

# DESARROLLO DE UN BIOSENSOR UTILIZANDO UN INTERFERÓMETRO DE FIBRA DE CRISTAL FOTÓNICO



Como requisisto para obtener el grado de:

Maestro en Optomecatrónica

Asesores:

Dr. Uladzímir Petróvich Minkóvich

Dr. Yeison Javier Montagut Ferizzola

**Presenta:** 

Juan Esteban Betancur Ochoa

Diciembre de 2015 León, Guanajuato, México A mis padres, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, y que me dieron las fuerzas y la confianza para aventurarme en este proceso.

A toda mi familia por siempre estar presente a pesar de la distancia.

A mis nuevos y viejos amigos que han hecho de este tiempo una experiencia inolvidable.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi asesor, Dr. Uladzímir Petróvich Minkóvich, que creyó en mí y me dio la confianza para trabajar en un proyecto nuevo para él. También a mi coasesor, Dr. Yeison Javier Montagut Ferizzola, que me estuvo apoyando a pesar de la distancia. Al Dr. David Monzón, al Dr. Joel Villatoro, al Dr. Rigoberto Castro y a la M.Sc. Marisol Jaramillo que me brindaron su asesoría y ayuda en diversos momentos.

Quiero agradecer también enormemente al CIO que me abrió sus puertas como institución y me apoyó en mi proceso formativo. También a todas las personas que de una u otra manera me ayudaron y acompañaron en este proceso, en especial a las chicas del DFA por su grandioso trabajo administrativo, a los compañeros del laboratorio de electrónica, a los del taller mecánico y a los del taller óptico que me brindaron su ayuda y asesoría.

A mi familia que siempre estuvo pendiente de mis avances tanto en el ámbito de estudio como en el personal, y que me ayudaron a salir adelante en esta etapa.

También quiero agradecer a mis compañeros que estuvieron presentes en los arduos momentos de estrés con el estudio, pero que también estuvieron ahí para salir por un momento de esparcimiento.

Finalmente agradecer a CONACYT que me brindó el apoyo económico durante estos dos años de maestría, y a las instituciones que también me apoyaron como la Escuela de Ingeniería de Antioquia, la Universidad CES y el Centro de Investigaciones en Óptica.

## CONTENIDO

4

INTRC	DUC	CIÓN16
1.	PRE	ELIMINARES17
1.1	Plar	nteamiento del problema 17
1.	1.1	Contexto y caracterización del problema 17
1.2	Obj	etivos del proyecto 17
1.:	2.1	Objetivo General 17
1.:	2.2	Objetivos Específicos 18
1.3	Mar	co de referencia 18
1.3	3.1	Biosensores 18
1.3	3.2	Fibras Ópticas convencionales 20
1.3	3.3	Fibras de cristal fotónico23
1.3	3.4	Fabricación de fibras de cristal fotónico 26
1.3	3.5	Sensores de fibra óptica 29
1.3	3.6	Fabricación de fibras adelgazadas (Tapers) 31
2.	ME	TODOLOGÍA
3.	DIS	EÑO Y FABRICACION DE LA CELDA DE TRABAJO
3.1	Dise	eño y fabricación 35
3.	1.1	Prototipo #1 36
3.	1.2	Prototipos #2 y #3
3.	1.3	Prototipo #4
3.	1.4	Prototipo #5 38
3.	1.5	Prototipo #6 39
3.	1.6	Prototipo #7 41

CIO Desarr	ollo	de un biosensor utilizando un interferómetro de fibra de cristal fotónico.	5
3.	1.7	Prototipo #8 con micro-fluídica 42	
3.2	С	conclusiones	
4.	11	NTERFEROMETRO DE FIBRA DE CRISTAL FOTÓNICO44	
4.1	F	ibra de cristal fotónico	
4.2	Е	mpalmes ( <i>Splicing</i> )	
4.3	A	delgazamiento ( <i>Tapering</i> )	
5.	Ρ	RUEBAS DE INDICE DE REFRACCIÓN63	
5.1	G	licerina	
5.2	С	loruro de Sodio	
5.	2.1	Prueba con fibra #16 66	
5.	2.2	Pruebas con fibra # 1768	
5.3	S	acarosa	
5.	3.1	Pruebas con fibra #1672	
5.	3.2	Pruebas con fibra #1774	
5.4	D	9-Glucosa	
5.5	Ρ	roteína BSA 81	
6.	F A	UNCIONALIZACION DE LA FIBRA DE CRISTAL FOTÓNICO DELGAZADA83	
6.1	Ρ	rotocolo de funcionalización83	
6.	1.1	Activación: 84	
6.	1.2	Inmovilización del antígeno 85	
6.2	Ρ	ruebas	
6.3	R	esultados	
7.	S	ISTEMAS DE AYUDA ADICIONALES	
7.1	Ρ	rograma de caracterización de fibras de cristal fotónico	
7.2	Ρ	rograma de analisis de datos92	

CI0 De	) sarrollo de	e un biosensor utilizando un interferómetro de fibra de cristal fotónico.		6
	7.2.1	Análisis de datos en Python	92	
	7.2.2	Análisis de datos en Matlab	95	
8.	СО	NCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES	100	
(	Considera	aciones y trabajos futuros:	100	
BI	BLIOGRA	FÍA	102	

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Coeficientes para encontrar el parámetro V	25
Tabla 2	Características de Sensores de fibra óptica para la medición de índices de refracción	31
Tabla 3	Parámetros para el empalme SM-PCF, como se muestran en la pantalla de configuración de la empalmadora	46
Tabla 4	Características de adelgazamiento de las fibras #2 y #3	51
Tabla 5	Características de adelgazamiento de las fibras #8 y #10 después del proceso de adelgazamiento	53
Tabla 6	%V/V de glicerina en agua y su índice de refracción	63
Tabla 7	Concentración de Cloruro de Sodio en agua y su índice de refracción	66
Tabla 8	Concentración vs Índice de refracción de la Sacarosa	72
Tabla 9	Altas concentraciones de sacarosa en agua y sus índices de refracción	76
Tabla 10	Concentración vs Índice de refracción de la Glucosa	78
Tabla 11	Concentración vs Índice de refracción de soluciones de BSA en PBS.	81
Tabla 12	Soluciones preparadas para el proceso de funcionalización	83

7

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema general de un biosensor [1].	19
Figura 2	Esquema de una fibra óptica estándar de índice escalonado (representación no a escala).	20
Figura 3	Descomposición en vectores de onda de una fibra óptica de índice escalón.	21
Figura 4	Diagrama que muestra los términos más utilizados y las estructuras típicas de las diferentes clases y subclases de fibras de cristal fotónico [15].	23
Figura 5	Fotografía de una fibra de cristal fotónico (diámetro: 125 µm) con núcleo sólido y red de huecos triangular	24
Figura 6	Posicionamiento de los cilindros y tubos de vidrio para la preforma (a manera de ilustración).	26
Figura 7	Preforma con tubos y capilares (a manera de ilustración)	27
Figura 8	Preforma luego de la extrusión intermedia (a manera de ilustración).	27
Figura 9	Proceso de extrusión de fibra de cristal fotónico en la torre de estiramiento del CIO.	28
Figura 10	Proceso de fabricación de la fibra de cristal fotónico [20]	29
Figura 11	Esquema General de un sensor de fibra óptica	29
Figura 12	Perfil de una fibra de cristal fotónico adelgazada	32
Figura 13	Primer prototipo de celda de trabajo	36
Figura 14	Prototipo #2 (izquierda) y #3 (derecha)	37
Figura 15	Prototipo #4 con perfil angulado	38
Figura 16	Diseño del Prototipo #5 con perfil circular (Izquierda) y fotografía del mismo con su base (derecha).	39
Figura 17	Prototipo #6	39

CIO Desarrollo d	de un biosensor utilizando un interferómetro de fibra de cristal fotónico.	9	1
Figura 18	Fotografía del prototipo #6 en medio de una prueba	.40	
Figura 19	Celda # 6: Gráfico de pruebas con agua tomado con un analizador de espectros ópticos (OSA)	.41	
Figura 20	Prototipo #7	.42	
Figura 21	Prototipo #8 con micro-fluídica.	.42	
Figura 22	Fibra de cristal fotónico utilizada	.44	
Figura 23	Dimensiones en µm de la estructura de la PCF utilizada	.45	
Figura 24	Configuración de los electrodos para el empalme SM-PCF	.46	
Figura 25	Fotografía del resultado obtenido luego del empalme	.47	
Figura 26	Esquema de empalme SM-PCF-SM	.47	
Figura 27	Transmisión de la fibra #3 antes de ser adelgazada	.48	
Figura 28	Transmisión de la fibra #10, con 10 mm de PCF, antes y después de ser empalmada	.48	
Figura 29	Transmisión de la fibra #16, con 20 cm de PCF, antes y después de ser empalmada	.49	
Figura 30	Sistema para adelgazar fibras ópticas	.50	
Figura 31	Perfil de una fibra adelgazada.	.50	
Figura 32	Transmisión de la fibra #2 luego de ser adelgazada	.51	
Figura 33	Transmisión de la fibra #3 luego de ser adelgazada	.52	
Figura 34	Efecto del adelgazamiento en la transmisión de la fibra #2	.52	
Figura 35	Fotografía de la cintura de diámetro 28,3 µm de la fibra #8	.53	
Figura 36	Transmisión de la fibra #8 luego de ser adelgazada	.54	
Figura 37	Efecto del adelgazamiento en la transmisión de la fibra #8	.54	
Figura 38	Transmisión de la fibra #10 luego de ser adelgazada	.55	
Figura 39	Efecto del adelgazamiento en la transmisión de la fibra #10	.55	
Figura 40	Respuesta total de transmisión de la fibra #10	.56	
Figura 41	Parámetros de configuración Vytran	.57	

CIO Desarrollo d	de un biosensor utilizando un interferómetro de fibra de cristal fotónico.	10
Figura 42	Configuración del perfil de la fibra #16	58
Figura 43	Medición del diámetro final de la cintura de 18,1 µm de la fibra #16	58
Figura 44	Espectros de transmisión de la fibra #16	59
Figura 45	Respuesta total de transmisión de la fibra #16	59
Figura 46	Fotografía del perfil de subida de la fibra #16	60
Figura 47	Configuración del perfil de la fibra #17	60
Figura 48	Medición del diámetro final de la cintura de la fibra #17	61
Figura 49	Espectros de transmisión dela fibra #17.	61
Figura 50	Respuesta total de transmisión de la fibra #17.	62
Figura 51	Pruebas de concentración de glicerina en la fibra #2, con resolución de 0,5 nm.	64
Figura 52	Ajuste lineal de la fibra #2 para índices de refracción entre 1,33880 y 1,35233	64
Figura 53	Ajuste de concentración de glicerina, utilizando la fibra # 3	65
Figura 54	Espectro de transmisión de la fibra # 16 para diferentes concentraciones de NaCl, con resolución de 5 nm.	66
Figura 55	Ajuste lineal de la respuesta de la fibra # 16 ante cambios de concentración de NaCI en el rango de índice de refracción entre 1,3330 y 1,3428	67
Figura 56	Ajuste lineal de la respuesta de la fibra # 16 ante cambios de concentración de NaCl, para el primer mínimo.	68
Figura 57	Espectro de transmisión de la fibra # 17, con resolución 2 nm, para diferentes concentraciones de NaCl.	69
Figura 58	Ajuste lineal de la respuesta de la fibra # 17, con resolución del OSA en 2nm, ante cambios de concentración de NaCl	69
Figura 59	Espectro de transmisión de la fibra # 17, con resolución 0,5 nm y sin filtrar, para diferentes concentraciones de NaCI	70
Figura 60	Espectro de transmisión de la fibra # 17, con resolución 0,5 nm y con filtro gaussiano, para diferentes concentraciones de NaCl	70

CIO Desarrollo d	de un biosensor utilizando un interferómetro de fibra de cristal fotónico.	11
Figura 61	Ajuste lineal de la respuesta de la fibra # 17, con resolución del OSA en 0,5 nm, ante cambios de concentración de NaCl	71
Figura 62	Espectro de transmisión de la fibra #16, sin filtrar, ante diferentes concentraciones de sacarosa	73
Figura 63	Espectro de transmisión de la fibra #16, luego de aplicar un filtro gaussiano, ante diferentes concentraciones de sacarosa	73
Figura 64	Ajuste lineal de la fibra # 16 ante cambios de concentración de sacarosa	74
Figura 65	Espectro de transmisión de la fibra #17, luego de aplicar un filtro gaussiano, ante diferentes concentraciones de sacarosa	75
Figura 66	Ajuste lineal de la respuesta de la fibra # 17 ante cambios de concentración de sacarosa en el rango de índice de refracción entre 1,3330 y 1,3360.	76
Figura 67	Espectro de transmisión de la fibra # 17 para altas concentraciones de Sacarosa	77
Figura 68	Ajuste de la respuesta de la fibra # 17 para índices de refracción entren 1,3965 y 1,4017.	77
Figura 69	Espectro de transmisión de la fibra #17, con resolución del OSA en 2 nm, ante diferentes concentraciones de glucosa.	79
Figura 70	Ajuste lineal de la respuesta del sensor ante concentraciones de Glucosa, con un OSA de resolución 2 nm.	79
Figura 71	Espectro de transmisión de la fibra #17, con resolución del OSA en 0,2 nm, ante diferentes concentraciones de glucosa	80
Figura 72	Ajuste lineal de la respuesta del sensor ante concentraciones de Glucosa, con un OSA de resolución 0,2 nm	81
Figura 73	Ajuste lineal de la respuesta del sensor ante concentraciones de BSA, con un OSA de resolución 0,2 nm.	82
Figura 74	Esquema de formación de hidroxilos luego del tratamiento con solución piraña y proceso de silanización al aplicar APTES.	84
Figura 75	Esquema de unión del PDITC como enlace entre la superficie y la biomolécula. (Imagen obtenida de [53])	85
Figura 76	Respuesta del sensor para concentraciones entre 0,5 mg/ml y 0,125 mg/ml de anti-BSA	86

CIO Desarrollo d	de un biosensor utilizando un interferómetro de fibra de cristal fotónico.	12
Figura 77	Primera respuesta del sensor para concentraciones desde 125 ng/ml hasta 0,125 ng/ml de anti-BSA87	
Figura 78	Ajuste de la respuesta del sensor para concentraciones entre 125 pg/ml y 125 ng/ml de Anti-BSA87	
Figura 79	Segunda respuesta del sensor para concentraciones desde 12,5 ng/ml hasta 0,125 ng/ml de anti-BSA88	
Figura 80	Fotografía de la sección transversal de una fibra de cristal fotónico	
Figura 81	Resultados del diámetro y separación (en µm) entre agujeros, presentados por el algoritmo90	
Figura 82	Fotografía de una fibra estándar de 125 µm de diámetro cargada en la interfaz del algoritmo de medición91	
Figura 83	Mediciones de una fibra con diámetro de cintura de aproximadamente 41 µm92	
Figura 84	Interfaz de usuario para el programa de análisis de datos en Python	
Figura 85	Curvas filtradas automáticamente93	
Figura 86	Derivada de las curvas para identificar los picos94	
Figura 87	Desplazamiento del pico seleccionado94	
Figura 88	Gráfica de datos sin filtrar utilizando una resolución de 0,2 nm95	
Figura 89	Gráfica de los datos al aplicar un filtro gaussiano de 45 sigma96	
Figura 90	Ajuste lineal realizado utilizando la aplicación "Curve Fitting" de Matlab96	
Figura 91	Transformada de Fourier de una prueba de concentración de NaCl	
Figura 92	Datos de una muestra de NaCl en agua tomados con una resolución de 0,5 nm	
Figura 93	Descomposición en modos de la transmisión del sensor98	
Figura 94	Descomposición en el tercer modo de los datos de concentración de NaCI utilizando la fibra #1799	
Figura 95	Ajuste lineal utilizando los datos obtenidos del tercer modo	

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Planos de las celdas de trabajo	108
Anexo 2	Algoritmos de medición para fibras de cristal fotónico	109
Anexo 3	Algoritmos para el análisis de datos	110

## RESUMEN

Las fibras de cristal fotónico (PCF) son un área de interés reciente debido al amplio rango de ventajas y de opciones de configuración que presentan con respecto a las fibras ópticas convencionales estándar. Entre estas ventajas encontramos que son fabricadas con un solo material, tanto en el núcleo como en el recubrimiento, y que se pueden obtener fibras mono modo en un amplio rango de longitudes de onda.

Por esta razón se ha decidido incursionar en el área de los biosensores, que es otra área de interés reciente, utilizando estas fibras especiales. Para este fin se ha buscado diseñar un sensor que funcione gracias al efecto del campo evanescente para formar un interferómetro modal tipo Mach-Zehnder que permita la medición de soluciones acuosas con diferentes concentraciones.

En este trabajo se presentarán todos los pasos necesarios para la fabricación de un sensor de este tipo, desde la selección de la PCF con su posterior procesamiento, pasando por el diseño y fabricación de la celda de trabajo para realizar las mediciones, y las pruebas de caracterización para determinar la sensibilidad del sensor.

Adicionalmente se presentará un proceso de funcionalización del sensor, para un antígeno específico, que permitió la medición de concentraciones bajas de su anticuerpo.

Finalmente se presentan algunos algoritmos de ayuda, que permiten la caracterización en términos geométricos del sensor, y algoritmos de análisis de los datos obtenidos.

Palabras clave: Fibra óptica, cristal fotónico, interferómetro, biosensor.

## ABSTRACT

The area of photonic crystal fibers (PCF) has been lately of great interest due to its advantages and configuration options that the standard fibers don't present. Among the advantages is that it is fabricated with the same material both in the core and in the cladding, also you can have an endlessly single-mode fiber over a wide range of wavelengths.

For this reason we have decided to venture into the area of biosensors, which is another area of recent interest, using these special fibers. To this end we have sought to design a sensor that works thanks to the effect of the evanescent field to form a modal Mach-Zehnder interferometer that allows the measurement of aqueous solutions with different concentrations.

In this document we will present all the necessary steps for the manufacture of this kind of sensor, starting with the selection of the PCF and its processing, through the design and manufacturing of the work cell for measurement, and the testing process for the characterization of the sensor's sensitivity.

Keywords: Optical Fiber, Photonic crystal, interferometer, biosensor

#### INTRODUCCIÓN

Este proyecto trata sobre el desarrollo de un sensor utilizando las ventajas de las fibras de cristal fotónico diseñadas y fabricadas en el Centro de Investigaciones en Óptica (CIO), y sus posibles aplicaciones en el área de la bioquímica.

Como elemento transductor se utilizará una fibra de cristal fotónico adelgazada, de tal manera que ésta se comporte como un interferómetro modal donde uno de sus brazos será el modo fundamental y el brazo encargado de medir los cambios en el medio será un modo de orden superior.

Para lograr esto es necesario encontrar el diámetro de adelgazamiento donde se presente el patrón de interferencia, buscando maximizar la sensibilidad pero evitando que el dispositivo se vuelva frágil hasta el punto de hacer difícil su manipulación.

En las aplicaciones de bioquímica es común trabajar con soluciones en medios acuosos, es por esto que se desarrollará una celda de pruebas con el fin de facilitar la caracterización y funcionalización del sensor de fibra óptica.

Como caracterización del sensor se realizarán medidas de cambios de índice de refracción y de concentraciones de diferentes soluciones químicas. También se planteará una propuesta de protocolo de funcionalización para estudiar la sensibilidad del sensor ante un agente específico, como podría ser la presencia de una proteína en particular.

Finalmente se presentarán diferentes herramientas desarrolladas que facilitan la lectura de la respuesta del sensor y que podrían llevar a una propuesta de diseño para un sensor comercial.

#### 1. PRELIMINARES

#### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las fibras de cristal fotónico presentan propiedades especiales que les permite comportarse como elementos de medida de alta sensibilidad. Es por esto que se propone estudiar las aplicaciones de las fibras de cristal fotónico en el área de los biosensores.

#### **1.1.1 Contexto y caracterización del problema**

Un biosensor es un dispositivo analítico donde un componente biológicamente activo (receptor), como por ejemplo una enzima, un anticuerpo, una porción de tejido, una célula, etc., se une a un transductor, con el fin de detectar un analito objetivo u otros parámetros de interés biológico.

Cuando el analito objetivo es reconocido por el material biológico inmovilizado sobre la superficie del transductor, la interacción bioquímica es directamente transformada en una señal cuantificable por medio del transductor. De acuerdo con la naturaleza del transductor, la señal puede ser electroquímica (amperométrica o potenciométrica), piezoeléctrica u óptica. La señal eléctrica generada por el transductor es acondicionada y adquirida usando un *software* en conjunto con un dispositivo de adquisición de datos. Finalmente, se debe establecer una perfecta correlación entre las variaciones de la concentración del analito y los cambios de la señal [1].

En este trabajo se usó como elemento transductor una fibra de cristal fotónico (PCF, por sus iniciales en inglés) adelgazada, que se comporta como un interferómetro de Mach-Zehnder. Con este dispositivo se midieron pequeñas concentraciones de un analito de interés diluido en un medio acuoso que entra en contacto con la fibra. Para esto se realizaron pruebas con la superficie de la PCF descubierta y también se realizaron pruebas luego de un proceso de inmovilización para detectar el analito específico.

Este dispositivo es altamente sensible a cambios en la vecindad del área adelgazada del sensor, dependiendo su sensibilidad del diámetro adelgazado de la fibra y de la longitud de este adelgazamiento.

#### 1.2 OBJETIVOS DEL PROYECTO

#### 1.2.1 Objetivo General

•Desarrollar un biosensor utilizando un interferómetro de fibra de cristal fotónico.

#### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Estudiar la fabricación y el diseño de las fibras de cristal fotónico (PCF).
- Desarrollar un interferómetro basado en PCF.
- Diseñar e implementar una plataforma para realizar las pruebas con el interferómetro de PCF.
- Realizar pruebas de sensibilidad del sensor fabricado con diferentes compuestos químicos con aplicaciones biológicas.
- Desarrollar un protocolo de activación química superficial de PCF.
- Realizar pruebas de reconocimiento de analitos a través del uso del interferómetro de PCF como elemento transductor.
- Desarrollar los protocolos de reconocimiento, medición y análisis del biosensor.
- Realizar pruebas de sensibilidad del biosensor.

#### **1.3 MARCO DE REFERENCIA**

#### 1.3.1 Biosensores

De acuerdo a la IUPAC, un biosensor (Figura 1) es un dispositivo que utiliza las reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas, sistemas inmunes, tejidos, organelas celulares o células enteras para detectar compuestos químicos usualmente mediante señales eléctricas, térmicas u ópticas [2].



Figura 1 Esquema general de un biosensor [1].

La monitorización de las concentraciones de glucosa en pacientes con diabetes, la detección de pesticidas y otros contaminantes en el agua, son algunos ejemplos de aplicaciones exitosas y que están presentes en el mercado de los biosensores [3], [4].

Los sensores utilizados para determinar la interacción entre un antígeno y un anticuerpo se conocen como inmunosensores. Los anticuerpos son proteínas que pueden ser producidas naturalmente por el sistema inmune de los mamíferos en reacción a un agente externo (antígeno), pero también existen técnicas para su producción en laboratorio lo cual facilita su obtención para su posterior utilización en inmunoensayos.

Una técnica utilizada en los inmunosensores consiste en fijar un inmunoreactivo, es decir, el antígeno o anticuerpo sobre la superficie de un transductor o del elemento sensible. Las interacciones entre los inmunoreactivos hacen variar las propiedades del transductor, generando un cambio en la señal que está directamente relacionado con la inmunoreacción [1].

En el caso de los biosensores ópticos se han desarrollado técnicas basadas en mediciones de absorbancia, para la fabricación de sensores de pH [5] y de oxígeno [6]; reflectancia, para la fabricación de inmunosensores [7]; fluorescencia, en la fabricación de diversos tipos de sensores, entre ellos sensores para la detección de etanol, glucosa [8], urea y análisis de DNA [9].

Una técnica de especial interés, para este trabajo, es la que se basa en cambios de índice de refracción, que ha sido utilizada para la detección de proteínas [10]. Es posible obtener este tipo de sensores adelgazando una fibra óptica para la detección de biomoléculas como lo explica y demuestra Tian et al. en [11] o para la fabricación de sensores de DNA como lo manifestan Huang et al. en [12]. En ambos

casos se utiliza la misma configuración de fibra óptica adelgazada pero difieren en el proceso de funcionalización que se le aplica a la superficie de la misma.

#### 1.3.2 Fibras Ópticas convencionales

Las fibras ópticas convencionales se basan en el fenómeno de la reflexión total interna para guiar la luz. La fibra óptica más simple consiste en un núcleo dieléctrico con índice de refracción  $(n_1)$  recubierta por otro material dieléctrico con índice de refracción  $(n_0)$  que se le llama revestimiento, a esta fibra se le conoce como fibra óptica de índice escalonado. Adicionalmente las fibras suelen estar recubiertas por otro material polimérico que sirve como protector, lo que permite incrementar su resistencia mecánica y las protege a su vez del medio. La configuración estándar se puede visualizar en la Figura 2.



# Figura 2 Esquema de una fibra óptica estándar de índice escalonado (representación no a escala).

Para que la luz se va propague por el núcleo, y ocurra reflexión total en la interfaz núcleo/revestimiento, es necesario que se cumpla:

$$n_1 \sin(\pi/2 - \varphi) \ge n_0$$
 (1.1)

Esto quiere decir que el índice de refracción del núcleo debe ser mayor al del revestimiento y que además el ángulo  $\varphi$  de incidencia entre el vector de propagación de la luz y la interfaz núcleo/revestimiento debe ser suficientemente pequeño.

Para explicar otros conceptos es necesario mirar el guiado en la fibra en términos de ondas planas en lugar de rayos. Para esto vamos a considerar una fibra de índice escalonado infinitamente larga y con sección transversal circular de radio  $\rho$ . Suponiendo que la luz se propaga en dirección axial, es decir, en el eje z, que tiene una longitud de onda de  $\lambda$ , un número de onda  $k_0 = 2\pi/\lambda$  y una frecuencia angular

 $\omega = ck_0$ (donde c es la velocidad de la luz en el vacío), entonces podemos descomponer el campo electromagnético propagándose en el eje z como una superposición de campos que varían con  $\exp(i(\beta z - \omega t))$ , tanto en el núcleo como en el recubrimiento. Donde  $\beta$  es la constante de propagación. De esta forma se puede considerar la luz propagándose como la superposición de ondas planas con componente longitudinal  $\beta$  y componente radial  $k_{\perp}$  (también conocido como número de onda perpendicular). Esto se puede ver de manera gráfica en la Figura 3.



# Figura 3 Descomposición en vectores de onda de una fibra óptica de índice escalón.

Para cada medio el índice de refracción es el que determina la norma de cada vector de onda, y se debe cumplir que:

$$k_{\perp}^2 + \beta^2 = n^2 k_0^2 \tag{1.2}$$

Donde n es el índice de refracción local ( $n_1$  para el núcleo y  $n_0$  para el revestimiento). Para que las ondas puedan propagarse en la dirección z es necesario que  $\beta$  sea real, de lo contrario las ondas decaerán exponencialmente en esa dirección. En el caso donde  $k_{\perp}$  es imaginaria las ondas planas asociadas son de tipo evanescente y su energía no puede propagarse fuera del eje de la fibra. Es por esto que para tener un guiado apropiado, el parámetro  $k_{\perp}$  debe ser imaginario en el revestimiento. Lo que lleva a tener que  $\beta > n_0 k_0$ . Y en la mayoría de casos donde el núcleo está compuesto por un material dieléctrico transparente se tiene que el parámetro  $k_{\perp}$  es real dando como resultado que  $\beta < n_1 k_0$ . [13]

Si definimos el índice efectivo de los campos como  $n_{eff} = \beta/k_0$  entonces podemos concluir que:

- Si  $n_0 < n_{eff} < n_1$ , la luz se propaga en el núcleo y es radialmente evanescente en el revestimiento.
- Si  $n_{eff} < n_0$  la luz puede propagarse fuera del revestimiento y se pierde.

#### • Modos en una fibra óptica

Al considerar los distintos escenarios que producen la propagación de la luz al interior de la fibra, encontramos que existe un rango de ángulos incidentes, constantes de propagación o un rango de índices de refracción efectivos que hacen esto posible. De esta manera se puede decir que un modo en una fibra óptica es una distribución del campo eléctrico de forma transversal y con una constante de propagación  $\beta$  asociada, que cumple con las condiciones de frontera en la interfaz núcleo/ revestimiento. Estos modos se mantendrán a lo largo de la fibra mientras no ocurran perturbaciones adicionales, como las que se pueden presentar en el caso de acoplamientos.

#### • Número de modos

El número de modos guiados de una fibra óptica estándar de índice escalonado depende de la frecuencia normalizada V:

$$V = k_0 \rho_{\sqrt{1-n_0^2}}^2$$
(1.3)

Donde  $k_0$  es el número de onda,  $\rho$  es el radio del núcleo,  $n_1$  y  $n_0$  son los índices de refracción del núcleo y del revestimiento.

Entre menor sea este parámetro, menor será el número de modos guiados que pueden propagarse por la fibra. Una fibra mono-modo se da cuando, para una longitud de onda dada, la frecuencia normalizada V es menor a 2.405. Para valores mayores a este se considera que la fibra es multi-modo [14].

#### • Atenuación

La atenuación es una medida de la pérdida de potencia óptica de la luz al propagarse por la fibra y es medida usualmente en decibeles (dB/m o dB/km). Esta pérdida de potencia en las fibras puede darse por factores intrínsecos como el esparcimiento (scattering) y la absorción, y por factores extrínsecos como el doblamiento [14].

El esparcimiento de Rayleigh se da al interior de la fibra por pequeñas fluctuaciones en el índice de refracción de esta, mientras que la absorción es una propiedad intrínseca del material con el que está construida.

#### o **Dispersión**

La dispersión se refiere al hecho de que la fase o velocidad de grupo de las ondas dependen de su frecuencia. En las guías de onda se suele utilizar este término para referirse a todos los fenómenos que causan que los pulsos de luz se ensanchen al propagarse, y se contemplan cuatro causas esenciales:

• Dispersión inter-modal (solo en fibras multi-modo)

- Dispersión por el material
- Dispersión de la guía de onda
- Dispersión por la polarización del modo

#### 1.3.3 Fibras de cristal fotónico

Existen dos clases principales de fibras de cristal fotónico, o de manera más general fibras micro-estructuradas, las cuales se pueden dividir en aquellas que guían la luz por un fenómeno comparable al de la reflexión total interna y en otras que lo hacen por medio del efecto de banda fotónica prohibida (PBG por sus siglas en inglés).

Estas a su vez pueden ser divididas en un número de subclases que son determinadas por las dimensiones de sus estructuras y por sus propiedades específicas. Estas divisiones se pueden visualizar más fácilmente con el gráfico incluido en la Figura 4.



# Figura 4 Diagrama que muestra los términos más utilizados y las estructuras típicas de las diferentes clases y subclases de fibras de cristal fotónico [15].

Este trabajo se centró en las fibras que guían la luz por medio del fenómeno comparable al de la reflexión total interna.

Para que este fenómeno ocurra se utiliza una estructura de cristal fotónico 2D como revestimiento, y el núcleo se elige de tal forma que tenga un índice de refracción efectivo mayor. Un ejemplo de este tipo de fibra se puede ver en la Figura 5:



# Figura 5 Fotografía de una fibra de cristal fotónico (diámetro: 125 µm) con núcleo sólido y red de huecos triangular.

Estas fibras tienen la propiedad de presentar solo un modo en un amplio rango de longitudes de onda. Esto se debe a que la red de huecos alrededor del núcleo se comporta como un filtro modal [16], el cual "atrapa" al modo fundamental y deja escapar los modos de orden mayor. Para que esto suceda se ha demostrado que la relación entre el diámetro de los huecos d y la separación entre ellos  $\Lambda$  debe ser [17]:

$$d/_{\Lambda} < 0.4 \tag{1.4}$$

Debido a esto se pueden diseñar fibras con un área modal grande, las cuales pueden ser utilizadas en aplicaciones que requieran la transmisión de alta potencia óptica.

Es posible además utilizar la teoría de fibras convencionales para analizar las fibras de cristal fotónico. Un parámetro de relevancia es el conocido como frecuencia normalizada que para fibras convencionales se define como:

$$V = \frac{2\pi}{\lambda} \alpha \sqrt{n_{co}^2 - n_{cl}^2} = \sqrt{U^2 + W^2}$$
(1.5)

Con:

$$U = \frac{2\pi}{\lambda} \alpha \sqrt{n_{co}^2 - n_{eff}^2}$$
(1.6)

$$W = \frac{2\pi}{\lambda} \alpha \sqrt{n_{eff}^2 - n_{cl}^2}$$
(1.7)

Donde  $\lambda$  es la longitud de onda de operación,  $\alpha$  es el radio del núcleo,  $n_{co}$ ,  $n_{cl}$  y  $n_{co}$  son los índices de refracción del núcleo, del recubrimiento y el índice de refracción efecto del modo guiado fundamental, respectivamente. Y los parámetros U y W son la fase transversal y la atenuación normalizadas.

Para las fibras de cristal fotónico, Koshiba y Saitoh [18], proponen un parámetro  $V_{eff}$  de la siguiente manera:

$$V_{eff} = \frac{2\pi}{\lambda} \alpha_{eff} \sqrt{n_{co}^2 - n_{FSM}^2}$$
(1.8)

Donde el radio efectivo del núcleo,  $\alpha_{eff}$ , se asume como  $\Lambda/\sqrt{3}$ , siendo  $\Lambda$  la separación entre huecos en la estructura de la fibra, y  $n_{FSM}$  es el índice efectivo del recubrimiento, que se define como el índice efectivo del modo fundamental del espacio en el que están los capilares. Para encontrar este índice efectivo se utiliza el método de elementos finitos, el cual requiere un alto costo computacional.

Sin embargo en Mortensen et al. [19] proponen un método para determinar el valor V dependiendo exclusivamente de los parámetros geométricos de la PCF, es decir del diámetro de los huecos y la separación entre ellos, y de la longitud de onda de operación. La ecuación utilizada es la siguiente:

$$V\left(\frac{\lambda}{\Lambda}, \frac{d}{\Lambda}\right) = A_1 + \frac{A_2}{1 + A_3 e^{(A_4\lambda/\Lambda)}}$$
(1.9)

Donde los parámetros  $A_i$ (para i = 1 hasta i = 4) se obtienen de la siguiente ecuación:

$$A_{i} = a_{i0} + a_{i1} \left(\frac{d}{\Lambda}\right)^{b_{i1}} + a_{i2} \left(\frac{d}{\Lambda}\right)^{b_{i2}} + a_{i3} \left(\frac{d}{\Lambda}\right)^{b_{i3}}$$
(1.10)

Los coeficientes de  $a_{i0}$  hasta  $a_{i3}$  y de  $b_{i1}$  hasta  $b_{i3}$ , son constantes para todas las fibras del tipo LMA (*Large Mode Area*), y se presentan la Tabla 1.

	<i>i</i> = 1	<i>i</i> = 2	<i>i</i> = 3	<i>i</i> = 4
$a_{i0}$	0,54808	0,71041	0,16904	-1,52736
<i>a</i> <sub><i>i</i>1</sub>	5,00401	9,73491	1,85765	1,06745
<i>a</i> <sub><i>i</i>2</sub>	-10,43248	47,41496	18,96849	1,93229
<i>a</i> <sub>i3</sub>	8,22992	-437,50962	-42,4318	3,89
<i>b</i> <sub><i>i</i>1</sub>	5	1,8	1,7	-0,84

 Tabla 1
 Coeficientes para encontrar el parámetro V.

	<i>i</i> = 1	<i>i</i> = 2	<i>i</i> = 3	<i>i</i> = 4
<i>b</i> <sub><i>i</i>2</sub>	7	7,32	10	1,02
<i>b</i> <sub><i>i</i>3</sub>	9	22,8	14	13,4

De esta forma, al igual que en las fibras convencionales, la frecuencia de corte es dada por V=2,405. Es decir que cuando el valor V toma valores menores a 2,405 la fibra tiene un comportamiento mono modal y cuando toma valores mayores la fibra es multimodal.

Al conocer el parámetro V es posible encontrar el índice de refracción efectivo y la dispersión de la guía de onda [18].

#### **1.3.4** Fabricación de fibras de cristal fotónico

Uno de los aspectos más importantes en el diseño y desarrollo de nuevas fibras o dispositivos de fibras es su proceso de fabricación. Esto se resalta especialmente en las fibras micro-estructuradas ya que hay que tener especial cuidado con los parámetros del material y las fuerzas involucradas, como la viscosidad, gravedad o tensión superficial, para obtener la estructura con la geometría deseada.

El primer paso para fabricar una fibra de cristal fotónico es crear la preforma, la cual contiene la misma estructura deseada de la fibra pero a una escala mucho mayor. Esto se logra posicionando cilindros sólidos y tubos de sílice, según sea necesario, como se muestra en la Figura 6.



# Figura 6 Posicionamiento de los cilindros y tubos de vidrio para la preforma (a manera de ilustración).

Luego estos se acomodan al interior de otro cilindro de sílice más grande, y se llenan los espacios entre tubos con barras más pequeñas, llamadas capilares, del mismo material, Figura 7.



Figura 7 Preforma con tubos y capilares (a manera de ilustración).

Esta preforma pasa por un proceso de extrusión intermedio para fusionar los capilares y barras, Figura 8.



Figura 8 Preforma luego de la extrusión intermedia (a manera de ilustración).

La preforma pasa a una torre de estiramiento de fibra convencional para aumentar considerablemente el largo de la fibra y reducir su sección transversal, Figura 9.



Figura 9 Proceso de extrusión de fibra de cristal fotónico en la torre de estiramiento del CIO.

Posteriormente, esta fibra pasa por un proceso que la recubre de un polímero protector y finalmente la fibra es recolectada en un carrete para su almacenamiento.

A diferencia del estirado de fibras convencionales, el estirado en fibras de cristal fotónico se realiza a una temperatura más baja, aproximadamente a 1900 °C para evitar que los huecos de aire colapsen. También se suele aplicar presión al interior de los huecos de aire para mantener un mejor control sobre las dimensiones finales de estos. El esquema del proceso completo se puede ver en la Figura 10.

28



Figura 10 Proceso de fabricación de la fibra de cristal fotónico [20].

#### 1.3.5 Sensores de fibra óptica

Los sensores donde el generador de la señal, el canal de transmisión, el transductor o el detector, están compuestos en parte o en su totalidad por fibras ópticas se denominan Sensores de fibra óptica. En estos sensores la perturbación de entrada, que puede ser química, física, biológica, eléctrica, entre otras, modifica al menos uno de los parámetros de la luz, es decir su amplitud, frecuencia, fase o estado de polarización [21]. Luego el sistema detector recolecta estos cambios y los transforma, usualmente, en una señal eléctrica de salida. La configuración más general para un sensor de este tipo es la presentada en la Figura 11.



Figura 11 Esquema General de un sensor de fibra óptica.

Adicionalmente, los sensores de fibra óptica se pueden clasificar de acuerdo a:

- La variable física a medir
- La distribución espacial de la variable
- La modulación de los parámetros de la luz

Respecto a la distribución espacial se pueden diferenciar 4 categorías:

- a) Puntuales: Cuando la medición se hace en un solo punto fijo del espacio u objeto determinado.
- b) Distribuidos: Cuando las mediciones se hacen simultáneamente en varios puntos del espacio utilizando una misma fibra óptica
- c) Cuasi-Distribuidos: Cuando las mediciones se realizan en varios puntos discretos del espacio utilizando una misma fibra óptica.
- d) Integrados: Se realiza un gran número de mediciones sobre el objeto o espacio y luego se integran para obtener un solo valor.

También es posible diferenciar los sensores de acuerdo a la modulación que generan en la luz, así:

- a) Aquellos que modifican la amplitud o intensidad de la luz transmitida por la fibra óptica.
- b) Los que modifican la polarización de luz transmitida, conocidos como polarimétricos.
- c) Espectroscópicos, en los cuales el espectro de la señal contiene la información de la variable medida.
- d) Interferométricos o de cambio de fase, en los cuales la variable a medir ocasiona un desplazamiento de fase de la luz transmitida.

Con este amplio rango de posibilidades de sensores de fibra óptica es necesario determinar cuál es el más adecuado para cada aplicación [22].

Adicionalmente los sensores de fibra óptica tienen grandes ventajas frente a otros sistemas, como lo es la alta sensibilidad, la resolución de las técnicas ópticas y las características intrínsecas de las fibras ópticas. Entre las ventajas intrínsecas podemos mencionar:

• Inmunidad a la interferencia electromagnética, debido al material dieléctrico con el cual es construida la fibra.

- Químicamente inertes, lo que los hace idóneos para pruebas químicas y biológicas.
- Resistencia a altas temperaturas debido, nuevamente, al material con el que son fabricadas.
- La posibilidad de crear sistemas pequeños y ligeros.

Un sensor de fibra óptica de interés es el conocido como refractómetro, el cual permite medir el índice de refracción de los materiales. Para lograr fabricar este tipo de sensor de fibra óptica se han estudiado diversas técnicas que presentan diferentes ventajas y limitaciones. Algunos de estos sensores y sus características se presentan a continuación:

# Tabla 2Características de Sensores de fibra óptica para la medición de<br/>índices de refracción.

Configuración	Rango de índice de refracción	Sensibilidad	Desventajas	Referencia
Etched FBG	1,330-1,341	727 nm/RIU	Fragilidad Costo	[23]
LPG in Pure silica fiber	1,321-1,327	40 nm/RIU	Fabricación	[24]
Air clad PCF SMS structure	1,322-1,325	800 nm/RIU		[25]
Non adiabatic taper in fiber loop mirror	1,338-1,352	1233 nm/RIU	Fragilidad	[26]
SPR-taper	1,332-1,338	5000 nm/RIU	Fragilidad Fabricación	[27]

#### 1.3.6 Fabricación de fibras adelgazadas (Tapers)

Para que una fibra óptica pueda ser utilizada para medir cambios en el medio es necesario realizarle un proceso que la sensibilice. Esto es debido a que las fibras ópticas usualmente son diseñadas para transportar la luz de forma que los parámetros externos no la afecten.

Uno de los métodos que se han estudiado para sensibilizar la fibra es el conocido como adelgazamiento (o *tapering* en inglés). Este proceso consiste en calentar una zona de la fibra, hasta suavizarla, mientras es estirada longitudinalmente. Con esto

se logra que el diámetro de la fibra en la parte calentada se reduzca considerablemente. Es posible conseguir diámetros en la cintura de hasta 1  $\mu$ m, sin embargo, es importante considerar que para diámetros cada vez más pequeños la fragilidad y la dificultad de manipular la fibra aumentan [28].

Entre las fuentes de calor que usualmente se utilizan para calentar las fibras están los láseres de  $CO_2$ , el arco eléctrico entre 2 electrodos, el calentamiento de un filamento o un micro-soplete de combustión, producto de la combustión de una mezcla de oxígeno y butano.

El perfil obtenido mediante el proceso de adelgazamiento, cuando se aplica a una fibra micro-estructurada, se puede ver en la Figura 12. En este se pueden distinguir 3 zonas de interés. Una zona de longitud  $L_0$  (longitud de la cintura), con diámetro exterior  $\rho_w$  (diámetro de la cintura) donde los huecos de la fibra han sido colapsados, intencionalmente. Y una zona de compresión a la izquierda y de expansión a la derecha.



Figura 12 Perfil de una fibra de cristal fotónico adelgazada.

La zona de compresión a la derecha permite que la propiedad de confinamiento de la luz en el núcleo se rompa y hace que se generen dos modos guiados, uno que continua siendo el modo fundamental y otro modo de orden superior. Cuando estos dos modos se desplazan por la zona colapsada generan un efecto que se conoce como interferencia modal. Luego, al llegar a la zona de expansión, los dos modos son acoplados nuevamente en uno solo que viaja a través del resto de la fibra hasta el sistema detector. Este haz resultante lleva la información de la interferencia generada en el área estrechada, que es sensible a cambios en el medio [29].

Si se supone que solo dos modos están presentes en la interferencia, es decir, solo consideramos dos índices efectivos: un índice efectivo del núcleo  $n_{co}$  y uno del revestimiento  $n_{cl}$ . Entonces se puede expresar la intensidad de salida como:

$$I_T = I_{co} + I_{cl} + 2\sqrt{I_{co}I_{cl}\cos(\Delta\theta)}$$
(1.11)

Donde  $I_{co}$  e  $I_{cl}$  son las intensidades de los modos del núcleo y del revestimiento, respectivamente y  $\Delta\theta$  es la diferencia de fase entre estos. Esta diferencia de fase es la causante del patrón de interferencia y es generada por la diferencia entre índices de refracción del núcleo y revestimiento ( $\Delta n$ ) y por la distancia en la que interaccionan (longitud de la cintura  $L_0$ ):

$$\Delta \theta = \frac{2\pi}{\lambda} (\Delta n) L_0 \tag{1.12}$$

Debido a que solo se tiene un modo excitado en el revestimiento, entonces la distancia de interacción física es exactamente la misma  $L_0$ , pero la longitud del camino óptico entre modos varía debido a la diferencia entre los índices de refracción efectivos de estos ( $\Delta n = n_{eff}^{co} - n_{eff}^{cl}$ ). De esta forma al cambiar el índice de refracción del medio, se genera un cambio en la diferencia de fase que se visualiza en un desplazamiento del espectro de transmisión [30].

Las fibras estrechadas pueden además separarse en dos categorías: adiabáticas y no adiabáticas. Las fibras adiabáticas se caracterizan en que las áreas de compresión y expansión presentan un ángulo muy pequeño, con el fin de que el acoplamiento se dé de forma muy suave. De este modo se obtiene muy bajas pérdidas en el proceso, y la mayor parte de la radiación se mantiene en el modo fundamental de la fibra [31].

Para obtener una fibra estrechada de forma no adiabática, es necesario generar un cambio abrupto del diámetro de la fibra (un ángulo grande). De esta forma el acoplamiento se da entre el modo fundamental y un modo de orden superior, generando un interferómetro modal que se puede comparar con un interferómetro de Mach-Zehnder [32].

#### 2. METODOLOGÍA

Para el cumplimiento de los objetivos, se dividió el problema en los siguientes puntos importantes:

1. Diseño de la celda de trabajo

En esta etapa se presentarán diferentes propuestas de diseños para la celda de trabajo, así como su fabricación, las pruebas y las conclusiones y resultados de cada uno de estos diseños. Finalmente se presentará el diseño seleccionado para continuar con las demás etapas.

2. Fabricación de un interferómetro modal de fibra de cristal fotónico

Aquí se presentará todo el proceso de fabricación para crear un interferómetro de fibra de cristal fotónico. Se dará a conocer desde la estructura de fibra óptica utilizada, pasando por el empalme (*splicing*) con fibra estándar, hasta el proceso de adelgazamiento (*tapering*) de todos los prototipos construidos y algunos de los resultados obtenidos con ellos.

3. Pruebas de índice de refracción

Se mostrarán las pruebas realizadas para diferentes soluciones en medios acuosos que presentan diferentes índices de refracción. Estas pruebas son importantes pues son aplicaciones directas del sensor en áreas como la farmacéutica, la industria de alimentos y la medicina.

4. Proceso de funcionalización de la fibra

Se presentará una propuesta de un proceso de funcionalización de la fibra para volverla selectiva ante un analito específico.

5. Sistemas adicionales

Finalmente se darán a conocer otros sistemas que fueron implementados como ayuda para el desarrollo de este trabajo. Entre ellos se encuentran programas para la medición de los parámetros dimensionales de las fibras y un programa para la fácil lectura y análisis de los datos obtenidos.

Finalmente es importante resaltar que este proyecto fue en su mayoría experimental. Por esta razón los puntos anteriores no fueron realizados de una forma lineal, sino que se fueron aprendiendo y modificando en el transcurso del trabajo.

#### 3. DISEÑO Y FABRICACION DE LA CELDA DE TRABAJO

El primer paso para desarrollar el sensor de fibra de cristal fotónico consistió en idear y fabricar una celda de trabajo que permitiera fijar la fibra y realizar las pruebas en medios acuosos. Para esto se definieron los siguientes criterios de diseño:

- Volumen de trabajo pequeño: Se busca mantener el volumen de trabajo lo más pequeño posible con el fin de reducir la cantidad de reactivos necesarios, reduciendo así los costos. Es por esto que se planteó un volumen que va desde los 30 hasta los 100 µl.
- **Fácil manejo:** Es importante que la celda se pueda manipular con facilidad, ya que en esta se llevará a cabo el proceso de funcionalización y detección.
- **Protección a la fibra:** El sensor de fibra propuesto es muy frágil, es por esto que la celda debe ofrecer cierta protección para evitar que la fibra se rompa durante las pruebas y manipulación.
- Inmersión total del área sensible: Para el buen funcionamiento del sensor es indispensable que el área sensible de este se mantenga en total inmersión dentro del líquido a medir, asegurando también la repetitividad de las pruebas.
- **Resistencia a los reactivos:** En los procesos de inmovilización biológica se suele utilizar un reactivo agresivo llamado solución piraña que ataca principalmente los componentes orgánicos. Es por esto que se debe utilizar, en la fabricación de la celda, un material que no sea afectado por esta solución.
- Fácil acceso de los líquidos: Pensando en un primer prototipo de celda, utilizado para la experimentación temprana del biosensor, se propone que este facilite la inyección y extracción de líquidos del área de trabajo.

#### 3.1 DISEÑO Y FABRICACIÓN

Tomando en cuenta los criterios de diseño se propuso utilizar como material el **politetrafluoroetileno (PTFE)**, conocido también como Teflon<sup>™</sup>. Este material es muy resistente a la corrosión y es muy poco reactivo, debido principalmente a los fuertes enlaces entre el carbono y el flúor. Adicionalmente su coeficiente de fricción es muy bajo, lo que facilita la remoción de partículas y la limpieza de la celda.

Adicionalmente algunos de los primeros prototipos fueron construidos utilizando una máquina de impresión 3D, la cual utiliza ABS como material, con el fin de visualizar y probar de manera más acertada la manipulación de la celda, y la protección ofrecida a la fibra.

#### 3.1.1 Prototipo #1

El primer prototipo propuesto, mostrado en la Figura 13, consiste en una estructura elipsoidal con un eje mayor de 20 mm, un eje menor de 10 mm y un espesor de 3 mm. El pozo para depositar los líquidos tiene un volumen de trabajo de aproximadamente 30  $\mu$ l.



Figura 13 Primer prototipo de celda de trabajo.

Este prototipo fue fabricado utilizando una impresora 3D de la Escuela de Ingeniería de Antioquia y la Universidad CES. Pero aunque el volumen de trabajo era ideal y al aplicar los líquidos el sensor quedaba totalmente sumergido, su pequeño tamaño hacían que fuera difícil de manipular y no ofrecía buenos métodos para sujetar la fibra en los extremos. Adicionalmente se necesitaría de equipo especial para poderlo fabricar en PTFE.

#### 3.1.2 Prototipos #2 y #3

Los prototipos #2 y #3, Figura 14, fueron ideados de tal forma que fuera más fácil la manipulación de la celda. Estos tienen un largo de 30 mm, un ancho de 10 mm y un espesor total de 3 mm. El volumen de trabajo es de aproximadamente 30  $\mu$ L. Los prototipos están compuestos por un cuerpo inferior en el que se inserta la fibra, y un cuerpo superior que sirve para asegurarla y protegerla. Para unir los 2 cuerpos se propone un pegante acrílico y sellos herméticos de PTFE con el fin de mantener los líquidos al interior del pozo. La diferencia entre los 2 prototipos es que en el #3 se ha propuesto instalar simultáneamente 2 fibras, con el fin de realizar pruebas en paralelo. Donde una podría servir como referencia de la otra, o se podría utilizar para validar la selectividad del proceso de funcionalización.


Figura 14 Prototipo #2 (izquierda) y #3 (derecha).

Estos prototipos no fueron fabricados, y se quedaron solo como propuestas de diseño.

### 3.1.3 Prototipo #4

La Figura 15 esquematiza el prototipo #4, en el cual, se incorporó la idea de utilizar un perfil en ángulo con el fin de eliminar la necesidad de sellos herméticos resistentes a los reactivos. Se mantuvo un volumen de trabajo aproximado de 40  $\mu$ l. Tiene además un largo de 100 mm, un ancho de 60 mm y un espesor máximo de 20 mm, lo cual facilita notoriamente la manipulación de la celda.

El ángulo propuesto es de 15° para ambos lados respecto a la horizontal. Esto permite una inmersión total del área sensible y evita que los reactivos lleguen a los lugares indeseados de la fibra.

El prototipo fue fabricado primero en ABS utilizando la impresora 3D del CIO. En este se determinó que era posible disminuir el ancho de la celda a la mitad, es decir, 30 mm. Con estas nuevas dimensiones fue posible utilizar una barra de PTFE de 38.1 mm de diámetro para maquinar la celda en los talleres del centro de investigación.

Con este prototipo se lograron hacer algunas pruebas preliminares con los primeros interferómetros de fibra de cristal fotónico fabricados. Sin embargo el perfil angulado hacía difícil la instalación de la fibra en el canal central debido a la naturaleza frágil del vidrio desprotegido. Esta angulación también aumentaba las pérdidas por doblamiento del sensor.

37



Figura 15 Prototipo #4 con perfil angulado.

### 3.1.4 Prototipo #5

El prototipo #5, Figura 16, tiene un diseño circular para evitar cualquier derramamiento indeseado de las soluciones. Tiene un diámetro de 38.1 mm y una altura máxima de 12 mm, y el volumen de trabajo se mantuvo en aproximadamente 40 µl. Los ángulos propuestos debieron aumentar a 20° debido al pequeño diámetro del material en el que se piensa maquinar. Sin embargo se consideró que el área central fuera plana con el fin de no ocasionar pérdidas adicionales por doblamiento en la fibra descubierta y también disminuir las probabilidades de quebrar la fibra al instalarla. Adicionalmente se agregaron 2 ranuras horizontales que servirán para sujetar la fibra óptica.

Este prototipo fue construido en PTFE en el taller mecánico del CIO y en él se lograron hacer algunas pruebas. En esta ocasión la fragilidad y quebramiento de la fibra se daba a la salida de la celda debido al ángulo de 90° en estas esquinas. Para solucionar esto se creó una plataforma, en la impresora 3D, que sirvió tanto de apoyo de la fibra como también para aumentar el tamaño de la celda, facilitando así su manipulación.





### 3.1.5 Prototipo #6

Este prototipo tiene un perfil plano pues luego de muchas pruebas se determinó que, en estos volúmenes y para estas dimensiones del pozo, la tensión superficial de los líquidos era suficiente para mantenerlos al interior, Figura 17. De igual forma se realizaron 2 agujeros pasantes a cada lado para evitar que cualquier líquido se pueda desplazar por efectos de capilaridad hasta las ranuras de sujeción en los extremos y se recomienda poner un recipiente de vidrio o un papel absorbente debajo de la celda para recolectar los líquidos que se puedan ir por estos agujeros.

También se consideraron chaflanes en los bordes de la fibra para evitar quebramientos en estos sitios. El volumen de trabajo es de aproximadamente 50  $\mu$ l, con un largo del pozo de 13 mm.



Figura 17 Prototipo #6.

Esta celda, Figura 18, se fabricó utilizando como base el prototipo #4 para economizar en materiales.



Figura 18 Fotografía del prototipo #6 en medio de una prueba.

Al realizar diversas pruebas con el sensor, en esta celda, se encontró que se estaba presentando un efecto que generaba inestabilidad en las lecturas. El efecto se debía a que el área sensible del interferómetro de fibra óptica era mayor al largo del pozo y un pequeño cambio en la cantidad que cubría al sensor generaba un gran desplazamiento de fase.

Este efecto se descubrió aplicando, deliberadamente, liquido en diferentes lugares del canal de la fibra, así como al interior del pozo y obteniendo los espectros ópticos de la respuesta por medio de una fuente de luz LED, con longitud de onda central en 1550 nm, y un analizador de espectros ópticos (OSA) Ando AQ-6215E.

De esta forma se determinó que el sensor no era solo sensible en la cintura, sino que su sensibilidad empezaba desde el lugar de compresión del perfil de la fibra. A su vez también era sensible, aunque de menor manera, en el lugar de expansión de la fibra donde se acoplaban nuevamente los modos.

La Figura 19 presenta los diferentes valores que arrojó el sensor aplicando la misma cantidad de agua, pero cubriendo más o menos cantidad de área sensible. Los cambios se podían observar incluso si el líquido era depositado solamente en el pozo central de la celda. Esto se debía a que los bordes del pozo no estaban sellados completamente, sino que se utilizaba la tensión superficial del líquido para que este no fluyera por los canales laterales. Sin embargo, con este mecanismo, era posible que dependiendo de la velocidad y posición con la que se vertiera el líquido, los bordes del sensor presentaran mayor o menor contacto, variando así el índice efectivo y por tanto la posición de los picos de interferencia.



# Figura 19 Celda # 6: Gráfico de pruebas con agua tomado con un analizador de espectros ópticos (OSA).

#### 3.1.6 Prototipo #7

El último prototipo fabricado es una pequeña modificación del prototipo anterior. En este se mantuvieron todas las medidas y solo se cambiaron las dimensiones del pozo central, y el canal para la fibra, como se puede ver en Figura 20.

El pozo central aumentó de tamaño, dejándolo con un largo de 23 mm pero reduciendo un poco su profundidad, para obtener un volumen de trabajo de 70 µl.

El canal de la fibra se descentro un poco, dando así más espacio para manipular los líquidos al interior del pozo. También se cambió la ranura por una en forma de V, para tener un mejor guiado y alineación de la fibra en la celda.

Las ranuras laterales, para la sujeción de la fibra, se calcularon de tal forma que una porción de la fibra óptica, con recubrimiento de polímero, sobresaliera levemente. De esta forma es posible utilizar cintas adhesivas como mecanismo de sujeción, sin perder la alineación de la fibra a través de la celda.



Figura 20 Prototipo #7.

Este fue el último prototipo fabricado y en el que se realizaron el mayor número de pruebas con el interferómetro de fibra de cristal fotónico.

### 3.1.7 Prototipo #8 con micro-fluídica

Se propone un diseño, Figura 21, utilizando micro-fluídica, en el cual se asegura que el sensor siempre esté inmerso en la misma cantidad de líquido. Con este diseño también es posible realizar pruebas con un flujo constante de líquido al interior de la celda, lo que permitiría medir en tiempo real la interacción entre la superficie de la fibra y el medio.

El diseño consta de dos partes separadas que se unen por medio de 6 tornillos M4 que aseguran un sellado uniforme de la celda. El volumen de trabajo aproximado es de 60 µl. Los orificios de entrada y de salida están diseñados para trabajar con casquillos de 1 mm de diámetro y tuercas de 1/4 de pulgada. Este diseño se basó en el trabajo de Krohn [33].



Figura 21 Prototipo #8 con micro-fluídica.

Este diseño se propone solo de forma teórica, como un trabajo que podría mejorar el desempeño del sensor a futuro, pues no se tiene suficiente conocimiento del tema de construcción de celdas de micro fluidos.

## 3.2 CONCLUSIONES

Luego de probar y discutir diferentes diseños de celdas de trabajo se llegó a la conclusión que el prototipo #7 es la mejor opción para continuar con los estudios en esta etapa del proyecto. Esto se debe a que el prototipo ofrece las siguientes ventajas:

- Una buena sujeción de la fibra sin necesidad de mecanismos permanentes, como sería la situación al utilizar un pegamento. Adicionalmente los agujeros pasantes evitan que los líquidos lleguen al área de sujeción, pues podrían debilitar el material adherente y cambiar las condiciones del sensor, perdiendo así repetitividad en las pruebas.
- Fácil instalación de la fibra, debido a su perfil plano.
- Fácil acceso a los líquidos, ya que la ranura para el guiado de la fibra se ha descentrado, dejando así un mayor espacio para insertar la jeringa o micropipeta utilizada para la manipulación de los reactivos.
- Permite cubrir un área mayor del sensor, 23 mm, debido a su pozo con forma alargada.
- Fácil manipulación de la celda, gracias a sus dimensiones exteriores.
- Volumen de trabajo aceptable, el cual en la práctica es de aproximadamente 90 µl. Esto se debe a que la tensión superficial de los líquidos forma una gota que sobresale de la superficie de la celda sin derramarse, lo que aumenta la cantidad necesaria para cubrir todo el largo del sensor.
- Material de fabricación de PTFE, que es poco reactivo, resiste altas temperaturas (punto de fusión de 327°C) y es de fácil limpieza gracias a sus propiedades anti adherentes.

# 4. INTERFEROMETRO DE FIBRA DE CRISTAL FOTÓNICO

Para la fabricación de un interferómetro modal a base de fibra de cristal fotónico es necesario considerar tres fases o procesos.

La primera fase consiste en la selección y caracterización de la fibra de cristal fotónico que se va a utilizar. Luego sigue el proceso de empalme con fibras estándar para reducir los costos del sensor. Finalmente está el proceso de adelgazamiento de la fibra que se encargará de generar el patrón de interferencia, el cual es sensible a cambios en el medio cercano a la fibra.

### 4.1 FIBRA DE CRISTAL FOTÓNICO

La fibra de cristal fotónico seleccionada es del tipo LMA (*Large Mode Area*), la cual tiene un núcleo sólido y una distribución de huecos alrededor de este en forma hexagonal, Figura 22. Esta fibra fue fabricada en el CIO y ha sido utilizada en diversos estudios, entre ellos [34] y [35].



Figura 22 Fibra de cristal fotónico utilizada.

Esta fibra tiene una separación  $\Lambda$ , de aproximadamente 8,76 µm, un diámetro de agujero promedio d, de aproximadamente 6,03 µm y un diámetro exterior promedio de 125 µm. Estos valores fueron obtenidos con ayuda del algoritmo presentado en la sección 7.1, el cual entrega los resultados presentados en la Figura 23.



Figura 23 Dimensiones en µm de la estructura de la PCF utilizada.

Esta estructura presenta una relación  $d/\Lambda$  de 0,689 lo cual indica que tiene un comportamiento multimodal. La caracterización de las propiedades modales de este tipo de fibra se explica con mayor detalle en [36].

### 4.2 EMPALMES (SPLICING)

El proceso de empalme se realizó con el fin de reducir el costo del sensor, ya que la fibra micro-estructurada es mucho más costosa, con un precio superior a los \$100 dólares por metro en comparación con una fibra mono modo estándar que tiene un precio alrededor de los \$0,5 dólares por metro [37].

Para realizar el empalme se utilizó una empalmadora comercial Sumitomo Type-46s en la cual se modificaron los parámetros para lograr unir la fibra estándar con la PCF, tratando de mantener las pérdidas lo más bajas posibles sin generar un empalme frágil.

La dificultad para empalmar una fibra de cristal fotónico con una fibra estándar consiste en que las dos fibras requieren una temperatura diferente para llegar al punto de fusión debido a la diferencia en el área transversal. La fibra estándar es totalmente sólida y necesita una potencia mayor, mientras que la PCF tiene agujeros que la atraviesan longitudinalmente, reduciendo así el área y requiriendo menor potencia. Adicionalmente el calor al momento de la fusión puede hacer que los huecos de la PCF se colapsen y este efecto genera una interferencia adicional que es muy sensible a deformaciones en el sensor como lo muestra Villatoro Joel en [38] y [39].

En busca de obtener un buen empalme se empezó utilizando la configuración para empalmar dos fibras multi-modo, el cual intenta alinear las fibras basándose en el diámetro exterior y no en el núcleo. Esto se hace debido a que la PCF no presenta un núcleo de índice de refracción diferente al del recubrimiento y por esta razón el programa de la empalmadora no es capaz de reconocerlo para la alineación.

El siguiente paso fue reducir la potencia del electrodo variando el tiempo de fusión y pre-fusión. Finalmente se hicieron los últimos ajustes de potencia desplazando el electrodo de forma que, al generar el arco, transmitiera un mayor calor a la fibra estándar. El esquema de la configuración del electrodo se presenta en Figura 24.



Figura 24 Configuración de los electrodos para el empalme SM-PCF.

Los parámetros con mejores resultados para realizar el empalme entre fibra estándar y la fibra de cristal fotónico se presentan en la Tabla 3.

pantalla de configuración de la empalmadora.		
Parámetro	Valor	
Arc Center	290 dot	
Fusion Time	2 sec	
Prefusion Time	0,1 sec	
Arc Gap	20 µm	

40 µm

53 step

Tabla 3 Parámetros para el empalme SM-PCF, como se muestran en la

**Over Lap** 

Arc Power

Donde, "dot" y "step" son unidades definidas por el fabricante de la empalmadora Sumitomo Type-46s.

Los demás parámetros se dejaron iguales a los utilizados para empalmar fibras mono modales.

Al realizar la fusión con estos parámetros se obtiene un empalme como el mostrado en la Figura 25, en el cual, si se observa con detenimiento, es posible ver el lugar donde se unieron las fibras y el área de los huecos colapsados.



Figura 25 Fotografía del resultado obtenido luego del empalme.

Este procedimiento se efectuó de igual forma en ambos extremos de la fibra de cristal fotónico, generando así una estructura SM-PCF-SM como se muestra en la Figura 26.



Figura 26 Esquema de empalme SM-PCF-SM.

Algunos de los sensores se fabricaron sin ningún tipo de empalme, fibras #1 a #5, otros se realizaron con pedazos cortos de 7 a 10 mm de PCF, fibras #6 a #11 y las últimas se fabricaron con pedazos largos de 16 a 20 cm de PCF, fibras #12 a #17.

Los espectros de transmisión antes y después del empalme de una muestra de cada uno de estos grupos se muestran en la Figura 27, Figura 28 y Figura 29 respectivamente.



Figura 27 Transmisión de la fibra #3 antes de ser adelgazada.



Figura 28 Transmisión de la fibra #10, con 10 mm de PCF, antes y después de ser empalmada.



# Figura 29 Transmisión de la fibra #16, con 20 cm de PCF, antes y después de ser empalmada.

Las pérdidas de transmisión máximas generadas por estos empalmes son de 7 dB. También se observó que con secciones de PCF más largas, la interferencia debida a los huecos colapsados, se reduce notoriamente, hasta ser casi imperceptible.

## 4.3 ADELGAZAMIENTO (TAPERING)

Se realizaron dos tipos de adelgazamientos en la fibra de cristal fotónico, utilizando dos sistemas diferentes.

El primer sistema, que se utilizó en la mayor parte del proyecto, consiste en estirar lentamente la fibra mientras se calienta la zona de la cintura con una flama oscilante, producto de la Figura 30. Este sistema consiste en dos mordazas que aprisionan la fibra óptica en ambos lados y por medio de un sistema de motores la estiran lentamente mientras es calentada en el centro por medio de una flama oscilante, producto de la combustión de la mezcla de oxígeno y butano.



Figura 30 Sistema para adelgazar fibras ópticas.

Al aplicar esta técnica es posible determinar la distancia que es necesario estirar la fibra para obtener un diámetro final deseado, como se explica en Harun S.W [40], utilizando la siguiente ecuación:

$$L = 2 l_0 \ln(\frac{d_f}{d_0})$$
(4.1)

Donde  $l_0$  es la longitud de la cintura,  $d_f$  es el diámetro final deseado y  $d_0$  es el diámetro inicial de la fibra. De esta manera se obtiene el perfil mostrado en la Figura 31.



Figura 31 Perfil de una fibra adelgazada.

Sim embargo, para fabricar los sensores de este proyecto, se optó por monitorear la señal de transmisión del sensor hasta obtener el patrón de oscilación deseado, utilizando una fuente de luz LED y un OSA.

Los primeros sensores, exitosamente fabricados y compuestos enteramente de PCF, fueron obtenidos con las siguientes características:

CIO Desarrollo de un biosensor utilizando un interferómetro de fibra de cristal fotónico.

Tabla 4	Características de adelgazamiento de las fibras #2 y #3.			
Sensor	$d_0$	l <sub>o</sub>	L	$d_f$
Fibra #2	123 µm	5 mm	14,89 mm	27,75 µm
Fibra #3	124 µm	5 mm	13,13 mm	33,36 µm

51

Las transmisiones de estas fibras, luego de ser adelgazadas, se muestran en la Figura 32 y en la Figura 33, respectivamente.



Figura 32 Transmisión de la fibra #2 luego de ser adelgazada.

En estas figuras se puede ver que la transmisión de la fibra luego de ser adelgazada presenta un comportamiento oscilatorio, que se debe a la interferencia de los modos al interior de la fibra.



Figura 33 Transmisión de la fibra #3 luego de ser adelgazada.

Este patrón presenta tres picos fácilmente identificables, con un rango espectral libre de aproximadamente 35 nm, y unas perdidas máximas de aproximadamente 10,4 dB. Estos parámetros se pueden identificar con mayor facilidad al calcular la diferencia entre la transmisión antes y después de que la fibra es adelgazada, obteniéndose el siguiente resultado:



Figura 34 Efecto del adelgazamiento en la transmisión de la fibra #2.

Luego se probó el mismo método de adelgazamiento en las fibras empalmadas, con secciones de PCF de aproximadamente 1 cm de largo.

Las características de adelgazamiento de algunas de estas fibras se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5	Características de adelgazamiento de las fibras #8 y #10 después
	del proceso de adelgazamiento.

Sensor	$d_0$	l <sub>o</sub>	L	$d_f$
Fibra #8	127 µm	8 mm	24,05 mm	28,25 µm
Fibra #10	127 µm	6 mm	22,00 mm	20,30 µm

El valor del diámetro de la fibra #8 fue comprobado utilizando la procesadora de vidrio Vytran. La Figura 35 muestra la fotografía correspondiente.



Figura 35 Fotografía de la cintura de diámetro 28,3 µm de la fibra #8.

El espectro de transmisión de la fibra #8 luego de ser empalmada entre 2 fibras estándar, y la transmisión luego de ser adelgazada se muestra en la Figura 36.



Figura 36 Transmisión de la fibra #8 luego de ser adelgazada.

El efecto del adelgazamiento de la fibra se puede ver de manera más clara al tomar la diferencia entre las dos curvas, dando como resultado el espectro de transmisión presentado en la Figura 37. En este es posible ver que la respuesta tiene un rango espectral libre de aproximadamente 18 nm y que se generaron unas pérdidas máximas de 12 dB.



Figura 37 Efecto del adelgazamiento en la transmisión de la fibra #8.

Con las características de la fibra #10 mostradas en la Tabla 5, se obtuvo el espectro de transmisión mostrado en la Figura 38.



Figura 38 Transmisión de la fibra #10 luego de ser adelgazada.

Al realizar la diferencia entre el espectro antes y después de ser adelgazado se obtiene la respuesta que se muestra en la Figura 39.



Figura 39 Efecto del adelgazamiento en la transmisión de la fibra #10.

En este caso las pérdidas generadas por el adelgazamiento son mayores a las presentadas en la fibra #8 debido al diámetro más pequeño obtenido en la cintura. Sin embargo el rango espectral libre se mantuvo muy parecido, siendo en este caso de aproximadamente 19 nm.

Para calcular la respuesta de transmisión total del sensor es necesario calcular la diferencia entre la transmisión de la fuente de luz utilizada y la transmisión del sensor luego de haber sido empalmado y adelgazado. De esta forma se obtiene, por ejemplo, la respuesta total de la fibra #10 como se presenta en la Figura 40.

En esta gráfica se puede ver que la respuesta total del sensor presenta un rango espectral libre de aproximadamente 21 nm, unas pérdidas máximas de 16 dB y una respuesta casi senoidal que es fácil de analizar para obtener una medición con el sensor.



Figura 40 Respuesta total de transmisión de la fibra #10.

Los últimos sensores fabricados, y con los que se logró hacer el mayor número de mediciones, fueron realizados con la ayuda de la procesadora de vidrio Vytran GPX3400.

En este equipo es posible diseñar con mayor detalle el perfil de la fibra que se desea obtener luego de ser adelgazada. Sin embargo tiene el inconveniente de que los consumibles necesarios para utilizarla son muy costosos, especialmente el filamento que utiliza para calentar el vidrio, el cual tiene un costo aproximado de \$560 dólares [37] y tiene un tiempo de vida de solamente 40 minutos. Por esta razón solo se utilizó para fabricar las fibras #16 y #17, las cuales tiene un sección de PCF empalmada de aproximadamente 20 cm de largo.

Los parámetros utilizados para realizar ambos *tapers* son los presentados en la Figura 41. Estos parámetros deben ser calibrados antes de realizar un nuevo adelgazamiento pues dependen del filamento que esté instalado y de las características de la fibra.

Desarrollo de un biosensor utilizando un interferómetro de fibra de cristal fotónico.

ias/Purge			•		
Gas Flow Rate [l/min]		÷	Post-Purge Time [s]	5.0	
Background Argon [l/min]	0.15		Pre-Purge Time [s]	5.0	
faper Pull		1		105	
Constant Pull Velocity [mm/s]	1.00	5	Taper Pull Delay [s]	0.20	3
ilament Control					
Initial Furnace Move [mm]	0.0	- ÷			
Filament Start [W]	90.0		Filament Delta [%]	·10.00	Ī

Figura 41 Parámetros de configuración Vytran.

Las características del perfil del *taper* para las fibras, se escogieron tomando como guía lo presentado en Yadav T.K [30], debido a la gran sensibilidad reportada con sus sensores de fibra mono-modal.

Para la fibra #16 se utilizó el perfil mostrado en la Figura 42, el cual tiene un perfil de bajada y de subida simétrico de 5 mm y un largo de la cintura de 10 mm. Se definió además que para este sensor se deseaba un diámetro de la cintura de 20  $\mu$ m.

Desarrollo de un biosensor utilizando un interferómetro de fibra de cristal fotónico.



Figura 42 Configuración del perfil de la fibra #16.

Sin embargo, al finalizar el adelgazamiento se realizó una medida del diámetro final de la cintura y se descubrió que este en realidad había quedado de 18,1  $\mu$ m, como se presenta en la Figura 43.



### Figura 43 Medición del diámetro final de la cintura de 18,1 µm de la fibra #16.

El espectro de transmisión de esta fibra en todas sus etapas, fuente, empalme y adelgazamiento se presenta en la Figura 44.



Figura 44 Espectros de transmisión de la fibra #16.

Al realizar la resta entre el espectro de la fuente de luz LED y el de la fibra, luego de ser adelgazada, se obtiene la respuesta del sensor presentada en la Figura 45.



Figura 45 Respuesta total de transmisión de la fibra #16.

En esta respuesta se puede ver que el rango libre espectral es menor al de los sensores previamente presentados, con un valor de 11 nm: Además las pérdidas máximas totales son mayores, alrededor de los 29 dB, lo cual es debido al cambio abrupto del diámetro de la fibra.

Una fotografía del perfil de subida se presenta en la Figura 46, el cual empieza con un diámetro (a la izquierda) de aproximadamente 50  $\mu$ m y finaliza (a la derecha) con un diámetro de 101,3  $\mu$ m, en un tramo de aproximadamente 800  $\mu$ m.



Figura 46 Fotografía del perfil de subida de la fibra #16.

Para fabricar el sensor con la fibra #17 se utilizaron los mismos parámetros que con la fibra #16 pero se seleccionó un diámetro final de la cintura más grande de 25  $\mu$ m. Como se muestra en la Figura 47.



Figura 47 Configuración del perfil de la fibra #17.

De igual forma se realizó una medición para determinar el diámetro real obtenido, siendo este de 21,2 µm, como se muestra en la Figura 48.



Figura 48 Medición del diámetro final de la cintura de la fibra #17.

El espectro de transmisión luego de ser empalmada y adelgazada la fibra #17 se muestra en la Figura 49.



Figura 49 Espectros de transmisión dela fibra #17.

Este espectro presenta un número de picos menor, lo que significa un rango libre espectral mayor de aproximadamente 21 nm, al presentado en la fibra #16 lo cual se debe a la diferencia del diámetro de la cintura. Este sensor además presenta unas perdidas máximas de aproximadamente 35dB.



Figura 50 Respuesta total de transmisión de la fibra #17.

Las pruebas de índice de refracción se realizaron utilizando una fuente de luz LED con longitud de onda central en 1550 nm y un analizador de espectros ópticos (OSA) Ando AQ-6315E.

El protocolo de medición es el siguiente:

- 1. Lavar el pozo y la superficie del sensor con agua destilada y acetona hasta que al realizar una lectura con agua destilada el espectro no presente cambios visibles.
- 2. Inyectar la solución acuosa que se desea medir y tomar la medición con el OSA.
- 3. Repetir desde el paso 1 hasta obtener las mediciones deseadas.

### 5.1 GLICERINA

Las primeras pruebas de índice de refracción se realizaron con muestras de glicerina diluidas en agua. Estas pruebas se realizaron en las fibras #2 y #3 utilizando el prototipo de celda de trabajo #4.

Las concentraciones y los índices de refracción de estas se presentan a continuación:

Concentración de glicerina [%V/V]	RI
5	1,33880
6	1,33999
13	1,34854
16	1,35233

 Tabla 6
 %V/V de glicerina en agua y su índice de refracción.

Con la fibra #2 se realizaron 3 pruebas en diferentes horas del día utilizando las concentraciones anteriores, el resultado de una de las pruebas se presenta en la Figura 51. En este se puede notar el desplazamiento hacia la derecha de los picos conforme se aumenta la concentración de glicerina.



Figura 51 Pruebas de concentración de glicerina en la fibra #2, con resolución de 0,5 nm.

Se realizó el ajuste lineal respectivo utilizando el programa OriginPro, Figura 52, tomando la relación entre la longitud de onda del pico máximo y el índice de refracción de la solución, dando como resultado una sensibilidad promedio de 857 nm/RIU, pero un coeficiente de determinación de sólo 0,83793, el cual puede ser debido al pequeño pozo de trabajo de la celda que ocasiona inestabilidad en las mediciones, como se mencionó anteriormente.



Figura 52 Ajuste lineal de la fibra #2 para índices de refracción entre 1,33880 y 1,35233.

La fibra #3 fue probada con concentraciones que van desde 0% hasta 23% de glicerina diluida en agua destilada, pero sin conocer sus índices de refracción. Luego de analizar los datos y realizar el ajuste entre la longitud de onda del pico máximo y los porcentajes de concentración de la solución se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 53.



Figura 53 Ajuste de concentración de glicerina, utilizando la fibra # 3.

Se puede ver una correlación de 0,95584 entre los datos experimentales, lo cual demuestra que el sensor puede ser utilizado para medir diferentes concentraciones de soluciones en medio acuosos.

# 5.2 CLORURO DE SODIO

El cloruro de sodio, comúnmente conocido como sal de mesa, es un compuesto iónico que se encuentra en abundancia en el océano y en el líquido extracelular de muchos organismos. En el cuerpo humano tiene la función de regular la osmolaridad por medio de la bomba sodio-potasio. También actúa en la conducción de los impulsos eléctricos en los nervios, la contracción muscular y en la función renal [41].

Este compuesto además es altamente soluble en agua, solubilidad de 359 g/L, lo que lo hace ideal para realizar las pruebas de sensibilidad del sensor, ya que la solución es homogénea y fácil de remover con lavados de agua.

Estas pruebas se realizaron con NaCl en las concentraciones e índices de refracción que se muestran en la Tabla 7. Los índices de refracción presentados en todo el documento fueron obtenidos utilizando el Refractómetro Reichert AR200 Digital. Estas pruebas se realizaron utilizando el prototipo de celda de trabajo #7 y las fibras #16 y #17.

retraccion.		
Concentración de NaCl [Mol]	RI	
0	1,3330	
0,2	1,3350	
0,4	1,3369	
0,6	1,3389	
0,8	1,3408	
1	1,3428	

Tabla 7	Concentración de Cloruro de Sodio en agua y su índice de
	refracción.

### 5.2.1 Prueba con fibra #16

Con esta fibra se realizó la primera prueba, configurando el analizador de espectros para trabajar con una resolución de 5 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 54.



Figura 54 Espectro de transmisión de la fibra # 16 para diferentes concentraciones de NaCl, con resolución de 5 nm.

En la gráfica anterior se puede apreciar el desplazamiento hacia la derecha de los diferentes picos. Es importante notar que no se puede tomar arbitrariamente el pico con mayor potencia para analizar el desplazamiento, puesto que este puede variar levemente y cambiar los resultados. Sin embargo, si se observa la morfología de las curvas, se pueden notar patrones en los picos que los hacen fácilmente

identificables. De esta manera se seleccionan las longitudes de onda de los picos con morfología similares para hacer el análisis de desplazamiento.

Tomando la longitud de onda de los picos que se encuentran entre 1538 nm y 1548 nm, se realizó un ajuste lineal obteniéndose la gráfica que se muestra en la Figura 55.



# Figura 55 Ajuste lineal de la respuesta de la fibra # 16 ante cambios de concentración de NaCl en el rango de índice de refracción entre 1,3330 y 1,3428.

De igual forma se podría tomar el primer mínimo presentado entre 1531 nm y 1540, los cuales presentan el siguiente ajuste, Figura 56 :



Figura 56 Ajuste lineal de la respuesta de la fibra # 16 ante cambios de concentración de NaCI, para el primer mínimo.

Se puede notar que la sensibilidad en los 2 ajustes es muy similar, presentando sensibilidades de aproximadamente 850 nm/RIU, lo que lleva a la conclusión que se puede monitorear cualquiera de los picos para obtener una la respuesta del sensor ante cambios de índice de refracción. De igual manera podrían seguirse múltiples picos buscando una mayor precisión de la lectura.

### 5.2.2 Pruebas con fibra # 17

En la fibra # 17 se aplicaron las mismas concentraciones de NaCl, pero primero se cambió la resolución del analizador de espectros a 2 nm, Figura 57:



Figura 57 Espectro de transmisión de la fibra # 17, con resolución 2 nm, para diferentes concentraciones de NaCI.

El ajuste respectivo se muestra en la Figura 58, donde se puede ver que la sensibilidad es menor, 673 nm/RIU, a la presentaba en la fibra #16. Esto se debe a que la diferencia entre los diámetros en el área adelgazada. Sin embargo, esta sensibilidad es suficiente para medir los cambios en el índice de refracción de estas concentraciones de sal, y la linealidad de la respuesta sigue siendo alta,  $R^2 = 0.9723$ .



Figura 58 Ajuste lineal de la respuesta de la fibra # 17, con resolución del OSA en 2nm, ante cambios de concentración de NaCl.

Luego se repitió la prueba pero configurando el analizador de espectros en resolución de 0,5 nm, Figura 59, con la cual es posible ver los diferentes modos que interactúan en el sensor. Utilizando solo esta gráfica es imposible diferenciar los modos que realmente son afectados por los cambios en el índice de refracción en el medio, pero cuando se aplica un filtro alto es posible dejar el modo más lento que a su vez corresponde con el modo más sensible, Figura 60.



Figura 59 Espectro de transmisión de la fibra # 17, con resolución 0,5 nm y sin filtrar, para diferentes concentraciones de NaCl.



Figura 60 Espectro de transmisión de la fibra # 17, con resolución 0,5 nm y con filtro gaussiano, para diferentes concentraciones de NaCl.

Luego de aplicar el filtro gaussiano, Ecuación 5.1, con parámetro sigma,  $\sigma = 80$ , o utilizar alguno de los métodos explicados en el capítulo 7 es posible identificar el desplazamiento de los picos hacia la derecha y, con esta información, realizar el ajuste lineal, Figura 61, para analizar la respuesta del sensor:



 $g(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} e^{\frac{-x^2}{2\sigma^2}}$ (5.1)

Figura 61 Ajuste lineal de la respuesta de la fibra # 17, con resolución del OSA en 0,5 nm, ante cambios de concentración de NaCl.

Se puede ver un leve decremento en la sensibilidad general del sensor, sensibilidad de 613,9 nm/RIU, respecto a la lectura con resolución de 2 nm. Pero también se ve un aumento en el coeficiente de determinación, lo que se traduce en una lectura más precisa del índice de refracción del medio.

## 5.3 SACAROSA

La sacarosa es un carbohidrato encontrado naturalmente en muchas plantas y es refinado hasta convertirse en un polvo blanco y cristalino, conocido comúnmente como azúcar de mesa, para el consumo humano. La molécula de sacarosa se forma gracias a la combinación de 2 monosacáridos, la glucosa y la fructosa [42].

Las pruebas de soluciones de sacarosa se realizaron debido a su importancia en la industria de alimentos que necesitan cumplir con las regulaciones establecidas y deben demostrar la cantidad de esta sustancia contenida en sus productos. Las regulaciones dictan que para que un alimento o bebida se considere baja en azúcar, esta debe tener menos de 5 g de azúcar por cada 100 g de comida sólida o 2,5 g por cada 100 ml en líquidos, y para que se considere sin azúcar debe tener menos de 0,5 g para ambas presentaciones. Sin embargo, si se estudian algunas de las

bebidas más vendidas en el mundo se encuentra que su contenido de azúcar varía desde 5 hasta 13 g por cada 100 ml de líquido aproximadamente [43].

### 5.3.1 Pruebas con fibra #16

La primera prueba se realizó utilizando la fibra # 16, una resolución del analizador de espectros de 0,5 nm. Luego de leer cada muestra, se lavó el sensor repetidas veces con agua des-ionizada hasta obtener nuevamente la respuesta base.

Las concentraciones utilizadas y los índices de concentración de cada una de éstas se muestran en la Tabla 8.

Concentración de sacarosa [mg/ml]	RI
0	1,3330
1,5625	1,3332
3,125	1,3335
6,25	1,3339
10	1,3345
12,5	1,3348
20	1,3360
25	1,3367

 Tabla 8
 Concentración vs Índice de refracción de la Sacarosa.

La señal de salida del sensor sin filtrar se muestra en la Figura 62. En esta es posible notar que los desplazamientos en los picos no son identificables a simple vista, debido a la sobre posición de la interferencia de diferentes modos.


# Figura 62 Espectro de transmisión de la fibra #16, sin filtrar, ante diferentes concentraciones de sacarosa.

Sin embargo, al aplicar un filtro gaussiano con un sigma lo suficientemente alto o utilizar algunos de los métodos explicados en el capítulo 7, es posible encontrar el modo que se debe al adelgazamiento y que tiene mayor sensibilidad a los cambios del índice de refracción efectivo en el medio. De esta forma, luego de aplicar un filtro gaussiano con parámetro sigma igual a 85, se obtiene la siguiente respuesta, Figura 63:



Figura 63 Espectro de transmisión de la fibra #16, luego de aplicar un filtro gaussiano, ante diferentes concentraciones de sacarosa.

En esta gráfica es posible notar el desplazamiento en el pico máximo hacia la derecha ante incrementos de la concentración de sacarosa. Y tomando en cuenta el valor, en longitud de onda, de este pico se puede correlacionar con el índice de refracción como se muestra en la Figura 64.



Figura 64 Ajuste lineal de la fibra # 16 ante cambios de concentración de sacarosa.

El ajuste muestra una alta linealidad, coeficiente de determinación  $R^2$  de 0,9768, de la respuesta ante cambios de índice de refracción en el rango de índices desde 1,3330 hasta 1,3367. Además presenta una alta sensibilidad, 801,1 nm/RIU, que es mayor a la reportada; 282 nm/RIU [44] y 430.2 nm/RIU [45].

### 5.3.2 Pruebas con fibra #17

La segunda prueba se realizó utilizando la fibra # 17 utilizando concentraciones de sacarosa desde 0 hasta 20 mg/ml (Figura 65). Debido al desplazamiento esperado de los picos, se configuró el analizador de espectros para trabajar con una resolución de 2 nm.



Figura 65 Espectro de transmisión de la fibra #17, luego de aplicar un filtro gaussiano, ante diferentes concentraciones de sacarosa.

Con esta fibra se obtuvo una resolución de 546,4 nm/RIU que es menor a la de la fibra # 16. Esto se debe a que ésta fibra tiene un diámetro de la cintura mayor y por tanto una penetración menor del campo evanescente en el medio. El ajuste lineal, con un  $R^2$  de 0,9395, se puede ver en la Figura 66.

Con esta misma fibra se realizó otra prueba utilizando concentraciones mayores de sacarosa con el fin de aumentar de manera significativa el índice de refracción efectivo del medio y acercarlo al índice de la fibra óptica. Se espera comprobar que cuando la diferencia entre el índice de refracción y el de la fibra se aproximan, la sensibilidad aumenta de manera exponencial como se muestra en [46], [47] y [48].





# Figura 66 Ajuste lineal de la respuesta de la fibra # 17 ante cambios de concentración de sacarosa en el rango de índice de refracción entre 1,3330 y 1,3360.

Las concentraciones en moles, en mg/ml y sus índices de refracción, utilizados para esta prueba se presentan a continuación:

Concentración de Sacarosa [Mol]	mg/ml	RI
1,85	633,255	1,3965
1,90	650,370	1,3983
1,95	667,485	1,3998
2,00	684,600	1,4017

Tabla 9Altas concentraciones de sacarosa en agua y sus índices de<br/>refracción.

Utilizando altas concentraciones de sacarosa es posible aumentar el índice de refracción de la solución hasta valores cercanos al del vidrio [49], sin embargo, solo se realizaron concentraciones de hasta 2M para mantener una solución homogénea y no tener problemas con la solubilidad o con partículas que puedan quedar flotando en la solución y que podrían cambiar considerablemente las mediciones.

El resultado de esta prueba, presentado en la Figura 67, demuestra que cuando el índice de refracción del medio se acerca al índice de la fibra, la sensibilidad del sensor aumenta considerablemente.



Figura 67 Espectro de transmisión de la fibra # 17 para altas concentraciones de Sacarosa.

Al realizar un ajuste lineal, Figura 68, se encuentra que la sensibilidad aumenta hasta 1920 nm/RIU en el rango de índices de refracción comprendido entre 1,3965 y 1,4017. Adicionalmente la linealidad es de 0,9984.



Figura 68 Ajuste de la respuesta de la fibra # 17 para índices de refracción entren 1,3965 y 1,4017.

Si se tiene en cuenta que los analizadores de espectros modernos pueden alcanzar una resolución de 0.01 nm, entonces con este sensor y en estos rangos se podrían resolver cambios de índice de refracción del orden de  $6x10^{-6}$ .

#### CIO Desarrollo de un biosensor utilizando un interferómetro de fibra de cristal fotónico.

Sin embargo, aunque estos sensores presentan gran sensibilidad ante cambios de índice de refracción, se tiene la desventaja de que también presentan un rango espectral libre muy angosto (aproximadamente 15 nm), necesitándose así otro instrumento con menor sensibilidad que pueda dar un estimado del índice, y luego utilizar nuestro sensor para dar una medida mucho más precisa del analito.

### 5.4 D-GLUCOSA

La glucosa es una azúcar que se genera de manera natural en el proceso de la fotosíntesis de las plantas. Además este compuesto se encuentra en la sangre humana y su concentración da indicios de que la persona puede sufrir de diabetes.

Para considerar los niveles de glucosa en sangre, en una persona, como normales, esta debe presentar concentraciones por debajo de los 100 mg/dl, si esta cantidad está entre los 100 y 125 mg/dl se considera prediabetes, y si presenta una concentración mayor a estos niveles, en 2 pruebas separadas, se considera que la persona sufre de diabetes.

Estas concentraciones generan cambios muy pequeños en el índice de refracción al diluirlas en agua, como se puede ver en la Tabla 10. Por esta razón se utilizaron concentraciones mayores a las usadas normalmente en los exámenes de glucosa.

Concentración de glucosa [mg/ml]	RI	
0	1,3330	
1	1,3331	
2,5	1,3333	
5	1,3336	
10	1,3344	
15	1,3351	
20	1,3359	

Tabla 10 Concentración vs Índice de refracción de la Glucosa.

Al aplicar estas soluciones de glucosa en el sensor, y configurando el analizador de espectros para trabajar con una resolución de 2 nm, se obtuvieron los siguientes resultados, Figura 69:



Figura 69 Espectro de transmisión de la fibra #17, con resolución del OSA en 2 nm, ante diferentes concentraciones de glucosa.

A los datos se le aplicó un filtro gaussiano de 25 sigma para tratar de identificar con facilidad los picos máximos. Y luego se realizó el ajuste lineal, Figura 70, obteniendo una alta sensibilidad pero con un coeficiente de determinación de solo 0,8852. Esto quiere decir que los valores obtenidos a bajas concentraciones tienen una precisión baja.



Figura 70 Ajuste lineal de la respuesta del sensor ante concentraciones de Glucosa, con un OSA de resolución 2 nm.

Luego se realizó la misma prueba pero se configuró el OSA para trabajar con una resolución de 0,2 nm. Como ya se mencionó las lecturas realizadas con estas

resoluciones tan altas presentan un mayor cantidad de ruido y además muestran los demás modos que pueden estar actuando en la interferencia. Por esta razón es necesario filtrar los datos para obtener una lectura limpia y poder analizar el desplazamiento de los picos. Luego de aplicar un filtro gaussiano de 45 sigma se obtuvieron los siguientes resultados, Figura 71 :



# Figura 71 Espectro de transmisión de la fibra #17, con resolución del OSA en 0,2 nm, ante diferentes concentraciones de glucosa.

Las respuestas se ven muy similares, sin embargo, al realizar el ajuste lineal, Figura 72, se puede ver que la linealidad de la respuesta es mucho mayor, 0.9691, y de esta forma es posible leer con mayor precisión los valores de prueba más bajos, los cuales entran en el rango deseado de la prueba de glucosa sin necesidad de procesos adicionales para aumentar la sensibilidad.



Figura 72 Ajuste lineal de la respuesta del sensor ante concentraciones de Glucosa, con un OSA de resolución 0,2 nm.

1.3345

1.335

1.334

Esta sensibilidad podría ser aumentada considerablemente si se le aplica un proceso químico a la superficie de la fibra, como por ejemplo la inmovilización de una enzima. Con este proceso se aumenta notablemente el cambio de índice de refracción del medio incluso con pequeñas concentraciones de glucosa [50].

## 5.5 PROTEÍNA BSA

1543.2 light 1543.2

> 1542.8 1542.6

> 1542.4

1.333

1.3335

La última prueba realizada, antes del proceso de funcionalización en la fibra, consistió en aplicar diferentes concentraciones de la proteína BSA diluida en PBS buffer.

Las concentraciones utilizadas, desde 0 mg/ml hasta 20 mg/ml y sus respectivos índices de refracción se presentan en la Tabla 11.

Concentración de BSA en PBS [mg/ml]	RI
0	1,3347
1,25	1,3350
2,5	1,3352
5	1,3356

Tabla 11Concentración vs Índice de refracción de soluciones de BSA en<br/>PBS.

81

1.3355

1.336

Concentración de BSA en PBS [mg/ml]	RI
10	1,3364
20	1,3382

A los datos obtenidos se les realizó el mismo procesamiento utilizado en las mediciones anteriores y se obtuvo el ajuste lineal presentado en la Figura 73. En este ajuste se puede ver que el sensor ha perdido notablemente su sensibilidad, debido posiblemente a la deposición de suciedades difíciles de remover incluso con acetona y a defectos o micro fracturas que pueden surgir en la superficie por el constante uso.



Figura 73 Ajuste lineal de la respuesta del sensor ante concentraciones de BSA, con un OSA de resolución 0,2 nm.

# 6. FUNCIONALIZACION DE LA FIBRA DE CRISTAL FOTÓNICO ADELGAZADA

### 6.1 PROTOCOLO DE FUNCIONALIZACIÓN

El proceso de activación e inmovilización se realiza con el fin de disponer las moléculas de interés (llamadas bioreceptores) sobre la superficie del transductor, en este caso sobre la superficie de la fibra de cristal fotónico, para realizar pruebas de sensibilidad y/o especificidad. En este trabajo, se realiza con la finalidad de validar el funcionamiento del sistema de interferómetro de PCF como biosensor.

En este caso la proteína seleccionada para inmovilizar es la albumina sérica bovina (BSA), por su bajo costo y porque ha sido ampliamente estudiada su inmovilización [51].

El protocolo seleccionado fue extraído de Nagel Thomas [52], en el cual se inmoviliza el antígeno de tuberculosis 38-kDa, sobre una superficie de vidrio, el cual se ha establecido como de gran relevancia en el diagnóstico de la tuberculosis. Es posible realizar este mismo procedimiento para la proteína BSA, debido a que ambos antígenos tienen suficientes grupos amino disponibles y por medio de estos grupos se está realizando la inmovilización covalente de la proteína que se unirá a la superficie

Las soluciones necesarias para el proceso y su composición se presentan en la Tabla 12.

Descripción	Solvente	Cantidad	Solutos	Cantidad	Volumen Total
Piraña	Ácido Sulfúrico 96%	75 ul	Peróxido de Hidrogeno 30%	25ul	100 ul
NaOH 5M	dH2O	1 ml	NaOH	0,2 g	1 ml
APTES 10%	dH2O	0,9 ml	APTES	0,1 ml	1 ml
PDITC 0,3 M	DMF	1 ml	PDITC	0,058 g	1 ml
TRIS Buffer	dH2O	27,92 ml	TRIZMA Base	3,634 g	30 ml
	HCL 37,2%	2,08 ml	2400		

#### Tabla 12 Soluciones preparadas para el proceso de funcionalización.

CIO

Desarrollo de un biosensor utilizando un interferómetro de fibra de cristal fotónico.

Descripción	Solvente	Cantidad	Solutos	Cantidad	Volumen Total
PBS Buffer 10X	dH2O	50 ml	NaCl	4 g	50ml
			KCI	0,1 g	
			Na2HPO4	0,72 g	
			KH2PO4	0,12 g	
1 mg/ml BSA	PBS	1 ml	BSA	1 mg	1 ml

Todos los reactivos fueron adquiridos directamente de la compañía Sigma-Aldrich (México).

El protocolo que se realizó se presenta a continuación.

# 6.1.1 Activación:

- Lavado y activación de la superficie con solución piraña por 5 minutos
- Aplicar solución NaOH 5M por 30 segundos
- Incubar en APTES 10%(v/v) en agua destilada por 2 horas a 80°C
- Secar a 110°C por 1 Hora

Este proceso logra formar grupos hidroxilos en la superficie de la fibra de vidrío por medio de la aplicación de la solución piraña y de la soda caustica, para luego formar una mono-capa al utilizar la solución APTES, dejando así grupos aminos expuestos para el proceso de inmovilización. Este proceso se esquematiza en la Figura 74.



Figura 74 Esquema de formación de hidroxilos luego del tratamiento con solución piraña y proceso de silanización al aplicar APTES.

#### 6.1.2 Inmovilización del antígeno

- Incubar por 2 horas en 0.3 M PDITC en DMF.
- Lavar en DMF y secar con nitrógeno.
- Incubar, 1mg/ml de BSA en PBS Buffer por 4 horas.
- Lavar con TRIS Buffer.

El PDITC funciona como enlace entre el grupo amino existente en la superficie del sensor, luego de la silanización, y los grupos aminos existentes en la proteína BSA. Como se muestra en la Figura 75.



Figura 75 Esquema de unión del PDITC como enlace entre la superficie y la biomolécula. (Imagen obtenida de [53])

Este protocolo fue llevado a cabo, en su totalidad, en el pozo de la celda de trabajo # 7, que fue diseñada y fabricada de tal forma que resistiera las sustancias químicas utilizadas, las reacciones químicas y las altas temperaturas.

# 6.2 PRUEBAS

Luego del proceso de funcionalización, se realizaron pruebas inyectando diferentes concentraciones de Anti-BSA disueltas en el buffer PBS, empezando en 0,5 mg/ml hasta los 120 pg/ml.

Antes de cada prueba se limpió la superficie del sensor aplicando TRIS Buffer y dejando que actúe por aproximadamente 3 minutos, antes de ser removido y aplicado otras 2 veces consecutivas. De esta forma se buscó obtener unas condiciones similares antes de aplicar el PBS, como blanco o línea base, y el anti-BSA para el análisis.

Luego de aplicar la muestra de anticuerpo se tomaron 4 mediciones, 2 consecutivas con un intervalo de tiempo entre ellas de aproximadamente 2 minutos y 2 más luego de una espera de 4 minutos, esperando una estabilización en la señal.

### 6.3 RESULTADOS

Para el análisis de estos resultados se filtraron los datos con los algoritmos presentados en el Capítulo 7, luego se tomaron los desplazamientos en longitud de onda respecto a la línea base, al aplicar PBS, tomada antes de cada medición.

En la Figura 76 se muestran los resultados de la primera prueba realizada con concentraciones de anti-BSA disueltas en PBS, las cuales van desde 0,5 mg/ml hasta 0,125 mg/ml. En las gráficas se representa con una flecha la primera lectura realizada al aplicar cada concentración en el pozo del sensor.



Figura 76 Respuesta del sensor para concentraciones entre 0,5 mg/ml y 0,125 mg/ml de anti-BSA.

Se puede ver que al aplicar estas concentraciones se genera un pico de respuesta inmediato muy elevado, pero luego de un tiempo la respuesta se estabiliza aproximadamente en el mismo valor para todas las muestras. Esto se debe a que las concentraciones actualmente utilizadas son saturantes, es decir, que van a cubrir de manera total todos los sitios de activos en la superficie del sensor.

Al ver esta respuesta, se redujeron las concentraciones hasta encontrar una que no produjera una señal saturante. Esto se logró en el orden de los ng/ml, y se realizaron 2 pruebas en días separados para confirmar la habilidad del sensor para detectar estas concentraciones.



Figura 77 Primera respuesta del sensor para concentraciones desde 125 ng/ml hasta 0,125 ng/ml de anti-BSA.

Como se puede ver en la Figura 77, el sensor presenta una respuesta fácilmente identificable para concentraciones de 125 pg/ml de anti-BSA. Adicionalmente el sensor empieza a presentar una respuesta saturante cuando las concentraciones están en el orden de los 125 ng/ml. Esto se puede visualizar de mejor forma en el ajuste presentado en la Figura 78, que se forma al tomar el desplazamiento en longitud de onda luego de aproximadamente 8 minutos de aplicar la muestra.



Figura 78 Ajuste de la respuesta del sensor para concentraciones entre 125 pg/ml y 125 ng/ml de Anti-BSA.

Esta misma prueba se repitió al siguiente día, pero de manera inversa, empezando en la concentración mayor y disminuyendo hasta 125 pg/ml. Los resultados se presentan en la Figura 79.



Figura 79 Segunda respuesta del sensor para concentraciones desde 12,5 ng/ml hasta 0,125 ng/ml de anti-BSA.

Con estos resultados se confirma que es posible leer concentraciones tan bajas como 125 pg/ml de anti-BSA. Lo cual va en acuerdo con lo reportado en King Branden J. [54], en el cual presentan un límite de detección de 500 pg/ml y un nivel de saturación alrededor de los 5 ng/ml.

Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos en cada una de las pruebas, se puede ver que los desplazamientos en longitud de onda no se mantienen iguales para las mismas concentraciones. Esto se puede deber a la desnaturalización de la proteína inmovilizada ya que no fue posible almacenar el sensor a una temperatura de 4°C. También es posible que se deba a los constantes lavados utilizando el TRIS Buffer, el cual puede o no remover en la totalidad los enlaces formados entre el antígeno y anticuerpo en la superficie del sensor.

Para lograr unos valores más estables sería necesario optimizar el proceso de funcionalización de la fibra y el protocolo de medición y lavado. Pero estos estudios no entran en el alcance de este proyecto.

# 7. SISTEMAS DE AYUDA ADICIONALES

En el transcurso del proyecto se diseñaron e implementaron algunos programas con el fin de facilitar y brindar nuevas herramientas para el estudio y desarrollo de sensores a base de fibras de cristal fotónico.

#### 7.1 PROGRAMA DE CARACTERIZACIÓN DE FIBRAS DE CRISTAL FOTÓNICO

Las fibras de cristal fotónico y los sensores a base de fibras adelgazadas se pueden caracterizar gracias a sus propiedades geométricas.

En el caso de la fibra de cristal fotónico es importante conocer principalmente su diámetro exterior, la separación entre huecos y el diámetro de los mismos.

Por esta razón se diseñó e implementó un algoritmo que mediante una fotografía, tomada con la ayuda de un microscopio, y la referencia del diámetro exterior de la fibra, que es posible obtener utilizando un micrómetro, entregue el valor del diámetro de los huecos seleccionados y de la separación entre ellos.

Un ejemplo, de una de las fotografías empleadas se muestra en la Figura 80.



#### Figura 80 Fotografía de la sección transversal de una fibra de cristal fotónico.

Al aplicar el algoritmo sobre esta imagen se obtiene los resultados presentados en la Figura 81. El algoritmo permite seleccionar los agujeros que se desea medir y calcula la separación entre ellos si se selecciona más de uno. En este caso se puede ver que el diámetro promedio de los huecos es de aproximadamente 8,13  $\mu$ m y la separación entre ellos de 12,25  $\mu$ m. La no uniformidad de las mediciones se debe tanto a defectos en la estructura de la fibra de cristal fotónico, como también a ruidos en la fotografía debidos a la iluminación o suciedades sobre la superficie de la fibra.



Figura 81 Resultados del diámetro y separación (en µm) entre agujeros, presentados por el algoritmo.

Para tener un control sobre la fabricación de los sensores de fibra óptica adelgazada es importante medir con precisión tanto las áreas de compresión y expansión, como la cintura del *taper*. Por esta razón se diseñó e implementó un algoritmo capaz de medir el diámetro de la fibra punto a punto, el cual es capaz de trabajar tanto con fibra óptica estándar, como con fibra de cristal fotónico.

Este algoritmo utiliza nuevamente las fotográficas obtenidas con ayuda de un microscopio, utilizando una primera fotografía de una fibra estándar de 125 µm de diámetro como referencia de calibración, Figura 82. Las siguientes fotografías, las que se desean analizar, se deben tomar con el mismo aumento que la primera.



# Figura 82 Fotografía de una fibra estándar de 125 µm de diámetro cargada en la interfaz del algoritmo de medición.

Para utilizar este programa se deben seguir los siguientes pasos:

- Cargar la imagen de referencia haciendo click en el botón "Load Reference Image" y seleccionando la fotografía de una fibra cuyo diámetro sea conocido, por ejemplo, una fibra estándar de 125 µm de diámetro.
- Escribir el diámetro de la fibra cargada y hacer click en el botón "Calibrate".
- Al hacer esto aparecerá un apuntador en forma de cruz. Debe hacer un primer click en una sección de la fibra, y luego hacer otro click un poco más a la derecha del anterior. Esto para que el algoritmo pueda identificar el ángulo con el que está colocada la fibra y pueda tener una medición más precisa.
- Luego puede cargar la imagen que desea medir, oprimiendo el botón "Load image for measure".
- Finalmente, al oprimir el botón "Manual", aparecerá nuevamente el apuntador en forma de cruz. Al hacer click con este en cualquier sección de la fibra, se desplegará el diámetro medido, en micrómetros, en la casilla "Measured Diameter", como se muestra en la Figura 83. Puede repetir esta operación tantas veces quiera para medir diferentes secciones de la fibra. También es posible cargar otra imagen para analizar sin necesidad de tener que volver a calibrar el algoritmo.



# Figura 83 Mediciones de una fibra con diámetro de cintura de aproximadamente 41 µm.

Estos algoritmos fueron validados utilizando un microscopio National Optical DC5-163 y el software de medida calibrado Motic Images Plus 2.0©.

Estos programas fueron implementados en la plataforma Matlab® y sus códigos se presentan en el anexo 2.

# 7.2 PROGRAMA DE ANALISIS DE DATOS

Debido a la naturaleza de los datos y para lograr obtener una buena medición con el sensor desarrollado, es necesaria aplicar un algoritmo de filtrado y un algoritmo para identificar el corrimiento en longitud de onda de los picos.

### 7.2.1 Análisis de datos en Python

Como primer aproximamiento para resolver estos problemas, se diseñó e implementó un programa utilizando el lenguaje de programación Python. Este programa permite cargar hasta 50 curvas diferentes directamente del archivo entregado por el analizador de espectros. Tiene las opciones de graficar, filtrar por medio de un filtro gaussiano, derivar, obtener la derivada de Fourier y encontrar todos los picos de la o las curvas seleccionadas.

También tiene una función automática que, luego de haber cargado las curvas, escribir el número de picos que se esperan obtener (tanto máximos como mínimos) y de seleccionar un pico a medir, encuentra el parámetro necesario del filtro

gaussiano para solamente dejar el número de picos deseados y luego encuentra el desplazamiento del pico seleccionado.

La interfaz de usuario de este programa se presenta en la Figura 84.



Figura 84 Interfaz de usuario para el programa de análisis de datos en Python.

La modalidad de análisis automático se activa al presionar el botón "Analyze Shift", y en caso de haber seleccionado las curvas y los parámetros de la manera adecuada, entrega los siguientes resultados: Curvas filtradas (Figura 85), Derivadas de las curvas (Figura 86), desplazamiento del pico seleccionado (Figura 87).







Figura 86 Derivada de las curvas para identificar los picos.



Figura 87 Desplazamiento del pico seleccionado.

Este algoritmo se utilizó como primer aproximamiento para analizar cada uno de los paquetes de datos, pues arroja de manera rápida y sencilla un análisis preliminar del desplazamiento de los picos y del parámetro del filtro gaussiano que es necesario aplicar para la información relevante.

Los códigos, tanto de la interfaz de usuario como de los algoritmos empleados, se presentan en el anexo 3.

#### 7.2.2 Análisis de datos en Matlab

Utilizando la plataforma de desarrollo de Matlab, se implementó un algoritmo para tomar los datos entregados por el analizador de espectros para luego ser filtrarlos y analizados.

Un ejemplo de los datos obtenidos sin filtro se muestra en la Figura 88, en la cual no es posible identificar con facilidad el desplazamiento de los picos para cambios en el índice de refracción del medio.



Figura 88 Gráfica de datos sin filtrar utilizando una resolución de 0,2 nm.

Sin embargo al aplicarle un filtro gaussiano con parámetro sigma igual a 45, se obtienen unas curvas, Figura 89, donde es posible notar con mayor facilidad el desplazamiento de los picos.



Figura 89 Gráfica de los datos al aplicar un filtro gaussiano de 45 sigma.

El parámetro sigma es seleccionado con mayor facilidad gracias a los resultados del análisis realizado con el programa en Python.

Este algoritmo entrega además las longitudes de onda del pico máximo, que son utilizadas posteriormente por la aplicación de Matlab Ilamada Curve Fitting para generar una ajuste lineal entre el índice de refracción de la muestra y el desplazamiento en longitud de onda de los picos, como se muestra en la Figura 90.



Figura 90 Ajuste lineal realizado utilizando la aplicación "Curve Fitting" de Matlab.

En busca de métodos alternativos para el análisis de los datos entregados por el analizador de espectros al configurarlo en altas resoluciones, desde 1 nm, se observó la posibilidad de utilizar la transformada de Fourier para identificar los modos existentes en la señal. La respuesta para una de las muestras se presenta en la Figura 91.



Figura 91 Transformada de Fourier de una prueba de concentración de NaCl.

Al realizar la transformada de Fourier a los datos de transmisión del sensor, es posible identificar tres modos que interfieren en la respuesta. Un modo fundamental, uno con pico en 0,75 ciclos por nanómetro y otro en 1,5 ciclos por nanómetro.

Sin embargo luego de numerosas pruebas se determinó que el modo más sensible a cambios en el índice de refracción del medio es el fundamental, y que los demás modos no sufren un cambio significativo ante estas perturbaciones. De tal manera, que si se pudiera diseñar un filtro que permitiera separar los modos existentes, sería posible analizar la respuesta del sensor y de cada uno de los modos independientemente.

Siguiendo con esta idea se utilizó un algoritmo conocido como Descomposición Empírica Modal (EMD por sus siglas en inglés), el cual es utilizado por la transformada de Hilbert-Huang que se usa normalmente para el análisis de procesos no-lineales y no estacionarios [55].

Este algoritmo permite descomponer una señal en los diferentes modos que la componen. Por ejemplo, al tomar los datos generados por una muestra de NaCl en agua con una resolución del analizador de espectros en 0,5 nm, Figura 92, es posible descomponerlos utilizando la EMD y obtener los tres modos que interactúan como se presenta en Figura 93.



Figura 92 Datos de una muestra de NaCl en agua tomados con una resolución de 0,5 nm.



Figura 93 Descomposición en modos de la transmisión del sensor.

Con esta descomposición se pueden diferenciar fácilmente los modos que interactúan en el sensor de fibra de cristal fotónico, brindando así una poderosa herramienta que permite analizar cada uno de estos por separado ante cambios en el medio o en las condiciones del sensor.

Por ejemplo al analizar un conjunto completo de datos, y dejar solamente el tercer modo, es decir el más lento, es posible obtener los siguientes resultados.



Figura 94 Descomposición en el tercer modo de los datos de concentración de NaCl utilizando la fibra #17.

Y si se toma el valor en longitud de onda del pico máximo y se correlaciona con el índice de refracción de la muestra, es posible generar un ajuste lineal con los siguientes resultados:



Figura 95 Ajuste lineal utilizando los datos obtenidos del tercer modo.

Estos datos concuerdan en gran medida con los resultados obtenidos con otros métodos de filtrado, como los presentados en la sección 5.2.

# 8. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

- Se estudió el proceso de diseño y fabricación de las fibras de cristal fotónico, en especial del tipo LMA (*Large Area Mode*), que se pueden fabricar en las instalaciones del CIO.
- Se diseñaron, fabricaron y probaron diferentes prototipos de celdas de trabajo teniendo en cuenta los criterios de diseño necesarios para trabajar con un biosensor de fibra de cristal fotónico adelgazada.
- Se fabricaron varios interferómetros modales utilizando fibras de cristal fotónico, algunas empalmadas entre dos secciones de fibra monomodo estándar (SM28), utilizando dos equipos de procesado de vidrio existentes en el CIO.
- Se realizaron pruebas de índice de refracción con los sensores interferométricos fabricados, obteniéndose sensibilidades del orden de 850 nm/RIU, mayores a las reportadas en [44] y [45], en el rango de índices entre 1,3330 y 1,3428, y sensibilidades del orden de 1920 nm/RIU, comparables con la presentada en [46], entre 1,3965 y 1,4017. Esto además demuestra que para índices de refracción cercanos al del vidrio la sensibilidad del sensor aumenta considerablemente. Adicionalmente las pruebas se realizaron con soluciones de interés en el área biomédica.
- Se aplicó un proceso de funcionalización al sensor de fibra de cristal fotónico que permite inmovilizar un antígeno específico a su superficie. Con este método se logró hacer pruebas con su anticuerpo correspondiente, y se logró obtener mediciones de concentraciones de hasta 125 pg/ml.
- Se diseñaron e implementaron algoritmos para la medición de los parámetros geométricos de las fibras de cristal fotónico, que ayudan en la caracterización de las fibras antes y después del proceso de adelgazamiento.
- Se diseñaron e implementaron algoritmos de filtrado y análisis de las señales entregadas por el sensor interferométrico de PCF.

### **CONSIDERACIONES Y TRABAJOS FUTUROS:**

• Se recomienda continuar con el estudio de las celdas de trabajo, en especial en el diseño de una celda de micro-fluídica que permita obtener mediciones más estables y con volúmenes menores.

- Aunque se obtuvieron altas sensibilidades en el sensor, incluso con índices de refracción bajos, se recomienda continuar el estudio del efecto del perfil de la fibra adelgazada en la sensibilidad final del sensor.
- Los sensores presentados en este trabajo son de fácil fabricación y repetitividad, pero presentan el inconveniente de ser muy frágiles.
- El protocolo de funcionalización realizado a la superficie de la fibra debe ser estudiado con mayor profundidad para lograr optimizar el proceso. Para esto se recomienda realizar pruebas con un microscopio de fuerza atómica (AFM) o con un microscopio electrónico de barrido (SEM).

# **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] A. Montoya, A. Ocampo y C. March, «Fundamentals of Piezoelectric Immunosensors,» de *Piezoelectric Transducers ans Applications*, Valencia, Springer, 2008, pp. 289-303.
- [2] IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed., Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.
- [3] F. Ortega Ortiz de Apodaca, Biosensores y Biochips: Herramientas para el diagnóstico y la terapéutica, Madrid, 2006.
- [4] C. March, J. Manclús, Y. Jiménez, A. Arnau y A. Montoya, «A piezoelectric immunosensor for the determination of pesticide residues and metabolites in fruit juices,» *Talanta*, vol. 78, pp. 827-833, 2009.
- [5] R. Wolthuis, D. McCrae, E. Saaski, J. Hartl y G. Mitchell, "Development of a medical fiber-optic ph sensor based on optical absorption," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 39, pp. 531-537, 1992.
- [6] R. A. Wolthuis, D. McCrae, J. C. Hartl, E. Saaski, G. L. Mitchell, K. Garcin y R. Willard, «Development of a medical fiber-optic oxygen sensor based on optical absorption change,» *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 39, pp. 185-193, 1992.
- [7] Y. Yang, K. Xiong, Y. Tan, B. Liu, Y. Sun, D. Chen y H. Tan, "Direct monitoring of antigen-antibody interactions by optical fiber bioprobe," *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, vol. 5254, pp. 431-436, 2003.
- [8] M. F. McCurley, «An optical biosensor using a fluorescent, swelling sensing element,» Biosensors and Bioelectronics, vol. 9, pp. 527-533, 1994.
- [9] J. A. Ferguson, T. C. Boles, C. P. Adams y D. R. Walt, «A fiber-optic DNA biosensor microarray for the analysis of gene expression,» *Nature Biotechnology*, vol. 14, pp. 1681-1684, 1996.
- [10] C. Pennington, M. Jones, M. Evans, R. VanTassell y J. Averett, «Fiber optic based biosensors utilizing long period grating (LPG) technology,» *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, vol. 4255, pp. 53-62, 2001.
- [11] Y. Tian, W. Wang, N. Wu, X. Zou y X. Wang, «Tapered Optical Fiber Sensor for Label-Free Detection of Biomolecules,» Sensors, vol. 11, pp. 3780-3790, 2011.

- [12] Y. Huang, Z. Tian, L.-P. Sun, D. Sun, J. Li, Y. Ran y B.-O. Guan, "High-sensitivity DNA biosensor based on optical fiber taper interferometer coated with conjugated polymer tentacle," *Optics Express*, vol. 23, nº 21, pp. 26962-26968, 2015.
- [13] A. W. Snyder y J. D. Love, Optical Waveguide Theory, Springer, 1983.
- [14] G. P. Agrawal, Fiber-Optic Communication Systems, John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [15] A. Bjarklev, J. Broeng y A. Sanchez Bjarklev, Photonic Crystal Fibres, Boston: Kluwer academic publishers, 2003.
- [16] P. Russell, «Photonic Crystal Fibers,» Science, pp. 358-362, 2003.
- [17] B. T. Kuhlmey, R. C. McPhedran y C. M. de Sterke, «Modal cutoff in microstructured optical fibers,» *Optics Letters*, pp. 1684-1686, 2002.
- [18] M. Koshiba y K. Saitoh, «Applicability of classical optical fiber theories to holey fibers,» *Optics Letters*, vol. 29, nº 15, pp. 1739-1741, 2004.
- [19] N. A. Mortensen, M. D. Nielsen, J. R. Folkenberg, A. Petersson y H. R. Simonsen, «Improved large-mode-area endlessly single-mode photonic crystal fibers,» *Optics Letters*, vol. 28, nº 6, pp. 393-395, 2003.
- [20] R. Ramsay, «Photonic-crystal fiber characteristics benefit numerous applications,» *SPIE Newsroom,* 2008.
- [21] D. A. Krohn, Fiber Optic Sensors: Fundamentals and Applications, ISA-The Instrumentation, Systems, and Automation Society, 2000.
- [22] J. M. López-Higuera, Handbook of Optical Fibre Sensing Technology, John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [23] D. Pereira, O. Frazão y J. Santos, «Fibre Bragg grating sensing system for simultaneous measurement of salinity and temperature,» *Optical Engineering*, vol. 43, pp. 299-304, 2004.
- [24] G. Rego, J. Santos y H. Salgado, «Refractive index measurement with long-period gratings arc-induced in pure-silica-core fibres,» *Optics Communications*, vol. 259, pp. 598-602, 2006.
- [25] S. Silva, J. Santos, F. Malcata, J. Kobelke, K. Schuster y O. Frazão, «Optical refractometer based on large-core air-clad photonic crystal fibers,» *Optics Letters*, vol. 36, pp. 852-854, 2011.

[26] M. Zibaii, O. Frazão, H. Latifi y P. Jorge, «Controlling the sensitivity of refractive index

measurement using a tapered fiber loop mirror,» *IEEE Photonics Technology Letters,* vol. 23, pp. 1219-1221, 2011.

- [27] N. Díaz-Herrera, A. González-Cano, D. Viegas, J. Santos y M. Navarrete, «Refractive index sensing of aqueous media based on plasmonic resonance in tapered optical fibres operating in the 1.5 μm region,» *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 146, pp. 195-198, 2010.
- [28] D. Monzón-Hernández y V. P. Minkovich, «Fibras ópticas microestructuradas estrechadas para fabricar sensores,» Gaceta Ideas CONCYTEG, 2007.
- [29] V. P. Minkovich, D. Monzón-Hernández, J. Villatoro, A. B. Sotsky y L. I. Sotskaya, «Modeling of Holey Fiber Tapers With Selective Transmission for Sensor Applications,» *Journal of Lighwave Technology*, pp. 4319-4328, 2006.
- [30] T. Yadav, R. Narayanaswamy, M. H. Abu Bakar, Y. Mustapha Kamil y M. A. Mahdi, «Single mode tapered fiber-optic interferometer based refractive index sensor and its application to protein sensing,» *Optics Express*, vol. 22, nº 19, pp. 22802-22807, 2014.
- [31] C. A. J. Gouveia, J. M. Baptista y P. A. Jorge, «Refractometric Optical Fiber Platforms for Label Free Sensing,» de *Current Developments in Optical Fiber Technology*, Dr. Sulaiman Wadi Harun, 2013, pp. 345-373.
- [32] J. Ju, L. Ma, W. Jin y Y. Hu, «Photonic bandgap fiber tapers and in-fiber interferometric sensors,» *Optics Letters*, vol. 34, nº 12, pp. 1861-1863, 2009.
- [33] D. J. Pike, N. Kapur, P. A. Millner y D. I. Stewart, «Flow Cell Design for Effective Biosensing,» *Sensors,* nº 13, pp. 58-70, 2013.
- [34] J. Villatoro, V. P. Minkovich y D. Monzón-Hernanández, «Compact Modal Interferometer Built With Tapered Microstructured Optical Fiber,» *IEEE Photonics Technology Letters*, vol. 18, nº 11, pp. 1258-1260, 2006.
- [35] D. Monzón-Hernández, V. P. Minvovich, J. Villatoro, M. P. Kreuzer y G. Badenes, «Photonic crystal fiber microtaper supporting two selective higher-order modes with high sensitivity to gas molecules,» *Applied Physics Letters*, vol. 93, p. 81106, 2008.
- [36] V. P. Minvokich, A. V. Kir'yanov, A. B. Sotsky y L. I. Sotskaya, «Large-mode-area holey fibers with a few air channels in cladding: modeling and experimental investigation of the modal properties,» *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 21, nº 6, pp. 1161-1169, 2004.
- [37] Thorlabs, Inc., «Thorlabs, Inc. Your Source for Fiber Optics, Laser Diodes, Optical Instrumentation and Polarization Measurement & Control,» [En línea]. Available: https://www.thorlabs.com. [Último acceso: 24 November 2015].

- [38] J. Villatoro, V. Finazzi, V. P. Minkovich, V. Pruneri y G. Badenes, «Temperatureinsensitive photonic crystal fiber interferometer for absolute strain sensing,» *Applied Physics Letters*, nº 91, p. 091109, 2007.
- [39] J. Villatoro, V. P. Minkovich y J. Zubia, «Locally pressed photonic crystal fiber interferometer for multiparameter sensing,» *Optics Letters*, vol. 39, nº 9, pp. 2580-2583, 2014.
- [40] S. Harun, K. Lim, C. Tio, K. Dimyati y H. Ahmad, «Theoretical analysis and fabrication of tapered fiber,» Optik, nº 124, pp. 538-543, 2013.
- [41] A. C. Guyton y J. E. Hall, Tratado de Fisiología médica, Elsevier, 2011.
- [42] J. Yudkin, J. Edelman y L. Hough, Sugar Chemical, Biological and Nutritional Aspects of Sucrose, London: The Butterworth Group, 1973.
- [43] European Commission, «European Commission,» 20 August 2015. [En línea]. Available: http://ec.europa.eu/food/safety/labelling\_nutrition/claims/nutrition\_claims/index\_en.htm. [Último acceso: 21 October 2015].
- [44] Q. Wu, Y. Semenova, P. Wang y G. Farrell, "High Sensitivity SMS Fiber Structure Based Refractometer - Analysis and Experiment," *Optics Express*, vol. 19, nº 9, pp. 7937-7944, 2011.
- [45] D. Wu, T. Zhu, M. Deng, D.-W. Duan, L.-L. Shi, J. Yao y Y.-J. Rao, «Refractive index sensing based on Mach–Zehnder interferometer formed by three cascaded single-mode fiber tapers,» *Applied Optics*, vol. 50, nº 11, pp. 1548-1553, 2011.
- [46] D. Liu, A. K. Mallik, J. Yuan, C. Yu, G. Farrel, Y. Semenova y Q. Wu, "High sensitivity refractive index sensor based on a tapered small core single-mode fiber structure," *Optics Letters*, vol. 40, nº 17, pp. 4166-4169, 2015.
- [47] V. P. Minkovich, J. Villatoro, D. Monzón-Hernánde, S. Calixto, A. B. Sotsky y L. I. Sotskaya, «Holey fiber tapers with resonance transmission for high-resolution refractive index sensing,» *Optics Express*, vol. 13, nº 19, pp. 7609-7614, 2005.
- [48] J. Villatoro, V. Finazzi, G. Badenes y V. Pruneri, «Highly Sensitive Sensors Based on Photonic Crystal Fiber Modal Interferometers,» *Journal of Sensors,* p. 11, 2009.
- [49] Mettler-Toledo International Inc. , «Mettler-Toledo,» [En línea]. Available: http://us.mt.com/us/en/home/supportive\_content/application\_editorials/Sucrose\_re\_e.html. [Último acceso: 21 October 2015].
- [50] A. Deep, U. Tiwari, P. Kumar, V. Mishra, S. C. Jain, N. Singh, P. Kapur y L. M. Bharadwaj, «Immobilization of enzyme on long period grating fibers for sensitive glucose detection,»

106

Biosensors and Bioelectronics, vol. 33, pp. 190-195, 2012.

- [51] K. Barrientos-Urdinola, «Caracterización de cristales piezoeléctricos biofuncionalizados para la detección de una biomolécula modelo,» Escuela de Ingeniería de Antioquia-Universidad CES, Envigado, 2015.
- [52] T. Nagel, E. Ehrentreich-Förster, M. Singh, K. Schmitt, A. Brandenburg, A. Berka y F. F. Bier, "Direct detection of tuberculosis infection in blood serum using three optical label-free approaches," Sensors and Actuators, vol. 129, pp. 934-940, 2008.
- [53] PolyAn GmbH, «PolyAn: 3D-PDITC activated Matrix,» [En línea]. Available: http://www.poly-an.de/products/microarray-products/surfaces-for-microarrays/3d-pditcactivated-matrix/. [Último acceso: 24 November 2015].
- [54] B. J. King, I. Idehenre, P. E. Powers, J. W. Haus y K. M. Hansen, «Biosensing platform with tapered optical microfibers: new results,» *SPIE Proceedings*, vol. 8933, p. 7, 2014.
- [55] N. E. Huang y S. S. Shen, Hilbert-Huang Transform and Its Applications, World Scientific, 2005.

# ANEXOS

# Anexo 1 Planos de las celdas de trabajo
## Anexo 2 Algoritmos de medición para fibras de cristal fotónico

## Anexo 3 Algoritmos para el análisis de datos