohole arrays fabricated by electron-beam and nanosphere lithography. *Phys. Status Solidi* **206**, 976 (2009). DOI: 10.1002/pssa.200881294.
- ¹⁴² T. Ebbesen, H. Lezec, H. Ghaemi, T. Thio, and P. Wolff, Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole arrays. *Nature* **391**, 667 (1998). DOI: 10.1038/35570.
- ¹⁴³ M. Foquet, K.T. Samiee, X. Kong, B.P. Chauduri, P.M. Lundquist, S.W. Turner, J. Freudenthal, and D.B. Roitman, Improved fabrication of zero-mode waveguides for single-molecule detection. *J. Appl. Phys.* **103**, 034301 (2008). DOI: 10.1063/1.2831366.
- ¹⁴⁴ J.-H. Seo, J.H. Park, S.-I. Kim, B.J. Park, Z. Ma, J. Choi, and B.-K. Ju, Nanopatterning by laser interference lithography: applications to optical devices. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **14**, 1521 (2014).
- ¹⁴⁵ Q. Chen, C. Martin, and D.R.S. Cumming, Transfer Printing of Nanoplasmonic Devices onto Flexible Polymer Substrates from a Rigid Stamp. *Plasmonics* **7**, 755 (2012). DOI: 10.1007/s11468-012-9370-4.
- ¹⁴⁶ J. Junesch, T. Sannomiya, and A.B. Dahlin, Optical properties of nanohole arrays in metal-dielectric double films prepared by mask-on-metal colloidal lithography. *ACS Nano* **6**, 10405 (2012). DOI: 10.1021/nn304662e.
- ¹⁴⁷ G.C. Schatz, J.M. McMahon, and S.K. Gray, Tailoring the parameters of nanohole arrays in gold films for sensing applications. in *Plasmon. Met. Nanostructures Their Opt. Prop. V*, edited by M.I. Stockman (2007), pp. 664103–664103–8. DOI: 10.1117/12.731368.
- ¹⁴⁸ J.M. McMahon, J. Henzie, T.W. Odom, G.C. Schatz, and S.K. Gray, Tailoring the sensing capabilities of nanohole arrays in gold films with Rayleigh anomaly-surface plasmon polaritons. *Opt. Express* **15**, 18119 (2007). DOI: 10.1364/OE.15.018119.
- ¹⁴⁹ J.C. Sharpe, J.S. Mitchell, L. Lin, N. Sedoglavich, and R.J. Blaikie, Gold nanohole array substrates as immunobiosensors. *Anal. Chem.* **80**, 2244 (2008). DOI: 10.1021/ac702555r.
- ¹⁵⁰ R. Gordon, D. Sinton, K.L. Kavanagh, and A.G. Brolo, A new generation of sensors based on extraordinary optical transmission. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1049 (2008). DOI: 10.1021/ar800074d.
- ¹⁵¹ C. Valsecchi and A.G. Brolo, Periodic metallic nanostructures as plasmonic chemical sensors. *Langmuir* **29**, 5638 (2013). DOI: 10.1021/la400085r.
- ¹⁵² C. Escobedo, On-chip nanohole array based sensing: a review. *Lab Chip* **13**, 2445 (2013). DOI: 10.1039/c3lc50107h.
- ¹⁵³ G.A. Cervantes Tellez, S. Hassan, R.N. Tait, P. Berini, and R. Gordon, Atomically flat symmetric elliptical nanohole arrays in a gold film for ultrasensitive refractive index sensing. *Lab Chip* **13**, 2541 (2013). DOI: 10.1039/c3lc41411f.
- ¹⁵⁴ J.D. Caldwell, O. Glembocki, F.J. Bezares, N.D. Bassim, R.W. Rendell, M. Feygelson, M. Ukaegbu, R. Kasica, L. Shirey, and C. Hosten, Plasmonic nanopillar arrays for large-area, high-enhancement surface-enhanced Raman scattering sensors. *ACS Nano* **5**, 4046 (2011). DOI: 10.1021/nn200636t.
- ¹⁵⁵ Y. Suzuki and K. Yokoyama, Construction of a more sensitive fluorescence sensing material for the detection of vascular endothelial growth factor, a biomarker for angiogenesis, prepared by combining a fluorescent peptide and a nanopillar substrate. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 3696 (2011). DOI: 10.1016/j.bios.2011.02.007.

- ¹⁵⁶ M. Saito, A. Kitamura, M. Murahashi, K. Yamanaka, L.Q. Hoa, Y. Yamaguchi, and E. Tamiya, Novel gold-capped nanopillars imprinted on a polymer film for highly sensitive plasmonic biosensing. *Anal. Chem.* **84**, 5494 (2012). DOI: 10.1021/ac300307e.
- ¹⁵⁷ V. Anandan, Y.L. Rao, and G. Zhang, Nanopillar array structures for enhancing biosensing performance. *Int. J. Nanomedicine* **1**, 73 (2006). DOI: 10.2147/nano.2006.1.1.73.
- ¹⁵⁸ A.E. Cetin, A.A. Yanik, C. Yilmaz, S. Somu, A. Busnaina, and H. Altug, Plasmonic nanopillar arrays for optical trapping, biosensing, and spectroscopy. in *Proc. SPIE 8097, Opt. Trapp. Opt. Micromanipulation VIII* (2011), p. 80971P. DOI: 10.1117/12.891921.
- ¹⁵⁹ M. Holgado, C.A. Barrios, F.J. Ortega, F.J. Sanza, R. Casquel, M.F. Laguna, M.J. Bañuls, D. López-Romero, R. Puchades, and A. Maquieira, Label-free biosensing by means of periodic lattices of high aspect ratio SU-8 nano-pillars. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 2553 (2010). DOI: 10.1016/j.bios.2010.04.042.
- ¹⁶⁰ F.J. Sanza, M. Holgado, F.J. Ortega, R. Casquel, D. López-Romero, M.J. Bañuls, M.F. Laguna, C.A. Barrios, R. Puchades, and A. Maquieira, Bio-Photonic Sensing Cells over transparent substrates for anti-gestrinone antibodies biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4842 (2011). DOI: 10.1016/j.bios.2011.06.010.
- ¹⁶¹ R.H. Wendt and V.A. Fassel, Atomic Absorption with Induction-Coupled Plasmas. *Anal. Chem.* **38**, 337 (1966). DOI: 10.1021/ac60234a003.
- ¹⁶² G.N. Taylor and T.M. Wolf, Oxygen plasma removal of thin polymer films. *Polym. Eng. Sci.* **20**, 1087 (1980). DOI: 10.1002/pen.760201610.
- ¹⁶³ H. Li, A. Belkind, F. Jansen, and Z. Orban, An in situ XPS study of oxygen plasma cleaning of aluminum surfaces. *Surf. Coatings Technol.* **92**, 171 (1997). DOI: 10.1016/S0257-8972(97)00079-0.
- ¹⁶⁴ H. Duan, D. Winston, J.K.W. Yang, B.M. Cord, V.R. Manfrinato, and K.K. Berggren, Sub-10-nm half-pitch electron-beam lithography by using poly(methyl methacrylate) as a negative resist. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **28**, C6C58 (2010). DOI: 10.1116/1.3501353.
- ¹⁶⁵ S. Wang, D.F.P. Pile, C. Sun, and X. Zhang, Nanopin plasmonic resonator array and its optical properties. *Nano Lett.* **7**, 1076 (2007). DOI: 10.1021/nl062911y.
- ¹⁶⁶ W.H. Teh and C.G. Smith, Fabrication of quasi-three-dimensional micro/nanomechanical components using electron beam cross-linked poly (methyl methacrylate) resist. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **21**, 3007 (2003). DOI: 10.1116/1.1629290.
- ¹⁶⁷ W.H. Teh, M. Graham, and C.G. Smith, Cross-linked PMMA as a low-dimensional dielectric sacrificial layer. *J. Microelectromechanical Syst.* **12**, 641 (2003). DOI: 10.1109/JMEMS.2003.817891.
- ¹⁶⁸ I. Aranaz, S. Carrasco, M.G. Tardajos, C. Elvira, H. Reinecke, D. López, and A. Gallardo, Singular thermosensitivity of polymethyl methacrylate/poly-N-isopropylacrylamide conetworks prepared by a facile synthetic route. *Polym. Chem.* **2**, 709 (2011). DOI: 10.1039/C0PY00313A.
- ¹⁶⁹ Z. Li, M. Day, J. Ding, and K. Faid, Synthesis and Characterization of Functional Methacrylate Copolymers and Their Application in Molecular Imprinting. *Macromolecules* **38**, 2620 (2005). DOI: 10.1021/ma0478308.
- ¹⁷⁰ G. Blagoi, S. Keller, A. Johansson, A. Boisen, and M. Dufva, Functionalization of SU-8 photoresist surfaces with IgG proteins. *Appl. Surf. Sci.* **255**, 2896 (2008). DOI: 10.1016/j.apsusc.2008.08.089.
- ¹⁷¹ M. Joshi, R. Pinto, V.R. Rao, and S. Mukherji, Silanization and antibody immobilization on SU-8. *Appl. Surf. Sci.* **253**, 3127 (2007). DOI: 10.1016/j.apsusc.2006.07.017.
- ¹⁷² R. Marie, S. Schmid, A. Johansson, L. Ejlsing, M. Nordström, D. Häfliger, C.B. Christensen, A. Boisen, and M. Dufva, Immobilisation of DNA to polymerised SU-8 photoresist. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1327 (2006). DOI: 10.1016/j.bios.2005.03.004.
- ¹⁷³ A. del Campo and C. Greiner, SU-8: a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography. *J. Micromechanics Microengineering* **17**, R81 (2007). DOI: 10.1088/0960-1317/17/6/R01.
- ¹⁷⁴ M. Devittorio, Two-dimensional photonic crystal waveguide obtained by e-beam direct writing of SU8-2000 photoresist. *Microelectron. Eng.* **73-74**, 388 (2004). DOI: 10.1016/j.mee.2004.02.075.

- ¹⁷⁵ V. Kudryashov, X. Yuan, W.-C. Cheong, and K. Radhakrishnan, Grey scale structures formation in SU-8 with e-beam and UV. *Microelectron. Eng.* **67-68**, 306 (2003). DOI: 10.1016/S0167-9317(03)00083-2.
- ¹⁷⁶ P.F. Williams, editor, Plasma Processing of Semiconductors. *Plasma Processing of Semiconductors* (Springer Netherlands, Dordrecht, 1997). DOI: 10.1007/978-94-011-5884-8.
- ¹⁷⁷ D.A. Parsons, Roger L., Gulino, Effect of an oxygen plasma on uncoated thin aluminum reflecting films. NASA Tech. Memo. 89882 **Document I**, 1 (1987).
- ¹⁷⁸ J. a. Baier-Saip, J.I. Avila, G. Tarrach, a. L. Cabrera, V. Fuenzalida, R. a. Zarate, and I.K. Schuller, Deep oxidation of aluminum by a DC oxygen plasma. *Surf. Coatings Technol.* **195**, 168 (2005). DOI: 10.1016/j.surfcoat.2004.06.020.
- ¹⁷⁹ C. Lee, Global Model of Plasma Chemistry in a High Density Oxygen Discharge. *J. Electrochem. Soc.* **141**, 1546 (1994). DOI: 10.1149/1.2054960.
- ¹⁸⁰ M. a. Hartney, Oxygen plasma etching for resist stripping and multilayer lithography. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **7**, 1 (1989). DOI: 10.1116/1.584440.
- ¹⁸¹ F.C. Fehsenfeld, P.D. Goldan, A.L. Schmeltekopf, and E.E. Ferguson, Laboratory measurement of the rate of the reaction $O + O_2 \rightarrow O_2 + O$ at thermal energy. *Planet. Space Sci.* **13**, 579 (1965). DOI: 10.1016/0032-0633(65)90170-4.
- ¹⁸² J.B. Thompson, Electron Energy Distributions in Plasmas. IV. Oxygen and Nitrogen. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **262**, 503 (1961). DOI: 10.1098/rspa.1961.0135.
- ¹⁸³ P.F. Kurunczi, J. Guha, and V.M. Donnelly, Recombination reactions of oxygen atoms on an anodized aluminum plasma reactor wall, studied by a spinning wall method. *J. Phys. Chem. B* **109**, 20989 (2005). DOI: 10.1021/jp054190h.
- ¹⁸⁴ S. Herranz, M. Marciello, D. Olea, M. Hernández, C. Domingo, M. Vélez, L.A. Gheber, J.M. Guisán, and M.C. Moreno-Bondi, Dextran–Lipase Conjugates as Tools for Low Molecular Weight Ligand Immobilization in Microarray Development. *Anal. Chem.* **85**, 7060 (2013). DOI: 10.1021/ac400631t.
- ¹⁸⁵ K. Hirayama, S. Akashi, M. Furuya, and K. Fukuhara, Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 639 (1990). DOI: 10.1016/S0006-291X(05)80083-X.
- ¹⁸⁶ H. Lee, Y. Kim, and B. Kim, Fabrication of luminescent nanoarchitectures by electron irradiation of polystyrene. *Adv. Mater.* **20**, 2094 (2008). DOI: 10.1002/adma.200702221.
- ¹⁸⁷ I.A. Badmaeva, N. V. Surovtsev, V.K. Malinovskii, and L.L. Sveshnikova, IR and Raman spectroscopic study of the photopolymerization of Langmuir-Blodgett films of acetylenic acids. *J. Struct. Chem.* **51**, 244 (2010). DOI: 10.1007/s10947-010-0038-7.
- ¹⁸⁸ K.Y. Lee, Micromachining applications of a high resolution ultrathick photoresist. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **13**, 3012 (1995). DOI: 10.1116/1.588297.
- ¹⁸⁹ H. Lorenz, M. Despont, N. Fahrni, N. LaBianca, P. Renaud, and P. Vettiger, SU-8: a low-cost negative resist for MEMS. *J. Micromechanics Microengineering* **7**, 121 (1997). DOI: 10.1088/0960-1317/7/3/010.
- ¹⁹⁰ K. LISTER, Pattern transfer of a 23 nm-period grating and sub-15 nm dots into CVD diamond. *Microelectron. Eng.* **73-74**, 319 (2004). DOI: 10.1016/j.mee.2004.02.060.
- ¹⁹¹ B. Bilenberg, M. Schøler, P. Shi, M.S. Schmidt, P. Bøggild, M. Fink, C. Schuster, F. Reuther, C. Gruetzner, and A. Kristensen, Comparison of high resolution negative electron beam resists. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **24**, 1776 (2006). DOI: 10.1116/1.2210002.
- ¹⁹² C. Vieu, F. Carcenac, A. Pépin, Y. Chen, M. Mejias, A. Lebib, L. Manin-Ferlazzo, L. Couraud, and H. Launois, Electron beam lithography: resolution limits and applications. *Appl. Surf. Sci.* **164**, 111 (2000). DOI: 10.1016/S0169-4332(00)00352-4.
- ¹⁹³ A. Pépin, V. Studer, D. Decanini, and Y. Chen, Exploring the high sensitivity of SU-8 resist for high resolution electron beam patterning. *Microelectron. Eng.* **73-74**, 233 (2004). DOI: 10.1016/j.mee.2004.02.046.

- ¹⁹⁴ D.M. Tanenbaum, High resolution electron beam lithography using ZEP-520 and KRS resists at low voltage. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **14**, 3829 (1996). DOI: 10.1116/1.588676.
- ¹⁹⁵ T.I.T. Okpalugo and P. Papakonstantinou, High resolution XPS characterization of chemical functionalised MWCNTs and SWCNTs. *Carbon N. Y.* **43**, 153 (2005). DOI: 10.1016/j.carbon.2004.08.033.
- ¹⁹⁶ A. Bay, N. André, M. Sarrazin, A. Belarouci, V. Aimez, L.A. Francis, and J.P. Vigneron, Optimal overlayer inspired by Photuris firefly improves light-extraction efficiency of existing light-emitting diodes. *Opt. Express* **21 Suppl 1**, A179 (2013). DOI: 10.1364/OE.21.00A179.
- ¹⁹⁷ A. Bay, P. Cloetens, H. Suhonen, and J. Vigneron, Improved light extraction in the bioluminescent lantern of a Photuris firefly (Lampyridae). *Opt. Express* **21**, 64860H (2013). DOI: 10.1117/12.701344.
- ¹⁹⁸ H. Duan, J. Zhao, Y. Zhang, E. Xie, and L. Han, Preparing patterned carbonaceous nanostructures directly by overexposure of PMMA using electron-beam lithography. *Nanotechnology* **135306**, (2009). DOI: 10.1088/0957-4484/20/13/135306.
- ¹⁹⁹ A.P.G. Robinson, R.E. Palmer, T. Tada, T. Kanayama, M.T. Allen, J.A. Preece, and K.D.M. Harris, 10 nm scale electron beam lithography using a triphenylene derivative as a negative/positive tone resist. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **32**, L75 (1999). DOI: 10.1088/0022-3727/32/16/102.
- ²⁰⁰ C.A. Barrios, S. Carrasco, V. Canalejas-Tejero, D. López-Romero, F. Navarro-Villoslada, M.C. Moreno-Bondi, J.L.G. Fierro, and M.C. Capel-Sánchez, Fabrication of luminescent nanostructures by electron-beam direct writing of PMMA resist. *Mater. Lett.* **88**, 93 (2012). DOI: 10.1016/j.matlet.2012.08.035.
- ²⁰¹ V. Canalejas-Tejero, S. Herranz, A. Bellingham, M.C. Moreno-Bondi, and C.A. Barrios, Passivated aluminum nanohole arrays for label-free biosensing applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 1005 (2014). DOI: 10.1021/am404509f.
- ²⁰² B.R. Strohmeier, The effects of O₂ plasma treatments on the surface composition and wettability of cold-rolled aluminum foil. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* **7**, 3238 (1989). DOI: 10.1116/1.576342.
- ²⁰³ B.R. Strohmeier, Improving the wettability of aluminum foil with oxygen plasma treatments. *J. Adhes. Sci. Technol.* **6**, 703 (1992). DOI: 10.1163/156856192X01051.
- ²⁰⁴ S.H. Lee, T.W. Johnson, N.C. Lindquist, H. Im, D.J. Norris, and S.-H. Oh, Linewidth-Optimized Extraordinary Optical Transmission in Water with Template-Stripped Metallic Nanohole Arrays. *Adv. Funct. Mater.* **22**, 4439 (2012). DOI: 10.1002/adfm.201200955.
- ²⁰⁵ L. Pang and G. Hwang, Spectral sensitivity of two-dimensional nanohole array surface plasmon polariton resonance sensor. *Appl. Phys. Lett.* **91**, 123112 (2007). DOI: 10.1063/1.2789181.
- ²⁰⁶ A.A. Yanik, M. Huang, A. Artar, T.-Y. Chang, and H. Altug, Integrated nanoplasmonic-nanofluidic biosensors with targeted delivery of analytes. *Appl. Phys. Lett.* **96**, 021101 (2010). DOI: 10.1063/1.3290633.
- ²⁰⁷ J.B. Wright, K.N. Cicotte, G. Subramania, S.M. Dirk, and I. Brener, Chemoselective gas sensors based on plasmonic nanohole arrays. *Opt. Mater. Express* **2**, 1655 (2012). DOI: 10.1364/OME.2.001655.
- ²⁰⁸ H. Im, J. Sutherland, J. Maynard, and S. Oh, Nanohole-based surface plasmon resonance instruments with improved spectral resolution quantify a broad range of antibody-ligand binding kinetics. *Anal. Chem.* **84**, 1941 (2012). DOI: 10.1021/ac300070t.Nanohole-based.
- ²⁰⁹ Y. Shen, J. Zhou, T. Liu, Y. Tao, R. Jiang, M. Liu, G. Xiao, J. Zhu, Z.-K. Zhou, X. Wang, C. Jin, and J. Wang, Plasmonic gold mushroom arrays with refractive index sensing figures of merit approaching the theoretical limit. *Nat. Commun.* **4**, 2381 (2013). DOI: 10.1038/ncomms3381.
- ²¹⁰ A. Szeghalmi, E.B. Kley, and M. Knez, Theoretical and Experimental Analysis of the Sensitivity of Guided Mode Resonance Sensors. *J. Phys. Chem. C* **114**, 21150 (2010). DOI: 10.1021/jp107540y.
- ²¹¹ G.E. Ewing, Ambient thin film water on insulator surfaces. *Chem. Rev.* **106**, 1511 (2006). DOI: 10.1021/cr040369x.

- ²¹² K. Wouters and R. Puers, Diffusing and swelling in SU-8: insight in material properties and processing. *J. Micromechanics Microengineering* **20**, 095013 (2010). DOI: 10.1088/0960-1317/20/9/095013.
- ²¹³ E. Dermitzaki, B. Wunderle, J. Bauer, H. Walter, and B. Michel, Structure property correlation of epoxy resins under the influence of moisture; and comparison of diffusion coefficient with MD-simulations. in *EuroSimE 2008 - Int. Conf. Therm. Mech. Multi-Physics Simul. Exp. Microelectron. Micro-Systems* (IEEE, 2008), pp. 1–8. DOI: 10.1109/ESIME.2008.4525087.
- ²¹⁴ R. Yan, S.P. Mestas, G. Yuan, R. Safaisini, D.S. Dandy, and K.L. Lear, Label-free silicon photonic biosensor system with integrated detector array. *Lab Chip* **9**, 2163 (2009). DOI: 10.1039/b902111f.
- ²¹⁵ S. Carrasco, V. Canalejas-Tejero, F. Navarro-Villoslada, C.A. Barrios, and M.C. Moreno-Bondi, Cross-linkable linear copolymer with double functionality: resist for electron beam nanolithography and molecular imprinting. *J. Mater. Chem. C* **2**, 1400 (2014). DOI: 10.1039/c3tc31499e.
- ²¹⁶ V. Canalejas-Tejero, S. Carrasco, F. Navarro-Villoslada, J.L. García Fierro, M. del C. Capel-Sánchez, M.C. Moreno-Bondi, and C.A. Barrios, Ultrasensitive non-chemically amplified low-contrast negative electron beam lithography resist with dual-tone behaviour. *J. Mater. Chem. C* **1**, 1392 (2013). DOI: 10.1039/c2tc00148a.
- ²¹⁷ C.A. Barrios, V. Canalejas-Tejero, S. Herranz, J. Urraca, M.C. Moreno-Bondi, M. Avella-Oliver, Á. Maquieira, and R. Puchades, Aluminum Nanoholes for Optical Biosensing. *Biosensors* **5**, 417 (2015). DOI: 10.3390/bios5030417.
- ²¹⁸ C.A. Barrios and V. Canalejas-Tejero, Compact discs as versatile cost-effective substrates for releasable nanopatterned aluminium films. *Nanoscale* **7**, 3435 (2015). DOI: 10.1039/c4nr06271j.
- ²¹⁹ V. Canalejas-Tejero, A. López, R. Casquel, M. Holgado, and C.A. Barrios, Sensitive metal layer-assisted guided-mode resonance SU8 nanopillar array for label-free optical biosensing. *Sensors Actuators B Chem.* **226**, 204 (2016). DOI: 10.1016/j.snb.2015.11.114.