

**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR FOTÓNICO
DE ALTA SENSIBILIDAD BASADO EN
INTERFERÓMETROS MACH-ZEHNDER
INTEGRADOS EN TECNOLOGÍA DE SILICIO**

José Sánchez del Río Sáez
Departamento de Física de Materiales
Universidad Autónoma de Madrid

**Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Física de Materiales**

**Desarrollo de un biosensor fotónico de alta sensibilidad
basado en interferómetros Mach-Zehnder integrados en
tecnología microelectrónica de silicio**

**Memoria para optar al grado
de Doctor en Ciencias Físicas
Presentada por**

José Sánchez del Río Sáez

**Y dirigida por la doctora
Laura M. Lechuga Gómez**



**Instituto de Microelectrónica de Madrid (IMM)
Centro Nacional de Microelectrónica (CNM)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**

Tres Cantos, Madrid 2004

Objetivos de la tesis

El principal objetivo de esta Tesis es el desarrollo de un biosensor fotónico de alta sensibilidad basado en interferómetros Mach-Zehnder integrados (MZIs). Ya desarrollado, se presentan dos aplicaciones biosensoras: la primera queda enmarcada dentro del campo de la Genómica y consiste en la detección de reacciones de hibridación entre cadenas de ADN con un bajo límite de detección y de mutaciones en esas cadenas (cuyas secuencias complementarias corresponden a la del gen BRCA-1). La segunda está centrada en el campo de la Proteómica y consiste en la detección de bajas concentraciones de pesticida carbaril mediante un inmunoensayo de inhibición.

Para conseguir una alta sensibilidad, los MZIs que constituyen este biosensor están basados en guías de ondas TIR y se diseñan para tener comportamiento monomodo y alta sensibilidad superficial. Su fabricación se realiza con la tecnología microelectrónica del silicio, que facilita la posterior integración de los emisores y detectores de luz, sistemas de fluídica, sistemas de modulación de la señal, etc. para obtener así futuros prototipos compactos. Es necesario buscar un montaje experimental robusto y estable con bajos niveles de ruido y deriva. Además se trata de diseñar una configuración que permita obtener una mayor información en las medidas biosensoras. Es el caso de la configuración de doble polarización, por la cual se pueden obtener respuestas en ambas polarizaciones para una misma señal de medida. Además, la mínima señal detectable por cambio de fase del dispositivo (3 veces la desviación estándar del ruido) permite conocer su límite de detección en el cambio del índice de refracción externo.

Para evaluar las altas prestaciones del dispositivo desarrollado se ha de realizar una caracterización óptica del mismo, como es el comportamiento modal de las guías que lo constituyen (han de ser monomodo), el estudio de las pérdidas propagación en sus tramos rectos y curvos, de las pérdidas de inserción, de las pérdidas de acoplamiento de los modos guiados entre ramas o del ruido y de la deriva del sistema. En el desarrollo del biosensor se ha de funcionalizar la superficie del transductor de forma adecuada e inmovilizar las biomoléculas receptoras. Técnicas como las de fluorescencia o radiomarcaje permiten conocer si el protocolo seguido de biofuncionalización de la superficie sensora es el correcto.

Como se puede observar, en esta memoria se combinan distintas disciplinas y ha englobado el trabajo de grupos especializados en campos muy diferentes: Tecnología Microelectrónica, Óptica Integrada, Fluídica, Bionanotecnología, Química, Biología.... mostrando la necesidad del trabajo multidisciplinar para poder desarrollar biosensores integrados con un amplio rango de aplicaciones biotecnológicas y médicas. De hecho, las aplicaciones biosensoras que se presentan están íntimamente relacionadas con las demandas actuales requeridas por la Genómica y la Proteómica. Así, la detección de dos mutaciones puntuales en el gen BRCA-1 es una novedosa aplicación que convierte al biosensor MZI en una herramienta muy poderosa para utilizarse en un gran número de aplicaciones biomédicas y clínicas. Por otro lado, la detección de muy bajas concentraciones del pesticida carbaril permite emplear el biosensor MZI en la detección de contaminantes ambientales con una alta sensibilidad.

CAPÍTULO 1

Introducción

En la actualidad, son muchos los campos a nivel industrial, a nivel de control y aprovechamiento de los recursos naturales, a nivel sanitario y médico, etc. que demandan el desarrollo de sistemas cada vez más avanzados que permitan analizar, recoger y procesar la información requerida a tiempo real y con una gran sensibilidad. Estos sistemas, conocidos como biosensores, están ya presentes en nuestra vida cotidiana (en nuestra casa, en la clínica, en los hospitales, en los distintos laboratorios farmacéuticos y de investigación, etc.) y tienen un amplio rango de aplicaciones, todas con la finalidad de mejorar nuestra calidad de vida.

La historia de los biosensores comenzó en 1962, cuando el científico americano Leland Clark, en el artículo publicado en 1962 en la revista *Annals of the New York Academy of Sciences* (Clark, L.C. Jr. *Ann. NY Acad. Sci.* 102, 29-45, 1962)¹, describía cómo conseguir que los sensores electroquímicos fueran más selectivos añadiendo enzimas. El experimento consistía en que el enzima glucosa oxidasa quedaba atrapada en un electrodo de oxígeno mediante una membrana de diálisis. Detectando los cambios en la concentración de oxígeno próximos a la enzima, podía conocerse su actividad, por lo que el sensor químico de oxígeno se convertía en un biosensor. De hecho, a esta configuración la llamó electrodo enzimático, que en definitiva es el primer dispositivo que se puede considerar como biosensor. Posteriormente, en 1975, se comercializaría el primer analizador de glucosa (por la compañía Yellow Spring Instruments – Ohio), basado en la detección amperométrica del peróxido de hidrógeno. Actualmente millones de personas de todo el mundo utilizan el biosensor de glucosa.

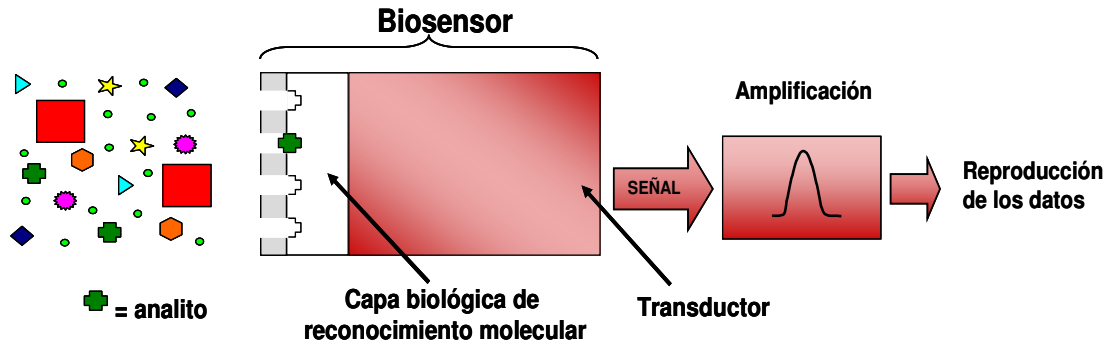
Sin embargo, el término biosensor comenzó a utilizarse a partir de 1977 cuando se desarrolló el primer dispositivo utilizando microorganismos vivos inmovilizados en la superficie de un electrodo sensible a amonio². Este dispositivo se utilizaba para detectar el aminoácido arginina y sus creadores lo llamaron “sensor bio-selectivo”. Posteriormente para acortar, se denominó “biosensor” y este término ha permanecido desde entonces para designar la unión entre material biológico y un transductor físico. A partir de ese momento el diseño y las aplicaciones de los biosensores en distintos campos de la química analítica ha continuado creciendo³.

Durante los últimos años, los numerosos avances en el ámbito de la nanobiotecnología, microelectrónica y fotónica han impulsado el desarrollo del campo de los biosensores^{4,5}. El número de publicaciones científicas, revisiones y patentes sobre biosensores desarrollados en esta última década ha sido muy elevado, lo que refleja el gran interés que despierta en la comunidad científica. El desarrollo de los biosensores ha estado centrado principalmente en el campo del diagnóstico clínico y existe un interés más reciente en los campos medioambiental, químico, farmacéutico, agroalimentario y militar⁹.

1.1 Definición de biosensor

Un biosensor se define como un dispositivo compacto de análisis que incorpora:

- Un elemento de reconocimiento biológico (ácido nucleico, enzima, anticuerpo, tejido, célula...) preparado para detectar específicamente una sustancia, aprovechando la exquisita especificidad de las interacciones biomoleculares.
- Un sistema de transducción al que está asociado el receptor y que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito.



El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el compuesto de interés y el elemento de reconocimiento biológico. Como resultado de esta unión, se produce la variación de parámetros fisicoquímicos que son detectados por el transductor, produciendo una señal cuantificable indicativa de la presencia del analito sometido a estudio y proporcional a su concentración en la muestra.

El receptor biológico y el transductor, están integrados conjuntamente. Las dos características principales de un biosensor son su *alta sensibilidad* y su *alta selectividad*, de tal forma que el dispositivo interactúe exclusivamente con el compuesto de interés y no con otros de propiedades similares.

Además de estas dos características esenciales, existen otras muchas como son su *alta fiabilidad* (los sistemas de transducción deben permanecer inalterados por la muestra a medir) y su *alta estabilidad*, necesaria para poder obtener medidas precisas y de alta sensibilidad. Han de ser capaces de realizar *análisis a tiempo real y de medida directa (sin necesidad de marcador)*, de tal forma que se puede estudiar la dinámica de interacción (constante de afinidad, asociación, disociación...) y por tanto elucidar los mecanismos fundamentales de dicha interacción. Esta característica diferencia a los biosensores de las técnicas analíticas convencionales, como son la fluorescencia o el marcaje radiactivo, que necesitan de un marcador para poder realizar el análisis biológico o clínico requerido. Muchos de ellos han de tener las ventajas de *portabilidad y miniaturización* para poder realizar el análisis *in-situ* y a pie de campo. Gracias a los desarrollos en microelectrónica y nanotecnología (incluyendo las avanzadas técnicas de micromecanizado y nanofabricación), se han logrado reducir las dimensiones de estos dispositivos. De esta forma, pueden ensamblarse varios de ellos en un mismo sistema que realiza varias tareas a la vez (medida simultánea de distintos analitos con la misma

cantidad de muestra, es la *capacidad de multianálisis*) y son aplicables a ensayos donde el tamaño físico del dispositivo, el volumen de la muestra (del orden de nanolitros o picolitros) o localización de la medida son factores limitantes.

Por otro lado, los biosensores han de ser fabricados con *bajo coste*. Esta última característica es difícil conseguir, pues el elemento transductor y los biorreceptores que constituyen el biosensor suelen encarecer el dispositivo. Aún así, con los avances de la ingeniería genética (que permite la creación de nuevas biomoléculas o de las ya existentes, pero a gran escala) y de la nanotecnología e ingeniería de materiales (que permite la fabricación de nanoestructuras de nuevos materiales de bajo coste y con las propiedades deseadas) se busca fabricar biosensores de alta sensibilidad y selectividad e introducirlos en el mercado para así estar al alcance del mayor número de beneficiarios. Es necesario que tengan un *tiempo de vida largo*: la estabilidad química, física y mecánica del elemento de reconocimiento condicionan el tiempo de vida del dispositivo. Es importante que el dispositivo no tenga que ser sustituido o desechado si está integrado en una línea de producción de una industria. También es bueno que permitan *tiempos de análisis cortos*, para poder realizar medidas directas de forma rápida y continua. Es importante también evitar un *pretratamiento de la muestra*, que supone ahorro de tiempo, materiales y reactivos. El *manejo* de los biosensores ha de ser *sencillo* para el mayor número posible de usuarios.

En cuanto a sus aplicaciones⁷, son muchas las que pueden encontrarse en la literatura y determinarán el tipo de biosensor a emplear. Debido a su alta sensibilidad y selectividad, los biosensores pueden ser usados para detectar numerosas sustancias químicas o biológicas, de muy bajo peso molecular, como drogas, toxinas, moléculas orgánicas (glucosa, colesterol, antibióticos, etc), pesticidas, proteínas (albúmina, insulina, inmunoglobulina, antígenos, etc.).

Aunque el rango de aplicación más amplio es el campo biomédico y clínico, también son empleados en otros muchos, como los de la terapéutica, veterinaria, agricultura, monitorización de procesos industriales y control de polución y medio ambiental.

1.2 Clasificación

Los biosensores se clasifican en función del tipo de transductor empleado, que permite traducir la interacción biológica en una señal medible y cuantificable por el usuario y en función de la naturaleza del elemento de reconocimiento o receptor biológico^{5,6,8}.

Tal como se presenta en la Tabla 2, los receptores biológicos empleados pueden ser enzimas, orgánulos tejidos o células completas, anticuerpos, ácidos nucleicos, aptámeros, polímeros de impresión molecular o ácidos nucleicos peptídicos. Los transductores pueden ser electroquímicos, ópticos, mecanoacústicos y termoeléctricos, principalmente.

Tabla 1: Criterios de clasificación de los biosensores

Elemento de reconocimiento o receptor biológico	Sistema de transducción
<ul style="list-style-type: none"> • Enzima • Orgánulo, tejido, célula completa • Anticuerpo • Ácidos nucleicos • Aptámeros • Polímeros de impresión molecular (PIM) • Ácidos nucleicos peptídicos (PNA) 	<ul style="list-style-type: none"> • Electroquímicos: amperométricos, potenciométricos, conductométricos • Ópticos: absorción, fluorescencia, onda evanescente • Mecanoacústicos: piezolétricos, nanomecánicos • Termolétricos

La elección del material biológico depende de las características del compuesto a analizar, sin embargo la elección del transductor está condicionada por el tipo de elemento de reconocimiento elegido, ya que éste determina cuál será la variación en las propiedades físico-químicas que ocurra como consecuencia de la interacción. Además, dependiendo del tipo de interacción que se establece entre el receptor biológico y el analito, los biosensores pueden considerarse como de medida directa, a partir de la medida de las características del analito, o indirecta, empleándose un reactivo auxiliar que experimenta un cambio en sus propiedades cuando el analito interacciona con el receptor.

1.2.1 Biosensores según el receptor biológico

Teniendo en cuenta el elemento de reconocimiento biológico y la naturaleza de la interacción, los biosensores se pueden dividir en dos grandes categorías:

Biosensores catalíticos: En este tipo de biosensores, la reacción de afinidad o reconocimiento biológico produce una modificación química del analito, que hace posible la detección. Las biomoléculas receptoras (biocatalizadores) pueden ser enzimas o sistemas multienzimáticos aislados, orgánulos celulares, células completas o tejidos animales o vegetales en los que estos sistemas se encuentran en su medio natural.

Biosensores de afinidad: se basan en la interacción del analito de interés con el receptor biológico, sin que exista transformación catalítica, produciéndose una reacción de equilibrio en la que se forma un complejo analito-receptor. Esta reacción es una reacción de afinidad con un enlace esencialmente irreversible. Entre los receptores de bioafinidad son de mencionar los anticuerpos, lecitinas, ADN, aptámeros y PNAs.

1.2.2 Biosensores según el transductor

Transductores electroquímicos: transforman la señal producida por el elemento de reconocimiento con el analito en una señal eléctrica cuantificable. Son los sensores más desarrollados hasta el momento debido a que son simples de fabricar y de usar, rápidos y fiables. Entre estos biosensores los *biosensores amperométricos*⁹ miden la intensidad de la corriente eléctrica asociada al flujo de electrones involucrados en los procesos redox (que se producen por la reacción biológica que ocurre en los electrodos), los *biosensores potenciométricos*¹⁰ usan electrodos selectivos a ciertos iones para determinar los cambios en la concentración de los iones escogidos y los *biosensores*

conductométricos determinan cambios en la conductancia asociados con cambios en el ambiente iónico de las soluciones. Hemos de resaltar, como una variante de los biosensores potenciométricos y haciendo uso de la tecnología del silicio, los biosensores basados en transistores de efecto campo (FET)^{11,12}, que se fundamentan en las variaciones de potencial producidas entre una aislante (que recubre al silicio) y un electrolito cargado unido a su superficie. Constan de tres microelectrodos, estando uno de ellos modificado por el receptor biológico, el cual se encuentra sumergido en un medio líquido junto con un electrodo de referencia. La interacción con el analito produce un cambio en la intensidad de la corriente entre los otros dos electrodos cuando se ha aplicado una diferencia de potencial entre ellos.

Transductores mecanoacústicos: Los transductores acústicos o de masa, miden los cambios en la frecuencia básica de oscilación de un cristal (9-14 Hz), cuando se genera un incremento de masa en su superficie debido a una reacción de reconocimiento molecular. A este grupo pertenecen los sistemas basados en cristales piezoeléctricos, los cuales vibran con una frecuencia determinada al estar sometidos a una señal eléctrica externa. Un cambio de masa en su superficie produce un cambio en su frecuencia de resonancia, que viene relacionada por la expresión $\Delta m = \frac{m_c \Delta f}{f}$, con m_c la masa del cristal y f la frecuencia de resonancia. Este es el caso de la microbalanza del cristal de cuarzo (QCM)¹³. Cuando la oscilación sólo se produce en la superficie del cristal, en vez de todo el volumen, los biosensores se denominan de onda acústica superficial (SAW).

Por otro lado, los transductores mecánicos¹⁴, son estructuras móviles o flexibles que permiten medir la interacción bioquímica que se produce en su superficie a partir de sus efectos en el comportamiento estático (cambio de deflexión) y/o dinámico (cambio de la frecuencia) del propio transductor. Los más utilizados son los que usan micropalanca fabricadas con la tecnología estándar del silicio¹⁵⁻¹⁷, aunque pueden utilizarse otros materiales¹⁸, como polímeros o materiales piezoeléctricos. Son muy sensibles y permiten detectar el movimiento a escala nanométrica, sin embargo están todavía en desarrollo, pues la interpretación de la señal obtenida por la interacción bioquímica que se produce es compleja, ya que hay una gran cantidad de variables que afectan al movimiento de la micropalanca.

Transductores ópticos: son aquellos que detectan la reacción de reconocimiento a través de cambios producidos en la propagación de la luz, ya sea a través de la longitud de onda, intensidad (debido a cambio de absorción o dispersión) o velocidad (cambios de índice de refracción).

Los transductores ópticos serán los que más atención se dedique en este capítulo. Su utilización presenta claras ventajas sobre los transductores electroquímicos, ya que no es necesario un electrodo de referencia, no existe interferencia eléctrica, se pueden utilizar en ambientes que resulten agresivos para los eléctricos y pueden efectuarse medidas a diferentes longitudes de onda. Suelen ser más sensibles, poseen mayor estabilidad mecánica, menor tamaño y peso más reducido.

La implementación de los transductores ópticos puede realizarse a través de los componentes ópticos convencionales (fibras ópticas, prismas, espejos, divisores de haz...). Sin embargo, esta forma de proceder puede tener una serie de desventajas, como

son un elevado tamaño y peso de los elementos ópticos citados, que impiden una integración y miniaturización del dispositivo y por tanto su manejo y transporte es peor, disminuyendo además la estabilidad del sistema de medida, con el correspondiente incremento del ruido en la señal detectada. Por ello, para solventar estos problemas, los biosensores ópticos comienzan a desarrollarse bajo el marco de la fotónica integrada.

1.3 Fotónica integrada

El término Óptica Integrada (mejor llamado fotónica integrada) fue introducido por primera vez en 1969 por Miller¹⁹, para describir la idea inicial de crear circuitos integrados ópticos análogos a los electrónicos, en que se utilizaran fotones en lugar de electrones. De esta forma, no sólo quedaban satisfechas las demandas requeridas por el campo de las telecomunicaciones, que solicitaba la necesidad de transmitir una gran cantidad de información a gran velocidad y que pudiera llegar a cualquier lugar, sin prácticamente atenuación ni distorsión alguna. También quedaban satisfechas las demandas requeridas por los campos medioambientales, de la medicina, de la clínica y de la industria alimentaria y militar, que demandaban biosensores ópticos estables, robustos y compactos, que tuvieran un fácil acceso a la zona de la interacción con la luz y que fueran altamente sensibles. En la actualidad, estos biosensores deben tener una alta capacidad de multianálisis y poder integrarse con sistemas microelectrónicos y micromecánicos muy precisos, haciendo uso de la tecnología CMOS. Esta integración permite obtener un sistema total de menor coste, altamente sensible y multianalítico, en que las distintas funciones ópticas, electrónicas, de fluidica y de recogida y procesado de la señal de medida, junto con las fuentes de inserción de luz, queden integradas en lo que se llamará un Microsistema Total de Análisis (μ -TAS).

Tres descubrimientos claves en la década de los sesenta revolucionaron la óptica moderna e iniciaron el nuevo campo de la optoelectrónica. El primero fue el invento del láser por T.H.Maiman en 1960, el segundo gran acontecimiento se produjo con la fabricación de los dispositivos ópticos semiconductores para la generación y detección de luz (propuestos en 1963 por Z.I. Alferov y H. Kroemer) y el tercero la implementación de nuevas técnicas de fabricación para la obtención de fibras baratas, con pérdidas de propagación muy bajas (en 1970 se presenta la primera fibra óptica con pérdidas de 17 dB/km, una fibra óptica de sílice dopada con titanio). Estas pérdidas estaban por debajo del umbral de 20 dB/km, valor límite para que las fibras ópticas puedan ser aplicadas como medio de transmisión en las líneas de comunicaciones, tal como fue propuesto por Charles Kao en su tesis doctoral en 1966. El primer enlace trans-oceánico fue el TAT-88 y comenzaría a operar en 1988. Desde entonces se ha empleado fibra óptica en multitud de enlaces transoceánicos, entre ciudades y poco a poco se va extendiendo su uso desde las redes troncales de las operadoras hacia los usuarios finales.

Así, la óptica clásica, que inicialmente hacía uso de los elementos convencionales ópticos, como lentes, espejos, filtros, etc. estaba obligada a describir una familia mucho más compleja de dispositivos como láseres, detectores de semiconductor, moduladores de luz, etc. Su funcionamiento debía describirse tanto en términos de óptica como de electrónica, apareciendo una nueva disciplina llamada *fotónica*²⁰.

La aparición de nuevos dispositivos fotónicos, resultantes de la unión de la óptica y de la electrónica, hace que aparezcan otras subdisciplinas dentro de la fotónica: *la electro-óptica, la óptica cuántica, la electrónica cuántica y la óptica no lineal*, entre otras. La rama de la óptica que combina alguna de estas disciplinas es la llamada *óptica integrada*, o en forma más precisa, *fotónica integrada*.

El elemento esencial de la fotónica integrada es la guía de ondas²¹, una estructura por la que la luz viaja por reflexión total interna (TIR) en una película delgada llamada núcleo, de un índice de refracción mayor que el de los medios que le rodean (Figura 2). Cuando el ángulo de incidencia de la luz, φ , supera un valor denominado ángulo crítico, toda la radiación que incide sobre la intercara del núcleo con los medios que lo rodean es reflejada hacia el interior del núcleo y la luz permanece guiada por la estructura. Con esta guía de ondas básica se pueden fabricar diversos dispositivos ópticos, similares a los de la óptica convencional, sobre un único sustrato, como pueden ser interconectores, divisores de potencia, reflectores de guías de onda, acopladores direccionales, polarizadores, divisores de haz, moduladores de fase, moduladores de intensidad, conversores de modos TE – TM, etc. De este modo se elimina la necesidad de ajustes mecánicos entre componentes y la inestabilidad de los sistemas ópticos convencionales, además de lograr dispositivos más robustos, compactos, de pequeño tamaño y bajo coste. Otras ventajas son el fácil alineamiento de sus elementos ópticos, la alta velocidad de operación, el pequeño voltaje necesario para controlar la luz, la alta densidad de potencia que puede transmitirse, la posibilidad de interactuar con efectos acusto-ópticos, etc. Debido a la pequeña longitud de onda empleada en fotónica integrada, propia de la luz guiada, es posible llegar a miniaturizar los elementos ópticos como si de circuitos electrónicos se tratara, obteniendo circuitos y dispositivos ópticos integrados del orden de micras.

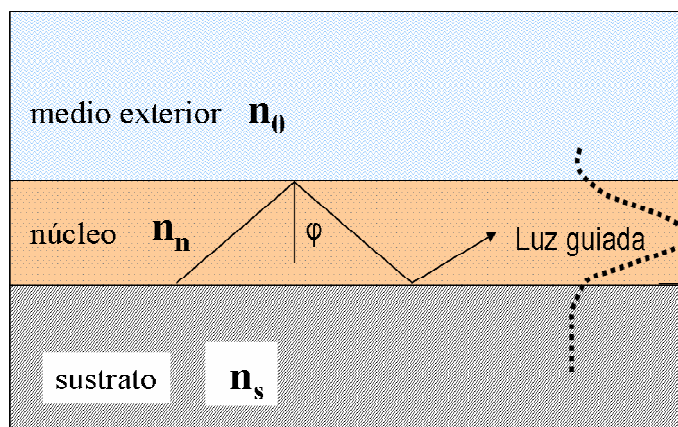
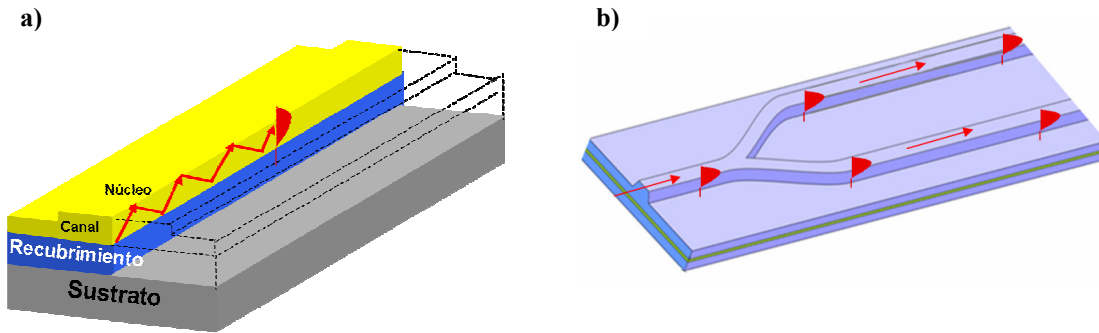


Fig.2 Estructura básica de la guía de ondas

Sin embargo, este pequeño tamaño de los dispositivos tiene también desventajas, como la pequeña zona de interacción para lograr ciertos efectos sobre el control de la luz (modulación, conmutación, etc) o como las pérdidas que se producen en las guías de onda (sobre todo en los tramos curvos), lo que ha limitado el número de componentes que se puedan integrar en un único sustrato. Además, la estructura de las capas que configuran las guías de onda han de tener una calidad óptica muy alta (baja rugosidad, elevada uniformidad), para conseguir unas condiciones óptimas de guiado (bajas pérdidas de propagación e inserción, pequeña dispersión, etc).

Las guías ópticas más empleadas para el diseño y fabricación de complejas estructuras geométricas de guiado²² (guías curvas, uniones en Y, acopladores direccionales, uniones en U, uniones Y-Y, divisores 3dB, acelerómetros, V-grooves, etc) son las guías de onda acanaladas, en las que el confinamiento de la luz se produce en dos dimensiones a lo largo de canales con una anchura de unas pocas micras, frente a las guías de onda planas, en las que la luz viaja confinada en una sola dimensión y que históricamente fueron las primeramente fabricadas. Los medios que rodean al núcleo son llamados recubrimientos de sustrato y de núcleo (que muchas veces es el medio externo).



Entre las muchas guías de onda acanaladas, tres son las más comunes y ampliamente usadas en la fabricación de dispositivos fotónicos integrados. La primera es la *guía de ondas stripe* y es la más sencilla de construir, en donde se deposita una capa de un material de índice de refracción más alto que el del sustrato y por un proceso de ataque se consigue el escalón, tal como aparece en la Figura 4 (a). Si el proceso de ataque no es completo y no llega al sustrato, tenemos también una guía de ondas acanalada, a pesar de que la altura y el espesor de la estructura han sido controlados, pues la luz queda confinada por la diferencia de espesor entre el núcleo y la capa lateral. Es la llamada *guía de ondas rib* (Figura 4 (b)) y es la que usaremos en esta Tesis. También se pueden construir guías acanaladas depositando un canal cuyo índice de refracción sea mayor que el del medio externo, pero menor que el del núcleo, tal como se ve en la Figura 4 (c). El otro tipo de guía de ondas es la *guía de ondas acanalada enterrada* (Figura 4 (d)). En este caso la guía de ondas se fabrica induciendo un crecimiento local en el índice de refracción del sustrato, generalmente a través de métodos de difusión.

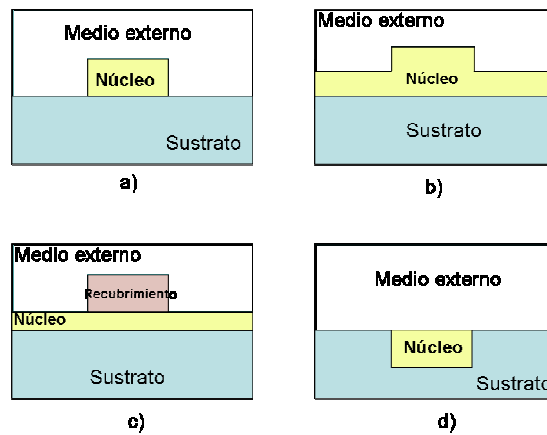


Fig. 4 Diferentes tipos de guías de ondas acanaladas según el método empleado para conseguir el confinamiento lateral de la luz.

Son varios los materiales que se usan como sustratos de las guías acanaladas, en función de las aplicaciones que se quieran realizar. Entre ellos tenemos el vidrio²³, el niobato de litio (LiNbO_3)^{24, 25}, los semiconductores III-V^{26,27}, los polímeros^{28,29} y el silicio^{30,31}. El silicio es el más adecuado para el desarrollo de biosensores ópticos integrados, porque:

1. Es un material que se puede obtener a bajo coste y con muy alta calidad.
2. Es un material compatible con la tecnología microelectrónica, por lo que los dispositivos ópticos y microelectrónicos pueden integrarse en el mismo sustrato, a través de la tecnología planar, que está muy desarrollada.
3. Las excelentes propiedades mecánicas del silicio permiten utilizar técnicas de micromecanizado para la fabricación de gran variedad de microdispositivos (guías acanaladas con escalones de alturas del orden de nanómetros; V-grooves para las fibras ópticas, marcas de alineamiento, cubetas, válvulas y bombas; dispositivos para microdesplazamientos, aprovechando las propiedades eléctricas o térmicas del material; etc) y así formar los denominados microsistemas.
4. Es un material que permite un alto contraste de índices entre el núcleo de las guías y su recubrimiento, lo que permitirá que la luz vaya muy poco confinada por el núcleo y gran parte de ella se extienda por sus alrededores (campo evanescente). Como veremos en el Capítulo 1, esta propiedad permitirá obtener biosensores ópticos con una alta sensibilidad superficial.

Para la fabricación de los dispositivos ópticos integrados basados en el silicio, se hace uso de la tecnología planar²², en que todos los componentes están localizados en la superficie superior del sustrato de silicio. El primer paso a seguir en esta tecnología, es la *fabricación de las obleas*, proceso que se puede obtener mediante diversos métodos como el Czochralski o el método de zona flotante. A continuación, éstas se oxidan mediante un *proceso de oxidación térmica*, la cual puede ser *seca* o *húmeda*, si se usa vapor de agua u oxígeno en el proceso. Para transferir los motivos geométricos que determinarán la geometría final del dispositivo, se realizan *procesos de fotolitografía o grabado* (mediante una material fotosensible o *fotoresina*) y *ataque*, el cual también puede ser *químico o húmedo y seco*, en función de si los agentes atacantes están en disolución en un medio acuoso o si el mecanismo del ataque ocurre en atmósfera gaseosa. En este último, los mecanismos pueden ser puramente físicos

(*sputtering*, i.e.), químicos (*ataque por plasma*) o una combinación de ambos (*RIE* o *haz de iones reactivos*).

En muchas ocasiones es necesario añadir ciertos tipos de dopantes (boro, arsénico o fósforo) en el sustrato o en las capas crecidas, mediante un *proceso de impurificación* a través de mecanismos como *la difusión* o *la implantación iónica*. De esta forma las propiedades (ópticas, mecánicas, térmicas, etc.) de los materiales que constituyen el dispositivo final pueden ser muy variadas y llegar a controlarse en función de la aplicación requerida. En otros muchos casos, se puede querer depositar capas delgadas de diversos materiales como óxidos, polisilicio, metales, semiconductores, etc. Las *técnicas de deposición* son muy variadas y dependen si en el proceso se produce una reacción química o física. Así, si en el proceso hay reacción química (*deposición química en fase de vapor* o *CVD*), podemos hablar de las técnicas *CVD a presión atmosférica*, de la técnicas *CVD a baja presión (LPCVD)* o de la técnicas *CVD asistidas por plasma (PECVD)*, entre otras. Sin embargo si el mecanismo de la reacción en el proceso de deposición es físico, estaremos hablando de la *deposición física en estado de vapor* o *PVD*, que puede realizarse mediante técnicas como las de *evaporación*, la de *sputtering* o por *epitaxia de haces moleculares (MBE)*.

Para conseguir integrar los dispositivos ópticos fabricados con los circuitos eléctricos, se implementan electrodos metálicos en las áreas de interés³². Para ello, se evapora el metal sobre el sustrato mediante un proceso de *metalización*. Los mecanismos de metalización son muy variados y muchas veces se usan técnicas como las de *PVD* o las de *sputtering*. Una vez realizados los contactos eléctricos y dependiendo de las propiedades ópticas de los materiales crecidos, el dispositivo óptico ya fabricado puede utilizarse para las aplicaciones requeridas.

1.4 Biosensores ópticos integrados

La mayoría de los biosensores ópticos integrados tienen en común (Figura 5) el hecho de que *la guía de ondas* (incluimos también la *fibra óptica*, constituyendo los biosensores de *fibra óptica* u *optodos*³³) es la estructura básica que los forma y que el principio de detección utilizado por todos ellos es el del *campo evanescente*. Aunque la luz en una guía de ondas se propaga confinada prácticamente en el núcleo de la misma (modos guiados), hay una parte de ella (denominada campo evanescente) que se extiende por los medios adyacentes (recubrimiento o medio externo) y que decae exponencialmente con la distancia al núcleo (distancia de penetración). Esta distancia de penetración suele ser de unos cientos de nanómetros (50-500 nm) y es la que permite detectar los cambios que se producen en el medio externo cuando una reacción bio(química) se está llevando a cabo (entre el receptor biológico inmovilizado en la superficie de la guía y el analito que reacciona). La magnitud del cambio en la propagación de la luz, depende de la concentración del analito y de la constante de afinidad de la interacción, obteniendo así una medida cuantitativa de esta interacción.

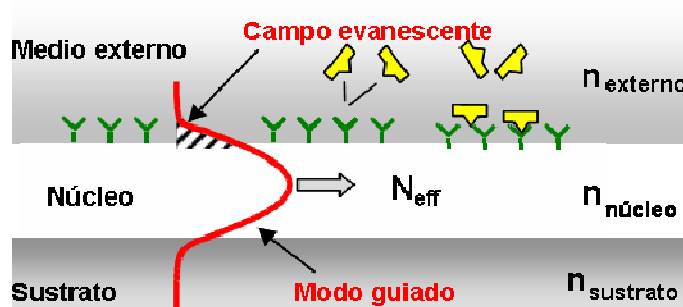


Fig. 5 Guía de ondas convencional por la cual se propaga un modo electromagnético guiado. Observamos su campo evanescente interactuando con el medio externo.

Las guías de onda de los biosensores ópticos integrados, pueden ser guías de ondas dieléctricas convencionales (Figura 2), ya descritas en el apartado anterior, en que la luz se propaga por un medio dieléctrico (núcleo) rodeado de otros dos de índice de refracción menor (recubrimiento) y las basadas en el fenómeno de resonancia de plasmón superficial (SPR), por la excitación de plasmones (densidades de carga) superficiales que se propagan en la interfaz de un metal y un dieléctrico. Estas últimas dan lugar al biosensor de plasmón de resonancia superficial³⁴ (SPR), que es un biosensor ya comercializado y ampliamente descrito en la literatura.

Como se ha comentado anteriormente, en los biosensores ópticos integrados los analitos a detectar inducen un cambio en el índice de refracción del medio exterior. Si el cambio de índice se produce en la parte imaginaria del índice de refracción (o constante de absorción), hablamos de *biosensores de absorción*, que necesitan una referencia para poder eliminar las posibles variaciones de intensidad debidas a las fuentes de luz. Mucho más empleados y sensibles, son los biosensores que detectan cambios en la parte real del índice de refracción del medio exterior y que generan una variación en la velocidad de propagación de la luz guiada, o lo que es lo mismo, en su índice de refracción efectivo. Entre otros y que serán descritos a continuación, tenemos: el biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR), el acoplador por red de difracción (grating coupler), el espejo resonante (resonant mirror) y los biosensores interferométricos (como son el interferómetro de polarización o de Fabry-Perot y el de Young o el interferómetro Mach-Zehnder, que proporcionan una referencia interna para compensar las posibles fluctuaciones de índice de refracción, adsorciones inespecíficas o cambios de temperatura). En la siguiente tabla se muestran los límites de detección de algunos de estos biosensores ópticos de campo evanescente.

Tabla 2: Límites de detección de los biosensores de campo evanescente

Transductor	Límite de detección (pg/mm ²)
SPR	1-5
Espejo resonante	6
Acoplador de red	1-10
Interferómetro de polarización	2
Interferómetro de Young	0.2
Interferómetro Mach-Zehnder (MZI)	0.06 (en esta Tesis)

1.4.1 Acoplador de red (Grating coupler)

Propuesto primeramente por Tiefenthaler³⁵ y Lukosz³⁶ en 1989, este biosensor consta de una red de difracción fabricada en una guía de ondas con un núcleo de alto índice de refracción ($n=1.75-1.92$, SiO₂ dopado con TiO₂) sobre un sustrato de bajo índice (generalmente vidrio), que permite obtener un valor alto en la longitud de penetración del campo evanescente y por tanto un biosensor muy sensible. La red de difracción permite acoplar la luz en la guía de ondas y el ángulo al que se produce el acoplo cambia cuando se produce una variación en el índice de refracción del medio exterior a la guía (Figura 6). Las medidas se pueden realizar, midiendo el ángulo de acoplo o el de desacoplo³⁷.

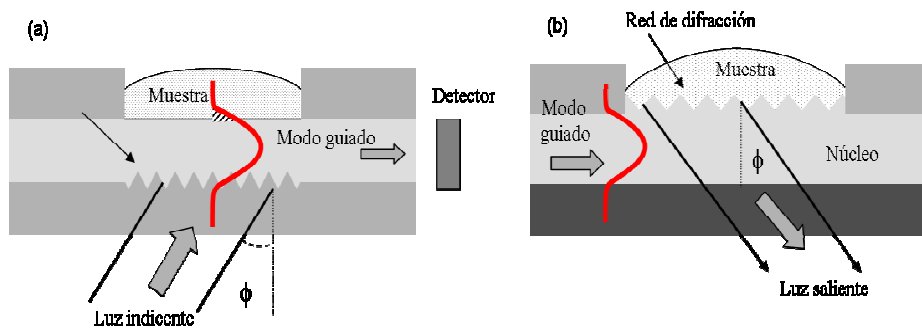


Fig. 6 Esquema del acoplador por red de difracción. Las medidas se pueden realizar midiendo a) el ángulo de acoplo o b) el ángulo de desacoplo

Son muchas las aplicaciones que se han realizado con el acoplador de red como biosensor óptico integrado. En todas ellas, los receptores biológicos se inmovilizan sobre la red de difracción. Las aplicaciones más conocidas³⁸⁻⁴⁰ son las de detección de drogas, de pesticidas (con un límite de detección del orden nM) e iones metálicos y las del estudio de la afinidad de ciertas reacciones y cinética de células vivas.

1.4.2 Espejo resonante (Resonant Mirror)

Su principio de operación está basado en la reflexión interna total frustrada y fue propuesto en 1993 por R. Cush y colaboradores⁴¹ (Figura 7). El dispositivo es un prisma con el que se acopla luz, a través de una capa dieléctrica de bajo índice (con un espesor de 1 mm), en una guía de ondas de alto índice (de espesor alrededor de los 100 nm). La luz, que se acopla en la guía, inmediatamente se desacopla, experimentando un cambio de fase de π . Este ángulo de resonancia depende del índice de refracción del medio exterior a la guía y para determinarlo se incide con una haz polarizado lineal a 45° y se analiza la luz reflejada con un polarizador cruzado. El detector a la salida del analizador sólo medirá intensidad cuando la polarización TE (transversal eléctrica) o TM (transversal magnética) pase por el ángulo de resonancia. El dispositivo se puede usar variando el ángulo y manteniendo constante la longitud de onda o fijando el ángulo y cambiando la longitud de onda.

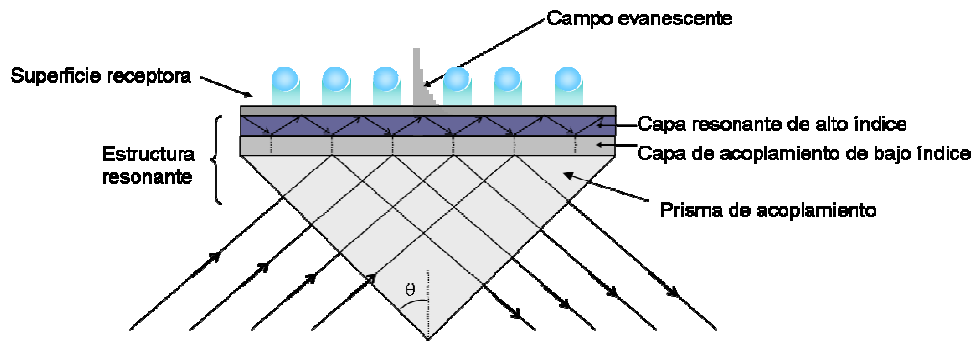


Fig. 7 Esquema del espejo resonante (Resonant Mirror)

Este dispositivo ha sido empleado para numerosas aplicaciones, como en la detección de la hibridación de ADN⁴² y en el estudio de la cinética de interacción proteína-proteína⁴³.

1.4.3 Interferómetro de doble polarización

Propuesto inicialmente por Lukosz⁴⁴ en 1991, este dispositivo interferométrico se basa en una guía de ondas que soporta modos TE y TM, los cuales tienen diferentes constantes de propagación (Figura 8). La luz linealmente polarizada que incide en la guía, excita los modos TE y TM que se propagan por el núcleo de la guía, de tal forma que la luz recogida a la salida tendrá polarización elíptica. El estudio del grado de esta elipticidad nos dará información de los procesos que han tenido lugar en el medio exterior a la guía.

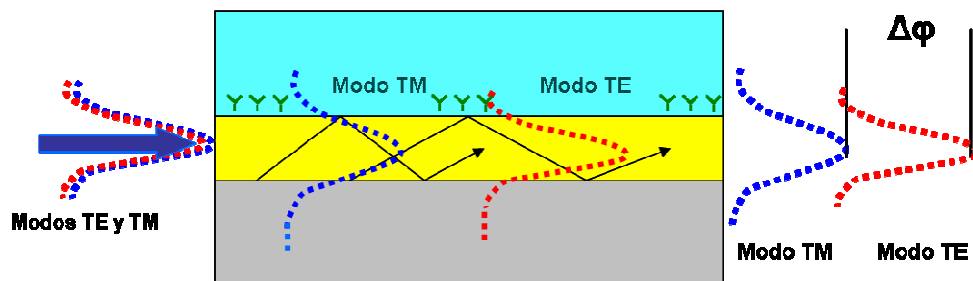


Fig. 8 Esquema del biosensor basado en el interferómetro de doble polarización

Entre sus aplicaciones tenemos su uso como refractómetro y como sensor bioquímico⁴⁵, con límites de detección de 2 pg/mm^2 en adsorción superficial⁴⁶.

1.4.4 El biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR)

Es un dispositivo basado en el fenómeno de resonancia de plasmón superficial⁴⁷, debido a la excitación de plasmones superficiales en la interfaz de un metal y un dieléctrico^{48,49}. Un plasmón superficial es una oscilación de la densidad de carga superficial que se propaga en la interfaz de un medio dieléctrico y un metal. La intensidad máxima del plasmón superficial se localiza en dicha interfaz, mientras que su amplitud decae exponencialmente, en ambos medios, con la distancia a la interfaz.

(campo evanescente). Para generar un plasmón superficial se debe excitar la superficie del metal en contacto con el dieléctrico, de manera que verifique la condición de resonancia, es decir, que los vectores de la onda incidente y del plasmón superficial coincidan (condición de resonancia). De esta forma, atendiendo a la Figura 9, se debe satisfacer la siguiente relación:

$$k_{sp} = k_{x,d} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\epsilon_m \cdot \epsilon_d} \quad (1)$$

con k_{sp} el vector de onda de propagación de los plasmones superficiales y $k_{x,d}$ la componente paralela del vector de ondas de la luz en la intercara metal-dieléctrico. Las constantes dieléctricas de los medios metal y dieléctrico son ϵ_m y ϵ_d respectivamente. Es importante destacar que los plasmones superficiales son ondas TM, se excitan por tanto solamente con la polarización TM de la luz para frecuencias situadas en el rango visible del espectro, con altas pérdidas en el infrarrojo cercano. En la Figura 9, el ángulo θ es el ángulo incidente de la luz, que se convierte en el *ángulo de resonancia* cuando se produce la excitación óptica de los plasmones superficiales.

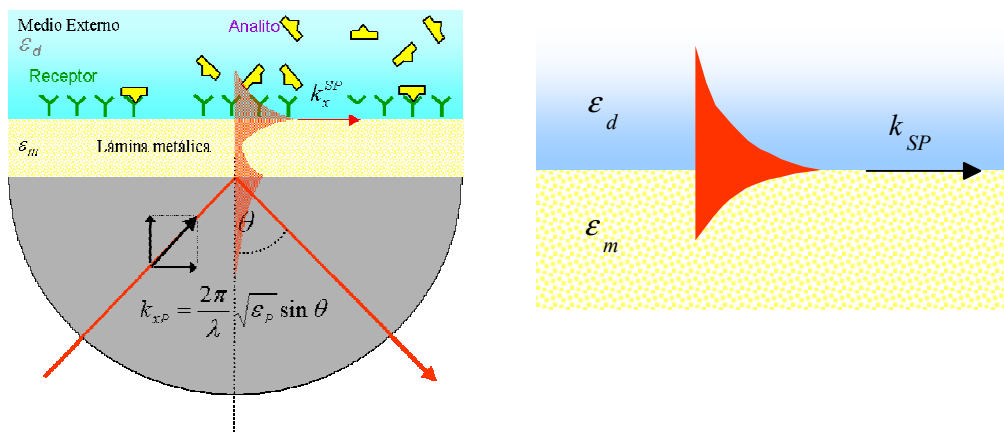


Fig. 9 Descripción del fenómeno de resonancia de plasmón superficial

Cuando se alcanza la condición de resonancia, se observa un mínimo en la intensidad de la luz reflejada para el ángulo de resonancia. El espesor de la capa metálica es un parámetro crítico para obtener esta condición y para el oro alcanza un valor en torno a los 50 nm para una longitud de onda de $\lambda=633$ nm.

Existen varios métodos para lograr la excitación de los plasmones superficiales (por reflexión total interna en estructuras acopladas por prisma, por redes de difracción y mediante luz guiada en una guía recubierta con una película delgada de metal). El más común es el que fue propuesto por Kretschmann y Raether⁴⁹, en el que se coloca una lámina delgada de metal sobre la base de un prisma, de modo que al hacer incidir la luz a través del prisma, se puede excitar el plasmón superficial en la intercara metal-dieléctrico (Figura 10). El ángulo de incidencia de la luz al que se produce la resonancia depende, entre otros factores, del índice de refracción del medio exterior al metal, por lo que esta configuración puede usarse como biosensor⁵⁰ para estudiar las reacciones biológicas que ocurran en el medio externo, sobre la lámina metálica.

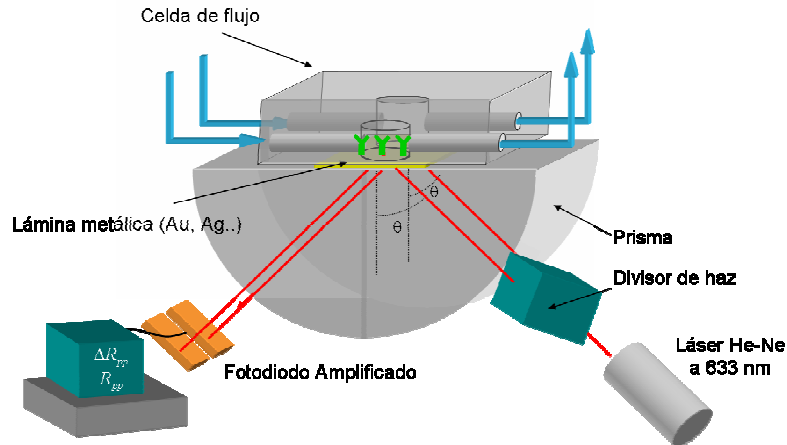


Fig. 10 Biosensor de resonancia de plasmón superficial de doble canal

Son muchas las aplicaciones que se presentan en la literatura con el biosensor SPR⁵¹. Entre las más comunes podemos citar las aplicaciones en el campo medioambiental⁵²⁻⁵⁴ (detección de contaminantes), las aplicaciones en el campo de la genética^{55,56} (diagnóstico de enfermedades genéticas, secuenciación de ADN, etc.), las que estudian la cinética de interacción⁵⁷⁻⁵⁹ (entre parejas antígeno-anticuerpo, proteína-proteína, ADN-proteína, ADN-ADN etc.) o las aplicaciones en el campo clínico⁶⁰ (detección de agentes patógenos y drogas).

Como se comentó en la Tabla 2, el límite de detección de este biosensor óptico está en torno a 1-5 pg/mm² de material biológico adsorbido en la superficie sensora. Este límite no es suficiente para la detección de bajas concentraciones de moléculas de bajo peso molecular (<1000 unidades de masas atómicas). De esta forma es necesario mejorar su sensibilidad y para ello se han descrito en la literatura varias configuraciones para mejorar estos límites de detección^{61,62}. En estas configuraciones las sensibilidades de los biosensores SPR crecen en un orden de magnitud y se acercan a los límites de detección de los biosensores ópticos interferométricos⁶³, que en la actualidad son los biosensores ópticos de medida directa más sensibles conocidos hasta ahora.

1.4.5 El biosensor basado en el interferómetro Fabry-Perot

El interferómetro Fabry – Perot (Figura 11) consta de una guía de ondas recta acanalada y monomodo. Los cantos de la guía actúan como espejos resonantes, por lo que la guía de ondas se convierte en un resonador Fabry-Perot. La luz se refleja hacia delante y hacia atrás y en cada reflexión, parte de la luz guiada se desacopla. La intensidad transmitida varía periódicamente con la diferencia de fase de las ondas que se reflejan y transmiten en las fronteras núcleo-recubrimiento y guía-aire, pudiéndose controlar con la temperatura y viene dada por la función de Airy:

$$I_t = \frac{T^2}{(1-R)^2 + 4R \sin^2(\Phi)} \cdot I_0 \quad (2)$$

siendo I_0 y I_T las intensidades de los haces de entrada y de salida de la guía respectivamente, mientras que R es la reflectividad de los espejos. La fase interferométrica Φ , que puede controlarse con la temperatura, viene dada por:

$$\Phi = \frac{4\pi}{\lambda} N_{eff} L \quad (3)$$

donde L es la longitud de la guía, λ la longitud de onda y N_{eff} el índice de refracción efectivo del modo guiado. Cuando el interferómetro Fabry-Perot actúa como biosensor, las reacciones biológicas⁶⁴ que ocurren en su superficie inducen un cambio en la fase de la luz guiada, que se verá reflejado como un cambio periódico en la intensidad a la salida de la guía de ondas.

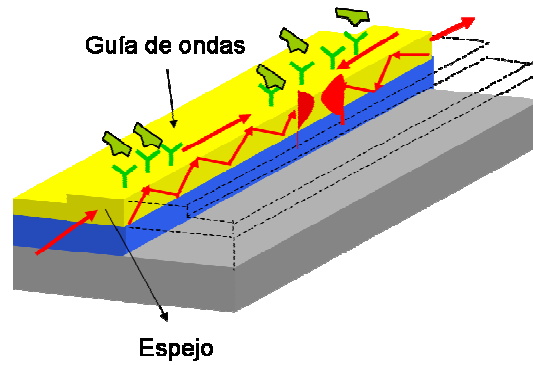


Fig. 11 Biosensor óptico interferométrico Fabry-Perot

1.4.6 El interferómetro Mach-Zehnder integrado

El interferómetro Mach-Zehnder integrado es un dispositivo óptico con la configuración mostrada en la Figura 12. La luz se propaga por una guía de ondas acanalada que se divide en dos haces por medio de un divisor en Y. Cada haz viaja por una rama del interferómetro (rama sensora y de referencia) para luego recombinarse en una guía de salida mediante otra unión en Y, produciéndose la interferencia de ambos haces. En la rama sensora, el campo evanescente interactúa con la interacción biológica a detectar, la cual induce un cambio en la fase de la luz que viaja por dicha rama respecto a la que lo hace por la rama de referencia. A la salida del sensor ambos haces interferirán, lo que produce una variación de la intensidad que es función del $\cos(\Delta\varphi)$, siendo $\Delta\varphi$ el desfase producido en la rama sensora. Por lo tanto, la señal a la salida del dispositivo vendrá dada por:

$$I_T = I_S + I_R + 2\sqrt{I_S I_R} \cos \Delta\varphi_S \quad (1)$$

$$\Delta\varphi_S = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot l \cdot \Delta N_{eff} \quad (2)$$

donde I_T es la intensidad de salida del MZI, I_S e I_R son, respectivamente, las intensidades de luz en las ramas sensora y de referencia y $\Delta\varphi_S$ la variación de fase experimentada entre la luz que viaja por la rama sensora y la de referencia. Esta variación de fase depende de la longitud del área sensora, de la longitud de onda λ de trabajo y de la diferencia de los índices de refracción efectivos en ambas ramas

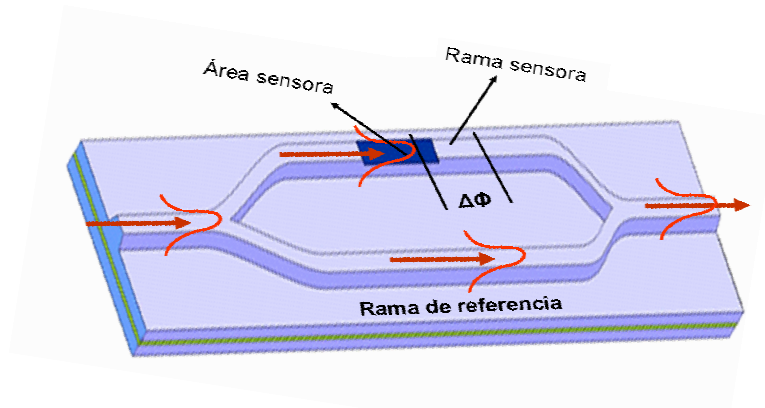


Fig. 12 Interferómetro Mach-Zehnder (MZI)

Debido a que la rama de referencia reduce los problemas de deriva térmica, adsorción inespecífica, etc. el interferómetro Mach-Zehnder se ha convertido en el biosensor óptico de medida directa más sensible (con una sensibilidad superficial de 10^{-4} nm^{-1}), con límites de detección teóricos del orden de fg/mm^2 de capa molecular adsorbida, que corresponde a un espesor promedio de capa biológica detectada de 10^{-4} nm , o lo que es lo mismo, un nivel de detección directa del orden de pM . El MZI puede detectar moléculas biológicas muy pequeñas, de peso molecular menor a 100 unidades de masa atómica, por lo que se pueden llevar a cabo muchas aplicaciones biosensoras de interés. De hecho, ya algunas aparecen descritas en la literatura^{31,65-74} como por ejemplo la detección de gases, de pesticidas, de reacciones inmunológicas e hibridación de ADN. En esta memoria de tesis doctoral, también como aplicaciones del biosensor MZI, se presentan la detección de reacciones de hibridación entre moléculas de ADN complementarias, la detección de mutaciones en el ADN y la detección del pesticida carbaril mediante un inmunoensayo de inhibición.

A pesar de esta alta sensibilidad, el MZI integrado tiene también una serie de desventajas, como son:

1. Complejidad en el diseño y fabricación del dispositivo
2. Problemas asociados con la periodicidad de la señal de salida del MZI (Figura 13), por lo que no se puede determinar de forma precisa el cambio de fase, pues es el mismo para múltiplos enteros de π , o su dirección (no se sabe si el índice de refracción efectivo de la guía crece o disminuye, o lo que es lo mismo, si las moléculas biológicas se unen o no al área sensora del MZI). Otro problema, asociado a esta periodicidad de la señal, es el no conocer el desfase inicial entre las dos ramas del MZI, por lo que el mismo estímulo puede producir diferente variación de señal dependiendo del punto de la curva de transmisión donde se encuentre el interferómetro.
3. Fluctuaciones en la intensidad de la fuente de luz, que pueden malinterpretarse como cambios de fase del interferómetro.

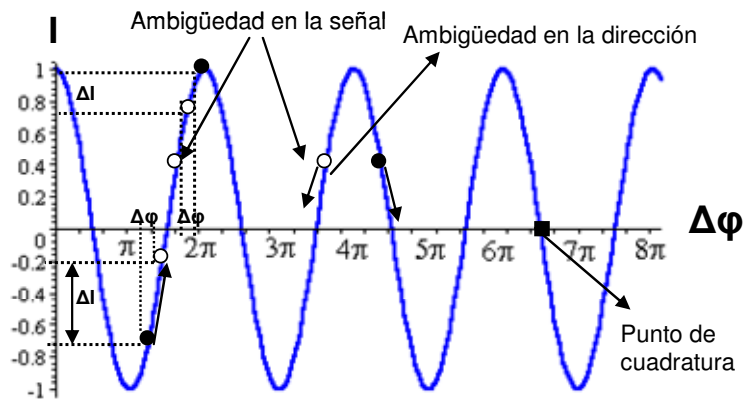


Fig. 13 Señal de respuesta del MZI donde se muestran las desventajas de su carácter periódico

Los problemas asociados con la periodicidad de la señal pueden solucionarse incorporando un sistema de modulación en la rama de referencia del MZI, de tal forma que se pueda elegir el punto de partida en la curva de transmisión⁷⁵. Entre los distintos métodos de compensación o modulación de fase propuestos se destacan las modulaciones electroóptica³², termoóptica, optomecánica⁷⁶ y magnetoóptica⁷⁷.

1.4.7 El interferómetro de Young

El interferómetro de Young⁷⁸ es una variante del interferómetro Mach-Zehnder (MZI). Al igual que en el MZI, el haz de luz se propaga por una guía de ondas acanalada y se divide en dos ramas (rama de referencia y rama sensora) por medio de una unión Y. Ambos haces (que forman un cono de luz a las salidas de las ramas) se recombinan y pueden ser proyectados en una pantalla, obteniendo así un patrón de franjas de interferencia, tal y como se observa en la Figura 14. La distribución de intensidad es detectada por un array de fotodetectores.

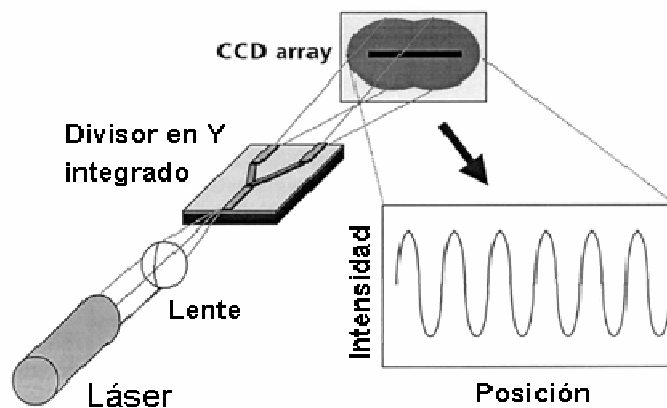


Fig. 14 Esquema del interferómetro de Young

Cuando el interferómetro de Young se emplea como biosensor, las moléculas que se unen a la rama sensora producen un desplazamiento lateral de las franjas. De esta forma podemos conocer el espesor de la capa biológica depositada.

Una de las desventajas de este dispositivo es la distancia a la que tiene que situarse el detector para obtener una máxima resolución. Sin embargo las ventajas^{79,80}

son varias, como la simplicidad del montaje experimental y las correspondientes a todo dispositivo óptico interferométrico (siempre que las ramas del dispositivo sean simétricas), como son la eliminación de las posibles fluctuaciones de índice de refracción, adsorciones inespecíficas, cambios de temperatura y longitud de onda.

Son varias las aplicaciones biosensoras descritas en la literatura empleando interferómetro de Young⁸¹⁻⁸⁴, todas ellas con un alto nivel de sensibilidad¹⁵¹. Las más comunes son la detección de inmunoreacciones pareja antígeno-anticuerpo, el estudio de capas biológicas delgadas y la dinámica de su formación o la detección y análisis estructural de proteínas y moléculas pequeñas .

1.5 Esquema general de la tesis

Esta Tesis Doctoral está centrada en el desarrollo un biosensor altamente sensible basado en interferómetros Mach-Zehnder integrados (MZIs) que han sido fabricados con tecnología microelectrónica estándar de silicio. Dos tipos de aplicaciones con este biosensor desarrollado se presentan en esta Tesis: la primera consiste en la detección de reacciones de hibridación entre cadenas de ADN complementarias y de mutaciones en esas cadenas. La segunda consiste en la detección de distintas concentraciones del pesticida carbaril.

En primer lugar, en este Capítulo 1 de introducción se ha definido qué es biosensor y se presentan las principales características de los biosensores ópticos, bajo el marco de la Fotónica Integrada. Más concretamente se describen los biosensores basados en los interferómetros Mach-Zehnder integrados, junto con sus ventajas e inconvenientes.

En el Capítulo 2 se introducen los fundamentos teóricos de la propagación de la luz en guías de onda TIR empleando el modelo óptico electromagnético. A continuación se modelizan las características que debe exhibir un interferómetro Mach-Zehnder integrado (MZI) para su aplicación biosensora, al igual que se presenta el diseño teórico que debe tener para su óptimo funcionamiento. Posteriormente se describe el proceso seguido para la fabricación de los MZIs y su caracterización morfológica.

En el Capítulo 3 se presenta la caracterización óptica de los MZIs y de las estructuras de guiado, junto con una descripción de los montajes experimentales empleados en la Tesis. Se realiza un análisis experimental de las sensibilidades de los MZIs que ya han sido caracterizados ópticamente y se compara con el análisis teórico realizado en el Capítulo 2. También se estudia la estabilidad (ruido y deriva del sistema) de cada uno de los sistemas experimentales empleados y se elige el más estable como sistema óptimo para la caracterización biosensora. A partir de este sistema óptimo, se calcula el límite de detección en la variación del índice de refracción externo del dispositivo.

En el Capítulo 4 se describen las técnicas empleadas para la correcta biofuncionalización del MZI integrado que permitirán su posterior desarrollo como dispositivo biosensor, junto con las dos aplicaciones llevadas a cabo, que son: la primera está centrada en el marco de la Genómica y consiste en la detección de reacciones de hibridación entre cadenas de ADN complementarias y de mutaciones en

esas cadenas. La segunda está enmarcada en el campo de la Proteómica y consiste en la detección de distintas concentraciones del pesticida carbaril mediante un ensayo de inhibición.

En el Capítulo 5 se debaten las perspectivas futuras del trabajo a realizar con el biosensor MZI. También se comentan las mejoras tecnológicas que pueden llevarse a cabo en este sistema, con el objetivo de convertirlo en un Microsistema Total de Análisis.

Para finalizar, en el Capítulo 6 se resumen las ideas más relevantes de la memoria, mostrando una visión general del trabajo presentado en esta Tesis.

Referencias

1. Clark, L. C. and Lyons, C., *Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1962. **102**(1): p. 29-&.
2. Walters, R. R., Moriarty, B. E., and Buck, R. P., *Pseudomonas Bacterial Electrode for Determination of L-Histidine*. Analytical Chemistry, 1980. **52**(11): p. 1680-1684.
3. Víctor González Rumayor, E. G. I., Olga Ruiz Galán, Lara Gago Cabezas, *Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria*. Informe de Vigilancia tecnológica, 2005.
4. Baird, C. L. and Myszka, D. G., *Current and emerging commercial optical biosensors*. Journal of Molecular Recognition, 2001. **14**(5): p. 261-268.
5. Vo-Dinh, T. and Cullum, B., *Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 2000. **366**(6-7): p. 540-551.
6. Nakamura, H. and Karube, I., *Current research activity in biosensors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003. **377**(3): p. 446-468.
7. Tiefenauer, L. and Ros, R., *Biointerface analysis on a molecular level - New tools for biosensor research*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2002. **23**(2-3): p. 95-114.
8. Collings, A. F. and Caruso, F., *Biosensors: recent advances*. Reports on Progress in Physics, 1997. **60**(11): p. 1397-1445.
9. Updike, S. J. and Hicks, G. P., *Enzyme Electrode*. Nature, 1967. **214**(5092): p. 986-&.
10. Cassiano, N. M., Ramos, L. A., and Capelato, M. D., *Electrodeposited lead dioxide about graphite as potentiometric sensor to the ions lead and sulphate*. Ecletica Quimica, 2001. **26**: p. 111-123.
11. Meixner, L. K. and Koch, S., *Simulation of Isfet Operation Based on the Site-Binding Model*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1992. **6**(1-3): p. 315-318.
12. Fritz, J., Cooper, E. B., Gaudet, S., Sorger, P. K., and Manalis, S. R., *Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(22): p. 14142-14146.
13. Zhou, X. C., Huang, L. Q., and Li, S. F. Y., *Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide*

- immobilization methods and the application in genetic diagnosis*. Biosensors & Bioelectronics, 2001. **16**(1-2): p. 85-95.
14. Singh-Zocchi, M., Dixit, S., Ivanov, V., and Zocchi, G., *Single-molecule detection of DNA hybridization*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(13): p. 7605-7610.
 15. McKendry, R., Zhang, J. Y., Arntz, Y., Strunz, T., Hegner, M., Lang, H. P., Baller, M. K., Certa, U., Meyer, E., Guntherodt, H. J., and Gerber, C., *Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(15): p. 9783-9788.
 16. Alvarez, M., Carrascosa, L. G., Moreno, M., Calle, A., Zaballos, A., Lechuga, L. M., Martinez-A, C., and Tamayo, J., *Nanomechanics of the formation of DNA self-assembled monolayers and hybridization on microcantilevers*. Langmuir, 2004. **20**(22): p. 9663-9668.
 17. Alvarez, M., Calle, A., Tamayo, J., Lechuga, L. M., Abad, A., and Montoya, A., *Development of nanomechanical biosensors for detection of the pesticide DDT*. Biosensors & Bioelectronics, 2003. **18**(5-6): p. 649-653.
 18. Gunter, R. L., Delinger, W. G., Manyoats, K., Kooser, A., and Porter, T. L., *Viral detection using an embedded piezoresistive microcantilever sensor*. Sensors and Actuators a-Physical, 2003. **107**(3): p. 219-224.
 19. Miller, S. E., *Integrated Optics - an Introduction*. Bell System Technical Journal, 1969. **48**(7): p. 2059-+.
 20. Lifante, G., *Integrated Fotonics Fundamentals*. 2002, Ed:Willey. Madrid.
 21. Tamir, T., *Guided -wave optoelectronics*. 1988. Ed:Springer. Berlin
 22. Llobera, A., *Integrated Optics Technology on Silicon: Optical transducers*, in *Departamento de Óptica*. Tesis, 2002. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.
 23. Zhu, P. X., Shelton, D. R., Karns, J. S., Sundaram, A., Li, S. H., Amstutz, P., and Tang, C. M., *Detection of water-borne E-coli O157 using the integrating waveguide biosensor*. Biosensors & Bioelectronics, 2005. **21**(4): p. 678-683.
 24. Cantelar, E., Torchia, G. A., Sanz-Garcia, J. A., Pernas, P. L., Lifante, G., and Cusso, F., *Tm³⁺-doped Zn-diffused LiNbO₃ channel waveguides*. Physica Scripta, 2005. **T118**: p. 69-71.
 25. Terlevich, L., Balsamo, S., Pensa, S., Pirola, M., and Ghione, G., *Design and characterization of a 10-Gb/s dual-drive Z-cut Ti: LiNbO₃ electrooptical modulator*. Journal of Lightwave Technology, 2006. **24**(6): p. 2355-2361.
 26. Stillman, G. E., Rossi, J. A., Heckscher, H., and Wolfe, C. M., *Low-Loss High-Purity Gaas Waveguides for Monolithic Integrated Optical Circuits at Gaas Laser Wavelengths*. Ieee Transactions on Electron Devices, 1975. **22**(11): p. 1060-1061.
 27. Boyd, R. W., Heebner, J. E., Lepeshkin, N. N., Park, Q. H., Schweinsberg, A., Wicks, G. W., Baca, A. S., Fajardo, J. E., Hancock, R. R., Lewis, M. A., Boysel, R. M., Quesada, M., Welty, R., Bleier, A. R., Treichler, J., and Slusher, R. E., *Nanofabrication of optical structures and devices for photonics and biophotonics*. Journal of Modern Optics, 2003. **50** (15-17): p. 2543-2550.
 28. Esinenco, D., Psoma, S. D., Kusko, M., Schneider, A., and Muller, R., *Su-8 micro-mosensor based on Mach-Zehnder interferometer*. Reviews on Advanced Materials Science, 2005. **10**(4): p. 295-299.

29. Shew, B. Y., Kuo, C. H., Huang, Y. C., and Tsai, Y. H., *UV-LIGA interferometer biosensor based on the SU-8 optical waveguide*. Sensors and Actuators a-Physical, 2005. **120**(2): p. 383-389.
30. Lechuga, L. M., *Optical sensors based on evanescent field sensing - Part II. Integrated optical sensors*. Quimica Analitica, 2000. **19**: p. 61-67.
31. Prieto, F., Sepulveda, B., Calle, A., Llobera, A., Dominguez, C., Abad, A., Montoya, A., and Lechuga, L. M., *An integrated optical interferometric nanodevice based on silicon technology for biosensor applications*. Nanotechnology, 2003. **14**(8): p. 907-912.
32. Heideman, R. G. and Lambeck, P. V., *Remote opto-chemical sensing with extreme sensitivity: design, fabrication and performance of a pigtailed integrated optical phase-modulated Mach-Zehnder interferometer system*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1999. **61**(1-3): p. 100-127.
33. Marazuela, M. D. and Moreno-Bondi, M. C., *Fiber-optic biosensors - an overview*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002. **372**(5-6): p. 664-682.
34. Nylander, C., Liedberg, B., and Lind, T., *Gas-Detection by Means of Surface-Plasmon Resonance*. Sensors and Actuators, 1982. **3**(1): p. 79-88.
35. Tiefenthaler, K., *Grating Couplers as Label-Free Biochemical Wave-Guide Sensors*. Biosensors & Bioelectronics, 1993. **8**(7-8): p. R35-R37.
36. Tiefenthaler, K. and Lukosz, W., *Sensitivity of Grating Couplers as Integrated-Optical Chemical Sensors*. Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics, 1989. **6**(2): p. 209-220.
37. Dubendorfer, J. and Kunz, R. E., *Compact integrated optical immunosensor using replicated chirped grating coupler sensor chips*. Applied Optics, 1998. **37**(10): p. 1890-1894.
38. Ramsden, J. J., *Sensitivity Enhancement of Integrated-Optic Sensors Using Langmuir-Blodgett Lipid Films*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1993. **16**(1-3): p. 439-442.
39. Piehler, J., Brandenburg, A., Brecht, A., Wagner, E., and Gauglitz, G., *Characterization of grating couplers for affinity-based pesticide sensing*. Applied Optics, 1997. **36**(25): p. 6554-6562.
40. Bieri, C., Ernst, O. P., Heyse, S., Hofmann, K. P., and Vogel, H., *Micropatterned immobilization of a G protein-coupled receptor and direct detection of G protein activation*. Nature Biotechnology, 1999. **17**(11): p. 1105-1108.
41. Cush, R., Cronin, J. M., Stewart, W. J., Maule, C. H., Molloy, J., and Goddard, N. J., *The Resonant Mirror - a Novel Optical Biosensor for Direct Sensing of Biomolecular Interactions. I. Principle of Operation and Associated Instrumentation*. Biosensors & Bioelectronics, 1993. **8**(7-8): p. 347-353.
42. Watts, H. J., Yeung, D., and Parkes, H., *Real-Time Detection and Quantification of DNA Hybridization by an Optical Biosensor*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(23): p. 4283-4289.
43. Edwards, P. R., Gill, A., Pollardknight, D. V., Hoare, M., Buckle, P. E., Lowe, P. A., and Leatherbarrow, R. J., *Kinetics of Protein-Protein Interactions at the Surface of an Optical Biosensor*. Analytical Biochemistry, 1995. **231**(1): p. 210-217.
44. Lukosz, W. and Stamm, C., *Integrated Optical Interferometer as Relative-Humidity Sensor and Differential Refractometer*. Sensors and Actuators a-Physical, 1991. **25**(1-3): p. 185-188.

45. Schneider, B. H., Edwards, J. G., and Hartman, N. F., *Hartman interferometer: versatile integrated optic sensor for label-free, real-time quantification of nucleic acids, proteins, and pathogens*. *Clinical Chemistry*, 1997. **43**(9): p. 1757-1763.
46. Schlatter, D., Barner, R., Fattinger, C., Huber, W., Hubscher, J., Hurst, J., Koller, H., Mangold, C., and Muller, F., *The Difference Interferometer - Application as a Direct Affinity Sensor*. *Biosensors & Bioelectronics*, 1993. **8**(2): p. 109-116.
47. Lechuga, L. M., Calle, A., and Prieto, F., *Optical sensors based on evanescent field sensing - Part I. Surface plasmon resonance sensors*. *Quimica Analitica*, 2000. **19**: p. 54-60.
48. Economou, E. N., *Surface Plasmons in Thin Films*. *Physical Review*, 1969. **182**(2): p. 539-&.
49. H.Raether, *Surface plasmon oscillations and their applications*. *Physics of thin films*, ed. A. Press. Vol. 9. 1977, Florida. 145-262.
50. Liedberg, B., Nylander, C., and Lundstrom, I., *Biosensing with Surface-Plasmon Resonance - How It All Started*. *Biosensors & Bioelectronics*, 1995. **10**(8): p. R1-R9.
51. Homola, J., *Present and future of surface plasmon resonance biosensors*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003. **377**(3): p. 528-539.
52. Marco, M. P. and Barcelo, D., *Environmental applications of analytical biosensors*. *Measurement Science & Technology*, 1996. **7**(11): p. 1547-1562.
53. Mauriz, E., Calle, A., Lechuga, L. M., Quintana, J., Montoya, A., and Manclus, J. J., *Real-time detection of chlorpyrifos at part per trillion levels in ground, surface and drinking water samples by a portable surface plasmon resonance immunosensor*. *Analytica Chimica Acta*, 2006. **561**(1-2): p. 40-47.
54. Mauriz, E., Calle, A., Montoya, A., and Lechuga, L. M., *Determination of environmental organic pollutants with a portable optical immunosensor*. *Talanta*, 2006. **69**(2): p. 359-364.
55. Yuan, B. F., Hao, Y. H., and Tan, Z., *Universal sensing strategy for the detection of nucleic acid targets by optical biosensor based on surface plasmon resonance*. *Clinical Chemistry*, 2004. **50**(6): p. 1057-1060.
56. Jiang, T. S., Minunni, M., Wilson, P., Zhang, J., Turner, A. P. F., and Mascini, M., *Detection of TP53 mutation using a portable surface plasmon resonance DNA-based biosensor*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2005. **20**(10): p. 1939-1945.
57. Wang, R. H., Minunni, M., Tombelli, S., and Mascini, M., *A new approach for the detection of DNA sequences in amplified nucleic acids by a surface plasmon resonance biosensor*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2004. **20**(3): p. 598-605.
58. Sota, H., Hasegawa, Y., and Iwakura, M., *Detection of conformational changes in an immobilized protein using surface plasmon resonance*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(10): p. 2019-2024.
59. Yuk, J. S. and Ha, K. S., *Proteomic applications of surface plasmon resonance biosensors: analysis of protein arrays*. *Experimental and Molecular Medicine*, 2005. **37**(1): p. 1-10.
60. Vikinge, T. P., Hansson, K. M., Sandstrom, P., Liedberg, B., Lindahl, T. L., Lundstrom, I., Tengvall, P., and Hook, F., *Comparison of surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance in the study of whole blood and plasma coagulation*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2000. **15**(11-12): p. 605-613.

61. Wu, S. Y., Ho, H. P., Law, W. C., Lin, C. L., and Kong, S. K., *Highly sensitive differential phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor based on the Mach-Zehnder configuration*. Optics Letters, 2004. **29**(20): p. 2378-2380.
62. L.M.Lechuga, B. Sepúlveda, J.Sánchez del Río, A.Calle, G.Armelles and C.Domínguez, *Optical Biosensor Devices as Early Detectors of Biological and Chemical Warfare Agents* en *Frontiers in planar Lightwave Circuit Technology*. 2006, Netherlands: Springer. 119-140.
63. Ince, R. and Narayanaswamy, R., *Analysis of the performance of interferometry, surface plasmon resonance and luminescence as biosensors and chemosensors*. Analytica Chimica Acta, 2006. **569**(1-2): p. 1-20.
64. Kinrot, N. and Nathan, M., *Investigation of a periodically segmented waveguide Fabry-Perot interferometer for use as a chemical/biosensor*. Journal of Lightwave Technology, 2006. **24**(5): p. 2139-2145.
65. Drapp, B., Piehler, J., Brecht, A., Gauglitz, G., Luff, B. J., Wilkinson, J. S., and Ingenhoff, J., *Integrated optical Mach-Zehnder interferometers as simazine immunoprobes*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1997. **39**(1-3): p. 277-282.
66. Weisser, M., Tovar, G., Mittler-Neher, S., Knoll, W., Brosinger, F., Freimuth, H., Lacher, M., and Ehrfeld, W., *Specific bio-recognition reactions observed with an integrated Mach-Zehnder interferometer*. Biosensors & Bioelectronics, 1999. **14**(4): p. 405-411.
67. Luff, B. J., Wilkinson, J. S., Piehler, J., Hollenbach, U., Ingenhoff, J., and Fabricius, N., *Integrated optical Mach-Zehnder biosensor*. Journal of Lightwave Technology, 1998. **16**(4): p. 583-592.
68. Brosinger, F., Freimuth, H., Lacher, M., Ehrfeld, W., Gedig, E., Katerkamp, A., Spener, F., and Cammann, K., *A label-free affinity sensor with compensation of unspecific protein interaction by a highly sensitive integrated optical Mach-Zehnder interferometer on silicon*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1997. **44**(1-3): p. 350-355.
69. Heideman, R. G., Kooyman, R. P. H., and Greve, J., *Performance of a Highly Sensitive Optical Wave-Guide Mach-Zehnder Interferometer Immunosensor*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1993. **10**(3): p. 209-217.
70. Schipper, E. F., Brugman, A. M., Dominguez, C., Lechuga, L. M., Kooyman, R. P. H., and Greve, J., *The realization of an integrated Mach-Zehnder waveguide immunosensor in silicon technology*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1997. **40**(2-3): p. 147-153.
71. Schipper, E. F., Bergevoet, A. J. H., Kooyman, R. P. H., and Greve, J., *New detection method for atrazine pesticides with the optical waveguide Mach-Zehnder immunosensor*. Analytica Chimica Acta, 1997. **341**(2-3): p. 171-176.
72. Hong, J. G., Choi, J. S., Han, G. Y., Kang, J. K., Kim, C. M., Kim, T. S., and Yoon, D. S., *A Mach-Zehnder interferometer based on silicon oxides for biosensor applications*. Analytica Chimica Acta, 2006. **573**: p. 97-103.
73. Prieto, F., Lechuga, L. M., Calle, A., Llobera, A., and Dominguez, C., *Optimized silicon antiresonant reflecting optical waveguides for sensing applications*. Journal of Lightwave Technology, 2001. **19**(1): p. 75-83.
74. B Sepúlveda, J. Sánchez del Río., M Moreno, F J Blanco, K Mayora, C Domínguez and L M Lechuga, *Optical biosensor microsystems based on the integration of highly sensitive Mach-Zehnder interferometer devices*. J. Opt. A: Pure Appl. Opt, 2006. **8**: p. 561-566.

75. Lenferink, A. T. M., Schipper, E. F., and Kooyman, R. P. H., *Improved detection method for evanescent wave interferometric chemical sensing*. Review of Scientific Instruments, 1997. **68**(3): p. 1582-1586.
76. Cocorullo, G., Della Corte, F. G., Rendina, I., and Sarro, P. M., *Thermo-optic effect exploitation in silicon microstructures*. Sensors and Actuators a-Physical, 1998. **71**(1-2): p. 19-26.
77. Gorecki, C., Chollet, F., Bonnotte, E., and Kawakatsu, H., *Silicon-based integrated interferometer with phase modulation driven by surface acoustic waves*. Optics Letters, 1997. **22**(23): p. 1784-1786.
78. Sepúlveda, B., *Efectos magneto-ópticos en dispositivos biosensores de campo evanescentes*. Tesis, 2005. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
79. Brandenburg, A. and Henninger, R., *Integrated Optical Young Interferometer*. Applied Optics, 1994. **33**(25): p. 5941-5947.
80. Ymeti, A., Greve, J., Lambeck, P. V., Wijn, R., Heideman, R. G., and Kanger, J. S., *Drift correction in a multichannel integrated optical young interferometer*. Applied Optics, 2005. **44**(17): p. 3409-3412.
81. Snyder, J. J. and Kwiatkowski, S. L., *Wavelength measurement with a Young's interferometer*. Optical Engineering, 2005. **44**(8): p. -.
82. Ymeti, A., Kanger, J. S., Greve, J., Besselink, G. A. J., Lambeck, P. V., Wijn, R., and Heideman, R. G., *Integration of microfluidics with a four-channel integrated optical Young interferometer immunosensor*. Biosensors & Bioelectronics, 2005. **20**(7): p. 1417-1421.
83. Brandenburg, A., *Differential refractometry by an integrated-optical Young interferometer*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1997. **39**(1-3): p. 266-271.
84. Ymeti, A., Kanger, J. S., Greve, J., Lambeck, P. V., Wijn, R., and Heideman, R. G., *Realization of a multichannel integrated Young interferometer chemical sensor*. Applied Optics, 2003. **42**(28): p. 5649-5660.

CAPÍTULO 2

Diseño y fabricación de interferómetros Mach-Zehnder integrados

2.1 Guías de ondas de reflexión total interna

La base principal de la tecnología fotónica integrada es la guía de ondas^{1, 2}. Una guía de ondas puede definirse como una estructura óptica en que la luz queda confinada dentro de sus fronteras por reflexión total interna (TIR). Para ello, es necesario que un medio de alto índice, llamado núcleo de la guía, con índice de refracción n_n esté rodeado de otros medios de índices de refracción más bajos. Éstos pueden recubrir al sustrato (recubrimiento de sustrato, de índice de refracción n_s) o al núcleo (recubrimiento del núcleo, de índice de refracción n_r). En la mayoría de los casos el recubrimiento del núcleo es el medio externo con un índice de refracción n_e .

Existen diferentes tipos de guías de onda dependiendo del número de dimensiones en que la luz queda confinada. Así, mientras una guía de ondas plana confina la radiación electromagnética en una dimensión (Figura 1), las guías de onda acanaladas la confinan en dos al igual que las fibras ópticas. Existe también confinamiento de la luz en tres dimensiones, en que la radiación está atrapada y no se propaga (cristales fotónicos).

Es importante entender qué ocurre cuando se reduce el espesor del núcleo de las guías de ondas, llegando a dimensiones del orden de la longitud de onda de la radiación confinada. En este caso, la interferencia producida por la onda reflejada por reflexión total interna en la frontera superior del núcleo y la reflejada en la zona inferior, hace que la luz pueda propagarse sólo para ciertos ángulos. Para cada ángulo permitido de propagación, la estructura transversal del campo electromagnético asociado a la radiación confinada se mantiene y el haz de luz se propaga a lo largo del núcleo; es lo que se denomina *modo de propagación*. Así un modo de propagación resulta de combinar la reflexión total interna y la interferencia constructiva.

La guía óptica más sencilla por su geometría es la guía plana convencional. Si el medio de más arriba (recubrimiento de núcleo) y el de más abajo (recubrimiento de sustrato) son iguales (iguales constantes ópticas), la estructura se denomina *guía de ondas plana simétrica*. Por otro lado, si los medios superior e inferior son distintos, estaremos hablando de una *guía de ondas plana asimétrica* (Figura 1). A pesar de que se han desarrollado dispositivos ópticos integrados basados en guías de ondas planas, tienen mayor aplicación las estructuras que confinan la luz en dos dimensiones ya que son con las que se pueden diseñar circuitos ópticos. Así pues, un estudio de la guía óptica plana puede servir, principalmente, para explicar el principio de funcionamiento de las guías ópticas y como modelo para comprender las propiedades de las guías de onda acanaladas.

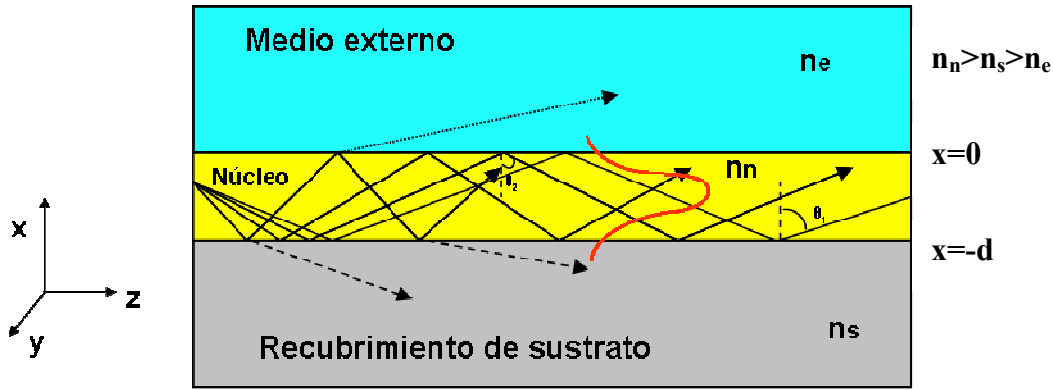


Fig. 1 Esquema de una guía de ondas plana TIR asimétrica y su principio de funcionamiento: Sólo los rayos que experimentan reflexión total interna en las dos intercaras núcleo-recubrimiento pueden propagarse confinados en el núcleo

2.1.1. Guías TIR planas

Para estudiar de modo exhaustivo el comportamiento de la luz en las guías ópticas, se debe utilizar la teoría electromagnética, basada en las ecuaciones de Maxwell^{3,4}.

Una onda electromagnética queda definida en cualquier punto del espacio y del tiempo a través de los vectores *campo eléctrico* $\vec{E}(\vec{r}, t)$ y *campo magnético* $\vec{H}(\vec{r}, t)$, siendo \vec{r} el vector de posición en un sistema de coordenadas arbitrario y t el tiempo. Para la descripción del campo electromagnético en un medio material es necesario definir dos magnitudes vectoriales: el *vector desplazamiento eléctrico* $\vec{D}(\vec{r}, t)$ y el *vector de densidad de flujo magnético* $\vec{B}(\vec{r}, t)$. Las ecuaciones de Maxwell en un medio material se expresan como:

$$\nabla \times \vec{H} = \vec{J} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (1)$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (2)$$

$$\nabla \cdot \vec{D} = \rho \quad (3)$$

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \quad (4)$$

donde $\rho(\vec{r}, t)$ y $\vec{J}(\vec{r}, t)$ denotan la *densidad de carga* y el *vector densidad de corriente* respectivamente.

No obstante, para resolver estas ecuaciones diferenciales acopladas es necesario establecer relaciones adicionales entre los vectores \vec{D} y \vec{E} , \vec{J} y \vec{E} , y los vectores \vec{H} y \vec{B} . Estas relaciones son las llamadas *relaciones constitutivas* y dependen de las propiedades eléctricas y magnéticas del medio considerado. Para un medio isotrópico, lineal y homogéneo, las relaciones constitutivas vienen dadas por:

$$\vec{D} = \epsilon \cdot \vec{E} \quad (5)$$

$$\vec{B} = \mu \cdot \vec{H} \quad (6)$$

$$\vec{J} = \sigma \cdot \vec{E} \quad (7)$$

En estas relaciones, ϵ y μ , representan la permitividad eléctrica y permeabilidad magnética, respectivamente y σ la conductividad del medio. Si el medio es *no lineal*, será necesario incluir términos adicionales propios de un desarrollo en serie de potencias para los campos eléctricos y magnéticos. Además, si el medio es *homogéneo*, las constantes ópticas del medio, como ϵ , μ y σ no dependen del vector de posición \vec{r} . Por último, se ha de tener en cuenta que en un medio *isótropo* las constantes ópticas son magnitudes escalares e independientes de la dirección de los vectores \vec{E} y \vec{H} , lo que implica que los vectores \vec{D} y \vec{J} son paralelos al campo eléctrico \vec{E} , mientras que el vector \vec{B} es paralelo al campo magnético \vec{H} .

Haciendo uso de las relaciones constitutivas para un medio *isótropo*, *homogéneo* y *lineal*, las ecuaciones de Maxwell pueden escribirse en términos de los campos eléctrico \vec{E} y magnético \vec{H} :

$$\nabla^2 \vec{E} = \mu \cdot \sigma \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} + \mu \cdot \epsilon \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} \quad (8)$$

$$\nabla^2 \vec{H} = \mu \cdot \sigma \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} + \mu \cdot \epsilon \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} \quad (9)$$

Si el medio es ópticamente *inhomogéneo* ($n = n(\vec{r})$), *dieléctrico* (con conductividad cero ($\sigma = 0$)), *no magnético* (permeabilidad magnética $\mu = \mu_0$), *isótropo* y *lineal* ($\vec{D} = \epsilon \cdot \vec{E}$), mediante (8) y (9), se pueden obtener las siguientes ecuaciones de onda:

$$\nabla^2 \vec{E} + \nabla \left(\frac{1}{n^2} \nabla n^2 \cdot \vec{E} \right) - \mu_0 \cdot \epsilon_0 \cdot n^2 \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = 0 \quad (10)$$

$$\nabla^2 \vec{H} + \frac{1}{n^2} \nabla n^2 \times (\nabla \times \vec{H}) - \mu_0 \cdot \epsilon_0 \cdot n^2 \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} = 0 \quad (11)$$

Las soluciones a las ecuaciones (10) y (11) corresponden a las diferentes distribuciones de campo que soporta la guía, que se denominan *modos*. Asumiendo que el índice de refracción depende sólo de una coordenada cartesiana, se tiene que $n = n(x)$ (**guías de ondas planas**) y que la propagación es a lo largo del eje z , los campos eléctricos y magnéticos toman la forma:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}(x) \cdot e^{i(\omega t - \beta z)} \quad (12)$$

$$\vec{H}(\vec{r}, t) = \vec{H}(x) \cdot e^{i(\omega t - \beta z)} \quad (13)$$

donde ω es la frecuencia angular y β la constante de propagación. Estas dos expresiones determinan el campo electromagnético para un modo que se propaga en la dirección z y viene caracterizado por la constante β .

La invarianza de la guía de ondas en la dirección y va a permitir desacoplar ciertas componentes de los campos electromagnéticos dentro de las ecuaciones de Maxwell. Este desacoplamiento va a dar lugar a la propagación independiente de dos polarizaciones de la radiación electromagnética, conocidas como *polarización transversal eléctrica* (TE) y *polarización transversal magnética* (TM).

Los modos electromagnéticos TE (Figura 2 (a)) se caracterizan por tener sólo la componente y del campo eléctrico (E_y), es decir, el campo eléctrico es perpendicular al plano de propagación de la radiación, plano XZ. En cambio, en los modos TM (Figura 2 (b)) el campo magnético es perpendicular al plano de propagación, es decir, sólo presentan la componente H_y del campo magnético.

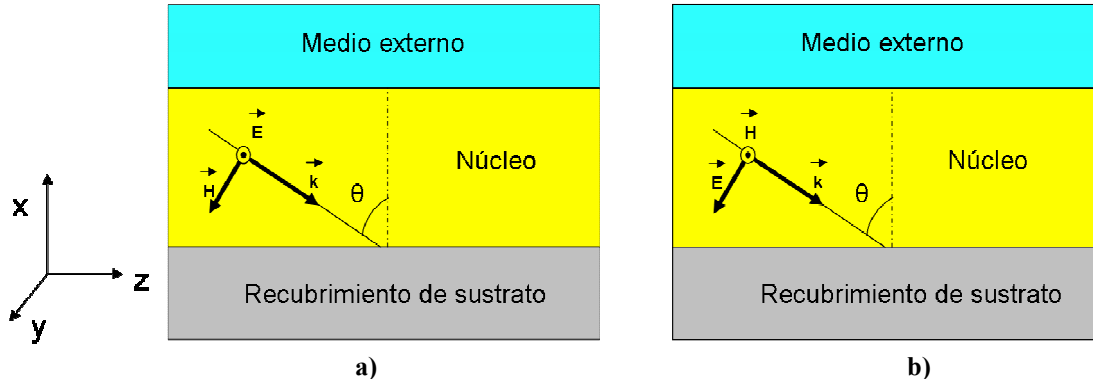


Fig. 2 Esquema de la propagación de la luz por una guía TIR asimétrica **a)** en polarización TE y **b)** en polarización TM.

Para encontrar los modos de propagación en una guía de ondas plana, se estudiará la situación en que la polarización de los modos es TE. El caso se puede hacer extensivo a la situación en que el campo eléctrico asociado al modo tiene una sola componente paralela (modos TM) al plano de propagación, obteniendo así resultados muy parecidos a los del caso TE.

Modos TE: Tal como dijimos anteriormente, se ha de encontrar la solución general para las amplitudes complejas E_y , H_x y H_z . Sustituyendo la solución obtenida para las estructuras planas y dada por las ecuaciones (12) y (13), en las ecuaciones de Maxwell (1) y (2), se obtienen las siguientes ecuaciones:

$$H_x = -(\beta/w \cdot \mu_0)E_y \quad (14)$$

$$H_z = (i/w \cdot \mu_0) \cdot \partial E_y / \partial x \quad (15)$$

$$i \cdot \beta \cdot H_x + \partial H_z / \partial x = -i \cdot w \cdot \epsilon_0 \cdot n^2(x) \cdot E_y \quad (16)$$

Si se introducen las componentes H_x y H_z de las ecuaciones (14) y (15) respectivamente en la ecuación (16), obtenemos una ecuación que implica sólo la componente E_y del campo eléctrico:

$$\frac{d^2 E_y(x)}{dx^2} + [k_0^2 \cdot n^2(x) - \beta^2] \cdot E_y(x) = 0 \quad (17)$$

donde $k_0 = 2\pi/\lambda_0$ y λ_0 es la longitud de onda de la luz en el espacio libre, relacionado con la frecuencia angular por $w = 2\pi \cdot c / \lambda_0$. Debido a que la ecuación anterior es una ecuación diferencial de segundo orden para el caso de una determinada estructura plana, será necesario imponer condiciones contorno adecuadas en las interfases. En particular serán la continuidad de las componentes tangenciales del campo eléctrico \vec{E}_t y \vec{H}_t en las intercaras (E_y y H_z).

Examinemos en particular qué tipo de solución admite la ecuación de ondas (17). La solución que se propone es aquella que lleve la componente $E_y(x)$ y toma la forma:

$$E_j(x) = A_j e^{i\gamma_j x} + B_j e^{-i\gamma_j x} \quad (18)$$

donde $E_j(x)$ representa la componente y de la amplitud del campo eléctrico para la onda que se propaga en la región j -ésima (núcleo, recubrimiento de núcleo o de sustrato) y A_j

y B_j son dos constantes complejas, que se serán calculadas después de incluir las condiciones de contorno adecuadas. Se puede probar que la expresión (18) satisface la ecuación de ondas (17) siempre que el parámetro γ_j venga dado por:

$$\gamma_j = \sqrt{k_0^2 n_j^2 - \beta^2} \quad (19)$$

donde γ_j es diferente para cada región y viene caracterizado por el índice de refracción n_j .

Para discutir los distintos comportamientos de la solución dada por (18) en una región determinada, conviene introducir un nuevo parámetro adimensional, llamado *índice de refracción efectivo* N :

$$\beta \equiv k_0 N \quad (20)$$

De acuerdo con esta definición, el índice de refracción efectivo N representa el índice de refracción que experimenta el modo que se propaga a lo largo del eje z .

Las soluciones dadas por la ecuación (18) dependen del índice de refracción N del modo y del índice de refracción n_j de la región considerada (Figura 3).

(a) Si la constante de propagación β es menor que $k_0 n_j$ (o $N < n_j$) entonces el parámetro γ_j es un número real y la solución general propuesta en (18) corresponderá a una función sinusoidal.

(b) Por el contrario, si la constante de propagación satisface que $\beta > k_0 n_j$ (o $N > n_j$), el parámetro γ_j es un número imaginario puro y así la solución dada por (18) vendrá descrita por funciones exponenciales.

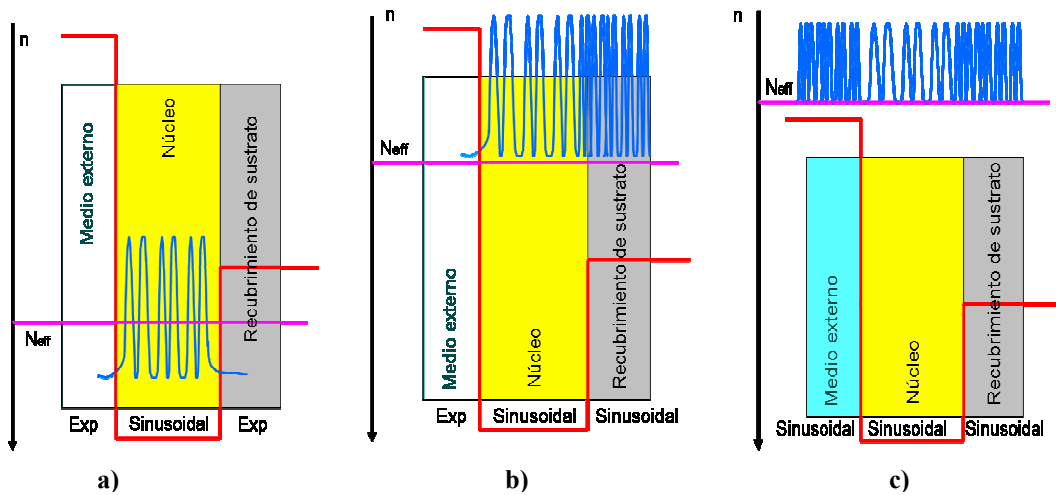


Fig. 3 Esquema de los distintos modos en una guía TIR asimétrica **a)** modos de propagación guiados **b)** modos de radiación al sustrato **c)** modos de radiación

Modos TM: De forma similar al caso anterior, pero para la polarización TM, se obtiene la siguiente relación entre las componentes del campo:

$$E_x = (\beta/w \cdot \epsilon_0 \cdot n^2) \cdot H_y \quad (21)$$

$$E_z = (1/i \cdot w \cdot \epsilon_0 \cdot n^2) \cdot \partial H_y / \partial x \quad (22)$$

$$i \cdot \beta \cdot E_x + \partial E_z / \partial x = i \cdot w \cdot \mu_0 \cdot H_y \quad (23)$$

Procediendo de manera muy parecida a la polarización TE, se obtiene la ecuación de onda para modos TM en guías de onda planas:

$$\frac{d^2 H_y(x)}{dx^2} - \frac{1}{n^2} \frac{dn^2}{dx} \frac{dH_y(x)}{dx} + [k_0^2 \cdot n^2(x) - \beta^2] \cdot H_y(x) = 0 \quad (24)$$

Además, para regiones de índice de refracción constante ($n = \text{constante}$) la ecuación queda de la forma:

$$\frac{d^2 H_y(x)}{dx^2} + [k_0^2 \cdot n^2(x) - \beta^2] \cdot H_y(x) = 0 \quad (25)$$

Al igual que en el caso anterior, se imponen condiciones de contorno adecuadas en las intercaras, como son la continuidad de las componentes transversales de los campos eléctrico y magnético (E_z y H_y).

Supongamos ahora que la guía de ondas plana posee *un perfil de índices de refracción en escalón*. En este caso asumiremos que, tal como se observa en la Figura 1 o en la Figura 3 (a), $n_r < n_s < n_n$ y que el plano $x = 0$ corresponde a la frontera recubrimiento de núcleo o medio externo-núcleo.

Modos guiados TE: Aunque las guías de onda planas de índice de escalón son estructuras inhomogéneas, dentro de cada una de las tres regiones o capas, el índice de refracción es constante. Así, considerando cada región separadamente, la ecuación de ondas para los modos TE viene expresada como:

$$\frac{d^2 E_y(x)}{dx^2} + [k_0^2 \cdot n^2 - \beta^2] \cdot E_y(x) = 0 \quad (26)$$

Si estamos interesados en encontrar la solución de los modos guiados, la constante de propagación β asociada a un determinado modo debe satisfacer la siguiente condición:

$$k_0 n_s < \beta < k_0 n_n \quad (27)$$

o lo que es lo mismo, en términos de índices de refracción, en donde el índice de refracción efectivo N del modo guiado ha de estar comprendido entre el índice de refracción del núcleo n_n y el índice de refracción del sustrato.

$$n_s < N < n_n \quad (28)$$

Teniendo en cuenta lo anterior, la ecuación de ondas (26) en cada región homogénea puede escribirse como:

$$\frac{d^2 E_y}{dx^2} - \gamma_r^2 \cdot E_y = 0 \quad x \geq 0 \quad (\text{recubrimiento}) \quad (29)$$

$$\frac{d^2 E_y}{dx^2} + k_n^2 \cdot E_y = 0 \quad 0 > x > -d \quad (\text{núcleo}) \quad (30)$$

$$\frac{d^2 E_y}{dx^2} - \gamma_s^2 \cdot E_y = 0 \quad x \leq -d \quad (\text{sustrato}) \quad (31)$$

donde los tres parámetros γ_r , k_n y γ_s vienen dados por:

$$\gamma_r^2 = \beta^2 - k_0^2 n_r^2 \quad (32)$$

$$k_n^2 = k_0^2 n_n^2 - \beta^2 \quad (33)$$

$$\gamma_s^2 = \beta^2 - k_0^2 n_s^2 \quad (34)$$

Resolviendo las ecuaciones diferenciales (29)-(31) y aplicando las condiciones de contorno, que requieren que E_y y dE_y/dx sean continuas en la intercara núcleo-recubrimiento de núcleo o medio externo ($x = 0$) y en la frontera núcleo – recubrimiento de sustrato ($x = -d$), se obtiene la *relación de dispersión* o *ecuación de resonancia transversal* para las guías planas asimétricas de índice en escalón:

$$\tan k_n d = \frac{\frac{\gamma_r}{k_n} + \frac{\gamma_s}{k_n}}{1 - \left(\frac{\gamma_r}{k_n}\right)\left(\frac{\gamma_s}{k_n}\right)} \quad (35)$$

Como la función tangente es una función periódica de período π , la ecuación (35) admite un número finito de soluciones, por lo que la guía de ondas soportará un número finito de modos guiados que forman una base ortogonal y se propagan de forma independiente en la guía de ondas. Es el caso de la guía *multimodo*. Sin embargo, si la relación de dispersión sólo admite una solución, la guía de ondas es llamada guía de ondas *monomodo*. Es posible incluso que la ecuación trascendente no tenga solución (para una determinada longitud de onda λ), en este caso la guía de ondas no puede soportar ningún modo.

Una vez que la constante de propagación β ha sido calculada para un determinado modo, los coeficientes γ_r , k_n y γ_s quedan definidos de forma inmediata, y así el campo eléctrico en las tres regiones queda completamente determinado:

$$E_y = \begin{cases} A \cdot e^{-\gamma_r x} & x \geq 0 \\ A \cdot \left(\cos k_n x - \frac{\gamma_r}{k_n} \cdot \text{sen} k_n x \right) & -d < x < 0 \\ A \cdot \left(\cos k_n d + \left(\gamma_r / k_n \right) \text{sen} k_n d \right) \cdot e^{\gamma_s (x+d)} & x \leq -d \end{cases} \quad (36)$$

De acuerdo con esta expresión y como se observa en la Figura 3 (a), el campo eléctrico decrece exponencialmente en el recubrimiento y en el sustrato mientras que tiene una dependencia sinusoidal dentro del núcleo, propio de un modo confinado. El decaimiento exponencial comentado anteriormente es lo que se llama *onda evanescente* y su profundidad de penetración viene determinada por los parámetros $1/\gamma_r$ y $1/\gamma_s$. Además, para un modo determinado, el campo de penetración en el recubrimiento es menor que en el sustrato, pues $n_r < n_s$ y por tanto $\gamma_r > \gamma_s$.

Para calcular las componentes del campo magnético asociadas a cada modo, basta con hacer uso de las ecuaciones (14) y (15), de tal forma que el modo en la guía de ondas queda completamente caracterizado.

Modos guiados TM: Procediendo de forma muy similar al caso anterior, la solución para el campo magnético asociado a los modos polarizados TM queda expresada por:

$$H_y = \begin{cases} A \cdot e^{-\gamma_r x} & x \geq 0 \\ A \cdot \left(\cos k_n x - \frac{n_n^2 \gamma_r}{n_r^2 k_n} \cdot \text{sen} k_n x \right) & -d < x < 0 \\ A \cdot \left(\cos k_n d + (\gamma_r / k_n) \cdot (n_n^2 / n_r^2) \cdot \text{sen} k_n d \right) \cdot e^{\gamma_r (x+d)} & x \leq -d \end{cases} \quad (37)$$

El campo eléctrico asociado con los modos TM puede ahora obtenerse a través de las ecuaciones (21) y (22), teniendo así completamente caracterizado el perfil del campo electromagnético del modo TM.

La profundidad de penetración del campo evanescente puede ahora generalizarse con la siguiente expresión⁵:

$$d_{ev} \cong \frac{\lambda}{2\pi \sqrt{n_n^2 - n_i^2}} \left(\frac{n_i}{n_n} \right)^{2\rho} \quad (38)$$

con $i = e, r$ para los medios externo o recubrimiento sustrato respectivamente y con $\rho=0$ para los modos TE y $\rho=1$ para los modos TM.

2.1.2 Guías TIR con confinamiento lateral

La guía óptica plana tratada hasta ahora confina la luz en una sola dimensión. En general, en la mayoría de los dispositivos fotónicos integrados (como es el caso del interferómetro Mach-Zehnder integrado), la luz viaja en guías de ondas acanaladas y queda confinada en dos direcciones del espacio. De esta forma, por un lado, la radiación que se propaga en estas guías - 2D puede hacerlo sin sufrir difracción, que implicaría un incremento en las pérdidas de potencia de la luz guiada. Por otro, la configuración acanalada permite realizar numerosas funciones, como modulación, amplificación, conmutación etc.

En un interferómetro Mach-Zehnder integrado la luz se divide en dos haces de igual intensidad y posteriormente se recombinan para producir la interferencia. Por lo tanto, la división y recombinación de los haces requiere el confinamiento lateral de la luz en la guía de ondas. Dicho confinamiento lateral se puede conseguir de diversas formas, aunque una de las geometrías más comúnmente usadas es la guía acanalada rib (Capítulo 1, Figura 4), que será la que empleemos para nuestro dispositivo.

En las guías de onda ópticas acanaladas, no hay modos TE y TM puros, sino dos familias de modos electromagnéticos transversales (TEM). Los modos ópticos que tienen como componente principal la del campo eléctrico a lo largo del eje - x, se comportan de forma muy parecida a los modos TM de una guía de ondas plana. Por esta razón son los *modos quasi-TM*. Consecuentemente, los modos que tienen como componente mayoritaria el campo eléctrico a lo largo del eje - y, están estrechamente relacionados con los modos TE en una guía plana, considerándose como modos *quasi-TE*.

2.1.3 Análisis teórico de las guías bidimensionales

En las guías con confinamiento lateral hay que tener en cuenta que el índice de refracción es función de las coordenadas X e Y ($n=n(x,y)$), por lo que el análisis de modos de la estructura es más complejo que en caso de las guías unidimensionales. Al igual que en el caso de las guías planas, las soluciones de las guías bidimensionales se

obtienen de las ecuaciones de onda (10) y (11). Sin embargo, no es posible un tratamiento exacto del comportamiento modal en las guías de onda 2D, incluso para el caso más sencillo, que es el caso de una guía de ondas acanalada rectangular simétrica. Por tanto, es necesario emplear alguna aproximación matemática para resolverlas. Existen varios métodos numéricos^{1, 4, 6, 7} que actualmente se usan con esta intención, aunque son válidos sólo cuando los modos viajan muy confinados en la guía y no se ven afectados por los vértices del núcleo. Así tenemos el método Marcatilli⁸, los métodos perturbativos⁹ y variacionales¹⁰ o el método del índice efectivo^{1,11}, entre otros. Nos centraremos en este último, por su sencillez y por sus resultados precisos en el caso de las guías acanaladas cuando la profundidad del canal es pequeña. Se trata de una extensión del método de Marcatilli para el cual, además de la soluciones modal transversal, se precisa de la solución en dirección ortogonal¹².

Este método consiste, básicamente, en dividir el estudio de la estructura bidimensional en dos problemas unidimensionales:

1. Se divide la guía acanalada en tres regiones (Figura 4 (a)), que se analizan independientemente, considerándose cada una como una guía planar. El espesor del núcleo en la región I es d_c , mientras que en la región II es $(d_c - h)$.

2. Una vez calculados los índices de refracción efectivos en la regiones I y II (N_I y N_{II} , ya que $N_{III}=N_I$), se construye una estructura de guía planar equivalente de tres capas (Figura 4 b). En esta guía, los índices de refracción de cada capa corresponden a los índices efectivos N_I y N_{II} calculados en el primer caso, suponiendo que el espesor de núcleo es igual a la anchura del canal de la estructura inicial (w). El índice efectivo de esta guía equivalente corresponderá con el índice de propagación efectivo de la guía acanalada.

Mediante este método aproximado, se conocen los índices de refracción efectivos de los modos que se propagan por las guías acanaladas. Si la estructura de guiado usada tiene una altura de escalón muy pequeña, del unos pocos nanómetros, se puede emplear el método del índice efectivo en una sola dimensión, sin tener en cuenta la presencia del canal en la guía.

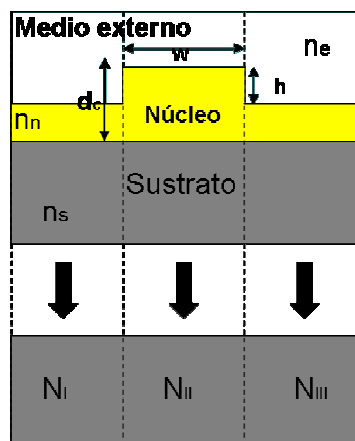


Fig. 4 Esquema del método de índice efectivo. **a)** Se divide la estructura en tres regiones que se tratan como guías planares independientes. **b)** Los índices efectivos obtenidos en el paso anterior se emplean para construir una guía planar equivalente.

Para los modos que viajan cerca de las esquinas del núcleo (modos muy poco confinados) o para guías de sección arbitraria (no rectangular), estos métodos aproximados no son válidos y es necesario desarrollar métodos más exactos¹² que resuelvan las ecuaciones (10) y (11). Están basados en métodos numéricos y ofrecen una descripción completa de las propiedades de propagación de los modos (constantes de propagación, perfil del campo electromagnético, etc.). Los más empleados son el método de ajuste de puntos¹³, el método de ajuste o acoplo de modos¹¹, el método de diferencias finitas¹⁴, el método de elementos finitos (FEM)¹⁵ y el método de las diferencias finitas no uniforme (NU-FDM)¹⁶ etc.

Todos estos métodos, tanto exactos como aproximados, buscan solución a la ecuación de ondas estacionarias y por tanto no muestran cómo se propagan los modos electromagnéticos por la estructura. Para simular la propagación del campo electromagnético por la guía de ondas (cálculo numérico de la solución transitoria), se emplea el método de propagación del haz (BPM, Beam Propagation Method)^{1,6,16}. Este procedimiento calcula las condiciones de guiado, las pérdidas de la estructura y las pérdidas de inserción al aplicar al dispositivo una señal externa. El algoritmo BPM tiene en cuenta de forma implícita las ondas guiadas, las ondas radiadas y evanescentes, y también permite variaciones del índice de refracción en la dirección z . Se basa en la aproximación paraxial de la ecuación de onda de Helmholtz, por la cual la amplitud de la onda varía lentamente en la dirección de propagación. El algoritmo divide el cálculo de la propagación en dos etapas: en la primera etapa simula la propagación del campo electromagnético a través de un medio homogéneo, y, en la segunda etapa, por lo general, tiene en cuenta que el medio es inhomogéneo y hace una corrección de fase adecuada a la distribución de índices refracción. Son varias las técnicas numéricas que hacen uso del algoritmo BPM para obtener las soluciones transitorias en función de las distintas estructuras de guiado y de cómo se trate matemáticamente la segunda etapa: el Método de Propagación del Haz de Diferencias Finitas (FD-BPM)¹⁷, el Método de Propagación del Haz de la Transformada Rápida de Fourier (FFT-BPM)¹⁸, el Método de Propagación del Haz de los Elementos Finitos (FE-BPM)¹⁹, el Método de Propagación del Haz de Amplio Ángulo (WA-BPM)²⁰ o el Método de Propagación del Haz Bidireccional²¹.

2.2 Guías acanaladas del MZI para aplicaciones biosensoras

En un interferómetro Mach – Zehnder integrado, las guías de onda acanaladas han de tener dos características básicas para que el dispositivo funcione como un biosensor:

1. *Comportamiento monomodo*
2. *Alta sensibilidad superficial*

El diseño de las guías de ondas con estas características requiere, en primer lugar, elegir la longitud de onda de trabajo. Debido a la aplicación biosensora de los MZI integrados, se opta por una longitud de onda de 632 nm, en la que las moléculas biológicas son transparentes. Además, esta longitud de onda corresponde con la del

láser He-Ne y con la de algunos diodos láser, facilitando el desarrollo del montaje experimental y abaratando los costes.

2.2.1 Diseño de la estructura de las guías monomodo: modelización teórica

Los distintos modos guiados de una guía de ondas se propagan independientemente e interfieren de forma independiente en un MZI. Además, los cambios ópticos que se produzcan en el medio externo, como los producidos por una reacción de afinidad, van a afectar de forma diferente a cada uno de los modos. Este comportamiento hace que la señal a la salida del interferómetro sea muy difícil de interpretar si las guías no son monomodo.

Asimismo, como las guías de un MZI integrado deben tener confinamiento lateral, el comportamiento monomodo debe satisfacerse en las dos direcciones de confinamiento. El esquema que permite este tipo de confinamiento lateral es el de la guía de ondas *acanalada rib* (Figura 4 (d) del capítulo de Introducción), permitiendo su diseño a través del método del índice efectivo. Para una guía de ondas acanalada convencional, el comportamiento monomodo dependerá, para una longitud de onda λ fija, del espesor del núcleo, de la anchura y altura del canal y de la diferencia de índices de refracción núcleo-recubrimiento de sustrato, es decir, del contraste de índice, Δn , definido como:

$$\Delta n = \frac{n_n^2 - n_r^2}{n_n^2} \quad (39)$$

Atendiendo a los espesores de núcleo y recubrimiento de sustrato de las guías de onda acanaladas, el comportamiento monomodo se puede obtener en los siguientes casos:

a) Si la diferencia de índices de refracción entre el núcleo y el recubrimiento del sustrato ($n_n - n_r$) es muy pequeña (por ejemplo, del orden del 0.5 %), se puede tener comportamiento monomodo para espesores gruesos de núcleo, del orden de varias micras. Estas guías tienen la ventaja de tener un tamaño de núcleo similar al de algunas fibras ópticas monomodo comerciales (diámetro 4-10 μm), por lo que las pérdidas de acoplamiento de la luz fibra-guía son muy bajas. Además, el espesor del recubrimiento de sustrato ha de ser muy grueso (Figura 5 (a)), mayor que el espesor del núcleo, de tal forma que el campo evanescente no penetre hacia el sustrato (absorbente en el visible) y las pérdidas de propagación no sean muy altas. Este tipo de estructura de guiado puede presentar problemas en los procesos de fabricación, primero porque los tiempos de crecimiento de las capas de núcleo y recubrimiento son muy largos, de varias horas y segundo porque es necesario controlar de forma muy precisa el índice de refracción para que sea lo más homogéneo posible. Así, como ejemplo, se puede obtener comportamiento monomodo en las polarizaciones TE y TM, para guías de onda con espesores de núcleo y recubrimiento de sustrato de $d_n=4 \mu\text{m}$ y $d_r=10 \mu\text{m}$ respectivamente y con índices de refracción externo, núcleo y recubrimiento de sustrato de $n_e=1.3381$, $n_n=1.464$ y $n_r=1.46$ respectivamente ($n_n - n_s = 4 \cdot 10^{-3}$). El índice de refracción efectivo en este ejemplo de estructura de guiado es de $N_{TM0}=1.463083$ para la polarización TM y de $N_{TE0}=1.462715$ para la polarización TE (Figura 5 (a)).

b) Si el contraste de índices ($n_n - n_r$) es alto (por ejemplo, por encima de 10^{-1}), el espesor de la capa de recubrimiento del sustrato puede ser más delgado, del orden de unas pocas micras, pues la longitud de penetración del campo evanescente es pequeña (Figura 5 (b)). Esto supone una ventaja desde el punto de vista tecnológico, pues se necesitan tiempos más cortos en el crecimiento de esta capa. Sin embargo, el espesor de la capa del núcleo debe ser de pocas centenas de nanómetros ($\sim 90\text{-}300 \text{ nm}$, dependiendo del contraste de índices) para que la estructura sea monomodo, lo que implica altas pérdidas de acoplamiento al introducir de forma directa la luz en el interior del núcleo. De hecho, si la inserción de la luz se realiza con fibra óptica monomodo, las pérdidas de inserción (Capítulo 2), que dependen del espesor del núcleo de la guía y del tipo de polarización de la luz guiada, son bastante altas, en comparación con los valores de pérdidas de inserción fibra-guía cuando los espesores de núcleo son del orden de micras. Como ejemplo de comportamiento monomodal para alto contraste de índices, tanto para las polarizaciones TE como TM, son las guías de onda con espesores de núcleo y recubrimiento de sustrato de $d_n=150 \text{ nm}$ y $d_r=2 \mu\text{m}$ respectivamente y con índices de refracción externo, núcleo y recubrimiento de sustrato de $n_e=1.3381$, $n_n=2.0$ y $n_r=1.46$ respectivamente ($n_n - n_s = 0.54$). El índice de refracción efectivo en este ejemplo de estructura de guiado es de $N_{TM0}=1.594691$ para la polarización TM y de $N_{TE0}=1.716321$ para la polarización TE (Figura 5 (b)).

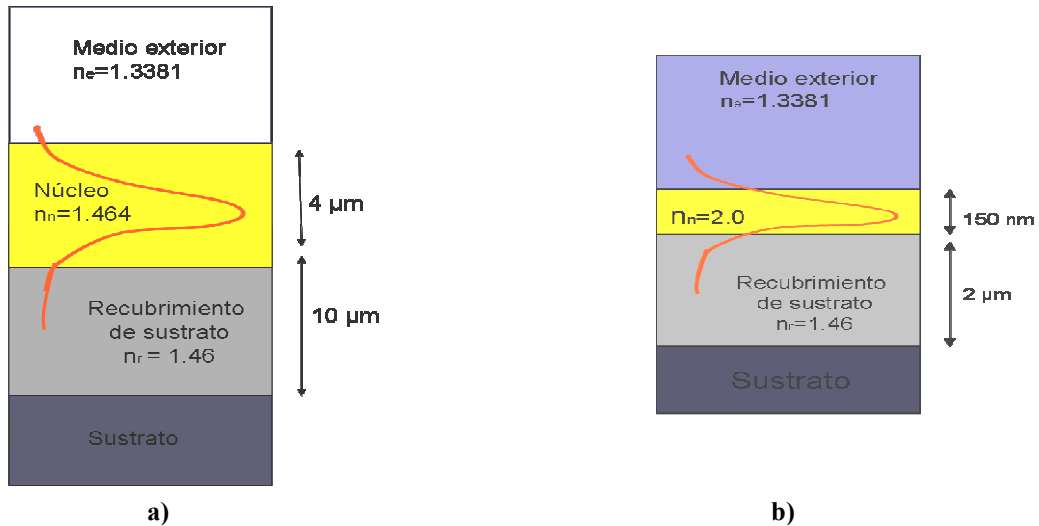


Fig. 5 Estructuras de las guías para conseguir comportamiento monomodo si: **a)** el contraste de índices es bajo ($<5 \cdot 10^{-3}$) **b)** si el contraste de índices es alto ($>10^{-1}$)

Para obtener comportamiento monomodo en la dirección lateral, se ha de estudiar la altura y anchura del canal de las guías. Así también se plantean los dos casos anteriores:

a) Si la diferencia de índice de refracción entre el núcleo y el recubrimiento del sustrato ($n_n - n_r$) es muy pequeña (por ejemplo, del orden del 0.5 %), la altura y anchura del canal pueden tener dimensiones del orden de las micras, como puede verse en la Figura 6 (a), para el caso particular de una guía con recubrimiento de sustrato de espesor $d_r = 5 \mu\text{m}$ e índice de refracción $n_r = 1.46$ y un núcleo de $4 \mu\text{m}$ de espesor e índice $n_n = 1.464$ ($n_n - n_r = 4 \cdot 10^{-3}$).

b) Si la diferencia de índices de refracción entre el núcleo y el recubrimiento del sustrato ($n_n - n_r$) es alta (por ejemplo, por encima de 10^{-1}), los valores de la altura del canal han de ser unos pocos nanómetros (ver la Figura 6 (b) para recubrimiento de sustrato de $2 \mu\text{m}$ de espesor y de índice de refracción $n_r = 1.46$ y para un núcleo de 150 nm de espesor y un índice de refracción $n_n = 2.00$; $n_n - n_r = 0.54$). Otro ejemplo es el estudiado para un recubrimiento de sustrato de SiO_2 de espesor $2 \mu\text{m}$ con un índice de refracción $n_r = 1.46$ y un núcleo de Si_3N_4 de índice de refracción de $n_n = 2.00$ y con una anchura de escalón de $4 \mu\text{m}$. En esta configuración de guía de ondas, el comportamiento monomodo se obtiene para espesores de núcleo menores de 300 nm y alturas de escalón menores de 5 nm . Desde un punto de vista tecnológico, la necesidad de escalones de sólo unos nanómetros añade una gran complejidad al proceso de fabricación, más explícitamente al de fotolitografía: estos valores son aproximadamente un orden de magnitud superior a la rugosidad superficial de núcleo.

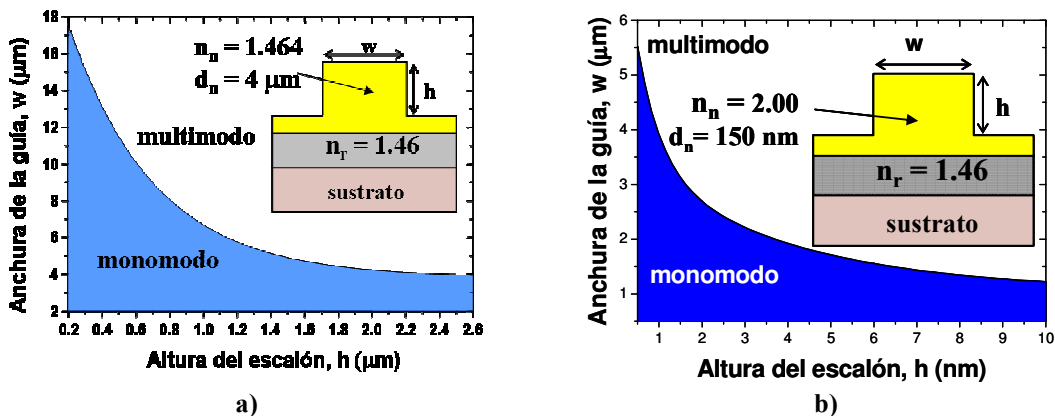


Fig. 6: Anchura del canal en función de su profundidad para obtener comportamiento monomodo lateral en las guías de ondas acanaladas con **a)** bajo contraste de índices y **b)** alto contraste de índices. Los cálculos están realizados mediante el método de índice efectivo, suponiendo una longitud de onda de $\lambda = 632.8 \text{ nm}$.

En ambos casos (a) y (b), los cálculos se han realizado empleando el método del índice efectivo calculando, para cada valor de la altura del escalón h , el número de modos guiados que soporta la estructura al variar la anchura de la guía w .

2.2.2 Diseño de la estructura de las guías con alta sensibilidad superficial: modelización teórica

Para conseguir biosensores ópticos de campo evanescente altamente sensibles, es necesario que la longitud de penetración del campo evanescente en el medio externo sea lo suficientemente alta como para que las interacciones biológicas que tienen lugar sobre la superficie del sensor afecten al modo guiado y puedan ser detectadas. Estas interacciones inducen cambios en las propiedades ópticas de propagación del modo guiado, o lo que es lo mismo, en su índice de refracción efectivo, que está relacionado con la sensibilidad del sensor. Se puede definir *sensibilidad* como la variación del índice de refracción efectivo del modo guiado en función del cambio que produce dicho estímulo en el medio exterior. Generalmente, se trata de desarrollar un transductor que maximice su sensibilidad hacia el estímulo a detectar.

En función de cómo detecte el campo evanescente el cambio en el índice de refracción real externo, podemos hablar de dos tipos de sensibilidades, la *sensibilidad homogénea* y la *sensibilidad superficial* (Figura 7).

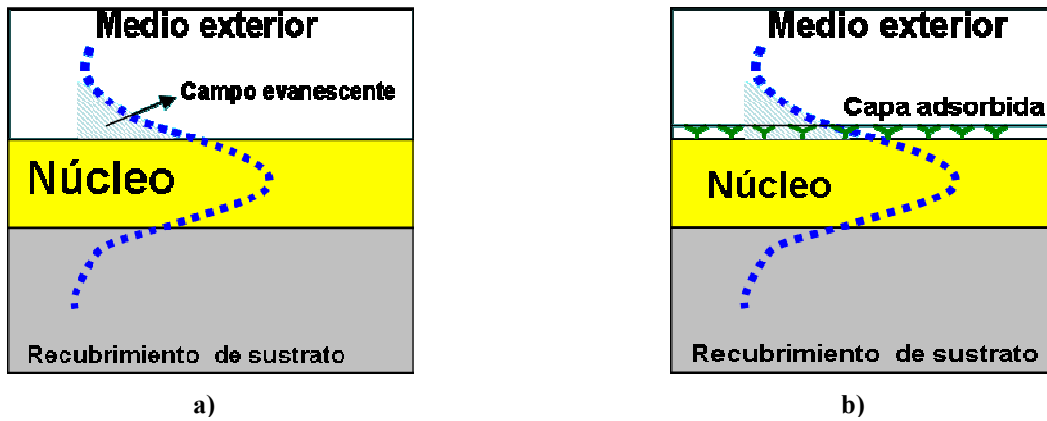


Fig. 7 Modo fundamental propagándose por una guía plana TIR para el cálculo de la a) Sensibilidad homogénea b) Sensibilidad superficial. También se observa la fracción del modo que viaja por el medio exterior (campo evanescente)

Si la variación en el índice de refracción es homogénea en el volumen del medio exterior, hablamos de sensibilidad homogénea. Ésta se define como el cambio en el índice de refracción efectivo, N , inducido por el cambio en el índice de refracción en volumen en el medio exterior, n_e :

$$\eta_e \equiv \frac{\partial N}{\partial n_e} \quad (40)$$

En nuestro caso se cumple que:

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot l \cdot \Delta N_{eff} \quad (41)$$

La sensibilidad homogénea también puede expresarse de la siguiente forma:

$$\eta_e \equiv \frac{\partial N}{\partial n_e} = \frac{\lambda}{2\pi \cdot l} \cdot \frac{\partial \varphi}{\partial n_e} \quad (42)$$

Con λ la longitud de onda de la luz guiada, l la longitud de la zona de interacción de la luz guiada y $\frac{\partial \varphi}{\partial n_e}$ la variación de fase inducida por el cambio en el índice de refracción en volumen en el medio exterior, n_e .

Este tipo de variación permite aplicaciones en las que el sensor actúa como refractómetro, es decir, en medidas cuya variación implica un cambio en su índice de refracción²². Para evaluar la sensibilidad homogénea, se puede hacer uso de la siguiente expresión analítica:

$$\eta_e \equiv \frac{\partial N}{\partial n_e} \cong \frac{n_e}{N} \frac{k_n^2}{k_n^2 - \gamma_e^2} \frac{\gamma_e}{k_0^2 d_{ef}} \left[2 \left(\frac{N}{n_0^2} \right)^2 - 1 \right]^\rho \quad (43)$$

donde $k_0=2\pi/\lambda$ es el vector de ondas en el vacío, γ_e viene dado por la ecuación (19), k_n por la ecuación (33) y d_{ef} recibe el nombre de *espesor efectivo del núcleo* y viene determinado por la siguiente expresión:

$$d_{ef} = d_n + \frac{\left[\left(\frac{N}{n_n^2} \right)^2 + \left(\frac{N}{n_e} \right)^2 - 1 \right]^{-\rho}}{k_0 \sqrt{N^2 - n_e^2}} + \frac{\left[\left(\frac{N}{n_n} \right)^2 + \left(\frac{N}{n_r} \right)^2 - 1 \right]^{-\rho}}{k_0 \sqrt{N^2 - n_r^2}} \quad (44)$$

donde n_e , n_n y n_r son los índices de refracción del medio exterior, recubrimiento de sustrato y núcleo respectivamente, N el índice de refracción efectivo y d_n el espesor real del núcleo. En las ecuaciones (43) y (44), el parámetro ρ puede tomar el valor de $\rho=0$ si el modo es TE o $\rho=1$ si el modo es TM.

Se ha calculado la sensibilidad homogénea teórica $\frac{\partial \phi}{\partial n_e}$ por medio del método del índice efectivo para

diferentes espesores de núcleo de la guía de ondas, tanto para la polarización TE como para la polarización TM (Figura 8). La guía de ondas propuesta es una guía de ondas acanalada con un índice de refracción del núcleo de $n_n=2.00$ y con un recubrimiento de sustrato de índice de refracción $n_r=1.46$ y espesor de $d_s=2 \mu\text{m}$. Para este cálculo teórico de la sensibilidad homogénea, se ha supuesto un cambio de índice de refracción externo de $\Delta n_e=1.2 \times 10^{-3}$.

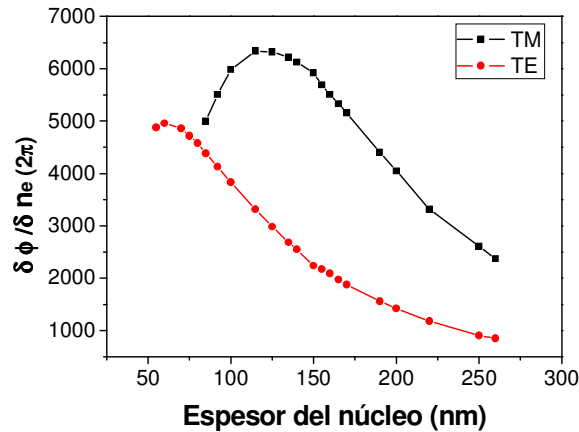


Fig.8 Sensibilidad homogénea teórica en función del espesor del núcleo (Si_3N_4 , $n_s=2.00$) de una guía de ondas acanalada con un recubrimiento de sustrato de SiO_2 de $2 \mu\text{m}$ de espesor y $n_r=1.46$ para un cambio de índice de refracción externo de $\Delta n_e=1.2 \times 10^{-3}$.

En la Figura 8 se puede observar que la mayor sensibilidad homogénea se obtiene para un espesor de núcleo en torno a $d_n=130 \text{ nm}$ en la polarización TM. Por debajo del espesor de 55 nm , la guía no soporta modos TM. Existe un rango de valores de espesor de núcleo d_n comprendido entre 55 nm y 80 nm aproximadamente, para el cual también sólo se propagan modos TE, pues la longitud de penetración del campo evanescente de los modos TM es muy elevada, lo que hace que el modo TM se irradie al medio externo. A partir de un espesor de núcleo de 260 nm , el comportamiento es bimodal para ambas polarizaciones.

Si la variación de índice de refracción se produce en la superficie del núcleo, en una región de espesor mucho menor que la longitud de penetración del campo evanescente en el medio externo, se habla de la *Sensibilidad superficial* (S_{sup}). Se trata del caso en que se adsorben moléculas sobre la superficie del sensor o se detectan interacciones biomoleculares cuando uno de los componentes ha sido inmovilizado previamente sobre la superficie. Así, la sensibilidad superficial se define²³ como el cambio en el índice de refracción efectivo, N , inducido por el cambio en el espesor de una capa de moléculas, d_i , que se adsorben sobre la superficie de la guía de ondas:

$$\eta_{\text{sup}} \equiv \frac{\partial N}{\partial d_l} \quad (45)$$

Considerando un espesor d_l de capa biológica adsorbida con índice de refracción n_l sobre la superficie de una guía de ondas plana TIR, la sensibilidad superficial queda determinada por la siguiente expresión^{5, 22}:

$$\eta_e \equiv \frac{\partial N}{\partial n_e} \cong \frac{k_n^2}{k_0^2 d_{ef} N} \frac{\left(\frac{n_l}{n_e}\right)^{2\rho} \gamma_e^2 - \left(\frac{n_e}{n_l}\right)^{2\rho} \gamma_l^2}{\left(\frac{n_n}{n_e}\right)^{2\rho} \gamma_e^2 + \left(\frac{n_e}{n_n}\right)^{2\rho} k_n^2} \quad (46)$$

En esta ecuación se ha supuesto que el espesor de la capa biológica inmovilizada sobre la superficie del sensor es mucho más pequeño que la longitud de onda de la luz empleada. Esta condición es válida para reacciones biológicas, así por ejemplo, el espesor de una capa de ADN hibridada en el área sensora del MZI es del orden del nanómetro y la de una inmunoreacción entre un anticuerpo y su antígeno de 2-3 nm, que son valores despreciables frente a los 633 nm de la longitud de onda que se suele emplear.

Existe un valor del espesor efectivo del núcleo para el cual la sensibilidad superficial toma un valor máximo⁴:

$$d_{ef,\text{min}} = \frac{0.7\lambda}{\sqrt{n_n^2 - n_r^2}} \quad (47)$$

Por tanto, los valores altos de sensibilidad se alcanzan para espesores de núcleo próximos al espesor efectivo mínimo. Es más, cuanto más pequeño sea este espesor efectivo mínimo, lo que implica un alto contraste de índices de refracción entre el núcleo y el recubrimiento de sustrato de la guía de ondas, más alta será la sensibilidad superficial.

Los cambios de índice de refracción del medio exterior se traducen en una variación del índice de refracción efectivo del modo guiado, debido a una interacción con el campo evanescente. Por tanto, si se produce una variación de índice de refracción externo n_e , como la adsorción de moléculas en la superficie de la guía de ondas, el cambio en el índice de refracción efectivo del modo guiado queda determinado por la siguiente expresión:

$$\Delta N = \frac{\partial N}{\partial n_e} \Delta n_e + \frac{\partial N}{\partial d_l} \Delta d_l \quad (48)$$

donde $\frac{\partial N}{\partial n_e}$ y $\frac{\partial N}{\partial d_l}$ son las sensibilidades homogénea y superficial, respectivamente.

Dependiendo de la configuración de los índices de refracción y espesores de las capas que forman la guía, la maximización de ambas sensibilidades puede conseguirse para distintos parámetros. En la Figura 9 se presenta la sensibilidad superficial teórica²⁴ calculada mediante el método del índice efectivo. Esta sensibilidad superficial se ha representado en función del espesor del núcleo y del contraste de índices núcleo-

recubrimiento, para valores de índice de refracción y espesores de capa biológica adsorbida de $n_l=1.45$ y $d_l=10$ nm, con medio externo agua, de índice de refracción $n_e=1.33$, tanto para la polarización TE como para la TM.

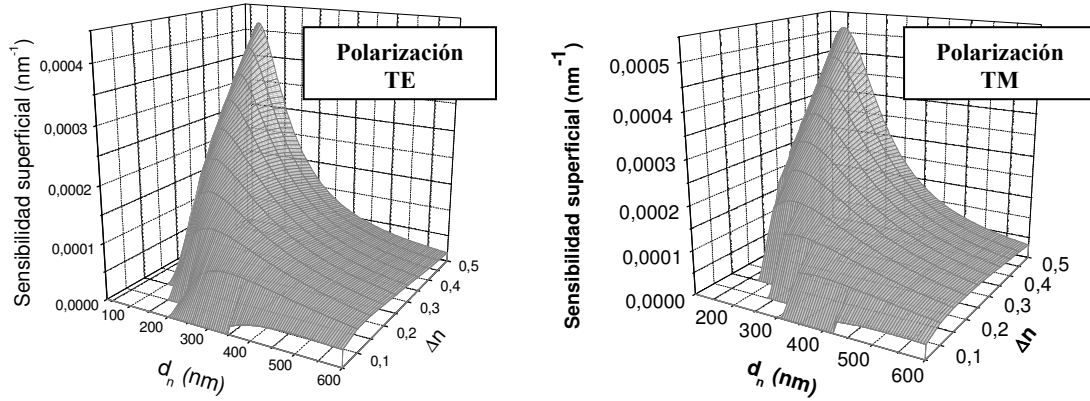


Fig. 9 Sensibilidad superficial de una guía de ondas en función del contraste de índices con el recubrimiento de sustrato Δn y del espesor de núcleo d_n . Se supone que el recubrimiento de sustrato es SiO_2 con un índice $n_r = 1.46$, y la capa de moléculas tiene un índice $n_l = 1.45$ y espesor $d_l=10$ nm y la longitud de onda de la luz es de 632.8 nm.

Como se puede observar en la Figura 9, la máxima sensibilidad superficial se consigue con guías con alto contraste de índices y espesores en torno a los cientos de nanómetros. De hecho, para mostrar los espesores de núcleo necesarios que dan lugar a una alta sensibilidad superficial, se ha representado en la Figura 10 la sensibilidad superficial en función del espesor del núcleo de Si_3N_4 ($n_n=2.00$) de una guía de ondas acanalada de 2 μm de espesor de recubrimiento de sustrato de SiO_2 ($n_r=1.46$), con una capa biológica ($n_l=1.45$) de espesor $d_l=10$ nm, adsorbida sobre el núcleo e inmersa en un medio externo agua ($n_e = 1.33$).

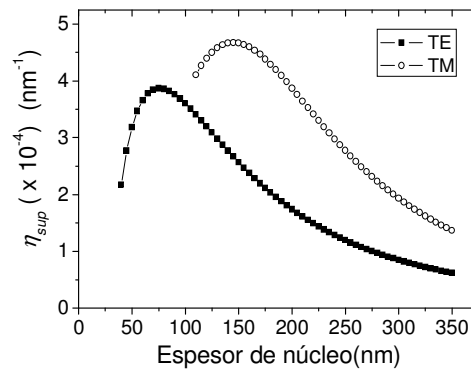


Fig.10 Sensibilidad superficial en función del espesor del núcleo (Si_3N_4 , $n_n=2.00$) de una guía de ondas acanalada con un sustrato de SiO_2 de 2 μm de espesor, una capa biológica adsorbida ($n_l=1.45$, $d_l=10$ nm) sobre el núcleo y en un medio externo de agua ($n_e=1.33$)

Si se supone una capa núcleo de Si_3N_4 ($n_n = 2.00$) sobre un recubrimiento de sustrato de SiO_2 de 2 μm de espesor, la máxima sensibilidad superficial se obtiene para un espesor de 75 nm en la polarización TE y 150 nm en la polarización TM, como muestra la Figura 10. Se ha de destacar que, atendiendo a esta modelización teórica,

para un espesor de 75 nm no existen modos TM que se propaguen por el núcleo de la guía propuesta.

2.2.3. Diseño de los divisores

El MZI es un interferómetro de doble haz, que en su versión integrada, consiste en dos uniones en Y o divisores de haz enfrentados. Una unión en Y o divisor de haz consiste en una guía de entrada que se separa gradualmente, a lo largo de una zona de transición, en dos guías similares. Si se considera que las guías de onda que constituyen el MZI son monomodo, que la fuente de luz empleada es monocromática y que la amplitud del campo eléctrico en la guía de entrada es E_0 , entonces a la salida en una de las ramas éste será $\sqrt{\alpha_1 \cdot k_1} \cdot E_0 \cdot \cos(w_0 t)$, mientras que para la otra será $\sqrt{\alpha_1 \cdot (1 - k_1)} \cdot E_0 \cdot \cos(w_0 t)$, donde α_1 son las pérdidas que se producen en la zona de transición del divisor y k_1 el coeficiente de acoplamiento de la luz en el divisor. Además, la luz se propaga con ciertas pérdidas ópticas β_s y β_r propias de las ramas sensora y de referencia, respectivamente. A lo largo de ellas, la luz experimentará un cambio de fase φ_s y φ_r en cada una de las ramas, tal como se muestra en la siguiente expresión:

$$\varphi_{s,r} = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot l \cdot N_{s,r} \quad (49)$$

con $N_{s,r}$ el índice de refracción efectivo del modo guiado, λ la longitud de onda de la luz y l la longitud de interacción.

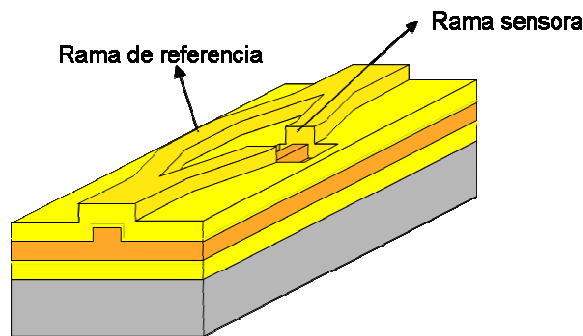


Fig.11 Esquema del interferómetro Mach-Zehnder integrado

Cuando ambos haces, desfasados uno con respecto al otro con un desfase $\Delta\varphi_{s,r} = \varphi_s - \varphi_r$, se recombinan a través de la otra unión en Y, se excitarán modos de orden superior en la guía de salida del MZI, que serán radiados fuera de la guía, que tiene comportamiento monomodo (Figura 12). De esta forma, la intensidad a la salida del MZI vendrá determinada por la siguiente expresión:

$$I = \langle E_r^2 \rangle + \langle E_s^2 \rangle + 2 \langle E_r \cdot E_s \rangle \quad (50)$$

con $\langle \cdot \rangle$ el promedio temporal sobre un período mucho mayor que w_0 . De esta forma se obtiene la siguiente expresión:

$$I = I_0 \cdot [\alpha_1^2 \cdot k_1^2 \cdot \beta_r + \alpha_1^2 \cdot (1 - k_1^2) \cdot \beta_s + 2 \cdot \alpha_1^2 \cdot k_1 \cdot (1 - k_1) \sqrt{\beta_r \cdot \beta_s} \cos(\varphi_r - \varphi_s)] \quad (51)$$

con $I_0 = E_0^2/2$.

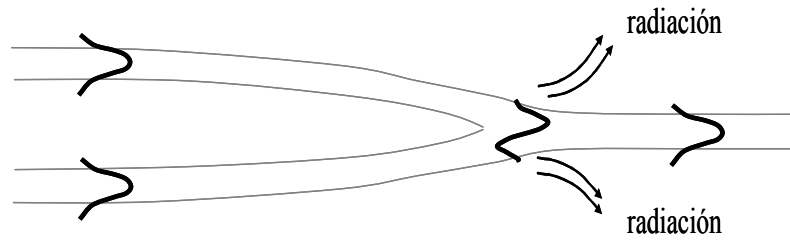


Fig. 12 Comportamiento monomodo en una unión en Y. Los modos superiores que se excitan al recombinarse los haces de ambas ramas, se pierden por radiación.

Conociendo los coeficientes de acoplamiento de los divisores, las pérdidas en las uniones en Y y las pérdidas de propagación de las ramas interferométricas, es posible establecer una relación directa entre la variación sinusoidal de la señal de salida del MZI y el cambio de fase que experimenta la luz en una de las ramas frente a la otra. Es importante también que el contraste en la señal de salida del MZI sea máximo, es decir, que la amplitud de la señal periódica del MZI sea la máxima posible. Este contraste viene determinado por el *factor de visibilidad* (V), definido como:

$$V = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}} \quad (52)$$

Un contraste máximo en la señal de salida del MZI implica un factor de visibilidad $V=1$. Si se suponen uniones en Y simétricas y pérdidas y factores de acoplamiento iguales, la ecuación (52) puede expresarse de la siguiente forma:

$$V = \frac{2 \cdot k \cdot (1-k) \cdot \sqrt{\beta_r \cdot \beta_s}}{k^2 \cdot \beta_r + (1-k)^2 \cdot \beta_s} \quad (53)$$

Si los divisores se diseñan simétricos, el factor de acoplamiento y las pérdidas en las uniones Y dependerán sólo de los procesos de fabricación. El factor de visibilidad toma el valor de $V=1$ para un factor de acoplamiento $k=0.5$ o 3 dB, es decir, la intensidad de la luz que se propaga en ambas ramas (de referencia y sensora) debe ser la misma (Figura 13).

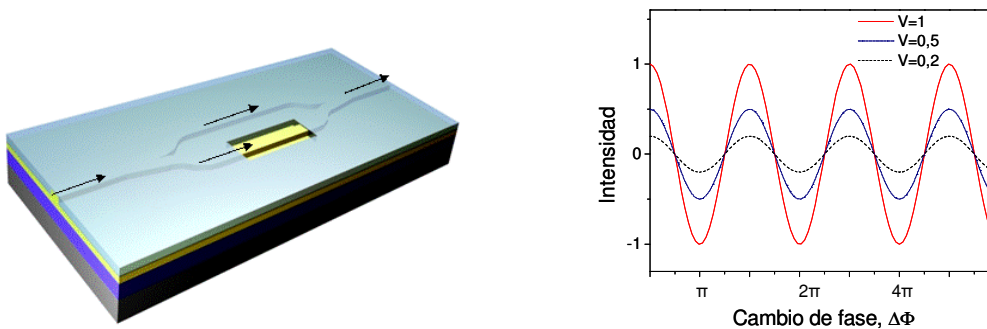


Fig. 13 Configuración final del MZI y señal sinusoidal de salida para diferentes valores del factor de visibilidad

Para evitar que las pérdidas totales de propagación sean muy altas, la longitud total del interferómetro ha de ser de unas decenas de milímetros (30 mm). Por otro lado, para que la visibilidad sea máxima, con pérdidas en las uniones Y y de acoplamiento muy bajas, las dos ramas del MZI han de ser idénticas (simétricas respecto al eje de la guía de entrada). Un diseño adecuado de las ramas del MZI permitirán pérdidas de acoplo de la luz muy bajas. Por ello, mediante estudios de modelización con BPM realizados por miembros de nuestro grupo¹⁶ para el diseño adecuado del interferómetro, se ha elegido una separación entre las ramas del MZI de 50 μm , que nos asegura un acoplamiento de modos prácticamente nulo entre ambas guías.

La zona progresiva de transición entre la guía monomodo recta de entrada del MZI hasta su definitiva división en dos guías de onda rectas monomodo de salida, no puede ser excesivamente larga, para que así la longitud total del sensor sea compatible con los procesos de fabricación (con pérdidas de propagación bajas y con vías de desarrollo a un futuro prototipo compacto). Además, experimentalmente se ha comprobado que esta zona ha de ser suave y poco abrupta, para que las pérdidas en las uniones Y sean bajas y la adaptación entre los modos de las guías entrada/salida y de las guías en estas uniones sea lo más eficiente posible, con bajas pérdidas de radiación. Por ello, los radios de curvatura óptimos en las uniones Y diseñadas, son de 80 mm (Prieto).

Previamente a su fabricación, se diseñaron las máscaras necesarias para la definición de los interferómetros, divisores, las áreas sensoras y las marcas de alineamiento mediante el programa Lasi versión 7.0. Una ilustración de este programa con el esquema de la oblea se ve reflejada en la Figura 14. En estas máscaras, la oblea de silicio queda dividida en 14 chips, que se cortarán con una sierra de diamante y posteriormente se pulirán para realizar los estudios ópticos y químicos.

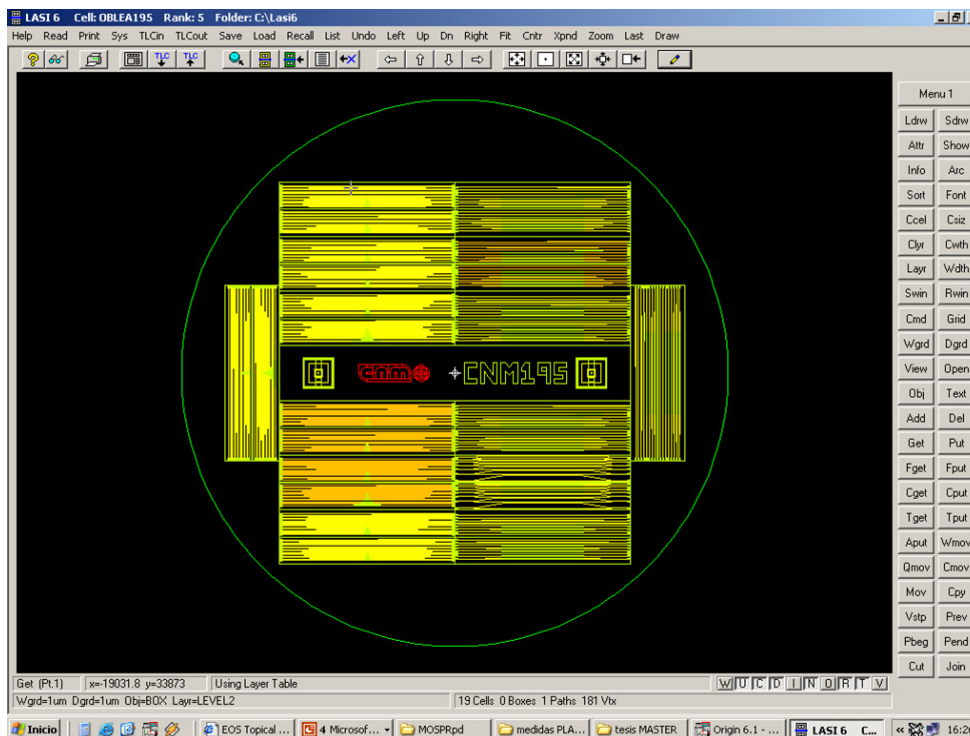


Fig. 14 Programa de diseño Lasi 7.1, y esquema de la estructura de la oblea diseñada

Son dos los tipos distintos de obleas que se han diseñado, con distintas estructuras geométricas de guiado, contenidas en los llamados chips, de dimensiones $3 \times 1 \text{ cm}^2$. El primer tipo se muestra en la Figura 15 y presenta chips con guías rectas (con y sin área sensora), divisores de haz y MZIs simétricos (con una, con dos y sin área sensora). Las uniones Y tienen diferentes radios de curvatura o ángulos, dependiendo de si son lineales o curvas. Los canales de las guías tienen anchuras de 3, 4, 5, 6, 7 y $8 \mu\text{m}$. Este tipo de obleas tienen espesores de núcleo de 200 nm y fueron usadas en estudios anteriores para obtener experimentalmente los radios de curvatura óptimos en las uniones Y. En esta Tesis se emplearon principalmente para la caracterización modal de sus distintas estructuras de guiado.

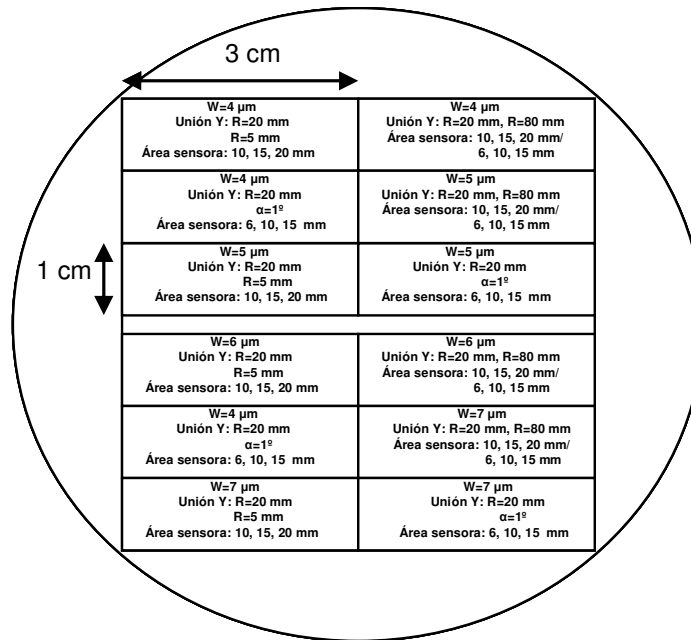


Fig. 15 Esquema de una de las obleas con sus distintas estructuras de guiado

El segundo tipo de obleas (Figura 16) empleadas en esta Tesis presenta también chips con las mismas estructuras de guiado (guías rectas, divisores y MZIs) que en la oblea anterior, con y sin áreas sensoras, pero con la diferencia de tener uniones Y solamente curvas (no lineales) con el mismo radio de curvatura ($R=80 \text{ mm}$). Las anchuras y alturas de canal son las mismas para todos los chips, con $4 \mu\text{m}$ y 3 nm respectivamente. Las longitudes de las áreas sensoras de las guías rectas de algunos chips varían entre $50\text{-}1000 \mu\text{m}$, mientras que las de los MZIs son las mismas (15 mm). A diferencia de la otra oblea, ésta tiene algunos MZIs asimétricos (distinta longitud de ramas sensora y de referencia) y otras estructuras de guiado presentan el canal de la guía acanalada *rib* invertido, aunque no se emplearán en esta tesis. Los espesores de núcleo crecidos en este tipo de obleas son de 75 nm , 150 nm y 200 nm y sus MZIs serán empleados tanto en la caracterización óptica y morfológica como en aplicaciones biosensoras.

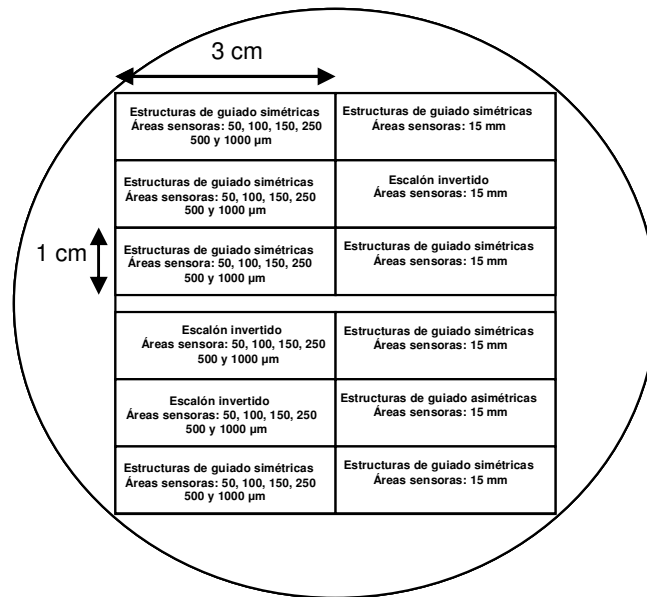


Fig. 16 Esquema del segundo tipo de obleas fabricadas, con sus distintas estructuras de guiado simétricas, antisimétricas y de escalón invertido.

Cada chip contiene los siguientes dispositivos (Figura 17):

i) Guía de ondas recta sin área sensora ($W0$): Se trata de una guía de ondas recta acanalada *rib* y se emplea para estudiar su comportamiento modal, al igual que las pérdidas de propagación.

ii) Guía de ondas recta con un área sensora ($W1$): Un área sensora abierta en la guía de ondas recta permite estudiar cómo afecta ésta a la propagación del modo.

iii) Divisor de haz sin área sensora ($D1$): La guía recta se divide en otras dos por medio de una unión Y. Se emplea para estudiar el comportamiento modal del dispositivo y el factor de acoplamiento de la unión Y.

iv) Divisor de haz con área sensora ($D2$): Un área sensora está abierta en una de las ramas del divisor. El modo guiado experimenta dos transiciones bruscas al comienzo y al final del área sensora, al cambiar el índice de refracción del medio de recubrimiento. Con este dispositivo se pueden estudiar las pérdidas de transición que experimenta el modo en estas discontinuidades y compararse con las pérdidas que hay en la otra rama.

v) Interferómetro sin área sensora ($I1$): permite saber si la luz se guía correctamente por el MZI.

vi) Interferómetro con sólo un área sensora abierta ($I2, I3$) en la rama sensora: Un área sensora está abierta en una de las ramas del interferómetro y permite emplear el MZI como biosensor, mediante el flujo de disoluciones por el área sensora con una macrocubeta. Esta cubeta tiene un canal por el que fluyen las disoluciones, de longitud y anchuras mayores a las del área sensora. Las variaciones en el índice de refracción o las interacciones moleculares sólo afectan al área sensora, al estar la rama de referencia protegida por el óxido de recubrimiento.

vii) *Inteferómetro con dos áreas sensoras abiertas (I4, I5, I6)*: Dos áreas sensoras, una en cada rama, están abiertas en este tipo de MZIs. Debido a la homogeneidad de los procesos de fabricación en las distintas zonas de las obleas (y por tanto en cada una de las zonas del MZI) y a la distancia tan pequeña entre las ramas, se puede suponer que estas ramas son idénticas y que responden de la misma forma ante las variaciones ambientales en el medio externo. Por tanto, si en una rama se consigue que se lleve a cabo la reacción final, el cambio de fase será debido únicamente a las interacciones específicas entre las moléculas receptoras y sus analitos complementarios.

El correcto funcionamiento de los MZIs con dos áreas sensoras como dispositivos biosensores precisa de una fluídica integrada en el chip, con microcubetas y microcanales que permiten distribuir las disoluciones requeridas en cada una de estas áreas sensoras, al igual que en varios de ellos de forma simultánea. Nuestro grupo ha conseguido desarrollar esta fluídica integrada²⁵, haciendo uso de la tecnología polimérica del SU8²⁶, con el objetivo de obtener un sistema total de multianálisis.

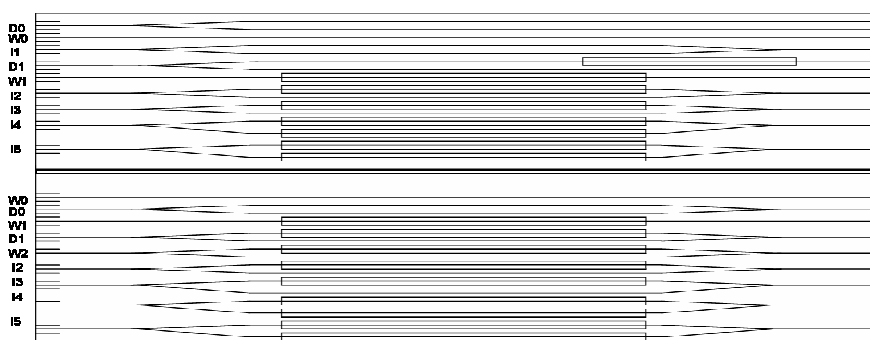


Fig. 17 Distribución de los diferentes dispositivos ópticos dentro de un chip

2.3 Fabricación de los dispositivos

La fabricación de los dispositivos se ha realizado en las instalaciones de Sala Blanca que posee el Centro Nacional de Microelectrónica en Barcelona (CNM). Se hace uso de la tecnología microelectrónica de silicio compatible CMOS^{27-29, 30}, donde los materiales básicos que se emplean son el óxido de silicio y el nitruro de silicio, que son transparentes a la longitud de onda de trabajo ($\lambda=632.8$ nm y 635 nm). Las técnicas de crecimiento que utilizan la tecnología microelectrónica de silicio compatible CMOS deben proporcionar capas amorfas, sin estructuras policristalinas (que puedan producir fenómenos de birrefringencia) con buena adhesión al sustrato y estabilidad mecánica y química; el índice de refracción de las capas crecidas debe de ser uniforme y reproducible mientras que su pureza ha de ser muy alta y su rugosidad muy baja para que las pérdidas de luz en la propagación sean mínimas. Un esquema de los pasos seguidos y de las diferentes técnicas usadas en la fabricación de los MZIs, aparece en la Figura 18 y será descrito a continuación.

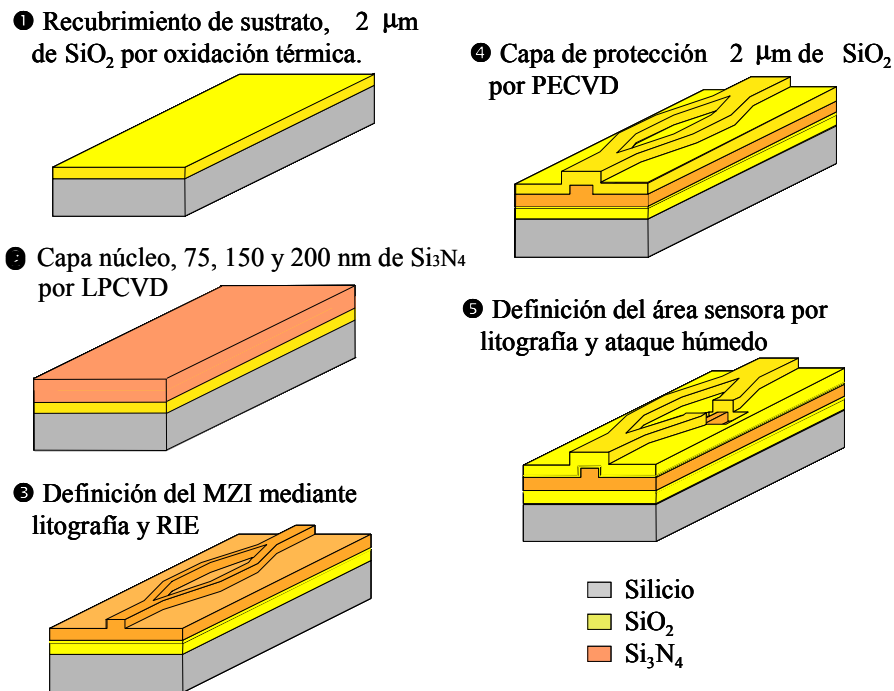


Fig. 18 Esquema del proceso de fabricación de los MZI para aplicación biosensora.

2.3.1 Crecimiento del recubrimiento de sustrato: El proceso de fabricación parte de una oblea de silicio de 4 pulgadas de diámetro, dopada p, con orientación $\langle 100 \rangle$ y con un grosor de 500 μm . Sobre esta oblea se crecen 2 μm de SiO_2 por oxidación térmica del sustrato, formando la capa de recubrimiento del sustrato (Figura 14.1). El óxido de silicio crecido es estequiométrico con un índice de refracción de 1.46, de estructura amorfa y una densidad entre 2.15-2.25 g/cm^3 . Esta capa es necesaria para conseguir el confinamiento de la luz en el núcleo y para su aislamiento del sustrato de silicio, que es absorbente en el visible.

2.3.2 Crecimiento de la capa del núcleo: La capa núcleo de la guía está fabricada con Si_3N_4 , cuyo índice de refracción es 2.00, lo cual permite tener un alto contraste de índices ($\Delta n = 0.54$). Esta capa se deposita mediante deposición química en fase vapor a baja presión (LPCVD- Low Pressure Chemical Vapour Deposition)^{31, 32}, que permite el crecimiento de capas de alta densidad, muy homogéneas y con baja contaminación de partículas. Los espesores de núcleo elegidos fueron de 75 nm, 150 nm y 200 nm (Figura 14.2). La razón de fabricar MZIs con espesores de núcleo de 200 nm fue para poder tener medidas con dos polarizaciones, una con muy alta sensibilidad (polarización TM) y otra con algo menos (polarización TE). Los espesores de núcleo de 75 nm fueron escogidos para maximizar la sensibilidad en polarización TE. Con este espesor no se transmiten modos TM a lo largo del área sensora. Se construyeron también MZIs de espesores de núcleo de 150 nm, para así conseguir la máxima sensibilidad posible en TM. Otra desventaja de este espesor es que el modo TM se propaga muy poco confinado en el núcleo, de tal forma que por cualquier impureza o defecto de fabricación en el área sensora puede convertirse en modo de radiación y absorberse al medio externo.

2.3.3 Definición de las estructuras interferométricas: El siguiente paso consiste en definir las estructuras interferométricas formadas por guías acanaladas

(Figura 14.3). Para ello, se realiza un proceso litográfico y un ataque en seco con iones reactivos (RIE) para conseguir canales de 3-4 nm de profundidad y anchuras comprendidas entre 3 y 8 μm . El ataque en seco combina las ventajas del ataque físico (anisotropía) con las del ataque químico (selectividad) aunque las paredes de las guías no son perfectamente verticales. Los divisores y uniones Y de los interferómetros presentan brazos circulares de 80 mm de radio, pues son los que han exhibido menores pérdidas en estudios previos²². La separación final entre las ramas del interferómetro es de 100 μm , evitando así el acoplamiento entre los modos viajando en ambas ramas.

2.3.4 Crecimiento de la capa recubrimiento: A continuación se deposita una capa de SiO_2 de 2 μm de espesor (Figura 14.4) mediante deposición química en fase vapor asistida por plasma (PECVD – Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition)³³⁻³⁶, que sirve para proteger el interferómetro y luego así definir el área sensora. El índice de refracción de esta capa es de 1.46.

2.3.5 Definición de las áreas sensoras y marcas de alineamiento: Por último, se definen las áreas sensoras de los dispositivos atacando el SiO_2 de recubrimiento en la rama sensora, mediante ataque químico húmedo (Figura 14.5). Este ataque químico del SiO_2 presenta una gran selectividad respecto al Si_3N_4 , con lo que se evita el problema de poder alterar la estructura acanalada del nitruro, aunque crea paredes verticales con un cierto grado de inclinación, factor que no es importante en el funcionamiento correcto de los MZIs. De esta manera, se abre un canal de 50 μm de ancho y 15 mm de largo, a través del cual el dispositivo interactuará con el entorno. La longitud del área sensora se ha elegido como un compromiso entre la obtención de una alta sensibilidad del dispositivo (proporcional a la longitud del área sensora) y una longitud del dispositivo que no sea demasiado larga para evitar que las pérdidas de propagación sean importantes y con vistas a desarrollar futuros prototipos compactos.

Debido a la altura nanométrica de los escalones de las guías, no existe ninguna referencia visual para saber dónde están los dispositivos ópticos después de la fabricación. Sólo las áreas sensoras abiertas (Figura 19 (a)) pueden verse por microscopio óptico. Por ello, en este paso se han incluido también marcas de alineamiento, por ataque químico húmedo, para facilitar el enfoque de la luz en los interferómetros (Figura 19 (b)).

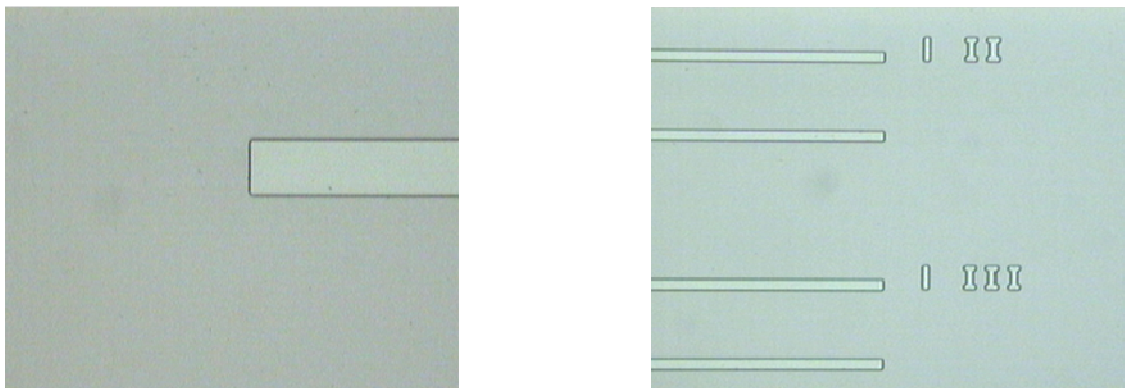


Fig. 19 a) Comienzo del área sensora de un MZI **b)** Marcas de alineamiento para facilitar el acoplamiento en los MZIs

2.4 Preparación de las guías

Ya cortados de forma individual los chips, por medio de una sierra de diamante, se procedió a pulir sus caras de entrada y de salida. Un buen proceso de pulido es fundamental para que estas caras de entrada y salida de los chips sean superficies especulares y la luz pueda acoplarse de forma directa, por medio de una fibra u objetivo. Por ello, se ha diseñado un sistema de pulido que consta de un plato giratorio sobre el que se fija un papel abrasivo y sobre el que se apoya la cara de entrada o salida del chip. La pulidora empleada está diseñada para el pulido de superficies planas, por lo que se desarrolló un sistema robusto con posicionadores micrométricos (eje-x y eje -z) que, acoplado a la pulidora, permita colocar las muestras en posición vertical para el pulido de las caras de los chips (Figura 20 (a)). El papel abrasivo es de carburo de silicio (SiC), con gránulos de 9 y 0.3 μm .

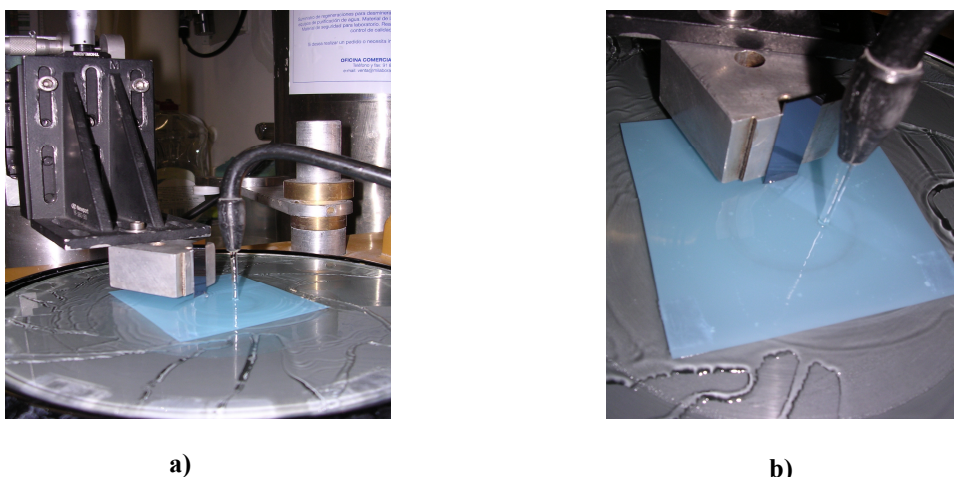


Fig. 20 Montaje experimental del proceso de pulido donde se observa: **a)** posicionador X-Z que permite el movimiento perpendicular y lateral del chip sobre el papel abrasivo de pulido; **b)** el chip con los distintos elementos ópticos se ha de colocar perpendicular al plato de giro

El pulido comienza con un papel de grano de 9 μm , debastándose el canto del chip hasta alcanzar el extremo de las guías, que coincide con el comienzo de las marcas de alineamiento. La velocidad de rotación usada es de 250 rpm y un chorro de agua lubrica la superficie de pulido. El tiempo aproximado de debastado es de unos 45 minutos. A continuación, para eliminar los daños ocasionados en las guías por el anterior proceso, se usa un papel abrasivo de grano de 0.3 μm , a velocidad de giro de 75 rpm durante 20 minutos y con agua como lubricante. Después de cada fase de pulido, los cantos deben inspeccionarse con microscopio óptico y cerciorar si su superficie está libre de defectos. Las muestras deben colocarse con la zona de las guías enfrentadas al movimiento de rotación del plato y lo más perpendicular a éste, pues durante el proceso de pulido, las partículas desprendidas son arrastradas y dañan la zona posterior del chip (Figura 20 (b)). Una vez que el pulido se ha realizado correctamente, las caras de entrada y salida del chip quedan libre de defectos, pudiéndose observar al microscopio óptico las marcas de alineamiento y las distintas capas (sustrato, recubrimiento de sustrato, núcleo y recubrimiento de núcleo) que configuran la guía de ondas (Figura

21). De esta forma, es de esperar que las pérdidas de inserción de luz en la guías sean muy bajas. El proceso de pulido se simplificó sustancialmente cuando las obleas fueron cortadas por discos de sierra de diamante que cortaban y pulían simultáneamente. De esta forma, los chips recién cortados ya salían con cantos debastados y sólo fue necesario emplear 20 minutos de pulido con el papel de $0.3\ \mu\text{m}$ para que su superficie quedara especular. Así, cada chip podía ser pulido en 40 minutos aproximadamente, lo que implicaba un ahorro de tiempo considerable.

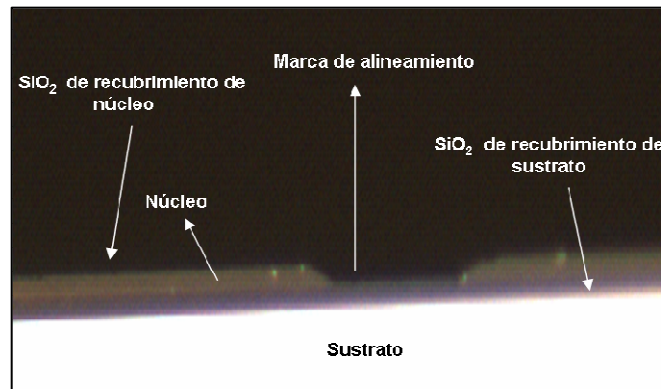


Fig. 21 Foto de una zona del canto de un chip pulido, donde se observan las capas de la guía TIR (la zona blanca es el sustrato ($500\ \mu\text{m}$), la capa más oscura el SiO_2 ($2\ \mu\text{m}$), la línea amarilla el núcleo ($200\ \text{nm}$) y la marrón la capa de protección de SiO_2 ($2\ \mu\text{m}$) y la marca de alineamiento).

2.5 Caracterización morfológica

Se ha realizado una caracterización morfológica de las capas. Para ello se hizo uso de la microscopía de fuerza atómica (AFM)³⁷, para obtener información sobre la calidad de las mismas a través de su rugosidad³⁸. Por otro lado, también va a permitir comprobar la profundidad del canal en las guías acanaladas, el espesor de la capa de óxido de protección y su ángulo de ataque, que serán comparados con los valores nominales de fabricación.

En la Figuras 22 y 23 se muestra el estudio que se ha realizado por AFM de los MZIs. Como se observa en la Figura 22, el canal de las guías es de $4\ \text{nm}$ de profundidad y está de acuerdo con los valores nominales de fabricación. La rugosidad de la capa de Si_3N_4 , medida a través de la desviación cuadrática media, es de sólo $1.5\ \text{\AA}$, lo cual es indicativo de la excelente calidad estructural de las capas crecidas mediante LPCVD. En cambio, la capa de óxido de protección presenta poca uniformidad pudiendo variar el espesor de la capa dentro de la oblea entre 1.5 y $2\ \mu\text{m}$. Esta falta de uniformidad no es importante ya que la penetración del campo evanescente en el SiO_2 para distancias mayores a $500\ \text{nm}$ puede considerarse despreciable, por lo que no afecta al modo guiado. En cuanto a la rugosidad, esta capa presenta una desviación cuadrática media hasta de $5\ \text{nm}$, que es un valor alto y puede tener cierta importancia en el funcionamiento de los interferómetros, ya que puede hacer perder luz en las transiciones del área sensora, empeorando la amplitud de la respuesta en intensidad de los interferómetros.

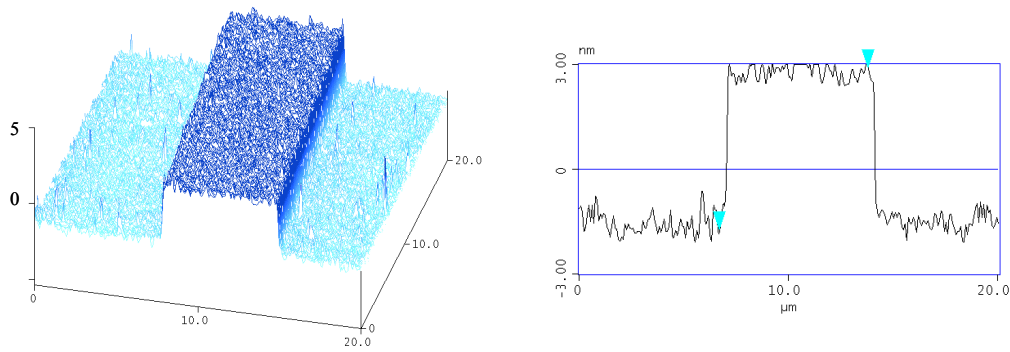


Fig. 22 Medidas morfológicas de las guías acanaladas mediante microscopía de fuerza atómica.

Como se puede ver en la Figura 23, el ángulo de ataque del óxido en la capa de recubrimiento es muy bajo, entre 15 y 25°. Este bajo ángulo crea una zona de unas 5 micras de longitud a la entrada y a la salida del área sensora en la que el campo evanescente va a interactuar con la superficie rugosa del SiO₂, pudiendo dispersar la luz guiada.

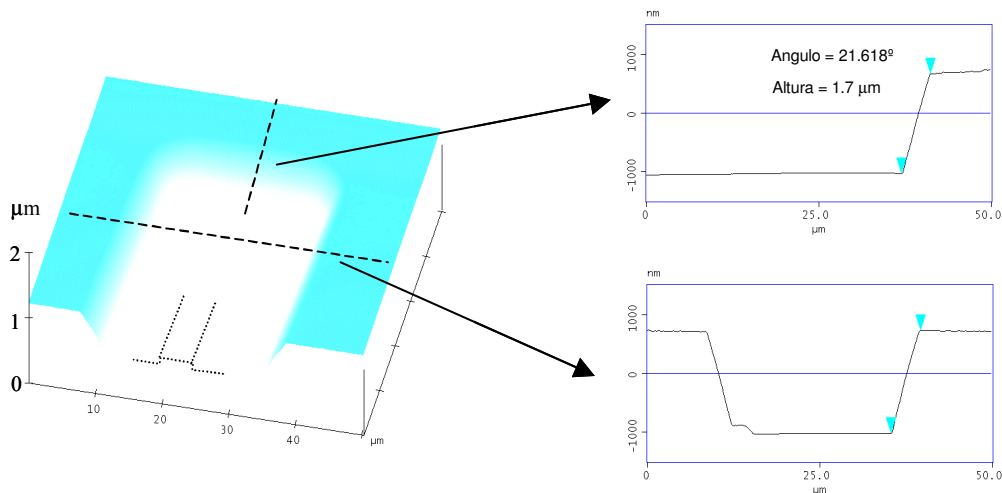


Fig. 23 Imagen AFM del área sensora del MZI. En líneas discontinuas se indican los lugares en los que se ha medido el perfil del área sensora. En línea punteada se representa el lugar en el que se encuentra el canal de la guía óptica en relación con el área sensora.

Las imágenes de AFM fueron tomadas con un Microscopio de Fuerzas Atómicas de la marca Digital Instrument Nanoscope III y funcionando en modo de contacto. Las palancas comerciales usadas son de nitruro de silicio de la marca Olympus y tienen una constante de elasticidad de 0.10 N/m.

2.6 Conclusiones

En este capítulo se han revisado los conceptos teóricos necesarios para entender la propagación de la luz por las guías de onda planas, al igual que en las guías de onda acanaladas *rib*, esenciales en el funcionamiento del MZI. Éstas últimas guías confinan la luz en dos dimensiones y para su análisis teórico es necesario utilizar, o bien métodos aproximados (como el del Método del Índice Efectivo, que es el empleado en esta Tesis Doctoral) o bien métodos más exactos (como el Método de Diferencias Finitas no Uniforme).

Las guías de onda acanaladas TIR que configuran el MZI deben tener dos características muy importantes para su posterior funcionamiento biosensor: comportamiento monomodal y alta sensibilidad superficial. Para conseguir el comportamiento monomodal en las dos direcciones del espacio, es necesario un alto contraste de índices entre recubrimiento de sustrato y núcleo, unos espesores de recubrimiento de sustrato de unas pocas micras, unos espesores de núcleo de pocas centenas de nanómetros (90-300 nm) y unas alturas y anchuras de canal en torno a nanómetros y micras respectivamente. Para conseguir una alta sensibilidad superficial, tanto para la polarización TE como TM, se diseñan guías de onda acanaladas *rib* con índices de refracción de recubrimiento de sustrato de $n_r=2.00$ y espesores de $d_r=2\mu\text{m}$ y con núcleos de índice de refracción $n_n=2.00$ y espesores de $d_n=75\text{ nm}$, 150 nm y 200 nm .

En un MZI, la luz que se propaga por la guía acanalada *rib* se divide en dos por medio de una unión en Y, para volverse a recombinar a través otra unión en Y. Por tanto, además de las dos características esenciales anteriores, es necesario que las pérdidas de propagación en cada una de las ramas y las pérdidas de acoplamiento de los divisores, sean muy bajas. Se han diseñado MZIs con uniones curvas de radios de $80\text{ }\mu\text{m}$ y con separación entre ramas de $50\text{ }\mu\text{m}$, como configuraciones óptimas de bajas pérdidas.

Para la fabricación de los dispositivos se ha empleado la tecnología del silicio. De esta forma, los MZIs fabricados cumplen las características requeridas de diseño para su funcionamiento como biosensor altamente sensible y de bajas pérdidas y para poder integrarlos en un futuro prototipo compacto. La estructura de las guías de onda óptimas que configuran el MZI para obtener un biosensor, es la siguiente: Un recubrimiento de sustrato de SiO_2 de espesor de $2\text{ }\mu\text{m}$ crecido por oxidación térmica sobre el sustrato de Si; un núcleo de Si_3N_4 depositado por LPCVD sobre el recubrimiento del sustrato y con espesores que pueden ser de 75 nm y 200 nm , para conseguir altas sensibilidades en TE y TM respectivamente o de 150 nm para conseguir la sensibilidad máxima en TM. Un recubrimiento del núcleo de $2\text{ }\mu\text{m}$ de espesor depositado por PECVD. Por último, las áreas sensoras son abiertas en una y dos de sus ramas, mediante un proceso de litografía y ataque húmedo, tienen una longitud de 15 mm y un ancho de $50\text{ }\mu\text{m}$.

Una vez fabricadas las obleas con sus chips, que contienen los distintos MZIs, y otros elementos ópticos (guías de onda rectas, divisores con y sin área sensora, etc), es necesario pulirlos para conseguir superficies especulares en las caras de entrada y salida de la luz. Ya pulidos, se realizó una caracterización morfológica de los mismos con la idea de obtener información sobre la calidad de las capas (recubrimientos y núcleo de las guías que los configuran) a través de su rugosidad, al igual que sobre la profundidad y anchura de los canales, espesores de las capas de óxido de protección. La calidad óptica resultó ser muy alta, el ángulo de ataque de la capa de óxido de protección variaba entre 15° y 25° y los valores de los espesores de las capas y de las alturas y anchuras de canal de las guías coincidían con los valores nominales de fabricación.

Referencias

1. Lifante, G., *Integrated photonics*, ed. Wiley. 2003, Madrid, Spain.

2. Okamoto, K., *Fundamental of Optical Waveguides*, ed. A. Press. 2000, Japan.
3. Marcuse, D., *Theory of dielectric optical waveguides*, ed. A. Press. 1974, Nueva York.
4. Tamir, T., *Guided -wave optoelectronics*. 1988, ed. Springer. Berlin.
5. Prieto, F., *Sensores interferométricos Mach-Zehnder integrados basados en guías de onda ARROW para aplicaciones biosensoras*. Tesis. 2002, Centro Nacional de Microelectrónica. Madrid.
6. Jiménez, D. J., *Diseño de dispositivos óptoelectrónicos Integrados: Métodos Numéricos de Simulación de la Propagación de Ondas Electromagnéticas*. Tesis. 2000, Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.
7. Chiang, K. S., *Construction of Refractive-Index Profiles of Planar Dielectric Wave-Guides from the Distribution of Effective Indexes*. Journal of Lightwave Technology, 1985. **3**(2): p. 385-391.
8. Marcatil, E., *Dielectric Rectangular Waveguide and Directional Coupler for Integrated Optics*. Bell System Technical Journal, 1969. **48**(7): p. 2071-&.
9. Kumar, A., Thyagarajan, K., and Ghatak, A. K., *Analysis of Rectangular-Core Dielectric Waveguides - an Accurate Perturbation Approach*. Optics Letters, 1983. **8**(1): p. 63-65.
10. Akiba, S. and Haus, H. A., *Variational Analysis of Optical-Waveguides with Rectangular Cross-Section*. Applied Optics, 1982. **21**(5): p. 804-808.
11. Batrak, D. V. Plisyuk. *Applicability of the effective index method for simulating ridge optical waveguides*. Quantum Electronics, 2006 **36** (4): p. 349-352
12. Gregorio, J. I. G., *Estudio teórico y desarrollo experimental de guías de onda ópticas en tecnología de silicio: aplicación al diseño de sensores optoquímicos*. Tesis. 1996, Universidad de Zaragoza. Zaragoza
13. Goell, J. E., *A Circular-Harmonic Computer Analysis of Rectangular Dielectric Waveguides*. Bell System Technical Journal, 1969. **48**(7): p. 2133-+.
14. Schulz, N., Bierwirth, K., and Arndt, F., *Rigorous Finite-Difference Analysis of Coupled Channel Wave-Guides with Arbitrarily Varying Index Profile*. Journal of Lightwave Technology, 1991. **9**(10): p. 1244-1253.
15. Yeh, C., Ha, K., Dong, S. B., and Brown, W. P., *Single-Mode Optical-Waveguides*. Applied Optics, 1979. **18**(10): p. 1490-1504.
16. Llobera, A., *Análisi i caracterizació d'acobladors direccionals basats en estructures ARROW*. 2000, Proyecto de Investigación, Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.
17. Chung, Y. and Dagli, N., *An Assessment of Finite-Difference Beam Propagation Method*. Ieee Journal of Quantum Electronics, 1990. **26**(8): p. 1335-1339.
18. Feit, M. D. and Fleck, J. A., *Light-Propagation in Graded-Index Optical Fibers*. Applied Optics, 1978. **17**(24): p. 3990-3998.
19. Koch, T. B., Davies, J. B., and Wickramasinghe, D., *Finite-Element Finite-Difference Propagation Algorithm for Integrated Optical-Device*. Electronics Letters, 1989. **25**(8): p. 514-516.
20. Chung, Y. C. and Dagli, N., *A Wide-Angle Propagation Technique Using an Explicit Finite-Difference Scheme*. Ieee Photonics Technology Letters, 1994. **6**(4): p. 540-542.
21. Kaczmarek, P. and Lagasse, P. E., *Bidirectional Beam Propagation Method*. Electronics Letters, 1988. **24**(11): p. 675-676.
22. Prieto, F., Sepulveda, B., Calle, A., Llobera, A., Dominguez, C., Abad, A., Montoya, A., and Lechuga, L. M., *An integrated optical interferometric*

- nanodevice based on silicon technology for biosensor applications*. Nanotechnology, 2003. **14**(8): p. 907-912.
23. Huber, W., Barner, R., Fattinger, C., Hubscher, J., Koller, H., Muller, F., Schlatter, D., and Lukosz, W., *Direct Optical Immunosensing (Sensitivity and Selectivity)*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1992. **6**(1-3): p. 122-126.
 24. Sepúlveda, B., *Efectos magneto-ópticos en dispositivos biosensores de campo evanescentes*. Tesis. 2005, Universidad Complutense de Madrid: Madrid.
 25. Blanco, F. J., Agirregabiria, M., Berganzo, J., Mayora, K., Elizalde, J., Calle, A., Dominguez, C., and Lechuga, L. M., *Microfluidic-optical integrated CMOS compatible devices for label-free biochemical sensing*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2006. **16**(5): p. 1006-1016.
 26. Blanco, F. J., Agirregabiria, M., Garcia, J., Berganzo, J., Tijero, M., Arroyo, M. T., Ruano, J. M., Aramburu, I., and Mayora, K., *Novel three-dimensional embedded SU-8 microchannels fabricated using a low temperature full wafer adhesive bonding*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2004. **14**(7): p. 1047-1056.
 27. Llobera, A., *Integrated Optics Technology on Silicon: Optical Transducers*. Tesis. 2002, Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.
 28. C. Domínguez, J. A. R. a. L. M. L. (2003) *Integrated optical transducers for (bio)chemical sensing*. Comprehensive Analytical Chemistry XXXIX Volume, 541-586
 29. L. M. Lechuga, F. P. a. B. S., *Interferometric Biosensors for environmental pollution detection*. Optical Sensors for Industrial E, 2003.
 30. M. Moreno, I. G., J. Muñoz, C. Domínguez, J. Calderer, F. Villuendas, J. Pelayo, *CMOS compatible ARROW waveguides*. Proc. 8th CIMITEC, S-VII.2, 1994.
 31. Kuiper, A. E. T., Willemsen, M. F. C., Mulder, J. M. L., Elferink, J. B. O., Habraken, F. H. P. M., and Vanderweg, W. F., *Thermal-Oxidation of Silicon-Nitride and Silicon Oxynitride Films*. Journal of Vacuum Science & Technology B, 1989. **7**(3): p. 455-465.
 32. Lanford, W. A. and Rand, M. J., *Hydrogen Content of Plasma-Deposited Silicon-Nitride*. Journal of the Electrochemical Society, 1977. **124**(8): p. C286-C286.
 33. Martinu, L. and Poltras, D., *Plasma deposition of optical films and coatings: A review*. Journal of Vacuum Science & Technology A, 2000. **18**(6): p. 2619-2645.
 34. Han, S. M. and Aydil, E. S., *Study of surface reactions during plasma enhanced chemical vapor deposition of SiO₂ from SiH₄, O₂, and Ar plasma*. Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films, 1996. **14**(4): p. 2062-2070.
 35. Price, K. J., McNeil, L. E., Suvkanov, A., Irene, E. A., MacFarlane, P. J., and Zvanut, M. E., *Characterization of the luminescence center in photo- and electroluminescent amorphous silicon oxynitride films*. Journal of Applied Physics, 1999. **86**(5): p. 2628-2637.
 36. Sassella, A., Borghesi, A., Corni, F., Monelli, A., Ottaviani, G., Tonini, R., Pivac, B., Bacchetta, M., and Zanotti, L., *Infrared study of Si-rich silicon oxide films deposited by plasma-enhanced chemical vapor deposition*. Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films, 1997. **15**(2): p. 377-389.

37. Raiteri, R., Margesin, B., and Grattarola, M., *An atomic force microscope estimation of the point of zero charge of silicon insulators*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1998. **46**(2): p. 126-132.
38. Henke, L., Nagy, N., and Krull, U. J., *An AFM determination of the effects on surface roughness caused by cleaning of fused silica and glass substrates in the process of optical biosensor preparation*. Biosensors & Bioelectronics, 2002. **17**(6-7): p. 547-555.

CAPÍTULO 3

Caracterización del interferómetro Mach-Zehnder integrado

3.1 Cálculo de las pérdidas de propagación y de inserción del dispositivo

Conocer la calidad óptica de las guías que configuran el MZI es fundamental a la hora de evaluar sus buenas prestaciones como biosensor y de compararlo con respecto a otros dispositivos. Para ello, es necesario conocer las pérdidas de inserción y de propagación de la luz en las guías, que además nos determinará la potencia de entrada necesaria para recoger una señal de salida del dispositivo lo suficientemente intensa. Con esta idea, se ha hecho uso de dos métodos comúnmente usados en Fotónica para el cálculo de pérdidas en guías. Uno de ellos es el método de resonancia de Fabry-Perot¹, que nos permitirá calcular, para polarizaciones TE y TM, las pérdidas de propagación para las guías de 75 nm y de 200 nm. El otro método usado es el método cut-back², que permitirá calcular las pérdidas de propagación y las de inserción.

3.1.1 El método de resonancia Fabry-Perot

El método de resonancia Fabry-Perot^{3,4} considera que las guías de onda, cuando están perfectamente pulidas, son resonadores simétricos de tipo Fabry-Perot, de forma que la intensidad transmitida varía periódicamente con la diferencia de fase δ de las ondas que se reflejan y transmiten en la frontera existente entre el núcleo y el recubrimiento y además puede controlarse con la temperatura (o con un campo eléctrico aplicado). La intensidad transmitida puede expresarse a través de¹:

$$I_t = \frac{T^2 \exp(-\alpha \cdot L)}{(1 - \tilde{R})^2 + 4\tilde{R} \sin^2(\delta/2)} \cdot I_0 \cdot \eta \quad (1)$$

donde I_0 es la intensidad del haz laser, η la eficiencia de acoplo del modo fundamental a la guía, T la transmisividad del modo con el canto de la guía y $\delta = 2\beta \cdot l$, la diferencia de fase interna que depende de la constante de propagación, β , del modo que se propaga en la guía de longitud L . La cantidad $\tilde{R} = R \cdot \exp(-\alpha \cdot L)$ viene determinada por el estudio de las resonancias de las ondas reflejadas que se producen en la guía de ondas. R es la reflectividad del modo y α el coeficiente de atenuación de la guía de ondas.

Variando la temperatura de forma constante, se obtiene un patrón de interferencia, tal como se observa en las Figuras 2 y 3, en que la intensidad transmitida varía de forma periódica con la diferencia de fase δ y puede visualizarse haciendo uso de un fotodiodo y un programa de adquisición que monitoriza el voltaje V frente al tiempo t .

Las pérdidas de propagación de la luz en la guía de ondas vienen determinadas por la ecuación (2):

$$At(dB/cm) = \frac{4.34}{L} (LnR - Ln\tilde{R}) \quad (2)$$

donde L es la longitud de las guías (cm) y R la reflectividad de sus caras pulidas que se puede aproximar en nuestro caso (estructuras de bajo guiado) por la siguiente expresión:

$$R = \left(\frac{N_{eff} - 1}{N_{eff} + 1} \right)^2 \quad (3)$$

donde N_{eff} el índice de refracción efectivo de las guías de onda usadas y que se calcula con el método del índice efectivo. \tilde{R} es el factor de reflexión de pérdidas y viene determinado por:

$$\tilde{R} = \frac{K}{2} \quad (4)$$

donde K es el contraste máximo de las resonancias Fabry-Perot que se determina experimentalmente estudiando el valor máximo y mínimo de la I de la luz guiada detectada por el fotodiodo y que varía periódicamente con la temperatura. Así, este contraste queda expresado de la siguiente forma:

$$K = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \quad (5)$$

Conociendo todos estos parámetros y haciendo uso de la ecuación (2), es posible conocer las pérdidas de propagación de las guías de ondas que constituyen los MZIs.

El montaje experimental para estimar las pérdidas de propagación por el método Fabry-Perot es el siguiente: un objetivo 40x focaliza el haz procedente de un láser de He – Ne linealmente polarizado en la entrada de una de las guías rectas sin área sensora. Esta guía recta está situada sobre un peltier conectado a su vez a una fuente de voltaje y a un controlador de temperatura, de tal forma que las guías rectas pueden calentarse y enfriarse según conveniencia (Figura 1). Las guías rectas usadas fueron de espesores de núcleo de 75 nm y de 200 nm, tanto para la polarización TE como para la polarización TM, aunque con esta última polarización el método sólo se empleó para las guías de 200 nm, pues las guías de 75 nm no soportan modos TM. Un objetivo de recogida 20x focaliza la luz que sale de la guía a un fotodiodo y un diafragma óptico permite filtrar la luz guiada procedente de su núcleo. Ésta se digitaliza mediante una tarjeta de adquisición y se procesa mediante Labview.

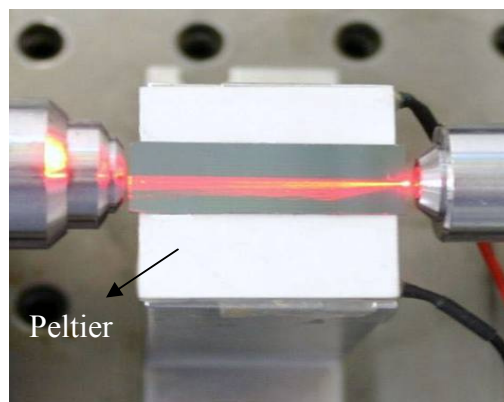


Fig.1 Montaje experimental para el cálculo de pérdidas en las guías por el método de Fabry-Perot

El contraste de las franjas de interferencia al variar la temperatura de las guías, tanto para las de espesor de núcleo de 75 nm (polarización TE) como las de espesor de núcleo de 200 nm (polarizaciones TE y TM), se muestra en las Figuras 2 y 3 respectivamente y fue usado para el cálculo de sus pérdidas. Para las guías de onda rectas de 75 nm se calcularon pérdidas de 0.82 dB/cm en la polarización TE.

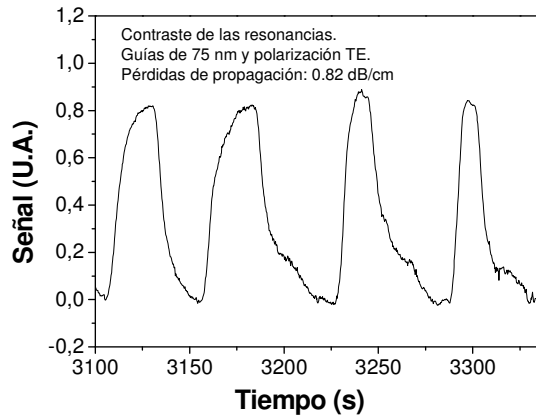


Fig.2 Método de *Fabry-Perot* para calcular las pérdidas de propagación en las guías de onda. Se observa la variación periódica de la señal de la intensidad transmitida por la guía de ondas de 75 nm de espesor de núcleo con el tiempo, a medida que se varía la temperatura, en la polarización TE. Las pérdidas de propagación de estas guías son de 0.82 dB/cm

Las pérdidas de propagación más bajas calculadas por este método, para las guías de espesores de núcleo de 200 nm en las polarizaciones TE y TM, fueron 0.14 dB/cm y 0.26 dB/cm, respectivamente.

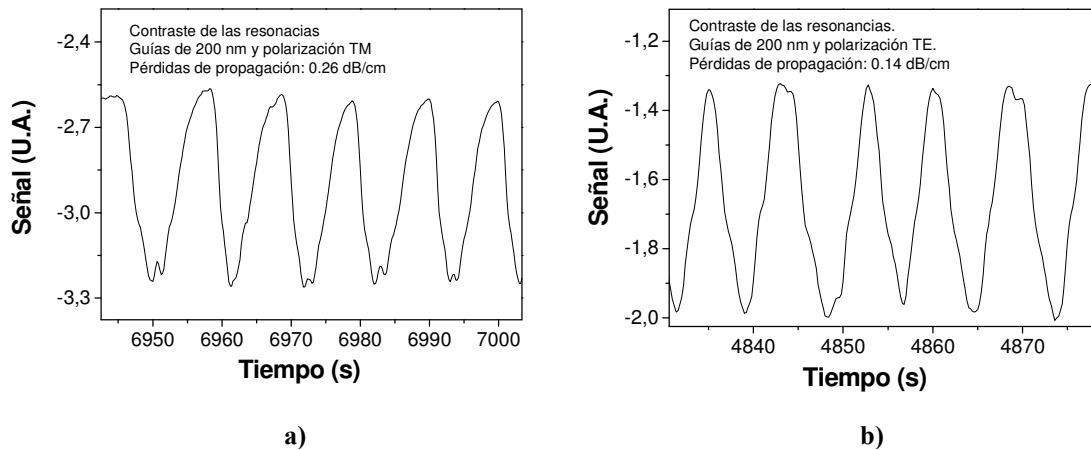


Fig.3 Método de *Fabry-Perot* para calcular las pérdidas de propagación en las guías de onda. Variación periódica de la señal de la intensidad transmitida por la guía de ondas de 200 nm de espesor de núcleo con el tiempo, a medida que se varía la temperatura, en polarización **a)** TM y **b)** TE. Las pérdidas de propagación de estas guías para las polarización TE y TM son de 0.14 y 0.26 dB/cm respectivamente.

En la siguiente Tabla se resumen las pérdidas de propagación más bajas medidas para las guías de espesores de núcleo de 200 nm en polarizaciones TE y TM y para las guías de espesores de núcleo de 75 nm en polarización TE.

Tabla 1 Pérdidas de propagación para las guías con espesores de núcleo de 75 nm en polarización TE y de 200 nm en polarización TE y TM usando el método de *Fabry-Perot*

200 nm		75 nm	Espesor de núcleo
TM	TE	TE	Polarización
0.26	0.14	0.82	Pérdidas propagación (dB/cm)

Estos últimos resultados para las guías de espesores de 200 nm muestran que los modos TM poseen más pérdidas que los modos TE, pues su confinamiento en el núcleo de la guía es menor (mayor es el campo evanescente del modo guiado, que se propaga por la capa de recubrimiento de SiO₂). En las guías de 75 nm de espesor de núcleo, las pérdidas de propagación son mayores, pues el modo TE se propaga menos confinado (es más sensible a las variaciones de índices de refracción externo) que el modo TM en las guías de 200 nm de espesor de núcleo.

3.1.2 El método de “cut-back”

El método *cut-back*^{2, 5} permite también calcular las pérdidas de propagación en las guías rectas, a la vez que se obtienen las pérdidas de inserción de la luz en la guía. Para ello se cortan chips a distintas longitudes y se representa la atenuación de cada tramo de guía recta frente a sus longitudes correspondientes, ajustándose de forma lineal. Dicha atenuación viene expresada en la ecuación (6) y en ella se incluyen tanto las pérdidas de propagación en las guías como las de acoplamiento de entrada/salida:

$$A_t^{\text{tot}} \text{ (dB)} = 10 \log (P_o/P_{\text{guía}}) = 2 P_{\text{acoplo}} \text{ (dB)} + P_{\text{propagación}} \text{ (dB)} \quad (6)$$

donde P_o es la potencia total de entrada del haz de luz a la guía de ondas, $P_{\text{guía}}$ es su potencia a la salida, P_{acoplo} son las pérdidas de inserción y $P_{\text{propagación}}$ las de propagación. La pendiente del ajuste lineal de los datos experimentales proporciona las pérdidas de propagación de las guías, mientras que la ordenada en el origen, las de inserción entrada/salida. En la Figura 4 vemos algunos de los fragmentos de guías cortados de un chip, que se usarán para el cálculo de las pérdidas de propagación e inserción.

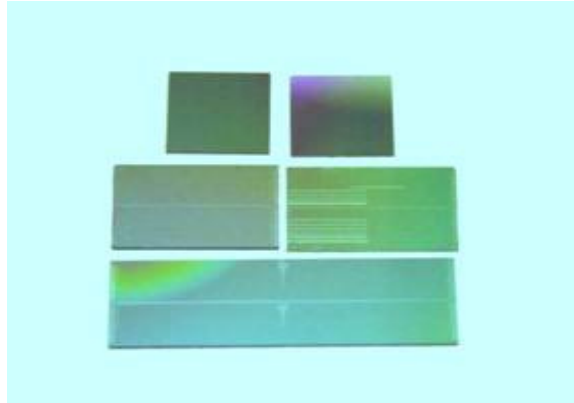


Fig. 4 Chips con guías de onda y MZIs cortados a distintas longitudes y pulidos, para calcular las pérdidas de propagación y las pérdidas de inserción por el método *cut-back*

El montaje experimental para realizar el método *cut-back* es el siguiente (Figura 5): se hace uso de una fibra óptica monomodo⁶ de 4 micras de núcleo que está conectorizada por un extremo a un diodo laser de 635 nm y por el otro a un controlador de polarización. Otra fibra idéntica con control de la polarización y conectorizada con la salida del controlador, acopla por enfrentamiento directo la luz ya polarizada procedente del diodo laser en cada una de las distintas guías de ondas rectas cortadas a distintas longitudes. La luz es recogida a la salida de las guías por otra fibra óptica monomodo idéntica con control de la polarización y que está conectorizada a un fotodiodo. La señal es digitalizada por una tarjeta de adquisición y procesada mediante LABVIEW. De esta forma, las pérdidas de inserción son las debidas a las pérdidas de inserción de la fibra óptica monomodo en la guía recta.

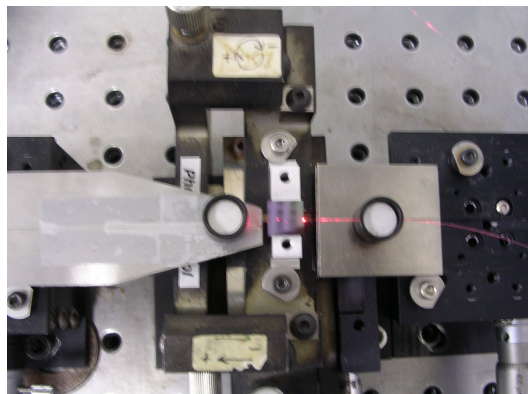


Fig. 5 Parte del montaje experimental para las medidas de pérdidas de propagación y de inserción en guías por el método *cut-back*

Para conocer la potencia de la luz polarizada, que sale de la fibra óptica monomodo con control de la polarización y que se acopla a la guía, se usó el mismo montaje experimental anterior de inserción de luz, salvo que los dos extremos de esta

fibra están conectorizados (uno al controlador de polarización y otro al del fotodiodo conectorizado), de tal forma que la luz era recogida por este último.

Se utilizaron 3 chips con guías ópticas rectas sin área sensora, de espesores de núcleo de 75 y 200 nm, con la misma anchura y altura de escalón de núcleo. Cada chip se cortó en tres tramos de guías con distintas longitudes: en el caso de 75 nm, los tramos fueron de 1.525 cm, 2.370 cm y 3.200 cm, mientras que para el caso de 200 nm, las longitudes fueron de 1.2 cm, 2.0 cm y 3.2 cm. En el caso de las guías de 75 nm de espesor de núcleo, no fue necesario el controlador de polarización. Los resultados aparecen en las Figuras 6 y 7.

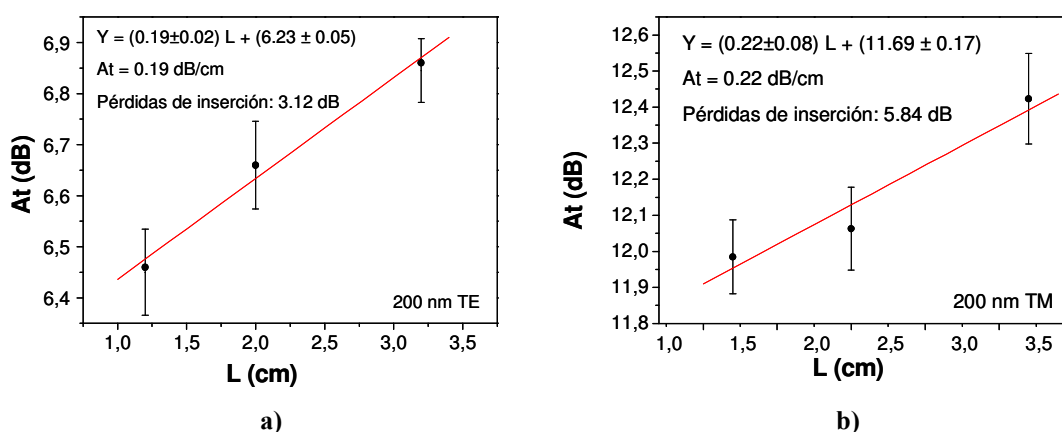


Fig. 6 Método *cut-back* para calcular las pérdidas de propagación y las pérdidas de inserción en las guías de onda de 200 nm, tanto para polarización TE como TM. Las pérdidas de inserción para la polarización TE y TM son de 3.12 dB y 5.84 dB respectivamente, mientras que las pérdidas de propagación para la polarización TE y TM son de 0.19 dB/cm y de 0.22 dB/cm respectivamente

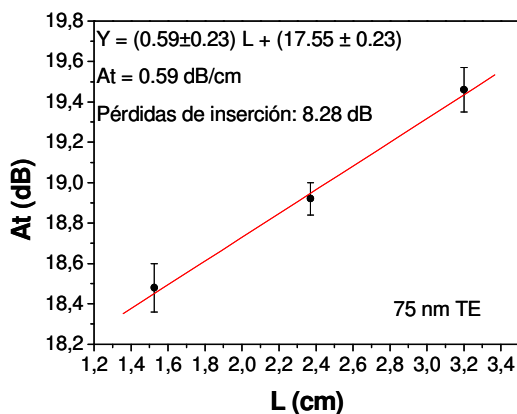


Fig.7 Método *cut-back* para calcular las pérdidas de propagación y las pérdidas de inserción en las guías de onda de 75 nm para la polarización TE. Las pérdidas de inserción para la polarización TE son de 8.28 dB mientras que las de propagación 0.59 dB/cm

Para las guías de 75 nm se obtuvieron unas pérdidas de inserción de 8.28 dB y de propagación de 0.59 dB/cm en la polarización TE, mientras que para las guías de 200 nm se obtuvieron pérdidas de inserción de 5.84 dB y de propagación de 0.22 dB/cm en la polarización TM y de 3.12 dB y 0.19 dB/cm para la polarización TE. El hecho de que las pérdidas de inserción sean mayores en las guías de 75 nm que en las de 200 nm

de espesor de núcleo, se explica por su menor espesor de núcleo, siendo menor la intensidad de luz guiada que se acopla de la fibra al núcleo de la guía. Sin embargo, que las pérdidas de inserción sean mayores en los modos TM que en los modos TE para las guías de 200 nm, puede explicarse por el alto grado de confinamiento de los modos TE en el núcleo de la guía frente a los modos TM. Las pérdidas de propagación se parecen mucho a las calculadas anteriormente por el método de Fabri-Perot, lo que garantiza la fiabilidad de los resultados por ambos métodos. Las diferencias pueden explicarse por diferencias en el pulido en cada una de las guías. El hecho de que unas guías tengan cantos mejor pulidos (mejor superficie especular) que otras, puede influir en la reflectividad de sus caras cuando actúen como resonadores en el método Fabry-Perot, perjudicando la visibilidad de las franjas de interferencia (y por tanto en el cálculo de las pérdidas) o en la mayor o menor eficiencia de acoplo de la luz de la fibra en la guía, afectando seriamente al cálculo de las pérdidas en el método cut-back. En la siguiente Tabla se resumen las pérdidas de propagación e inserción medidas por este método para las guías de diferentes espesores de núcleo en la polarización TE y TM.

Tabla 2 Pérdidas de propagación y de inserción para las guías con espesores de núcleo de 75 nm en polarización TE y de 200 nm en polarización TE y TM, usando el método de *cut-back*

200 nm		75 nm	Espesor de núcleo
TM	TE	TE	Polarización
0.22	0.19	0.59	Pérdidas propagación (dB/cm)
5.84	3.12	8.28	Pérdidas inserción (dB)

3.2 Cálculo de las pérdidas en las uniones Y

Una vez calculadas las pérdidas de propagación de las guías de onda usadas y las pérdidas de inserción de la luz de la fibra en la guía, se procedió a calcular las pérdidas en las uniones Y. Para ello se hizo uso de los divisores de haz, que se caracterizan por dos parámetros: el factor de acoplamiento (κ) y las pérdidas del dispositivo (α_{divisor}). El factor de acoplamiento está relacionado con el grado de acoplo de la luz que se propaga en una de las ramas, con la otra. Se determina dividiendo la potencia a la salida de una de las ramas del divisor entre la suma de la potencia a la salida de ambas ramas y expresando el resultado en dB.

$$\kappa = -10 \cdot \log\left(\frac{P_{\text{rama1}}}{P_{\text{rama1}} + P_{\text{rama2}}}\right) \quad (7)$$

donde P_{rama1} y P_{rama2} son las potencias de salida de cada rama.

Las pérdidas del dispositivo se definen como la relación entre la potencia total de entrada y la potencia total de salida, también expresada en dB.

$$\alpha_{\text{divisor}} = 10 \cdot \log\left(\frac{P_0}{P_{\text{rama1}} + P_{\text{rama2}}}\right) \quad (8)$$

donde P_{rama1} y P_{rama2} son las potencias de salida de cada rama y P_0 la potencia total de entrada. Estas pérdidas incluyen no sólo las correspondientes a la unión Y sino también las pérdidas de propagación de las guías y las pérdidas de inserción entrada/salida. Para obtener solamente las pérdidas de la unión Y, se puede usar como referencia las

pérdidas medidas en una guía de ondas recta, la cual incluirá tanto las pérdidas de inserción entrada/salida como las de propagación (ecuación 6).

Para poder usar estas expresiones, es necesario que las pérdidas de inserción entrada/salida y de propagación sean las mismas en la guía que en el divisor. Esta suposición es válida porque los procesos de fabricación son muy homogéneos y las ramas están muy próximas (50 μm).

El montaje experimental fue el mismo que el usado para el cálculo de las pérdidas de propagación en las guías por el método de Fabri-Perot, salvo que no fue necesario aumentar la temperatura.

El factor de acoplamiento entre todos los divisores medidos de espesores de núcleo de 200 nm varían entre 2.96 dB y 3.00 dB en la polarización TM, lo que implica que prácticamente no hay acoplamiento de luz entre ramas del divisor. Para la polarización TE, el comportamiento es ideal (misma intensidad a la salida para ambas ramas, $\kappa = 3.01$ dB) y no hay acoplamiento de luz entre ramas. El comportamiento para la polarización TM en las guías de espesores de núcleo de 200 nm es igual para los divisores de espesores de núcleo de 75 nm con polarización TE, pues los perfiles de los modos que se propagan por las guías son muy parecidos. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 3 Factor de acoplamiento para los divisores con espesores de núcleo de 75 nm en polarización TE y de 200 nm en polarización TE y TM

200 nm		75 nm	Espesor de núcleo
TM	TE	TE	Polarización
2.96-3.00	3.01	2.96-3.00	Pérdidas de acoplamiento κ (dB)

Una vez conocidas las pérdidas de propagación y acoplamiento, se calcularon también las pérdidas que se producían en las uniones Y en las polarizaciones TE y TM en el caso de divisores con espesores de núcleo de 200 nm y en la polarización TE para los de 75 nm, haciendo uso de las ecuaciones (6), (7) y (8). Las pérdidas varían entre 0.17 - 0.23 dB para las polarizaciones TM y TE en los divisores de espesores de núcleo de 200 nm y 75 nm respectivamente, mientras que para los de espesores de 200 nm en polarización TE, las pérdidas en las uniones en Y son menores y varían entre 0.12 y 0.15 dB, pues los modos TE propagan más confinados en el núcleo. Estos divisores medidos tienen radios de curvatura de 80 mm^7 . La tabla 4 muestra las pérdidas en las uniones en Y obtenidas.

Tabla 4 Pérdidas en las uniones Y medidas para los divisores con espesores de núcleo de 75 nm en polarización TE y de 200 nm en polarización TE y TM

200 nm		75 nm	Espesor de núcleo
TM	TE	TE	Polarización
0.17-0.23	0.12-0.15	0.17-0.23	Pérdidas en las uniones en Y (dB)

3.3 Comportamiento modal del dispositivo

Para realizar la caracterización modal de las guías, se hace uso del mismo montaje experimental que en el apartado anterior, recogiendo la luz a la salida de los interferómetros con un objetivo de microscopio de 40x. Un prisma divisor de haz divide el haz incidente en dos ortogonales, de tal forma que uno incide en una cámara CCD y el otro en un fotodiodo. De esta forma, este montaje experimental permite observar el cambio de fase del MZI ante una variación del índice de refracción externo, al igual que también permite visualizar en una pantalla el modo cambiante en intensidad que sale del MZI (Figura 8).

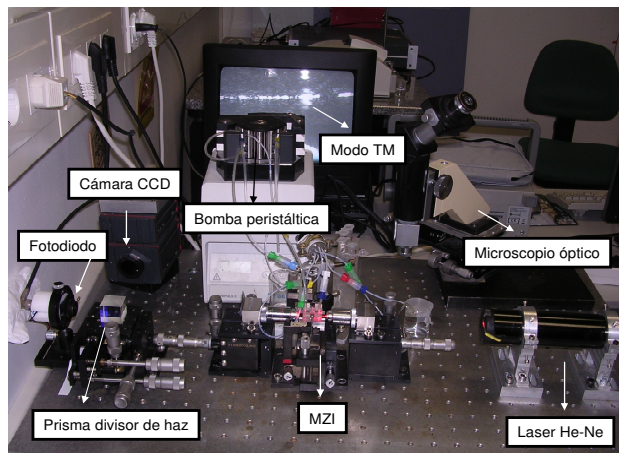


Fig. 8 Montaje experimental para la caracterización modal de las guías, divisores e interferómetros.

Como era de esperar, la caracterización modal de las guías acanaladas ha demostrado que exhiben comportamiento monomodo en las dos direcciones cuando tienen una anchura de canal menor de $5 \mu\text{m}$ como se refleja en las Figuras 9 (a) y (b) para una guía recta y un divisor de haz de $4 \mu\text{m}$ de anchura, respectivamente. En cambio, si la anchura es igual o mayor, es posible excitar el segundo modo transversal, como se puede ver en la Figura 9 (c) para un canal de $5 \mu\text{m}$. Este comportamiento modal coincide con los resultados teóricos obtenidos con el método del índice efectivo para las distintas estructuras de guiado.

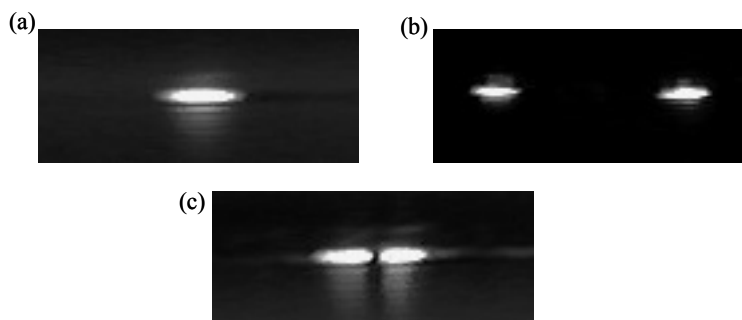


Fig. 9 Comportamiento monomodo de: **a)** una guía recta de $4 \mu\text{m}$ de anchura, **b)** un divisor en Y de $4 \mu\text{m}$ de anchura, **c)** una guía recta de $5 \mu\text{m}$ de anchura

3.4 Montaje experimental para la caracterización biosensora

Dos montajes experimentales muy parecidos, tal como se muestran en las Figuras 10 y 11, han sido empleados en el desarrollo del MZI como biosensor y se eligen en función de qué espesores de núcleo de guías usemos, 75 nm o 200 nm. En ambos casos, un objetivo 40x focaliza la luz, procedente de una fuente láser de He-Ne linealmente polarizada, a la entradas de las guías. Una posicionador de acero que confiere al sistema estabilidad, hace de soporte para las guías y sobre él se incorporará el sistema de fluidica, con la misma cubeta de metacrilato descrita anteriormente, a través de la cual pasan las distintas disoluciones sobre los interferómetros.

Si los MZIs tienen un espesor de núcleo de 75 nm, no será necesario polarizar la luz de entrada, pues su componente TM no se propaga por el núcleo del área sensora del MZI. En este caso, una fibra óptica multimodo de 9 μm de núcleo y 150 μm de recubrimiento que está conectorizada a un fotodiodo, recoge, por enfrentamiento directo, la luz guiada a la salida del MZI (Figura 10). De esta forma, todas las variaciones en intensidad de la luz que se produzcan por cambios en el índice de refracción efectivo del área sensora del interferómetro, como los debidos a interacciones moleculares en su superficie o cambios volumétricos en el índice de refracción externo, serán recogidos por la fibra y procesados.

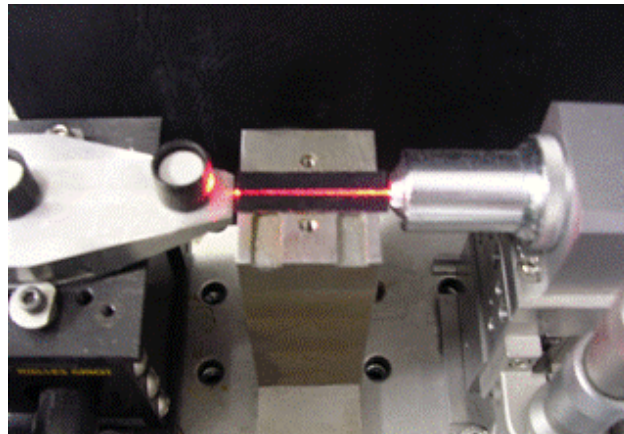


Fig. 10 Parte del montaje experimental integrado objetivo-fibra para la caracterización biosensora

En el caso de usar MZIs de 200 nm de espesor de núcleo, se puede hacer uso del montaje experimental anterior, aunque habrá que rotar el láser de forma adecuada para que su eje de polarización quede paralelo o perpendicular a su plano de propagación, en función de si se quiere luz con polarización TM o TE. También se puede introducir una nueva variante (Figura 11), que consiste en emplear un prisma polarizador lineal divisor de haz que divide el haz en dos haces perpendiculares y polarizados. Uno de ellos, el que se transmite por el prisma, tiene polarización TE, mientras el otro, que se refleja, tiene polarización TM. De esta forma se obtienen dos señales ópticas para una misma medida y aunque una señal es más sensible que la otra, se pueden usar como referencia. Un objetivo a la salida de la guía focaliza el haz al prisma divisor y dos fotodiodos amplificadas, cada uno de ellos situados en las direcciones de los haces ortogonales, recogen la señal. En esta configuración de doble polarización, la luz focalizada en la entrada de los MZIs ha de tener una mezcla de polarizaciones TE y TM, por lo que el láser estará rotado de tal forma que su eje de polarización forme un ángulo de 45° con respecto al plano de propagación. Además dos diafragmas ópticos, cada uno anterior a cada fotodiodo, filtran la luz guiada que sale del núcleo de las guías.

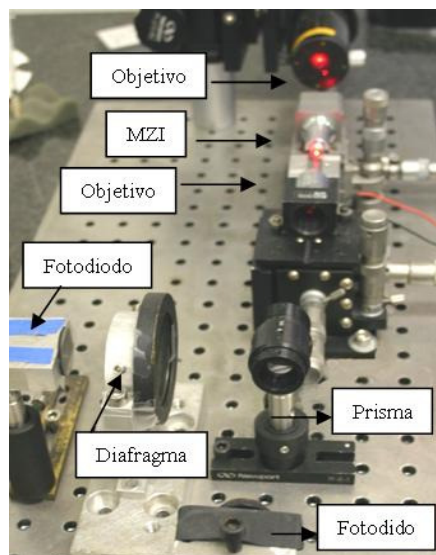


Fig. 11 Montaje experimental para el sistema de doble polarización en su caracterización biosensora

En la Figura 12 (a) se observa la señal dual TE y TM de respuesta del MZI para un cambio de índice de refracción externo de $\Delta n = 2.5 \times 10^{-3}$ y en la Figura 12 (b) una imagen del programa empleado.

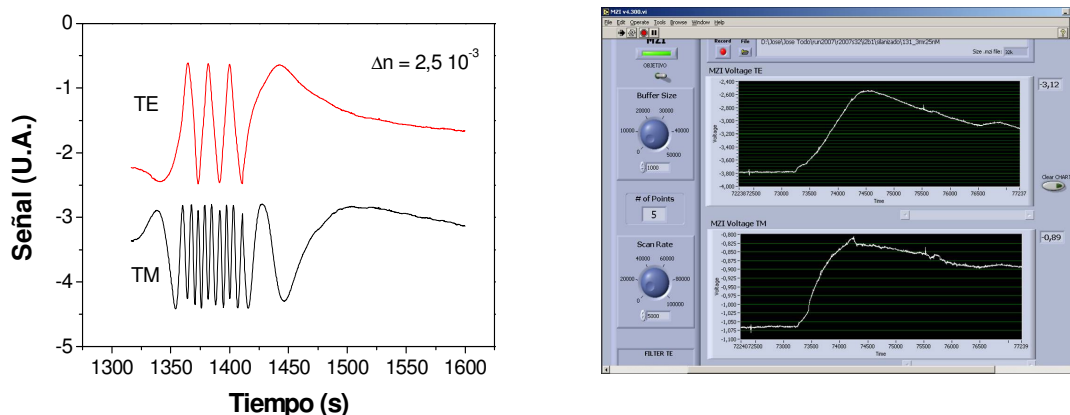


Fig. 12 a) Respuesta de un MZI de 200 nm de espesor de núcleo para un cambio de índice de refracción de $\Delta n = 2.5 \times 10^{-3}$ en la configuración de doble polarización y **b)** programa diseñado en Labview para analizar la señal

Esta configuración de doble polarización presenta tres claras ventajas que permiten obtener información adicional en la interpretación de las medidas. El problema de la ambigüedad de la señal periódica (ya descrito en el Capítulo 1) queda en parte eliminado. Debido a la periodicidad de la señal de respuesta del MZI, una sola lectura de medida no permite determinar de forma precisa, para múltiplos enteros de π , un cambio en su pendiente (cambio en el desfase del MZI). Esto es así porque este cambio de desfase es el mismo para múltiplos enteros de π (no se sabe si el cambio en el índice de refracción efectivo entre ambas ramas del MZI pasa de crecer a disminuir, o lo que es lo mismo, si en un proceso de interacción biomolecular sobre la superficie sensora, las moléculas pasan de unirse a despegarse o viceversa). Sin embargo, teniendo la señal de referencia con la otra polarización, el cambio en la variación del índice de refracción efectivo (o cambio en el desfase), que será más o menos acusado si la señal es TM o TE

respectivamente, podrá determinarse siempre que no se produzca en las zonas de menor sensibilidad de la señal (múltiplos enteros de π). Así, se puede discernir si las moléculas biológicas pasan de unirse a despegarse (o viceversa) de la superficie transductora. Un caso parecido es el que aparece en la Figura 13 (a) y en la Figura 13 (b), cuando el MZI ha sido desarrollado como biosensor de ADN.

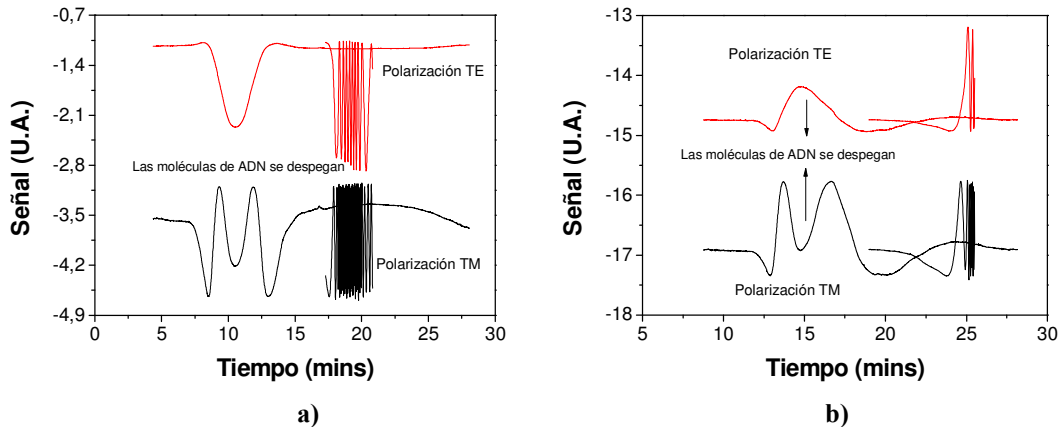


Fig. 13 Ventajas de tener una señal de referencia óptica: **a)** Las moléculas de ADN se despegan durante el proceso de hibridación, tal como se observa por el cambio de pendiente en la señal TM, debido a que la capa con biorreceptores inmovilizada en la superficie del transductor ha perdido su actividad tras sucesivos experimentos de hibridación. En TE no podría determinarse. **b)** Igual que en a), en este caso se observa en las dos señales el cambio de pendiente de la señal, aunque en TE es más evidente.

Otra ventaja de tener una señal óptica de medida adicional es que permite discernir qué es deriva térmica de lo que es decaimiento o incremento lento de la señal por cambios lentos en el índice de refracción entre soluciones. Así, en la Figura 14 (a), se observa cómo existe una deriva del sistema que es independiente de la polarización y puede por tanto corregirse. También, cualquier artefacto en la señal de medida (vibración brusca del banco óptico, cambio repentino en la velocidad del fluido...) afectará a ambas polarizaciones y podrá eliminarse (Figura 14 (b)).

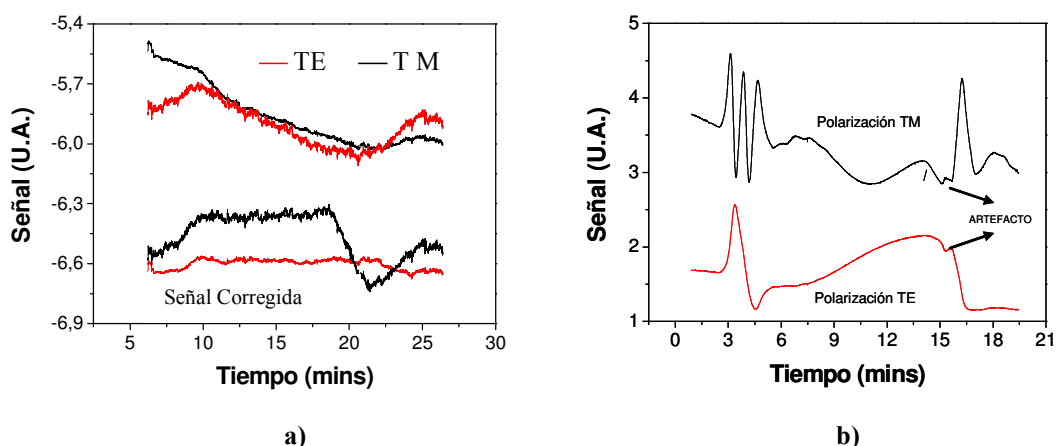


Fig. 14 Ventajas de tener una señal de referencia óptica **a)** Deriva del sistema y deriva del sistema corregida **b)** El artefacto, producido por vibración externa del sistema, aparece en las señales TE y TM y puede eliminarse

Por último, la tercera ventaja a citar de esta configuración con doble polarización, está relacionada con el empleo del MZI como biosensor. En este caso, sabiendo que para los MZIs de 200 nm de espesor de núcleo la sensibilidad superficial en TM es aproximadamente 3 veces mayor que en TE, es posible comparar para una misma medida esta relación con la obtenida con los resultados del número de moléculas que se unen o se desunen en la superficie del sensor en una de las polarizaciones frente a la otra. De esta forma, se facilita la interpretación de la lectura de las señales. Además, para esta configuración, los niveles de ruido y deriva térmica son muy bajos, tal como será descrito en el siguiente apartado.

3.5 Ruido y deriva del sistema

Es necesario realizar un estudio del ruido y de la deriva de los sistemas diseñados para conocer cuál es la configuración más estable ante posibles perturbaciones externas (variaciones de temperatura, vibraciones mecánicas, ruido eléctrico, etc), y así conseguir un biosensor con buenas prestaciones. A partir de esta configuración óptima y una vez evaluada experimentalmente su sensibilidad, se calculará el límite de detección en la variación del índice de refracción externo del dispositivo.

En la Tabla 5 se muestran los sistemas experimentales empleados y sus aplicaciones. También se describen las ventajas y desventajas que presentan.

Tabla 5 Aplicaciones, ventajas y desventajas de los sistemas experimentales empleados. Las ventajas y desventajas con asterisco son resultados que se presentan al final de este apartado.

Configuración experimental	Espesor del núcleo de los MZIs	Tipo de polarización empleada	Aplicación	Ventajas	Desventajas
Doble polarización	200 nm	TM	Biosensor (Hibridación del ADN)	Una señal de referencia óptica adicional, alta estabilidad*	Poca integración
Objetivo-Objetivo	75 nm	TE	Cálculo del límite de detección en Δn_{ext}	Máxima estabilidad*, no es necesario controlar la polarización de la luz	Poca integración, una sola señal de medida
Objetivo de entrada-Fibra de recogida	75 nm	TE	Biosensor (Hibridación del ADN y detección del pesticida carbaril)	Mayor integración para futuros prototipos compactos, alta estabilidad*, no control de la polarización	Una sola señal de medida
Fibra de entrada y recogida	200 nm 75 nm	TE, TM	Caracterización de los dispositivos ante cambios del n_{ext}	Sistema muy integrado, no control de la polarización (75 nm)	Poca estabilidad*, una sola señal de medida

La *relación señal-ruido de un sistema* S/N se define como el cociente entre la desviación estándar (σ_V) de los datos de medida recogidos durante un intervalo corto de tiempo y su valor medio (\bar{V}) y viene expresado por la siguiente ecuación:

$$S/N = \frac{\sigma_V}{\bar{V}} \quad (rads) \quad (9)$$

Se define *deriva térmica* D_t de un sistema experimental como el cociente entre la variación en la señal base de medida (ΔV) que experimenta el sistema debida al cambio de temperatura (ΔT) durante un período largo de medida. La ecuación que define la deriva térmica es la siguiente:

$$D_t = \frac{\Delta V}{\bar{V} \cdot t \cdot T} \quad (rads/h \cdot ^\circ C) \quad (10)$$

Una de las causas que producen la deriva térmica está relacionada con que el MZI no es simétrico en sentido estricto, ya que la rama sensora es distinta a la de referencia (no tiene el área sensora), aunque de igual longitud. Esta diferencia geométrica en las ramas hace que un pequeño cambio de temperatura en el medio externo produzca una variación periódica muy lenta de la señal de medida. Además, este cambio de temperatura puede afectar también a la dilatación o contracción térmicas

de las partes metálicas que configuran el banco óptico (microposicionadores, posicionadores de fibra y fotodiodos, etc). Por tanto el movimiento mecánico del sistema también influye en la deriva, aunque en este caso la variación de la señal no es sinusoidal, sino que decae lentamente con el tiempo (la dilatación o contracción de las piezas desenfoca el haz de entrada en las guías).

Para el cálculo del ruido y de la deriva de los sistemas empleados se hizo pasar agua por el área sensora de los MZIs a una velocidad de 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. En el caso del cálculo de la deriva, el agua estuvo circulando durante 24 horas y un sensor de temperatura permitía conocer la temperatura durante este tiempo. Sin embargo, para el cálculo del ruido, el tiempo de medida fue de 120 segundos.

Si se considera 3.17 V como una amplitud promedio de la señal sinusoidal del MZI (puede ser mayor o menor, dependiendo de la cantidad de luz que se propague por el área sensora) y que por tanto equivale a un desfase de $\Delta\phi = \pi$, la relación señal ruido S/N se puede expresar en radianes (*rads*), mientras que la deriva térmica D_t , en *rads / h* $^{\circ}\text{C}$.

Los resultados, para los MZIs de espesor de núcleo de 200 nm, se expresan en la Tabla 6.

Tabla 6 Valores del ruido y de la deriva en los distintos sistemas experimentales usados para los MZIs de espesores de núcleo de 200 nm en las polarizaciones TE y TM

200 nm	Doble polarización		Objetivo de entrada-Fibra de recogida		Fibra de entrada y recogida	
	TE	TM	TE	TM	TE	TM
S/N (2π rads)	4.80E-4	2.01E-4	7.45 E-4	3.90E-4	1.90E-3	1.60E-3
Deriva (2π rads/h $^{\circ}\text{C}$)	4.70E-3	4.70E-3	2.58E-3	2.66E-3	3.13E-2	3.23E-2

Mientras que para los MZIs de espesor de núcleo 75 nm, se obtienen los valores recogidos en la Tabla 7.

Tabla 7 Valores del ruido y de la deriva en los distintos sistemas experimentales usados para los MZIs de espesores de núcleo de 75 nm en la polarización TE

75 nm	Objetivo-Objetivo	Objetivo de entrada-Fibra de recogida	Fibra de entrada y recogida
	TE	TE	TE
Ruido (2π rads)	1.6E-4	2.32 E-4	1.60E-3
Deriva (2π rads/h $^{\circ}\text{C}$)	4.77E-3	4.86 E-3	3.23E-2

El montaje experimental con menor S/N es el que usa dos objetivos, los de entrada y de recogida de la luz y el que además utiliza los MZIs de espesores de 75 nm. Es este sistema el más sensible a cambios en el índice de refracción externo y por tanto, el que posee el límite de detección más bajo. Por ello, será este sistema el que se emplee para calcular el límite de detección de nuestro dispositivo. Su principal desventaja es que no posee ninguna referencia óptica adicional.

La configuración de doble polarización para los MZIs de espesores de núcleo de 200 nm es el segundo diseño con menor S/N y además tiene una referencia óptica, que permite obtener información adicional en las medidas. Su deriva es aproximadamente el doble que la del sistema con deriva más baja (sistema con fibra de recogida en la salida), pero esto no afectará porque las reacciones biomoleculares que se detectan con el MZI en comparación con la deriva térmica de la señal, tienen lugar en una escala de tiempo menor.

Cabría esperar que la S/N detectada en los MZIs de 200 nm fuera mayor en polarización TM que en polarización TE, ya que el campo evanescente es menor para este último caso. Este hecho no coincide con las medidas experimentales, debido a que en el cálculo de la S/N no sólo influye el tipo de polarización, sino también las variaciones mecánicas por temperatura de los componentes del montaje experimental, como por ejemplo el desajuste de los posicionadores.

El montaje experimental empleado en el cálculo de la sensibilidad homogénea de los MZIs con diferentes espesores de núcleo (diseño fibra-fibra) es el que tiene más ruido y deriva en su señal de medida, aproximadamente un orden de magnitud mayor. Esto es debido a que las fibras ópticas clivadas, enfrentadas directamente a las guías, tienen su extremo (unas pocas micras de su longitud) suspendido en el aire, por lo que cualquier variación térmica y mecánica del sistema experimental, afecta seriamente al acoplo de la luz entre fibra-guía y guía-fibra.

La fibra óptica de recogida que se usó en la caracterización de la sensibilidad homogénea y en aplicaciones biosensoras tiene un núcleo de 9 μm , que es mayor que el de la fibra óptica de entrada monomodo. De esta forma, se puede recoger mayor intensidad de luz guiada procedente de la salida del MZI y de esta forma disminuir las variaciones de señal experimentadas por los cambios térmicos y movimientos mecánicos.

Para llevar la señal del MZI al punto de cuadratura, que es donde el dispositivo es más sensible a cualquier cambio, se puede hacer uso de la deriva térmica del sistema, esperando un tiempo hasta que el sistema llegue a tal punto de intensidad. Sin embargo, como el sistema es robusto y estable y la variación de temperatura no muy elevada, habría que esperar largos tiempos para conseguir tal situación. Con el objetivo de minimizar este tiempo, se colocó un peltier conectado a una fuente de voltaje en el soporte de acero, tal como se muestra en la Figura 15 (a). Así, al aumentar lentamente la temperatura del soporte (y producir por tanto un movimiento mecánico del sistema muy pequeño), la deriva térmica del sistema crece y la señal del MZI puede llevarse de forma más rápida al punto de cuadratura (Figura 15 (b)), cuyo valor coincide con el punto de intensidad correspondiente a la mitad de la amplitud de la señal sinusoidal de respuesta del MZI y puede tomarse como referencia para varias medidas sucesivas. La señal sinusoidal que se emplea para determinar el punto de cuadratura del MZI es la debida a cambios anteriores registrados en las variaciones del índice de refracción efectivo del modo guiado (por cambios del índice de refracción externo o por unión de biomoléculas a la superficie sensora). El punto de cuadratura será prácticamente el mismo para cada medida porque el decaimiento de la señal de intensidad del MZI por el movimiento mecánico del sistema es muy lento y puede corregirse con los microposicionadores.

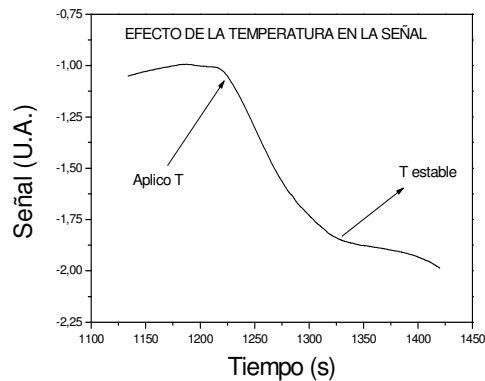
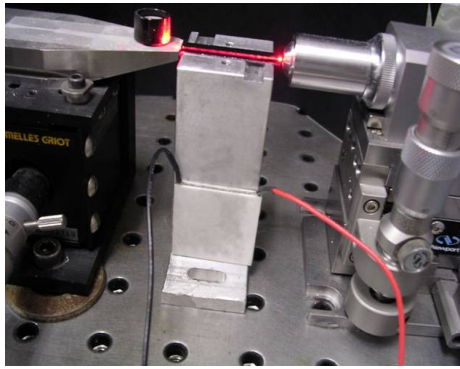


Fig. 15 a) Montaje experimental para llevar el MZI al punto de cuadratura y **b)** respuesta del MZI al aplicar temperatura al soporte

3.6 Sensibilidad del dispositivo y límite de detección

Para conocer el límite de detección del dispositivo, tanto en la variación del índice de refracción real externo al emplearse como refractómetro, como en el recubrimiento superficial de las moléculas que participan en las reacciones biológicas que ocurren en la superficie del sensor, al emplearse como biosensor, es necesario caracterizar experimentalmente sus sensibilidades homogénea y superficial. Ya conocidas y eligiendo la configuración óptima de menor ruido, se puede conocer la mínima señal de respuesta (cambio de fase $\Delta\phi$) detectable por el MZI (tres veces la desviación estándar del ruido) ante un cambio en el índice de refracción externo. A partir de esta mínima señal detectable y de la sensibilidad homogénea obtenida experimentalmente, se está ya en disposición de determinar el límite de detección en el cambio del índice de refracción externo del dispositivo. Sin embargo, la sensibilidad superficial experimental y el límite de detección del dispositivo ante una determinada concentración del analito, depende en gran medida del peso molecular de la molécula a determinar, ya que las moléculas pequeñas generarán respuestas de menos intensidad que las de mayor peso molecular. Además, la concentración del elemento biológico inmovilizado y el formato de ensayo utilizado son factores determinantes para establecer la sensibilidad del sensor en términos de concentración del analito. Los resultados obtenidos empleando este criterio se muestran en las distintas aplicaciones biosensoras presentadas en los próximos Capítulos.

3.6.1 Caracterización de la sensibilidad homogénea del dispositivo

Una vez estudiado el comportamiento modal de las estructuras fabricadas y estudiado el ruido y deriva de los distintos montajes experimentales empleados, se procedió a caracterizar la sensibilidad homogénea de los diferentes interferómetros, tanto de los MZIs de espesores de núcleo de 75 nm, como los de 150 nm y 200 nm. Para ello se diseñó el montaje experimental, que se observa en la Figura 16. Una fibra óptica monomodo de 4 micras de diámetro de núcleo y 150 micras de recubrimiento está conectorizada por uno de sus extremos a un diodo laser de 635 nm y por su otro extremo a un controlador de polarización de fibra óptica basado en un compensador Babinet-Soleil. El acoplamiento de la luz, ya polarizada, a la guía de ondas, se realiza por enfrentamiento directo de otra segunda fibra óptica monomodo que tiene las mismas características que la anterior, pero en la que se controla la polarización. Esta fibra, conectorizada por uno de sus extremos a la salida del controlador de polarización, está clivada por su otro extremo y queda enfrentada directamente a la guía. Debido a que en los MZIs con espesores de núcleo de 75 nm, los modos TM van muy poco confinados y se pierden al propagarse por su área sensora, no es necesario en este caso el controlador de polarización. Sin embargo, para caracterizar los MZIs de 150 y 200 nm, sí se hizo uso del mismo. La luz a la salida del MZI es recogida con una fibra óptica multimodo, de 9.8 micras de diámetro de núcleo y 150 micras de recubrimiento, que está conectorizada a un fotodiodo. Ambas fibras de entrada y salida están ancladas sobre microposicionadores de fibra que a su vez quedan fijos sobre posicionadores de traslación XYZ manuales, con una resolución de desplazamiento de 50 nm. El chip que contiene los distintos dispositivos está situado sobre una plataforma con cuatro ejes de libertad, dos de traslación YZ, uno de rotación y otro de balanceo.

Para acoplar la luz por enfrentamiento directo se hace uso de un microscopio óptico que permite visualizar la posición de las fibras frente a las guías a través de las marcas de alineamiento que hay en cada chip.

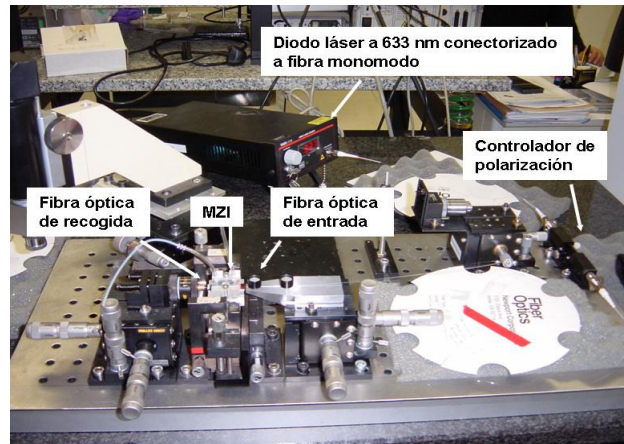


Fig. 16 Banco óptico para la caracterización de la sensibilidad del dispositivo

En la Figura 17 se pueden ver con mayor detalle las fibras de entrada y recogida, así como el chip sobre el microposicionador central, con la cubeta de flujo. Esta cubeta de flujo está mecanizada en metacrilato, con una profundidad de canal de $100\ \mu\text{m}$, anchura de $1\ \text{mm}$ y longitud de $18\ \text{mm}$ y permite la caracterización de los dispositivos respecto a los cambios de índice de refracción real externo. Está conectorizada con tubos de teflón a una bomba peristáltica que participa en el proceso de inyección y carga de muestras, mediante una válvula de inyección de baja presión.

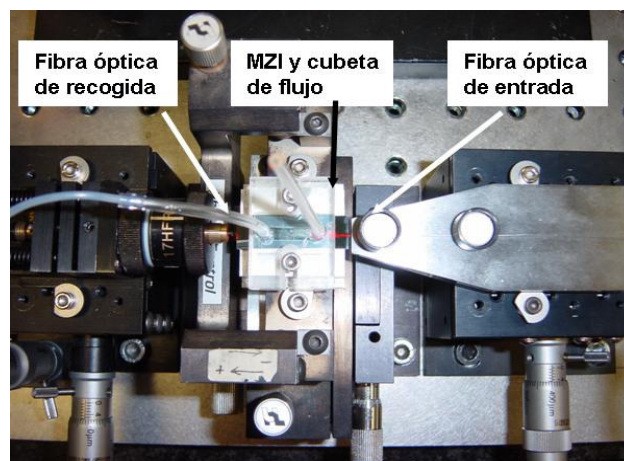


Fig. 17 Detalle de las fibras ópticas de entrada y recogida, y del chip con la cubeta de flujo.

La luz recogida por el fotodiodo se amplifica mediante un amplificador corriente/voltaje de ganancia variable, se digitaliza mediante una tarjeta de adquisición y se procesa mediante Labview, como se ilustra en la Figura 18.

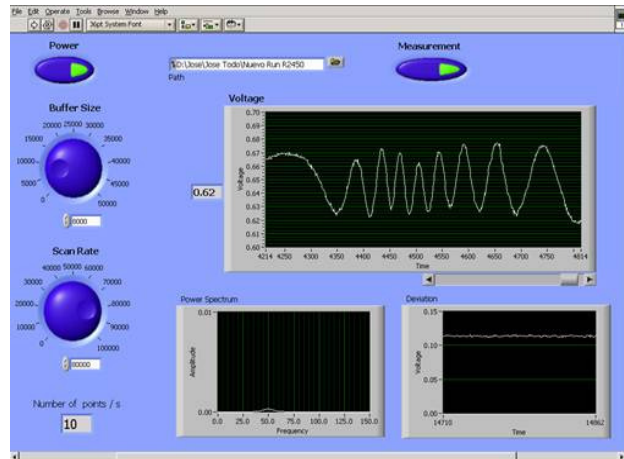


Fig. 18 Programa de adquisición y tratamiento de la señal de los MZI

Se han caracterizado los interferómetros con espesores de núcleo de guía de 75 nm, 150 nm y 200 nm, para la polarización TE en el primero y para las polarizaciones TE y TM en los dos últimos, respecto a cambios de índice de refracción externo en el rango comprendido entre $\Delta n=4 \times 10^{-4}$ y $\Delta n=8.8 \times 10^{-3}$. Para ello, se inyectaron disoluciones de distintas concentraciones de ácido clorhídrico HCl 0.1M en agua y por lo tanto, con distintos índices de refracción, tal como se muestra en la Tabla 5. Los resultados correspondientes se muestran en la Figura 19 (a) y (b) y en la Figura 20 (a), junto con las simulaciones teóricas. En estos cálculos no se ha tenido en cuenta la presencia del canal en la guía. El buen acuerdo teórico-experimental también permite deducir que los modos que se propagan por las guías acanaladas se pueden considerar, en la práctica, como TE o TM puros.

Tabla 8 Índice de refracción y concentración de las distintas disoluciones de HCl empleadas para el cálculo de las sensibilidades de los MZIs con espesores de núcleo de 75nm, 150 nm y 200 nm

n	Δn	C_{HCl} (mM)
1.3332	4×10^{-4}	0.09
1.3333	5×10^{-4}	0.10
1.3337	9×10^{-4}	0.16
1.3338	1×10^{-3}	0.18
1.3344	1.6×10^{-3}	0.28
1.3348	2×10^{-3}	0.36
1.3351	2.3×10^{-3}	0.38
1.3356	2.8×10^{-3}	0.40
1.3359	3×10^{-3}	0.43
1.3361	3.2×10^{-3}	0.45
1.3367	3.9×10^{-3}	0.55
1.3369	4.1×10^{-3}	0.58
1.3373	4.5×10^{-3}	0.64
1.3378	5×10^{-3}	0.71
1.3384	5.6×10^{-3}	0.8
1.3386	5.8×10^{-3}	0.9
1.3394	6.4×10^{-3}	1.00

1.3401	7.3×10^{-3}	1.14
1.3416	8.8×10^{-3}	1.37

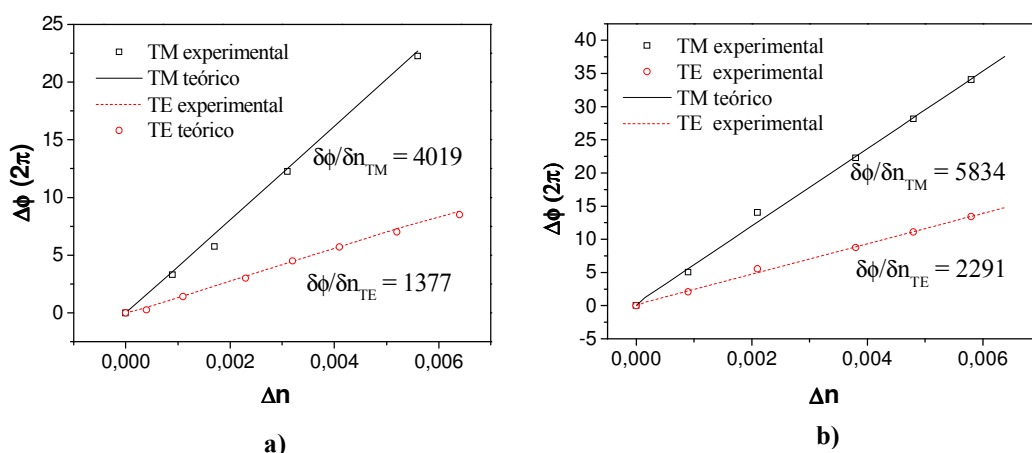


Fig. 19 Sensibilidad teórica y experimental en las polarizaciones TE y TM para los MZIs de **a)** 200 nm y **b)** 150 nm

En la Figura 20 (b) se muestran diferentes respuestas de interferómetros con espesores de núcleo de 200 nm y 150 nm para una misma variación de índice de refracción externo ($\Delta n = 4.3 \cdot 10^{-4}$) y con polarización TM.

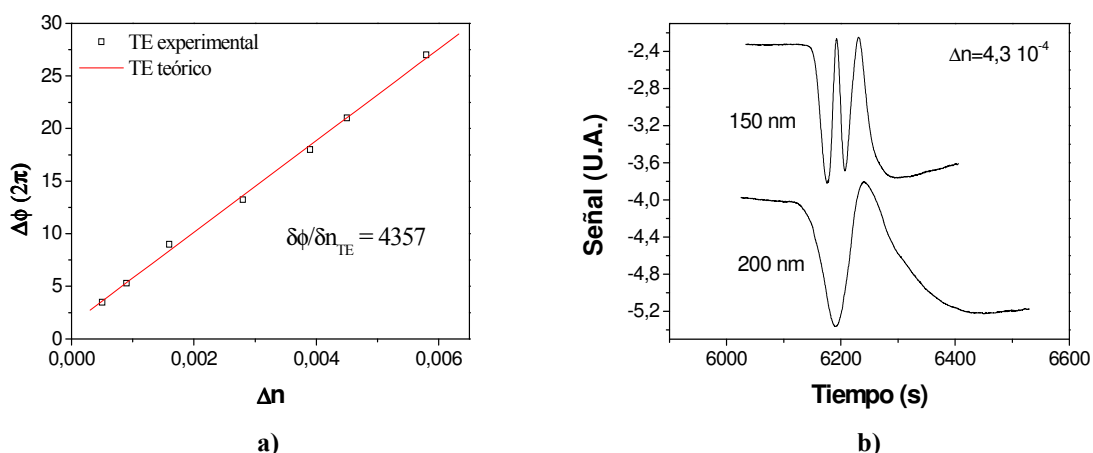


Fig. 20 a) Sensibilidad teórica y experimental para los MZIs de 75 nm en polarización TE y **b)** comparación de las respuestas periódicas entre MZIs de 150 nm y 200 nm en polarización TM para una misma variación de índice de refracción externo

De los resultados anteriores se concluye que los MZIs con espesores de núcleo de 150 nm tienen una sensibilidad homogénea en la polarización TM 1.45 veces mayor que los MZIs con espesores de núcleo de 200 nm en la misma polarización y 1.3 veces mayor que los MZIs con espesores de núcleo de 75 nm en polarización TE. Esta sensibilidad tan alta permite emplear estos dispositivos como refractómetros altamente sensibles, aunque debido al poco confinamiento del modo en el núcleo de sus guías, en determinadas ocasiones puede irradiarse al medio externo, por lo que no se emplearán en aplicaciones biosensoras.

3.6.2 Límite de detección

Una vez determinada experimentalmente la sensibilidad homogénea de los interferómetros de espesores de núcleo de 200 y 75 nm y conocida la configuración con menor S/N en la señal de medida, se calculó el límite de detección del dispositivo para el cambio del índice de refracción externo, a partir de la mínima señal detectable de cambio de fase. Esta mínima señal detectable se consideró como la equivalente a tres veces la S/N del sistema.

La mínima señal detectable de cambio de fase para el sistema más estable (con menor S/N), que es el que hace uso de MZIs de 75 nm de espesor de núcleo y de dos objetivos, uno de entrada y otro de salida, es la siguiente:

$$\Delta\phi_{\min} = 4.84 \cdot 10^{-4} \times (2\pi) \text{ rads} \quad (11)$$

El ajuste de los datos obtenidos en la calibración del MZI respecto a cambios en el índice de refracción externo es lineal (Figuras 19 (a), (b) y 20 (a)), lo que permite obtener el límite de detección en la variación del índice de refracción del dispositivo a partir de la mínima señal detectable de cambio de fase para el sistema más estable, que toma el valor de:

$$\Delta n = 1.08 \times 10^{-7} \quad (12)$$

Este límite de detección en la variación del índice de refracción externo es un límite de detección muy bajo y se encuentra dentro del rango de los límites de detección más bajos de los dispositivos ópticos interferométricos integrados más sensibles que se describen en la literatura. En la Tabla 9 se muestran algunos de ellos.

Tabla 9: Límites de detección en el cambio del índice de refracción externo Δn y en el cambio de fase $\Delta\phi$ de algunos dispositivos ópticos de campo evanescente

Dispositivo ópticos de campo evanescente integrados	Límite de detección en el cambio del índice de refracción externo Δn		Límite de detección en el cambio de fase $\Delta\phi$ (2π rads)	
MZI integrado y con modulación de fase ¹²	5.0×10^{-8}		1.0×10^{-4}	
MZI integrado (esta Tesis)	1.08×10^{-7}		$4.84 \cdot 10^{-4}$	
Interferómetro de Young integrado ⁸⁻¹¹	3.6×10^{-7}	7.0×10^{-7}	5.6×10^{-4}	8.7×10^{-5}
SPR Biacore ¹³	1.0×10^{-6}		-	
SPR IBISII ¹⁴	7.5×10^{-6}		-	
SPR magnético ¹⁵	5.0×10^{-6}		-	
Inteferómetro de polarización ¹⁶	2×10^{-5}		-	
Acoplador de red ¹⁷	10^{-4}		-	

La variación en índice de refracción efectivo del sistema y su cambio de fase, están relacionados por la siguiente expresión:

$$\Delta\phi_{\min} = \frac{2\pi}{\lambda} l \Delta N_{\text{eff}} \quad (13)$$

con l al longitud de la guía, λ la longitud de onda de la luz y ΔN_{eff} el cambio del índice de refracción efectivo del modo guiado. Haciendo uso de la ecuación (13), la mínima señal detectable de cambio en el índice de refracción efectivo del modo guiado para la configuración más estable es:

$$\Delta N_{eff, \min} = 2.05 \times 10^{-8} \quad (14)$$

3.7 Conclusiones

En este capítulo se han caracterizado ópticamente las distintas estructuras de guiado fabricadas en la sala blanca del CNM en Barcelona. Se han presentado los cálculos de pérdidas de propagación para las guías de onda rectas sin área sensora, con espesores de núcleo de 75 nm para las polarizaciones TE y con espesores de núcleo de 200 nm para las polarizaciones TE y TM, mediante el método de Fabry-Perot y el método cut-back. Además, para estas polarizaciones y haciendo uso de este último método, se calcularon las pérdidas de inserción desde una fibra óptica monomodo de 4 μm de diámetro de núcleo y 150 μm de diámetro de recubrimiento, en cada una de estas guías rectas. En segundo lugar, se ha estudiado experimentalmente el comportamiento modal de estas guías, así como de divisores y de interferómetros. Para guías de menos de 5 μm de anchura de canal y alturas comprendidas entre 1 y 4 nm, el comportamiento es claramente monomodo en ambas direcciones, tal como se visualiza por medio de una cámara CCD, que permite observar los distintos modos guiados de luz. Sin embargo, para anchuras de canal mayores a 5 μm , se puede excitar el segundo modo transversal. En tercer lugar, se caracterizaron experimentalmente las sensibilidades homogéneas de los MZIs con espesores de núcleo de 75 nm, 200 nm y 150 nm respectivamente, obteniendo un excelente acuerdo con los resultados teóricos. Por otro lado, se describieron los distintos montajes experimentales y se procedió a realizar un estudio sobre el ruido y la deriva de cada uno de ellos. A partir del sistema más estable y con menos ruido, que consistía en un montaje que hacía uso de un objetivo de entrada para focalizar la luz en los MZIs de 75 nm de espesor de núcleo y otro de salida para recoger la luz guiada, se calculó su límite de detección con la mínima señal detectable de cambio de fase en el dispositivo: esta mínima señal detectable es equivalente a 3 veces la desviación estándar del ruido, de tal forma que el límite de detección obtenido es de $\Delta n = 1.08 \cdot 10^{-7}$. Este límite de detección tan bajo permite incluir este dispositivo en el grupo de los interferómetros ópticos más sensibles que se describen en la literatura.

Referencias

1. Regener, R. and Sohler, W., *Loss in Low-Finesse Ti-Linbo3 Optical Wave-Guide Resonators*. Applied Physics B-Photophysics and Laser Chemistry, 1985. **36**(3): p. 143-147.
2. Kaminow, I. P. and Stulz, L. W., *Loss in Cleaved Ti-Diffused Linbo3 Waveguides*. Applied Physics Letters, 1978. **33**(1): p. 62-64.
3. Yariv, A., *Optical Electronics in Modern Communications*, ed. O.U. Press. 1997, California. p121-158.
4. Wolf, M. B. a. E., *Principles of Optics*. ed. C.U. Press. 2002, London.
5. Prieto, F., Lechuga, L. M., Calle, A., Llobera, A., and Dominguez, C., *Optimized silicon antiresonant reflecting optical waveguides for sensing applications*. Journal of Lightwave Technology, 2001. **19**(1): p. 75-83.

6. B.Jeunhomme, L., *Single-mode fiber optics, principles and applications*, ed. O. Engineering. Vol. 23. 1989, New York.
7. Prieto, F., Sepulveda, B., Calle, A., Llobera, A., Dominguez, C., Abad, A., Montoya, A., and Lechuga, L. M., *An integrated optical interferometric nanodevice based on silicon technology for biosensor applications*. Nanotechnology, 2003. **14**(8): p. 907-912.
8. Ymeti, A. F. E., *Development of a Multichannel Integrated Young Inteferometer Immunosensor*. 2004; T esis, Twente University: Twente, Holland.
9. G.H.Cross, A. A. R., S.Brand, J.F.Popplewell, L.L.Peel, M.J.Swann and NjJ.Freeman, *A new quantitative optical sensor for protein characterization*. Biosensors&Bioelectronics, 2003. **19**: p. 383-390.
10. Brandenburg, A., *Differential refractometry by an integrated-optical Young interferometer*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1997. **39**(1-3): p. 266-271.
11. Brandenburg, A., Krauter, R., Kunzel, C., Stefan, M., and Schulte, H., *Interferometric sensor for detection of surface-bound bioreactions*. Applied Optics, 2000. **39**(34): p. 6396-6405.
12. Heideman, R. G. and Lambeck, P. V., *Remote opto-chemical sensing with extreme sensitivity: design, fabrication and performance of a pigtailed integrated optical phase-modulated Mach-Zehnder interferometer system*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1999. **61**(1-3): p. 100-127.
13. BIACORE, *Pharmacia Biosensor* www.biacore.com.
14. Hengelo, *IBIS II*, www.ibis-spr.nl, IBIS Technologies bv.
15. Sepúlveda, B., *Efectos magneto-ópticos en dispositivos biosensores de campo evanescentes*. 2005, Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
16. Lukosz, W., Stamm, C., Moser, H. R., Ryf, R., and Dubendorfer, J., *Difference interferometer with new phase-measurement method as integrated-optical refractometer, humidity sensor and biosensor*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1997. **39**(1-3): p. 316-323.
17. Clerc, D. and Lukosz, W., *Integrated Optical Output Grating Coupler as Refractometer and (Bio-)Chemical Sensor*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1993. **11**(1-3): p. 461-465.

CAPÍTULO 4

Aplicaciones como biosensor del MZI

4.1. Aplicaciones en Biotecnología

4.1.1 Aplicaciones en Genómica: Detección de mutaciones en el ADN. Aplicación del MZI para la detección precoz de cáncer de mama hereditario.

Como aplicación biosensora del MZI, en esta Tesis se ha desarrollado un biosensor altamente sensible con la finalidad de detectar mutaciones puntuales en el ADN¹. Las mutaciones puntuales son alteraciones en las que se ha variado una o varias bases respecto de la original y en muchos casos pueden ser hereditarias, transmitiéndose de padres a hijos. Estas mutaciones pueden ser indicativas de la predisposición a tener ciertas enfermedades (Parkinson, pérdida de audición, enfermedades cardíacas, hepáticas o pancreáticas, diferentes tipos de cáncer como de próstata, colon, o mama, etc.) y por ello su detección es tan importante.

Entre todas estas enfermedades el cáncer de mama es la que ha requerido nuestra atención en esta Tesis. El cáncer de mama ocupa el primer puesto entre los cánceres incidentes en la mujer, al igual que en lo que a la mortalidad se refiere. Los principales factores de riesgo están relacionados claramente con el sexo femenino, la edad superior a los 50 años y los antecedentes familiares. Otros factores son los factores genéticos, los factores exógenos y los factores personales.

Hay diversos grupos de riesgo ligados a factores genéticos en relación con el cáncer de mama; los cánceres familiares suponen alrededor del 10-15% de todos los casos. El cáncer de mama familiar, con las características de mayor precocidad, agresividad y agregación familiar, supone la situación de riesgo más identificable por lo que es importante la identificación de los familiares con cáncer de mama, sobre todo en primer o segundo grado. En la mayoría de los casos de cáncer con compromiso genético, los genes asociados son el BRCA-1 y el BRCA2, localizados en el cromosoma 17q y 13q, respectivamente; aunque este grupo sólo supone aproximadamente un 5% de los casos, en este terreno se abre un amplio campo de investigación, no exento de polémica, por las implicaciones prácticas que tiene.

Debido a ello, en esta Tesis se ha querido estudiar el gen BRCA-1. El gen BRCA-1² es un gen de supresión tumoral que repara el ADN dañado. Son muchas las mutaciones que pueden aparecer en este gen, unas seiscientas, aumentando considerablemente el riesgo desarrollar cáncer de colon, próstata y sangre o de otras enfermedades como la anemia Fanconi³. Estas mutaciones tienen serias consecuencias para las mujeres, ya que son indicativas en una mujer de la predisposición a desarrollar cáncer de mama. Su detección se llevará a cabo por detección directa y a tiempo real de las reacciones de hibridación entre las moléculas de ADN previamente inmovilizadas en

la superficie del transductor y sus complementarias, sin necesidad de ningún tipo de marcador.

El esquema de detección elegido consiste en detectar la mutación 916delTT (delección de dos timinas en la secuencia del gen BRCA-1) de individuos portadores respecto de los no portadores y por tanto sanos, que presentan el fenotipo salvaje WT (del inglés wild-type). Para ello se deberá trabajar en condiciones en las que la hibridación de secuencias perfectamente complementarias esté mucho más favorecida que con secuencias entre las que haya un desajuste en una o varias bases, como consecuencia de la presencia de una mutación.

Dado que nuestro objetivo es detectar a los pacientes portadores de la mutación, se inmovilizará en la superficie del sensor un oligo que contenga la secuencia mutante, de modo que la posterior hibridación con ADN de pacientes portadores de la mutación dará lugar a una hibridación perfectamente complementaria. De esta forma se obtendrá una elevada respuesta en el sensor, claramente detectable (cambio de fase $\Delta\phi$) en las condiciones de trabajo seleccionadas. Por el contrario, la hibridación con el ADN de pacientes sanos (no portadores de la mutación), dará lugar a una hibridación parcial, que por estar más desfavorecida generará una menor respuesta en el sensor y claramente diferenciable del caso anterior. Por tanto, en estas condiciones se podrá distinguir claramente a los pacientes sanos de los portadores de la mutación, de manera rápida, sencilla y eficaz.

De acuerdo con este esquema de detección, las secuencias empleadas para la detección de esta mutación son (Tabla 1):

- a) 916delTT-SH: Secuencia usada para la inmovilización. Lleva un grupo sulfhidrilo (-SH) en el extremo 5' de su cadena y es portadora de una mutación consistente en la delección de dos timinas. La secuencia completa se muestra en la Tabla 1.
- b) 916delTT-MR: Secuencia correspondiente a los individuos portadores de la mutación y por tanto presenta una delección de dos adeninas. Es perfectamente complementaria a la secuencia inmovilizada, tal como se observa en la Tabla 1.
- c) 916delTT-WT: Secuencia correspondiente a los individuos sanos. No lleva la mutación anterior y por tanto es parcialmente complementaria a la secuencia inmovilizada (Tabla 1).
- d) 916delTT-MF: Secuencia control no complementaria a la inmovilizada (Tabla 1).

Tabla 1: Nombre y secuencias de los oligos empleados

Designación	Mutación	Descripción	Nº de bases	Secuencia
916delTT-SH	Delección TT	Inmovilización	28	5'-SH-(CH ₂) ₆ - TTT TTT TTT TTT TTT GTT CTG TCA AACT - 3'
916delTT-MR (S)	Delección AA	Perfectamente complementaria	13	5'- AGT TTG ACA GAA C - 3'
916delTT-MR (L)	Delección AA	Perfectamente complementaria	58	5' - TGC CAC ATG GCT CCA CAT GCA AGT TTG ACA GAA CTA CCC TGA TAC TTT TCT GGA TGC C - 3'
916delTT-MF		Control	58	5'- GGC ATC CAG AAA AGT ATC AGG GTA GTT CTG TTT CAA ACT TGC ATG TGG AGC CAT GTG GCA - 3'
916delTT-WT- R	No hay	Parcialmente complementaria	60	5'- TGC CAC ATG GCT CCA CAT GCA AGT TTG AAA CAG AAC TAC CCT GAT ACT TTT CTG GAT GCC - 3'

Los experimentos de hibridación se han realizado en dos fases: Una primera más sencilla que ha servido para optimizar y fijar las condiciones óptimas de trabajo y en la que se ha utilizado oligos de 13 bases con la secuencia mutante. Realizada esta fase, que permitió comprobar el funcionamiento del dispositivo biosensor para dichas secuencias, se procedió a diseñar secuencias equivalentes en las que se tendrían al trabajar con muestras reales. Cuando se extrae ADN de un paciente, éste debe sufrir una serie de procesos para su purificación y enriquecimiento en la región del ADN que se desea detectar. Este paso se lleva a cabo mediante una reacción denominada PCR (*Polymerase Chain Reaction*). La reacción en cadena de la polimerasa⁴, es una técnica de [biología molecular](#) cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de [ADN](#) particular, partiendo de un mínimo. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN y basta partir de una única copia del mismo. Se fundamenta en la propiedad natural de las [ADN polimerasas](#) para replicar hebras de

ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse las polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

El resultado de la PCR es una secuencia de ADN más o menos larga, de entre 50-80 bases aproximadamente en cuyo interior se encuentra la secuencia de nuestro interés. Así pues, el funcionamiento del dispositivo quedará demostrado para secuencias tipo PCR, que denominaremos largas (MR-L, o simplemente MR) en contraposición de las anteriores, más cortas, que denominaremos MR-S (Tabla 1).

El oligo 916delTT fue comprado a la empresa GenoMechanix (Florida, USA) y tiene 15 tiaminas como espaciador vertical y un grupo tiol como grupo funcional. Los oligos complementarios MR-S, MR, MF y WT-F fueron comprados a la empresa Isogen Bioscience BV (Maarsen, Holanda).

4.1.1.1 Protocolo de inmovilización e hibridación de ADN para la detección de mutaciones del gen BRCA-1

Uno de los aspectos fundamentales del funcionamiento de los biosensores es la inmovilización del elemento de reconocimiento sobre la superficie del transductor⁵. La forma de unir la molécula biológica a la superficie sensora condicionará la actividad biológica del elemento inmovilizado, al igual que la reproducibilidad de las medidas a lo largo del ensayo.

Son cuatro los procedimientos más empleados en la inmovilización del elemento de reconocimiento a la superficie del transductor. El primero es **la adsorción física**, en que el elemento de reconocimiento se une no covalentemente al sustrato, a través de interacciones hidrófobas y electrostáticas sin necesidad de ninguna modificación química ni funcionalización de la superficie del transductor. Este tipo de inmovilización presenta el problema de no formar una monocapa homogénea de biorreceptores, dando lugar a agregados de moléculas débilmente unidas sin orientación alguna sobre la superficie del transductor. El segundo procedimiento que se puede usar es el de la **inmovilización por enlace covalente**, en que la molécula se une covalentemente a los grupos químicos existentes en la superficie del transductor. Este tipo de inmovilización produce una unión muy fuerte entre receptor y superficie del transductor. Entre las distintas técnicas usadas en este tipo de inmovilización, se suele hacer uso de la técnica de monocapas autoensambladas (SAMs). Esta técnica permite una orientación más o menos controlada de los elementos inmovilizados, produciendo capas biológicas muy uniformes con alta densidad de ocupación. El tercer procedimiento es el de **inmovilización por atrapamiento**, en que el elemento de reconocimiento se retiene físicamente por inclusión en una matriz polimérica o por encapsulamiento de la biomolécula dentro de una membrana semipermeable. Por último, el cuarto procedimiento de inmovilización más común es el de **la interacción por afinidad**, entre la molécula inmovilizada y su complementaria, como es el caso de la unión avidina-biotina⁶.

Un ejemplo de inmovilización por enlace covalente del elemento receptor, es la técnica de monocapas autoensambladas (SAMs)^{7, 8}. Se definen monocapas autoensambladas, como los ensamblajes moleculares y ordenados que se forman espontáneamente por la adsorción de un surfactante con una afinidad determinada

propia de su grupo terminal, al sustrato. En nuestro caso las SAMs son monocapas compactas y ordenadas de cadenas orgánicas en las que intervendrían no sólo fuerzas de tipo covalente entre el grupo terminal y el sustrato, sino fuerzas de Van de Waals entre cadenas orgánicas vecinas.

Dependiendo de la superficie (Au, Si, SiO₂, Si₃N₄...) sobre la que se quiere construir la SAM y dependiendo también de qué grupo funcional se necesite para posteriormente unir las moléculas biológicas receptoras (grupos amino primarios -NH₂, grupos mercapto o tiol SH-, grupos carboxilo COOH-, grupos alcohol -OH, grupos nitrilo ≡CN...), se hace uso de distintas técnicas de tratamiento químico de la superficie del transductor (silanización con grupos tiol -SH, esterificación, CNBr, ...) y de diferentes compuestos que participan en el proceso (alquiltioles, alcoxisilanos, aminosilanos..). En nuestro caso la superficie a funcionalizar es de Si₃N₄, que es una superficie con muy poca afinidad hacia los grupos funcionales que los biorreceptores a inmovilizar suelen tener asociados, por lo que es necesario preparar químicamente la superficie por la técnica SAM de la silanización^{9,10}.

La silanización es un proceso químico de formación de monocapas auto ensambladas de cadenas orgánicas, mediante la unión covalente de un compuesto tipo silano (R_x-SiH_{4-x}) y los grupo hidroxilo de los sustratos sobre los que se forman las monocapas dando lugar a los grupos O_x-Si-R_{3-x} (Figura 1 (a)). La funcionalidad de la monocapa de silano formada depende del grupo funcional del compuesto silano que se utilice.

Existen numerosos estudios sobre la estructura, morfología y composición química de las SAMs de silano crecidas sobre las superficies de Si, de SiO₂ y de Si₃N₄, aunque en esta última existen menos datos¹¹⁻¹⁵. En todas ellas el recubrimiento de la monocapa depende críticamente del grado de hidratación del sustrato y por tanto del número de grupos OH que hay en su superficie¹⁶. Por tanto, la humedad del sustrato en el proceso de silanización juega un papel muy importante y es necesario una capa de agua sobre su superficie (Figura 1 (b)) que permita que la silanización se lleve a cabo. A pesar de que el Si₃N₄ crecido por LPCVD (que es el material de las guías de onda del MZI donde se van a inmovilizar las moléculas) es hidrofílico, posee pocos grupos hidroxilo, menos que el SiO₂, lo que hace que sea necesario oxidar la superficie previamente a su modificación química.

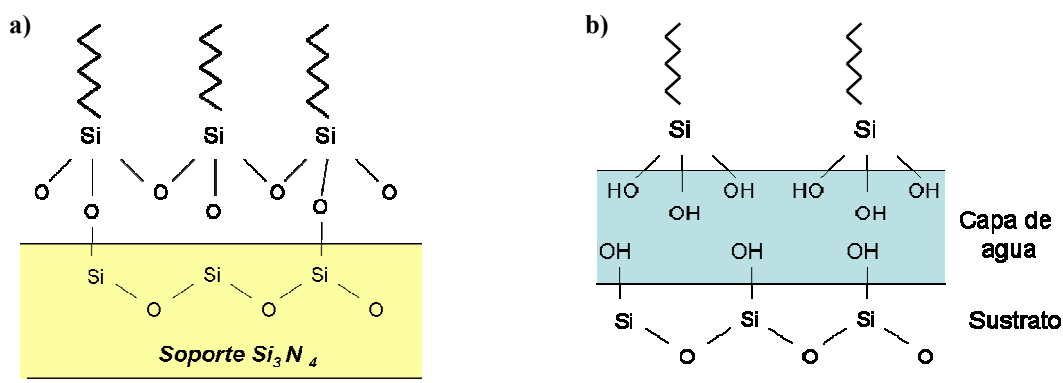


Fig. 1 a) Formación de la monocapa de silano, que es debida principalmente al enlace entre los grupos silanol terminales b) Capa de agua (capa de solvatación) sobre el sustrato que permite que la silanización se lleve a cabo

El recubrimiento de la superficie a funcionalizar depende de la concentración y de la longitud del compuesto orgánico, del tiempo de incubación, del tipo de solvente usado y de la temperatura en que se ha llevado a cabo el proceso, distinguiéndose dos fases o regímenes cinéticos en la formación de una monocapa (Figura 2): una primera fase donde se produce una rápida adsorción del 80-90 % de las cadenas, seguida de una “segunda fase” de lenta ordenación que afecta a la cristalinidad de la monocapa^{17, 18}. Es fundamental una proporción adecuada de silano y de humedad en el proceso, pues sino se formarían agregados de polímero desordenados. Las monocapas de silano formadas son altamente hidrofóbicas^{11, 12, 19, 20}.

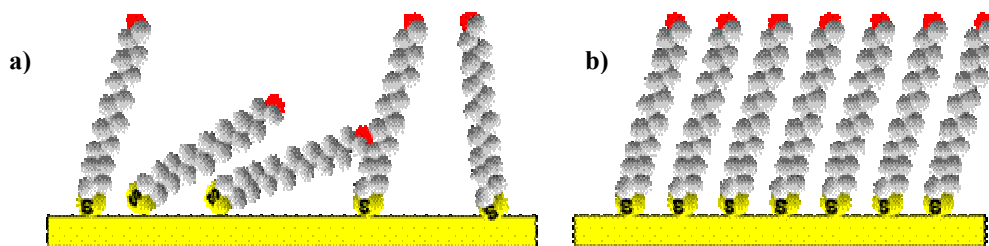


Fig. 2 Fases en la formación de la monocapa de silano: a) Rápida adsorción de las cadenas b) Lenta ordenación de las mismas que afecta a la cristalinidad de la monocapa

El protocolo que se ha seguido para funcionalizar la superficie de Si_3N_4 del transductor es el siguiente²¹:

i) Limpieza de los MZIs

Los chips se calientan en disolventes orgánicos hasta prácticamente llegar a su punto de ebullición. De esta forma se eliminan restos de material orgánico e inorgánico remanentes del proceso de fabricación y transporte. El proceso llevado a cabo es el siguiente:

- 1) Calentamiento de los chips inmersos en tricloroetileno en un crisol. A continuación se introducen en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos.
- 2) Se repite el proceso para los disolventes acetona y etanol, en este orden.
- 3) Los chips se lavan con abundante agua y se someten a ultrasonidos durante 5 minutos. A continuación se secan con un chorro comprimido de N_2 seco.

Los disolventes orgánicos fueron comprados a la empresa Merck (Darmstadt, Alemania).

ii) Limpieza mediante plasma de O_2

Los chips fueron introducidos en una cámara de vacío a una presión de 0.16 torr (10^{-4} bars). Una vez que la cámara se llenó de O_2 , se generó el plasma con estos parámetros: potencia eléctrica de 100 W, 3.6 MHz de radiofrecuencia y una presión final del O_2 de 0.4 torr, durante un tiempo de 5 minutos. De esta forma desaparece cualquier impureza orgánica remanente de los procesos de litografía en la fabricación de los MZIs, oxidándose la superficie y creando nuevos grupos silanol en ella^{22, 23}.

iii) Lavado con 10% HNO_3 en agua destilada en reflujo:

Inmediatamente después del tratamiento por plasma de O_2 , los chips se limpiaron con 10 % HNO_3 en agua destilada a una temperatura de 75 °C y en reflujo, durante 25 minutos, para oxidar su superficie y crear más grupos silanol sobre ella.

iv) Lavado con agua abundante y secado:

Este proceso es de vital importancia, pues el lavado con agua favorece más la oxidación y limpia las trazas de nitrógeno remanentes del proceso anterior. La superficie se secó con N₂ seco.

v) Silanización con 3-(mercaptopropil)-trimetoxisilano (MPTMS) en tolueno:

El chip se introduce en una disolución al 10% de MPTMS (que tiene como grupo funcional un grupo tiol terminal) en tolueno a temperatura ambiente y en reflujo, durante un tiempo de 24 h, formándose así una monocapa de silano. El MPTMS fue comprado a la empresa Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) mientras que el tolueno a la empresa Merck (Darmstadt, Alemania)

vi) Secado de la muestra a 120°C:

Para conseguir la estabilidad de la monocapa de silano, el chip se introdujo en un horno a 120 °C durante un tiempo de 3h. De esta forma se eliminaba el exceso de agua en la monocapa de silano.

Ya funcionalizada la superficie del transductor con un grupo tiol mediante la técnica de las SAMs, el oligo 916delTT, que presenta un grupo tiol en su extremo 5', queda unido a la superficie por este punto de unión mediante un puente disulfuro. El proceso de inmovilización del oligo 916delTT queda esquematizado en la Figura 3.

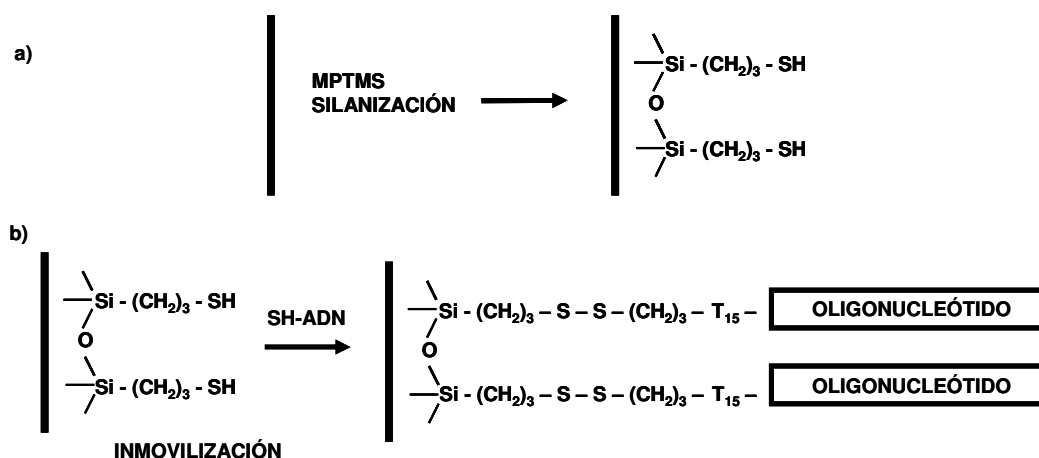


Fig. 3 Esquema de a) la funcionalización de la superficie por el proceso de la silanización b) la inmovilización de los oligonucleótidos tiolados

Es importante controlar la densidad de oligos inmovilizados en la superficie del transductor²⁴, pues una densidad óptima permitirá obtener una señal de hibridación muy eficiente. Si la densidad de oligos inmovilizados es alta, no habrá acceso para las cadenas de ADN complementarias que están en solución y la eficiencia de hibridación será muy baja. En estos casos se suelen introducir intercaladores o espaciadores laterales, que facilitan el acceso de la molécula diana²⁵. Definimos eficiencia de hibridación²⁴ como:

$$\varepsilon = \frac{N^{\circ} \text{ de moléculas de ADN complementarias que hibridan}}{N^{\circ} \text{ de moléculas de ADN inmovilizadas en la superficie}} \quad (1)$$

y, para el biosensor MZI desarrollado en esta tesis, la eficiencia de hibridación se puede definir como:

$$\varepsilon = \frac{\Delta\Phi_{\text{hibrid}}}{\Delta\Phi_{\text{inmov}}} \quad (2)$$

con $\Delta\Phi_{\text{inmov}}$ el cambio de fase experimentado por el MZI al unirse sobre la superficie del transductor las moléculas que se inmovilizan y $\Delta\Phi_{\text{hibrid}}$ la debida a la reacción de hibridación de las moléculas de oligo complementarias con las moléculas de ADN ya inmovilizadas.

Otros de los factores que pueden afectar al mecanismo de hibridación son el *tiempo de reacción y la temperatura* a la que se produce el proceso^{20, 24}. Por otro lado, las bases de las cadenas de oligo inmovilizadas más cercanas a la superficie son menos accesibles que las que están más alejadas, por lo que en muchas ocasiones se usan espaciadores verticales, que facilitan el acceso a las moléculas diana^{26, 27}. Por ello se ha elegido el oligo 916delTT con un espaciador vertical de 15 bases timina.

La *fuerza iónica* y el *pH* de la solución tampón empleadas en la inmovilización e hibridación de las moléculas de ADN, han de tenerse también en cuenta para conseguir una alta eficiencia en la formación de las dobles hélices²⁴. Altas fuerzas iónicas apantallan la densidad de carga negativa de las cadenas de ADN y favorecen la unión con sus complementarias para su hibridación. Sin embargo, si la densidad de moléculas de oligo inmovilizadas es baja, algunas cadenas pueden quedar tumbadas sobre el soporte, dificultando la hibridación con las moléculas complementarias. Por tanto se ha de buscar una solución tampón con una fuerza iónica y pH adecuados que permitan tener las cadenas del oligo 916delTT inmovilizadas sobre la superficie del transductor erguidas, de tal forma que las moléculas de los oligos complementarios tengan fácil acceso para hibridar con éstas. La solución tampón elegida, tanto para el proceso de inmovilización como para el de hibridación, es una solución tampón de fosfato 50 mM y NaCl 750 mM a pH=7 a temperatura ambiente y es la misma que la que fue empleada en el laboratorio con el SPR en las medidas de inmovilización e hibridación de secuencias.

a) Protocolo de inmovilización

Para el proceso de inmovilización del ADN, diferentes concentraciones de 300 μl del oligonucleótido tiolado 916delTT, en el rango de 1 pM - 1 μM (1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM, 5 nM, 45 nM, 100 nM y 500 nM) en la solución tampón de fosfato 50 mM y NaCl 750 mM a pH=7, fueron inyectadas una a continuación de otra, a una velocidad de 25 $\mu\text{l}/\text{min}$, para circular en flujo laminar sobre las áreas sensoras de los MZIs de 200 nm de espesor de núcleo y en polarización TM. Para los MZIs de 75 nm, sin embargo, se inyectó sólo una concentración de 100 nM del mismo oligonucleótido, en las mismas condiciones que en el caso anterior.

b) Protocolo de hibridación

Para detectar las reacciones de hibridación entre cadenas complementarias, se inyectaron a temperatura ambiente diferentes concentraciones de 300 μ l de los oligonucleótidos complementarios MR-S y MR en la misma solución tampón y a la misma velocidad de flujo que en el proceso de inmovilización. Las concentraciones inyectadas para el oligo MR-S son: 1 μ M, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM y 0.1 nM, mientras que las del MR: 1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 2 nM, 1nM, 100 pM, 10 pM y 1pM.

Para llevar a cabo la regeneración de la capa sensora²⁸, se desnaturaliza la doble hélice de ADN en sus dos cadenas sencillas, de manera que la cadena de ADN inmovilizada quedará de nuevo preparada para hibridar. Este proceso implica la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las bases complementarias que forman la doble hélice. Para regenerar la superficie después de cada hibridación, se inyectaron 300 μ l de agua DI y 300 μ l HCl 2.5 mM en agua DI a la velocidad de 25 μ l/min y a temperatura ambiente.

Como control negativo se hicieron pasar 300 μ l de diferentes concentraciones (1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 2 nM, 1nM, 100 pM, 10 pM y 1pM) del oligonucleótido no complementario (MF) en las mismas condiciones de hibridación, solución tampón, velocidad de flujo y temperatura.

Se inyectaron también diferentes concentraciones (500 nM, 100 nM, 50 nM, 40 nM y 25 nM) de 300 μ l del oligo complementario WT-R en la misma solución tampón, a la misma velocidad, con la finalidad de detectar la adición de dos bases adenina en el oligo MR. Esta detección se realizó comparando estas señales de respuesta con las de hibridación anteriores obtenidas con el oligonucleótido MR. El proceso de regeneración fue el mismo que el descrito anteriormente.

Para cuantificar el número de moléculas de oligo inmovilizadas en la superficie del transductor para una concentración de saturación, se ha empleado la técnica de radiomarcaje, obteniendo así información sobre el recubrimiento de la superficie del transductor. También se ha realizado un estudio sobre la reutilización del chip y así poder llevar a cabo sucesivos experimentos de inmovilización de ADN, mediante la técnica de la fluorescencia.

La técnica de radiomarcaje de un oligo determinado consiste en marcar radioactivamente el extremo 5' de sus cadenas con fósforo radioactivo ³²P, de tal forma que la radioactividad emitida por este fósforo puede detectarse directamente mediante un contador de centelleo (o indirectamente mediante una placa fotográfica). Son varias las formas de marcar radioactivamente un oligonucleótido determinado. Una de ellas puede realizarse añadiendo fosfato radioactivo mediante su síntesis. Así, si se añade fosfato radioactivo al medio de cultivo cuando está teniendo lugar la síntesis del ADN, el nuevo ADN será radioactivo. Otra forma alternativa es usando ATP radioactivo marcado en el tercer fosfato. El enzima polinucleótido quinasa quita específicamente el tercer fosfato del ATP y lo une al grupo hidroxilo 5' del ADN. Esta técnica es extremadamente útil y rápida ya que permite el marcaje de moléculas de ADN ya preformadas y será la que haya sido empleada para marcar los oligos 916delTT.

Paralelamente a la técnica de marcaje radioactivo, la técnica de marcaje fluorescente se basa en la detección de la intensidad de fluorescencia emitida por un fluoróforo (Cy3 en nuestro caso) incorporado en el extremo 3' de la cadena del oligo que se quiere marcar, al iluminarlo con radiación U.V. El método más común de marcaje fluorescente es añadir el fluoróforo durante la síntesis del oligo y la detección puede realizarse por escáneres de detección de fluorescencia o por microscopios ópticos con lámparas de fluorescencia.

Para las medidas basadas en marcaje radioactivo, las cadenas del oligo 916delTT fueron marcadas a través de la enzima T4 polinucleótido kinasa (New England Biolabs) y el isótopo $[\gamma^{32}]$ ATP (Amershan Biosciences). Los experimentos fueron realizados en estático sobre las áreas sensoras de los MZIs, mediante la deposición de 1 μ l del oligo 916delTT 1 μ M marcado durante 1h antes de hacer el lavado.

Para las medidas basadas en marcaje por fluorescencia, las cadenas de ADN han sido adquiridas previamente modificadas con el fluoróforo Cy3 en el extremo 3'. La lectura de la fluorescencia se ha realizado con el microscopio óptico de la marca Axioscop 2 MAT (Zeiss) que tiene una cámara scanner AxioCam MRc5 y una lámpara de emisión U.V. (366 nm) HB50. Las imágenes obtenidas por el microscopio de fluorescencia fueron tratadas con el programa Adobe Photoshop, que permitió comparar en cada imagen las intensidades relativas emitidas en cada inmovilización.

La cantidad de cadenas del oligonucleótido 916delTT- $[\gamma^{32}P]$ inmovilizadas en la superficie de Si_3N_4 es de 5.9×10^{10} moléculas/cm², que equivale a un recubrimiento superficial de 8.4 pg/mm², o lo que es lo mismo, 8.85×10^8 cadenas del oligonucleótido 916delTT- $[\gamma^{32}P]$ inmovilizadas en el área sensora del MZI. Este dato confirma la elección correcta de las condiciones de fuerza iónica y pH de la solución tampón, que fueron tomadas de las medidas de inmovilización e hibridación realizadas en el laboratorio con el SPR, aunque la densidad de oligo inmovilizado es dos órdenes de magnitud menor. También confirma el acierto en no utilizar espaciadores laterales, ya que la densidad de oligo inmovilizado es baja.

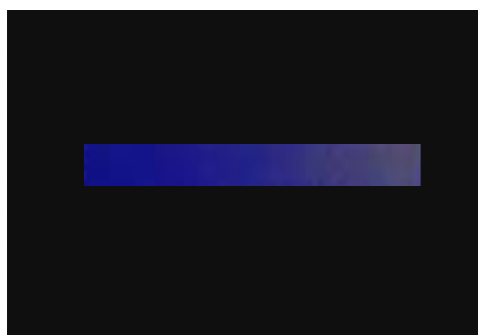
En el estudio realizado por la técnica de fluorescencia, se analizó la capacidad que tenían diferentes disolventes para remover la monocapa de silano con el oligonucleótido inmovilizado. El chip, inicialmente funcionalizado y con el oligonucleótido 916delTT-Cy3 inmovilizado (Figura 4), se lavó con disolventes orgánicos, se introdujo en un plasma de oxígeno y se sumergió en una disolución 10% HNO₃ en agua destilada a una temperatura de T=75°C, haciendo uso del mismo procedimiento seguido en la silanización. Inmovilizando la misma concentración del oligonucleótido 916delTT-Cy3, se observó que la intensidad de luz recogida propia de la fluorescencia era del orden de 100 veces menor, lo que implicaba que la monocapa de silano había sido eliminada en gran parte (Figura 5(a)). La aplicación del protocolo anterior de limpieza (disolventes orgánicos, plasma de O₂ y HNO₃), silanización del chip e inmovilización del oligonucleótido 916delTT-Cy3 1 μ M sobre su superficie, dio lugar a una imagen de fluorescencia que seguía siendo tenue, del orden de 110 veces menor (Figura 5 (b)) que la obtenida para una monocapa del mismo oligonucleótido inmovilizado que no había sido tratada (Figura 4). Esto implicaba que, una vez utilizados los chips para el funcionamiento del MZI como biosensor de ADN, ya no serían reutilizables.



Fig. 4 Imagen de fluorescencia para la inmovilización del oligonucleótido 916delTT 1 μ M en el área sensora



a)



b)

Fig. 5 Imagen por fluorescencia del área sensora de la Figura 6 del MZI **a)** una vez lavado con disolventes orgánicos, tratado con plasma de O_2 y con HNO_3 en agua destilada caliente a $75^\circ C$ para eliminar la monocapa del oligonucleótido 916delTT-Cy3 inmovilizada. A continuación es inmovilizada la misma concentración del oligonucleótido 916delTT-Cy3 1 μ M. **b)** Tratados y lavados de nuevo por el proceso anterior y silanizados (por segunda vez) para obtener una nueva monocapa de silano y luego así inmovilizar el oligonucleótido 916delTT-Cy3. Las imágenes en intensidad de fluorescencia sobre el área sensora son muy ténues.

4.1.1.2 Configuración del MZI

Tal como se muestra en la Tabla 6 del Capítulo 3, las configuraciones experimentales empleadas en la detección de las reacciones de inmovilización e hibridación y en la detección de mutaciones, son las siguientes (Tabla 2):

Tabla 2: Aplicaciones, ventajas y desventajas de las configuraciones experimentales empleadas en el biosensor MZI de ADN

Configuración experimental	Espesor del núcleo de los MZIs	Tipo de polarización empleada	Aplicaciones	Ventajas	Desventajas
Objetivo de entrada-Fibra de recogida	75 nm (Hibridación e inmovilización) 200 nm (Inmovilización)	TE TM	Detección de la reacción de inmovilización. Detección de la reacción de hibridación con los oligos MR-S y MR	Mayor integración para futuros prototipos compactos, alta estabilidad, no control de la polarización	Una sola señal de medida
Doble polarización	200 nm	TE y TM	Detección de la reacción de hibridación con los oligos MR y WT-R	Una señal de referencia óptica adicional, alta estabilidad	Poca integración

En las medidas de muy baja concentración se utilizó un peltier que permite llevar la señal del MZI a su punto de cuadratura (Capítulo 3, Figura 15 (a)). El sistema de fluidica empleado en todas las medidas de hibridación se muestra en la Figura 6. Una cubeta de metacrilato es colocada con su canal fluidoico sobre los MZIs que se van a usar y dos bombas peristálticas participan en el proceso de inyección y carga de las muestras. Estas bombas funcionan de forma independiente con una válvula de inyección de baja presión. De esta forma, la circulación de las disoluciones tampón y de ADN sobre el área sensora de los MZIs puede controlarse y será en ambos casos la misma (25 $\mu\text{l}/\text{min}$), por lo que las monocapas de silano y oligonucleótido inmovilizado no quedarán afectadas por posibles cambios en la velocidad del fluido circulante. La velocidad de carga de las muestras es de 200 $\mu\text{l}/\text{min}$, pero no afecta a la monocapa biológica, pues es independiente de las velocidades de inyección de las muestras y circulación de la disolución tampón.

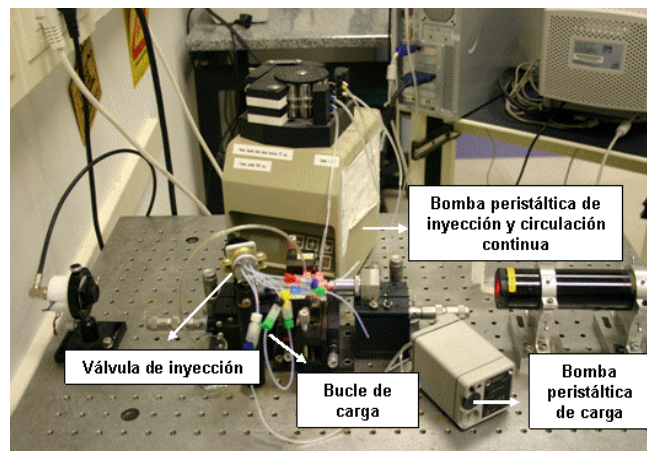


Fig. 6 Sistema de fluidica empleado para las medidas biosensoras

4.1.1.3 Resultados

Los resultados obtenidos por la inmovilización del oligo 916delTT en los MZIs de 200 nm se describen a continuación. El cambio de fase que se produce en el sensor por la inmovilización de 1 pM del oligonucleótido 916delTT es del orden $\Delta\phi = 0.01 \times 2\pi$ rads (esta señal queda enmascarada con la señal de deriva), la de 10 pM, $\Delta\phi = 0.1 \times 2\pi$ rads, que equivale a un espesor promedio de capa inmovilizada de $d_l = 0.1 \text{ \AA}$ y la de 100 pM, $\Delta\phi = 0.8 \times 2\pi$ rads (el espesor promedio total de capa inmovilizada es de $d_l = 0.8 \text{ \AA}$). Para la concentración de 1 nM inyectada a continuación, $\Delta\phi = 2 \times 2\pi$ (Figura 7 (a)), mientras que con 5 nM, $\Delta\phi = 3.5 \times 2\pi$ (Figura 7 (b)). El espesor promedio de capa inmovilizada al haberse inyectado esta última disolución es de 3.8 \AA .

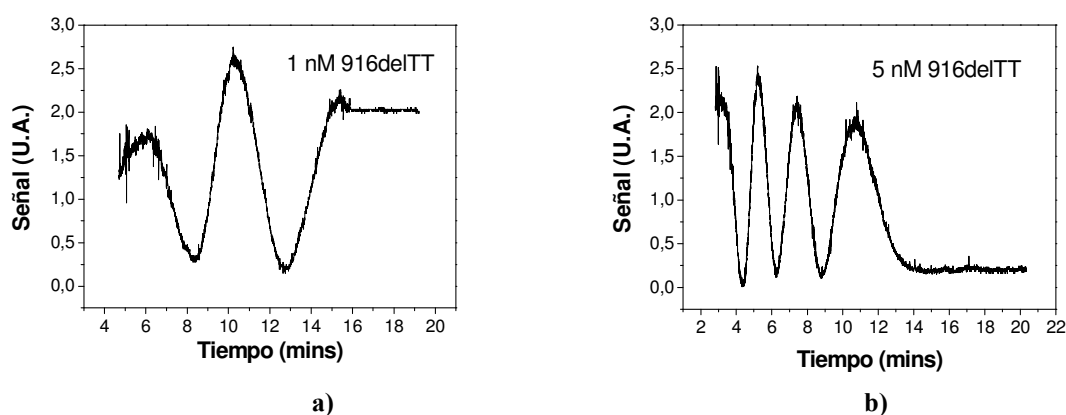


Fig.7 Señal de respuesta del biosensor para la inmovilización de **a)** 1 nM y **b)** 5 nM de 916delTT en el área sensora del MZI

En la Figura 7 (b) se puede observar cómo a medida que las moléculas de oligo se van uniendo covalentemente a la monocapa de silano, van quedando menos silanoles libres en la superficie del transductor y la inmovilización va siendo cada vez más lenta.

En la Figura 8 (a) se muestra la respuesta del MZI al inyectar 45 nM del oligonucleótido 916delTT, obteniendo un cambio de fase de $\Delta\phi = 4.7 \times 2\pi$ rads. Con esta concentración se alcanza la saturación, de tal forma que las siguientes disoluciones de concentraciones 100 nM (Figura 8 (b)) y 500 nM, no producen una variación de fase apreciable ($\Delta\phi = 1 \times 2\pi$ y $\Delta\phi = 0.3 \times 2\pi$ respectivamente). La concentración óptima para conseguir una inmovilización eficiente es del orden de 50 nM.

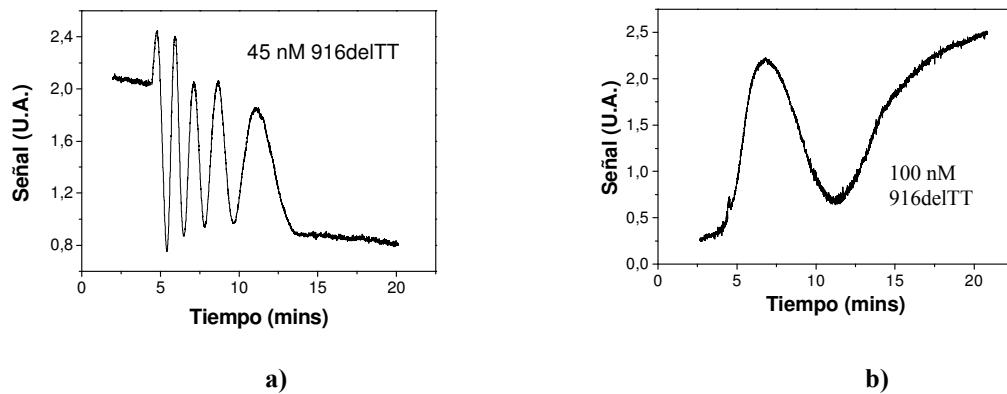


Fig.8 Señal de respuesta del biosensor para la inmovilización de **a)** 45 nM y **b)** 100 nM del oligonucleótido 916delTT en el área sensora del MZI

Por tanto en el punto de saturación 8.9×10^8 moléculas de ADN fueron inmovilizadas en la superficie del transductor recubriéndola con un recubrimiento superficial de $\Gamma = 8.4 \text{ pg/mm}^2$, que equivale a un espesor promedio de capa inmovilizada en torno al nm ($d_f = 9 \text{ \AA}$) y una cambio de fase de $\Delta\phi = 10.9 \times 2\pi$.

Los resultados obtenidos por la inmovilización del oligo 916delTT en los MZIs de 75 nm se describen a continuación. En este caso se inmovilizaron las cadenas del oligonucleótido 916delTT con una sólo inyección de 100 nM de concentración en la misma solución tampón que en el caso anterior.

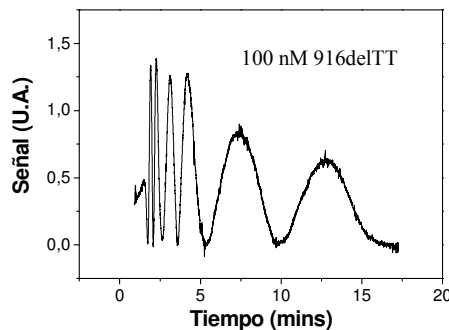


Fig.9 Cambio de fase experimentado por el biosensor de 75 nm de espesor de núcleo en polarización TE al inmovilizar 100 nM del oligonucleótido 916delTT en su área sensora

El cambio de fase experimentado es de $\Delta\phi = 6.2 \times 2\pi$ rads, tal como aparece en la Figura 9 e implica un espesor promedio de capa con el oligo inmovilizado de 4.5 \AA y un recubrimiento superficial de 4.8 pg/mm^2 . Este recubrimiento superficial equivale a 5.3×10^8 moléculas del oligo 916delTT inmovilizadas en la superficie del transductor. Las inyecciones posteriores de disoluciones con concentraciones más elevadas produjeron cambios de fase muy pequeños, lo que implicaba que se había alcanzado el nivel de saturación. Comparando con el caso anterior, la inyección de 100 nM del oligonucleótido 916delTT, en la misma solución tampón y en los MZIs de espesores de núcleo de 75 nm, debería producir un desfase igual o algo mayor a $\Delta\phi_{\text{tot}} = 10.9 \times 2\pi$ (pues son algo más sensibles que los de 200 nm). Este menor espesor promedio de capa con el oligonucleótido inmovilizado implica que existe un mejor reordenamiento de cadenas del 916delTT cuando se realizan diferentes inyecciones de menor a mayor

concentración hasta alcanzar la saturación, que cuando se inyecta una única solución del oligonucleótido MR-S, de concentración elevada que también produce saturación.

Tal como aparece en la Figura 10, la cinética de la reacción de inmovilización²⁹ del oligonucleótido 916delTT en el área sensora del MZI es logarítmica con el tiempo, de tal forma que a medida que van ocupándose los silanoles activos, más lenta es la reacción de inmovilización (hay menos enlaces activos con el silano, por lo que menos son las moléculas de oligonucleótido que se unen y por tanto más lenta es la variación de fase).

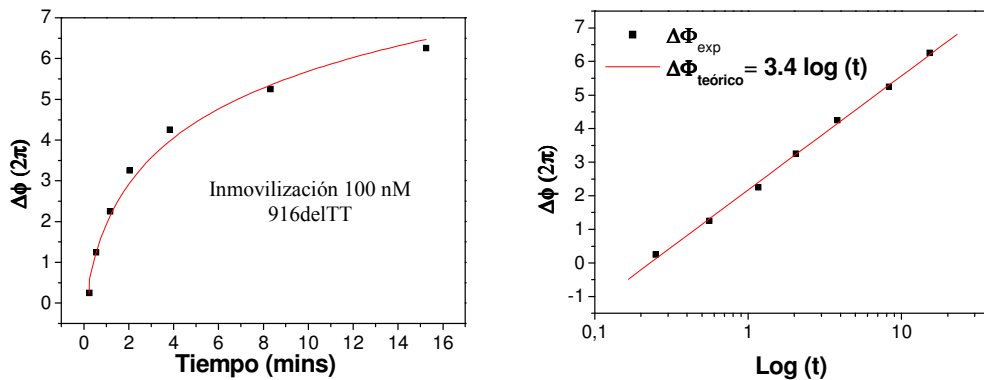


Fig.10: Cinética logarítmica de la inmovilización de 100 nM del oligonucleótido 916delTT sobre el área sensora del MZI de 75 nm de espesor de núcleo en polarización TE

a) Detección de secuencias cortas

Para una inyección de 1 μM de disolución de oligo complementario, el cambio de fase experimentado por el biosensor es de $\Delta\phi = 2.8 \times 2\pi$ rads, tal como aparece en la Figura 11 (a) y equivale a un espesor de capa hibridada de 2 \AA . Esta concentración de oligonucleótido complementario es la concentración de saturación alcanzada por el biosensor, ya que después de la regeneración, concentraciones más elevadas producen cambios de fase muy pequeños.

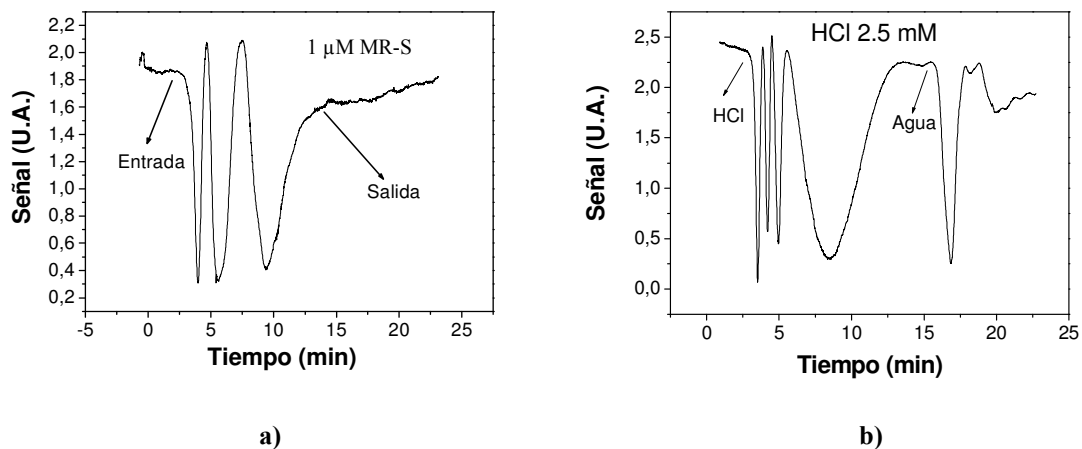


Fig. 11: Respuesta del biosensor de espesor de núcleo de 75 nm **a)** al producirse la hibridación de 1 μM del oligo MR-S **b)** al producirse la regeneración de la superficie con HCl 2.5 mM.

Después de producirse la hibridación con la disolución 1 μM del oligo MR-S, se regeneró la superficie inyectando agua y HCl 2.5 mM. En la Figura 11 (b) se observa el cambio de fase experimentado por el biosensor debido a esta regeneración. Estudiando la señal de respuesta del MZI, el cambio de fase experimentado al fluir la disolución de HCl por el área sensora es de $\Delta\phi = 4 \times 2\pi$ rads debido al cambio de índice de refracción entre ambas soluciones junto con la disminución del espesor de la capa superficial de oligo hibridada. Al entrar el agua, el desfase es de $\Delta\phi \approx 1.2 \times 2\pi$ rads debido al cambio de índice de refracción entre ambas soluciones. Por tanto, el HCl reduce la capa hibridada en un espesor equivalente a 2 \AA , propio de un desfase neto de $\Delta\phi = 2.8 \times 2\pi$ rads, por lo que toda las moléculas de ADN complementarias han roto sus puentes de hidrógeno y se han incorporado a la disolución. De esta forma, la regeneración ha sido prácticamente completa, quedando la capa del oligo MR-S inmovilizada activa para de nuevo hibridar.

En este punto de saturación, el espesor promedio de capa hibridada es de 2 \AA . Debido a este pequeño espesor (en comparación con la altura de las dobles hélices de ADN formadas, que son consideradas como cilindros de altura $\approx 10 \text{ nm}$), algunas de estas cadenas estarán erguidas y otras muchas tumbadas, o la mayoría erguidas, pero muy espaciadas entre ellas.

Después de la inyección de la disolución del oligo MR-S 1 μM y de regenerar la superficie, se hizo pasar una disolución 100 nM del oligo anterior, como se puede ver en la Figura 12 (a). El cambio de fase obtenido para esta concentración es de $\Delta\phi = 1.4 \times 2\pi$ rads, que equivale a un espesor promedio de capa hibridada de 1 \AA . A continuación se procede a regenerar la superficie con agua y HCl 2.5 mM, tal como aparece en la Figura 12 (b). El HCl, al igual que en el proceso de regeneración anterior, rompe los puentes de hidrógeno de unión entre las moléculas que ya han sido inmovilizadas y las complementarias, de tal forma que la respuesta del biosensor MZI a este proceso de regeneración es un cambio de fase neto de $\Delta\phi = 1.4 \times 2\pi$ rads, lo que implica que la regeneración ha sido completa. Una vez regenerada la superficie con agua y HCl 2.5 mM, se hizo pasar una disolución 100 nM de oligo no complementario MF, para cerciorarnos de que no se producían adsorciones inespecíficas en el área sensora del biosensor MZI que pudieran contribuir a la señal de hibridación (Figura 12 (a)). El cambio de fase neto producido al pasar esta disolución de oligo no complementario fue nulo; Un pequeño cambio de fase puede observarse cuando la disolución del oligo no complementario llega al área sensora del MZI, posiblemente producido por un pequeño cambio del índice de refracción entre esta disolución y la solución tampón que estaba circulando (este cambio de índice puede ser debido a cambios del pH entre la muestra, preparada de una solución madre más concentrada y la disolución tampón, utilizada durante todo el tiempo del experimento (varias semanas), cambios en la temperatura entre disoluciones durante el tiempo de medida, cambios de salinidad por impurezas en la preparación de la muestra o en la solución tampón etc). Ese pequeño cambio de fase vuelve a producirse cuando la solución tampón reemplaza a la disolución del oligo complementario, debido al mismo cambio de índice de refracción entre disoluciones. Por tanto, podemos llegar a la conclusión que no existe ninguna unión entre moléculas del oligo MF en disolución y la capa

inmovilizada.

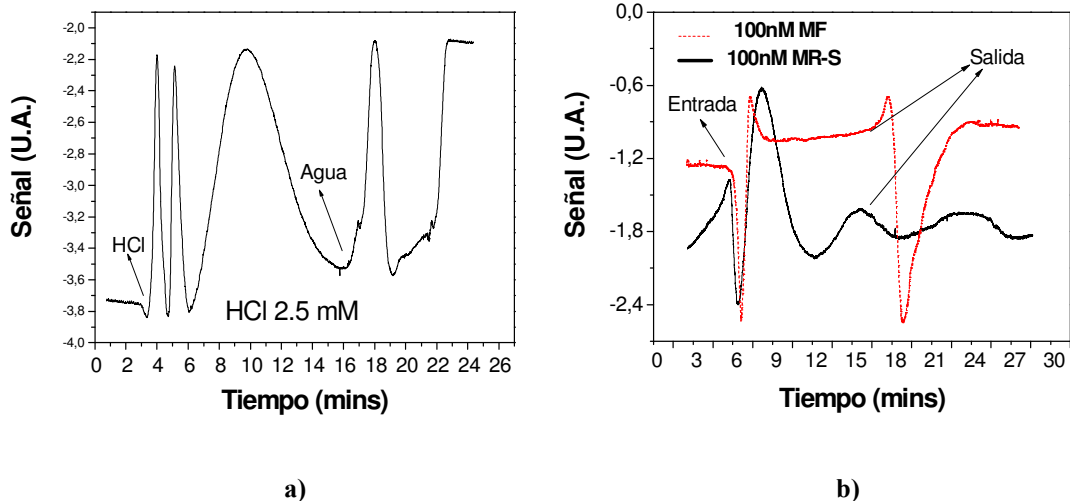


Fig. 12 Cambio de fase experimentado por el biosensor de espesor de núcleo de 75 nm en polarización TE por **a)** la hibridación de una solución 100 nM del oligo MR(S) y de una solución 100 nM del oligo MF **b)** regeneración de la superficie con HCl 2.5 mM

Una vez regenerada la superficie, se inyectaron disoluciones del oligo MR-S, en concentraciones de 50 nM y 10 nM. El cambio de fase producido por la hibridación de 50 nM fue de $\Delta\phi = 0.6 \times 2\pi$ rads (Figura 13 (a)) y equivale a un espesor promedio de capa hibridada de 0.44 \AA . Después de regenerar la superficie como en los casos anteriores, se obtuvo un cambio de fase de $\Delta\phi = 0.4 \times 2\pi$ rads para la hibridación de 10 nM de disolución del oligo MR-S, como se muestra en la Figura 13 (b), o lo que es lo mismo, un espesor de capa hibridada de 0.31 \AA . En las Figuras 13 (a) y 13 (b) se presentan estos cambios de fase para estas concentraciones y se comparan con los cambios de fase obtenidos para la concentración de 100 nM de oligo complementario.

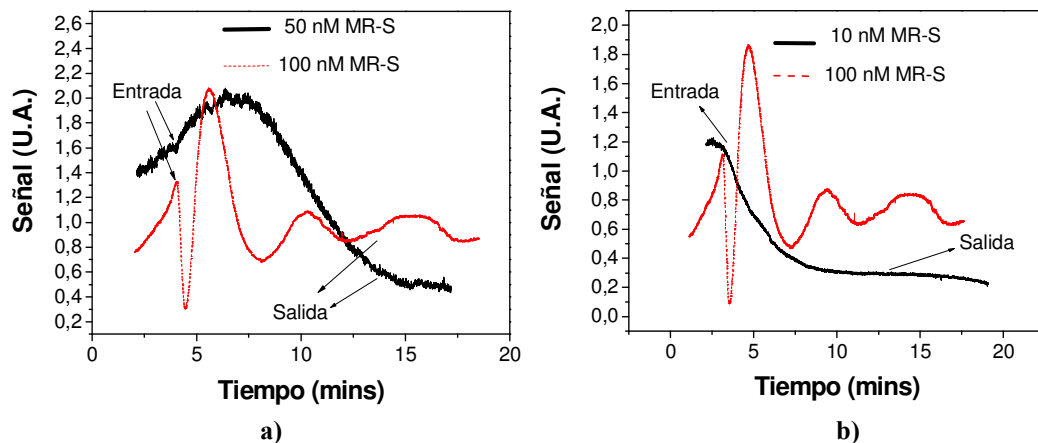


Fig.13 Cambio de fase experimentado por el biosensor en la configuración objetivo de entrada-fibra de recogida y de espesor de núcleo de 75 nm en polarización TE por **a)** la hibridación de una disolución de 50 nM del oligo MR(S) **b)** la hibridación de una disolución de 10 nM del mismo oligo. En ambos casos, las señales se han comparado con el cambio de fase equivalente a la hibridación de 100 nM del MR(S)

También se introdujeron disoluciones del oligo MF con las concentraciones 10 nM y 50 nM, obteniendo un cambio de fase casi nulo, lo que implicaba que no había adsorciones inespecíficas. Tampoco se observó esta vez cambio en el índice de

refracción de estas disoluciones con la solución tampón. Las respuestas del biosensor MZI para las disoluciones de oligo no complementario aparecen en la Figura 14 (a) y (b) y se comparan con las respuestas del biosensor MZI para las hibridaciones a esas mismas concentraciones de disoluciones del oligo complementario MR-S.

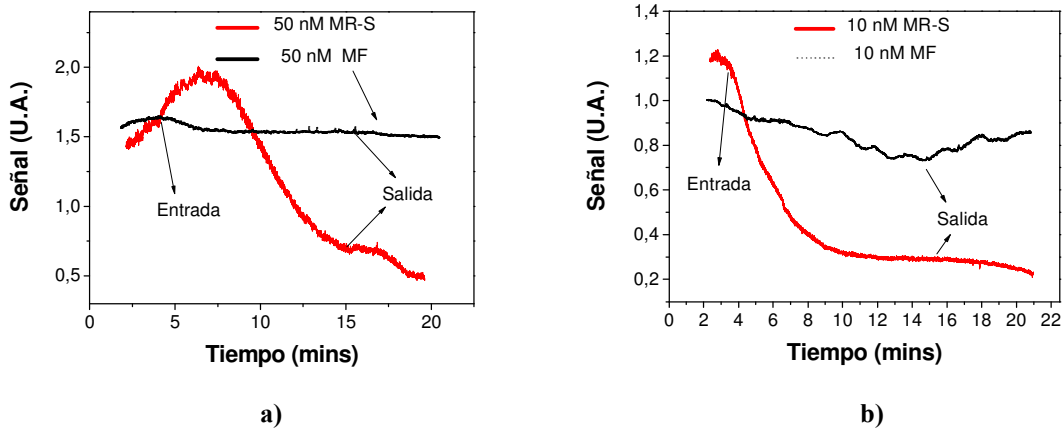


Fig. 14 Cambio de fase experimentado por el biosensor en la configuración objetivo de entrada-fibra de recogida y de espesor de núcleo de 75 nm en polarización TE por **a)** la hibridación de una disolución 50 nM del oligo MF comparada con otra disolución 50 nM del oligo MR(S) **b)** la hibridación de una disolución 10 nM del oligo MF comparada con otra disolución 10 nM del MR(S)

Una vez inyectadas las concentraciones de 50 nM y 10 nM del oligo MR-S y conseguido regenerar la superficie, se inyectaron 1 nM y 0.1 nM de este mismo oligo. El cambio de fase obtenido para la hibridación de 1 nM es de $\Delta\phi = 0.26 \times 2\pi$ rads (Figura 15 (a)) y equivale a un espesor medio de capa hibridada de 0.19 \AA . Una vez regenerada la superficie, el cambio de fase para la hibridación de 0.1 nM es de $\Delta\phi = 0.20 \times 2\pi$ rads (Figura 15 (b)) o lo que es lo mismo, se obtiene un espesor medio de capa hibridada de 0.14 \AA que equivale a un recubrimiento superficial de $\Gamma = 0.1 \text{ pg/mm}^2$ (1.7×10^7 moléculas del oligo MR-S hibridadas en el área sensora). En esta gráfica se observa un pequeño cambio de índice entre la disolución del oligo y la solución tampón. La concentración de 0.1 nM será considerada como el límite de detección del biosensor en la hibridación del oligonucleótido MR-S.

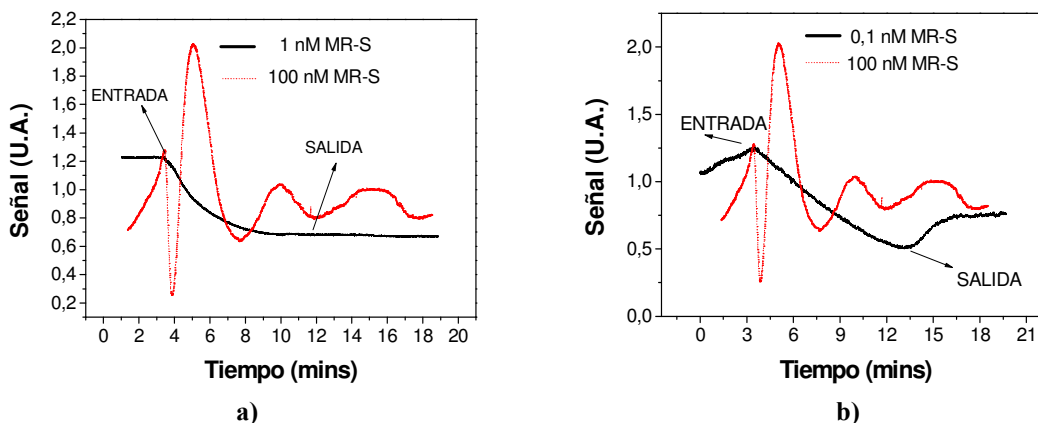


Fig. 15 Cambio de fase experimentado por el biosensor en la configuración objetivo de entrada-fibra de recogida y de espesor de núcleo de 75 nm en polarización TE por **a)** la hibridación de una disolución 1 nM del MR(S) **b)** la hibridación de una disolución 0.1 nM del MR(S). En ambos casos las señales se han comparado con el cambio de fase equivalente a la hibridación de 100 nM del oligo MR(S)

Para cerciorarnos que no había adsorciones inespecíficas en los procesos de hibridación anteriores se emplearon disoluciones del oligo MF, de concentraciones 1 nM y 0.1 nM, una vez regenerada la superficie. El cambio de fase neto para ambas soluciones fue nulo, tal como aparece en las Figuras 16 (a) y (b). También, en ambas gráficas, se observa un cambio de fase en la entrada de la disolución del oligo no complementario en el área sensora, al igual que en su salida, debido a cambios en el índice de refracción entre las disoluciones empleadas.

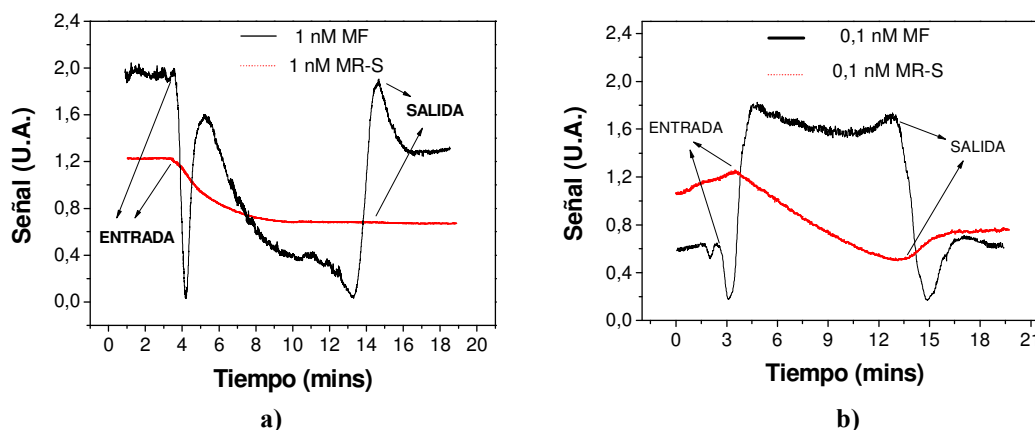


Fig. 16 Cambio de fase experimentado por el biosensor MZI en la configuración objetivo de entrada-fibra de recogida y de espesor de núcleo de 75 nm en polarización TE debido a **a)** la hibridación de una solución 1 nM del oligo MF comparada con otra solución 1 nM del oligo MR(S) **b)** la hibridación de una disolución 0.1 nM del oligo MF comparada con otra disolución 0.1 nM del oligo MR(S)

Una vez cuantificado el desfase para cada concentración del oligo MR-S en solución, se elaboró una curva de calibrado de hibridación (Figura (17)), en la cual se representaba el cambio de fase producido por las distintas concentraciones de oligonucleótido complementario MR-S que habían hibridado con el ya inmovilizado (916delTT) en la superficie del transductor del MZI, en función de la concentración de cada una de ellos. También se hizo lo mismo para las diferentes concentraciones de oligonucleótido no complementario MF que se inyectaron en el sensor.

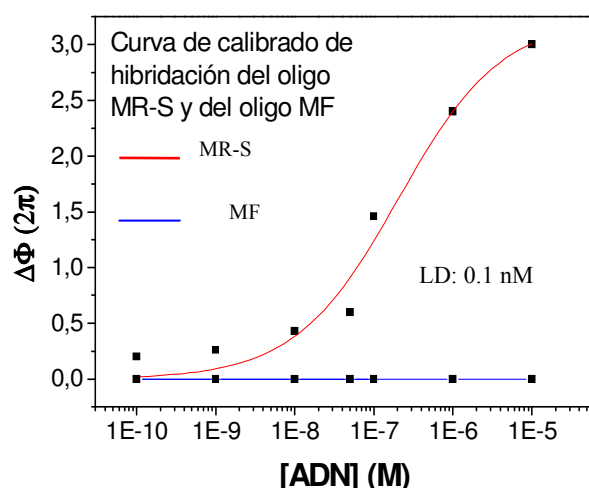


Fig. 17 Curva de calibrado del biosensor MZI en la configuración objetivo de entrada-fibra de recogida y con espesores de núcleo de 75 nm (polarización TE) para la hibridación de distintas concentraciones del oligo complementario MR(S) y no complementario MF

b) Detección de secuencias tipo PCR

En las gráficas del apartado anterior, se puede observar que algunas señales de hibridación para bajas concentraciones de oligo complementario (por ejemplo la correspondiente a la concentración de 50 nM) pueden confundirse con la deriva térmica del sistema y son difíciles de distinguir. Además, el límite de detección en la hibridación del oligo MR-S, que tiene una longitud de secuencia de 13 mers, es de 0.1 nM. Este límite de detección es bajo en comparación con los biosensores ópticos de medida directa de ADN descritos en la literatura (SPR³⁰, MZI³¹ etc.) pero podría mejorarse. Por ello, se inyectaron disoluciones del oligonucleótido MR, que tienen una longitud de secuencia de 58 mers y por tanto tienen un mayor peso molecular, aunque con la misma parte complementaria. De esta forma, para una misma concentración de oligonucleótido complementario, las secuencias largas deben hibridar produciendo un cambio de fase mayor que las cadenas cortas, pues tienen más masa y el cambio de índice efectivo en la guía por la hibridación es mayor. Por otro lado, tal como aparece en la literatura y para una fuerza iónica muy parecida a la de la solución tampón empleada, las cadenas cortas de oligo inmovilizadas y las cadenas largas de oligo que hibridan con éstas, tienen una alta eficiencia de hibridación.

Se inyectaron diferentes concentraciones del oligo complementario MR, en la misma solución tampón que en los casos anteriores. Para la inyección de una disolución 100 nM, se obtuvo la misma respuesta que para concentraciones más elevadas (500 nM y 1 μM), por lo que se dedujo que se había alcanzado el punto de saturación. El cambio de fase experimentado por el biosensor con la hibridación de 100 nM del oligo MR, fue de $\Delta\phi = 2.5 \times 2\pi$ rads, tal como se muestra en la Figura 18 (a). Una vez regenerada la superficie, se inyectó una disolución del oligo control MF, de la misma concentración, obteniendo un cambio de fase neto nulo. También puede observarse un cambio de fase debido al cambio de índice de refracción entre las disoluciones de oligo y tampón

(Figura 18 (a)). A continuación se inyectó 50 nM del oligo MR para luego volver a inyectar la misma concentración (50 nM), sin haber realizado ningún proceso de regeneración. Para la primera inyección de 50 nM del oligo complementario, se obtuvo un cambio de fase igual a $\Delta\phi = 1.3 \times 2\pi$ rads, mientras que para la segunda inyección se obtuvo un cambio de fase de $\Delta\phi = 1 \times 2\pi$ rads (Figura 18 (b)), de tal forma que la suma de los cambios de fase ($\Delta\phi = 2.3 \times 2\pi$ rads) coincidía prácticamente con el cambio de fase propio de la inyección de una disolución del oligo MR 100 nM.

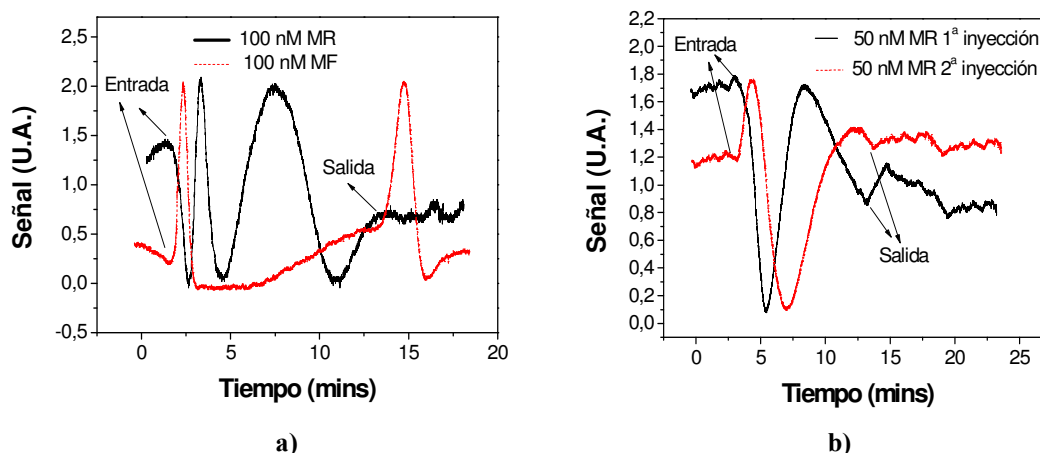


Fig. 18 Cambio de fase experimentado por el biosensor en la configuración objetivo de entrada-fibra de recogida y con espesor de núcleo de 75 nm en polarización TE debido a **a)** la hibridación de una disolución 100 nM del oligo no complementario MF y otra 100 nM del oligo complementario MR **b)** la hibridación de una solución 50 nM del MR seguida de otra hibridación de la misma concentración

Una vez regenerada la superficie después de la doble inyección consecutiva de 50 nM del oligo MR en solución tampón, se hicieron pasar concentraciones muy pequeñas del oligo MR en disolución, con la idea de conocer el límite de detección de hibridación más bajo del biosensor y poder establecer una curva de calibrado de hibridación. Así las concentraciones inyectadas fueron, consecutivamente y sin regeneración después de cada hibridación, las siguientes: 1 pM, 10 pM, 10 pM, 100 pM, 2 nM, 1 nM, 1 nM, 50 nM, 10 nM y 40 nM. Esta forma de proceder permite que al establecer la curva de calibrado, las concentraciones sean aditivas al igual que los cambios de fase.

Para la primera inyección 1 pM de disolución del oligo MR, no se pudo distinguir el cambio de fase en la hibridación, pues se confundía con la señal de deriva. Para la siguiente inyección 10 pM, se obtuvo un cambio de fase $\Delta\phi = 0.08 \times 2\pi$ rads (Figura 19 (a)), que es el límite de detección experimental del biosensor para la hibridación del oligo MR. La siguiente inyección 10 pM produjo un cambio de fase algo menor ($\Delta\phi = 0.05 \times 2\pi$ rads), mientras que la de 100 pM, tal como aparece en la Figura 10 (a), produce un cambio de fase de $\Delta\phi = 0.13 \times 2\pi$ rads. De esta forma, se ha inyectado al biosensor 120 pM del oligo MR en solución tampón, con una respuesta de cambio de fase neta de $\Delta\phi = 0.26 \times 2\pi$ rads. Para la siguiente inyección de 2 nM, se obtiene un cambio de fase de $\Delta\phi = 0.22 \times 2\pi$ rads (Figura 19 (a)) y para la de 1 nM, $\Delta\phi = 0.12 \times 2\pi$ rads (la concentración total inyectada es de 3.12 nM y el cambio de fase neto de $\Delta\phi = 0.6 \times 2\pi$ rads). Otra disolución 1 nM del oligo MR se hizo fluir por el área sensora del biosensor, obteniendo un cambio de fase de $\Delta\phi = 0.12 \times 2\pi$ rads (Figura 19 (a)). A continuación se inyectó 50 nM del oligo MR y el cambio de fase experimentado por el biosensor fue de $\Delta\phi = 0.6 \times 2\pi$ rads (Figura 19 (b)). La siguiente inyección de 10 nM

produjo un cambio de fase de $\Delta\phi = 1.08 \times 2\pi$ rads (Figura 19 (b)), por lo que en cálculo global, se obtiene un desfase neto de $\Delta\phi = 2.22 \times 2\pi$ rads para una concentración total de 64.12 nM. Por último, una inyección de 50 nM sólo produjo un cambio de fase de $\Delta\phi = 0.5 \times 2\pi$ rads, pues se había alcanzado el nivel de saturación (114.120 nM para un cambio de fase neto de $\Delta\phi = 2.72 \times 2\pi$ rads). Este último resultado coincide con el ya comentado anteriormente (Figura 18 (a)), el cual una vez regenerada la superficie con el oligo inmovilizado, la inyección de 100 nM de disolución del oligo MR da lugar a un cambio de fase parecido a este último ($\Delta\phi = 2.5 \times 2\pi$ rads).

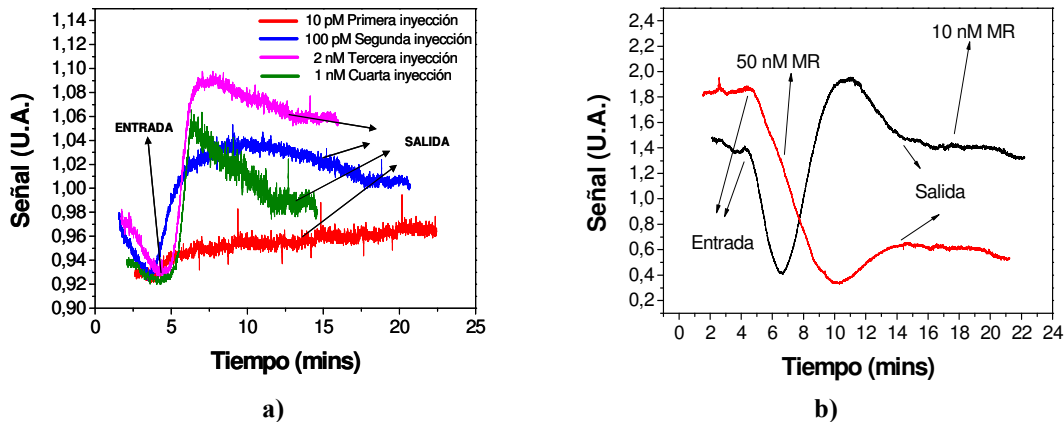


Fig. 19 Cambio de fase experimentado por el biosensor en la configuración objetivo de entrada-fibra de recogida y con espesor de núcleo de 75 nm en polarización TE debido a **a)** la hibridación por inyección consecutiva de soluciones de: 10 pM, 100 pM, 2 nM y 1 nM respectivamente del oligo complementario MR **b)** la hibridación detectada por la siguiente inyección de una solución 50 nM del MR seguida de otra de 10 nM

Se puede establecer una curva de calibrado de hibridación (Figura 20) en la cual se representan los cambios de fase obtenidos para las distintas concentraciones del oligo MR que han hibridado. El límite de detección de hibridación del biosensor en esta configuración y para este tipo de hibridación es de 10 pM y equivale a un recubrimiento superficial de 0.06 pg/mm^2 . También se representa la curva de calibrado para distintas concentraciones de disoluciones del oligo no complementario MF y la ya establecida para el oligo MR-S.

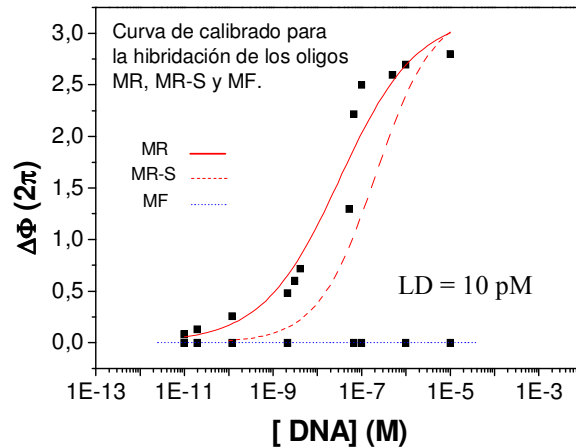


Fig. 20 Curva de calibrado del biosensor en la configuración objetivo de entrada-fibra de recogida y con espesores de guías de 75 nm (polarización TE) para la hibridación de distintas concentraciones del oligonucleótido complementario MR y del oligonucleótido control MF

Las señales de hibridación obtenidas para bajas concentraciones del oligo MR en la configuración objetivo de entrada-fibra de recogida del biosensor son bastante ruidosas y algunas, como en la cuarta inyección correspondiente a 1 nM que aparece en la Figura 19 (a), presentan una decaimiento en el tiempo por deriva bastante acusado. Debido a ello, se lleva a cabo una evaluación con la configuración de doble polarización, en la que una señal de referencia contribuye a proporcionar información adicional para interpretar este tipo de medidas. Es importante resaltar que en todas las señales de hibridación con bajas concentraciones de oligo complementario, se ha llevado al MZI a su punto de cuadratura (con el uso del peltier). Una imagen más nítida de las señales de hibridación de 10 pM (límite de detección experimental) y 100 pM del oligo MR, se presentan en las Figuras 21 (a) y 21 (b).

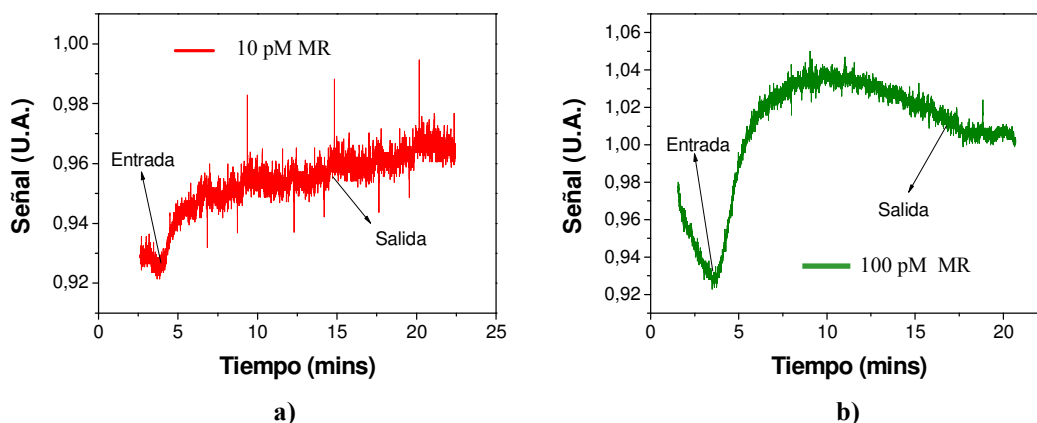


Fig. 21 Cambio de fase experimentado por el biosensor en la configuración objetivo de entrada-fibra de recogida y con espesores de núcleo de guías de 75 nm en polarización TE debido a **a)** la hibridación de 10 pM del oligo MR **b)** la hibridación en la siguiente inyección de 100 pM del mismo oligo

Utilizando la configuración de doble polarización, todas las señales de hibridación muestran dos curvas, una para el cambio de fase por hibridación de una determinada concentración del oligo MR para la polarización TE y otra para la

polarización TM. Los MZIs usados en esta configuración son de espesores de núcleo de 200 nm (Tabla 2), por lo que presentan diferentes sensibilidades en función de la polarización usada (TE o TM). Además, la configuración de doble polarización tiene menor ruido (para la polarización TM) y deriva (tanto para la polarización TE como TM) en comparación con la configuración objetivo de entrada-fibra de recogida, tal como se discutió en el Capítulo 3 (Tabla 7).

Se han inyectado disoluciones del oligo MR, en las concentraciones siguientes y por triplicado: 10 pM, 0.1 nM, 5 nM, 50 nM, 63 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μ M y 10 μ M. En este caso, las concentraciones no eran aditivas y después de cada hibridación, la superficie con el oligo inmovilizado fue regenerada (agua DI y HCl 2.5 mM). El hecho de poder obtener tres medidas de hibridación para cada concentración de oligo complementario, permitió elaborar una curva de calibrado con los promedios de los cambios de fase correspondientes a las tres medidas. Los valores de cambios de fase de cada gráfica citados en el texto son los correspondientes a la polarización TM.

La hibridación de 100 nM del oligo MR (longitud 58 mers) produjo un cambio de fase promedio de $\Delta\phi = 2.5 \times 2\pi$ rads (Figura 22 (a)), lo que coincidía prácticamente con los cambios de fase correspondientes a las concentraciones 500 nM ($\Delta\phi = 2.5 \times 2\pi$ rads), 1 μ M ($\Delta\phi = 2.7 \times 2\pi$ rads) y 10 μ M ($\Delta\phi = 3 \times 2\pi$ rads). Por tanto, esta concentración se puede considerar como la concentración de saturación y equivale a un espesor de capa hibridada de 1.81 \AA . La eficiencia de hibridación a esta concentración de saturación es del 22.9 %. Sin embargo, la eficiencia a esta misma concentración para el caso de hibridación con cadenas cortas del oligo MR-S (longitud 13 mers), es de 12.8 %. Por tanto, la hibridación de las cadenas largas del oligo MR con las cadenas cortas del oligo 916delTT inmovilizadas en la superficie del transductor mejora notablemente la eficiencia. Para esta concentración de hibridación de oligo MR, la regeneración de la superficie con el oligo 916delTT inmovilizado (agua y HCl 2.5 mM) fue completa (Figura 22 (b)) y sin perder eficiencia. El cambio de fase neto fue el mismo que el debido a la hibridación de 100 nM de oligo MR, por lo que el HCl 2.5 mM favoreció la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las moléculas del oligo MR y las cadenas del oligo 916delTT, quedando la capa inmovilizada totalmente activa para volver a hibridar. En esta figura se puede también observar un pequeño cambio de fase debido al pequeño cambio de índice de refracción entre el HCl 2.5 mM y el agua.

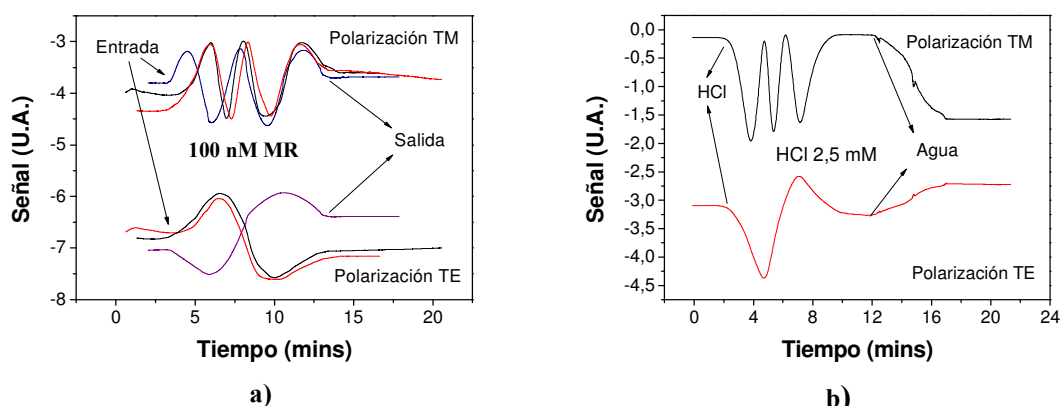


Fig. 22 Cambio de fase experimentado por el biosensor de doble polarización de espesor de núcleo de 200 nm debido a **a)** la hibridación de una disolución 100 nM del oligo MR en las polarizaciones TE y TM, para tres medidas repetidas **b)** regeneración de la superficie con HCl 2.5 mM en las polarizaciones TE y TM después de una de las medidas en (a)

Una vez regenerada la superficie, se inyectaron 63 nM del oligo MR y se repitieron las medidas por triplicado, regenerando la superficie cada vez. El cambio de fase promedio obtenido para las hibridaciones realizadas es de $\Delta\phi = 2.1 \times 2\pi$ rads, tal como se muestra en la Figura 23 (a) y equivale a un espesor promedio de capa hibridada de 1.13 \AA° . La regeneración posterior a cada hibridación fue casi completa, con un desfase neto de $\Delta\phi = 1.8 \times 2\pi$ rads, lo que implicaba que un espesor promedio de capa hibridada de 0.2 \AA° (que equivale a un cambio de fase de $\Delta\phi = 0.3 \times 2\pi$ rads) permanecía unido a la capa con el oligo 916delTT inmovilizada en la superficie del transductor. En la Figura 23 (b) se muestra la respuesta del biosensor MZI a la regeneración, donde se puede observar un pequeño cambio de índice de refracción entre el HCl y el agua.

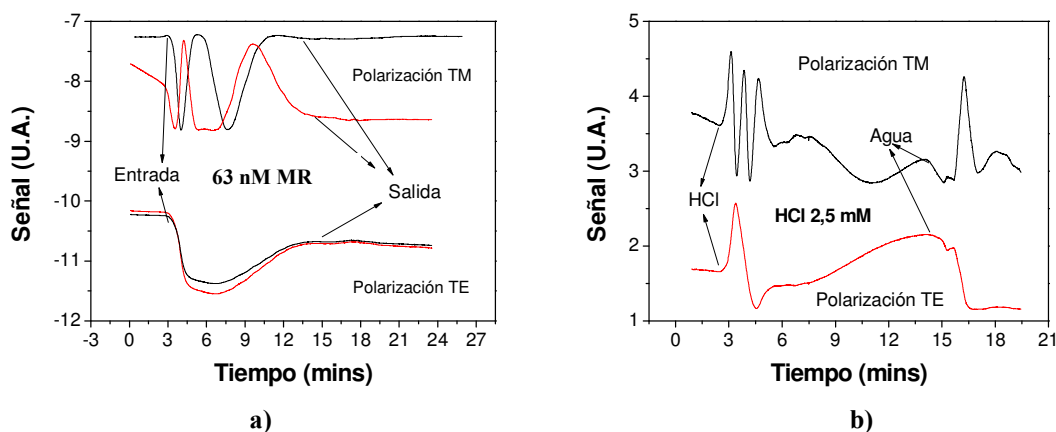


Fig. 23 Cambio de fase experimentado por el biosensor de doble polarización de espesor de núcleo de 200 nm por **a)** la hibridación de una solución 63 nM del oligo MR en las polarizaciones TE y TM, para tres medidas repetidas **b)** regeneración de la superficie con HCl 2.5 mM en las polarizaciones TE y TM después de una de las medidas en a)

Después de regenerar de nuevo la superficie con la capa del oligo 916delTT inmovilizada, se procedió a inyectar las disoluciones de 50 nM del oligo MR. El cambio de fase promedio experimentado por el biosensor, debido a la hibridación de 50 nM, es de $\Delta\phi = 1.2 \times 2\pi$ rads (Figura 24 (a)) y equivale al crecimiento de una capa hibridada de espesor 0.73 \AA° . Las regeneraciones posteriores a cada inyección tuvieron una alta eficiencia (el cambio de fase neto fue de $\Delta\phi \approx 1.2 \times 2\pi$) y prácticamente toda la capa del oligo 916delTT inmovilizada quedaba activa para las próximas hibridaciones (Figura 24 (b)). Se puede observar un cambio de fase pequeño debido a cambios de índice de refracción entre disoluciones.

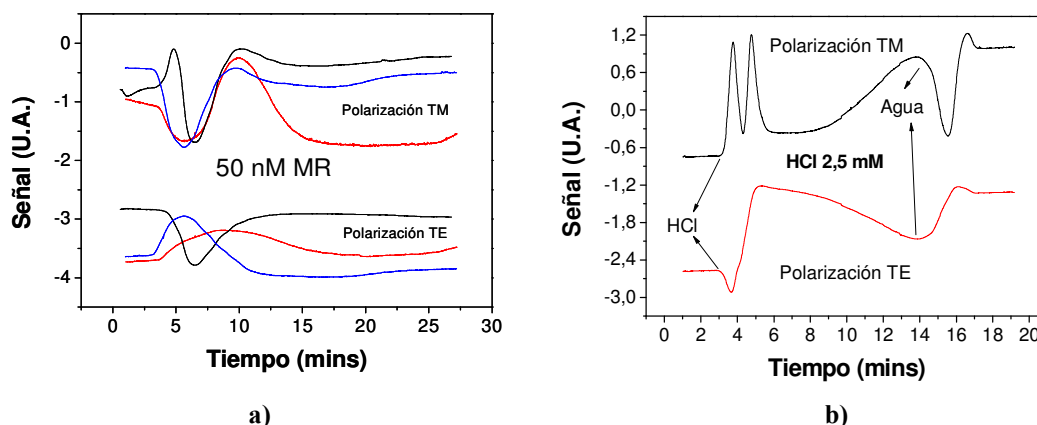


Fig. 24 Cambio de fase experimentado por el biosensor de doble polarización de espesor de núcleo de 200 nm debido a **a)** la hibridación de una solución 50 nM del oligo MR en las polarizaciones TE y TM, para tres medidas repetidas **b)** regeneración de la superficie con HCl 2.5 mM en las polarizaciones TE y TM después de una de las medidas en a)

También se inyectaron disoluciones del oligo MR en concentraciones 5 nM, 0.1 nM y 10 pM respectivamente. Las regeneraciones de la superficie sensora con el oligo 916delTT inmovilizado fueron completas y mostraron también cambio de índices de refracción entre disoluciones. Así, para la hibridación de 5 nM del oligo MR, el cambio de fase promedio experimentado por el biosensor fue de $\Delta\phi = 0.8 \times 2\pi$ rads, tal como se muestra en la Figura 25 (a) y equivale a un espesor promedio de capa hibridada de 0.5 \AA . El cambio de fase debido al proceso de regeneración correspondiente también se observa en la Figura 25 (b).

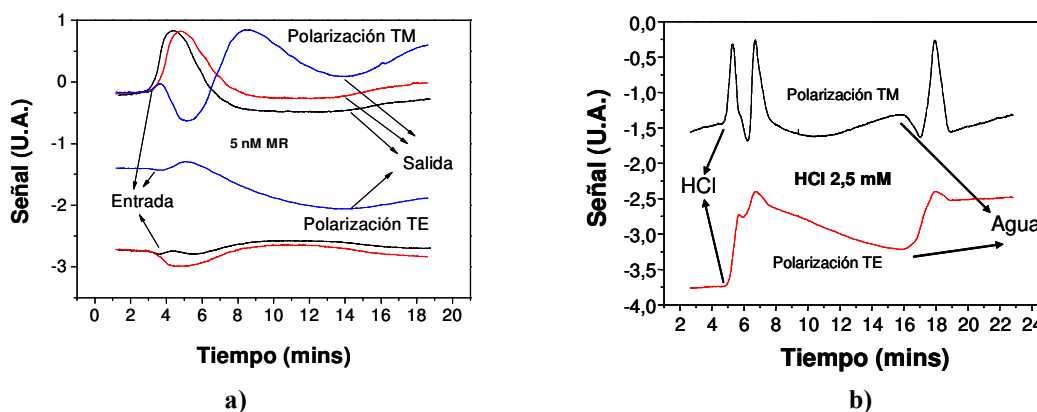


Fig. 25 Cambio de fase experimentado por el biosensor de doble polarización de espesor de núcleo de 200 nm debido a **a)** la hibridación de una solución 5 nM del oligo MR en las polarizaciones TE y TM, para tres medidas repetidas **b)** regeneración de la superficie con HCl 2.5 mM en las polarizaciones TE y TM después de una de las medidas en a)

Para la hibridación de 0.1 nM del oligo MR se obtuvo un cambio de fase de $\Delta\phi = 0.25 \times 2\pi$ rads (Figura 26 (a)), lo que equivale a un espesor promedio de capa hibridada de 0.15 \AA . Una vez regenerada la superficie, se inyectó 10 pM del mismo oligo. Para esta hibridación se obtuvo un cambio de fase de $\Delta\phi = 0.08 \times 2\pi$ rads (Figura 26 (b)), que equivale a un espesor de capa hibridada de 0.05 \AA , o lo que es lo mismo, 1.5×10^6 moléculas del oligo MR hibridadas en el área sensora. Esta concentración de oligo MR detectada es considerada como el límite de detección del biosensor MZI y equivale a un recubrimiento superficial de 0.06 pg/mm^2 .

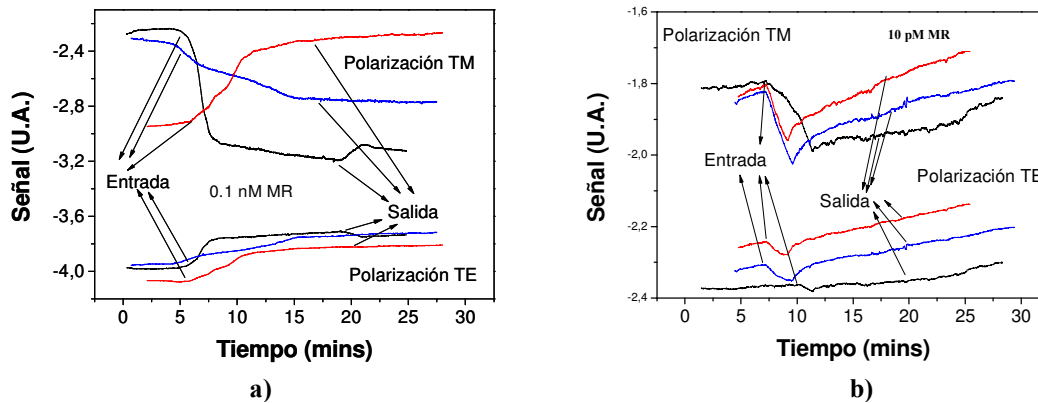


Fig. 26 Cambio de fase experimentado por el biosensor de doble polarización de espesor de núcleo de 200 nm debido a **a)** la hibridación de una disolución 0.1 nM del oligo MR en las polarizaciones TE y TM, para tres medidas repetidas **b)** la hibridación de una disolución 10 pM de oligo MR en las polarizaciones TE y TM, para tres medidas también repetidas

También se inyectaron disoluciones de diferentes concentraciones de oligo no complementario MF en solución tampón. En la Figuras 27 (a) y (b) se muestran los cambios de fase netos nulos al pasar las disoluciones del oligo MF por el área sensora. Pueden observarse pequeños cambios de fase debidos a cambios en el índice de refracción entre la solución tampón y las disoluciones del oligo MF.

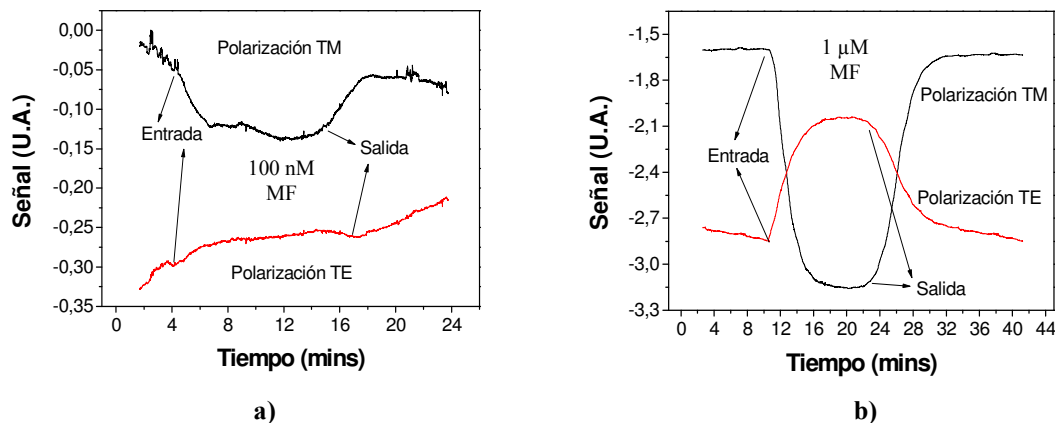


Fig. 27 Cambio de fase experimentado por el biosensor de doble polarización y de espesor de guía de 200 nm al inyectar **a)** una disolución 1 μ M del oligo no complementario MF en las polarizaciones TE y TM **b)** una disolución 100 nM del mismo oligo en las polarizaciones TE y TM

Con los resultados obtenidos se elabora una curva de calibrado (Figura (28)) donde se representa el cambio de fase $\Delta\phi$ experimentado por el biosensor de doble polarización para cada concentración del oligo MR. También se ha establecido una curva de calibrado para las respuestas del biosensor de doble polarización en función de las concentraciones inyectadas del oligo no complementario MF. Como se puede observar, la curva de calibrado de la Figura (28) es prácticamente idéntica a la curva de calibrado de la Figura (20), que fue establecida para el biosensor MZI en la configuración objetivo de entrada – fibra de recogida y con espesores de núcleo de 75 nm.

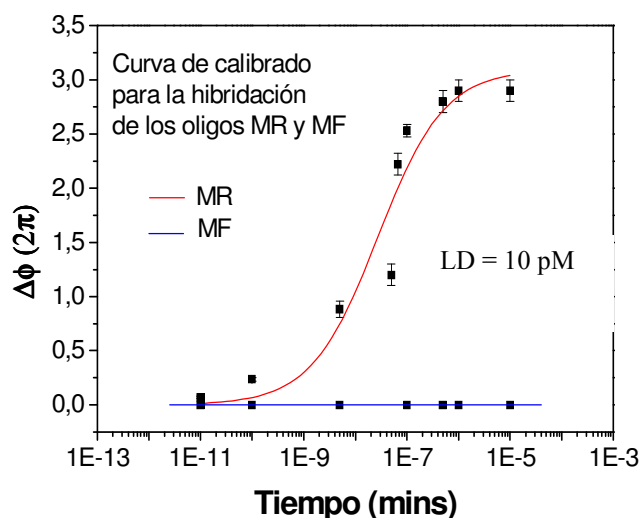


Fig. 28 Curva de calibrado para la polarización TM del biosensor de doble polarización y con espesores de núcleo de 200 nm para la hibridación de distintas concentraciones del oligo complementario MR y del no complementario MF

En esta parte de la memoria se ha obtenido la respuesta del biosensor al hibridar las cadenas del oligo WT-R y las del oligo 916delTT inmovilizadas en la superficie del transductor. De esta forma y comparando los resultados con los obtenidos en la hibridación del oligo MR, se pueden detectar las dos mutaciones internas que aparecen en la secuencia de bases del oligo MR (Tabla 1).

Las respuestas de hibridación del oligo WT-R para las concentraciones de 500 nM, 100 nM y 50 nM, dieron cambios de fase muy parecidos, lo que implicaba que la concentración de saturación era 50 nM, una concentración de oligo la mitad de baja que en las medidas de hibridación con el oligo 3-MR. Tal como se muestra en la Figura 29 (a), para las concentraciones de 500 nM y 100 nM los cambios de fase son ambos de $\Delta\phi = 0.8 \times 2\pi$ rads, mientras que para la concentración de 50 nM el cambio de fase es de $\Delta\phi = 0.75 \times 2\pi$ rads, que equivale a un espesor promedio de capa hibridada de 0.5 \AA . La eficiencia de hibridación en las cadenas del oligo WT-R es del 6.8 % lo que supone una eficiencia mucho más baja que en la hibridación con el oligo MR (22.9%) o con el oligo MR-S (12.8 %). En la Figura 29 (b) se muestra la regeneración de la superficie con el oligo 916delTT inmovilizado, que ha sido realizada después de tener lugar la hibridación de 50 nM del oligo WT-R. Se observa que la regeneración es casi completa y hay un pequeño cambio de fase debido al cambio de índice de refracción entre el HCl 2.5 mM y el agua desionizada.

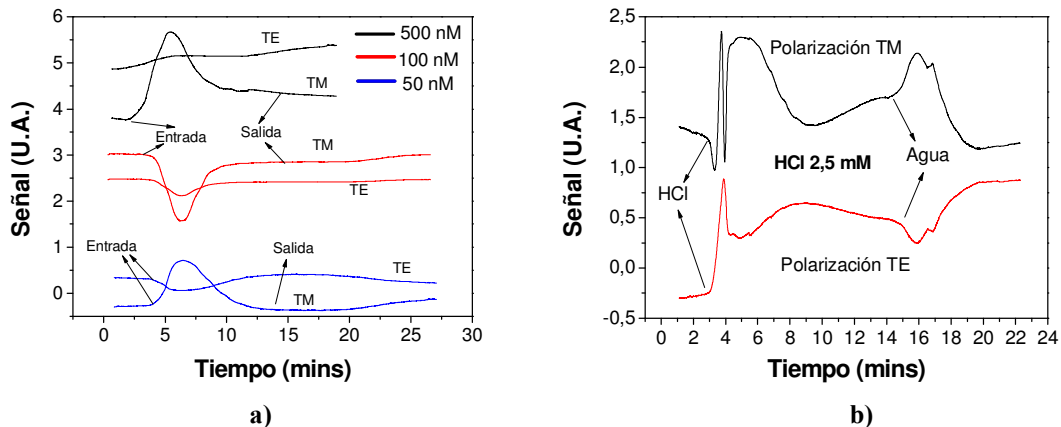


Fig. 29 Cambio de fase experimentado por el biosensor de doble polarización de espesor de núcleo de 200 nm debido a **a)** la hibridación de disoluciones 500 nM, 100 nM y 50 nM del oligo WT-R en las polarizaciones TE y TM **b)** regeneración de la superficie con HCl 2.5 mM en las polarizaciones TE y TM después de la hibridación de 50 nM del oligo WT-R

Las hibridaciones correspondientes a 40 nM y 25 nM del oligo WT-R en disolución, produjeron cambios de fase en el biosensor MZI de $\Delta\phi = 0.5 \times 2\pi$ rads y $\Delta\phi = 0.2 \times 2\pi$ rads, respectivamente (Figura 30 (a)), o lo que es lo mismo, crecimientos de capa hibridada de espesores de 0.7 \AA y 0.3 \AA , respectivamente. La concentración de 25 nM es la concentración más baja detectable y por tanto se la considera como el límite de detección del biosensor de doble polarización en la hibridación de las cadenas del oligo WT-R. Este límite de detección corresponde a un recubrimiento superficial de 0.1 pg/mm^2 o lo que es lo mismo, 3.7×10^6 moléculas del oligo WT-R hibridadas. También se hicieron pasar diferentes concentraciones de disoluciones del oligo no complementario MF, con el objetivo de comprobar que no se producían adsorciones inespecíficas. El cambio de fase neto fue nulo, tal como se puede observar en la Figura 30 (b) para la disolución 100 nM del oligo MF. También se puede observar en la misma Figura 30 (b) un pequeño cambio de fase debido a la diferencia de índices de refracción entre soluciones (la disolución con el oligo WT-R y la solución tampón), para la polarización TM.

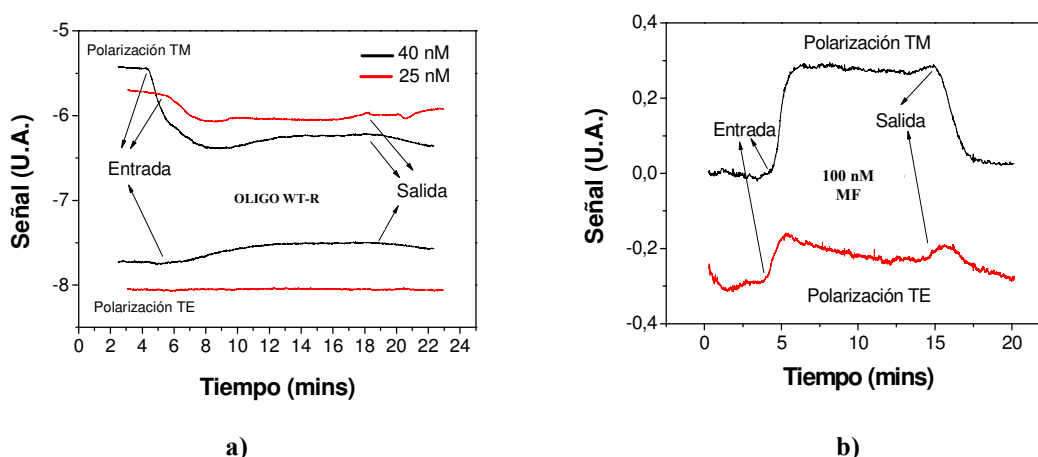


Fig. 30 Cambio de fase experimentado por el biosensor de doble polarización y de espesor de núcleo de 200 nm debido a **a)** la hibridación de disoluciones 40 nM y 25 nM del oligo WT-R en las polarizaciones TE y TM **b)** la inyección de una disolución del oligo no complementario MF 100 nM

Con los resultados obtenidos, se establece la curva de calibrado de hibridación para las diferentes concentraciones de los oligos WT-R y MF en disolución, representándose la variación de fase en función de la concentración de cada uno de ellos. Esta curva de calibrado manifiesta la potencialidad del biosensor en detectar mutaciones y se presenta en la Figura 31, junto con la del MR (Figura 28).

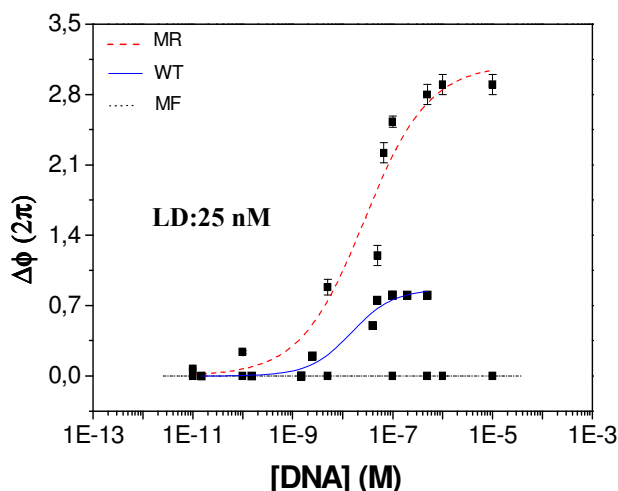


Fig. 31 Curvas de calibrado del biosensor para la hibridación de distintas concentraciones de los oligos complementarios MR, WT-R y del control MF

Tal como se comentó anteriormente, se observa que la eficiencia de hibridación para las cadenas del oligo WT-R es muy baja en comparación con la que se obtiene con las cadenas del oligo MR. Por lo general, la doble hélice es más estable cuando el número total de puentes de hidrógeno crece (hay menos mutaciones en las cadenas)³².

4.1.1.4 Discusión de los resultados

Los resultados obtenidos con el biosensor muestran una respuesta de hibridación clara, distinguible y reproducible y que el protocolo utilizado para la biofuncionalización de la superficie del transductor (Si_3N_4) ha sido correcto para la aplicación que se quería llevar a cabo: alcanzar un límite de detección muy bajo en la reacción de hibridación de los oligos MR y MR-S, que tienen una secuencia complementaria mutada respecto a la del gen BRCA-1. Debido a que el límite de detección alcanzado es de 10 pM, las condiciones de salinidad, pH y temperatura de la solución tampón empleadas y la velocidad y tiempo del flujo de las muestras por la superficie sensora escogidas son idóneas para la detección de la hibridación del oligo MR con la monocapa de oligo 916delTT inmovilizada. Además, los resultados obtenidos por las técnicas de radiomarcaje y fluorescencia también lo ratifican. Sin embargo, estas condiciones no son tan ideales para la detección de la hibridación entre las cadenas del oligo WT-R (oligo correspondiente al fenotipo de pacientes sanos) y las del 916delTT inmovilizadas, que no son totalmente complementarias (límite de detección de 25 nM).

A continuación se describen las posibles orientaciones de los oligos inmovilizados en la superficie sensora y se estudian las interacciones que pueden

participar en los procesos de inmovilización e hibridación detectados. De los resultados obtenidos por radiomarcaje para el recubrimiento máximo de las cadenas del oligo 916delTT (5.9×10^{10} moléculas/cm²), se determina la distancia entre estas cadenas, que es de 300 nm. Debido a las condiciones de alta salinidad y al régimen de baja densidad de moléculas del oligonucleótido 916delTT inmovilizadas, se puede hacer uso del modelo propuesto por Steel y colaboradores³³, que plantea dos posibles geometrías de las moléculas de ADN inmovilizadas, dependiendo de su longitud de secuencia. Si las cadenas de ADN son cortas (con $N < 24$), éstas se orientarán perpendicularmente a la superficie del transductor, con una configuración rígida (Figura 32 (a)). En este caso, un modelo geométrico podría ser el de cilindros de altura la longitud de las cadenas y de base, círculos de radio correspondiente al de la sección transversal de las mismas, que es independiente del número de nucleótidos. Si las cadenas sonda son largas ($N > 48$) (Figura 32 (b)), éstas se comportarán como polímeros enrollados en solución de radio, el radio de giro R_g , que viene determinado por la expresión²⁵:

$$R_g = \sqrt{\frac{0.43N\rho}{3}} \quad (3)$$

donde N es el número de nucleótidos de la cadena y ρ la longitud de persistencia. Esta longitud de persistencia, que se define como la longitud del oligonucleótido inmovilizado a partir de la cual se inclina 1 radián respecto a su eje y que es una medida de la resistencia que ofrece a doblarse, toma el valor de $\rho = 0.75$ nm en nuestro caso (oligonucleótidos de 28 mers en altas condiciones de salinidad).

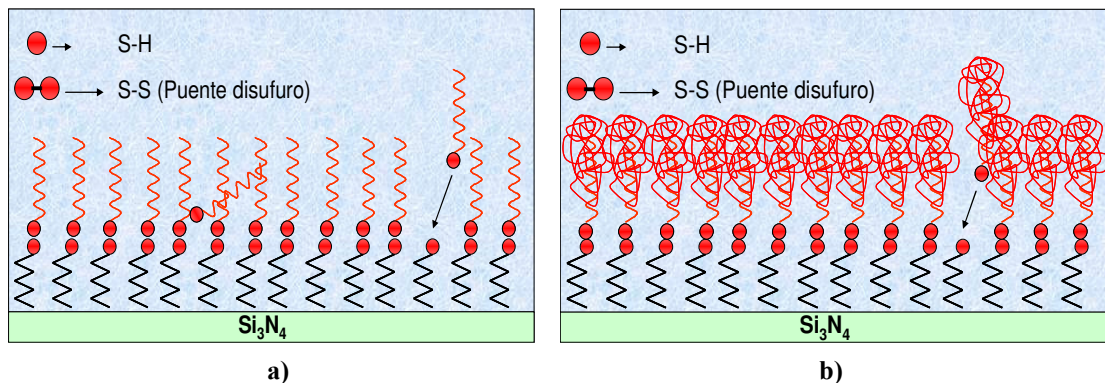


Fig. 32 Configuración de las cadenas de ADN inmovilizadas sobre la superficie de Si₃N₄ **a)** erguidas en posición vertical, que facilitarán la llegada de la cadena complementaria para su hibridación ($N < 24$) **b)** enrolladas en ellas mismas formando un ovillo ($N > 48$)

Ya que estamos en un caso intermedio ($N = 28$), se tendrán en cuenta los dos modelos. Si se considera el primer modelo, las cadenas del oligonucleótido 916delTT inmovilizadas en el nivel de saturación toman la forma de cilindros de altura 10.21 nm, en donde se ha hecho uso de la siguiente ecuación (4):

$$L (28 \text{ mers}) = N \times D_{N-N} + D_{Linker} \quad (4)$$

con N el número de nucleótidos, D_{N-N} la distancia de enlace entre nucleótidos (3.4 \AA) y D_{Linker} la longitud de la cadena de átomos propia del *linker* (en nuestro caso es el grupo funcional S(CH₂)₆) que tiene cada oligonucleótido tiolado que se inmoviliza. La longitud del *linker* puede calcularse como:

$$D_{Linker} = (D_{S-C} \cos(\varphi_{S-C}) + 6xD_{C-C} \cos(\varphi_{C-C})) \quad (5)$$

con $D_{S-C} = 1.541 \text{ \AA}$, la longitud de enlace azufre-carbono y $D_{C-C} = 1.81 \text{ \AA}$, la longitud de enlace carbono-carbono de la cadena. El ángulo φ es el ángulo propio de cada enlace C-S y C-C ($\varphi = 112^\circ$ para ambos³⁴) con respecto al eje de la cadena. Además se ha tenido en cuenta la contribución de la longitud del enlace S-S, propia del puente disulfuro ($D_{S-S} = 2.3 \text{ \AA}$). Debido a que el espesor de capa con el oligo 916delTT-SH inmovilizado es de 9 \AA y la longitud de las cadenas de 10.21 nm , algunas de las 8.9×10^8 cadenas estarán en posición vertical y otras estarán tumbadas, tal como se observa en la Figura 33. El hecho de que la longitud de Debye en la disolución tampón empleada en la inmovilización es de $\lambda^{-1} = 0.43 \text{ nm}$ (que hace que las fuerzas electrostáticas sean muy pequeñas, pues decaen con la exponencial del cociente entre la distancia y la longitud de Debye) y que las fuerzas de hidratación decaen con una longitud característica de 0.3 nm (siendo necesario una distancia interaxial por debajo de 3 nm para que estas fuerzas dominen la interacción), sólo aquellas cadenas que estén a esa distancia o menor sufrirán una leve repulsión por la interacción electrostática entre ellas.

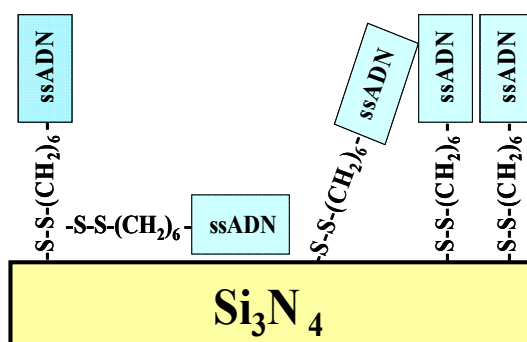


Fig.33 Disposición geométrica de las cadenas de ADN 916delTT sobre la superficie del transductor

Si se considera el segundo modelo, el radio hidrodinámico de giro es de $R_g = 3.01 \text{ nm}$, por lo que las cadenas del oligonucleótido 916delTT tendrán una altura de 8.53 nm , en donde se ha tenido en cuenta el diámetro del “ovillo” en disolución, el grupo tiol (linker) y el enlace S-S. De nuevo nos encontraremos en el caso anterior (Figura 33), en que algunas de las cadenas del oligonucleótido 916-TT-SH inmovilizadas están erguidas y otras tumbadas.

En determinadas situaciones, como al inmovilizar ADN tiolado en placas de oro, propio de técnicas como la del SPR (en que hay una interacción entre los nucleótidos de las cadenas del oligo inmovilizado y los átomos de oro, dificultando así seriamente el acceso de las cadenas de ADN complementarias para hibridar), se inmovilizan espaciadores como el MCH³⁵. Estos espaciadores mejoran la longitud de las cadenas tumbadas sobre la superficie de Au y minimizan la adsorción no específica de las cadenas de ADN sencillas. Una vez erguidas, la distancia entre cadenas de ADN vecinas es del orden de 6 nm (para las mismas condiciones de salinidad y pH que se han empleado en esta tesis), por lo que no hay interacción alguna entre cadenas vecinas y la eficiencia de hibridación crece, ya que hay mejor acceso de las cadenas de ADN complementarias a hibridar. En el MZI, no será necesario, pues no habrá interacción entre la baja densidad de cadenas de oligo inmovilizadas y la monocapa de silano³⁶, que es hidrofóbica.

Al producirse la hibridación, la doble cadena de ADN adopta una configuración estructural de cilindro rígido, con una longitud de persistencia de 50-80 nm. Por otro lado, la formación de la doble hélice produce un aumento de las cargas negativas, que se ve compensado por el aumento de la concentración salina de la solución tampón, que disminuye la longitud de Debye hasta 0.3 nm. La doble hélice tiene un diámetro de 3 nm debido a efectos electrostáticos (capa de 0.5 nm de cationes alrededor de su hélice). Por tanto la distancia entre bordes de cilindros vecinos (140 nm) es también muy grande frente a la longitud característica de las fuerzas de hidratación electrostáticas.

La eficiencia de hibridación obtenida con el oligo MR-S (13 mers) es 1.78 más baja que con el MR (58 mers) en la concentración de saturación. Esto es debido al mayor peso molecular de las cadenas del oligo MR, que producen un mayor cambio en el índice de refracción efectivo del modo guiado al hibridar. Sin embargo, la eficiencia de hibridación de las cadenas del oligo WT-R es 3.4 y 1.9 veces menor que las obtenidas con las del oligo MR y MR-S respectivamente, lo que explica que para condiciones óptimas de hibridación entre moléculas complementarias, las dobles hélices con secuencias mutadas sean menos estables que las que tienen secuencias complementarias completas.

El límite de detección alcanzado con el biosensor para la hibridación del oligo complementario MR (cuya secuencia complementaria posee un deleción de dos bases adenina respecto a la del gen BRCA-1 y que corresponde a la de las pacientes que al alcanzar la edad de 70 años tienen un riesgo del 80 % de padecer cáncer de mama) es de 10 pM. Este límite de detección en la hibridación del ADN complementario es el más bajo obtenido en los biosensores de medida directa y sin necesidad de marcador. Incluso podría mejorarse en condiciones óptimas de solución tampón (menor salinidad, diferente pH o temperatura, etc.). En la literatura aparecen muy pocos biosensores de medida directa de hibridación con gran sensibilidad, la mayoría realizan medidas no reproducibles. Así, los biosensores nanomecánicos alcanzan límites de detección de hibridación de 75 nM (es el array de micropalanca diseñado por IBM en el 2005³⁷, pero desde esa fecha no ha habido más publicaciones con este tipo de biosensores que hayan alcanzado ese límite de detección). Sólo el biosensor SPR presenta en la literatura numerosas publicaciones de medidas directas de hibridación de ADN³⁸, reproducibles y sin necesidad de marcador, con límites de detección del orden del nM de ADN complementario en solución. Aún así este límite de detección está lejos del límite de detección de 10 pM obtenido con el biosensor MZI, un límite de detección que comienza a acercarse al que alcanzan los métodos tradicionales indirectos de fluorescencia y radiomarcaje, o los electroquímicos³⁹. Estos métodos son muy sensibles, pero necesitan de marcadores para poder detectar las reacciones y sus sistemas de detección son poco compactos, complejos y caros. Por el contrario, el biosensor MZI es un dispositivo integrado de análisis directo que presenta las ventajas de portabilidad y fácil manejo. Su compatibilidad con la tecnología microelectrónica del silicio permite una mayor integración y miniaturización (redes de difracción o fibras ópticas para la inserción de luz y fotodetectores para la recogida de la señal integrados en una misma plataforma CMOS). En la actualidad la fluidica del sistema ya está incorporada mediante una novedosa técnica de fabricación de microcanales, con el polímero SU-8 como material estructural. Por tanto, se puede decir que el biosensor MZI desarrollado en esta Tesis puede funcionar como biosensor integrado de ADN altamente sensible, de

análisis directo y sin necesidad de marcador, que más cercano está, de entre todos los biosensores descritos hasta el momento en la literatura, de alcanzar su máxima integración y portabilidad y convertirse en el comúnmente llamado laboratorio en un chip o “lab-on-a-chip”.

4.1.2 Aplicaciones en Proteómica: Detección de pesticidas mediante inmunoensayos

La segunda aplicación biosensora del MZI que se ha desarrollado es la de un inmunosensor que permita detectar bajas concentraciones de un pesticida de la familia de los carbonatos.

El pesticida carbaril⁴⁰ es un éster de ácido carbámico con estructura de anillo fenilo (Figura 34) que pertenece a la clase de los metilcarbamatos y en el organismo humano produce la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa encargada de la degradación del neurotransmisor acetilcolina, responsable de activar las células nerviosas. Al inhibir la actuación de la enzima mantiene la actividad nerviosa, llegando a producir desde calambres, temblores, náuseas y dolores de cabeza a dosis bajas, hasta contracciones musculares involuntarias, parálisis y muerte por fallo respiratorio, a dosis más altas.

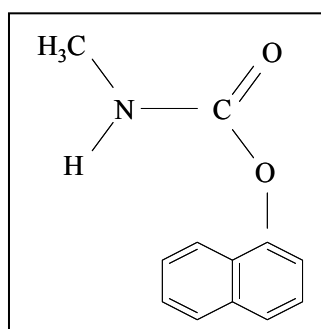


Fig. 34 Fórmula química estructural del pesticida carbaril. Su nombre en la normativa IUPAC es el 1-naphthyl methylcarbamate y comúnmente se le llama CH.

El pesticida carbaril se ha utilizado en horticultura como insecticida de amplio espectro, para controlar las plagas de insectos en las plantaciones de frutas, algodón, maíz, etc. El carbaril afecta a la densidad larvaria y al ambiente de depredación de las comunidades que viven cerca de zonas agrícolas o forestales, donde están expuestas a aplicaciones directas del pesticida. La población en general está expuesta al contacto con carbaril después de aplicaciones masivas con aerosoles en zonas cercanas a cultivos agrícolas y se ha llegado a detectar bajas concentraciones en aguas superficiales y alimentos. La sustancia se puede absorber por inhalación del aerosol, a través de la piel y por ingestión⁴¹.

4.1.2.1 Protocolo de inmovilización y detección por inmunoensayo competitivo

El pesticida carbaril es un compuesto de alta toxicidad y tiene un tamaño muy pequeño (201.2 Da). Debido a este bajo peso molecular y a que no tiene grupos reactivos para poder ser inmovilizado sobre la superficie funcionalizada del transductor, su detección directa con el biosensor desarrollado en esta Tesis es complicada. Por ello

es necesario hacer uso de otras técnicas de análisis^{42, 43}, como el inmunoensayo de inhibición, que será el que se use en esta Tesis.

Los inmunoensayos⁴⁴ son técnicas analíticas que utilizan anticuerpos como detectores bioquímicos de la presencia de un analito en una muestra. Se basan en el reconocimiento de un antígeno (Ag) por un anticuerpo (Ab). Los anticuerpos son glicoproteínas de la clase de las inmunoglobulinas (Ig)⁴⁵, producidas por el sistema inmune de los vertebrados frente a agentes patógenos o extraños (xenobióticos). La estructura básica de un anticuerpo se muestra en la Figura 35. Están formadas por dos cadenas idénticas pesadas y ligeras que se unen entre sí por medio de puentes disulfuro. Las cadenas pesadas y ligeras se organizan en una parte variable y una parte invariable. Aunque la región invariable del anticuerpo supone el 90 % del peso del anticuerpo, el sitio de unión del antígeno está formado por la asociación de cadenas pesadas y ligeras de la zona variable situadas en la zona amino temporal. La interacción se produce debido a la distribución espacial complementaria entre el antígeno y el anticuerpo.

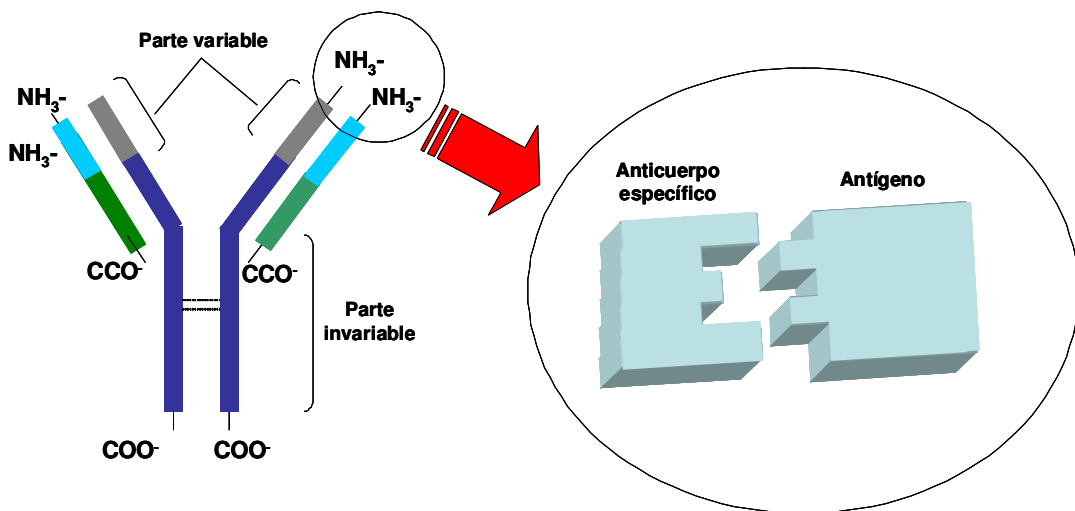


Fig. 35 Esquema de las partes de un anticuerpo y detalle de la zona de unión con el antígeno según el modelo V-Y

La afinidad del anticuerpo por el antígeno viene determinada por la combinación de fuerzas físicas, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, mientras que la especificidad del anticuerpo depende de su afinidad relativa por el antígeno y del número de interacciones químicas que se produzcan entre el antígeno y los sitios de unión del anticuerpo. La naturaleza del proceso de unión antígeno-anticuerpo es la que va a determinar la selectividad y sensibilidad del inmunoensayo.

Uno de los criterios para clasificar los inmunoensayos es la detección del grado de ocupación de los sitios de unión. Atendiendo a esta ocupación los inmunoensayos pueden ser competitivos o no competitivos⁴⁶.

Los inmunoensayos no competitivos son aquellos que utilizan concentraciones de anticuerpo en exceso para medir el grado de ocupación de los sitios de unión. Se inmovilizan anticuerpos no marcados y se añade el analito que se une al anticuerpo.

Para determinar los analitos que han interactuado se introduce el anticuerpo marcado que se une al analito y da lugar a una interacción tipo sandwich. Al añadir el sustrato se obtiene una señal que es proporcional a la concentración del analito.

Los inmunoensayos competitivos son aquellos que determinan los sitios de unión libres utilizando una concentración limitante de antígeno o de anticuerpo. En este formato pueden inmovilizarse sobre el soporte sólido anticuerpos o antígenos. Los ensayos que inmovilizan los anticuerpos se consideran directos ya que los analitos de la muestra y los antígenos marcados compiten por los sitios de unión del anticuerpo. Después de retirar los analitos y antígenos marcados que no han interactuado, se determinan los antígenos marcados unidos mediante la adición del sustrato enzimático adecuado. La señal obtenida es inversamente proporcional a la concentración del analito. Por el contrario, en el formato competitivo indirecto se inmovilizan los antígenos sobre el soporte sólido y el analito que se pretende determinar se añade junto con el anticuerpo. En este caso los antígenos inmovilizados compiten con los analitos de la muestra por los anticuerpos y los que se unen a los antígenos del soporte se determinan mediante la adición de anticuerpos marcados capaces de reconocer el anticuerpo que ha interactuado. La señal obtenida también es inversamente proporcional a la concentración de analito añadido.

Un tipo de inmunoensayo no competitivo indirecto es el inmunoensayo por inhibición⁴⁷, en que el análogo del analito se inmoviliza en la superficie sensora y la biomolécula que se detecta es aquella que ha quedado libre después de competir con el analito en solución. En los ensayos de inhibición, la concentración del anticuerpo en la mezcla con el analito permanece siempre fija, mientras que la del analito cambia para hacer posible la detección de una cantidad distinta de anticuerpo libre. En nuestro caso, la presencia del carbaril en la mezcla va a inhibir la unión del anticuerpo al conjugado, por lo que a medida que aumenta la concentración de analito disminuye el número de anticuerpos libres y reduce la respuesta del sensor.

El pesticida carbaril es una sustancia tóxica que puede acumularse en el organismo sin provocar una reacción antigénica debido a su pequeño tamaño. Dado que los organismos vivos no son capaces de reaccionar frente al pesticida y fabricar los anticuerpos adecuados para combatirlos, es necesario buscar otra estrategia que permita obtener los anticuerpos específicos. La técnica general empleada para su obtención es la síntesis de un compuesto similar al que se pretende detectar, es decir, que mantenga la misma estructura (que se denomina hapteno), capaz de unirse a una proteína de mayor tamaño para generar la respuesta antigénica. Al inyectar el complejo proteína-hapteno en un organismo vivo (por ejemplo ratón), éste sí será capaz de detectarlo y de generar una respuesta inmune, fabricando los anticuerpos específicos necesarios.

Los anticuerpos que se obtienen pueden ser policlonales o monoclonales. Los policlonales contienen una mezcla de diferentes poblaciones de anticuerpos producidos por los linfocitos B, cada uno con diferente afinidad y capacidad de reconocimiento del analito. El inconveniente de este tipo de anticuerpos es que el antisero policlonal puede variar de un animal a otro. Para superar este problema se desarrolló la técnica del hibridoma⁴⁸, que genera anticuerpos monoclonales homogéneos. En este caso los anticuerpos producidos por los linfocitos B se fusionan con las células de mieloma, dando lugar a las células de hibridoma. Todos los anticuerpos que procedan de la misma línea celular de hibridoma van a mantener constantes sus características de afinidad y su

producción podría asegurarse de forma ilimitada. El único inconveniente es que la producción de anticuerpos monoclonales es dificultosa y requiere períodos más largos de tiempo, aunque los anticuerpos obtenidos suelen ser más específicos. Una tercera forma de producir anticuerpos es mediante técnicas de genética molecular, que permiten obtener fragmentos de anticuerpo a partir de los sistemas huésped simples como levaduras, plantas, células de insectos o bacterias⁴⁹. Los fragmentos de anticuerpos recombinantes pueden llegar a ser más específicos, pero pierden estabilidad en disolventes orgánicos.

La Figura 36 muestra un esquema del proceso de obtención de los anticuerpos monoclonales a partir del pesticida carbaril (CH). El hapteno sintetizado (CNH, llamado (6-[(1-naftiloxi) carbonil-amino]) se une a la proteína BSA (albúmina de suero bobino, con un peso molecular de 67 kDa), formando el complejo BSA-CNH. El anticuerpo monoclonal del pesticida que se obtiene, a partir de la misma línea celular de hibridoma y con el que se ha trabajado es el LIB-CNH45.

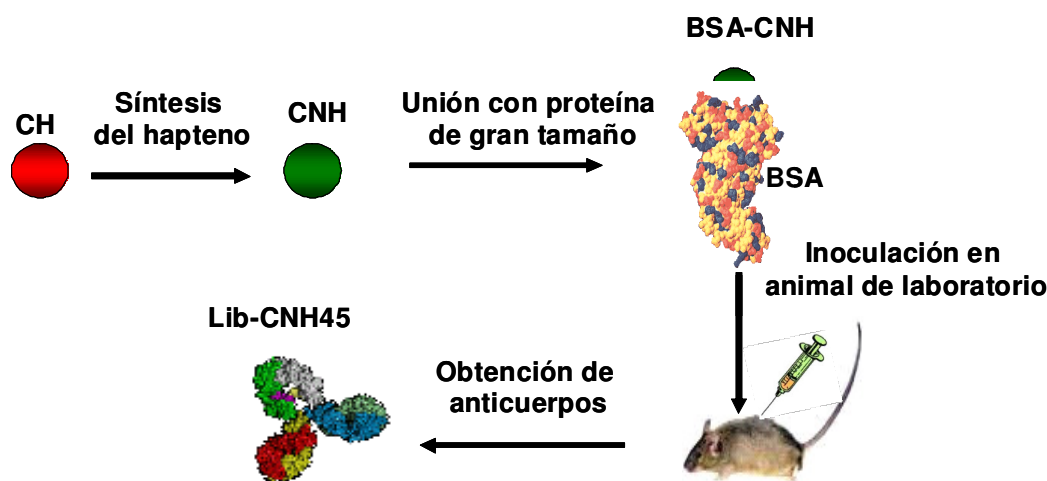


Fig. 36 Esquema de la cadena de obtención de anticuerpos específicos al pesticida CH

La síntesis de los haptenos, la obtención de los anticuerpos monoclonales, así como la purificación de los mismos fueron realizados en el Centro de Investigación e Innovación en Bioingeniería de la Universidad Politécnica de Valencia. La posterior comprobación de la inmunorreacción entre el pesticida y el anticuerpo obtenido se realizó en este mismo laboratorio mediante un ensayo inmuno-enzimático (ELISA)⁴³.

La detección del Carbaril con el MZI se ha llevado a cabo gracias a los conocimientos previos del grupo de Biosensores (CNM-CSIC), donde se ha realizado esta Tesis, en la preparación y detección de éste y otros pesticidas (DDT y Clorpirifos)^{50, 51} mediante la técnica del sensor de resonancia de plasmón superficial (SPR). El estudio se comenzó con un protocolo completamente comprobado y optimizado, con las concentraciones de antígeno y anticuerpo adecuadas para conseguir un inmunoensayo de inhibición eficiente. La velocidad de inyección de las muestras fue de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, la óptima para los tiempos en que se produce la inmunorreacción. La disolución tampón de PBST (PBS: 10 mM de disolución fosfato salina, pH=7,35, con

0.05 % del detergente Tween 20) se realizó con: cloruro potásico, cloruro sódico, fosfato hidrógeno de sodio y fosfato dihidrógeno de potasio (Panreac, Barcelona, España), además del detergente Tween 20 (Quantum Appligene, Heidelberg, Alemania) y se diluyó hasta conseguir la dilución 0.5x.

La inmovilización covalente complejo BSA-hapteno se ha realizado a través de la química de las monocapas auto-ensambladas (SAMs), mediante la formación de capas sucesivas hasta conseguir el grupo reactivo adecuado para inmovilizar la proteína a través de sus grupos amino. Primeramente, para la funcionalización de la superficie del transductor, se empleó el mismo protocolo de silanización que en el desarrollo del biosensor de ADN (ver *Apartado 1.1.1.2*), de tal forma que ésta quedaba funcionalizada por un grupo tiol (Figura 37 (a)). A continuación se inyectaron por la superficie del sensor 300 μ l de una disolución en agua de dos compuestos muy reactivos: el EDC (N-etil-N-dimetil-amino-propil carbodiimida 0.2 M) y el NHS (N-hidroxisucínimida, 0.05 M) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). A través del compuesto se forma un complejo intermedio (éster N-hidroxisucínimida) que permite el enlace covalente de las biomoléculas receptoras a través de sus grupos amino ($-\text{NH}_2$) (Figura 37 (b)). Ya funcionalizada la superficie, se introduce 10 $\mu\text{g/ml}$ de receptor (10 $\mu\text{g/ml}$ de proteína BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) con 10 $\mu\text{g/ml}$ de pesticida CNH) en la solución tampón salina PBST, una vez que el sistema se ha estabilizado en este mismo tampón. Esta capa biológica formada (Figura 37 (c)) deberá mantenerse estable y conservarse activa con el tiempo para que se produzcan inmunoreacciones y regeneraciones sucesivas. Para rellenar los huecos que han quedado sin proteína y así evitar adsorciones inespecíficas de los anticuerpos que en solución se pasarán a continuación, se bloquea la superficie con etanolamina ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$) 1 M, con $\text{pH}=8.5$ (Acros Organics, Geel, Bélgica). Este compuesto orgánico bloquea la superficie modificada y elimina los conjugados formados que no tengan un enlace fuerte. Así, la respuesta del MZI al inyectar el anticuerpo será únicamente debida a la inmunorreacción con el CNH. En esta etapa del ensayo, la solución tampón continua que circula es agua D.I. La configuración de capas biológicas hasta este último paso del bloqueo con etanolamina se muestra en la Figura 37 (d).

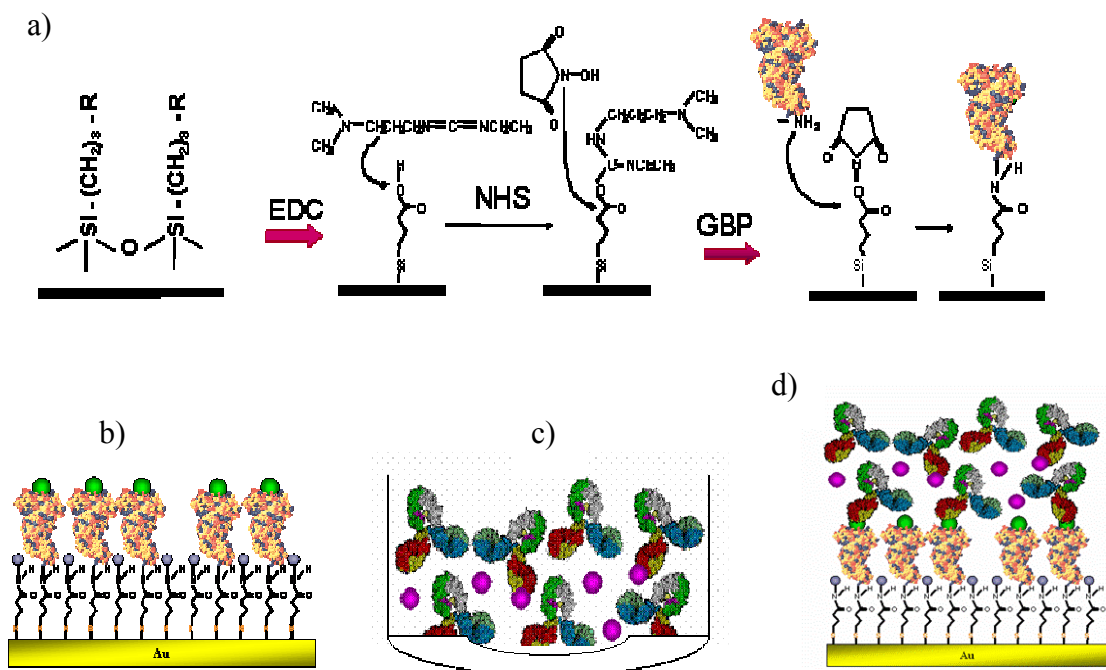


Fig. 37 Protocolo de inmovilización covalente basado en monocapas tioladas y detección del pesticida. a) Superficie funcionalizada del transductor con un grupo tiol, mediante la silanización y activación de la monocapa con el compuesto EDC-NHS b) Inmovilización covalente del complejo BSA-hapteno. c) Incubación de la disolución con anticuerpo y pesticida d) Detección del pesticida carbaril mediante un inmunoensayo de inhibición

Ya inmovilizado el antígeno con su conjugado asociado en la superficie del transductor, se detectaron distintas concentraciones de pesticida en disolución, mediante un inmunoensayo de inhibición (Figura 37 (d)). Para ello se inyectaron disoluciones de 300 μl con la misma concentración de anticuerpo (10 $\mu\text{g/ml}$ LIB-CN45) en la misma solución tampón salina PBST (PH=7, temperatura ambiente y al flujo constante de 15 $\mu\text{l/min}$) pero con distinta concentración de pesticida, una vez que el sistema se había estabilizado en este mismo tampón. Las concentraciones de pesticida fueron 0.002 $\mu\text{g/l}$, 0.02 $\mu\text{g/l}$, 0.1 $\mu\text{g/l}$, 2 $\mu\text{g/l}$, 20 $\mu\text{g/l}$ y 200 $\mu\text{g/l}$ y se obtuvieron por dilución de la más concentrada en agua. La mezcla analito-anticuerpo se sometió a un periodo previo de incubación antes de la inyección, para asegurar que la unión a la molécula inmovilizada se debe sólo al anticuerpo libre y no a aquél que no ha tenido tiempo de interactuar. Antes de cada inyección, el sistema se dejó estabilizar en la misma solución tampón que en la que iba el disuelto el anticuerpo.

El modo más efectivo de disociar el complejo antígeno-anticuerpo y regenerar la superficie con los biorreceptores inmovilizados es aumentando o reduciendo el pH del medio. En el caso del carbaril, debido a que no tolera bien los ambientes alcalinos, después de cada inmunoreacción se hizo pasar por el área sensora de los MZIs 300 μl de HCl 0.1 M en agua destilada, a temperatura ambiente y al flujo constante de 20 $\mu\text{l/min}$. En este caso, la solución tampón que circulaba de forma continua por el sensor era agua D.I.

Para comprobar que no había adsorciones inespecíficas en la superficie del sensor, se hicieron pasar disoluciones de anticuerpos no específicos 1 µg/ml en la solución tampón salina PBST con PH=7, a T ambiente y al flujo constante de 15 µl/min.

A la hora de calcular los espesores promedio d_l de las capas biológicas inmovilizadas se hizo uso del método del índice efectivo, suponiendo un índice de refracción de las proteínas de $n_p=1.45$. Para el cálculo del recubrimiento superficial Γ de la monocapa de anticuerpo se empleó la misma ecuación que en el cálculo del espesor promedio de la monocapa de antígeno inmovilizada⁵², que es la siguiente:

$$\Gamma = 0.6d_l \text{ (ng/mm}^2\text{)} \quad (5)$$

Γ es el recubrimiento superficial de las moléculas de anticuerpo que han reaccionado con la monocapa inmovilizada y d_l el espesor de monocapa de anticuerpo que ha reaccionado con la monocapa de antígeno inmovilizada sobre la superficie del transductor.

4.1.2.2 Configuración del MZI

El montaje experimental empleado para la detección del pesticida carbaril mediante el inmunoensayo de inhibición ya descrito, ha sido el de la configuración objetivo de entrada-fibra de recogida y con MZIs de espesores de núcleo de 200 nm, en polarización TM. El sistema de fluidica ha sido el mismo que el utilizado para el desarrollo del MZI como biosensor de ADN (Figura 6).

4.1.2.3 Resultados con el MZI

Tal como aparece en la Fig. 38 (a), la respuesta del MZI ante la inyección del EDC/NHS, produce una respuesta con un cambio de índice muy elevado respecto al agua desionizada que estaba circulando. El cambio de fase neto también es muy elevado. De esta forma, la superficie del transductor funcionalizada con el grupo tiol queda así activada para la posterior inmovilización de los biorreceptores.

En la Figura 38 (b) se observa la inmovilización covalente del complejo BSA-hapteno. El cambio total de fase es de $10 \times 2\pi$, que corresponde a una adsorción sobre la superficie de una capa homogénea de receptores biológicos de 3.2 nm (recubrimiento superficial de $1.9 \text{ ng}\cdot\text{mm}^{-2}$). Se observa también un cambio de índice con la solución tampón que estaba circulando.

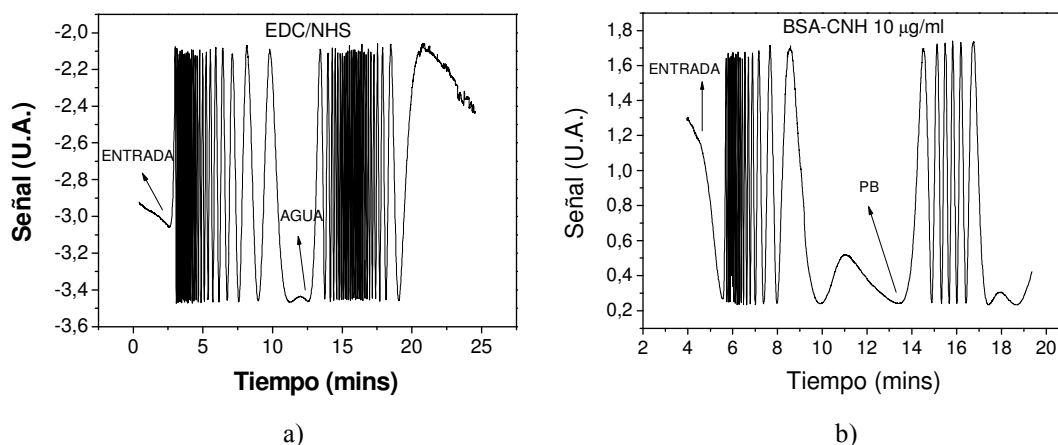


Fig. 38 Respuesta del MZI en la **a)** activación del tiol en la capa silanizada **b)** inmovilización covalente del pesticida carbaril

Ya inmovilizada la proteína BSA con su hapteno asociado, se procedió a bloquear la superficie con etanolamina. En la Figura 39 se muestra la respuesta del MZI al pasar la disolución de etanolamina por su área sensora, con un cambio de fase neto muy elevado. También se observa el gran cambio de índice que tiene esta disolución con el agua que estaba circulando.

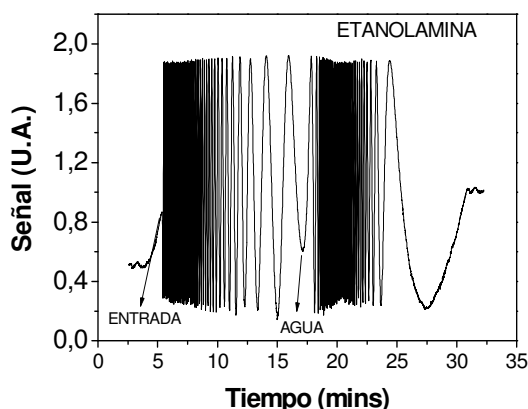


Fig. 39 Respuesta del MZI al hacer pasar la disolución de etanolamina para bloquear los huecos sin proteína que han quedado libres en la inmovilización del BSA

Bloqueada la superficie con etanolamina, se procedió a inyectar disoluciones de anticuerpo con distintas concentraciones de pesticida, para llevar a cabo un inmunoensayo competitivo y elaborar una curva del calibrado del sensor. La respuesta neta del MZI al reaccionar la disolución de LIB-CNH45 200 µg/l (con una concentración de pesticida de 200 µg/l) con la monocapa de antígeno inmovilizada fue de $\Delta\phi = 0.1 \times 2\pi$. La misma respuesta neta se obtuvo para la disolución con 20 µg/l, por lo que muy poco anticuerpo quedaba libre para reaccionar con el antígeno inmovilizado. En el caso de pasar 300 µl de disolución de LIB-CNH45 2 µg/l por el área sensora del biosensor, el cambio de fase neto fue de $\Delta\phi = 1 \times 2\pi$, que equivale a un espesor de capa de anticuerpo de 0.15 nm y a un recubrimiento superficial de $\Gamma = 0.09 \text{ ng/mm}^2$. Para la concentración de 0.1 µg/l de pesticida, el cambio de fase fue de $\Delta\phi = 3.75 \times 2\pi$ tal como aparece en la Figura 40. Sin embargo el cambio de fase neto fue de $\Delta\phi = 1.75 \times 2\pi$, que

equivale a un espesor de $d_f = 0.26 \text{ nm}$ y a un recubrimiento superficial de $\Gamma = 0.16 \text{ ng/mm}^2$

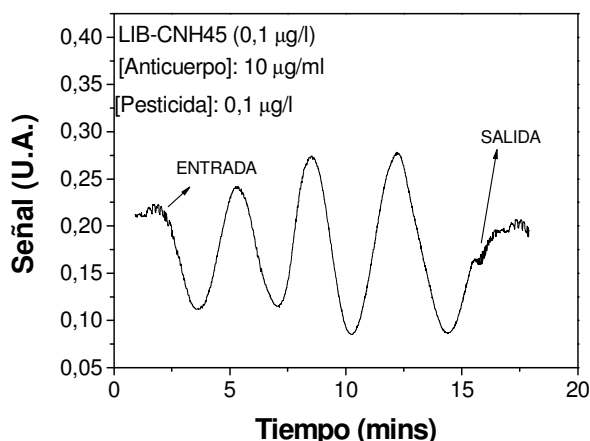


Fig. 40 Inmunoensayo de inhibición para $0.1 \mu\text{g/l}$ de pesticida con su anticuerpo

Para los casos de LIB-CNH45 ($0.02 \mu\text{g/l}$ y $0.002 \mu\text{g/l}$) se obtuvieron los mismos cambios de fase ($\Delta\phi = 5.25 \times 2\pi$), que implicaban cambios de fase netos de $\Delta\phi = 3.25 \times 2\pi$, por lo que la concentración de $10 \mu\text{g/ml}$ de LIB con $0.02 \mu\text{g/l}$ de CNH-45 en solución tampón se la considera como la concentración de saturación de anticuerpo y el límite de detección del pesticida carbaril para el biosensor en este inmunoensayo de inhibición (Figura 41). Esta concentración de saturación corresponde a un espesor de capa de anticuerpo de 0.48 nm y a un recubrimiento superficial de anticuerpo de $\Gamma = 0.30 \text{ ng/mm}^2$ sobre el área sensora con el complejo BSA-hapteno inmovilizado.

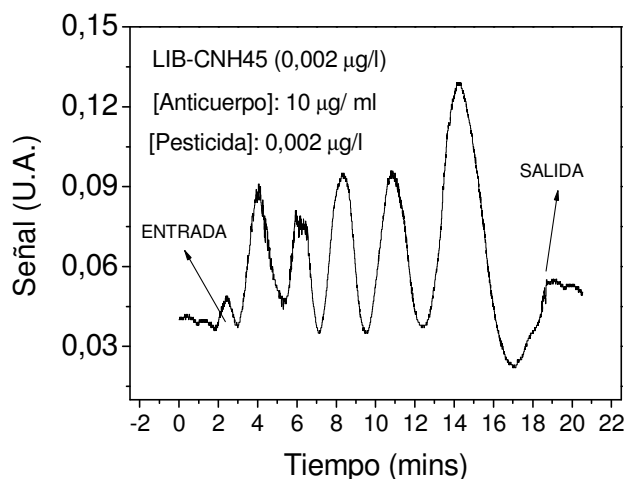


Fig. 41 Inmunoensayo de inhibición para $0.002 \mu\text{g/l}$ de pesticida con su anticuerpo

También se presenta en la Figura 42 la respuesta del biosensor al pasar $300 \mu\text{l}$ de $1 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo no específico en solución tampón PBST con $\text{PH}=7$, a T ambiente y al flujo constante de $15 \mu\text{l/min}$, una vez que se había regenerado la superficie sensora con el anticuerpo inmovilizado. El cambio de fase neto es prácticamente nulo, por lo que no hay adsorción inespecífica sobre la superficie del sensor. Se observa un cambio de fase ($\Delta\phi = 1.3 \times 2\pi$) al entrar y salir la disolución con el

anticuerpo de la cubeta fluídica, debido al cambio de índice entre esta disolución y la solución tampón.

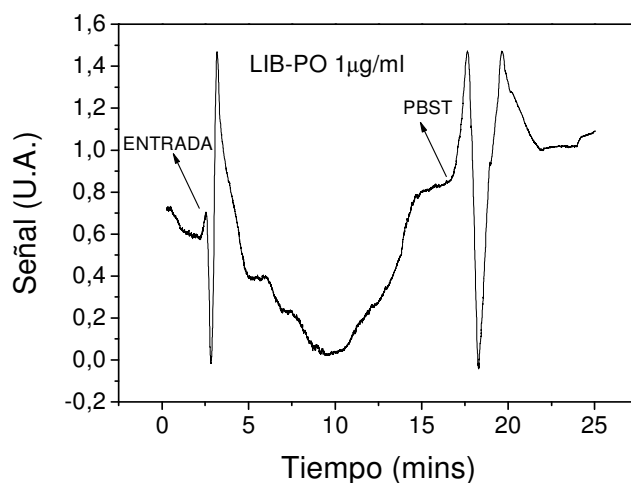


Fig. 42 Respuesta del biosensor al pasar una disolución de anticuerpo no específico LIB-PO 1 µg/ml por su área sensora con el anticuerpo inmovilizado.

La curva de calibrado para el ensayo de inhibición del pesticida carbaril con su anticuerpo en disolución se muestra en la Figura 43. En esta curva se representan la respuesta del biosensor para cada una de las distintas concentraciones de pesticida carbaril con su anticuerpo conjugado en disolución inyectadas en la superficie sensora del transductor.

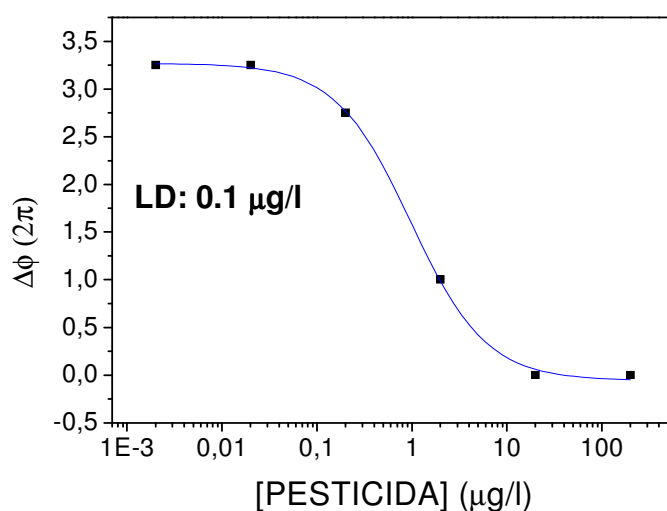


Fig. 43 Curva de calibrado del pesticida carbaril para el inmunoensayo de inhibición de la pareja antígeno-anticuerpo

El límite de detección calculado a partir de la curva de calibrado obtenida es LD=0.1 µg/l y el límite de trabajo está comprendido entre $I_{20} = 0.25$ µg/l y $I_{80} = 2.8$ µg/l. Éste límite de detección del pesticida carbaril es el límite de detección más bajo conocido en el momento en los biosensores ópticos de medida directa y sin necesidad de marcador y es 9 veces menor al obtenido con el biosensor SPR (LD=0.9 µg/l) en este mismo laboratorio⁵³. Esta aplicación del MZI como inmunosensor en la detección del pesticida carbaril con tan alta sensibilidad, permite situar al MZI, en el campo de la

proteómica y del medio ambiente, en una de las técnicas de análisis directo más sensibles descritas en la literatura.

4.1.3 Conclusiones

En este capítulo se presentan dos aplicaciones del MZI como biosensor. La primera aplicación está centrada en el campo de la Genómica y consiste en la detección de dos mutaciones puntuales en el gen BRCA-1, causantes del cáncer de mama en el 80 % de las mujeres que alcanzan los 80 años de edad. La segunda aplicación está centrada en el campo de la Proteómica y consiste en la detección de muy bajas concentraciones del pesticida carbaril mediante un inmunoensayo de inhibición.

Para la detección de las dos mutaciones puntuales en el gen BRCA-1, en primer lugar se ha funcionalizado la superficie del transductor (Si_3N_4) mediante silanización, formándose una monocapa de silano con un grupo tiol funcional. Seguidamente, para el desarrollo del biosensor de ADN, se ha inmovilizado un oligonucleótido funcionalizado con un grupo sulfridrilo (tiol) en el extremo 5' de su cadena. De esta forma, el elemento biorreceptor del biosensor queda inmovilizado a través de puentes disulfuro entre las cadenas de oligonucleótido tioladas y la superficie silanizada del transductor. Este oligonucleótido funcionalizado tiene una secuencia mutada del fenotipo salvaje (WT-F) correspondiente a pacientes sanos, con dos deleciones de timina en su secuencia. Para conseguir un bajo límite de detección en la hibridación del ADN, se hicieron pasar por el área sensora del MZI distintas concentraciones de oligos con secuencias complementarias completas a las inmovilizadas, pero correspondientes al fenotipo de pacientes enfermos. Estos oligos son de dos tipos: con cadenas cortas, de longitud de secuencia 13 mers y con cadenas largas, de longitud de secuencia 58 mers y amplificadas por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Debido a que el oligo de 58 mers tiene mayor peso molecular, el cambio de fase del biosensor MZI al hibridar con la capa inmovilizada es mayor para una misma concentración de oligo corto. De hecho, el límite de detección alcanzado en la hibridación con el oligo largo es de 10 pM, un límite de detección que es el más bajo de entre todos los biosensores de medida directa descritos en la literatura.

Para cuantificar el número de moléculas de oligo inmovilizadas en el área sensora del MZI (5.9×10^{10} moléculas/cm²) se hizo uso de la técnica de marcaje radiactivo. Para estudiar la capacidad de poder reutilizar el chip en siguientes inmovilizaciones, se empleó la técnica de la fluorescencia. Además con ambas técnicas se ratificó que el protocolo de biofuncionalización de la superficie del transductor era el correcto.

Además se hicieron pasar disoluciones de distintas concentraciones de oligo cuya secuencia complementaria es la correspondiente al fenotipo de pacientes sanos. Esta secuencia, que corresponde a la del gen BRCA-1, no es completamente complementaria a la inmovilizada y tiene dos mutaciones internas con respecto a la secuencia complementaria completa. El límite de detección alcanzado en la hibridación de este oligo complementario con la capa inmovilizada es de 25 nM y es un límite bastante más alto que los obtenidos en los casos anteriores. Este límite de detección podría mejorarse, optimizando las condiciones de fuerza iónica y pH de la solución tampón, variando la temperatura, etc. en detrimento del nivel de sensibilidad alcanzado

en la hibridación con secuencias complementarias correspondientes al fenotipo de pacientes enfermos (L.D. =10 pM), por lo que no sería interesante.

La otra aplicación del MZI como biosensor desarrollada en esta Tesis pertenece al campo de la Proteómica y consiste en la detección de muy bajas concentraciones del pesticida carbaril. El pesticida carbaril es una sustancia tóxica de bajo peso molecular (201.2 Da), por lo que su detección directa es complicada. Por ello se hace uso de un inmunoensayo de inhibición, en el cual el análogo del analito (proteína BSA) se inmoviliza con el analito en la superficie sensora y la biomolécula (anticuerpo LIB) que se detecta es aquella que ha quedado libre después de competir con el analito en solución. En nuestro caso, la presencia del carbaril en la mezcla va a inhibir la unión del anticuerpo al conjugado, por lo que a medida que aumenta la concentración de analito disminuye el número de anticuerpos libres y reduce la respuesta del sensor.

Ya realizado el inmunoensayo de inhibición se elaboró un curva de calibrado en donde se representaba la respuesta del biosensor para cada concentración de pesticida detectada. El límite de concentración de pesticida detectado por el biosensor MZI en este inmunoensayo de inhibición es de 0.1 µg/l, que es el límite de detección más bajo alcanzado con un biosensor de medida directa descrito en la literatura.

Referencias

1. Watson.J.D, *La doble hélice*. 1ª Edición. Ed. Alianza. 2000, Great Britain.
2. Duncan, J. A., Reeves, J. R., and Cooke, T. G., *BRCA1 and BRCA2 proteins: roles in health and disease*. Journal of Clinical Pathology-Molecular Pathology, 1998. **51**(5): p. 237-247.
3. Watson.J.D, *The secret of life*. 4ª Edición. Ed. Taurus. 2003. Great Britain.
4. Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M., and Higuchi, R., *Effective Amplification of Long Targets from Cloned Inserts and Human Genomic DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(12): p. 5695-5699.
5. Kasemo, B., *Biological surface science*. Surface Science, 2002. **500**(1-3): p. 656-677.
6. Pei, R. J., Cui, X. Q., Yang, X. R., and Wang, E. K., *Layer-by-layer assembly of multilayer films composed of streptavidin and biotinylated antibody by real-time biomolecular interaction analysis*. Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese, 2002. **23**(2): p. 195-198.
7. Ferretti, S., Paynter, S., Russell, D. A., Sapsford, K. E., and Richardson, D. J., *Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2000. **19**(9): p. 530-540.
8. Wink, T., vanZuilen, S. J., Bult, A., and vanBennekom, W. P., *Self-assembled monolayers for biosensors*. Analyst, 1997. **122**(4): p. R43-R50.
9. Brzoska, J. B., Benazouz, I., and Rondelez, F., *Silanization of Solid Substrates - a Step toward Reproducibility*. Langmuir, 1994. **10**(11): p. 4367-4373.
10. Sung, M. M., Kluth, G. J., and Maboudian, R., *Formation of alkylsiloxane self-assembled monolayers on Si3N4*. Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films, 1999. **17**(2): p. 540-544.

11. Hu, M. H., Noda, S., Okubo, T., Yamaguchi, Y., and Komiyama, H., *Structure and morphology of self-assembled 3-mercaptopropyltrimethoxysilane layers on silicon oxide*. Applied Surface Science, 2001. **181**(3-4): p. 307-316.
12. Vandenberg, E. T., Bertilsson, L., Liedberg, B., Uvdal, K., Erlandsson, R., Elwing, H., and Lundstrom, I., *Structure of 3-Aminopropyl Triethoxy Silane on Silicon-Oxide*. Journal of Colloid and Interface Science, 1991. **147**(1): p. 103-118.
13. McGovern, M. E. and Thompson, M., *Self-assembled silanes and the thiol functionalization of surfaces*. Analytical Communications, 1998. **35**(12): p. 391-393.
14. McGovern, M. E., Kallury, K. M. R., and Thompson, M., *Role of Solvent on the Silanization of Glass with Octadecyltrichlorosilane*. Langmuir, 1994. **10**(10): p. 3607-3614.
15. Allen, G. C., Sorbello, F., Altavilla, C., Castorina, A., and Ciliberto, E., *Macro-, micro- and nano-investigations on 3-aminopropyltrimethoxysilane self-assembly-monolayers*. Thin Solid Films, 2005. **483**(1-2): p. 306-311.
16. Han, S. M. and Aydil, E. S., *Study of surface reactions during plasma enhanced chemical vapor deposition of SiO₂ from SiH₄, O-2, and Ar plasma*. Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films, 1996. **14**(4): p. 2062-2070.
17. Shon, Y. S. and Lee, T. R., *A steady-state kinetic model can be used to describe the growth of self-assembled monolayers (SAMs) on gold*. Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(34): p. 8182-8191.
18. Schwartz, D. K., *Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation*. Annual Review of Physical Chemistry, 2001. **52**: p. 107-137.
19. Legrange, J. D., Markham, J. L., and Kurkjian, C. R., *Effects of Surface Hydration on the Deposition of Silane Monolayers on Silica*. Langmuir, 1993. **9**(7): p. 1749-1753.
20. Rogers, Y. H., Jiang-Baucom, P., Huang, Z. J., Bogdanov, V., Anderson, S., and Boyce-Jacino, M. T., *Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: A method for preparation of DNA microarrays*. Analytical Biochemistry, 1999. **266**(1): p. 23-30.
21. Williams, R. A. and Blanch, H. W., *Covalent Immobilization of Protein Monolayers for Biosensor Applications*. Biosensors & Bioelectronics, 1994. **9**(2): p. 159-167.
22. Yin, L. T., Chou, J. C., Chung, W. Y., Sun, T. P., and Hsiung, S. K., *Characteristics of silicon nitride after O-2 plasma surface treatment for pH-ISFET applications*. Ieee Transactions on Biomedical Engineering, 2001. **48**(3): p. 340-344.
23. Diao, J. P., Ren, D. C., Engstrom, J. R., and Lee, K. H., *A surface modification strategy on silicon nitride for developing biosensors*. Analytical Biochemistry, 2005. **343**(2): p. 322-328.
24. Peterson, A. W., Heaton, R. J., and Georgiadis, R. M., *The effect of surface probe density on DNA hybridization*. Nucleic Acids Research, 2001. **29**(24): p. 5163-5168.
25. Herne, T. M. and Tarlov, M. J., *Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces*. Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(38): p. 8916-8920.
26. Southern, E., Mir, K., and Shchepinov, M., *Molecular interactions on microarrays*. Nature Genetics, 1999. **21**: p. 5-9.

27. Shchepinov, M. S., CaseGreen, S. C., and Southern, E. M., *Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays*. *Nucleic Acids Research*, 1997. **25**(6): p. 1155-1161.
28. Jiang, T. S., Minunni, M., Wilson, P., Zhang, J., Turner, A. P. F., and Mascini, M., *Detection of TP53 mutation using a portable surface plasmon resonance DNA-based biosensor*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2005. **20**(10): p. 1939-1945.
29. Petrovykh, D. Y., Kimura-Suda, H., Whitman, L. J., and Tarlov, M. J., *Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold*. *Journal of the American Chemical Society*, 2003. **125**(17): p. 5219-5226.
30. Ronghui Wang, S. T., Maria Minunni, Maria Michela Spiriti, Marco Mascini, *Immobilisation of DNA probes for the development of SPR - based sensing*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2004. **20**: p. 967-974.
31. Sepulveda, B., del Rio, J. S., Moreno, M., Blanco, F. J., Mayora, K., Dominguez, C., and Lechuga, L. M., *Optical biosensor microsystems based on the integration of highly sensitive Mach-Zehnder interferometer devices*. *Journal of Optics a-Pure and Applied Optics*, 2006. **8**(7): p. S561-S566.
32. Tawa, K. and Knoll, W., *Mismatching base-pair dependence of the kinetics of DNA-DNA hybridization studied by surface plasmon fluorescence spectroscopy*. *Nucleic Acids Research*, 2004. **32**(8): p. 2372-2377.
33. Steel, A. B., Levicky, R. L., Herne, T. M., and Tarlov, M. J., *Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: Effect of oligonucleotide length on layer assembly*. *Biophysical Journal*, 2000. **79**(2): p. 975-981.
34. Schreiber, F., *Structure and growth of self-assembling monolayers*. *Progress in Surface Science*, 2000. **65**(5-8): p. 151-256.
35. Levicky, R., Herne, T. M., Tarlov, M. J., and Satija, S. K., *Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: A neutron reflectivity study*. *Journal of the American Chemical Society*, 1998. **120**(38): p. 9787-9792.
36. Manning, M. and Redmond, G., *Formation and characterization of DNA microarrays at silicon nitride substrates*. *Langmuir*, 2005. **21**(1): p. 395-402.
37. McKendry, R., Zhang, J. Y., Arntz, Y., Strunz, T., Hegner, M., Lang, H. P., Baller, M. K., Certa, U., Meyer, E., Guntherodt, H. J., and Gerber, C., *Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. **99**(15): p. 9783-9788.
38. Ronghui Wang, M. M., Sara Tombelli, Marco Mascini20 (2004) 598-605, *A new approach of the detection of DNA sequences in amplified nucleic acids by a surface plasmon resonance biosensor*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2004. **20**: p. 598-605.
39. Gooding, J. J., *Electrochemical DNA hybridization biosensors*. *Electroanalysis*, 2002. **14**(17): p. 1149-1156.
40. Sitting, M., *Handbook of toxic and Harzardous Chemicals and carcinogens*. 2^a ed. 1985, Parl Ridge, NJ.
41. Index, T. M., *An enciclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*. 11^a ed, Merck and Co. Inc, 1989, NJ.
42. Abad, A. and Montoya, A., *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to carbaryl.2. Assay optimization and application to the analysis of water samples*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997. **45**(4): p. 1495-1501.

43. Abad, A., Primo, J., and Montoya, A., *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to carbaryl. I. Antibody production from several haptens and characterization in different immunoassay formats*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(4): p. 1486-1494.
44. Penalva, J., Gabaldon, J. A., Maquieira, A., and Puchades, R., *Determination of carbaryl in vegetables using an immunosensor working in organic media*. Food and Agricultural Immunology, 2000. **12**(2): p. 101-114.
45. Golub, E. S., *A History of Immunology - Silverstein, Am.* Science, 1990. **247**(4940): p. 347-347.
46. Hennion, M. C., *Applications and validation of immunoassays for pesticides analysis*. Analisis, 1998. **26**(6): p. M149-M155.
47. Baeumner, A. J., *Biosensors for environmental pollutants and food contaminants*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003. **377**(3): p. 434-445.
48. Marco, M. P., Gee, S., and Hammock, B. D., *Immunochemical Techniques for Environmental-Analysis. I. Immunosensors*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 1995. **14**(7): p. 341-350.
49. Hock, B., *Antibodies for immunosensors - A review*. Analytica Chimica Acta, 1997. **347**(1-2): p. 177-186.
50. Mauriz, E., Calle, A., Lechuga, L. M., Quintana, J., Montoya, A., and Manclus, J. J., *Real-time detection of chlorpyrifos at part per trillion levels in ground, surface and drinking water samples by a portable surface plasmon resonance immunosensor*. Analytica Chimica Acta, 2006. **561**(1-2): p. 40-47.
51. Mauriz, E., Calle, A., Montoya, A., and Lechuga, L. M., *Determination of environmental organic pollutants with a portable optical immunosensor*. Talanta, 2006. **69**(2): p. 359-364.
52. Schipper, E., *Waveguide Immunosensing of small molecules*. Tesis. 1968, Twente, Holanda.
53. Mauriz, E., Calle, A., Abad, A., Montoya, A., Hildebrandt, A., Barcelo, D., and Lechuga, L. M., *Determination of carbaryl in natural water samples by a surface plasmon resonance flow-through immunosensor*. Biosensors & Bioelectronics, 2006. **21**(11): p. 2129-2136.

CAPÍTULO 5

Hacia un microsistema total de análisis

5.1 Introducción

Hasta el momento se ha presentado un biosensor de alta sensibilidad basado en interferómetros Mach-Zehnder integrados, junto con sus aplicaciones en el marco de la Genómica (detección de reacciones de hibridación entre cadenas de ADN complementarias y mutaciones puntuales) y de la Proteómica (detección del pesticida carbaril). Este dispositivo formará parte de lo que se denomina Microsistema Total de Análisis (Figura 1). Los microsistemas totales de análisis¹ son dispositivos que conectan el dominio eléctrico con el óptico (fuentes de luz con detectores electro-ópticos) y el electrónico (para el procesado de las señales eléctricas procedentes de los detectores y en ciertas ocasiones para controlar el estado de algunas funciones ópticas). También precisan de un sistema fluídico, que confiere al microsistema robustez y gran estabilidad y que transporta muy pequeños volúmenes de muestra a la región sensora². Esta reducción del volumen de muestra³ (por ejemplo, la concentración de un gen sencillo en una célula típica de mamífero es del orden del pM y si se diluye en un volumen de 10 μ l, la concentración de este volumen será de menos de 10^{-18} M, que puede ser detectada por sistemas muy sensibles de ácidos nucleicos) abarata mucho los costes. Además, para llevar estos pequeños volúmenes de muestra al área sensora, se necesitan microbombas con microválvulas y microcanales, generalmente fabricados con materiales poliméricos como PDMS o el SU8⁴⁻⁶. Los microsistemas deben estar encapsulados^{7, 8}, para así ser protegidos de las variables externas (cambios de presión, cambios de temperatura, etc.) y de daños que puedan sufrir en el transporte. Anteriormente al encapsulado, es necesario funcionalizar de forma adecuada la superficie del transductor e inmovilizar los biorreceptores requeridos para la aplicación biosensora que se quiere desarrollar.

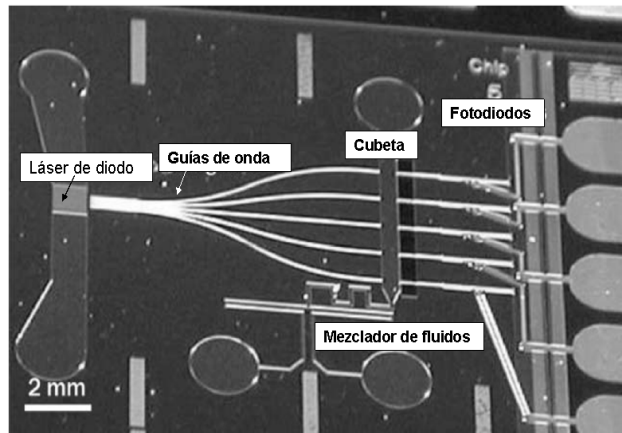


Fig. 1 Microsistema Total de Análisis, S. Balslev et al. *Lab Chip*, 2006, 6, 213-217

La miniaturización de los sistemas precisa de las avanzadas técnicas de micro y nanofabricación⁹ desarrolladas en la última década, combinadas con las ópticas y de micromecanizado, dando lugar a los llamados sistemas microoptoelectromecánicos (MOEMS). Las técnicas de micromecanizado pueden clasificarse en dos tipos: las técnicas de micromecanizado en volumen, que crean microestructuras a partir del mismo sustrato y las de micromecanizado en superficie, mediante el crecimiento de películas delgadas de material sobre el sustrato. Estas técnicas, además de la miniaturización de todos los sistemas ópticos, eléctricos, electrónicos y fluidicos, permiten conectar varios transductores a la vez en el mismo chip (interferómetros ópticos como el MZI, el de Young o el de Michelson, resonadores como el de Fabry-Perot o el de anillo¹⁰, transductores termoópticos o electroquímicos, etc.).

El desarrollo del sistema total de análisis se debe realizar en dos fases:

1. En primer lugar se integrarán de forma híbrida el sensor y los sistemas de emisión y detección de luz. El sistema de gestión de fluidos, que ya ha sido desarrollado en otra Tesis del Grupo, irá incorporado al biosensor y hará uso de la tecnología SU8 para el diseño de los microcanales. De esta forma, la fluídica del sistema así incorporada, le conferirá una alta integración y estabilidad, reduciendo la señal de ruido y deriva al igual que facilitando su portabilidad y manejo. Sin embargo, en esta primera fase, no se incluirá el sistema de modulación del interferómetro, realizándose a posteriori el procesamiento de la señal en el sistema de detección.

2. En una segunda fase, se realizará la integración total del sistema. Se desarrollará un sistema de modulación del interferómetro que se integrará, junto con el sistema de detección y procesado de la señal, en un único sustrato.

5.2 Integración del sistema emisor de luz

El sistema emisor de luz empleado para la construcción de un sistema de análisis integrado será un diodo láser¹¹ en el rango de longitudes de onda de 630-700 nm. La longitud de onda elegida depende de dos factores importantes: por un lado, debido a la ecuación (1):

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda}(N_s - N_R) \cdot d \quad (1)$$

donde $\Delta\varphi$ es el cambio de fase debido a la diferencia en los índices de refracción efectivos entre las rama sensora y de referencia ($N_S - N_R$), λ la longitud de onda de la fuente emisora de luz y d la longitud del área sensora que está en contacto con el medio externo, las longitudes de onda cortas son las más convenientes. Por otra parte, las moléculas biológicas son transparentes al visible y tienen una banda de absorción en torno a los 200 nm. En función de estos factores, se determinará la longitud de onda de trabajo, que será la de 632.8 nm, aunque si se utiliza otra frecuencia dentro del rango anterior mencionado, no será necesario modificar la estructura del MZI, porque estas estructuras se caracterizan por una gran tolerancia en su diseño.

Debido a que el silicio tiene un gap indirecto y que por tanto la recombinación radiativa es totalmente ineficiente, la integración monolítica de la fuente de luz láser es compleja. Por ello, ésta suele integrarse de forma híbrida en el sustrato de Si^{12, 13}.

Para la fabricación del microsistema integrado, la inserción de la luz láser a las guías de onda se puede realizar de varias formas. Una de ellas es por enfrentamiento directo de la fibra óptica monomodo, que está conectorizada al diodo láser y las guías rectas^{14, 15}. Estas fibras ópticas quedan fijas al sustrato por medio de V-grooves micromecanizados en las obleas de Si. De hecho, son muchos los artículos relacionados con el campo de las telecomunicaciones que se han escrito para la fabricación de V-grooves (Figura 2) en el silicio mediante distintas técnicas (ataque anisótropo, RIE, etc). Se puede observar en todos ellos que el proceso de fabricación es complejo y caro si se quiere una alta eficiencia de acoplo fibra-guía^{7, 16}.

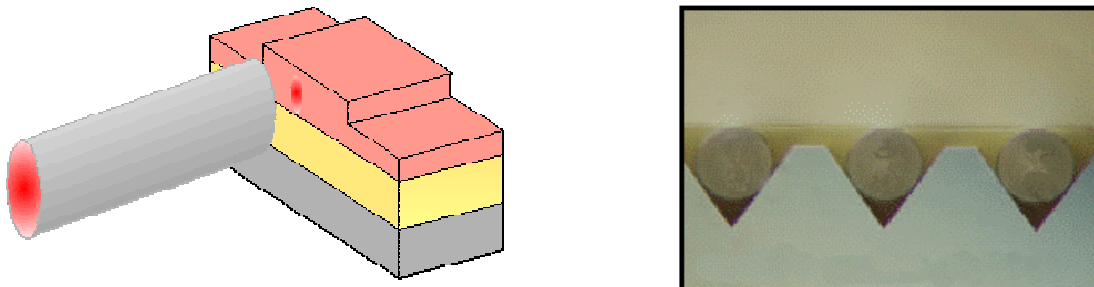


Fig. 2 Integración del sistema de inserción de luz **a)** enfrentamiento directo de la fibra óptica monomodo a la guía de ondas **b)** La fibra óptica monomodo va sellada en los V-grooves de Si

En nuestro caso, el enfrentamiento directo del núcleo de la fibra monomodo de diámetro 4 μm , con el núcleo de las guías de 4 μm de ancho y 3 nm de altura, conlleva una complejidad tecnológica importante. Por ello se plantea usar otra alternativa, que es la inserción de la luz por medio de redes de difracción micromecanizadas en el sustrato de Si en la entrada de las guías¹⁷. De esta forma no es necesario diseñar V-grooves y hay menos pérdidas por eficiencia de acoplo.

Para mejorar la eficiencia de acoplo fibra-guía, se pueden emplear fibras pulidas en forma de lente, de tal forma que la luz que sale de la fibra es focalizada a su distancia focal, dependiendo cómo se haya realizado el pulido. También se pueden

integrar microlentes en la misma plataforma de Silicio¹⁸, al igual que otros elementos ópticos pasivos (Figura 3)^{19,20}, como prismas, espejos, divisores de haz, etc.



Fig. 3 Ejemplo de micros sistema total de análisis con elementos pasivos ópticos. A. Llobera et al. *Lab Chip*, 2005, 5, 506-511

Para la fabricación de un sistema de análisis total integrado se deberá acoplar de forma directa la luz del diodo láser al sensor, con un perfil de campo entre ambas estructuras lo más parecido posible y con una distancia diodo láser-sensor minimizada. Para ello se hace uso de los diodos láser de emisión vertical (VCSEL, Vertical Cavity Surface Emitting Lasers)²¹⁻²³ (Soda *et al*, Haruhisa (1979)), construidos con la tecnología tipo III-V (GaAs, para longitudes de onda comprendidas entre 650 nm y 1300 nm o de InP para longitudes de onda comprendidas entre 1300 nm y 2000 nm), que emiten luz láser con un perfil de campo lejano con forma de gaussiana totalmente simétrica. Esto significa que el acoplamiento a dispositivos ópticos es más eficiente que con diodos láser de emisión lateral y además no se necesitan componentes ópticos intermedios (i.e. redes de difracción). Sin embargo, tecnológicamente presenta dificultades en cuanto a la preparación de las intercaras, a la precisión en el alineamiento y al método de fijado de la guía y el láser.

5.3 Integración del sistema de detección

Como en la inserción de la luz, su recogida puede realizarse a través de redes de difracción a la salida del MZI²⁴ o con fibras ópticas insertadas en V-grooves en los sustratos de silicio, que son llevadas a fotodetectores conectorizados con fibra no integrados en los sustratos de Si. Sin embargo, la integración en un mismo sustrato de guías de onda y fotodetectores es posible¹⁴, pues los MZIs están fabricados con la tecnología microelectrónica del silicio, pudiendo usarse su sustrato como parte del sistema fotodetector. De hecho se han desarrollado sistemas en los que se integran guías de onda TIR y fotodetectores en silicio²⁵, pero presentan problemas de eficiencia de acoplamiento de la luz al fotodetector y complejidad en la fabricación. También se pueden usar fotodetectores laterales encima de las guías²⁶. En este caso se hace uso del campo evanescente de la luz que viaja por el núcleo como señal de entrada al fotodetector.

5.4 Integración del sistema de fluidica

El sistema de flujo ya ha sido integrado en el biosensor^{5, 27}. El dispositivo integrado consiste en una red de microcanales tridimensionales fabricados con la tecnología SU8 sobre los MZIs, de tal forma que diferentes disoluciones pueden llegar simultáneamente a las áreas sensoras de los distintos interferómetros. Los microcanales tienen alturas comprendidas entre 40 y 60 μm y anchuras entre 100 y 250 μm , tal como se muestra en la Figura 4.

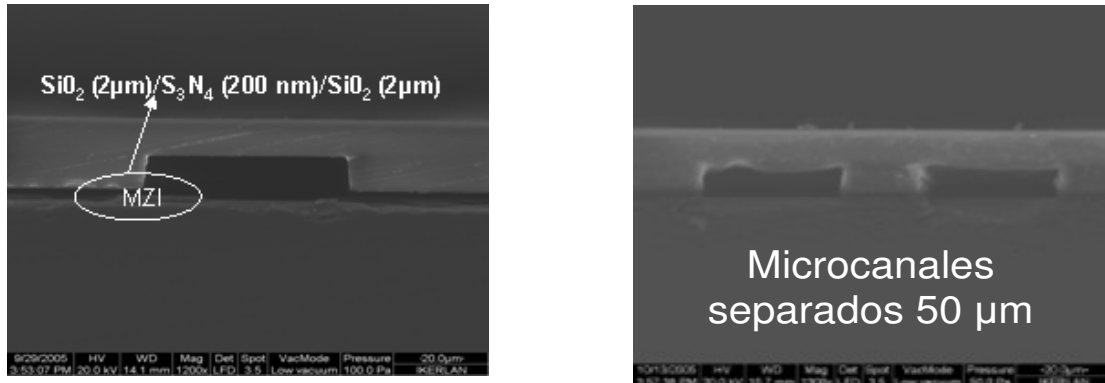


Fig. 4 Integración del sistema de fluídica sobre el MZI **a)** microcanal de SU8 sobre el área del MZI **b)** Microcanales que riegan las áreas sensoras de los MZIs con dos áreas sensoras, separados 50 μm

Como se puede observar en la Figura 3 (b), haciendo uso de la tecnología SU-8, los MZIs con dos áreas sensoras pueden ya emplearse para medidas biosensoras porque a través de los microcanales pueden introducirse simultáneamente disoluciones con las mismas condiciones de pH, temperatura, fuerza iónica, etc. y a la misma velocidad por cada una de las áreas sensoras de un mismo MZI. Por ejemplo, se puede hacer inyectar una solución tampón por una de las áreas sensoras del MZI, mientras que por la otra se puede pasar la misma solución tampón pero con los biorreceptores disueltos en ella. Debido a la homogeneidad de los procesos de fabricación en todas las obleas y a la distancia tan pequeña entre ramas, se puede suponer que las ramas son idénticas y que responden de misma forma ante cambios del medio externo. Por ello, si en una rama se consigue que se lleve la reacción final, el cambio de fase será debido únicamente a las interacciones específicas entre las moléculas receptoras y sus analitos complementarios.

Para pasar distintas disoluciones por el área sensora del MZI se hace uso de una microcubeta que forma parte del sistema de fluídica y que permite la entrada y la salida de las disoluciones por los distintos microcanales (Figura 5 (a)). En la Figura 5 (b) se puede observar el cambio de fase experimentado por el MZI ante un cambio de índice de refracción entre disoluciones de $\Delta n = 7 \times 10^{-4}$.

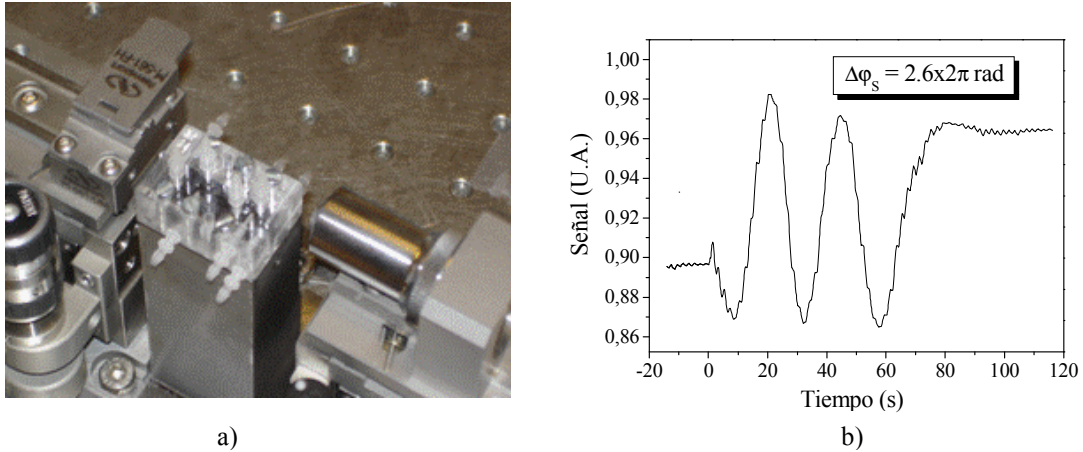


Fig. 5 a) Microcubeta del sistema de flúidica **b)** Cambio de fase experimentado por el MZI ante un cambio de índice de refracción de $\Delta n = 7 \times 10^{-4}$

En la Figura 6 se muestra la sensibilidad homogénea experimental calculada para los MZIs de 200 nm con el sistema de flúidica integrado al inyectar disoluciones de distintas concentraciones de HCl en agua DI con distinto índice de refracción por la superficie del transductor. Las concentraciones e índices de refracción de las disoluciones de HCl inyectadas fueron las siguientes: $C_0 = 0$ mM y $n_0 = 1.3328$, $C_1 = 0.18$ mM y $n_1 = 1.3338$, $C_2 = 0.36$ mM y $n_2 = 1.3348$, $C_3 = 0.45$ mM y $n_3 = 1.3361$ y $C_4 = 0.93$ mM y $n_4 = 1.3388$. Se puede observar que estos MZIs tienen un 8% menos de sensibilidad que los sin integrar. Una causa de esta pérdida de sensibilidad puede ser debida a las impurezas remanentes que queden en el área sensora de los MZIs después del proceso de fabricación de los microrcanales.

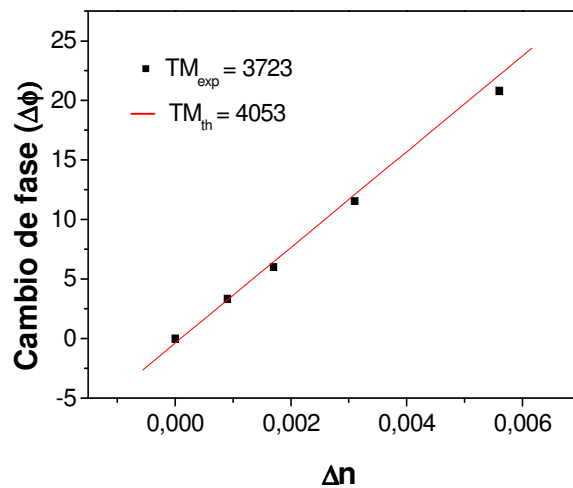


Fig. 6 Sensibilidad homogénea experimental para los MZIs de 200 nm con el sistema de flúidica integrado

5.5 El sistema de modulación

Es sabido que la señal de respuesta debida a los cambios de fase producidos en el área sensora se puede describir por la siguiente ecuación:

$$I_T = I_S + I_R + 2\sqrt{I_S I_R} \cos(\Delta\varphi_S(t)) \quad (1)$$

siendo I_S e I_R las intensidades de la luz en las ramas sensora y de referencia, respectivamente, y $\Delta\varphi_S(t)$ el cambio de fase inducido en el área sensora. Como ya se comentó anteriormente, hay esencialmente tres problemas asociados a la periodicidad de la señal:

a) Ambigüedad en la señal, pues no es posible determinar con exactitud el desfase al ser el mismo para múltiplos enteros de π . Por la misma razón, no es posible deducir la dirección del cambio de fase. Esta ambigüedad es un parámetro crítico a la hora de determinar si los componentes biológicos se están o no uniendo de la superficie del transductor (Figura 7)

b) La sensibilidad de la señal periódica del interferómetro, relacionada con la pendiente de la señal sinusoidal, que depende del valor del desfase, siendo cero en los extremos y máxima en su punto de cuadratura (Figura 7)

c) Variaciones relacionadas con la intensidad o fluctuaciones en la fuente de luz, que pueden confundirse con cambios en el desfase del interferómetro.

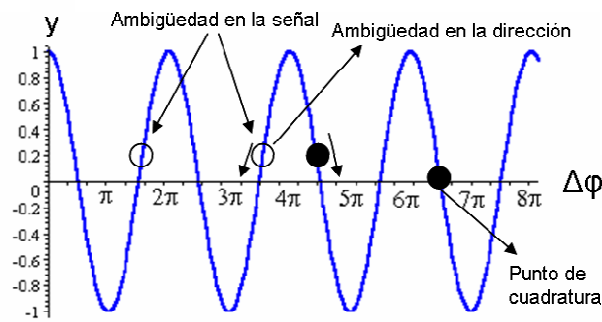


Fig. 7 Señal del MZI en función del desfase y los problemas asociados a la periodicidad de la señal

Estos problemas se pueden resolver mediante la introducción *de un sistema de compensación o un sistema de modulación de fase* en la rama de referencia de los interferómetros²⁸, como queda ilustrado en la Figura 8. A continuación describiremos el fundamento y las características de estos dos métodos:

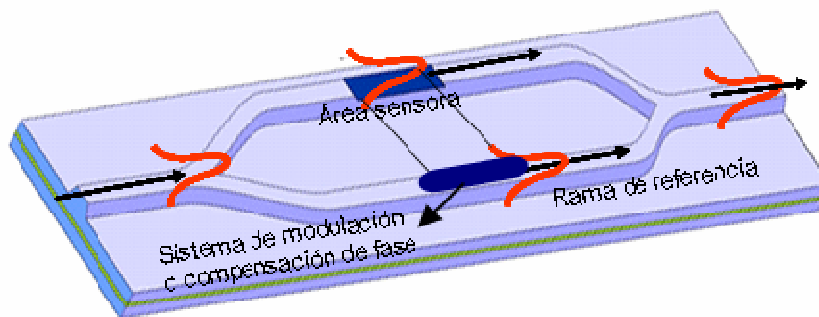


Fig. 8 Esquema de un MZI con un sistema de compensación o modulación de fase

5.5.1 Sistema de compensación de fase

El sistema compensación de fase está basado en la introducción de un cambio de fase en la rama de referencia que contrarreste los cambios de fase producidos por la

medida biosensora para mantener el interferómetro en su punto de máxima sensibilidad. Este método requiere un mecanismo de realimentación que actúe sobre el elemento compensador de la rama de referencia y mantenga el interferómetro fijo en este punto. Por tanto, los cambios de fase producidos en el interferómetro se miden a través de la señal que hay que aplicar al compensador para mantener el interferómetro en el punto de cuadratura²⁹. El principal problema de este sistema de medida estriba en la posible confusión entre los cambios de fase y las variaciones de intensidad debidas a las fluctuaciones de la fuente de luz o a la absorción o turbidez del medio externo.

5.5.2 Sistema de modulación de fase

Como alternativa al sistema de compensación de fase, se puede hacer uso del sistema de modulación de fase, que aplicado a una rama del MZI, permita elegir el punto de partida en la curva de transmisión. La señal que alimenta al modulador se puede acoplar a la salida del MZI mediante un sistema de realimentación de modo que, por ejemplo, se mantenga en el punto de máxima sensibilidad. Con este sistema se puede mantener una relación directa entre el desfase producido y la señal empleada para la modulación.

Dentro de los diferentes métodos que se usan para la modulación de dispositivos interferométricos, quizás el más conocido es el basado en el efecto electroóptico (LiNbO_3) por su uso frecuente en el campo de las comunicaciones¹⁵. La desventaja que presentan estos materiales es que su crecimiento es incompatible con la tecnología microelectrónica del silicio, aunque puede eliminarse haciendo uso del ZnO, por ejemplo¹⁵. Por otro lado, el óxido de silicio y el nitruro de silicio tienen unos coeficientes electroópticos muy bajos, por lo que es difícil emplear este efecto para la modulación del MZI. Los métodos más empleados en la modulación de los interferómetros basados en las guías TIR son el efecto termoeléctrico, el optomecánico y el magnetoóptico, principalmente.

El efecto termoeléctrico³⁰ hace uso de la dependencia del índice de refracción con la temperatura. Para ello se calienta localmente una de las ramas del MZI (la rama de referencia) depositando láminas delgadas de metal cerca del núcleo de la guía, de manera que actúan como resistencias al aplicar un voltaje sobre ellas. Una desventaja es que en la modulación termo-óptica el control de los cambios de fase es difícil debido al acoplamiento térmico entre las ramas del interferómetro, cuya separación es de 50 μm . Un método alternativo es inducir un cambio de temperatura en el MZI cuando las ramas no son simétricas. De esta forma se produce un cambio de fase por el cambio en la temperatura del dispositivo. Incluso no es necesario ramas de distintas longitudes, al tener en una rama (la rama sensora) el área sensora abierta, frente a la otra y que por tanto convierte al MZI en asimétrico. Este método fue realizado en el laboratorio con un peltier que calentaba los MZIs, pero no pudo implementarse para la modulación porque el haz se desviaba a medida que se iba calentando la guía. Este método puede inducir cambios en el índice de refracción de hasta 10^{-3} .

El efecto optomecánico³¹ consiste en inducir un cambio de fase mediante la aplicación de presión mecánica en la rama de referencia del interferómetro, sobre la que se ha colocado un diafragma que se deforma. El cambio de fase que se produce tiene dos causas, el efecto foto-elástico, es decir, el cambio de índice de refracción inducido por la presión, y la deformación del diafragma, que da a lugar a un aumento del camino

óptico de la luz. Las desventajas de esta modulación electromecánica son la complejidad tecnológica en los procesos de micromecanizado en las obleas, junto con la debida a la incorporación de elementos que realicen presión sobre el diafragma.

Otro tipo de modulación es el de la modulación magneto-óptica²⁸ y está basado en la utilización de un medio con propiedades magneto-ópticas situado en la rama de referencia, y en el control de su estado de imanación mediante un débil campo magnético externo. Un cambio de fase es inducido en la rama de referencia y es controlable en función de la dirección e intensidad del campo magnético empleado, al igual que el tipo de fluido magnético depositado sobre el área sensora del MZI. Este método de modulación tiene como problemas su implementación en la práctica, pues no es fácil encontrar un medio con las propiedades magneto-ópticas adecuadas que se deposite sobre una de las ramas del MZI y que no afecte a las propiedades de guiado de la luz en las guías.

En nuestro grupo se está trabajando en un sistema de modulación basado en el cambio de la longitud de onda de la fuente de luz. Este tipo de modulación es una modulación puramente óptica, que permite modular el MZI sin ninguna fuente externa de temperatura, de voltaje o de presión mecánica.

5.6 Nuevos campos de aplicación del biosensor basado en MZIs integrados

El transductor desarrollado en esta Tesis detecta las variaciones en el índice de refracción que se producen sobre su superficie, como las interacciones bioquímicas entre dos moléculas complementarias, con una gran sensibilidad y selectividad. Debido a la alta sensibilidad superficial del MZI cuando funciona como biosensor, un gran número de aplicaciones ambientales y biomédicas pueden llevarse a cabo. La selectividad ante un determinado compuesto se consigue con la incorporación de una capa de moléculas receptoras específica a dicho analito. Dependiendo del tipo de receptores que se empleen, el biosensor puede tener aplicaciones muy variadas, desde procesos industriales hasta análisis clínicos.

Ya se ha mostrado en esta memoria dos de las muchas posibles aplicaciones de este biosensor desarrollado: En el campo de la Genómica la detección de reacciones de hibridación entre cadenas de ADN complementarias, al igual que la detección de mutaciones en estas mismas cadenas. En el campo de la Proteómica, la detección del pesticida carbaril mediante un inmunoensayo de inhibición. Pero otras muchas pueden llevarse a cabo. De hecho, la determinación de tensioactivos (detergentes) y alguicidas (biocidas) en muestras ambientales costeras y la evaluación de sus riesgos toxicológicos son líneas de investigación inmediatas. Otras sustancias contaminantes, como son otros pesticidas además del carbaril (DDT, clorpirifos, etc.) pueden ser detectadas por el biosensor con altos niveles de sensibilidad.

Otras de sus aplicaciones posibles es la del análisis rápido de residuos antibióticos y corticoesteroides en productos relacionados con la industria agroalimentaria. De hecho, se pueden detectar hormonas esteroidales y compuestos β -androgénicos que se usan de forma ilegal para estimular el engorde animal, mediante el desarrollo de anticuerpos específicos que pueden llegar también a permitir el

biorreconocimiento selectivo de los distintos componentes de una misma familia de antibióticos o corticosteroides.

En el campo del diagnóstico clínico, el biosensor puede también detectar analitos de interés clínico en sangre y orina, enfermedades infecciosas (SIDA o hepatitis), tumores en fase temprana y metástasis, niveles hormonales para el control del sistema endocrino, proteínas con biomateriales o agentes patógenos alimentarios (salmonela, ECOLI). En el campo de la industria farmacéutica el biosensor MZI se puede usar para la monitorización de fármacos a tiempo real y en el control medioambiental para la determinación de contaminantes ambientales orgánicos y de contaminantes en localizaciones reales. Por último, también puede emplearse en la guerra química y bacteriológica, como es la detección in situ de agentes patógenos (virus de la viruela, el ántrax, etc.)

Para finalizar, se puede resaltar como perspectiva futura a realizar dentro del marco de la Genómica, la detección simultánea de diferentes muestras reales de ADN con y sin alteraciones en sus cadenas. La detección de mutaciones de ADN en distintas posiciones de sus cadenas, en función de qué zona del campo evanescente (muy cerca o muy lejos del modo guiado) participe en su detección, es una compleja aplicación de este biosensor basado en MZIs integrados, menos inmediata pero posible.

5.7 Conclusiones

En este capítulo se describen las posibles líneas futuras de investigación con el biosensor desarrollado en esta Tesis. Todas ellas están relacionadas con una mayor integración y estabilidad del dispositivo, al igual que intentar satisfacer todo el rango de aplicaciones que surgen de la Genómica y la Proteómica, al igual que de los campos clínicos y de investigación biomédica y ambiental.

Desde el punto de vista tecnológico, se comentan las ventajas e inconvenientes de la integración monolítica y de la integración híbrida para poder conseguir un microsistema total de análisis, en que los sistemas de emisión de luz, los sistemas de detección, los sistemas de fluídica y los sistemas de modulación queden implementados en una única plataforma CMOS.

También se comentan los posibles campos de aplicación biosensora. Todos ellos son posibles debido a la gran sensibilidad y selectividad del MZI cuando se desarrolla como dispositivo biosensor.

Referencias

1. Shoji, S., *Micro Total Analysis System (mu TAS)*. Electronics and Communications in Japan Part II-Electronics, 1999. **82**(2): p. 21-29.
2. Lagally, E. T. and Mathies, R. A., *Integrated genetic analysis microsystems*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2004. **37**(23): p. R245-R261.
3. Rodriguez-Mozaz, S., Marco, M. P., de Alda, M. J. L., and Barcelo, D., *Biosensors for environmental applications: Future development trends*. Pure and Applied Chemistry, 2004. **76**(4): p. 723-752.

4. Kim, J. Y., Baek, J. Y., Lee, K. A., and Lee, S. H., *Automatic aligning and bonding system of PDMS layer for the fabrication of 3D microfluidic channels*. Sensors and Actuators a-Physical, 2005. **119**(2): p. 593-598.
5. Blanco, F. J., Agirregabiria, M., Berganzo, J., Mayora, K., Elizalde, J., Calle, A., Dominguez, C., and Lechuga, L. M., *Microfluidic-optical integrated CMOS compatible devices for label-free biochemical sensing*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2006. **16**(5): p. 1006-1016.
6. Shew, B. Y., Kuo, C. H., Huang, Y. C., and Tsai, Y. H., *UV-LIGA interferometer biosensor based on the SU-8 optical waveguide*. Sensors and Actuators a-Physical, 2005. **120**(2): p. 383-389.
7. Kunz, R. E., *Integrated Optics in sensors: Advances Toward Miniaturized Systems for Chemical and Biochemical Sensing*. en Integrated Optical Circuits and Components, ed. N.D. Bran J.Thomposon. 1999. p.303-381.New York..
8. Moon, S., Han, S., Choi, J. H., Shin, S. G., Margalit, M., Avni, E., and Rogovsky, G., *Packaging for a FP-LD hybrid transceiver using filter-integrated PLC platform with PD insertion trench*. Microwave and Optical Technology Letters, 2006. **48**(3): p. 489-491.
9. Hierlemann, A., Brand, O., Hagleitner, C., and Baltes, H., *Microfabrication techniques for chemical/biosensors*. Proceedings of the Ieee, 2003. **91**(6): p. 839-863.
10. Lambeck, P. V., *Integrated optical sensors for the chemical domain*. Measurement Science & Technology, 2006. **17**(8): p. R93-R116.
11. *Semiconductor Laser Sources and Photodetectors*. en Optoelectronic technology and lightwave communication systems, ed. C.L. Van Nostrand Reinold. 1989, New York.
12. LeMinh, P., Holleman, J., Wallinga, H., Berenschot, J. W., Tas, N. R., and van den Berg, A., *Novel integration of a microchannel with a silicon light emitting diode antifuse*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2003. **13**(3): p. 425-429.
13. Henein G.E., M. D. J., Shmulovich J., Gomez L., Capuzzo M.A., Laskowski E.J., Yang R. and and J.V., G., *Hybrid integration for low-cost OE packaging and PLC transceiver*. Lasers and Electro-Optics Society Annual Meeting.LEOS '97 10th Annual Meeting. Conference Proceedings., IEEE.1997. San Francisco, L.A. U.S.A..
14. Leistiko, O. and Jensen, P. F., *Integrated bio/chemical microsystems employing optical detection: the clip-on*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 1998. **8**(2): p. 148-150.
15. Heideman, R. G. and Lambeck, P. V., *Remote opto-chemical sensing with extreme sensitivity: design, fabrication and performance of a pigtailed integrated optical phase-modulated Mach-Zehnder interferometer system*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1999. **61**(1-3): p. 100-127.
16. Hierlemann, A. and Baltes, H., *CMOS-based chemical microsensors*. Analyst, 2003. **128**(1): p. 15-28.
17. Nellen, P. M. and Lukosz, W., *Integrated Optical Input Grating Couplers as Direct Affinity Sensors*. Biosensors & Bioelectronics, 1993. **8**(3-4): p. 129-147.
18. Nakagawa, G., Miura, K., Sasaki, S., and Yano, M., *Lens-coupled laser diode module integrated on silicon platform*. Journal of Lightwave Technology, 1996. **14**(6): p. 1519-1523.

19. Llobera, A., Seidemann, V., Plaza, J. A., Cadarso, V. J., and Buttgenbach, S., *Characterization of optical accelerometers based on UV-sensitive polymers*. Ieee Sensors Journal, 2006. **6**(2): p. 412-419.
20. Llobera, A., Wilke, R., and Buttgenbach, S., *Optimization of poly(dimethylsiloxane) hollow prisms for optical sensing*. Lab on a Chip, 2005. **5**(5): p. 506-511.
21. Soda, H., Iga, K., Kitahara, C., and Suematsu, Y., *Gainasp-Inp Surface Emitting Injection-Lasers*. Japanese Journal of Applied Physics, 1979. **18**(12): p. 2329-2330.
22. Maisenholder, B., Zappe, H. P., Moser, M., Riel, P., Kunz, R. E., and Edlinger, J., *Monolithically integrated optical interferometer for refractometry*. Electronics Letters, 1997. **33**(11): p. 986-988.
23. Li H.E., Iga. K., *Vertical Cavity Surface Emitting Lasers Devices*, ed. S. Verlag. 2001. Holanda.
24. Lukosz, W., Nellen, P. M., Stamm, C., and Weiss, P., *Output Grating Couplers on Planar Wave-Guides as Integrated Optical Chemical Sensors*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1990. **1**(1-6): p. 585-588.
25. Wunderlich, S., Schmidt, J. P., and Muller, J., *Integration of Sion Wave-Guides and Photodiodes on Silicon Substrates*. Applied Optics, 1992. **31**(21): p. 4186-4189.
26. Erman, M., Jarry, P., Gamonal, R., Gentner, J. L., Stephan, P., and Guedon, C., *Monolithic Integration of a Gainas P-I-N Photodiode and an Optical Wave-Guide - Modeling and Realization Using Chloride Vapor-Phase Epitaxy*. Journal of Lightwave Technology, 1988. **6**(3): p. 399-412.
27. Blanco, F. J., Agirregabiria, M., Garcia, J., Berganzo, J., Tijero, M., Arroyo, M. T., Ruano, J. M., Aramburu, I., and Mayora, K., *Novel three-dimensional embedded SU-8 microchannels fabricated using a low temperature full wafer adhesive bonding*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2004. **14**(7): p. 1047-1056.
28. Sepúlveda, B., *Efectos magneto-ópticos en dispositivos biosensores de campo evanescentes*. Tesis. 2005, Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
29. Jackson, D. A., Dandridge, A., and Sheem, S. K., *Measurement of Small Phase-Shifts Using a Single-Mode Optical-Fiber Interferometer*. Optics Letters, 1980. **5**(4): p. 139-141.
30. Nishihara H., Massamitsu. H, Suhara T, *Optical integrated circuits*, ed. M.G. Hill. 1985, U.S.A.
31. Vadekar, A., Nathan, A., and Huang, W. P., *Analysis and Design of an Integrated Silicon Arrow Mach-Zehnder Micromechanical Interferometer*. Journal of Lightwave Technology, 1994. **12**(1): p. 157-162.

CAPÍTULO 6

Conclusiones finales

Esta memoria de Tesis Doctoral se ha centrado en el desarrollo de un biosensor fotónico de alta sensibilidad basado en interferómetros integrados. También se presentan dos tipos de aplicaciones llevadas a cabo con este biosensor ya desarrollado. La primera está centrada en el campo de la Genómica y es la detección de reacciones de hibridación entre cadenas de ADN complementarias y la detección de dos mutaciones puntuales en la secuencia de bases de ADN del gen BRCA-1. La segunda está centrada en el campo de la Proteómica y consiste en la detección de muy bajas concentraciones del pesticida carbaril mediante un inmunoensayo de inhibición.

6.1 Fabricación y caracterización del MZI

Los biosensores basados en interferómetros Mach-Zehnder integrados constituyen uno de los grupos de biosensores con mayor proyección debido a su gran sensibilidad, compatibilidad con la tecnología microelectrónica y capacidad de integración para conseguir un microsistema “Laboratorio-en-un-chip”. Están basados en guías de onda acanaladas de reflexión total interna (TIR) y para su correcto funcionamiento han de tener comportamiento monomodo. Este comportamiento monomodo se consigue para un alto contraste de índices entre el núcleo y el recubrimiento de las guías y para espesores de núcleo grandes que implican recubrimientos de sustrato gruesos o bien, para núcleos delgados pero con alturas de canal de sólo unos nanómetros.

En el desarrollo de un biosensor de alta sensibilidad, las guías de onda deben estar diseñadas para maximizar la interacción del campo evanescente con el medio exterior, de manera que la variación del índice de refracción efectivo del modo guiado al variar el espesor de la capa biológica adsorbida en la superficie del transductor (sensibilidad superficial, $\eta_{\text{sup}} \equiv \frac{\partial N}{\partial d_e}$) sea la mayor posible. Esta alta sensibilidad

superficial se consigue también para un alto contraste de índices, al igual que para pequeños espesores de núcleo, en torno a los cientos de nanómetros. Es más, para las estructuras de guiado consideradas en esta Tesis (recubrimientos de SiO₂ de espesores $d_r = 2 \mu\text{m}$ y de índice de refracción $n_r=1.46$ y núcleos de guía de Si₃N₄ de índice $n_n=2.00$), se obtiene que, para un espesor de 150 nm de núcleo, la sensibilidad superficial es máxima cuando la polarización del modo que se propaga por la estructura es TM. Por el contrario, para un espesor de 75 nm de núcleo, la sensibilidad superficial es muy alta para la polarización TE y no existen modos TM que se propaguen por la estructura cuando el recubrimiento del núcleo es aire o agua. Si el espesor del núcleo es de 200 nm, la sensibilidad en TM es alta y tres veces más que en TE. Para este espesor de núcleo, el modo TM se propaga más confinado que para los espesores de 75 nm en polarización TE y 150 nm en polarización TM. Es más, para este último espesor de 150 nm, el modo se propaga tan poco confinado por el núcleo que en ciertas ocasiones (áreas locales de mayor rugosidad, impurezas en la guía, etc.) puede convertirse en

modo de radiación al medio externo, por lo que las guías del MZI con este espesor de núcleo no serán empleadas en esta Tesis para aplicaciones biosensoras.

También se ha estudiado teóricamente la sensibilidad homogénea, que se define como la variación del índice de refracción efectivo del modo guiado ante un cambio en el índice de refracción del medio externo ($\eta_e \equiv \frac{\partial N}{\partial n_e}$), obteniendo valores muy parecidos a la sensibilidad superficial calculada para los MZIs con distintos espesores de núcleo. Todos estos estudios sobre el comportamiento modal y sensibilidades, se han realizado haciendo uso del método del índice efectivo

El MZI está formado por dos uniones Y enfrentadas y unidas por dos ramas. Para el diseño adecuado de las uniones Y se han realizado estudios experimentales de las pérdidas de propagación en tramos curvos, como se puede ver en la literatura, obteniendo los radios óptimos con menos pérdidas ($R = 80$ mm). Por otro lado, estudios previos teóricos por BPM indican que la separación entre las ramas ha de ser de $50 \mu\text{m}$, evitando así el acoplo de los modos que se propagan por ellas y el factor de acoplamiento 3 dB.

La fabricación de los dispositivos se realizó en la sala blanca del Centro Nacional de Microelectrónica (CNM) de Barcelona y se hizo uso de la tecnología microelectrónica del silicio. La estructura de los MZIs ya fabricados fue la siguiente: Un recubrimiento de sustrato de SiO_2 de espesor de $2 \mu\text{m}$ y $n=1.46$ crecido por oxidación térmica sobre el sustrato de Si; un núcleo de Si_3N_4 de índice de refracción $n=2.00$, depositado por LPCVD sobre el recubrimiento del sustrato y con espesores que pueden ser de 75 nm o 200 nm para conseguir altas sensibilidades en TE y TM respectivamente o de 150 nm para conseguir la sensibilidad máxima en TM. Para conseguir el confinamiento lateral de la luz guiada, las anchuras del canal del núcleo son de varias micras (varían de $3-8 \mu\text{m}$ y fueron así fabricadas para poder estudiar su comportamiento modal) y las alturas de varios nanómetros (4 nm). Por último, un recubrimiento del núcleo de SiO_2 de $2 \mu\text{m}$ de espesor y $n = 1.46$ fue depositado por PECVD sobre el núcleo. En algunos MZIs se abrieron las áreas sensoras con una longitud de 15 mm y un ancho de $50 \mu\text{m}$, en una o en dos de sus ramas, mediante un proceso de litografía y ataque húmedo. Ya fabricados, los MZIs con los distintos espesores de núcleo fueron caracterizados morfológica y ópticamente.

La caracterización morfológica se realizó con la técnica de Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM), mediante un microscopio de fuerzas atómicas (AFM) funcionando en el modo de contacto. De esta forma se estudió la calidad óptica de las capas por medio de su rugosidad, la profundidad del canal en las guías acanaladas, el espesor de la capa de óxido de protección y su ángulo de ataque. Resultó que la calidad óptica de las capas del núcleo era muy buena: el Si_3N_4 tenía una rugosidad del orden del Å . Sin embargo, el SiO_2 del orden de varios nanómetros. Esta rugosidad tan alta sí que puede tener cierta importancia en el funcionamiento los interferómetros ya que puede hacer perder luz en las transiciones del área sensora, empeorando la amplitud de la respuesta en intensidad de los interferómetros. Además, para estos mismos MZIs, la profundidad y anchura de canal y el espesor de SiO_2 de la capa de protección, coincidían con los valores nominales de fabricación.

Después de esta caracterización morfológica, fue necesario realizar una caracterización óptica de los MZIs. Para ello, se calcularon las pérdidas de propagación de las guías rectas de espesores de núcleo de 200 nm y de 75 nm, para ambas polarizaciones TE y TM y para la polarización TE respectivamente, haciendo uso de los métodos Fabry-Perot y cut-back. El método Fabry-Perot considera las guías de onda rectas como resonadores simétricos tipo Fabry-Perot, de tal forma que los cantos de las guías por donde se acopla la luz han de ser superficies especulares. Sin embargo, el método cut-back se basa en el cálculo de las pérdidas de propagación por cada tramo de guía recta de distinta longitud. Con este método y si el acoplo de luz se hace por fibra óptica monomodo, se puede calcular las pérdidas de inserción de la fibra óptica monomodo en la guía recta. Tanto las pérdidas de propagación, como las de inserción, alcanzaron valores muy bajos, lo que corroboraba la alta calidad óptica de las guías de onda empleadas. Por otro lado se calcularon las pérdidas en las uniones Y y de acoplamiento, también muy bajas, al igual que se hizo un estudio experimental del comportamiento modal del dispositivo. De esta forma, para alturas de escalón de 4 nm y anchuras de menos de 5 μm , se observó comportamiento monomodo en las dos direcciones del espacio. Sin embargo, para anchuras mayores, se podía excitar el segundo modo transversal.

Ya conocidas las pérdidas de propagación, de las uniones Y, de acoplamiento y de inserción de la fibra óptica monomodo en las guías rectas, al igual que estudiado su comportamiento modal, se caracterizó la sensibilidad homogénea de los distintos MZIs, obteniendo una alta coincidencia con los resultados teóricos.

El diseño del sensor está basado en el MZI por su alta sensibilidad y adecuación para ser fabricado como dispositivo integrado. Para conseguir esta alta sensibilidad, su montaje experimental debe presentar poco ruido y deriva y ser lo más compacto posible. Para ello se han diseñado diferentes sistemas experimentales que permiten una mayor integración, obtener información adicional en las medidas realizadas y presentar poco ruido y deriva en las señales de medida. Son los siguientes: una configuración con fibra óptica monomodo en la entrada y recogida de la señal y que fue empleada en la caracterización experimental de la sensibilidad homogénea. Presenta alto ruido y deriva en comparación con los otros, pero la inserción y recogida de luz con fibra óptica confiere mayor integración para futuros prototipos compactos. Otra configuración que es la que tiene un objetivo de entrada y otro de recogida y se emplea con los MZIs de 75 nm de espesor de núcleo. Presenta una gran estabilidad (es la configuración con menor ruido de todas las empleadas en la Tesis) y permite obtener el límite de detección en el cambio del índice de refracción externo del dispositivo. Este límite de detección se ha calculado en base a la mínima señal detectable por cambio de fase del MZI, que se la considera como tres veces la desviación estándar del ruido. De esta forma y atendiendo a la sensibilidad homogénea experimental calculada anteriormente, el límite de detección del MZI en el cambio en el índice de refracción externo y en esta configuración, toma el valor de $\Delta n = 1.08 \times 10^{-7}$ o lo que es lo mismo, un límite de detección en el cambio del índice de refracción efectivo del modo guiado de $\Delta n_{\text{eff}} = 2.05 \times 10^{-8}$. Este límite de detección tan bajo permite situar al MZI dentro del grupo de dispositivos ópticos de campo evanescente de medida directa más sensibles conocidos hasta el momento. La tercera configuración diseñada es la que tiene un objetivo en la entrada y una fibra óptica en la recogida y tiene muy bajo nivel de ruido y deriva, por lo que será empleada en las aplicaciones biosensoras para los MZIs de 75 nm de espesor de núcleo. De nuevo la fibra óptica de recogida confiere al sistema una

mayor integración. El último montaje experimental que se presenta, con menor ruido y deriva que el anterior, es el de doble polarización, en que un prisma óptico permite dividir la señal de recogida del MZI en dos señales polarizadas ortogonales, una en TE y otra en TM, con sus sensibilidades características. Esta configuración presenta por tanto una señal óptica adicional, que puede favorecer en ciertos casos la eliminación de la deriva o de artefactos que aparezcan en la señal de medida. También puede eliminar la ambigüedad de la señal periódica, propia de las zonas de menos sensibilidad. Será empleada con MZIs de 200 nm y para las aplicaciones biosensoras con ADN.

6.2 Desarrollo del biosensor y sus aplicaciones

En esta parte de la memoria se ha desarrollado un biosensor de alta sensibilidad superficial basado en los MZIs y se han presentado los resultados obtenidos de las dos aplicaciones biosensoras que fueron llevadas a cabo con este biosensor ya desarrollado. El primero tipo de aplicaciones está centrado en el campo de la Genómica y el segundo en el de la Proteómica. Así, la primera aplicación biosensora es la detección de reacciones de hibridación entre cadenas de ADN complementarias, junto con la detección de dos mutaciones internas en esas cadenas, mientras que la segunda es la detección de muy bajas concentraciones del pesticida carbaril mediante un inmunoensayo de inhibición.

Para el desarrollo del biosensor MZI, se ha funcionalizado la superficie del transductor mediante el proceso químico de la silanización, haciendo uso del compuesto MPTMS, que tiene un grupo tiol como grupo funcional. La técnica usada en esta etapa es la técnica de las SAMs, que recubre esta superficie con monocapas de silano funcionalizado. Para que la silanización sea eficiente y se formen monocapas uniformes y no agregados de polímero, es necesario que la superficie a silanizar esté bastante oxidada como para que haya el número suficiente de silanoles superficiales activos para enlazarse con el silano. Por ello, durante el protocolo seguido en la silanización, los MZIs fueron introducidos en un plasma de oxígeno para eliminar todos los residuos orgánicos remanentes del proceso de litografía y posteriormente, en un lavado con HNO₃ 10 % en agua destilada, para oxidar aún más la superficie del transductor. Además, la proporción de MPTMS ha de ser la adecuada, pues un exceso o defecto de agua en el proceso dificultaría seriamente la formación de las SAMs de silano, produciéndose agregados de polímeros desordenados.

Ya funcionalizada la superficie sensora, se inmovilizaron las moléculas biorreceptoras para posteriormente llevar a cabo las aplicaciones biosensoras. Para la detección de reacciones de hibridación y de mutaciones internas puntuales en el ADN, las moléculas biorreceptoras a inmovilizar fueron cadenas de oligonucleótido tiolado con un grupo sulfidrilo –SH en su extremo 5', de longitud 28 mers y con una secuencia de bases que corresponde a la del gen BRCA-1 (gen de supresión tumoral), pero con dos mutaciones puntuales internas en su secuencia. Estas dos mutaciones puntuales del gen BRCA-1 son las causantes del 80 % de los cánceres de mama en mujeres de 70 años de edad. El nivel de saturación se alcanzó para una concentración de 50 nM en solución tampón fosfato 50 mM y salino con NaCl 750 mM, PH=7, de tal forma que la respuesta del MZI para esta concentración fue de $\Delta\phi \approx 11 \times 2\pi$, lo que implicaba un espesor promedio de capa inmovilizada en torno al nanómetro (para este cálculo se hizo uso el método del índice efectivo). Previamente a esta inmovilización, que se llevó a cabo en flujo, se usaron las técnicas alternativas de radiomarcaje y fluorescencia, que

informaban si el protocolo seguido en la biofuncionalización de la superficie del transductor era el correcto. Mediante la técnica de radiomarcaje, se calculó que para la concentración de saturación, un número máximo de 8.8×10^8 moléculas del oligo tiolado habían sido inmovilizadas en el área sensora del MZI. Mediante la técnica de fluorescencia se llegó a la conclusión que no era posible reutilizar los MZIs para posteriores aplicaciones biosensoras, una vez que los biorreceptores habían sido inmovilizados en su superficie.

Para la detección de reacciones de hibridación, se hicieron pasar en flujo por el área sensora del MZI diferentes concentraciones del oligo complementario (que tiene una delección de dos bases adenina respecto a la secuencia complementaria de ADN del gen BRCA-1, aunque su secuencia complementaria es completa respecto a la inmovilizada) en la misma solución tampón que en el proceso de inmovilización. Primeramente las secuencias del oligo complementario utilizadas fueron cortas, de longitud 13 mers y reciben el nombre de MR(S). Las otras eran más largas, de 58 mers, reciben el nombre de MR y fueron con las que se obtuvo el límite más bajo en la detección del número de moléculas hibridadas en la superficie del transductor. Este límite de detección fue de 10 pM del oligo MR en solución, que equivale a 1.5×10^6 moléculas del oligo MR hibridadas en la superficie sensora del MZI o lo que es lo mismo, un recubrimiento superficial de capa hibridada de $\Gamma = 0.06 \text{ pg/mm}^2$.

En la detección de las dos mutaciones puntuales en el oligo MR, se siguió el mismo método que en la aplicación anterior. Se inyectaron distintas concentraciones del oligo WT-R, en la misma solución tampón, por la superficie sensora del MZI. Este oligo WT-R tiene una secuencia complementaria de bases idéntica a la del MR, pero con dos mutaciones internas (adición de dos bases de adenina) y corresponde a la secuencia complementaria completa del gen BRCA-1. En este caso el límite de detección alcanzado es más alto, de 25 nM.

Después de cada hibridación y para regenerar la superficie sensora con ADN inmovilizado (se rompen los puentes de hidrógeno entre las bases complementarias que forman la doble hélice), se inyectó HCl 2.5 mM en agua D.I. a T ambiente, de tal forma que la monocapa inmovilizada quedaba de nuevo preparada para hibridar.

Como control negativo se inyectaron distintas concentraciones de oligo no complementario (MF), una vez regenerada la superficie. El cambio de fase neto para cada concentración inyectada fue nulo, por lo que no había habido adsorciones inespecíficas en los procesos de hibridación anteriores.

En el caso de la detección del pesticida carbaril, se realizó un inmunoensayo de inhibición en que el análogo del pesticida (antígeno) se inmoviliza en la superficie sensora y la biomolécula (anticuerpo) que se detecta es aquella que ha quedado libre después de competir con el pesticida en solución. En los ensayos de inhibición la concentración de anticuerpo en la mezcla con el pesticida queda siempre fija, mientras que la del analito (pesticida) cambia para hacer posible la detección de una cantidad distinta de anticuerpo libre. Así, para el inmunoensayo realizado en esta Tesis, se inmovilizó el antígeno (proteína BSA) con su conjugado asociado (pesticida CNH) para posteriormente bloquear con etanolamina los huecos de la superficie sensora que habían quedado sin proteína. A continuación se hicieron pasar distintas concentraciones de dicho pesticida (CNH-45) con una misma concentración (1 $\mu\text{g/ml}$) de conjugado

asociado (LIB) en solución. Después de cada inmunoreacción se regeneró la superficie inmovilizada con HCL 0.1 M en agua DI. De esta forma se alcanzó un límite de detección del pesticida carbaril de LDO=0.1 $\mu\text{g/l}$.

Para finalizar se han descrito las posibles líneas futuras a realizar con el MZI. Todas ellas están encaminadas hacia la integración de las fuentes de luz, fotodetectores, conexiones eléctricas, sistemas de modulación y fluidica en un único chip integrado, gracias a las nuevas técnicas de micromecanizado y de fabricación con la tecnología microelectrónica del silicio y con la del SU-8. Así se podrá por fin obtener un microsistema total de análisis “laboratorio en un chip” que permita realizar todas las medidas clínicas y biomédicas de forma directa y a pie de campo.

Publicaciones relacionadas con la Tesis

1. J. Sánchez del Río, L.G. Carrascosa, A. Calle, C. Domínguez and L.M. Lechuga. ***Highly sensitive nanophotonic Si biosensors based on integrated Mach-Zehnder interferometers***. To be submitted to: Semiconductor Science and Technology (**invited paper**).
2. J. Sánchez del Río, L.G. Carrascosa, A. Calle, C. Domínguez and L.M. Lechuga. ***Dual polarization Mach-Zehnder Interferometer for Mismatching Base-Pair Detection and DNA testing with Picomolar sensitivity***. Submitted to Sensors&Actuators
3. Lechuga, L.M., Sepúlveda, B., Sánchez del Río, J., Blanco, F. , Calle, A. and Domínguez, C., ***Integrated micro- and nano-optical biosensor silicon devices CMOS compatible***. Proceedings of the SPIE, Optoelectronic Integration on Silicon, 2004. **5357** (96): p. 96-108
4. Lechuga , L.M., Mauriz, E., Sepúlveda, B., Sánchez del Río, J., Armelles, G., Domínguez, C., ***Optical Biosensor devices as early detectors of Biological and Chemical Warfare agents***, In Frontiers in Planar Lightwave Circuit Technology (design, simulation and fabrication). NATO Science Series. Mathematics, Physics and Chemistry. Ed. S. Janz. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht , Holanda. 2006. **216** (119-140)
5. Lechuga , L.M., Mauriz, E., Sepúlveda, B., Sánchez del Río, J., Llobera, A., Calle, A. y Domínguez, C. ***Optoelectronics sensors apply to Biology***, 2006. Óptica Pura y Aplicada. **39** (2): p.129-133
6. Sepulveda, B., Sánchez del Río J., Moreno, M., Blanco, F. J., Mayora, K., Dominguez, C., and Lechuga, L. M., ***Optical biosensor microsystems based on the integration of highly sensitive Mach-Zehnder interferometer devices***. Journal of Optics A: Pure and Applied Optics, 2006. **8**(7): p. S561-S566.
7. Sánchez del Río, J., Carrascosa L.G., Blanco, F.J., Moreno, M., Berganzo, J., Calle, A., Domínguez, C. and Lechuga, L.M. ***Lab-on-a-chip platforms based on highly sensitive nanophotonic Si biosensor for single nucleotide DNA testing***. Proceedings of the SPIE, Silicon Photonics II, 2007. **6477 6471B-1**
8. L.G. Carrascosa, E. Mauriz, J. Sánchez del Río, M. Moreno, K. Zinoviev, A. Calle, C. Domínguez and L.M. Lechuga. ***Portable nanobiosensor platforms for ultrasensitive multidetection of biological warfare agents in real time*** In Commercial and Pre-commercial Cell Detection Technologies for Defence against Bioterror – Technology, Market and Society NATO Security through Science. Series-B: Physics and Biophysics (to be submitted)

Contribuciones a congresos

1. Autores: B. Sepúlveda, J. Sánchez del Río, F. J. Blanco, A. Calle and C. Domínguez, A. Montoya and L.M. Lechuga
Título: Optical Microsystem platforms CMOS compatible based on Interferometric biosensor nanodevices.
Tipo de participación: Oral
Congreso: EUROPT(R)ODE VII (Seventh European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors)
Lugar celebración: Madrid-Spain
Fecha: Abril 2004

2. Autores: B. Sepúlveda, J. Sánchez del Río, F. J. Blanco, A. Calle, C. Domínguez , A. Montoya and L. M. Lechuga.
Título: Integrated Optical micro/nano devices CMOS compatible for Biosensing applications.
Tipo de participación: Oral
Congreso: IBERSENSOR '2004. 4nd IberoAmerican Conference on Sensors
Lugar celebración: Puebla (México) Fecha: Octubre 2004

3. Autores: J. Sánchez del Río, B. Sepúlveda, A. Calle, C. Domínguez and L. M. Lechuga.
Título: Integrated Micro/Nano-optical Biosensor devices Si CMOS compatible for microsystem applications
Tipo de participación: Oral Invitado
Congreso: IPRA-OSA. Integrated Photonics Research and Applications topical meeting
Lugar celebración: San Diego (California)
Fecha: Abril 2005

4. Autores: B. Sepúlveda, J. Sánchez del Río, F. J. Blanco, A. Calle, C. Domínguez , A. Montoya and L. M. Lechuga.
Título: Micro and Nano-optical Biosensor Devices for Real Applications
Tipo de participación: Oral Invited
Congreso: ICONO-LAT. International Conference on Lasers, Applications and technologies
Lugar celebración: St. Petersburg(Russia-Russia) Fecha: Mayo 2005

5. Autores: L.M. Lechuga, J. Sánchez del Río, B. Sepúlveda, F. Blanco, A. Calle and C. Domínguez
Título: Microsistemas BIOMEMS basados en interferómetros integrados Mach-Zehnder de silicio para aplicaciones biosensoras
Tipo de participación: Póster
Congreso: OPTOEL '05. Reunión Española de Optoelectrónica
Lugar celebración: Elche (Spain) Fecha: Julio 2005

6. Autores: J. Sánchez del Río, B. Sepúlveda, A. Calle, C. Domínguez nd L. M. Lechuga
Título: Integrated Optical micro/nano devices for Biosensing applications.
Tipo de participación: Póster
Congreso: EUROSENSORS '05.
Lugar celebración: Barcelona (Spain) Fecha: Septiembre 2005

7. Autores: B. Sepúlveda, J. Sánchez del Río, A. Calle, C. Domínguez and L. M. Lechuga
 Título: Optical Mirosystems development based on micro/Nanobiosensor devices.
 Tipo de participación: INVITED PAPER
 Congreso: Topical Meetings from the European Optical Society (EOS)
 Lugar celebración Capry (Italy) Fecha: Septiembre 2005
8. Autores: M. Moreno, L.G. Carrascosa, M. Álvarez, J. Sánchez del Río, B. Sepúlveda, E. Mauriz, J. Treviño, A. Calle and L.M. Lechuga
 Título: Nanobiosensor devices for early detetcion of cancer and infectious agents
 Tipo de participación: Póster
 Congreso: Acto de celebración: Ochoa, 100 años: mirando al futuro
 Lugar celebración: Madrid (Spain) Fecha: Noviembre 2005
9. Autores: J. Sánchez del Río, B. Sepúlveda, A. Calle, A. Llobera, C. Domínguez and L. M. Lechuga
 Título: Micro/nanophotonic biosensor based on integrated Mach-Zehnder interferometers for ultrasensitive DNA detections
 Tipo de participación: ORAL
 Congreso: SPIE Photonics Europe. Symposium: Optical sensing II
 Lugar celebración: Strasbourg (France) Fecha: Abril 2006
10. Título: A high sensitive DNA biosensor based on integrated MZI CMOS compatible
 Tipo de participación: POSTER
 Congreso: EUROPT(R)ODE VIII (Eighth European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors)
 Lugar celebración: Tübingen (Germany)
11. Autores: J. Sánchez del Río, M. Moreno, L. G. Carrascosa, B. Sepúlveda, A. Calle, C. Domínguez and L. M. Lechuga
 Título: Integrated Photonic biosensor for high sensitivity DNA testing.
 Tipo de participación: ABSTRACT
 Congreso: IBERSENSOR 2006. 5nd IberoAmerican Conference on Sensors
 Lugar celebración: Montevideo (Uruguay) Fecha: Septiembre 2006
12. Autores: L.G. Carrascosa, E. Mauriz, J. Sánchez del Río, M. Moreno, K. Zinoviev, A. Calle, C. Domínguez and L.M. Lechuga.
 Título: Lab-on-a-chip plattform based on highly sensitive nanophotonic Si Biosensors for single nucleotide DNA testing
 Tipo de participación: Poster
 Congreso: SPIE PHOTONICS WEST 2007
 Lugar celebración: San José, California, USA Fecha: Enero, 2007