

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Óptica con orientación en Óptica Física**

**Biosensor microfluídico plasmónico, para la
detección de antígenos**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Aram Azael Arriaran Rodriguez

Ensenada, Baja California, México

2020

Tesis defendida por

Aram Azael Arriaran Rodriguez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Víctor Ruiz Cortés

Codirector de tesis

Dra. Diana Garibo Ruiz

Codirector de tesis

Dr. Jacob Licea Rodríguez

Dr. Ricardo Téllez Limón

Dra. Patricia Juárez Camacho



Dr. Israel Rocha Mendoza

Coordinador del Posgrado en Óptica

Dra. Rufina Hernández Martínez

Directora de Estudios de Posgrado

Aram Azael Arriaran Rodriguez © 2020

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis

Resumen de la tesis que presenta Aram Azael Arriaran Rodriguez como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Óptica con orientación en Óptica Física.

Biosensor microfluídico plasmónico, para la detección de antígenos

Resumen aprobado por:

Dr. Víctor Ruiz Cortés

Codirector de tesis

Dra. Diana Garibo Ruiz

Codirector de tesis

La sensibilidad de la resonancia plasmónica de una película delgada de oro a cambios en las propiedades ópticas del medio circundante ha servido como base para el desarrollo de biosensores, haciendo que la sensibilidad sea una de las mayores ventajas de estos mismos, junto con el corto tiempo de análisis, abriendo la posibilidad de estudios dinámicos. En este trabajo de tesis se presenta el diseño y fabricación de un biosensor microfluídico plasmónico, para la detección de antígenos, utilizando la configuración de Kretschmann para la excitación de plasmones polaritones de superficie (PPS). El proceso para determinar la presencia de biopartículas específicas (antígeno) se realizó mediante la funcionalización de películas delgadas de oro (50 nm. de espesor), sobre un sustrato de vidrio, con el biorreceptor (anticuerpo) indicado. Este sustrato es colocado sobre el prisma semicilíndrico de la configuración de Kretschmann y se observa el desplazamiento angular del mínimo en intensidad del haz reflejado por el prisma. Las películas delgadas de oro se encuentran dentro de un sistema microfluídico. El sistema microfluído se fabricó en elastómero polidimetilsiloxano (PDMS) a partir de moldes maestros hechos con un proceso de fotolitografía. La implementación de un sistema microfluídico reduce el volumen de los químicos y muestras utilizadas.

Palabras clave: PPS, PDMS, biosensor, microfluídico, sensibilidad.

Abstract of the thesis presented by Aram Azael Arriaran Rodriguez as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Optics Physical Optics.

Plasmonic microfluidic biosensor for the detection of antigens.

Abstract approved by:

Dr. Víctor Ruiz Cortés

Thesis Co-Director

Dra. Diana Garibo Ruiz

Thesis Co-Director

The sensitivity of the plasmonic resonance of a gold thin film to changes in the optical properties of the surrounding medium has served as the basis for the development of biosensors, making sensitivity one of the greatest advantages of these sensors, along with the short time analysis, opening the possibility of dynamic studies. This thesis work presents the design and manufacture of a plasmonic microfluidic biosensor for the detection of antigens, using the Kretschmann configuration to excite the surface polariton plasmons (PPS). The process to determine the presence of specific bioparticles (antigen) was carried out by functionalizing thin gold films (50 nm thick), on a glass substrate, with the indicated bioreceptor (antibody). This substrate was placed on the semi-cylindrical prism of the Kretschmann configuration and the angular displacement of the minimum in intensity of the beam reflected by the prism is observed. The gold thin films are contained within a microfluidic system. The microfluidic system manufactured with polydimethylsiloxane elastomer (PDMS) from master molds made with a photolithography process. Implementing a microfluidic system reduces the volume of chemicals and samples used.

Keywords: SSP, PDMS, biosensor, microfluidic, sensibility

Dedicatoria

A mis padres y hermana.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por contribuir en gran parte de mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría.

Quiero agradecer a mi madre por el apoyo, cariño y paciencia que tuvo conmigo a lo largo de este trabajo presentado.

A mi padre que siempre estuvo apoyándome a su manera, dándome ánimos y consejos cuando era necesario.

A mi hermana por siempre estar dispuesta a ayudar cuando estaba atareado en otros asuntos.

A toda mi familia que estuvo para apoyarme. A mi primo Hugo Leonardo, y a su esposa Cinthia Zazueta, por ser amigos y familia.

Un gran agradecimiento a mis codirectores de tesis Dra. Diana Garibo Ruiz y Dr. Víctor Ruiz Cortés, por su apoyo a lo largo de este trabajo, sus enseñanzas, la paciencia que me tuvieron, sus consejos tanto académicos como personales, las risas, y sobre todo por el voto de confianza que me dieron para poder realizar esta tesis.

A los miembros de mi comité Dr. Jacob Licea Rodríguez, Dr. Ricardo Téllez Limón y Dra. Patricia Juárez Camacho, por aceptar ser parte de este trabajo, y siempre estar dispuesto a ayudar, a sus consejos tanto académicos como personales, y al gran apoyo que me otorgaron para poder terminar este trabajo.

Al Dr. Hugo Alejandro Borbón Núñez por ayudarme con el "Plasma Cleaner" aunque fuera en la tarde.

Al grupo de laboratorio por el apoyo, convivio y risas que compartimos estos años.

A mis amigos y compañeros de generación que estuvieron brindando su apoyo, Chu, Emilio, Pariente, Joe, Edgardo, Angela, Josué, David y Lambo, gracias por los recuerdos que forjamos, y sopórtame estos dos años.

Un gran agradecimiento a mis amigos que siempre han estado ahí para ayudarme, hacerme reír, y regañarme cuando se necesitaba, Miriam, Germán, Nando, Irving, Lechu, José, Araiza, y Claudita gracias por estar ahí desde la carrera.

A los amigos que forje estos últimos años, que llegaron de la nada, Shoal Kaduri, por siempre apoyarme y ayudarme a distraerme cuando era necesario. José Jesús Ocampo López por estar hasta altas horas de la noche en el último mes, para no distraerme ni rendirme. Christopher Juarez Fraijo alias el Pan, por brindar su apoyo, comprensión y chistes en el momento correcto. Al team Felix Carreto por sus tonterías, apoyo y diversión.

Por último, pero no menos importante, a mis amigos que han estado conmigo durante años, amistades que forje y que siempre han estado para apoyarme, para salir, darme consejos y para centrarme en lo que es importante, Joshua Orozco, Josué Pérez Jara, Saul Cabrera, Brenda Lopez, Gabriel Cordero, Mayrén Castillo, Luis Zamora, Martin Rodríguez y Sebastián Meneses.

Al departamento de física aplicada del CICESE por su incondicional hospitalidad en el transcurso de mi estancia ahí.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xii
Capítulo 1. Introducción	
1.1. Cáncer colorrectal	1
1.2. Etapas del cáncer de colon	3
1.3. Métodos de detección	3
1.4. Biosensores	5
1.5. Plasmones polaritones de superficie	7
1.5.1. Biosensores plasmónicos	9
1.6. Microfluídica	9
1.7. Justificación	10
1.8. Objetivos	10
1.8.1. Objetivos específicos	11
Capítulo 2. Antecedentes	
2.1. ACE	12
2.2. Anticuerpos	12
2.2.1. Estructura de anticuerpos	13
2.3. Antígenos	14
2.4. Ondas evanescentes	15
2.5. Plasmón polariton de superficie para dos medios.	18
2.6. Plasmón polariton de superficie en un sistema multicapa.	20
2.7. Configuración de Kretschmann	22
Capítulo 3. Metodología	
3.1. Fabricación de dispositivos optofluídicos	26
3.1.1. Diseño de sistema microfluídico	26
3.1.2. Fabricación de mascarillas	28
3.1.3. Fabricación de molde maestro	28
3.1.4. Fabricación de sistemas microfluídicos en PDMS	31
3.1.5. Pegado de microcanales	33
3.1.6. Implementación de sistemas para inyección de fluidos	35
3.2. Funcionlización de la superficie de oro por el metodo de monocapaz .	36

Tabla de contenido (continuación)

Capítulo 4. Resultados

4.1. Plasmón polariton de superficie en una película delgada de oro y aire, excitado con láser	39
4.1.1. Plasmón polariton de superficie en dos canales con película delgada de oro	41
4.2. PPS en una película de oro, excitados con un diodo emisor de luz	43
4.2.1. PPS en dos películas de oro, excitados con un diodo emisor de luz.	45
4.3. Excitación de PPS en un interfaz de oro-agua dentro de un sistema microfluídico	46
4.4. PPS excitado de una película de oro biofuncionalizado para glucosa oxidasa	48
4.5. Biofuncionalización por absorción de inmunoensayos	49

Capítulo 5. Conclusiones

Literatura citada	54
Anexos	56
A. Apendice A	56
B. Apendice B	57

Lista de figuras

Figura	Página
1. Tumor de CCR en mucosa rectal (middlesexhealth.org/learning-center/espanol/enfermedades-y-afecciones/c-ncer-rectal).	2
2. Dependiendo del área donde afecte el CCR se tendrán diferentes síntomas.	4
3. Configuración básica de un biosensor	6
4. Número de artículos publicados referentes a la detección de patógenos por diferentes técnicas en los últimos 20 años. Fuente ISI web of Source. Ca. 2500. artículos encontrados acerca de la detección de patógenos en los últimos 20 años. (Olivier Lazcka, 2007)	7
5. La copa Lycurgus tiene dos tipos de color diferente, dependiendo de como se observe. A)Color verde si se observa en reflexión. B) Color rojo intenso cuando se observa en transmisión (Uriarte Medina,2015).	8
6. Esquema de la molécula de inmunoglobulina. Las cadenas pesadas son representadas en color negro, mientras que las ligeras por gris claro. CH, dominios de la cadena pasada; CL, dominio de la cadena ligera (Merino, 2011).	13
7. Representación esquemática de la geometría para un haz incidente, reflejado y transmitido.	15
8. Representación esquemática de A) rayo refractado,B) Ángulo crítico, y C) Reflexión total interna	16
9. Representación esquemática de la reflexión total interna, una onda incide en el medio n_2 , con un índice mayor al medio n_1 , con un ángulo mayor al crítico, esto da como resultado una onda evanescente con decaimiento exponencial en el medio n_1	17
10. Ilustración esquemático del comportamiento del campo electromagnético de un plasmón polariton de superficie.	18
11. Geometría utilizada para el sistema de multicapa, que consiste en la capa I en vuelto en un sistema tipo sandwich entre dos medios semi-infinitos de los espacios II y III.	20
12. Relación de dispersión para tres sistemas diferentes (Uriarte Medina,2015).	22
13. Diagrama de la configuración de Kretschmann para la excitación de los PPS sobre una película delgada metálica.	23
14. Comportamiento de la reflectancia con respecto al ángulo de incidencia en configuración de Kretschmann para una sistema de 3 medios. (Novotny, 2006)	24
15. Comportamiento de la reflectancia con respecto al ángulo de incidencia en configuración de Kretschmann, con una película delgada de oro y un longitud de onda incidente de 650 nm.	25
16. Diseño de microcanales con el software de diseño para la fabricación de mascarillas.	27

Lista de figuras (continuación)

Figura	Página
17. Diagrama de flujo para la fabricación de un sistema microfluídico.	27
18. Diagrama de flujo para la fabricación de mascarilla para la fabricación de un dispositivo microfluídico.	28
19. Diagrama de flujo para la fabricación de un molde maestro.	29
20. Diagrama esquemático del proceso de fabricación del molde maestro. . . .	30
21. Resultado final del molde maestro.	31
22. Diagrama de flujo del proceso de fabricación de dispositivos optofluídicos en PDMS.	32
23. Recipiente que contiene el maestro, donde se vierte la mezcla de PDMS y curador, para la fabricación de microcanales en PDMS.	32
24. Diagrama esquemático del proceso de fabricación de microcanales en PDMS.	33
25. Diagrama de como fabricar los canales de PDMS	34
26. Fotografía despues de haber pegado el sustrato y el PDMS	35
27. Microbomba de la marca Micrux, modelo NE-4000 de dos jeringas para inyección de líquidos.	35
28. Sistema microfluídico con las mangueras de entrada y salida para la inyección de líquidos.	36
29. Principio general de detección inmunoenzimática del biosensor. I. representa la reacción química de un anticuerpo secundario marcado con la enzima HRP (Ab-HRP).	36
30. Biofuncionalización por monocapas.	37
31. Arreglo experimental óptico para la excitación del PPS, utilizando la configuración de Kretshmann, usando un láser de 650 nm de longitud de onda	38
32. Arreglo experimental óptico para la excitación del PPS, utilizando la configuración de Kretshmann, utilizando una lampara con una longitud de onda central de 621 nm	38
33. Arreglo experimental para la excitación de PPS variando el ángulo de incidencia.	40
34. Fotografía del PPS generado en la interfaz entre oro y aire	40

Lista de figuras (continuación)

Figura	Página
35. Gráfica de intensidad contra ángulo de incidencia, donde se observa que el decaimiento de la intensidad, esto representa la excitación del PPS en la película delgada de oro. Rectángulo azul.	41
36. A) Diagrama del sistema optofluídico. B) Fotografía del sistema optofluídico terminado..	41
37. Arreglo experimental para la excitación de PPS con un microcanal, que contiene dos películas de oro, con variando el ángulo de incidencia	42
38. Fotografía del PPS generado por un microcanal de dos con película de oro, con una interfaz de oro y aire. Rectángulo azul y verde, regiones de excitación de los PPS.	42
39. Gráfica de ángulo de incidencia contra intensidad.	43
40. Gráfica de intensidad contra longitud de onda de la lámpara LED.	44
41. Gráfica de intensidad contra longitud de onda de la lámpara LED.	44
42. Gráfica de intensidad contra longitud de onda de la lámpara LED.	45
43. Fotografía del PPS generado por un microcanal de dos con película de oro, con una interfaz de oro y aire, utilizando un diodo emisor de luz. Rectángulo azul y verde, regiones de excitación de los PPS.	45
44. Gráfica de ángulo de incidencia contra intensidad	46
45. Fotografía de un PPS generado en una interfaz oro-agua con un diodo emisor de luz.	47
46. Gráfica de ángulo de incidencia contra intensidad.	47
47. Fotografía de un PPS generado en una película de oro, biofuncionalizada por el método de fotopolímeros, para la glucosa oxidasa..	48
48. Gráfica de ángulo de incidencia contra intensidad.	49
49. Diagrama de absorción contra concentración de ACE.	50
50. Experimento de seguimiento.	51

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Desventajas de pruebas médicas para la detección del CCR	4

Capítulo 1. Introducción

El cáncer es un término común que se usa en un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo humano, también se habla de tumores malignos o neoplasias malignas. Una de las principales características del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina metástasis. Esta es la principal causa de muerte por cáncer.

En el 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) señaló que los cánceres que se diagnostican con mayor frecuencia a nivel mundial son los de pulmón, hígado, estómago, colorrectal (CCR), mama y esófago. Según los datos de la OMS, el cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo. Los 5 tipos de cáncer que causaron el mayor número de fallecimientos en 2012 son:

- Pulmonar (1.64 millones de defunciones)
- Hepática (788 000 defunciones)
- Colorrectal (774 000 defunciones)
- Gástrico (754 000 defunciones)
- Mamario (571 000 defunciones)

En el año 2015 se atribuyó que 8.8 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad (OMS, 2014).

1.1. Cáncer colorrectal

Según la OMS y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el CCR es el cuarto más común en el continente americano. Cada año se estima que hay más de 240,000 casos nuevos y aproximadamente 112,000 muertes debida a esta enfermedad (Cayon, 2014).

El CCR es el que se origina, como dice su nombre, en el colon o recto. A estos cánceres también se las puede llamar cáncer de colon o recto, sin embargo, se acostumbra

agruparlos por sus características en común, y un cáncer termina propiciando el otro.

En México, podría pensarse que el cáncer de mama ocupa la primera posición como un problema de salud pública, debido a los concurrentes impulsos e investigaciones realizadas, sin embargo, el cáncer en órganos del sistema digestivos ocupa el primer sitio con mayores tasas de morbilidad hospitalaria y principal causa de mortalidad (con 32.52 casos por cada 100 mil habitantes), comprendido en una población de 20 años y más (OMS, 2014 y 2015). El CCR es igual de frecuentes en ambos sexos.

En general el CCR se originan por un crecimiento en el revestimiento interno (figura 1) del colon o recto (ACS, 2014). Estos crecimientos son referidos como pólipos. Algunos tipos de pólipos se pueden convertir en cáncer, pero no todos los pólipos se convierten en tal. La probabilidad de que un pólipo se vuelva canceroso depende del tipo del mismo. Los dos principales son:

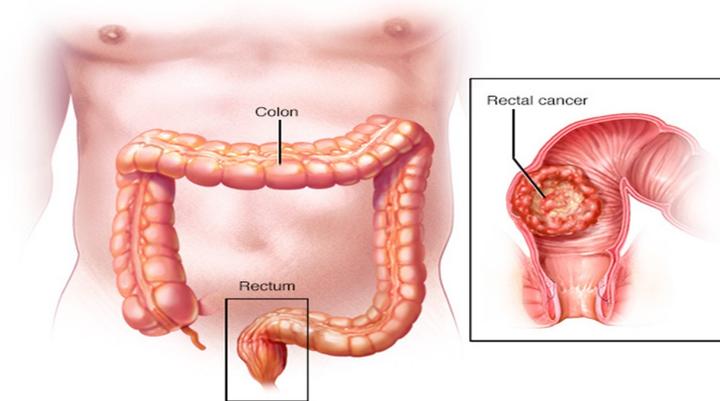


Figura 1. Tumor de CCR en mucosa rectal (middlesexhealth.org/learning-center/esp-anol/enfermedades-y-afecciones/c-ncer-rectal).

-Pólipos adenomatosos (adenomas): Estos pólipos algunas veces se transforman en cáncer. Debido a esto, los adenomas se denominan afecciones precancerosas.

-Pólipo inflamatorios e hiperplásicos: estos son más frecuentes pero en general no son precancerosos.

En 1965 Gold y Freedman (Gold y Freedman, 1965) descubrieron el primer marcador tumoral, el antígeno carcinoembrionario (ACE). El ACE es una glucoproteína de superficie celular altamente glucosilada. En el individuo sano existen múltiples fun-

ciones del ACE que han sido ampliamente estudiadas, su función como molécula de adhesión ha sido la más ampliamente estudiada (Félix, 2005). Su presencia en los seres humanos es tan normal que se sabe que diariamente se eliminan entre 50 y 70 mg de ACE en las heces de individuos sanos. El ACE se expresa en los tejidos de los adultos sanos, así como durante el desarrollo fetal, se expresa en el colon así como en células de lengua, esófago, estómago, cérvix y próstata. No obstante, su presencia elevada se relaciona a un grupo de sustancias conocidas como antígenos asociados a tumores. El ACE es mayormente utilizado para la detección de los cánceres de mayor interés nacional como; CCR, cáncer gástrico y cáncer de ovario.

1.2. Etapas del cáncer de colon

Para determinar que tan avanzado se encuentra el CCR, se han establecido 5 etapas. A continuación, se describen cada una de ellas:

La etapa 0 es la más temprana de todas ellas, en ésta el cáncer no ha crecido más allá de la capa interna del colon o recto.

La etapa I y II el cáncer ha crecido hacia las capas externas del colon o recto. En estas dos etapas el cáncer no se ha propagado a más allá de unos cuantos ganglios linfáticos, aún sin metástasis.

La etapa intermedia o etapa III el cáncer se ha propagado capas más externas del colon o del recto. No obstante, sigue sin propagarse a otros órganos, sin metástasis.

La etapa terminal o etapa IV el cáncer puede que se propague a otros órganos distantes como el hígado o el pulmón. En este punto ya hay metástasis, en esta etapa el cáncer es prácticamente incurable.

1.3. Métodos de detección

Los oncólogos para la detección del cáncer, se auxilian de técnicas convencionales como son la centrifugación, cromatografía, fluorescencia y la clasificación de células magnéticas activadas, biología molecular, etc., en todas ellas dependen de la experiencia y juicio subjetivo de personal altamente calificado (Chen, 2012). Diagnosticar

un cáncer en etapa temprana a través de imágenes transversales (tomografía computarizada) y biopsia no es frecuentemente posible, además de que son diagnósticos invasivos para los pacientes, con enfoque costoso, y produce sustancialmente interpretaciones falsas-negativas (Krebs, 2010; Hurt, 2008). Las pruebas médicas más comunes son la prueba inmunoquímica fecal (FIT) y la colonoscopia, no obstante tienen una serie de desventajas (tabla 1). Las manifestaciones clínicas del CCR dependen en gran medida de su localización. Los tumores del colon izquierdo (figura 2) suelen manifestarse por cambio de ritmo de evacuación, seudodiarrea, rectorragia y oclusión. Las neoplasias del colon derecho suelen producir anemia crónica por pérdida de sangre oculta en la deposición (Monotoro Huguet y García Pagán, 2012). Las mayores desventajas de los métodos de detección es que son procedimientos invasivos e incómodos para el paciente, y las interpretaciones erróneas en etapas tempranas del CCR.

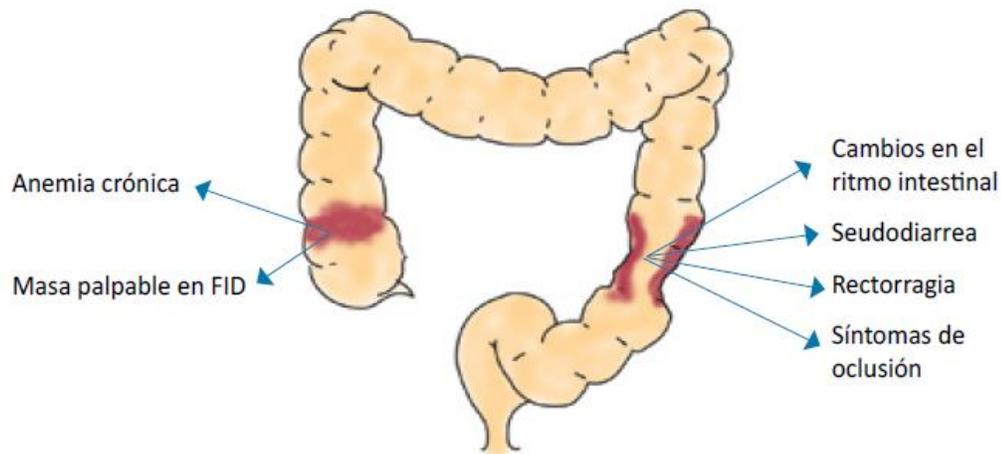


Figura 2. Dependiendo del área donde afecte el CCR se tendrán diferentes síntomas.

Tabla 1. Desventajas de pruebas médicas para la detección del CCR

Prueba	Desventajas
FIT.	Alimentos y medicamentos estropean interpretación de resultados.
	Interpretación errónea en etapas tempranas.
	Resultados falsos positivos.
	Se tienen que estar haciendo pruebas constantemente, para poder descartar padecimiento de CCR
Colonoscopia	Preparación total del intestino.
	Procedimiento invasivo e incómodo.
	Interpretaciones erróneas en etapas tempranas.
	Costos elevados.

Por lo tanto, un seguimiento de detección, control de niveles de ACE antes y des-

pués de una terapia de cáncer facilita el reconocimiento precoz de las recurrencias o la detección de metástasis (Lech *et al.* (2014)). Así, desde una perspectiva nacional e incluso internacional, hay motivos justificados para centrar las actividades en el desarrollo de herramientas con alta manufactura tecnológica que permitan mejorar la prestación de atención sanitaria en el ámbito público y alcanzar una mayor cobertura de atención con técnicas y métodos que puedan ser útiles en zonas con difícil acceso. Un sensor es un convertidor técnico, que toma una variable física (temperatura, distancia, presión, etc.) y la convierte en otra variable diferente, por ejemplo, en una señal eléctrica.

1.4. Biosensores

En la actualidad los sensores han sido explorados en distintas áreas, tales como: alimentos, farmacéutica, medicina, etc. Esto es debido a que ofrecen una serie de ventajas como: rápida respuesta con respecto a las pruebas tradicionales, sistemas de detección de alta sensibilidad y elevada especificidad. Especialmente en el área de la medicina, los sensores han sido muy atractivos por su posible miniaturización, con lo cual se permitiría su portabilidad y alcanzar una mayor cobertura en poblaciones de acceso difícil para la detección y determinación de biomoléculas de interés, por ejemplo; el antígeno carcinoembrionario (ACE). El ACE está implicado en la detección del CCR, el cual en la actualidad ha aumentado su incidencia en gente joven entre 25-30 años, anteriormente era más común en gente mayor de 60-65 años, por lo tanto este cáncer ha obtenido atención. Así, una gran demanda de métodos confiables para detección de cáncer es necesario, para poder ser utilizado como herramienta de seguimiento y diagnóstico temprano del cáncer, en etapas donde se puede combatir.

Un biosensor se define como un dispositivo analítico que se compone por un elemento de reconocimiento biológico (enzimas, aptámeros, anticuerpos, etc.), capaz de reconocer un analito, en contacto con un transductor físico-químico (piezoeléctrico, electroquímico, óptico, etc.) generando una respuesta cuantitativa o cualitativa del analito presente en la muestra. Como resultado de la interacción específica del elemento de reconocimiento biológico con el analito, se produce un cambio físico-químico que el transductor convierte en una señal medible. En la figura 3 se muestra el esquema básico de funcionamiento de un biosensor.

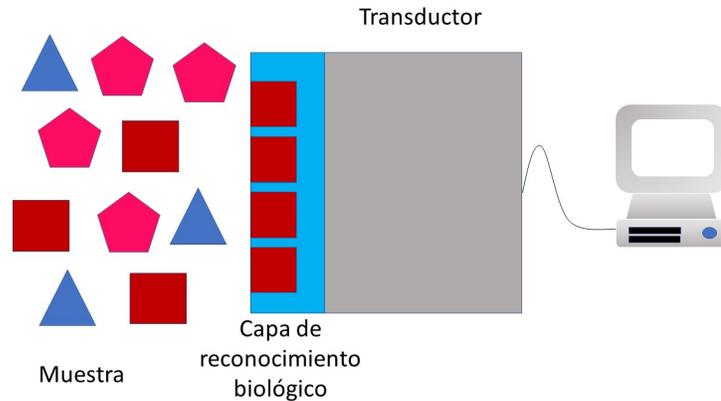


Figura 3. Configuración básica de un biosensor

Este tipo de sensores tienen varias características de las cuáles las que más destacan son la sensibilidad y la selectividad. Además de estas características, los biosensores presentan otras tales como:

- Versatilidad, que permite seleccionar diferentes receptores biológicos para determinar diferentes analitos.
- Capacidad de miniaturización.
- Bajo costo de producción, lo que permite su desarrollo comercial.
- Tiempo de análisis cortos.
- Pequeña cantidad de muestra.
- Mínimo tratamiento de la muestra.

Entre los biosensores hay tres tipos que son de mayor interés en la actualidad:

-Electroquímicos: En estos sensores, el elemento transductor basa su respuesta en la medida de una propiedad eléctrica generada en un sistema electroquímico (potencial), corriente, relación corriente-potencial. Según la técnica electroquímica utilizada, se dividen en conductimétricos, potenciométricos y amperométricos. Este tipo de transductores se caracteriza por su robustez, su sencilla y económica fabricación, su amplio rango de linealidad y cortos tiempos de respuesta (Garrido, 2013).

-Pizoeléctrico: Estos sensores tienen un transductor que basa su función en el fenó-

meno de la piezoelectricidad. Este tipo de transductores generan una tensión eléctrica proporcional a la aceleración por presión sobre un cristal piezoeléctrico. Son capaces de recibir desde bajas frecuencias hasta ultrasonidos (Ferrer, 2015).

-Ópticos: Los sensores ópticos, son sensores que pueden trabajar en entornos difíciles para sensores eléctricos. Estos pueden detectar diferentes propiedades físicas, tales como; presión, posición, cambio químicos, campos magnéticos, eléctricos, densidad, vibración, intensidad de la luz, radiación y color (Sabri *et al.*, 2013).

Dentro de la gama de biosensores, los ópticos son los que han tenido un gran avance tecnológico entre los demás biosensores como se muestra en la figura 4.

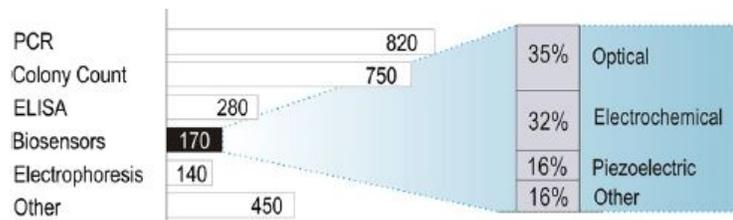


Figura 4. Número de artículos publicados referentes a la detección de patógenos por diferentes técnicas en los últimos 20 años. Fuente ISI web of Source. Ca. 2500. artículos encontrados acerca de la detección de patógenos en los últimos 20 años. (Olivier Lazcka, 2007)

Dentro de los sensores ópticos, se encuentran los sensores plasmónicos, los cuales se basan en el estudio de las propiedades del plasmón polaritón de superficie (PPS): tanto la teoría como las aplicaciones son usadas en el desarrollo de sensores químicos y biosensores, estos han tenido un gran avance en la actualidad (Gauglitz, 2004).

1.5. Plasmones polaritones de superficie

Bajo ciertas condiciones, los metales presentan un fenómeno intrínseco de la interacción luz-materia bajo condiciones de iluminación específicas, estos son los PPS, oscilaciones colectivas de los electrones de conducción en la interfaz formada entre un material dieléctrico y un material conductor cuando son excitados, al ser excitados dichos electrones, se crea un movimiento oscilatorio colectivo de los electrones en las superficies de los metales. Rufus Ritichie fue el primero en reportar estas ondas o PPS en 1950 (Vidal García y Moreno, 2008). Como los electrones al moverse disipan la energía, los PPS no se les había considerado para ser usados en dispositivos ópticos con la

finalidad de enviar información, ya que estas ondas no viajan grandes distancias en el material, y es disipada en forma de calor. Los PPS solo viajan algunas milésimas de milímetro, por lo tanto, no son adecuadas para transportar energía a distancias mayores. Sin embargo, estamos en una época donde la industria requiere que la tecnología sea miniaturizada. Así, estos PPS que se desplazan tan poco, que pueden ser una opción para ser implementados en aplicaciones nanotecnológicas.

El fenómeno de los PPS no es reciente, ya que se han observado desde el siglo IV, pero no se identificaban como tal. Un claro ejemplo es la copa de Lycurgus, que cuenta con más de 1600 años de antigüedad (figura 5). Esta copa tiene un color verde suave cuando se observa en reflexión y un rojo intenso cuando se observa en transmisión. Esto fue un misterio hasta los principios del siglo XIX, cuando se realizó un análisis microscópico al vidrio de la copa, en el cual se demostró que los artesanos que elaboraron la copa utilizaron una pintura que contenían nanopartículas de oro y plata de alrededor de 50 nm, ocasionando dichos efectos. Estos materiales también fueron utilizados para fabricar los vitrales de las catedrales medievales.



Figura 5. La copa Lycurgus tiene dos tipos de color diferente, dependiendo de como se observe. A) Color verde si se observa en reflexión. B) Color rojo intenso cuando se observa en transmisión (Uriarte Medina, 2015).

Los PPS han captado mucho la atención debido a las extensas aplicaciones que estos tienen, usándose ampliamente en sensores químicos y biosensores. La noción sobre la investigación de sensores con PPS empezó con Wood (Wood, 1902) quien fue el primero en observar anomalías en el espectro de la luz difractada por rejillas metálicas, hace más de 100 años, por otro lado, el primero en introducir los principios

de detección de gas y biosensado fue Liedberg (Liedberg *et al.*, 1983). Esta técnica de detección siguió progresando a la par de otras técnicas, sin embargo, está tomó relevancia por sus características en sensibilidad, y su detección en tiempo real (Prabowo *et al.*, 2018).

1.5.1. Biosensores plasmónicos

El biosensor óptico es probablemente el más popular en bioanálisis, esto por su sensibilidad y selectividad. Estos biosensores dan una rápida respuesta. Algunos ejemplos en los que han sido aplicado son en la detección de contaminantes, toxinas, drogas, patógenos entre otros. Sin embargo, esto no significa que tenga la mejor respuesta, ya que carece de una alta precisión, pero esto puede ser mejorado según la técnica que se use. El método que está ganando popularidad es el biosensor de resonancia de plasmones superficiales (SPR).

Para estos sensores se utiliza un prisma y una película delgada de metal. Al incidir luz en la interfaz metal-dieléctrico con el ángulo de incidencia necesario para alcanzar el efecto de reflexión total interna en el prisma, es posible excitar los electrones de la película delgada de oro, lo cual también dependerá de tener la longitud de onda adecuada para que el PPS entre en resonancia. La condición de resonancia de los plasmónes dependen del índice de refracción del medio. La resonancia del plasmón reduce la intensidad del haz reflejado de la luz con polarización p, esta ocasiona una caída en la reflectancia. Estos sensores tienen tiempos cortos de respuesta, alta sensibilidad, bajo costo de fabricación, y uso en diferentes campos, no solo en laboratorio.

1.6. Microfluídica

La microfluídica es la parte de la ciencia y tecnología de sistemas que procesan y manipulan pequeñas cantidades de fluidos (10^{-9} hasta 10^{-18} litros), usando canales con dimensiones desde décimas hasta centésimas de milímetros (Whitesides, 2006). Dentro de estos canales viajan los fluidos y partículas que se desean manipular.

Los sistemas microfluídicos tienen diversas aplicaciones potenciales en diferentes áreas (medicina, química, biología, etc.). La miniaturización de los dispositivos en estas

áreas tiene diferentes beneficios, entre ellos obtener dispositivos desechables; menor tiempo de análisis, reducir el consumo de muestras y analitos; mayor eficiencia de separación de muestras; y obtener dispositivos portables siendo ésta última el mayor beneficio (McDonald *et al.*, 2000).

1.7. Justificación

La detección oportuna y temprana del cáncer de colorectal (CCR) ha sido un gran reto dentro de todos los métodos de examinación actualmente aprobados. Cada uno de ellos tiene sus ventajas y desventajas. Resaltando las interpretaciones falso-negativo y/o falso-positivo y la pobre o nula detección en etapas tempranas. En la actualidad se han explorado biosensores electroquímicos para su detección a través del ACE, sin embargo, no existe evidencia de su aplicabilidad y utilidad en etapas tempranas de CCR. Se cree que un sensor óptico plasmónico basado en la inmunodetección del ACE, permitirá niveles altos de sensibilidad y especificidad, reutilización de superficie sensora y viable económicamente. Contribuyendo en una primera fase para la futura investigación e implementación en muestras reales. Para de esta manera ayudar a obtener un método de detección efectivo en etapas tempranas del CCR, que con ello podrá contribuir en el combate del cáncer sin que llegue a esparcirse por todo el cuerpo (metástasis) y derivar en muerte. Lo anterior en conjunto con la microfluídica, podría desarrollar dispositivos portátiles y de bajo costo.

1.8. Objetivos

El principal objetivo de este proyecto es crear un biosensor plasmónico microfluídico para detectar y corroborar la presencia del antígeno carcinoembrionario, usando con la configuración de Kretschmann para la excitación del plasmón en la película delgada de oro. Implementando un sistema microfluídico para la reducción de material a utilizar.

1.8.1. Objetivos específicos

- Desarrollar un sistema experimental para la excitación de PPS mediante la configuración de Kretschmann.
- Diseñar y fabricar sistemas microfluídicos con dimensiones y arquitecturas específicas.
- Deposito de película delgada de oro en regiones específicas de los canales microfluídicos para poder ser implementado en el biosensor plasmónico.
- Corroborar en el sistema experimental la excitación de PPS en la superficie transductora del biosensor.
- Demostrar como prueba de concepto la inmovilización del anticuerpos monoclonales de ACE (MAb_{ACE}) en la superficie transductora del biosensor

Capítulo 2. Antecedentes

En este capítulo se presenta la revisión de los fundamentos esenciales de la estructura de anticuerpos y ACE que serán empleados en la biofuncionalización de la superficie transductora del sensor y se revisarán los fundamentos teóricos necesarios para el estudio de los plasmones polaritones de superficie (PPS).

2.1. ACE

Los biomarcadores clínicos desempeñan un papel importante en la detección temprana de un cáncer, diseño de terapias individuales y para identificar los procesos subyacentes involucrados a la enfermedad (Madu Lu, 2010). Estos pueden estar asociados con un solo tipo de cáncer, mientras que otros están asociados con dos o más tipos de cáncer. Sin embargo, no existe un marcador universal que pueda detectar cualquier tipo de cáncer. El ACE es ampliamente utilizado en el CCR, como marcador pronóstico, estadificación y seguimiento de respuesta del tratamiento e indicador de metástasis a nivel hepático. Todos los cánceres se clasifican en diferentes etapas que pueden conllevar a diversas implicaciones y complicaciones en diversos órganos del cuerpo humano. En etapas primarias el cáncer de colon no muestra ningún síntoma. Etapas más tempranas del CCR se identifican con el valor 0 lo cual indica que es un cáncer muy precoz. De las etapas I a la IV es cuando empiezan los riesgos en la salud. Entre más bajo sea el número, menos se ha propagado el cáncer en el individuo.

2.2. Anticuerpos

El reconocimiento de un componente, siendo los anticuerpos en el suero de pacientes convalecientes de enfermedades infecciosas, marcó los inicios del desarrollo de la medicina preventiva (Machado *et al.*, 2000). El uso de estos anticuerpos protectores como fracciones de inmunoglobulinas crudas que se unen a los antígenos representó el primer tratamiento efectivo de numerosas enfermedades infecciosas.

Los anticuerpos, también denominados inmunoglobulinas (Ig), son glucoproteínas especializadas que hacen parte de la inmunidad humoral; son producidas por las cé-

lulas del sistema inmune llamadas células B, estas tienen la capacidad de reconocer otras moléculas específicas, siendo los antígenos.

La respuesta inmunológica específica se desarrolla cuando un organismo ha sido expuesto a uno o varios antígenos, originando una respuesta policlonal, es decir, la producción de anticuerpos contra un rango amplio de estructuras presentes en los antígenos. Por lo contrario, la respuesta monoclonal se da por la selección de un solo clon activado de células B que produce un anticuerpo para un determinante antigénico único.

2.2.1. Estructura de anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas que envuelven una estructura bioquímica compleja demarcada por la unión de cuatro cadenas proteicas: dos pesadas (CH), y dos ligeras (CL), unidos mediante puentes disulfuro (figura 6). Funcionalmente, los anticuerpos se dividen en una fracción que involucra el reconocimiento antigénico, denominada Fab' y Fab'', y una fracción cristalizante (Fc). Las regiones Fab están conformadas por una región variable y otra conservada. La región variable tiene una diversidad casi infinita para el reconocimiento de antígenos, gracias a las regiones determinantes de complementariedad (CDR), o regiones hipervariables; la región conservada ayuda a la estabilización de la reacción entre los segmentos CDR con el antígeno (figura 6).

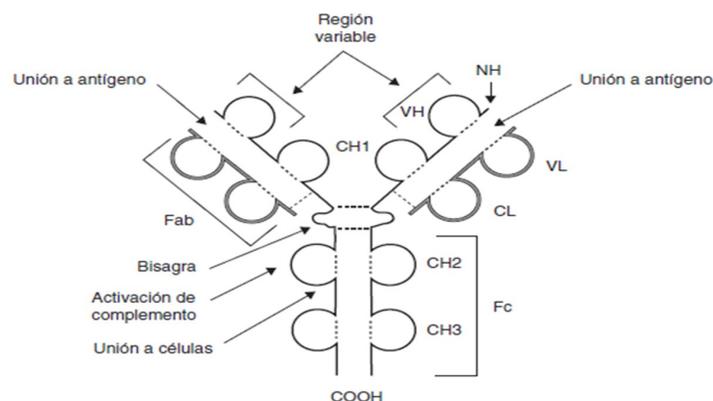


Figura 6. Esquema de la molécula de inmunoglobulina. Las cadenas pesadas son representadas en color negro, mientras que las ligeras por gris claro. CH, dominios de la cadena pasada; CL, dominio de la cadena ligera (Merino, 2011).

Los anticuerpos no sólo son componentes fundamentales del sistema inmune, sino que, junto con el estudio y el descubrimiento de sus funciones, han servido como herramientas biológicas útiles usadas de rutina en las áreas diagnósticas, terapéuticas y de investigación.

La propiedad de los anticuerpos de unirse con alta especificidad y afinidad a una molécula blanco permite su utilización como herramientas esenciales en investigación biomédicas y clínica, las cuales han probado ser invaluable para:

- Detectar y cuantificar niveles de expresión de genes.
- Determinar la localización de la expresión de genes a nivel celular, subcelular y en los tejidos.
- Inmunodiagnóstico: en el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas y sistémicas al permitir la detección de antígenos y anticuerpos específicos en la circulación o tejidos usando anticuerpos monoclonales en inmunoensayos.
- Diagnostico y tratamiento en tumores específicos: los anticuerpos monoclonales se usan en la detección de tumores mediante técnicas inmunológicas de diagnostico y para la inmunoterapia de tumores in vivo.

2.3. Antígenos

El Antígeno es una molécula de procedencia exógena o endógena que resulta extraña para el cuerpo. Puede ser específicamente unida por un anticuerpo o por un receptor de la célula T (por sus siglas en inglés, TCR), pero no necesariamente genera una respuesta inmune (Vega Robledo, 2009). Para aquellas moléculas que inducen una respuesta inmune, se ha propuesto el termino inmunógeno. Algunas moléculas pequeñas, pueden unirse específicamente a los anticuerpos, pero no activan a las células B o T (son antígenos, pero no inmunógenos).

El Epítopo o determinante antigénico, es el sitio o porción inmunodominante de un antígeno, a través del cual se une con un anticuerpo o con un receptor linfocito T. De esta manera, un mismo antígeno puede tener epítomos para unirse con anticuerpos o con el receptor de la célula. Los anticuerpos reconocen a la estructura expuesta, primaria o terciaria, del antígeno nativo y los receptores de T principalmente a la

primaria, lo que implica la existencia de dos tipos de epítomos.

-Lineal: formado por secuencias de aminoácidos continuos y contiguos.

-Conformacional: constituido por secuencias de aminoácidos continuos o discontinuos y distantes, que se aproximan entre sí debido al plegamiento o conformación tridimensional del antígeno.

2.4. Ondas evanescentes

La plasmónica es el estudio de la interacción de la radiación electromagnética (luz) y los electrones libres en la interfaz metal-dieléctrico. Los PPS se manifiestan como un campo evanescente de cierta intensidad que decae exponencialmente en z (figura 9).

Cuando una onda plana incide en un interfaz parte de esta será transmitida y otra parte reflejada, la onda transmitida se propagará por el segundo medio, mientras que la reflejada seguirá propagándose por el primer medio como se muestra en la figura 8a. Estas ondas planas pueden ser descritas por las siguientes ecuaciones:

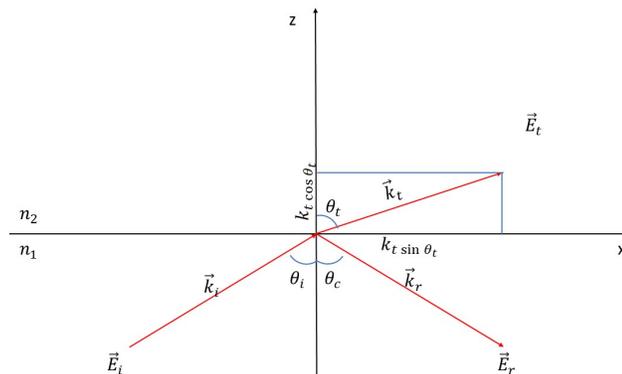


Figura 7. Representación esquemática de la geometría para un haz incidente, reflejado y transmitido.

$$\begin{aligned}
 \vec{E}_i &= E_{0i} e^{-i\vec{k}_i \cdot \vec{r}}, \\
 \vec{E}_t &= E_{0t} e^{-i\vec{k}_t \cdot \vec{r}}, \\
 \vec{E}_r &= E_{0r} e^{-i\vec{k}_r \cdot \vec{r}},
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

Considerando una onda plana incidente en un interfaz de medio1/medio2, donde el índice del medio 1 (n_1) es mayor del índice de refracción del medio 2 (n_2) y se incrementa el ángulo de incidencia con respecto a la normal, el haz de luz transmitida se acerca a la interfaz entre ambos medios, hasta tener un ángulo de 90 grados y esto hace que este en paralelo con la superficie (figura 8b), a esto se le conoce como ángulo crítico, y esta determinado por la ecuación:

$$\theta_c = \text{sen}^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right), \quad (2)$$

y se genera la condición de reflexión total interna bajo esta condición se genera una onda evanescente en la interfaz en el medio n_2 (figura 8c), en este caso ya no tendremos onda transmitida, y el ángulo de la onda incidente será igual que el de onda reflejada.

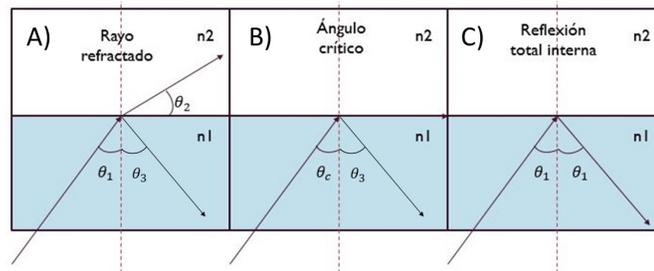


Figura 8. Representación esquemática de A) rayo refractado, B) Ángulo crítico, y C) Reflexión total interna

La onda evanescente está descrita por la siguiente ecuación:

$$\vec{E}_t = E_{0t} e^{-i\vec{k}_t \cdot \vec{r}} \quad (3)$$

donde

$$\vec{k}_t \cdot \vec{r} = k_{tx}x + k_{tz}z \quad (4)$$

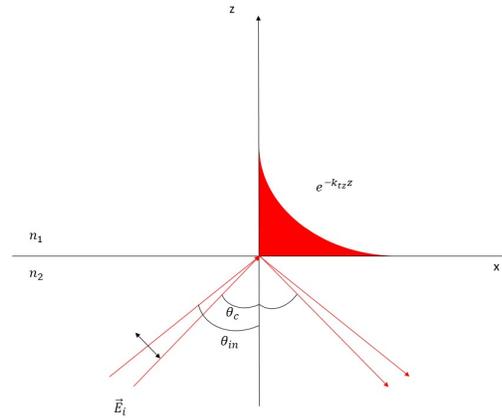


Figura 9. Representación esquemática de la reflexión total interna, una onda incide en el medio n_2 , con un índice mayor al medio n_1 , con un ángulo mayor al crítico, esto da como resultado una onda evanescente con decaimiento exponencial en el medio n_1

Se sabe que:

$$k_{tx} = k_t \sin \theta_t \quad (5)$$

$$k_{tz} = k_t \cos \theta_t \quad (6)$$

De la ley de Snell se obtiene que k_t :

$$k_t \cos \theta_t = \pm k_t \left(1 - \frac{n_1^2}{n_2^2} \sin^2 \theta_i \right)^{1/2} \quad (7)$$

como en este caso se sabe que $\sin \theta_i > \frac{n_1}{n_2}$

$$k_t \cos \theta_t = \pm k_t \left(1 - \frac{n_1^2}{n_2^2} \sin^2 \theta_i \right)^{1/2} = \pm i\beta \quad (8)$$

$$k_{tx} = k_t \frac{n_2^2}{n_1^2} \sin \theta_i \quad (9)$$

$$\vec{E}_t = E_{0t} e^{\mp i\beta y} e^{k_{tx} \frac{n_2^2}{n_1^2} \sin \theta_i} \quad (10)$$

Esta expresión representa un campo que decae exponencialmente.

2.5. Plasmón polariton de superficie para dos medios.

Los PPS, son excitaciones electromagnéticas que se propagan en la interfaz entre un dieléctrico y un conductor. Estas ondas electromagnéticas de la superficie surgen a través del acoplamiento de los campos electromagnéticos a las oscilaciones de los electrones de conducción (Maier, 2007). En los plasmones, un campo electromagnético de excitación se acopla a las oscilaciones de los electrones libres del metal (electrones del plasma) y se propaga por la interfaz como una onda. Esta propagación tiene líneas de campo que penetran en ambos medios como se muestra en la figura 10.

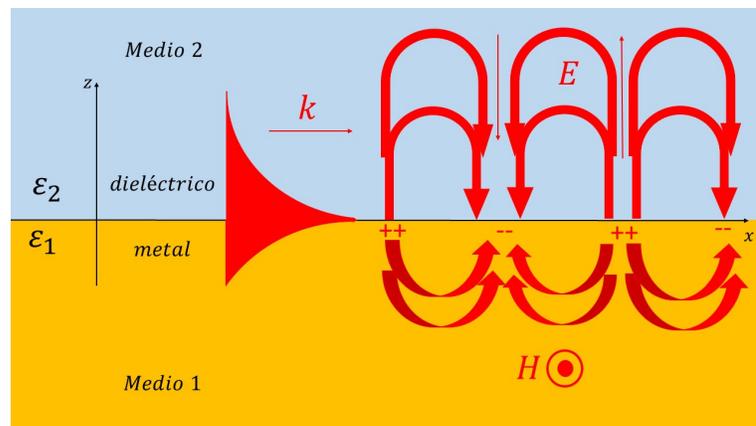


Figura 10. Ilustración esquemática del comportamiento del campo electromagnético de un plasmón polariton de superficie.

En la superficie de un metal, los electrones pueden realizar fluctuaciones coherentes, llamadas oscilaciones colectivas del plasma de superficie. La existencia de este efecto fue demostrada por Powell y Swan (Powell y Swan, 1965), en sus experimentos de pérdida de energía en electrones en aluminio. La frecuencia ω de estas oscilaciones longitudinales está unida a su vector de onda k_z por la relación de dispersión. Estas fluctuaciones de carga pueden ser localizadas en la dirección z , están acompañadas por las componentes transversal y longitudinal de campo electromagnético el cual desaparece cuando $|z| \rightarrow \infty$ y tiene su máximo en la superficie $z=0$, lo que es normal de las ondas de superficie.

Se describen los campos en el medio 1 y en el medio 2:

$$\vec{H}_2 = (0, H_{y2}, 0)e^{i(k_x x + k_z z - \omega t)} \quad (11)$$

$$\vec{E}_2 = (E_{x2}, 0, E_{z2})e^{i(k_x x + k_z z - \omega t)} \quad (12)$$

$$\vec{H}_1 = (0, H_{y1}, 0)e^{i(k_x x - k_z z - \omega t)} \quad (13)$$

$$\vec{E}_1 = (E_{x1}, 0, E_{z1})e^{i(k_x x - k_z z - \omega t)} \quad (14)$$

donde E es el campo electrico y H el campo magnetico, siendo positivo para $z \geq 0$, y negativo para $z \leq 0$ y con k_z imaginaria, lo que ocasiona el decaimiento exponencial del campo E_z . El vector de onda k_x , es paralelo a la direcci3n de x ; $k_z = 2\pi/\lambda_p$, donde λ_p es la longitud de onda de la oscilaci3n del plasma. Estos campos deben satisfacer las ecuaciones de Maxwell y las condiciones de frontera para producir la relaci3n de dispersi3n para los PPS en la superficie plana del metal con una constante diel3ctrica ($\epsilon_1 = \epsilon'_1 + i\epsilon''_1$), estando en contacto con un diel3ctrico con constante diel3ctrica ϵ_2 , se deben satisfacer las siguientes ecuaciones:

$$D_0 = \frac{k_{z1}}{\epsilon_1} + \frac{k_{z2}}{\epsilon_2} = 0, \quad (15)$$

$$\epsilon_i \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 = k_x^2 + k_{zi}^2, \quad (16)$$

de manera que

$$k_{zi} = \left[\epsilon_i \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_x^2 \right]^{1/2}, \quad i = 1, 2 \quad (17)$$

El vector de onda k_z es continuo a trav3s de la interfaz. La relaci3n de dispersi3n de los plasmones puede ser escrita como

$$k_x = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2} \right)^{1/2} \quad (18)$$

2.6. Plasmón polariton de superficie en un sistema multicapa.

Para excitar el PPS en un sistema multicapa tipo sandwich donde en el centro esta el medio uno que es el medio conductor, entre dos medios dielectricos como se observa en la figura 11. En este sistema, cada interfaz se puede excitar el PPS. Para modos TM:

$$\vec{E} = (E_x, 0, E_z) \quad (19)$$

$$\vec{H} = (0, H_y, 0) \quad (20)$$

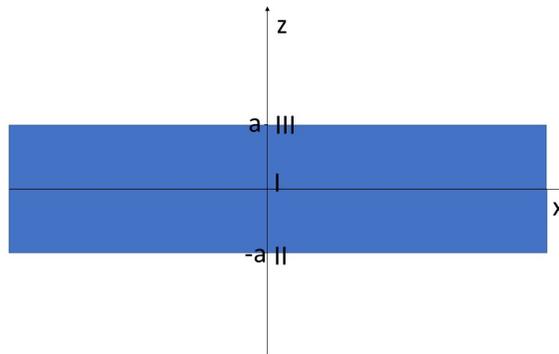


Figura 11. Geometría utilizada para el sistema de multicapa, que consiste en la capa I en el centro de un sistema tipo sandwich entre dos medios semi-infinitos de los espacios II y III.

En este caso solo estamos interesados en los modos acoplados de bajo orden, para comenzar haremos una descripción general de modos TM que no son oscilatorios en la dirección z normal a la interfaz. Para $z > a$, los componentes son (Maier, 2007):

$$H_y = Ae^{i\beta_x} e^{-k_3 z} \quad (21)$$

$$E_x = iA \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_3} k_3 e^{i\beta_x} e^{-k_3 z} \quad (22)$$

$$E_z = -A \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_3} e^{i\beta_x} e^{-k_3 z} \quad (23)$$

Para $z < -a$ (Maier, 2007)

$$H_y = Be^{i\beta_x} e^{k_2 z} \quad (24)$$

$$E_x = -iB \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_2} k_2 e^{i\beta_x} e^{k_2 z} \quad (25)$$

$$E_z = -B \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_2} e^{i\beta_x} e^{-k_2 z} \quad (26)$$

Haciendo que los campos decaigan exponencialmente en los medios II y III. En la región de $-a < z < a$, los modos localizados en la interfaz entre la parte superior e inferior.

$$H_y = Ce^{i\beta_x} e^{k_1 z} + De^{i\beta_x} e^{-k_1 z}, \quad (27)$$

$$E_x = -iC \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_1} k_1 e^{i\beta_x} e^{k_1 z} + iD \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_1} k_1 e^{i\beta_x} e^{-k_1 z}, \quad (28)$$

$$E_z = C \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_1} e^{i\beta_x} e^{k_1 z} + D \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_1} e^{i\beta_x} e^{-k_1 z}, \quad (29)$$

Despejando la ecuación anterior se encuentra la Relación de dispersión para tres medios (Maier, 2007)

$$e^{-4k_1 a} = \frac{\left[\frac{k_3}{\epsilon_3} + \frac{k_1}{\epsilon_1} \right] \left[\frac{k_1}{\epsilon_1} + \frac{k_2}{\epsilon_2} \right]}{\left[-\frac{k_3}{\epsilon_3} + \frac{k_1}{\epsilon_1} \right] \left[-\frac{k_2}{\epsilon_2} + \frac{k_1}{\epsilon_1} \right]}, \quad (30)$$

2.7. Configuración de Kretschmann

En esta sección se menciona el método utilizado para la excitación de los PPS. El cual fue propuesto en 1968 por los físicos Kretschmann y Raether.

La relación de dispersión de la luz en un dieléctrico, no se cruza (figura 12) con la relación de dispersión de la interfaz metal-aire lo cual hace imposible poder excitar plasmones simplemente aumentando la frecuencia al campo electromagnético, debido a que el valor mayor que el vector de onda que puede obtener en el dieléctrico está descrito por:

$$k_{diel} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d} \quad (31)$$

mientras que la relación de dispersión de los electrones en la interfaz es:

$$k_{pps} > \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d} \quad (32)$$

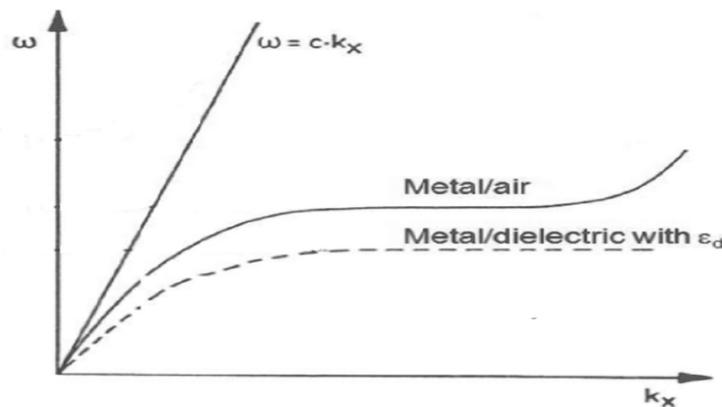


Figura 12. Relación de dispersión para tres sistemas diferentes (Uriarte Medina,2015).

Teniendo esto en cuenta, se hace uso de distintas técnicas que logren disminuir la pendiente de la relación de dispersión de la luz para así lograr igualar las frecuencias. Una de estas técnicas es el uso de prismas con alto índice de refracción. Además de que es posible modificar ese valor cambiando el ángulo de incidencia con el propósito

de igualar ambos vectores de onda. Uno de estos arreglos experimentales para excitar plasmones por medio de prismas, es la configuración de Kretschmann.

La configuración de Kretschmann esta basa en la técnica de reflexión total interna, y son modeladas matemáticamente usando las expresiones de los coeficientes de reflexión de Fresnel para la polarización p. La configuración se muestra en la figura 13

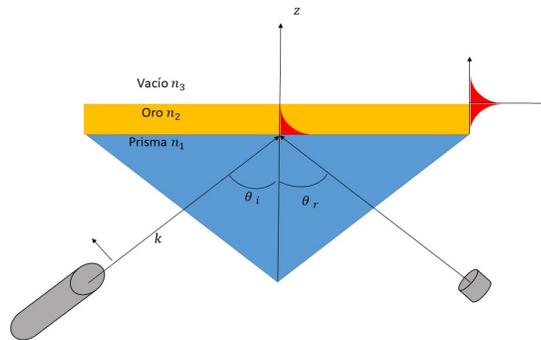


Figura 13. Diagrama de la configuración de Kretschmann para la excitación de los PPS sobre una película delgada metálica.

Se utiliza un prisma con un medio n_1 con el fin que el vector de onda k de la luz que llega a la interfaz del prisma con el metal, entre en resonancia con los electrones libres del metal, para que de esta manera el PPS viaje confinado en el interfaz prisma-metal. La condición de excitación de los PPS se da cuando la componente tangencial del vector de onda incidente es igual al vector de onda del PPS. Para poder generar el acoplamiento entre ambos vectores de onda, es necesario variar el ángulo de incidencia θ_i del haz incidente, cuando esté pase parte de la energía que este en la interfaz metal-dieléctrico se acopla, y no habrá luz reflejada.

$$k_{tx} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} = k_{pps} \quad (33)$$

Graficando la reflectancia R vs ángulo de incidencia θ_i . Se observa que para un valor de θ_i , R tiene un mínimo. Este ángulo es el que satisface las condiciones de

acoplamiento para excitación del PPS. En la figura 14 (Novotny y Hecht, 2006), se muestra la reflectancia en función del ángulo de incidencia para películas delgadas de plata de diferentes espesores.

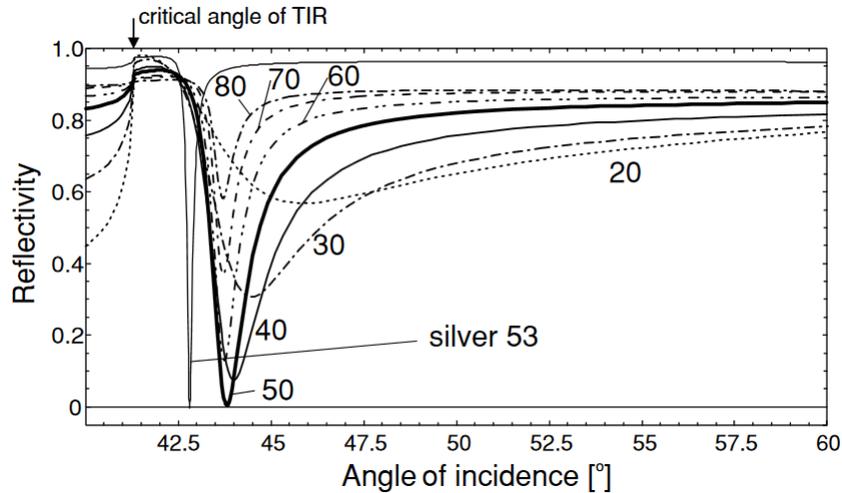


Figura 14. Comportamiento de la reflectancia con respecto al ángulo de incidencia en configuración de Krestchmann para un sistema de 3 medios. (Novotny, 2006)

Comparando la figura 14 con la figura donde se observa el acoplamiento del PPS pero en una película delgada de oro (figura 15, este PPS es excitado a una longitud de onda diferente a la de la plata, en este caso de longitud de onda (650nm), se puede observar que el ángulo de acoplamiento es diferente al de la gráfica de la plata, de la misma manera de acuerdo al espesor de la película delgada cambia el porcentaje de acoplamiento.

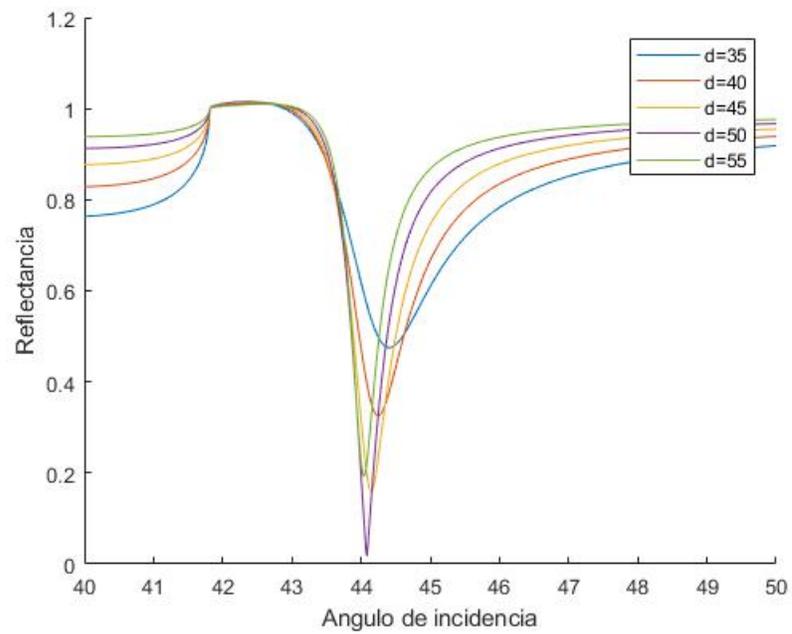


Figura 15. Comportamiento de la reflectancia con respecto al ángulo de incidencia en configuración de Krestchmann, con una película delgada de oro y una longitud de onda incidente de 650 nm.

Capítulo 3. Metodología

En este capítulo se describe la metodología aplicada para la fabricación de los dispositivos microfluídico y la metodología para llevar acabo la biofuncionalización en una película de oro.

3.1. Fabricación de dispositivos optofluídicos

Los dispositivos optofluídicos son utilizados en diferentes áreas como biosensores, dispositivos para la selección de partículas, sistemas de mezclado, entre otros. En este trabajo se utiliza como biosensor para encontrar la biopartícula modelo ACE. Se encontraron varias ventajas en trabajar con sistemas microfluídicos, como por ejemplo la disminución de reactivos, tener un sistema portable de tamaño pequeño y bajo costo de fabricación. El polímero utilizado para fabricar estos dispositivos es el polidimetilsiloxano (PDMS), que es económico, inerte y transparente.

Para la manufactura de estos sistemas es necesario seguir una serie de pasos, los cuales son: fabricación de mascarillas, fabricación de maestro, fabricación de microcanales con PDMS, pegado de los microcanales y sistemas de inyección de fluidos.

En la figura 17 se muestra el diagrama de flujo para la fabricación de los dispositivos microfluídicos y su descripción se hará en las siguientes secciones.

3.1.1. Diseño de sistema microfluídico

Para el diseño de microcanales, es necesario usar un programa de diseño, como AUTOCAD, PHOTOSHOP, CORELDRAW entre otros. Para este trabajo se utiliza CORELDRAW, usando este programa se realizó el diseño de la mascarilla (figura 16).

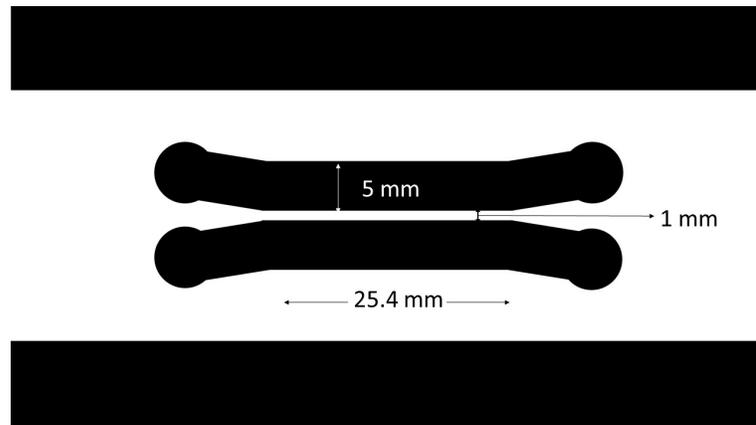


Figura 16. Diseño de microcanales con el software de diseño para la fabricación de mascarillas.

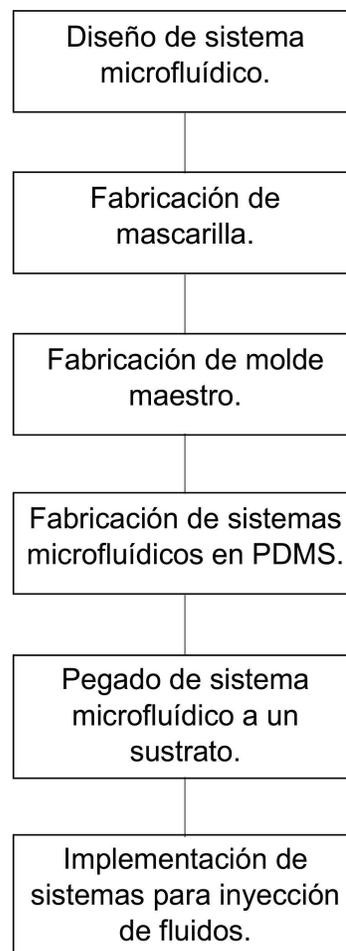


Figura 17. Diagrama de flujo para la fabricación de un sistema microfluídico.

3.1.2. Fabricación de mascarillas

La mascarilla es el elemento donde se graban los diseños de los microcanales. Se utilizan acetatos fotográficos para grabar dichos diseños mediante un proceso de revelado, similar al utilizado con las fotografías. Esta mascarilla tiene secciones oscuras y transparentes, para poder grabar el maestro, por medio de un proceso fotolitográfico.

Para la fabricación de la mascarilla (figura 18), ésta se diseñó en CORELDRAW (figura 16), se proyecta el diseño en una pantalla de televisión 4k marca SAMSUNG, con 3840 píxeles horizontales y 2160 píxeles verticales. Mediante una cámara de película fotográfica, se enfoca hasta tener una imagen del tamaño sustrato de vidrio, una vez tomada la fotografía, se revela el acetato. El resultado será una mascarilla con los colores invertidos del diseño original.

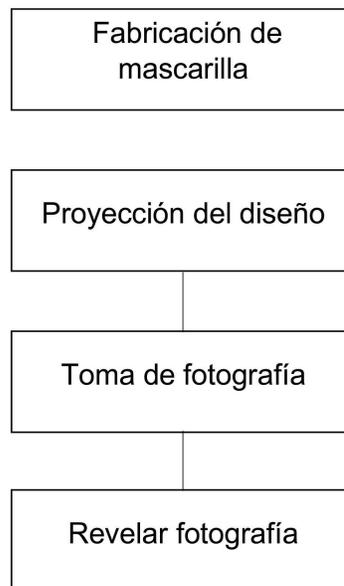


Figura 18. Diagrama de flujo para la fabricación de mascarilla para la fabricación de un dispositivo microfluídico.

3.1.3. Fabricación de molde maestro

El molde maestro es sobre el cual se vertió el PDMS, para que este quede copiado sobre la superficie del mismo. Este puede ser reutilizado para poder crear múltiples microcanales de PDMS.

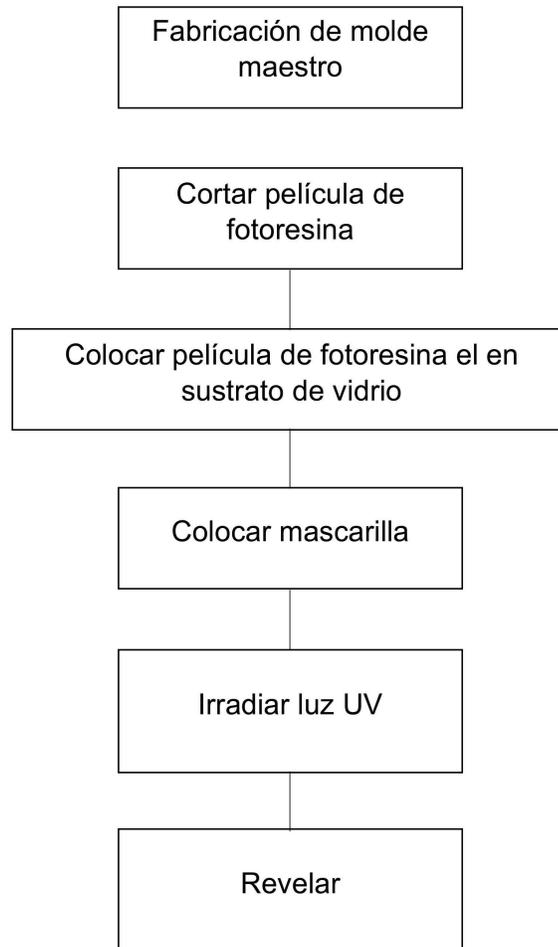


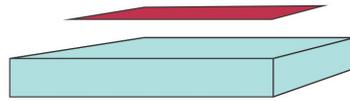
Figura 19. Diagrama de flujo para la fabricación de un molde maestro.

Para la creación de un molde maestro (figura 20), se cortó un pedazo de película de fotoresina del tamaño del sustrato de vidrio (3" x 1"), es necesario quitar la primera capa protectora de plástico de la película de fotoresina, esto deja expuesto un adhesivo para fijarlo al sustrato de vidrio. Para tener un correcto pegado se le administra calor, y después con ayuda de papel se le frota repetidamente, hasta que la película de fotoresina esté completamente pegada al sustrato de vidrio. Se colocó la mascarilla sobre el sustrato de vidrio con película de fotoresina, se le irradia con luz UV durante 45 segundos. Se retira la última capa protectora para poder revelar la película de fotoresina y de esta manera se retiró las secciones donde la luz UV no incidió. El resultado final se puede observar en la figura 21.

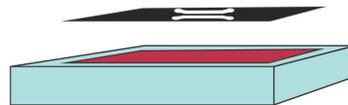
Porta objetos de vidrio



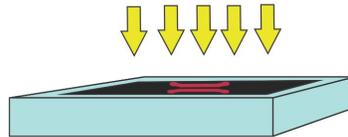
Cortar y colocar "dryfilm"



Colocar mascarilla sobre porta objetos



Iluminar con luz UV



Revelar la película de fotoresina



Figura 20. Diagrama esquemático del proceso de fabricación del molde maestro.

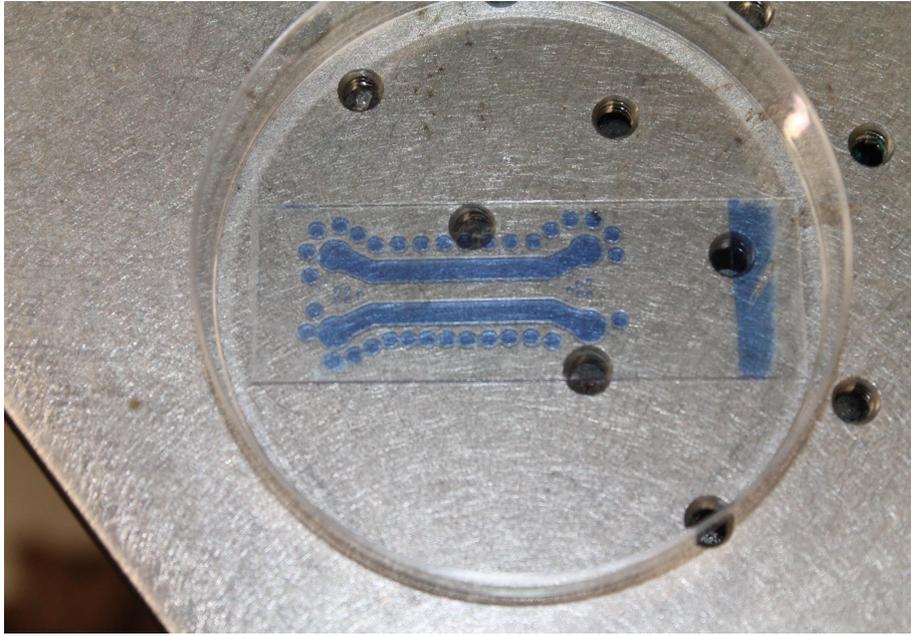


Figura 21. Resultado final del molde maestro.

3.1.4. Fabricación de sistemas microfluídicos en PDMS

Para la creación de los microcanales con PDMS (figura 22) se utilizó el elastómero Sylgard tipo 184 de Dow Corning que consta de dos agentes químicos, base de elastómero de silicón y agente curados de elastómero de silicón, que al mezclarlos con una proporción de 10:1 da una capa de PDMS determinada por la cantidad de gramos utilizados. La mezcla puede contener burbujas de aire por lo que se colocó en una campana de vacío durante 15 minutos, o hasta que no se observen burbujas de aire en la mezcla. Se vierte sobre un recipiente (figura 23) donde se encuentra el molde maestro, se colocó el recipiente en un horno a una temperatura 100 grados centígrados durante 20 minutos. Al terminar, se retira el PDMS del molde maestro, y así se obtuvo un sistema microfluidico impreso en PDMS con $25\mu\text{m}$ de espesor . Como resultado se obtiene un material transparente e inherente, tal y como se observa en la figura 24.

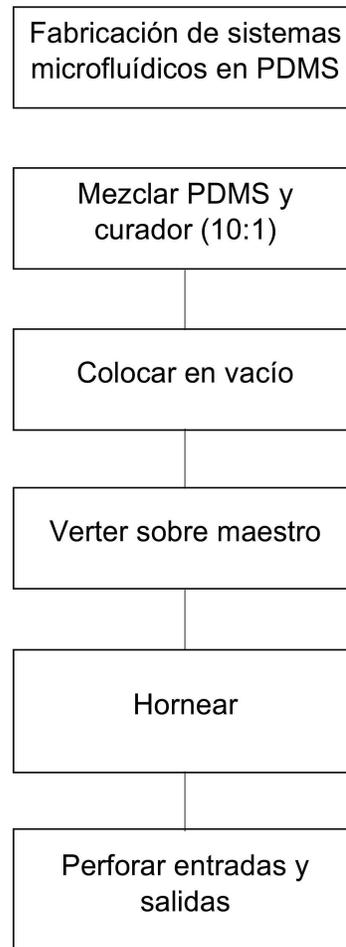


Figura 22. Diagrama de flujo del proceso de fabricación de dispositivos optofluídicos en PDMS.

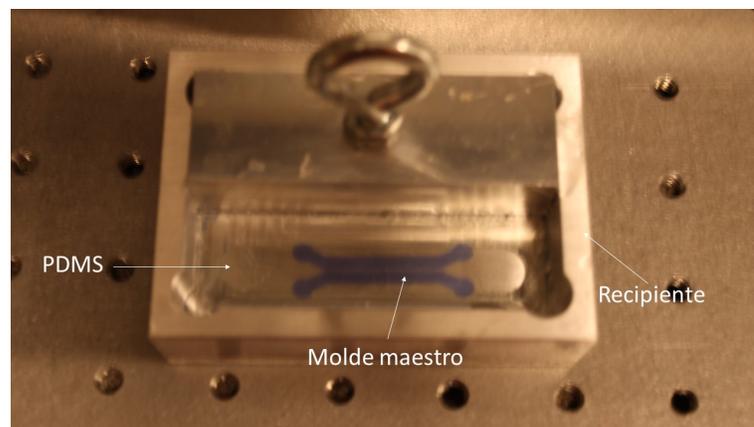


Figura 23. Recipiente que contiene el maestro, donde se vierte la mezcla de PDMS y curador, para la fabricación de microcanales en PDMS.

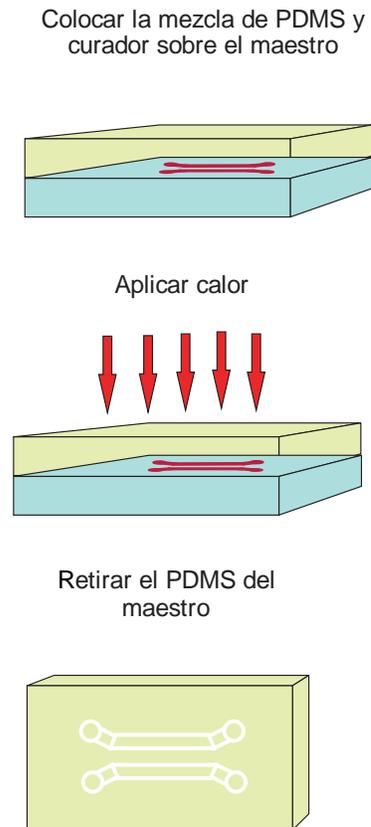


Figura 24. Diagrama esquemático del proceso de fabricación de microcanales en PDMS.

3.1.5. Pegado de microcanales

Para darle rigidez al PDMS con el diseño de los microcanales es necesario adherirlo a un sustrato de vidrio.

Para poder pegar los microcanales primero es necesario limpiar el porta objetos de vidrio, como se describe en el diagrama de la figura 25 (para ver los pasos a fondo revisar anexo A). La limpieza de los porta objetos es muy importante, de lo contrario no se tendra un correcto pegado de los microcanales, haciendo que se despeguen o simplemente no se logren adherir al sustrato de vidrio.

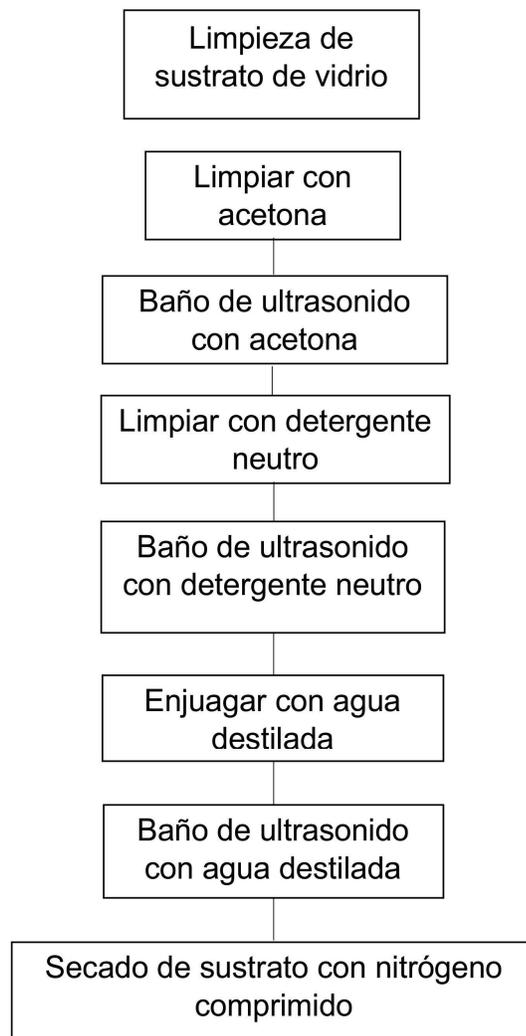


Figura 25. Diagrama de como fabricar los canales de PDMS

Para pegar el microcanal de PDMS a un sustrato de vidrio se utilizó un “Plasma Cleaner”. Dentro de la cámara del “plasma cleaner”, este es un aparato utilizado para limpiar contaminantes e impurezas de superficies, sin embargo, si se utiliza por cortos tiempos se puede utilizar para adherir microcanales a un sustrato de vidrio. Se coloca el sustrato de vidrio y sobre el se coloca PDMS con los microcanales hacia abajo, y se le da un tratamiento de plasma por 30 segundos en un ambiente de oxígeno. Al sacarlo de la cámara, se deja bajo presión durante 24 horas. Al seguir todo estos pasos se obtendrá un sistema microfluídico como se observa en la figura 26

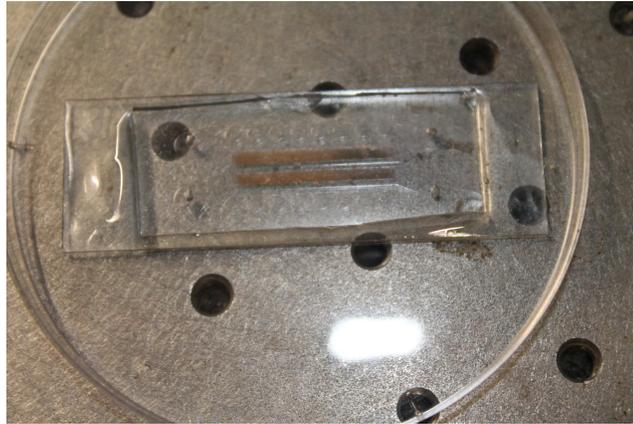


Figura 26. Fotografía después de haber pegado el sustrato y el PDMS

3.1.6. Implementación de sistemas para inyección de fluidos

Dentro de los microcanales se debe tener en cuenta el flujo con el cual se inyecta el fluido, ya que si es el flujo es muy grande, la presión aumentará y se despegará el microcanal, y si es muy bajo se tardará en recorrer el canal. Para la inyección de líquidos se utilizó una microbomba de la marca Micrux, modelo NE-4000, con capacidad de inyectar dos líquidos diferentes (figura 27), sin embargo, ambos tendrán el mismo flujo. La microbomba utilizada tiene diferentes flujos que van desde $\mu\text{L}/\text{min}$ hasta mL/min .



Figura 27. Microbomba de la marca Micrux, modelo NE-4000 de dos jeringas para inyección de líquidos.

En cada canal se colocó una manguera diferente, para poder inyectar dos líquidos diferentes, la salida del líquido es independiente de cada canal. En la figura 28 se puede observar el sistema microfluídico conectado a la microbomba.

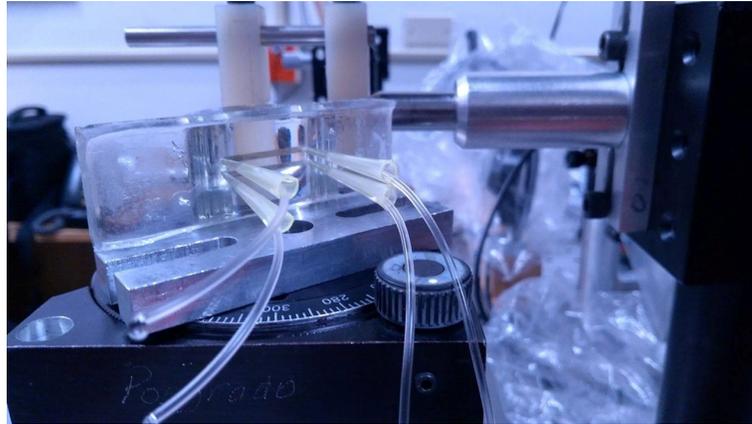


Figura 28. Sistema microfluídico con las mangueras de entrada y salida para la inyección de líquidos.

3.2. Funcionlización de la superficie de oro por el metodo de monocapaz

El biosensor se basará en un inmunoensayo tipo sandwich, en dónde se inmovilizará un anticuerpo monoclonal anti-ACE (MAb_{ACE}) sobre la superficie sensora (chip de oro), que fue modificada para la correcta orientación del anticuerpo (figura 29). Se usó un anticuerpo secundario con una enzima marcadora (HRP, por sus siglas en inglés “horseradish peroxidase”) como develador de la reacción y presencia del antígeno ACE. La reacción es colorimétricamente medible, basándose en si se encuentra presente el antígeno la enzima se oxida mostrando una coloración directamente proporcional con la cantidad del ACE presente (Figura 29).

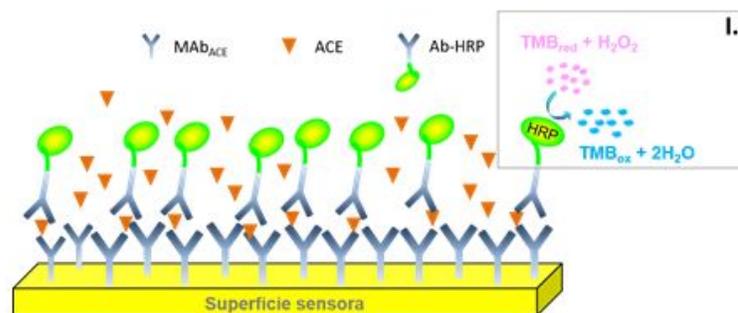


Figura 29. Principio general de detección inmunoenzimática del biosensor. I. representa la reacción química de un anticuerpo secundario marcado con la enzima HRP (Ab-HRP).

La biofuncionalización por monocapas consistió en tener una superficie de oro, la cual se modificará químicamente para formar una capa auto-ensamblada de Cisteamina, un compuesto orgánico que tiene un grupo tiol (-SH) que forma un enlace dativo

con el oro y en el otro extremo queda libre un grupo amino (-NH₂). Por otro lado, se utilizará una solución de EDC/NHS (50 mg/mL/50 mg/mL) para activar los grupos carboxílicos del anticuerpo *MAb_{ACE}*. El anticuerpo reacciona con el EDC y se activan los grupos carboxílicos del anticuerpo (pasa de COOH a COO—), el NHS sirve para que la reacción sea más estable y más eficiente.

Una vez activados los grupos carboxílicos del anticuerpo, la solución se colocará en los chips de oro para que se realice la esterificación entre el grupo amino que se formó en la superficie del oro con el grupo carboxilo ya activado del anticuerpo (figura 30). Nota: se realizará un paso de bloqueo que consiste en poner el 1 % de BSA (Bovine Serum Albumin), la cual es una proteína que ocupará los espacios libres en donde no se ha inmovilizado *MAb_{ACE}*.

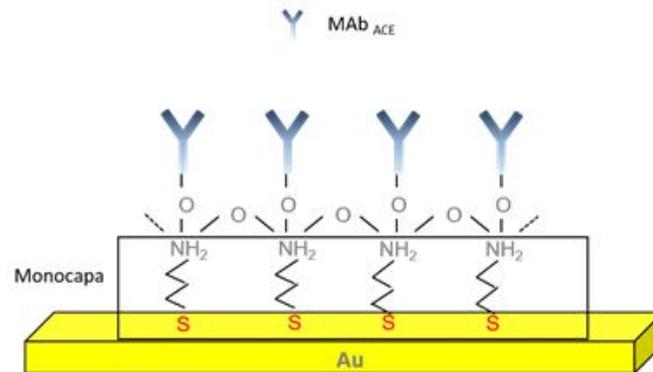


Figura 30. Biofuncionalización por monocapas.

Capítulo 4. Resultados

En este capítulo se muestran los resultados experimentales obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de investigación. Primero se describen los arreglos experimentales utilizados, se muestran los resultados para las primeras pruebas y caracterizar el arreglo experimental, tanto con una fuente de luz láser y un diodo emisor de luz. También se muestran los resultados de las pruebas de conceptos para la detección de biomoléculas y ACE.

Para estos experimentos se utilizó el mismo diseño experimental, sin embargo, se utilizaron dos dispositivos diferentes de emisión de luz, primero se usó un láser de 650 nm de longitud de onda (color rojo), y después se cambió por una diodo emisor de luz con una longitud de onda de 621 nm.

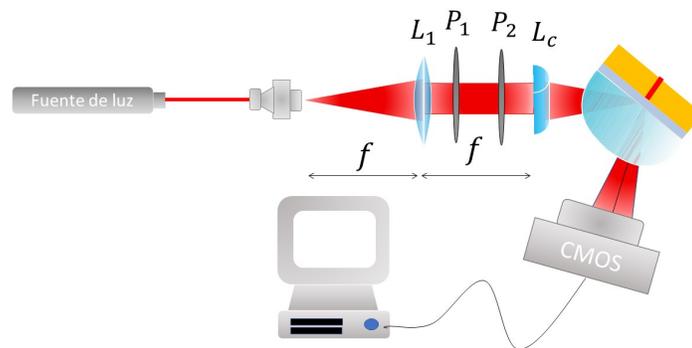


Figura 31. Arreglo experimental óptico para la excitación del PPS, utilizando la configuración de Kretschmann, usando un láser de 650 nm de longitud de onda

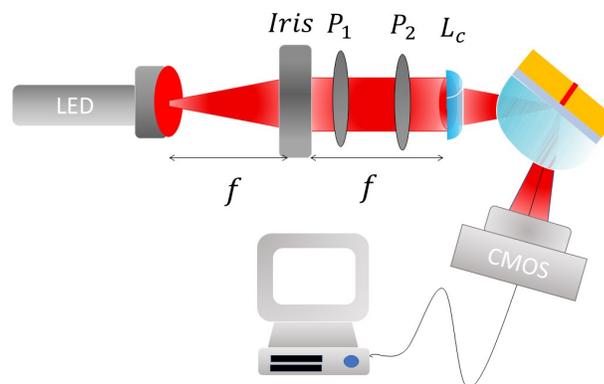


Figura 32. Arreglo experimental óptico para la excitación del PPS, utilizando la configuración de Kretschmann, utilizando una lámpara con una longitud de onda central de 621 nm

Los componentes para la construcción del arreglo experimental son:

- * Diodo láser de 650 nm (figura 31), y lampara de 621 nm (figura 32).
- * Filtro espacial, solo arreglo 1.
- * Iris, solo arreglo 2.
- * Polarizador lineal (P1 y p2), Thorlabs.
- * Lente planoconvexa (L1), Thorlabs, $F = 150$ mm, $D = 5.4$ mm
- * Lente semicilíndrica (Lc), Thotlabs, $F = 50$ mm.
- * Prisma semicilíndrico de una pulgada de radio y una pulgada de espesor con un índice de refracción $n = 1.511$, sobre una platina con capacidad de de movimiento en 360 grados.
- * Portaobjetos que contiene una película delgada de oro de 50 nm de espesor.
- * Camara CMOS, CANON Rebel T3, tamaño de pixel 5.15 μ m.

Ambos arreglos son utilizados para excitar PPS. En el arreglo 1 (figura 31) se utiliza un láser como fuente de excitación, éste incide en un filtro espacial para expandir el haz de luz. En el arreglo 2 (figura 32) ee utiliza una lampara LED que incide en un iris para delimitar el haz de luz. El haz incide en un polarizador lineal para tenerlo con polarización "p", utilizando una lente planoconvexa es enfocada en la lente semicilindrica, esto nos da una línea de luz que incide sobre el prisma semicilíndrico, que contine un portaobjetos con una película de oro, con aceite de inmersión entre el prisma y el porta objetos.

4.1. Plasmón polariton de superficie en una película delgada de oro y aire, excitado con láser

Para las primeras pruebas, se depositó una película de oro de 50 nm en un sustrato de vidrio, se colocó sobre el prisma semicilíndrico (figura 33) y se realizaron las pruebas para determinar el ángulo de incidencia para la excitación del PPS.

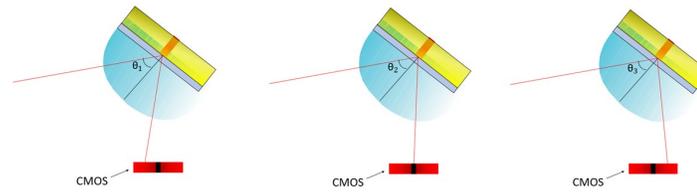


Figura 33. Arreglo experimental para la excitación de PPS variando el ángulo de incidencia.

Utilizando el primer arreglo óptico (figura 31) donde se utilizó un diodo láser de 632 nm de longitud de onda, el objetivo de este primer experimento fue determinar el ángulo que deberían de tener ambos polarizadores para tener polarización p, y de esta manera excitar el PPS en la película de oro. Al tener la condición de reflexión total interna se cambió el ángulo de incidencia hasta encontrar la posición donde se observa una región oscura en la fotografía (figura 34, rectángulo azul).

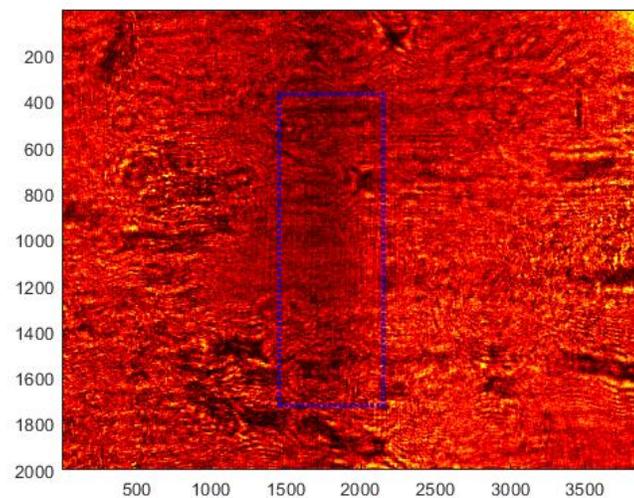


Figura 34. Fotografía del PPS generado en la interfaz entre oro y aire

Posteriormente se hizo un análisis de imagen con el programa MATLAB, donde se seleccionó una sección de 4272 píxeles en la componente x, y 300 píxeles en la componente z. De los datos obtenidos se calculó un promedio de estas líneas, el cual se muestra la variación de la intensidad en función del ángulo de incidencia (figura 35).

En los resultados obtenidos se observó un mínimo de intensidad cuando el ángulo de incidencia es 45 grados.

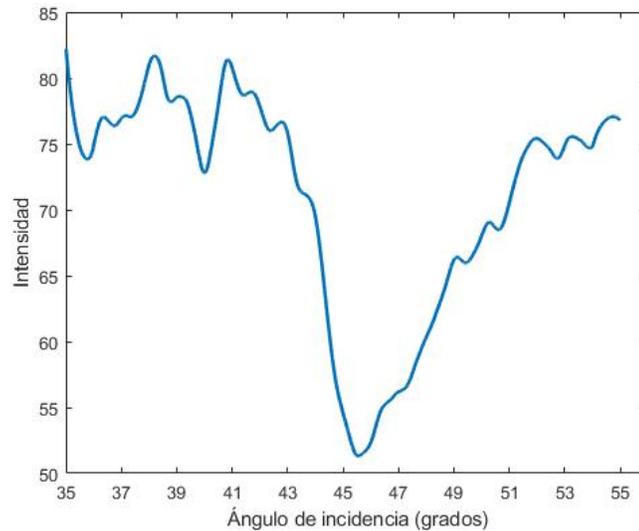


Figura 35. Gráfica de intensidad contra ángulo de incidencia, donde se observa que el decaimiento de la intensidad, esto representa la excitación del PPS en la película delgada de oro. Rectángulo azul.

4.1.1. Plasmón polariton de superficie en dos canales con película delgada de oro

Para tener dos canales de oro de la misma longitud y espesor, se utilizó la técnica de fotolitografía. Se diseñó en un diagrama del chip, que consistió en un portaobjetos de vidrio de 3" por 1", donde están dos películas de oro del mismo espesor, separadas 1mm entre ellas, y los microcanales hechos de PDMS. Una vez que se determinó el diseño se obtuvo el sistema optofluídico (figura 36).

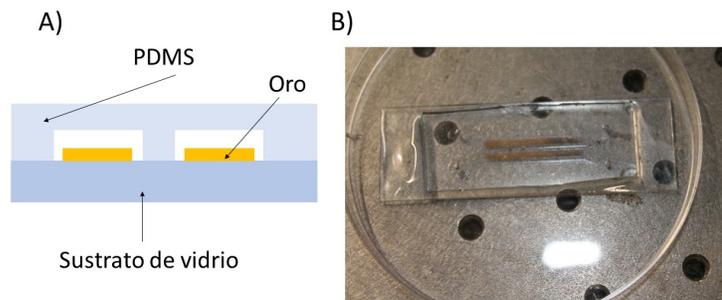


Figura 36. A) Diagrama del sistema optofluídico. B) Fotografía del sistema optofluídico terminado..

En este caso al incidir luz se puede observar cómo hay reflexión en ambas películas de oro, reflejando cada una luz al sensor CMOS, pudiendo diferenciar entre ambas películas (figura 37).

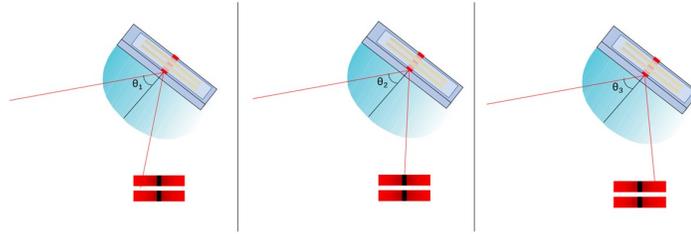


Figura 37. Arreglo experimental para la excitación de PPS con un microcanal, que contiene dos películas de oro, con variando el ángulo de incidencia

Variando el ángulo de incidencia se logra satisfacer la condición de excitación del PPS, al tener dos películas del mismo espesor ambos PPS son excitados en el mismo ángulo. Lo anterior puede ser observado en la figura 38 en donde ambas películas absorben la luz en la misma región (líneas centrales de color rojo).

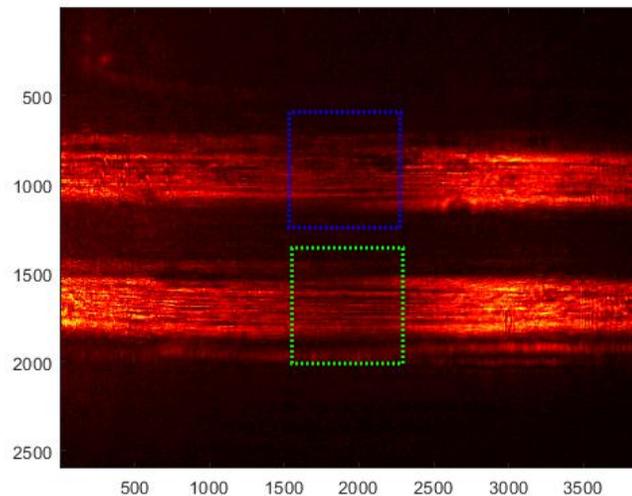


Figura 38. Fotografía del PPS generado por un microcanal de dos películas de oro, con una interfaz de oro y aire. Rectángulo azul y verde, regiones de excitación de los PPS.

De la fotografía se seleccionó una sección de cada película para hacer un promedio de líneas, y encontrar una gráfica de intensidad contra ángulo de incidencia. Lo ante-

riormente mencionado se reafirma, ya que en ambos casos la mínima intensidad se tiene alrededor de los 45 grados (figura 39).

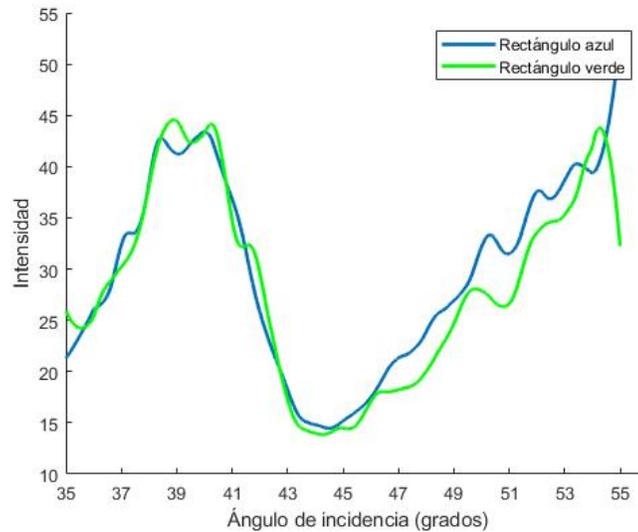


Figura 39. Grafica de ángulo de incidencia contra intensidad.

4.2. PPS en una película de oro, excitados con un diodo emisor de luz

En los resultados de la sección 4.1 se puede observar como las gráficas tienen mucho ruido, esto debido a la coherencia del haz, ocasionando que en las fotografías tengan el efecto de moteado óptico, haciendo que las gráficas presenten ruido. Lo anterior condujo a explorar otra fuente de iluminación, en lugar de un láser se utilizó por una fuente LED no coherente.

En la figura 40 se muestra la gráfica de intensidad contra longitud de onda de la lámpara LED, en donde se puede observar que esta fuente tiene un ancho espectro de 12 nm y un valor central de 623 nm.

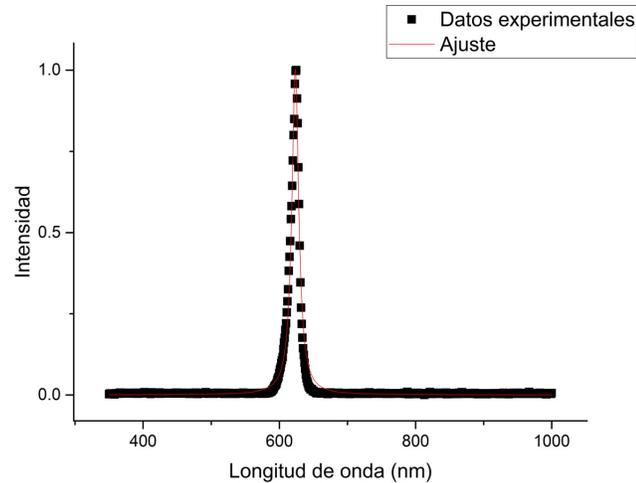


Figura 40. Grafica de intensidad contra longitud de onda de la lámpara LED.

El efecto de moteado óptico disminuye considerablemente al utilizar una fuente de baja coherencia, ya que este es un efecto ocasionado por la coherencia del haz, obteniendo una imagen más suavizada (figura 41), utilizando como fuente de luz el diodo emisor de luz, se logró excitar el PPS en la película de oro (ver rectángulo azul de figura 41).

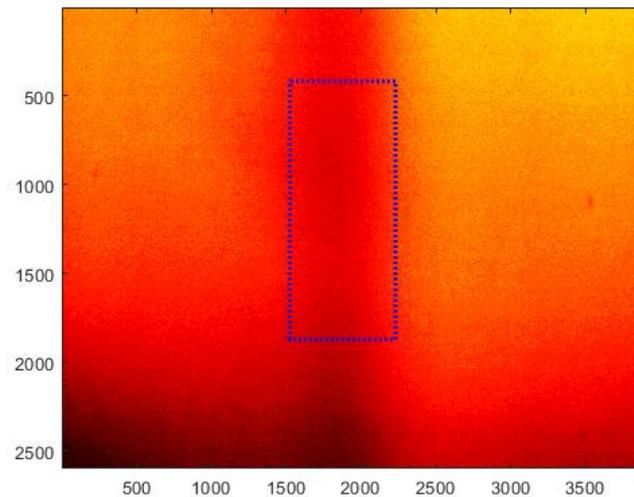


Figura 41. Grafica de intensidad contra longitud de onda de la lámpara LED.

El PPS generado con la lámpara LED mostró un ángulo de incidencia donde se encuentra el mínimo alrededor de 45 grados (figura 42).

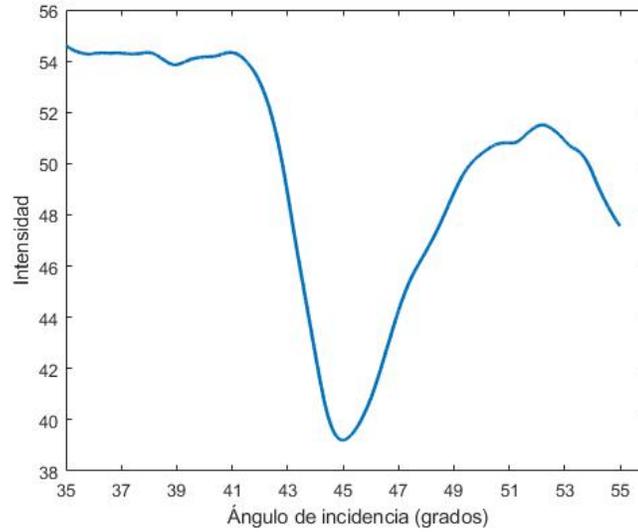


Figura 42. Grafica de intensidad contra longitud de onda de la lámpara LED.

4.2.1. PPS en dos películas de oro, excitados con un diodo emisor de luz.

En la figura 43, se encuentran dos regiones oscuras en ambas películas de oro, ambas están en la misma región, esto indica que se éxito un PPS y al estar en las mismas condiciones son excitados con el mismo ángulo de incidencia.

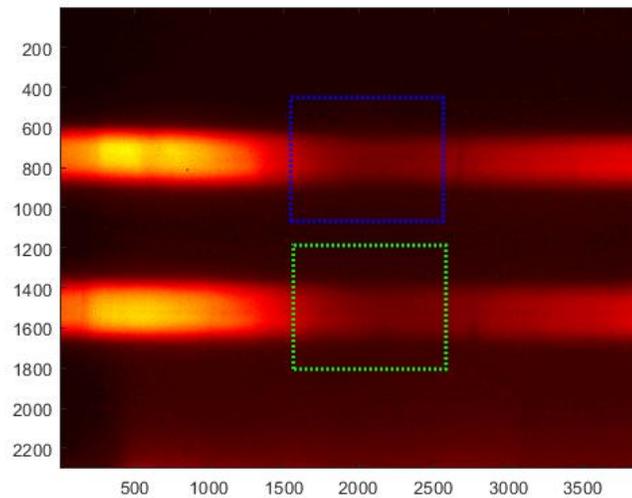


Figura 43. Fotografía del PPS generado por un microcanal de dos con película de oro, con una interfaz de oro y aire, utilizando un diodo emisor de luz. Rectángulo azul y verde, regiones de excitación de los PPS.

Analizando la fotografía, y obteniendo la gráfica de intensidad en función del ángulo de incidencia de cada película de oro se obtuvo la figura 44, donde los PPS de ambas

películas tuvieron una mínimo de intensidad en un ángulo de incidencia alrededor de 45 grados.

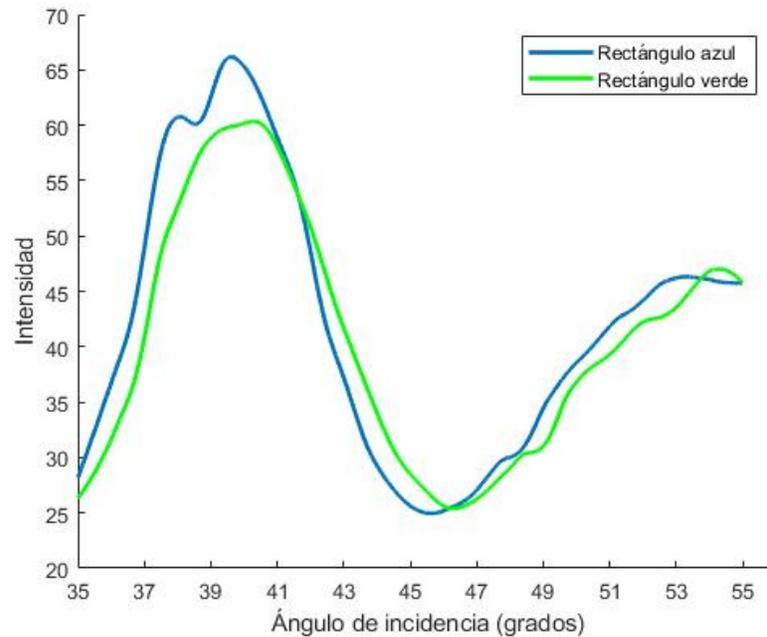


Figura 44. Grafica de ángulo de incidencia contra intensidad .

4.3. Excitación de PPS en un interfaz de oro-agua dentro de un sistema microfluídico

Con la finalidad de comprobar la sensibilidad de los PPS al cambio del índice de refracción de la superficie de la película de oro, se le inyectó agua destilada en uno de los microcanales, representado por un rectángulo azul en la figura 46, de esta manera se cambia la interfaz a oro-agua. Teniendo en cuenta que el índice de refracción del agua es de 1.3. El otro microcanal se dejó igual al caso anterior.

Al tener diferentes interfaces en los microcanales, los PPS serán excitados a diferentes ángulos de incidencia, en la figura 45 se observa una región oscura (señalado por un rectángulo azul) en el microcanal el cual tiene agua destilada, sin embargo, en el otro microcanal no se presenta ninguna absorción de la luz.

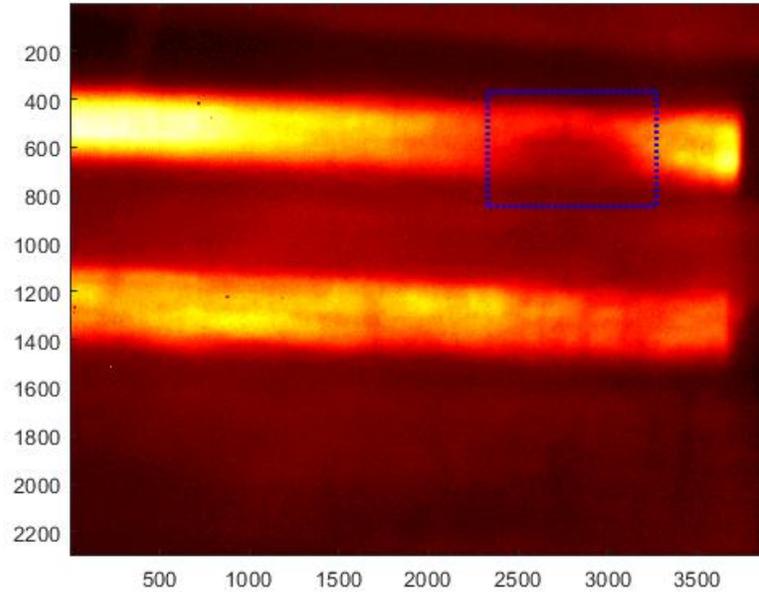


Figura 45. Fotografía de un PPS generado en una interfaz oro-agua con un diodo emisor de luz.

Analizando este micro canal con la interfaz oro-agua se encontró que la mínima intensidad se encuentra alrededor de 68 grados (figura 35), esto indica un desplazamiento del PPS de acuerdo al cambio del índice de refracción.

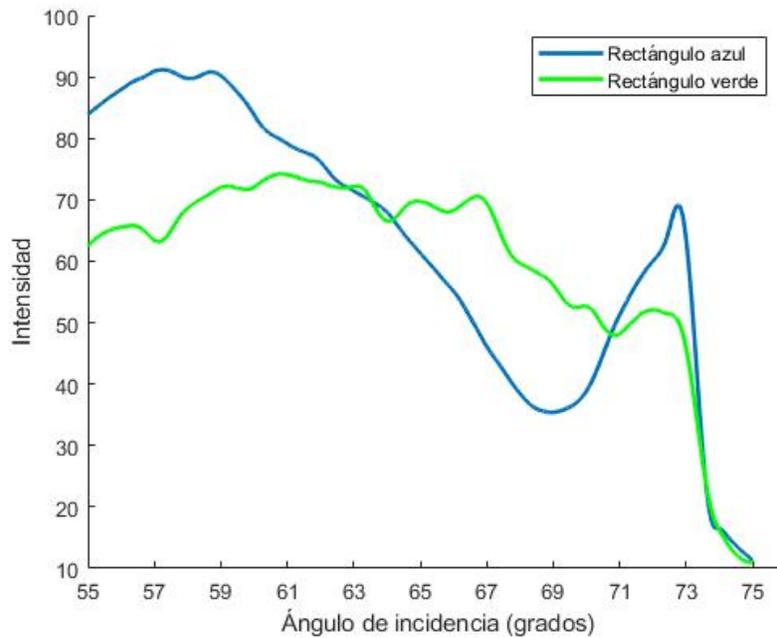


Figura 46. Grafica de ángulo de incidencia contra intensidad.

La interfaz de oro-aire tuvo un ángulo de incidencia mayor a 45 grados, por ello el PPS de esa interfaz no fue excitado, tenían un ángulo mayor al requerido para empatar el K_{pps} y K_{tx} , mientras que en el interfaz de oro-agua el PPS es excitado a un ángulo de incidencia de 68 grados.

4.4. PPS excitado de una película de oro biofuncionalizado para glucosa oxidasa

Una vez que se demostró la excitación del PPS, con la finalidad de preparación de superficie expuesta a otros materiales y biomoléculas se exploró una técnica de biofuncionalización segura y fácil de realizar. El atrapamiento de biomoléculas en redes poliméricas es ampliamente utilizado en todos tipos de sensores por su practicidad. Para ello se usó glucosa oxidasa como biomolécula a inmovilizar sobre un canal de oro en el fotopolímero (PVA-AWP, únicamente depositando una solución de mezclada con el fotopolímero y dejando secar. Los resultados observados conducen a afirmar que el atrapamiento de la biomolécula fue realizada, debido que en la la figura 47 se muestra una región oscura (señalada por un rectángulo punteado), el cual no es visto en el otro canal control sin enzima y sin fotopolímero.

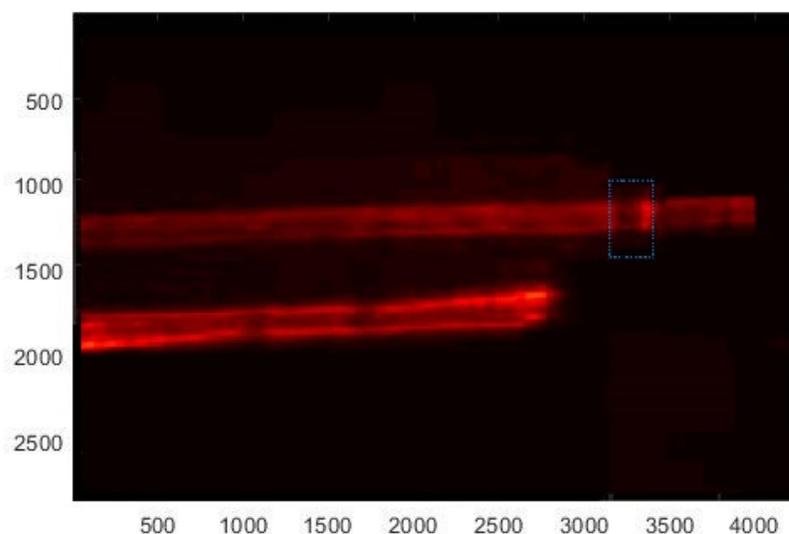


Figura 47. Fotografía de un PPS generado en una película de oro, biofuncionalizada por el método de fotopolímeros, para la glucosa oxidasa..

En el canal inferior no se presenta ningún PPS, esto ya que esa película fue usada como control, y el PPS generado por la biofuncionalización por su alto índice de refracción es generado casi en el límite del prisma semicilíndrico.

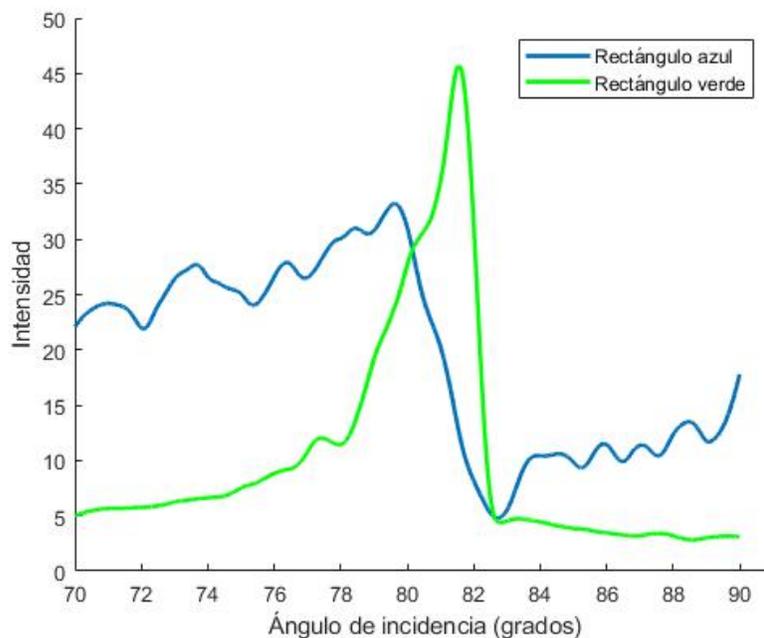


Figura 48. Grafica de ángulo de incidencia contra intensidad.

4.5. Biofuncionalización por absorción de inmunoensayos

Con la finalidad de evaluar la afinidad de la biomolécula modelo (ACE) depositada sobre un microchip de oro, mismo material de la superficie sensora de nuestro sistema óptico, se utilizó el método de funcionalización por monocapas. Una vez realizada la formación de la monocapa se prepararon diferentes diluciones de de MAb_{ACE} : 1/100, 1/200, 1/400 y 1/800 (a partir de una concentración proteica de: 1mg/mL). Así se evaluaron cada una de las concentraciones de MAb_{ACE} por inmunoensayos, comúnmente utilizados como método de análisis preliminar para evaluación de la capacidad de anclaje sobre una superficie sensora, optimización y exploración de métodos de inmovilización de biomoléculas. El tipo de ensayo desarrollado fue el inmunoensayo tipo sándwich. La enzima reveladora de la respuesta de presencia de las diferentes diluciones de MAb_{ACE} sobre el chip de oro es representado por la señal de respuesta con una coloración visible (azul) y medible a 620 nm, siendo directamente proporcional del anticuerpo primario presente en la superficie de oro (MAb_{ACE}) (Figura 49).

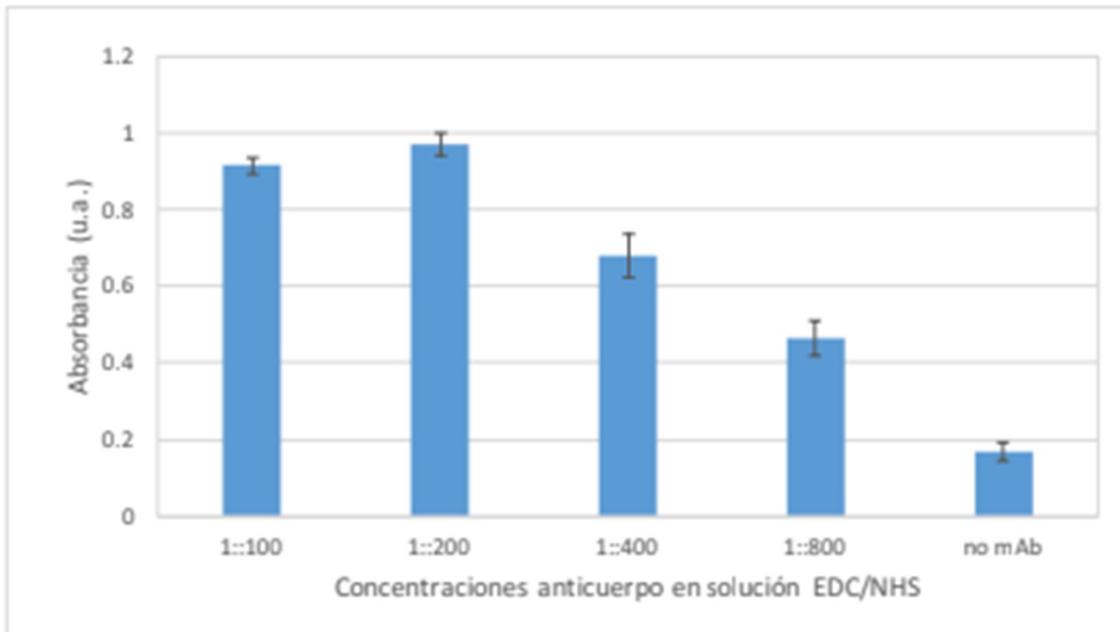


Figura 49. Diagrama de absorción contra concentración de ACE.

La respuesta obtenida del control sin anticuerpo primario (no MAB_{ACE}) no fue significativa (0.185 u.a.), lo que indica que no existió una absorción inespecífica de anticuerpos sobre la superficie de oro. La comparación de la respuesta obtenida (absorbancia) en las diferentes diluciones evaluadas de MAB_{ACE} demostró que la formación de monocapas y biofuncionalización de la superficie fue exitosa. Sin embargo, en la dilución 1/100 se esperaba obtener una absorbancia mayor a la obtenida en la subsecuente dilución (1/200) o una meseta (absorbancias iguales entre ambas), pero la absorbancia obtenida fue menor. Lo anterior implicaría una saturación de la superficie del chip de oro por el número de biomoléculas de MAB_{ACE} . Lo anterior, se puede atribuir a impedimentos estérico que surge de una elevada cantidad de moléculas de MAB_{ACE} inmovilizadas sobre el chip de oro, con lo cual podría estar impidiendo una orientación correcta de los anticuerpos para la interacción con el anticuerpo secundario con la enzima debeladora (IgG-HRP) de la presencia del MAB_{ACE} (Garibo, 2014). A partir de las diluciones 1/200 a 1/800 se mostró la tendencia que se esperaba, que a mayor número de MAB_{ACE} mayor es la respuesta en u.a. y decrece conforme disminuye el número de anticuerpos. Con la finalidad de probar en el sistema óptico se opta por seleccionar las diluciones que se encuentren dentro de absorbancias óptimas (0.6-0.7 u.a), en este sentido la dilución óptima a ser probada en el sistema óptico deberá ser 1:400 (0.654u.a). No obstante debido a la inestabilidad de algunos anticuerpos se de-

Se decidió probar nuevamente una concentración mayor (1/200) adicionando controles (No IgG-HRP, no MAb_{ACE}, sin cisteamina y únicamente el chip de oro) (figura 50) que nos permitirían descartar aspectos importantes en la futura biofuncionalización sobre la superficie sensora del biosensor óptico.

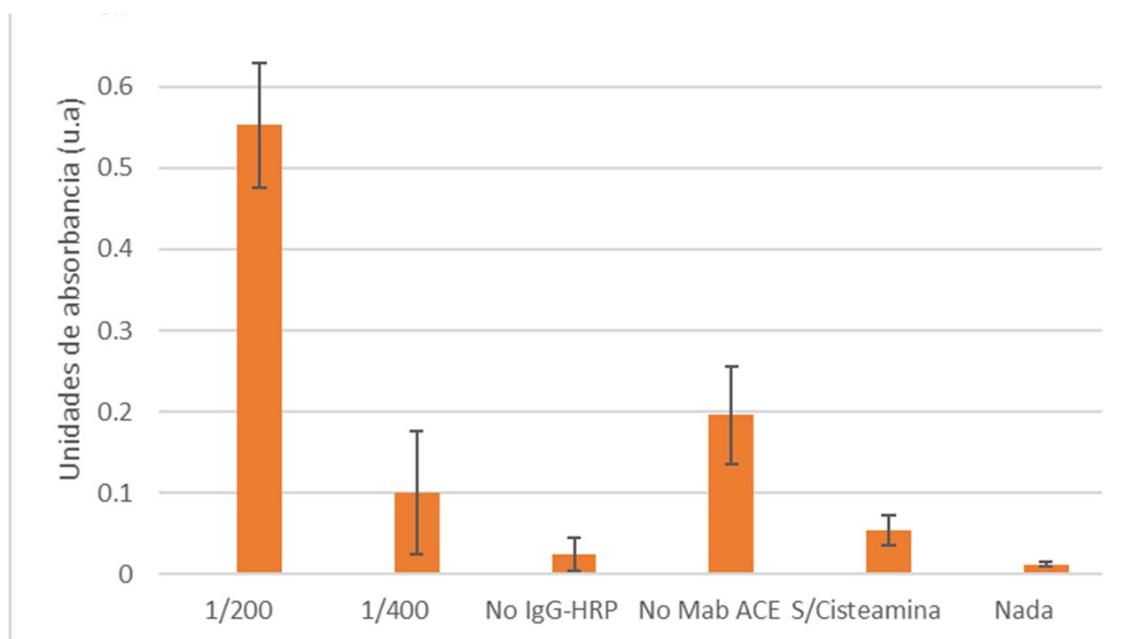


Figura 50. Experimento de seguimiento.

Lo anterior de inestabilidad del MAb_{ACE} (1/400) fue observado al obtener absorbancias con un valor 5 veces menor a la obtenida en el previo experimento (figura 50). Así, en un futuro ambas concentraciones (1/200 y 1/400) deberán ser verificadas para el futuro uso sobre una superficie de detección del sistema óptico con microfluídica. Como era de esperarse al no estar presente el anticuerpo secundario (IgG-HRP) una absorbancia no significativa (0.024) fue observada. No obstante, en el control de no MAb_{ACE} conduce a una inespecificidad, es decir el IgG-HRP se ancla sobre el chip (con monocapa de cisteamina) y sin presencia del anticuerpo primario (MAb_{ACE}). Lo anterior conduce a dos posibles mejoras en su futuro uso sobre el sistema óptico con microfluídica: 1) aumentar la concentración de la solución bloqueadora (BSA) y 2) tiempo de bloqueo más prolongado. Como era de esperarse al no haber cisteamina que es la monocapa para llevar a cabo el anclaje de biomoléculas no existe señal de respuesta.

Capítulo 5. Conclusiones

En este trabajo se realizó un estudio experimental para la construcción de un biosensor microfluídico utilizando plasmones polaritones de una superficie de oro como transductor.

Los resultados obtenidos durante la maestría condujeron a las siguientes conclusiones:

- Se logró desarrollar un sistema de excitación de PPS con la configuración de Kretschmann. Este consistió principalmente de una fuente de luz que incide sobre un prisma semicilíndrico y sobre este un sustrato con una capa de oro delgada (50nm), lo anterior sobre un sistema goniométrico para determinar los desplazamientos angulares de los mínimos de intensidad del haz reflejado por el prisma (acoplamiento plasmónico).

- Utilizando un diodo láser como fuente de luz se observa que el moteado láser causa señales ruidosas en la detección de éstas, aunque son promediadas, generan incertidumbre en la posición angular del mínimo de intensidad. Para reducir este ruido, se utilizó como fuente de luz un diodo emisor de luz con un ancho espectral angosto (ancho menor a 5nm), que permite reducir considerablemente el moteado láser. La incertidumbre de la ubicación del mínimo de absorción se redujo.

- Se utilizó como detector el sensor CMOS de una cámara fotográfica, y mediante análisis geométrico, fue posible relacionar posición de un pixel del detector con una distancia angular. Lo que permitió de manera directa relacionar la imagen obtenida por el sensor, en pixeles, con el desplazamiento angular en grados.

- Se diseñó y fabricó un sistema microfluídico de dos canales para ser implementado como cabezal en el sistema de detección. Esto se logró utilizando una técnica fotolitográfica, pasando por diferentes pasos; desde el molde maestro para la creación del sistema microfluídico, haciéndolo de un tamaño compacto para ser pegado en un sustrato de vidrio, usando como material principal PDMS, ya que es un material inerte para utilizar reactivos biológicos.

- Las mediciones de la presencia de excitación plasmónica en el sistema microfluídico cuando a uno de los canales se le inyectó agua y el otro sirvió de referencia.

El modelo óptico microfluídico de dos canales desarrollado mostró ser una prometedora alternativa para ser utilizado como biosensor plasmónico.

-Las pruebas de concepto realizadas para determinar la viabilidad de utilizar este sistema microfluídico como sensor plasmónico, y determinar la presencia de un antígeno específico (analito) condujeron a un primer e importante paso en la biofuncionalización de anticuerpos monoclonales ACE (MabACE) sobre una superficie de oro que sería parte del transductor de biosensor.

-Las pruebas auxiliares y preliminares de sensado por ensayos de inmunodetección sobre un chip de oro con las mismas características de la película de oro utilizada en el sistema microfluídico, demostraron una deposición exitosa de MAbACE sin existir una absorción inespecífica de algún otro componente biológico. Con lo cual conduce a la viabilidad del detector.

Literatura citada

- ACS (2014). Etapas del cáncer colorrectal. *Recuperado el 10/05/2019* <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/clasificacion-de-la-etapa.html>.
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, **39**(2): 23–29.
- Campbell, K., Rawn, D. F., Niedzwiadek, K. B., y Christopher T, E. (2007a). Paralytic shellfish poisoning (psp) toxin binders for optical biosensor technology: problems and possibilities for the future: a review. *SSN*, **28**(6): 711–725.
- Campbell, K., Stewart, L., y Elliot, C. T. (2007b). Assessment of specific binding proteins suitable for the detection of paralytic shellfish poisons using optical biosensor technology. *Anal. Chem.*, **79**(15): 5906–5914.
- Campàs, M., Prieto-Simón, B., y Marty, J.-L. (2007). Biosensors to detect marine toxins: Assessing seafood safety. *Talanta*, **72**(72): 884–895.
- Cayon, A. (2014). Cáncer colorrectal. *Pan American Health Organization / World Health Organization* *Recuperado el 10/05/2019* https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_contentview=articleid=11761:colorectal-cancerItemid=41765lang=es.
- de Juan Franco, E. (2013). Estrategias de inmovilización de anticuerpos para la detección directa de hormonas mediante inmunosensores de resonancia de plasmón superficial (tesis doctoral). *Universitat Autònoma de Barcelona*.
- Ferrer, J. (2015). Caracterización de sensores piezoeléctricos y capas de adaptación (matching layer) para detectores de partículas tipo pico (tesis de master). *Universidad Politécnica de Valencia, España*.
- Garrido, J. B. (2013). Estudio de sensores electroquímicos flexibles (tesis de maestría). *Universidad de Burgos, España*.
- Gauglitz, G. (2004). Direct optical sensors: principles and selected applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **381**: 141–155.
- Gold, P. y Freedman, S. O. (1965). Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *Journal of Experimental Medicine.*, **122**(3): 467–481.
- Lazcka, O., Del Campo, F. J., y Muñoz, F. X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **22**(22): 1205—1217.
- Lech, G., Slotwinski, R., y Krasnodebski, I. (2014). The role of tumor markers and biomarkers in colorectal cancer. *Neoplasma*, **61**(1): 1–8.
- Liedberg, B., Nylander, C., y Lunström, I. (1983). Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Physical Review*, **4**: 299–304.
- Machado, N. P., Tellez, G. A., y Castaño, J. C. (2000). Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio*, **10**(3): 186–197.
- Maier, S. A. (2007). *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer US. pp. 20–37.

- McDonald, J. C., Duffy, D. C., Anderson, J. R., y Chiu, D. T. (2000). Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, **21**: 27–40.
- Merino, A. G. (2011). Anticuerpos monoclonales. aspectos básicos. *Neurología*, **26**(5): 301–306.
- Monotoro Huguet, M. A. y García Pagán, J. C. (2012). Gastroenterología y hepatología. problemas comunes en la práctica clínica. *Jarpyo Editores, S.A.*, **2da**: 617–627.
- Novotny, L. y Hecht, B. (2006). Surface plasmons. in principles of nano-optics. *Cambridge: Cambridge University Press*, pp. 378–418.
- OMS (2014). Datos y cifras sobre el cáncer. *Recuperado el 10/05/2019*
<https://www.who.int/cancer/about/facts/es/>.
- Powell, C. J. y Swan, J. B. (1965). Origin of the characteristic electron energy losses in aluminum. *Physical Review*, **125**(4): 869–875.
- Prabowo, B. A., Purwidyantri, A., y Liu, K. C. (2018). Surface plasmon resonance optical sensor: A review on light source technology. *Biosensors*, **8**(3): 80.
- Sabri, N., Aljunid, S. A., y Kamaruddin, R. (2013). Toward optical sensors: Review and applications. *Journal of Physics: Conference Series*, **423**: 423.
- Téllez-Ávila, Ignacio, F. y García-Osogobio, S. M. (2005). El antígeno carcinoembrionario: a propósito de un viejo conocido. *Revista de Investigación Clínica*, **57**(6): 814–819.
- Uriarte Medina, G. (2015). Implementación de un microscopio de radiación de fuga para la obtención de imágenes de interacción de plasmones polaritones de superficie en nano-estructuras. *Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California*.
- Vega Robledo, G. B. (2009). Antígenos e inmunógenos. *Med UNAM.*, **52**(1): 41–42.
- Vidal García, F. J. y Moreno, L. M. (2008). Plasmones superficiales. *Investigación y ciencia*, **1**(1): 1–11.
- Wei, L., Feng, C., y Yuan, L. (2020). Resolution-improved spr sensor with a rotational modulation method. *Appl. Opt* **59**, **59**: 2883–2891.
- Whitesides, G. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, **442**: 368–373.
- Wood, R. W. (1902). On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, **4**(21): 396–402.
-

Anexos

A. Apendice A

Pegado de microcanales

Para el pegado de los microcanales, primero se debe de limpiar los sustratos, ya que la limpieza es lo que nos dara un correcto pegado.

Para limpiar los sustratos es necesario seguir los siguientes pasos.

1. Con "Lens-paperz acetona limpiar el sustrato, para remover el exceso de grasa.
2. Colocarlo en un baño de ultrasonido de acetona por 5 minutos.
3. Enjuagar con agua destilada sin dejar que el acetona se evapore.
4. Tallar el sustrato con una solución de detergente neutro, 9:1 de agua destilada y detergente neutro.
5. Colocar el sustrato en un baño de ultrasonido con la solución de detergente neutro por 15 minutos.
6. Enjuagar con agua destilada.
7. Colocar el sustrato en un baño de ultrasonido de agua destilada por 15 minutos.
8. Secar con nitrogeno gaseoso y guardar en un caja petri.

Una vez que esten limpios los sustratos, ya es posible usarlos para pegar los microcanales.

Para pegarlos se coloca tanto el sustrato como el microcanal de PDMS, en un "Plasma Cleaner", por 30 segundos en un ambiente de oxigeno. Se colocan tipo "Sandwichz se dejan bajo presión durante 24 horas.

B. Apendice B

Para excitar el PPS en un sistema multicapa tipo sandwich donde en el centro esta el medio uno que es el medio conductor, entre dos medios dielectricos como se observa en la figura 11. En este sistema, cada interfaz se puede excitar el PPS. En este caso solo estamos interesados en los modos acoplados de bajo orden, para comenzar haremos una descripción general de modos TM que no son oscilatorios en la dirección z normal a la interfaz. Para $z > a$, los componentes son:

$$H_y = Ae^{i\beta_x} e^{-k_3 z} \quad (1)$$

$$E_x = iA \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_3} k_3 e^{i\beta_x} e^{-k_3 z} \quad (2)$$

$$E_z = -A \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_3} e^{i\beta_x} e^{-k_3 z} \quad (3)$$

Para $z < a$

$$H_y = Be^{i\beta_x} e^{k_2 z} \quad (4)$$

$$E_x = -iB \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_2} k_2 e^{i\beta_x} e^{k_2 z} \quad (5)$$

$$E_z = -B \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_2} e^{i\beta_x} e^{-k_2 z} \quad (6)$$

Haciendo que los campos decaigan exponencialmente en los medios II y III. En la región de $-a < z < a$, los modos localizados en la interfaz entre la parte superior e inferior.

$$H_y = Ce^{i\beta_x} e^{k_1 z} + De^{i\beta_x} e^{-k_1 z} \quad (7)$$

$$E_x = -iC \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_1} k_1 e^{i\beta_x} e^{k_1 z} + iD \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_1} k_1 e^{i\beta_x} e^{-k_1 z} \quad (8)$$

$$E_z = C \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_1} e^{i\beta_x} e^{k_1 z} + D \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_1} e^{i\beta_x} e^{-k_1 z} \quad (9)$$

Por continuidad H_y y E_x quedan como: En $z=a$ Para H_y

$$Ae^{i\beta_x}e^{-k_3a} = Ce^{i\beta_x}e^{k_1a} + De^{i\beta_x}e^{-k_1a} \quad (10)$$

Simplificando

$$\therefore Ae^{-k_3a} = Ce^{k_1a} + De^{-k_1a} \quad (11)$$

Para E_x

$$iA \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_3} k_3 e^{i\beta_x} e^{-k_3a} = -iC \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_1} k_1 e^{i\beta_x} e^{k_1a} + iD \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_1} k_1 e^{i\beta_x} e^{-k_1a} \quad (12)$$

Simplificando

$$\therefore A \frac{k_3}{\epsilon_3} e^{-k_3a} = -C \frac{k_1}{\epsilon_1} e^{k_1a} + D \frac{k_1}{\epsilon_1} e^{-k_1a} \quad (13)$$

Haciendo lo mismo para $z=-a$. Para H_y .

$$Be^{i\beta_x}e^{-k_2a} = Ce^{i\beta_x}e^{-k_1a} + De^{i\beta_x}e^{k_1a} \quad (14)$$

Simplificando

$$\therefore Be^{-k_2a} = Ce^{-k_1a} + De^{k_1a} \quad (15)$$

Para H_x

$$-B \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_2} k_2 e^{i\beta_x} e^{-k_2a} = -iC \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_1} k_1 e^{i\beta_x} e^{-k_1a} + iD \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon_1} k_1 e^{i\beta_x} e^{k_1a} \quad (16)$$

Simplificando

$$\therefore -B \frac{k_2}{\epsilon_2} e^{-k_2a} = -C \frac{k_1}{\epsilon_1} e^{-k_1a} + D \frac{k_1}{\epsilon_1} e^{k_1a} \quad (17)$$

El sistema lineal de las cuatro ecuaciones acopladas. H_y debe cumplir la siguiente ecuación en las tres regiones

$$\frac{\partial^2 H_y}{\partial z^2} + (k_0^2 \epsilon_i - \beta^2) H_y = 0 \quad (18)$$

Sustituyendo

$$\frac{\partial^2 e^{i\beta_x} e^{-k_i z}}{\partial z^2} + (k_0^2 \varepsilon_i - \beta^2) e^{i\beta_x} e^{-k_i z} = 0 \quad (19)$$

$$e^{i\beta_x} e^{-k_i z} k_i^2 + (k_0^2 \varepsilon_i - \beta^2) e^{i\beta_x} e^{-k_i z} = 0 \quad (20)$$

$$\therefore k_i^2 = \beta^2 - k_0^2 \varepsilon_i \quad (21)$$

Con $i=1, 2, 3$. Resolviendo el sistema lineal de ecuaciones. Sustituyendo la ecuación 21 en 23.

$$\frac{k_3}{\varepsilon_3} e^{-k_3 a} \left[\frac{C e^{k_1 a} + D e^{-k_1 a}}{e^{-k_3 a}} \right] = -C \frac{k_1}{\varepsilon_1} e^{k_1 a} + D \frac{k_1}{\varepsilon_1} e^{-k_1 a} \quad (22)$$

$$\frac{k_3}{\varepsilon_3} C e^{k_1 a} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} C e^{k_1 a} = -\frac{k_3}{\varepsilon_3} D e^{-k_1 a} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} D e^{-k_1 a} \quad (23)$$

$$C e^{k_1 a} \left[\frac{k_3}{\varepsilon_3} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right] = D e^{-k_1 a} \left[-\frac{k_3}{\varepsilon_3} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right] \quad (24)$$

Resolviendo para C

$$\therefore C = D e^{-2k_1 a} \frac{\left[-\frac{k_3}{\varepsilon_3} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right]}{\left[\frac{k_3}{\varepsilon_3} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right]} \quad (25)$$

Resolviendo para D

$$\therefore D = C e^{2k_1 a} \frac{\left[\frac{k_3}{\varepsilon_3} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right]}{\left[-\frac{k_3}{\varepsilon_3} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right]} \quad (26)$$

Haciendo lo mismo para $z=-a$, sustituyendo la ecuación 25 en 27.

$$-\frac{k_2}{\varepsilon_2} e^{-k_2 a} \left[\frac{C e^{-k_1 a} + D e^{k_1 a}}{e^{-k_2 a}} \right] = -\frac{k_1}{\varepsilon_1} C e^{-k_1 a} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} D e^{k_1 a} \quad (27)$$

$$-\frac{k_2}{\varepsilon_2} C e^{-k_1 a} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} C e^{-k_1 a} = \frac{k_1}{\varepsilon_1} D e^{k_1 a} + \frac{k_2}{\varepsilon_2} D e^{k_1 a} \quad (28)$$

$$C e^{-k_1 a} \left[-\frac{k_2}{\varepsilon_2} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right] = D e^{k_1 a} \left[\frac{k_1}{\varepsilon_1} + \frac{k_2}{\varepsilon_2} \right] \quad (29)$$

Resolviendo para C

$$C = D e^{2k_1 a} \frac{\left[\frac{k_1}{\varepsilon_1} + \frac{k_2}{\varepsilon_2} \right]}{\left[-\frac{k_2}{\varepsilon_2} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right]} \quad (30)$$

Resolviendo para D

$$D = Ce^{-2k_1a} \frac{\left[-\frac{k_2}{\varepsilon_2} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right]}{\left[\frac{k_1}{\varepsilon_1} + \frac{k_2}{\varepsilon_2} \right]} \quad (31)$$

Sustituyendo la ecuación 29 en 31.

$$C = Ce^{2k_1a} \frac{\left[\frac{k_3}{\varepsilon_3} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right]}{\left[-\frac{k_3}{\varepsilon_3} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right]} e^{2k_1a} \frac{\left[\frac{k_1}{\varepsilon_1} + \frac{k_2}{\varepsilon_2} \right]}{\left[-\frac{k_2}{\varepsilon_2} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right]} \quad (32)$$

$$e^{-4k_1a} = \frac{\left[\frac{k_3}{\varepsilon_3} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right]}{\left[-\frac{k_3}{\varepsilon_3} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right]} \frac{\left[\frac{k_1}{\varepsilon_1} + \frac{k_2}{\varepsilon_2} \right]}{\left[-\frac{k_2}{\varepsilon_2} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right]} \quad (33)$$

En el caso de que los medios II y III sean iguales, nos encontramos con el siguiente caso particular, $k_2 = k_3$, $\varepsilon_2 = \varepsilon_3$

$$e^{-4k_1a} = \frac{\left[\frac{k_1}{\varepsilon_1} + \frac{k_2}{\varepsilon_2} \right]^2}{\left[-\frac{k_2}{\varepsilon_2} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right]^2}, \quad (34)$$

Obteniendo la raíz cuadrada

$$e^{-2k_1a} = \frac{\left[\frac{k_1}{\varepsilon_1} + \frac{k_2}{\varepsilon_2} \right]}{\left[-\frac{k_2}{\varepsilon_2} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right]}, \quad (35)$$

y despejando

$$\left[-\frac{k_2}{\varepsilon_2} + \frac{k_1}{\varepsilon_1} \right] e^{-k_1a} = \pm \left[\frac{k_1}{\varepsilon_1} + \frac{k_2}{\varepsilon_2} \right] e^{k_1a}. \quad (36)$$

En el caso positivo de la raíz cuadrada

$$\left[\frac{-k_2\varepsilon_1 + k_1\varepsilon_2}{\varepsilon_1\varepsilon_2} \right] e^{-k_1a} = \left[\frac{k_1\varepsilon_2 + k_2\varepsilon_1}{\varepsilon_2\varepsilon_1} \right] e^{k_1a}, \quad (37)$$

$$-k_2\varepsilon_1 e^{-k_1a} + k_1\varepsilon_2 e^{-k_1a} = k_1\varepsilon_2 e^{k_1a} + k_2\varepsilon_1 e^{k_1a}, \quad (38)$$

$$k_1\varepsilon_2 \left[e^{-k_1a} - e^{k_1a} \right] = k_2\varepsilon_1 \left[e^{k_1a} + e^{-k_1a} \right], \quad (39)$$

$$\frac{\left[e^{k_1a} - e^{-k_1a} \right]}{\left[e^{k_1a} + e^{-k_1a} \right]} = -\frac{k_2\varepsilon_1}{k_1\varepsilon_2}, \quad (40)$$

$$\tanh = -\frac{k_2\varepsilon_1}{k_1\varepsilon_2}. \quad (41)$$

En el caso negativo de la raíz cuadrada.

$$\left[\frac{-k_2 \varepsilon_1 + k_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 \varepsilon_2} \right] e^{-k_1 a} = - \left[\frac{k_1 \varepsilon_2 + k_2 \varepsilon_1}{\varepsilon_2 \varepsilon_1} \right] e^{k_1 a}, \quad (42)$$

$$\frac{[e^{k_1 a} - e^{-k_1 a}]}{[e^{k_1 a} + e^{-k_1 a}]} = - \frac{k_1 \varepsilon_2}{k_2 \varepsilon_1}, \quad (43)$$

$$\tanh = - \frac{k_1 \varepsilon_2}{k_2 \varepsilon_1}. \quad (44)$$