



# UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

---

---

CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA  
DIVISIÓN DE INGENIERÍAS

*“Diseño y caracterización de biosensores  
basados en fibra óptica”*

**Tesis que para obtener el grado de:**  
Doctor en Ingeniería eléctrica

**Presenta:**

M.I. Daniel Alberto Razo Medina

**Directores de Tesis:**

Dr. Edgar Alvarado Méndez

Dra. Mónica Trejo Durán

Salamanca, GTO.

Enero, 2018

Salamanca, Gto., a 12 de Enero del 2018.

M. en I. HERIBERTO GUTIÉRREZ MARTIN  
JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.-

Por medio de la presente, se otorga autorización para proceder a los trámites de impresión, empastado de tesis y titulación al alumno(a) **Daniel Alberto Razo Medina** del **Programa de Doctorado en Ingeniería eléctrica** y cuyo número de **NUA** es: **269153** del cual soy director. El título de la tesis es: **Diseño y caracterización de biosensores basados en fibra óptica.**

Hago constar que he revisado dicho trabajo y he tenido comunicación con los sinodales asignados para la revisión de la tesis, por lo que no hay impedimento alguno para fijar la fecha de examen de titulación.

**ATENTAMENTE**



Dr. Edgar Alvarado Méndez  
**DIRECTOR DE TESIS**  
**SECRETARIO**



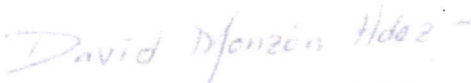
Dra. Mónica Trejo Durán  
**DIRECTOR DE TESIS**



Dr. José Amparo Andrade Lucio  
**PRESIDENTE**



Dr. Juan Manuel Sierra Hernández  
**VOCAL**



Dr. David Monzón Hernández  
**VOCAL**



Dr. Miguel Ángel Vázquez Guevara  
**VOCAL**

## **Agradecimientos**

A todos aquellos que me apoyaron y me ayudaron para culminar este trabajo.

**A Dios.-** Por haber me otorgado la vida, la fuerza y los medios necesarios para seguir adelante, haberme dado una gran familia y la oportunidad de conocer a muchas personas que me han dado su apoyo incondicional.

**A mi familia.-** Por todo el amor, motivación, consejo y sacrificio que me han dado, para alcanzar mis metas.

**A mis asesores.-** Por su apoyo y su experiencia compartida a través de su paciencia y motivación para culminar este proyecto.

**A todos los Doctores.-** Que han compartido conmigo su amistad y conocimiento, contribuyendo con mi aprendizaje y formación.

**A mis amigos.-** Por ofrecerme su amistad, por todo el apoyo que me han proporcionado y por todos los momentos alegres que hemos compartido.

**Al Dr. Ricardo** Navarro Mendoza por su ayuda en el estudio morfológico de la superficie de los optrodos analizados con el SEM del laboratorio de microscopía electrónica del laboratorio nacional de la Universidad de Guanajuato.

**Al Dr. Sergio** Calixto Carrera por el apoyo otorgado en el estudio de rugosidad superficial de los optrodos con el microscopio de fuerza atómica del laboratorio de materiales para opto-fluidos, micro-óptica y holografía del CIO.

**A la Dra. Ma. Fabiola** León Galván, por permitirnos realizar las valoraciones de nuestras muestras mediante el microscopio UV del laboratorio de orgánica del DICIVA.

**A la Dra. María** Cruz Moreno Bondi y a su grupo de trabajo “Grupo de Sensores Químicos Ópticos y Fotoquímica Aplicada (GSOLFA)”, por la oportunidad de trabajar y colaborar con ellos en la Universidad Complutense de Madrid, Durante la estancia de investigación del 2016.

## Agradecimientos institucionales



División de Ingeniería Campus Irapuato - Salamanca (DICIS). Por brindarme la oportunidad de pertenecer a esta institución y llevar a cabo mis estudios de posgrado, por su apoyo en la Concesión # 1, 115/2016.



Este trabajo de tesis ha sido soportado con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), mediante la beca de doctorado (CVU/becario No. 213921/206655).



# CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 ANTECEDENTES .....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN .....	4
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	5
1.3.1 Objetivo general .....	5
1.3.2 Objetivos particulares.....	5
1.4 APORTACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS.....	6
1.5 PLAN DE TRABAJO .....	7
<b>2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....</b>	<b>8</b>
2.1 SENSOR .....	8
2.1.1 Características de los sensores .....	8
2.1.2 Clasificación de sensores .....	11
2.1.3 Campos de aplicación.....	12
2.2 BIOSENSOR.....	13
2.2.1 Clasificación de los biosensores.....	14
2.2.1.1 Tipo de interacción.....	14
2.2.1.2 Método de detección .....	15
2.2.1.3 Elemento de reconocimiento .....	15
2.2.1.4 Sistema de transducción .....	16
2.2.2. Aplicaciones de biosensores.....	16
2.2.3 Biosensores de fibra óptica .....	17
2.3 INSTRUMENTACIÓN .....	18
2.3.1 Mecánica .....	18
2.3.1.1 Estructura .....	18
2.3.2 Electrónica.....	19
2.3.2.1 Fuente de luz .....	19
2.3.2.2 Transductor óptico.....	22
2.3.2.3 Puente de Wheatstone .....	24
2.3.2.4 Amplificador de instrumentación .....	26
2.3.2.5 Procesamiento e interfaz.....	30
2.3.3 Óptica .....	31
2.3.3.1 Propiedades ópticas de la materia.....	32
2.3.3.2 Guía de onda.....	34
2.3.4 Química .....	36
2.3.4.1 Proceso de inmovilización.....	36
2.3.4.2 Métodos de inmovilización .....	38
2.3.4.3 Técnica sol-gel .....	43
2.3.4.4 Proceso de la técnica sol-gel.....	45
2.3.5 Dispositivos de análisis y caracterización.....	47
2.3.5.1 Microscopio óptico.....	48

---

2.3.5.2 Analizador de espectros óptico.....	48
2.3.5.3 Espectroscopía IR por transformada de Fourier .....	49
2.3.5.4 Microscopio de fuerza atómica .....	51
2.3.5.5 Microscopio Electrónico de Barrido.....	52
<b>3. ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA .....</b>	<b>53</b>
3.1 REACTIVOS PARA LA TÉCNICA DE INMOVILIZACIÓN DE SOL-GEL.....	53
3.2 METODOLOGÍA.....	53
3.2.1 Preparación del material sol-gel/colesterol .....	54
3.3 PROCESO DE ELABORACIÓN DE OPTRODOS .....	54
3.3.1 Métodos de deposición.....	55
3.4 ANÁLISIS DEL ENCAPSULAMIENTO DE LA ENZIMA DE COLESTEROL.....	56
3.5 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS PELÍCULAS DE SOL-GEL.....	57
3.6 PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO .....	59
3.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS OPTRODOS.....	60
<b>4. DESARROLLO DEL BIOSENSOR Y RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
4.1 DISEÑO DEL BIOSENSOR.....	63
4.2 DESARROLLO DEL BIOSENSOR.....	64
4.2.1 Sistema mecánico.....	64
4.2.2 Sistema electrónico .....	65
4.2.2.1 Diseño del sistema de detección.....	65
4.2.2.2 Diseño electrónico .....	67
4.2.2.3 Sistema de adquisición de datos .....	68
4.3 DISPOSITIVO FINAL DE SENSADO .....	69
4.4 ANÁLISIS DE FUNCIONABILIDAD DEL PROTOTIPO .....	70
4.5 CURVA CARACTERÍSTICA .....	71
4.6 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO .....	72
4.7 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	73
4.8 DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO .....	77
4.9 RESULTADOS EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO.....	80
<b>5. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>81</b>
5.1 LOGROS DEL TRABAJO.....	81
5.2 IDEAS RELEVANTES.....	82
5.3 LIMITANTES .....	82
5.4 RECOMENDACIONES.....	82
<b>6. TRABAJOS.....</b>	<b>83</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>84</b>

---

**Índice de figuras**

Figura 1. Error de histéresis.-----	10
Figura 2. Elementos del sensado de un biosensor. -----	13
Figura 3. Absorción y emisión de luz. -----	20
Figura 4. Curvas características: a) $\lambda$ vs $I_v$ y b) T vs I.-----	21
Figura 5. Curva características de la fotorresistencia, luminancia vs resistencia. -----	23
Figura 6. Puente de Wheatstone.-----	24
Figura 7. Diagrama para análisis de puente de Wheatstone.-----	25
Figura 8. Diagrama interno de un amplificador de instrumentación.-----	27
Figura 9. Propiedades ópticas de la luz. -----	31
Figura 10. Forma de medir absorbancia y luminiscencia.-----	34
Figura 11. Guía de ondas ópticas. -----	34
Figura 12. Fibra Óptica.-----	35
Figura 13. Configuración de fibra óptica terminal de optrodos. -----	35
Figura 14. Métodos de inmovilización.-----	38
Figura 15. Técnica sol-gel para sintetizar diferentes productos. -----	44
Figura 16. Proceso de formación de un material sol-gel.-----	47
Figura 17. Microscopio óptico. -----	48
Figura 18. Analizador de espectro óptico.-----	49
Figura 19. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.-----	50



---

Figura 20. a) AFM, b) Elementos y análisis: c) morfológico y d) contraste de fases. -----	51
Figura 21. Microscopio Electrónico de Barrido. -----	52
Figura 22. Enzima de colesterol encapsulada dentro la estructura del sol-gel. -----	53
Figura 23. Síntesis del material sol-gel/colesterol. -----	54
Figura 24. Fibra preparada. -----	55
Figura 25. Métodos de deposición: a) Dip-coating y b) Immerse. -----	55
Figura 26. Espectro de absorción de la película sol-gel. -----	56
Figura 27. Espectro de absorción de la enzima de colesterol. -----	56
Figura 28. Comparativa entre los espectros de absorción del sol-gel: con y sin enzima.---	57
Figura 29. Optrodo de Sol-Gel/colesterol, Vista frontal, a) Immerse y b) Dip-coating. ----	57
Figura 30. Análisis morfológico con AFM, a) Dip-coating y b) Immerse. -----	58
Figura 31. Morfología de optrodos: a) Immerse, b) fibra óptica sola y c) Dip-coating. ----	59
Figura 32. Proceso de interacción entre analito y elemento de reconocimiento. -----	60
Figura 33. Caracterización lineal con el OSA para optrodo con Immerse. -----	62
Figura 34. Caracterización lineal con el OSA para optrodo con Dip-coating -----	62
Figura 35. Arreglo experimental del biosensor a desarrollar. -----	64
Figura 36. Sistema mecánico: a) modelo XYZ, b) real y c) Completo. -----	64
Figura 37. Caracterización del puente de wheatstone. -----	65
Figura 38. Curva característica de la fotorresistencia variando R1. -----	66
Figura 39. Curva característica de R <sub>1</sub> variando R <sub>x</sub> . -----	66

---

Figura 40. Sistema electrónico. -----	68
Figura 41. Acondicionamiento de la señal del optrodo. -----	69
Figura 42. Biosensor óptico final. -----	69
Figura 43. Caracterización de optrodos (Dip-coating) con el OSA. -----	70
Figura 44. Caracterización de optrodos (Dip-coating) con nuestro biosensor. -----	70
Figura 45. Caracterización del biosensor. -----	72
Figura 46. Características analíticas de validación. -----	73
Figura 47. Gráfico empírico de la relación de señal/ruido. -----	75
Figura 48. Características de desempeño de un sensor. -----	77
Figura 49. Límites de desempeño por método empírico. -----	78

**Índice de tablas**

Tabla 1. Clasificación de sensores.-----	12
Tabla 2. Descripción de transductores. -----	16
Tabla 3. Ejemplos de métodos de inmovilización-----	42
Tabla 4. Dilución de la concentración del colesterol estándar. -----	61
Tabla 5. Ajuste lineal para diferentes valores de la resistencia $R_1$ . -----	67
Tabla 6. Curva característica -----	72
Tabla 7. Datos estadísticos-----	79
Tabla 8. Límites de desempeño -----	79
Tabla 9. Detección de concentración de colesterol en muestras de suero humano. -----	80

**Lista de acrónimos**

ADC	Analog to Digital Converter
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFM	Atomic Force Microscope
AO	Amplificador Operacional
DAPS	Data Acquisition and Processing System
FTIR	Fourier Transform Infrared
GPS	Global Positioning System
ISO	International Standardization organization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LASER	Light Amplified by Stimulated Emission of Radiation
LC	Limit Critical
LCD	Liquid Crystal Display
LD	Laser Diode
LDR	Light Dependent Resistors
LED	Light Emitting Diode
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
NIR	Near-infrared
OSA	Optical Spectrum Analyzer
PIM	Polímero de Impronta Molecular
RSD	Relative Standard Deviation
SEM	Scanning Electron Microscope
SD	Standard Deviation
TEOS	Tetraethyl Orthosilicate

**Lista de símbolos y abreviaturas**

CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
O <sub>2</sub>	Oxígeno
pH	Grado de acidez o basicidad de una solución acuosa
H <sub>2</sub> O	Agua
NaCl	Cloruro de sodio
Nm	Nanómetro
Ω	Ohm
Δ	Determinante
λ	Longitud de onda
T	Temperatura
I	Corriente
R	Resistencia
V	Voltaje
I <sub>v</sub>	Intensidad luminosa
n	Semiconductor con electrón extra
p	Semiconductor con deficiencia de electrón
lux	Unidad de medida para la intensidad luminosa
Optrodo	La unión entre las palabras: óptico-electrodo
G	Ganancia
R <sub>G</sub>	Resistencia para ganancia
A	Absorbancia
%T	Porcentaje de transmitancia
KJ	Kilojoule
°C	Grados centígrados
Sol	Partículas sólidas muy finas dispersa en un líquido
Gel	Solido con densidad similar a los líquidos
Si <sub>2</sub> O	Dióxido de silicio

mg	Miligramo
dl	Decilitro
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico
cm	Centímetro
rpm	Revoluciones por minuto
ml	Mililitro
μl	Microlitro
min	Minuto
OH	Hidroxilo
C	Carbono
H	Hidrógeno
Cds	Concentración de disolución estándar
mM	Milimol
m	Pendiente
b	Ordenada
r	Correlación
S/N	Señal/ruido
Sy/x	Desviación estándar
μm	Micrómetro
s	Segundos
US\$	Dólares
mA	Miliamper

## Resumen

En este trabajo de tesis se presenta el diseño e implementación de un biosensor óptico para la medición o cuantificación de la concentración de colesterol, contenida dentro de una muestra de suero humano. El sistema de medición está basado en propiedades ópticas debido a los cambios químicos que se producen por la interacción entre la concentración del colesterol presente en la muestra y el reactivo de colesterol enzimático (kit, Ref. 1011). Se presenta el diseño y construcción de un dispositivo electrónico capaz de traducir estas propiedades (por medio de la absorción) en variables físicas que pueden ser medibles e interpretadas para el usuario. La elaboración del biosensor se llevó a cabo inmovilizando la enzima de colesterol sobre la superficie de la fibra óptica plástica (con un diámetro de 600  $\mu\text{m}$  del núcleo y 630  $\mu\text{m}$  de revestimiento, una apertura numérica de 0.50) por medio de dos métodos (Dip-coating e Immerse), aplicando la técnica de sol-gel, con el objetivo de determinar cuál es el método que muestra mejores resultados para el sensado de la concentración de colesterol (Ambos procesos de inmovilización se sometieron a análisis de morfología y propiedades de detección). Los resultados obtenidos en este proyecto muestran un intervalo lineal, idóneo para garantizar la fiabilidad de las mediciones obtenidas, con un rango de operación de 170 a 200 mg/dl (4.4-5.2 mM), el dispositivo tiene la ventaja de ser portátil para realizar análisis *in situ* en un tiempo muy corto (120s), simple, bajo costo, fácil de usar y alta sensibilidad ( $2.0629 \%T/mM^{-1}$ ). Finalmente, el biosensor de colesterol se ha aplicado con éxito para determinar la concentración de colesterol en muestras de suero humano comparando con los resultados realizados en un laboratorio clínico, ofreciendo una alternativa de biosensado. Además, a este dispositivo se le puede agregar la habilidad de multi-análisis, realizando otros optrodos donde se inmovilizan diferentes enzimas de reconocimientos para distintas bioelementos de interés (glucosa, pH, etc).

# 1. Introducción

## 1.1 Antecedentes

El desequilibrio o alteración en la concentración de sustancias como por ejemplo la glucosa, el pH, el oxígeno, etc., dentro de seres humanos, animales o plantas, puede ser causa de algunas enfermedades. El primer paso para prevenirlas es realizar estudios médicos, los cuales proporcionen la cantidad de sustancia que se encuentra dentro de una determinada muestra. Estas sustancias se pueden encontrar en los alimentos, el medio ambiente o en el organismo mismo en cuestión [1, 2, 3].

Existen dispositivos capaces de medir elementos presentes dentro de la muestra a analizar. A estos dispositivos se les conoce como sensores, los cuales proporcionan la medición en magnitud de una o varias propiedades de la muestra, por medio de procesos químicos o físicos. Los sensores pueden medir parámetros físicos como distancia, presión, temperatura, humedad, intensidad lumínica, aceleración, inclinación, desplazamiento, fuerza, torsión, movimiento, etc., y químicos como el pH, glutamato, etc. [4, 5, 6, 7, 8, 9]; dentro de la gama de los sensores existen los sensores biológicos llamados biosensores, los cuales como su nombre lo indica, realiza la medición con la ayuda de un elemento biológico.

El biosensor es un dispositivo analítico que incorpora un material biológico (por ejemplo: tejidos, microorganismos, organelas, receptores celulares, enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, productos naturales, etc. [10, 11, 12, 13]), un material derivado biológicamente (por ejemplo: anticuerpos recombinantes, proteínas modificadas, aptámeros, etc. [12]) o un material biomimético (por ejemplo: receptores sintéticos, catalizadores biomiméticos, ligandos combinatorios, polímeros impresos, etc. [14]). Asociado o integrado a un sistema de transducción fisico-químico (óptico, electroquímico, nano-mecánicos, piezoeléctrico o termométrico [14]). El cual traduce la interacción entre el analito (sustancia a medir) y el dispositivo analítico en una señal eléctrica medible para su cuantificación. Los biosensores



iniciaron su desarrollo y comercialización, fundamentalmente, alrededor de los años 60, orientados a aplicaciones clínicas y de impacto bioquímico.

Al profesor Leland C. Clark Jr., se le puede atribuir el concepto de biosensor. Dado que en 1962 Clark y Lyons, en su trabajo “titulado *electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery*” [15], realizaron una medición rápida y precisa del pH, CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> de la sangre. Por medio de una enzima de glucosa oxidasa acoplada a un electrodo para oxígeno. Más adelante en base a su trabajo y en su deseo de ampliar la gama de analitos que podrían medirse en el cuerpo, Clark dio un discurso histórico en el simposio de la Academia de Ciencias de Nueva York, en el que describía cómo fabricar sensores electroquímicos.

Lubbers y Opitz acuñaron el término optodo del griego *camino óptico* (οπτικος οδος) en 1975 para describir un sensor óptico con un indicador inmovilizado para medir CO<sub>2</sub> o O<sub>2</sub> [16]. Ellos extendieron el concepto para hacer un biosensor óptico para alcohol inmovilizando alcohol oxidasa al final de la fibra óptica del sensor de oxígeno. Un mejor avance en las aplicaciones *in vivo* de biosensores de glucosa fue reportado por M. Shichiri quien describió el primer electrodo enzimático tipo aguja para implantación en 1982 [17].

El impacto y la precisión analítica de los biosensores han conducido a un crecimiento vertiginoso de la investigación y desarrollo, en 1997, J. Wang con los protocolos de detección de ADN, fabricó un sensor de monitoreo ambiental basado en interacción de ácido nucleico como transductores electroquímicos, para la determinación de microbios o virus patógenos [18]. En 2002, T. Lee, realizó un sensor óptico para determinar el pH, por medio a los cambios que sufre la potencia óptica, debido al pH presente en la muestra [19]. Para determinar la contaminación orgánica de las aguas residuales, en 2005, E. Vaiopoulou elaboro un sensor microbiano, el cual se basa en la medición de la concentración de CO<sub>2</sub> en el gas residual producido durante la degradación del compuesto de carbono por actividades de respiración microbiana [20]. Por esa época. M. Alonso desarrollo un sensor amperométrico para determinar la glucosa utilizando un chip con microelectrodos para

medir la transferencia de electrones causadas por la glucosa a través del electrodo con la ayuda de dos compuestos mediadores (ferrocianuro y el azul de metileno) [21].

H. Yang implemento en el 2007 un sensor de pH, mediante una película delgada de acetato de celulosa dopada con fluorescencia sensible a pH [22]. Wang en el 2008, realizó un biosensor de glucosa electroquímico [23], con el propósito de crear un dispositivo más fiable para el control de la diabetes. En 2010, E. Yoo realizó un estudio de la importancia de los biosensores de glucosa en la sangre, para su monitoreo y control en el manejo de la diabetes [24]. La concentración de alcohol en bebidas (whisky, vinos, etc.) lleva un estricto control, por lo que M. Morisawa en el 2012, realizó un sensor para determinar la concentración de una forma más rápida (1 min), mediante la intensidad de luz transmitida [25]. N. Atar (2015) por medio de un biosensor de impronta molecular de resonancia de plasmon superficial, pudo medir la citrinina (toxina) en arroz de levadura roja [26]. Biosensor de rejilla de período largo de fibra óptica anclado con nano partículas de cubierta de oro y núcleo de sílice, se realizó recientemente en el 2016, por L. Marqués, para calcular la concentración de estreptavidina (proteína purificada a partir de la bacteria *Streptomyces avidinii*), mediante el cambio en el índice de refracción en sustancia acuosa [27].

Como se ha descrito brevemente, el diseño y desarrollo de biosensores es de gran interés por sus valiosas aplicaciones en distintas áreas, como en la industria, medio ambiente, ingeniería, medicina, etc. Aunque el campo de diagnóstico clínico es evidentemente, el más estudiado. Un ejemplo de este es el colesterol, debido a que es una sustancia adiposa que forma parte de las membranas celulares; cuando este aumenta las paredes de los vasos sanguíneos se estrechan aumentando su riesgo de ataque cardíaco y derrame cerebral [28, 29, 30, 31, 32]. Por tal motivo, la presente tesis, está enfocada en el desarrollo y creación de un biosensor que permita determinar la concentración de colesterol presente en el suero humano. Ofreciendo ventajas sobre otros sensores en términos de portabilidad, simplicidad, durabilidad, bajo costo, especificidad, alta sensibilidad y medición en tiempo real.

## 1.2 Justificación

En el área médica, debido al hecho de que los altos niveles de colesterol se asocia con un elevado riesgo de enfermedad cardiovascular, hipertensión arterial, derrame cerebral, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de útero, impotencia, etc., la determinación de la concentración de colesterol en sangre del cuerpo humano es muy importante.

Existen múltiples aparatos que miden la concentración de colesterol dentro del mercado con precios no muy accesibles a todo el público y la necesidad de poder acceder a ellos se ha masificado por el hecho de que cada vez aumenta el número de personas con colesterol alto.

Se plantea crear y desarrollar un biosensor óptico para determinar el colesterol **en suero humano** o en alguna otra muestra, utilizando una técnica espectroscópica (transmitancia), con el objetivo de ofrecer un sistema más simple, fácil de utilizar, fiable, portable y lograr una optimización de recursos minimizando el costo para que pueda estar al alcance de todas las personas, y así ayudar a la sociedad en el cuidado de la salud.

### 1.3 Objetivos de la investigación

#### 1.3.1 Objetivo general

Investigar, desarrollar técnicas y elementos para la creación de biosensores de fibra óptica plástica mediante la técnica sol-gel, que permitan cuantificar el colesterol presente en el **suero de la sangre**, logrando reducir costos, así como tener un sistema compacto reduciendo el tamaño obteniendo portabilidad y simple de usar, como una contribución a la solución de la prevención de desarrollo de problemas cardiovasculares.

#### 1.3.2 Objetivos particulares

- ❖ Deposición por medio de dos métodos (Dip-coating e Immerse)
- ❖ Análisis morfológicos y propiedades de sensado para ambos métodos
- ❖ Caracterización del biosensor
- ❖ Diseño y fabricación del sistema de alineado
- ❖ Medición mediante dispositivos electrónicos
- ❖ Optimización de la fabricación del biosensor
- ❖ Realización de un dispositivo portátil

#### 1.4 Aportaciones científicas y tecnológicas

Con el desarrollo de este biosensor de colesterol, se pretende mejorar algunos aspectos importantes que un dispositivo de sensado debe de contener, como lo son:

- Dispositivo multi-análisis
- Reducir la cantidad de muestra que se requiere para realizar el análisis
- Rango de operación amplio
- Reducir costo de fabricación
- Fiabilidad del sistema
- Simple y compacto, reduciendo el tamaño, peso y volumen de los elementos, para tener un sistema portable.

## 1.5 Plan de trabajo

El presente manuscrito se dividió en cinco capítulos, descritos a continuación:

**Capítulo 1.-** En este primer capítulo se explica de una manera breve y concisa, los objetivos de este proyecto, así como sus beneficios que traerían a la sociedad. Explicando las ventajas que tiene el desarrollo de este dispositivo de sensado, para garantizar la sustentabilidad del mismo.

**Capítulo 2.-** Se expone la parte teórica del proyecto, realizando una descripción concreta acerca de los sensores y sus elementos, además de una descripción de cada uno de los elementos que conforman el diseño del biosensor.

**Capítulo 3.-** Se presenta el proceso de elaboración de optrodos, por medio de los dos métodos de deposición de la enzima aplicando la técnica de inmovilización de sol-gel y las valoraciones realizadas para cada método, como el estudio de morfología, rugosidad superficial y caracterización de curvas.

**Capítulo 4.-** Se muestra el diseño y desarrollo del biosensor óptico para determinar la concentración de colesterol, caracterizado con muestras sintéticas y evaluando con muestra biológicas (suero humano).

**Capítulo 5.-** En este último capítulo se muestran las conclusiones generales obtenidas durante el desarrollo del proyecto.

## 2. Fundamentos teóricos

En este proyecto es de vital importancia el entendimiento de los conceptos básicos de cada elemento que componen al biosensor, para conocer sus alcances y aplicaciones. Para ello se realiza una descripción clara y breve de los sensores en general, enfatizando al biosensor, los elementos que lo componen y los aspectos que se requieren para llevar a cabo el desarrollo de este; adicionando los dispositivos de análisis para su valoración.

### 2.1 Sensor

Un sensor es un dispositivo capaz de detectar cambios físicos o químicos, llamados variables de instrumentación como por ejemplo la intensidad de la luz, temperatura, presión, magnetismo, humedad, aceleración, torsión, etc. Este debe ser capaz, por sus propias características o propiedades, de transformar esa magnitud en una señal física medible para que pueda ser interpretada. Por ejemplo una resistencia eléctrica para determinar voltaje, un termopar para temperatura, un fototransistor para intensidad de la luz, etc. En conclusión un sensor es un dispositivo que traduce un fenómeno físico o químico en una señal física medible [33, 34].

#### 2.1.1 Características de los sensores

Un buen sensor debe de tomar en consideración los aspectos tecnológicos para su realización, ya que, con estas características o parámetros, se puede evaluar o juzgar, que tan bueno puede ser el sensor desarrollado. Los aspectos a tomar en cuenta son los siguientes:

***Función de transferencia.***- Esta función muestra la relación entre la variable física de entrada y la señal eléctrica de salida. Usualmente representada por medio de una gráfica que muestra esta relación [35].

**Sensibilidad.-** Es la razón de cambio entre la señal medible de salida y la señal física medida. Delimitada por la pendiente de la curva característica y la precisión del sistema de medida. Una alta sensibilidad sería si un pequeño cambio físico genera un gran cambio en la señal medible [5].

**Rango dinámico.-** Es el conjunto de todos los valores posibles que la relación entre la entrada física y la señal de salida puede producir, es decir, es la colección de todas las salidas posibles de la señal eléctrica [5].

**Alcance (Span).-** Es la diferencia algebraica entre los valores superiores e inferiores del campo de medida del instrumento, para la señal física de salida [5].

**Repetibilidad.-** Es la capacidad del instrumento de medir repetidamente valores idénticos de la señal física de salida a un mismo cambio físico de entrada en las mismas condiciones y en el mismo sentido de variación, recorriendo todo el campo y en un corto tiempo [24, 5].

**Reproducibilidad.-** Es la variación entre las mediciones hechas, cuando miden el mismo cambio físico en diferentes tiempos, bajo condiciones de medición que cambian [5].

**Precisión.-** Se refiere a qué tan cerca están las mediciones entre ellas (grado de concordancia) obtenidas en mediciones repetidas de una misma muestra, o de muestras similares, bajo condiciones específicas. Estas condiciones se denominan condiciones de repetibilidad o de reproducibilidad; la precisión es mayor si los datos están más cercanos a la señal física (real) y se expresa numéricamente mediante medidas de dispersión tales como la desviación típica, la varianza, el coeficiente de variación bajo las condiciones especificadas o como la Desviación Estándar Relativa (RSD) [24, 5].

**Exactitud.-** Es el margen de error en porcentaje entre la señal física obtenida (valor práctico) y la señal física ideal (valor teórico). Así pues, una medición es más exacta cuanto más pequeño es el error de medida [24, 5].



**Ruido.**- Es una señal aleatoria añadida a la señal eléctrica de salida, ocasionada por diversas causas. Este ruido debe ser minimizado de tal forma, que se pueda depreciar para llevar a cabo la medición correcta [24, 5].

**Histéresis.**- Algunos sensores no entregan el mismo valor de medición cuando la señal física varía de forma ascendente o descendente. La diferencia que existe entre estas mediciones, en términos del valor medido, se le conoce como error de histéresis [5], este error se muestra en la Figura 1.

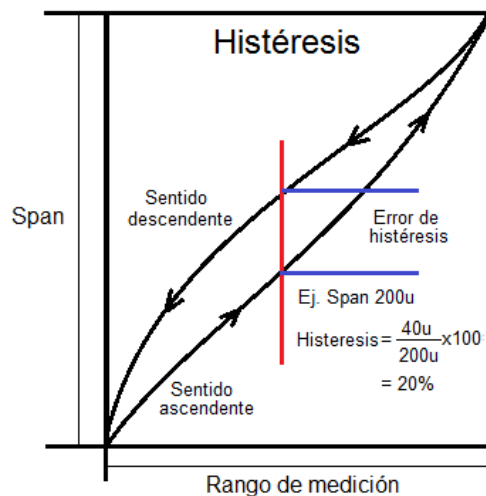


Figura 1. Error de histéresis.

**Resolución.**- Es la mínima fluctuación del cambio físico de entrada capaz de producir una señal física de salida perceptible en el instrumento [5].

**Estabilidad.**- Es la capacidad de un instrumento para mantener su comportamiento durante su vida útil y de almacenamiento especificadas [5].

**Vida útil.**- Tiempo mínimo especificado durante el cual se aplican las características de servicio continuo e intermitente del instrumento sin que presente cambios en su comportamiento [36].

***Selectividad.***- Es la capacidad de discriminar entre sustancias diferentes, es decir, responder exclusivamente a la sustancia que se desea analizar. Sin embargo, en algunas ocasiones se aceptan métodos con una pobre especificidad cuando el propósito del análisis es captar compuestos similares dentro de un grupo [36].

***Tiempo de respuesta.***- Es el tiempo que tarda el instrumento en cambiar su valor de la señal medible de salida cuando ocurre un cambio en la señal física de entrada [36].

***Tiempo de recuperación.*** Es el tiempo mínimo que transcurre antes de que el sensor pueda realizar la siguiente muestra, este no debe ser superior a unos minutos [36].

***Linealidad.***- Es la capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales, ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, a la variable física a medir, en un intervalo dado [24, 5].

***Los límites de validación.***- Son parámetros de la curva característica, para describir la más pequeña concentración de un analito que puede medirse de forma fiable mediante un procedimiento analítico [37].

### **2.1.2 Clasificación de sensores**

Los sensores se pueden clasificar de acuerdo a cuatro aspectos, el primero es según en función de su aplicación para determinar ciertos analitos, la siguiente es su principio, es decir, la medida bajo el que opera el transductor, el tercero es de acuerdo al despliegue del resultado de la medición y el último aspecto es de acuerdo a la energía que requiere para su funcionamiento. Para comprender mejor esta clasificación, se presentan en la Tabla 1 algunos tipos de sensores de acuerdo al aspecto considerado.

Tabla 1. Clasificación de sensores [4].

Clasificación	Sensores
Aplicación	Mecánica (área, volumen, fuerza, presión, etc.), térmica (temperatura, calor específico, etc.), eléctrica (voltaje, corriente, frecuencia, etc.), magnética (intensidad del campo, permeabilidad, densidad de flujo, etc.), radiante (intensidad, fase, transmitancia, reflectancia, etc.) y química (concentración, pH, composición, etc.).
Principio	Físico (resistivo, inductivo, termoelectrónico, piezoelectrónico, etc.), biológico (transformación bioquímica o física, espectroscopia, etc.) y químico (transformación química, procesos electroquímicos, etc.).
Salida	Análoga (la salida varía de forma continua) o digital (la salida varía en pasos discretos).
Energía	Activo (requiere la alimentación de una fuente de poder) o pasivo (produce su propia energía o utiliza la energía del fenómeno que está siendo medido).

### 2.1.3 Campos de aplicación

Los sensores debido a su aporte científico se han diseñado y desarrollado en casi todos los campos de la ciencia, como lo son la agricultura, automotriz, ingeniería civil, comercio, energía, seguridad, salud, telecomunicaciones, fabricación, en el espacio, etc.

Algunos ejemplos de estas aplicaciones se pueden encontrar en la literatura, como el reportado por J. Gu et al [38], en el cual por medio de un micro sensor de movimiento, puede hacer que un implante ocular, además de verse estéticamente bien, realice el mismo movimiento natural, con el que se mueve el otro ojo. En otro trabajo, I. Karubey [39], monitorea contaminantes de agua y aire, para el control de agua potable. Otra aplicación de sensores en el medio ambiente es la detección de gases peligrosos y toxicidad biológica presentada en los trabajos de X. Huang [40] y C. Chai [41]. En la industria alimenticia existe una variedad de publicaciones acerca de sensores, en el trabajo de D. Melloy [42], muestran un amplio panorama de los sensores utilizados para el análisis de comida como

su calidad, su proceso de producción, por medio del análisis de glucosa, fructuosa, lactosa, etc. En cuanto al área médica, el trabajo de A. Garinei [43], propuso una matriz de sensor capacitivo, con el propósito de medir la distribución de la presión en una membrana de una bomba para aplicaciones biomédica, P. Hilditch [44], determino los niveles de glucosa a través de la interacción de la glucosa oxidasa con ferroceno y la concentración de  $\alpha$ -amilasa para el diagnóstico de la pancreatitis aguda y crónica. Otro sensor de glucosa fue realizado por C. Henry [45], en el cual presenta el implante de un sensor de glucosa que mide el peróxido de hidrógeno producido por la oxidación de la glucosa.

Aunque en la actualidad, existen sensores de todo tipo para las diferentes áreas de aplicación, los biosensores se están convirtiendo en una herramienta imprescindible debido a sus aplicaciones de diagnóstico médico.

## 2.2 Biosensor

Como se mencionó anteriormente el biosensor consta de dos elementos, la detección biológica y un sistema de transducción Físico-Químico (Ver Figura 2). Es decir, es un dispositivo de análisis capaz de determinar la concentración de analito que se encuentra dentro de una muestra.

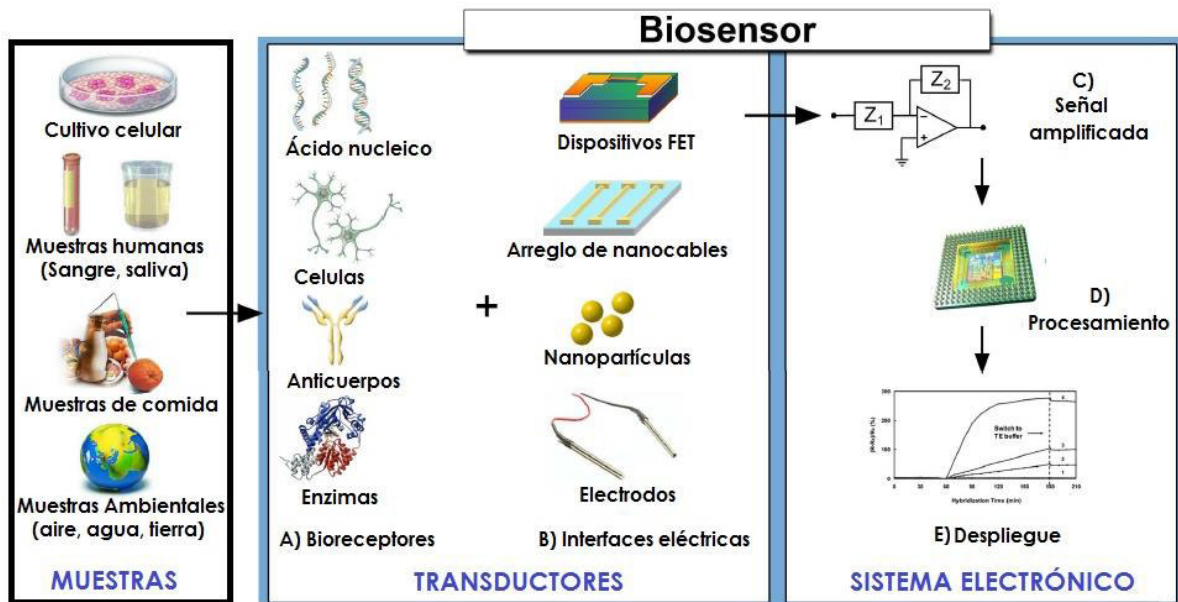


Figura 2. Elementos del sensado de un biosensor [46].

En principio, se puede diseñar un biosensor para cualquier tipo de compuesto que sea capaz de interactuar específicamente con un sistema biológico. Generalmente, el biosensor contiene una molécula biológica inmovilizada próxima a un transductor que, en contacto con el analito, transformará la señal química producida en una señal eléctrica o de otro tipo (óptica, calorimétrica, acústica, etc.) [42, 47].

El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el compuesto o microorganismo de interés y el elemento de reconocimiento. Como resultado de esta unión se produce la variación de una o múltiples propiedades físico-químicas (pH, transferencia de electrones, de calor, cambio de potencial, de masa, variación de las propiedades ópticas, etc.) que detecta el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal eléctrica indicativa de la presencia del analito sometido a estudio o proporcional a su concentración en la muestra.

### **2.2.1 Clasificación de los biosensores**

Los biosensores se pueden clasificar atendiendo las siguientes variables, por su tipo de interacción, el método utilizado para la detección, el elemento de reconocimiento del analito y por último el sistema de transducción [48].

#### **2.2.1.1 Tipo de interacción**

Biocatalítica y bioafinidad, esta clasificación se realiza en función del elemento de reconocimiento y del sistema de sensado que da lugar a la señal que se manifiesta durante la unión del analito en el sitio de unión.

Los sensores de interacción biocatalítica se basan en la utilización de catalizadores, que son elementos que favorecen una reacción química, en la cual a partir de uno o varios sustratos se forman uno o varios productos, los cuales crean propiedades medibles, son sistemas in-situ, constituidos por organelas, células, tejidos, sistemas enzimáticos o multienzimáticos de origen animal o vegetal [49]. Por otro lado los sensores de bioafinidad incluyen

componentes biológicos, tales como anticuerpos, ácidos nucleicos, colorantes, receptores de membrana celular y otros. Estos presentan una gran ventaja en cuanto a sus aplicaciones para la detección de residuos de pesticidas, fármacos, virus, agentes microbianos y alérgenos en alimentos, se basan en la interacción del analito de interés con el elemento de reconocimiento, sin que exista transformación catalítica (no se produce modificación química alguna de cualquiera de los elementos que participan en la unión), sino que se produce una reacción de equilibrio en la que se forma un complejo analito-receptor [50].

### **2.2.1.2 Método de detección**

El método de detección puede ser de modo directo o modo indirecto, en el primer caso se refiere cuando en la interacción del analito y el elemento de reconocimiento se produce una reacción química (proceso termodinámico en el cual una o más sustancias se transforman, cambiando su estructura molecular y sus enlaces, en otras sustancias llamadas productos, como el óxido de hierro producida al reaccionar el oxígeno del aire con el hierro) y el segundo método el modo indirecto es cuando en la interacción obtenemos únicamente un compuesto (sustancias pura formadas por 2 o más elementos, como H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, NaCl, etc.).

### **2.2.1.3 Elemento de reconocimiento**

El elemento de reconocimiento es un evento de vital importancia en el desarrollo de biosensores; ya que es el elemento que interactúa con el analito, para llevar a cabo su identificación., se vale de células, tejidos, péptidos, enzimas, receptores, anticuerpos, ácido nucleicos, carbohidratos, polímeros de impresión molecular (PIM), aptámeros, etc. [51, 52, 53, 20]. Añadiendo a estos mejoras como la incorporación de nanomateriales que puedan incrementar el rendimiento de los sensores y mejorar sus características, tales como la selectividad, estabilidad y efectividad.

#### 2.2.1.4 Sistema de transducción

El sistema de transducción o transductor es el elemento que convierte las variaciones de las propiedades físicas o químicas (producidas por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito en función de la concentración del analito) en una magnitud física que puede ser medible, amplificada, almacenada y registrada. La señal generada por el transductor en algunos casos no puede ser interpretada directamente y es necesaria la utilización de un software para su procesamiento.

Existen varios tipos de transductores, los más comunes son los mecánicos, los electroquímicos, los ópticos, los piezoeléctricos y los térmicos [54, 55, 56, 4]. Dependiendo de la naturaleza de la interacción que se origina entre el elemento de reconocimiento y el analito se puede utilizar un tipo de transductor u otro, ver la Tabla 2.

Tabla 2. Descripción de transductores [57].

Transductores	Descripción
Mecánico	Transforma los efectos mecánicos o acústicos.
Electroquímico	Transforma en una señal eléctrica la interacción química entre el analito y el electrodo.
Óptico	Transforma los cambios producidos en una señal óptica por la interacción de un analito con el receptor.
Piezoeléctrico	Transforma un cambio de masa que se da sobre el electrodo modificado con materiales con propiedades piezoeléctricas (generan un voltaje cuando se deforman).
Térmico	Son capaces de medir el cambio de calor sobre la superficie del electrodo.

#### 2.2.2. Aplicaciones de biosensores

Algunas de las aplicaciones de los biosensores en alimentos es la detección de residuos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos en productos lácteos, la determinación del tiempo de corte del coágulo de la leche en la fabricación de queso de cabra, el monitoreo de la fermentación maloláctica, determinante de las características de acidez en vinos [58, 59]. En el área médica se han desarrollado biosensores capaces de medir el pH, oxígeno, fructuosa,

glucosa, zinc, entre otros [12, 60]. Dentro de la rama de los biosensores, los biosensores ópticos, han cobrado gran auge debido a los avances científicos en láseres y fibras ópticas de bajo costo, por tal motivo son poderosas alternativas a las técnicas analíticas convencionales.

### **2.2.3 Biosensores de fibra óptica**

Los biosensores de fibra óptica son biosensores ópticos basados en técnicas espectroscópicas, interferométricas o refractométricas aprovechando las propiedades de guiado de la luz, estos biosensores tienen aplicaciones potenciales y de gran ayuda en diversas áreas como, en el medio ambiente, vigilancia, seguridad alimentaria, desarrollo de medicamentos, médicos y diagnóstico [61, 62]. Debido a simplicidad, durabilidad, resistencia en medios agresivos, inmunidad a interferencias electromagnéticas, bajo costo, las pequeñas dimensiones físicas, su facilidad para la detección del analito, portabilidad, el potencial multi-analítico e interfaz con funciones electrónicas.

Esta particular clase de biosensores se caracteriza por tener una fase sensible, donde se inmoviliza un indicador, cuyas propiedades ópticas se cambian en función de la concentración de analito presente en la muestra. La señal óptica es guiada a través de una fibra óptica hasta un detector, para posteriormente amplificarla y procesarla para su interpretación. Los biosensores de fibra óptica son más conocidos dentro de la comunidad científica como optrodos (la unión entre las palabras: *óptico-electrodo*) que optodos [63], aunque lingüísticamente incorrecto ya que estos sensores no analizan una señal eléctrica como los electrodos, sino óptica.

#### **Ventaja de los optrodos**

- No requieren señal de referencia
- Posibilidad de aumentar la distancia analito-sensor para su monitoreo
- Análisis multiparamétrico
- Terminales sensibles fácilmente intercambiables
- Utilización de fibras ópticas flexibles y de gran resistencia.



**Desventaja**

- Interferencia de la luz externa.
- Lavado o fotodegradación de los indicadores.
- Tiempos de respuesta, en ocasiones, elevados.
- Irreversibilidad.
- Dependencia de la concentración de analito.
- Interferencias o limitaciones introducidas por la fibra óptica.
- Dependencia del método de la optoelectrónica del equipo.

**2.3 Instrumentación**

La instrumentación es de vital importancia, ya que se combinan distintas ramas, con el propósito de analizar, diseñar y automatizar el proceso de manufactura, en este caso el biosensor. Para la fabricación del biosensor a desarrollar se consideran cinco aspectos, los cuales son:

- Mecánico (estructura)
- Electrónico (captura, procesamiento, interfaz, sensado)
- Óptico (guía de onda, fibra óptica)
- Químico (proceso de inmovilización, técnica sol-gel )
- Caracterización (instrumentos de análisis)

**2.3.1 Mecánica**

Por la parte de la mecánica, ésta proporciona la elaboración de la estructura del instrumento de sensado, la cual nos dan soporte interno y protección externa a otras partes del equipo.

**2.3.1.1 Estructura**

El instrumento debe poder operar en condiciones muy adversas, características del trabajo diario de campo. El diseño le permite resistir el polvo, vibraciones que pudiera recibir durante su traslado y tener la capacidad de ser portátil. Para cumplir con la característica de ser portable, se tiene que tomar en cuenta que las dimensiones del dispositivo como el peso

y volumen deben de ser los mínimos posibles. Además la construcción del instrumento de medición debe de conocer las localizaciones de todas las conexiones mecánicas, eléctricas, electrónicas, de fluidos, etc., para realizar la distribución de estas de una manera adecuada, incluyendo cualquier agujero de montaje.

### **2.3.2 Electrónica**

Los dispositivos electrónicos aportan la parte de la instrumentación, como lo son la fuente de luz, el detector, el acondicionamiento de la señal para la amplificación y lo más importante la interfaz con el usuario para su manejo [64, 65].

#### **2.3.2.1 Fuente de luz**

Las fuentes de luz son herramientas esenciales en aplicaciones ópticas, de acuerdo a la aplicación estas fuentes se caracterizan por su eficacia, consumo, potencia, facilidad de manipulación y transporte, entre otras. La elección de la fuente luminosa depende fundamentalmente de las propiedades espectroscópicas del analito (en métodos directos) o del indicador situado en el terminal sensible (métodos indirectos) y del costo y tamaño del dispositivo final [66]. Las fuentes de luz más utilizadas en la fabricación de sensores de fibra óptica son:

***Las lámparas incandescentes.*** Generan la radiación electromagnética por efecto Joule, la corriente eléctrica es conducida a través de un filamento calentado hasta la incandescencia. Son fuentes de baja intensidad, por lo que se utilizan en medidas de absorbancia o reflectancia [67].

***Las lámparas de descarga.*** En este tipo de fuente luminosa la lámpara se llena de un gas neutro, generalmente deuterio, mercurio o xenon. Una descarga eléctrica ioniza y excita el gas, cuya emisión origina una radiación característica. Tradicionalmente, en medidas de fotoluminiscencia se emplean las lámparas de xenon, que generan un espectro continuo en el intervalo 250-3000 nm [68].

*El LASER* (light amplification by stimulated emission of radiation) ha sido ampliamente utilizado en instrumentación analítica debido a la elevada intensidad (W), naturaleza coherente (están en fase temporal y espacial), ondas colimadas (viajan en la misma dirección en forma paralela: diámetro del haz constante) y son monocromáticas (estrecho ancho de banda; una sola longitud de onda). Las principales limitaciones que presentan estos dispositivos son su elevado costo y emisión de luz típicamente por encima de 600 nm. Sin embargo, recientemente se han desarrollado novedosos láseres azules y verdes de menor costo con los que probablemente aumentará, en un futuro próximo, la aplicación de estas fuentes de luz en el campo de los sensores ópticos [69].

*El diodo emisor de luz* (light-emitting diode, LED) es un componente optoelectrónico, que a diferencia del láser su intensidad es menor (mW), no es coherente, ni colimada, pero si monocromática aunque su ancho de banda es diez veces mayor [70]. Debido a que el LED es la fuente de luz a utilizar, se da una descripción más amplia de cómo funciona. El LED trabaja emitiendo una luz cuando un electrón libera energía al descender a un nivel de energía más bajo, esta cantidad específica de energía se convierte en un fotón o en luz de cierto color (longitud de onda), ver Figura 3.

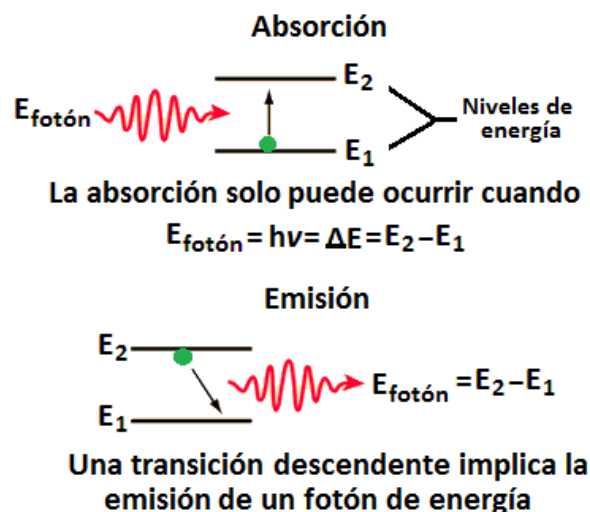


Figura 3. Absorción y emisión de luz.

Un ejemplo es el LED rojo, el cual trabaja a una longitud de onda de cercana a los 633nm y no se ve afectado su funcionamiento a temperatura ambiente, según las curvas características presentadas en la Figura 4a y 4b, Intensidad luminosa ( $I_v$ ) vs Longitud de onda ( $\lambda$ ) y Corriente ( $I$ ) vs Temperatura ( $T$ ), respectivamente.

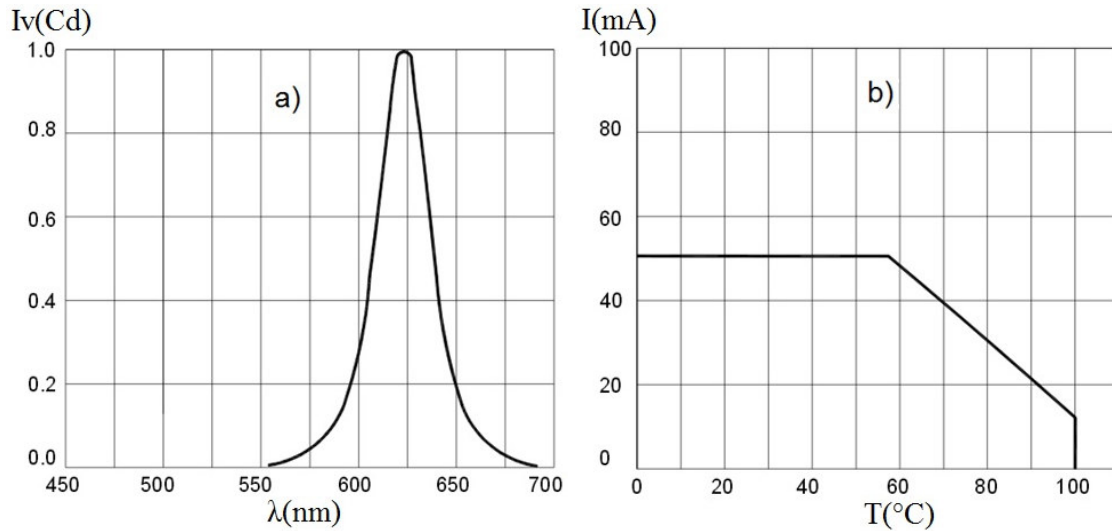


Figura 4. Curvas características: a)  $\lambda$  vs  $I_v$  y b)  $T$  vs  $I$  [71].

Los LEDs presentan ventajas sobre las fuentes de luz incandescente y fluorescente, tales como: bajo consumo de energía, mayor tiempo de vida, tamaño reducido, resistencia a las vibraciones, reducida emisión de calor, no crean campos magnéticos altos como la tecnología de inducción magnética, reducen ruidos en las líneas eléctricas, no les afecta el encendido intermitente y, en la mayoría de los colores cuentan con un alto nivel de fiabilidad y duración. Con respecto al laser, es más barato, de menor tamaño y potencia óptica, la cual es ideal para no dañar el elemento biológico (enzima) del biosensor. Debido a todas estas ventajas que ofrecen con respecto a las demás fuentes de luz, se convierte en idóneas fuentes de luz para el desarrollo del biosensor. Una vez seleccionada la fuente de luz, es necesario utilizar dispositivos electrónicos capaces de detectar y convertir esta señal física en otra señal medible.

### 2.3.2.2 Transductor óptico

El transductor óptico convierte las variaciones de intensidad de la luz (debido a la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito) en una magnitud medible, para ser cuantificada. Este debe tener un amplio intervalo de longitudes de onda, una elevada sensibilidad, buena relación señal/ruido, una respuesta constante, tiempo de respuesta rápido, entre otras características, a continuación se describen algunos.

***Los detectores de fotoconductividad.***- Son los detectores utilizados más para el infrarrojo cercano (NIR). Están constituidos por semiconductores cuyas resistencias disminuyen cuando absorben luz en esa zona del espectro, aunque su intervalo útil de medida puede ampliarse con enfriamiento. Estos semiconductores cristalinos están constituidos por sulfuros, seleniuros o telurios de metales como plomo, cadmio, galio e indio, depositados sobre unas placas de vidrio o cuarzo que constituyen la célula de medida, cerrada herméticamente a vacío [72].

***El fotodiodo.***- Es un diodo cuyo funcionamiento se realiza por vía óptica, consiste en uniones tipo p-n polarizadas inversamente y montadas sobre un chip de silicio. La polarización inversa genera una capa de agotamiento que reduce casi a cero la conductancia de la unión. Al incidir la luz sobre el circuito integrado se generan huecos y electrones en dicha capa, dando lugar a una corriente eléctrica, proporcional a la potencia de la radiación electromagnética. Estos detectores, tienen menor sensibilidad pero trabajan en un rango de entre 190 nm a 1100 nm [73].

***La fotorresistencia o resistencia dependiente de la luz*** (light-dependent resistor, LDR).- Es un componente electrónico cuya resistencia cambia con respecto a la intensidad de luz incidente. Consiste en una célula de sulfuro de cadmio, altamente estable, encapsulada con una resina epoxi transparente, resistente a la humedad. Cuando la LDR no está expuesta a radiaciones luminosas los electrones están firmemente unidos en los átomos que la conforman pero cuando sobre ella inciden radiaciones luminosas esta energía libera electrones con lo cual el material se hace más conductor, y de esta manera disminuye su

resistencia. La respuesta espectral es similar a la del ojo humano. Su nivel de resistencia aumenta cuando el nivel de luz disminuye [74, 75].

Las aplicaciones más comunes son el control de contraste en televisores y monitores, control automático de la iluminación en habitaciones, controles industriales, interruptores, etc. Con un rango de sensibilidad de 10 a 100 lux, la cual se puede calcular de acuerdo a la curva característica de la Figura 5, con la ecuación 2.1.

$$S = \frac{\log R_{40} - \log R_{1000}}{\log E_{100} - \log E_{10}} \quad [2.1]$$

Donde  $R_{100}$ ,  $R_{10}$  son las resistencias a 100 y 10 lux respectivamente, y  $E_{100}$ ,  $E_{10}$  las iluminancias de 100 y 10 lux respectivamente.

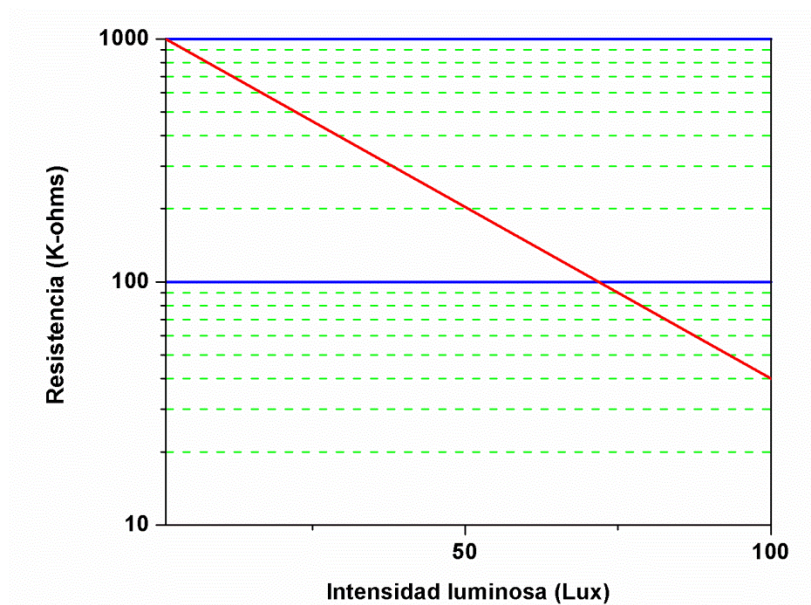


Figura 5. Curva características de la fotorresistencia, luminancia vs resistencia [76].

Una vez vistos los tipos de detectores, considerando que se va a trabajar en la región visible, se requiere una buena sensibilidad, el sistema sea portable y lo menos robusto posible, se optó por trabajar con la fotorresistencia para el desarrollo del biosensor.

Para el proceso de acondicionamiento, la señal obtenida de la interacción analito/enzima para su interpretación, se convierte a voltaje por medio del puente de Wheatstone y para la obtención de un nivel adecuado de la señal, es necesario amplificarla utilizando un amplificador instrumental.

### 2.3.2.3 Puente de Wheatstone

El puente de Wheatstone es un instrumento de gran precisión que puede operar tanto en corriente alterna como continúa, este instrumento puede medir resistencias óhmicas e impedancias como bobinas y condensadores [5]. Para determinar el valor de una resistencia eléctrica bastaría con colocar entre sus extremos un diferencial de potencia y medir la intensidad que pasa por ella, aplicando la ley de Ohm. Esta herramienta permite realizar mediciones con una precisión de resistencia con décimas de Ohms. En la Figura 6 se puede ver el esquemático de un puente de Wheatstone, el cual consiste de cuatro ramas resistivas, una fuente de alimentación y un detector de corriente como el galvanómetro.

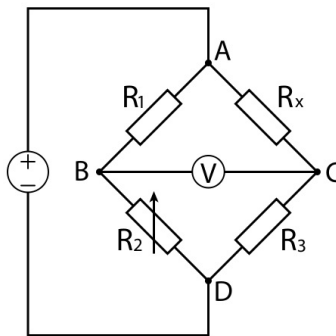


Figura 6. Puente de Wheatstone.

Para realizar el análisis del circuito, se consideran que todas las ramas están formadas por elementos resistivos ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$ ) y las corrientes circulantes ( $I_1$ ,  $I_2$  e  $I_3$ ) como se indican en la Figura 7.

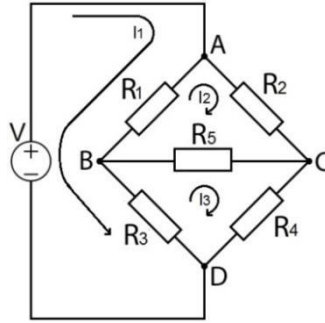


Figura 7. Diagrama para análisis de puente de Wheatstone.

Aplicando las dos leyes de Kirchoff simultáneamente, se obtienen las siguientes expresiones:

$$V - R_1(I_1 - I_2) - R_3(I_1 - I_3) = 0 \quad [2.2]$$

$$R_2 I_2 + R_5(I_2 - I_3) + R_1(I_2 - I_1) = 0 \quad [2.3]$$

$$R_4 I_3 + R_3(I_3 - I_1) + R_5(I_3 - I_2) = 0 \quad [2.4]$$

Resolviendo para las corrientes  $I_2$  e  $I_3$ , utilizando la regla de Cramer, tenemos que:

$$I_2 = \frac{V[R_1(R_3+R_4+R_5)+R_3R_5]}{\Delta} \quad [2.5]$$

$$I_3 = \frac{V[R_3(R_2+R_5+R_1)+R_1R_5]}{\Delta} \quad [2.6]$$

Dado que el puente debe de estar en equilibrio, la corriente que circula por la resistencia  $R_5$  debe ser nula, para lograr esto  $I_2$  tiene que ser igual a  $I_3$ . Por lo tanto igualando y reduciendo algebraicamente, las ecuaciones anteriores de  $I_2$  y  $I_3$ . Encontramos que:

$$\frac{V[R_1(R_3+R_4+R_5)+R_3R_5]}{\Delta} = \frac{V[R_3(R_2+R_5+R_1)+R_1R_5]}{\Delta} \quad [2.7]$$

$$R_1(R_3 + R_4 + R_5) + R_3R_5 = R_3(R_2 + R_5 + R_1) + R_1R_5 \quad [2.8]$$

$$R_1R_4 = R_2R_3 \quad [2.9]$$

$$\frac{R_1}{R_2} = \frac{R_3}{R_4} \quad [2.10]$$

Como se puede observar, independientemente de la tensión aplicada, la relación que existe entre las resistencias no cambia. Si las resistencias de las ramas del puente cumplen la



proporción indicada en la última ecuación, se dice que el puente está en equilibrio, es decir, los potenciales en los puntos B y C son iguales. Si alguna de las resistencias cambia de valor (fotorresistencia), los potenciales se verán afectados, interpretando este cambio de resistencia proporcional a la diferencia de voltajes entre el punto B y C.

#### **2.3.2.4 Amplificador de instrumentación**

El amplificador operacional (A.O.) es un dispositivo electrónico capaz de aumentar señales muy débiles. Este dispositivo tiene dos entradas y una salida. La salida es la diferencia de las dos entradas multiplicada por un factor  $G$  llamado ganancia. Inicialmente los amplificadores operacionales se empleaban para operaciones matemáticas (suma, resta, multiplicación, división, integración, derivación, etc.) en calculadoras analógicas, de ahí su nombre. Los amplificadores operacionales son circuitos integrados de gran aceptación por su diversidad, alto rendimiento y buen nivel de desempeño. Las características de un amplificador operacional ideal son:

- La ganancia en lazo abierto debe ser muy alta, idealmente infinito.
- Su impedancia de entrada debe ser alta, idealmente infinita.
- Su impedancia de salida debe ser baja (idealmente cero).

De estas características se desprenden dos reglas de suma importancia dentro del análisis de circuitos con amplificadores operacionales. Como primera regla, un amplificador retroalimentado el voltaje de entrada diferencial es igual a cero y como segunda regla, la corriente de entrada del amplificador operacional ideal es igual a cero.

Con base en estas dos reglas se puede examinar las diferentes configuraciones de amplificadores operacionales, que se encuentran dentro de dispositivos electrónicos avanzados. Uno de estos es el amplificador de instrumentación, el cual su uso es común principalmente para amplificar señales diferenciales muy pequeñas en muchos procesos industriales, medición y aplicaciones médicas.

Un amplificador de instrumentación es un amplificador diferencial creado a partir de amplificadores operacionales, cuya ganancia puede establecerse de forma muy precisa y que ha sido optimizado para que opere de acuerdo a sus propias especificaciones aún en un entorno hostil. Está diseñado para tener una alta impedancia de entrada y una alta razón de rechazo al modo común. La operación que realiza es la resta de sus dos entradas multiplicada por un factor. La configuración más utilizada como amplificador de instrumentación, está constituida por tres amplificadores operacionales y se suele dividir en dos etapas principales: Etapa pre-amplificación y Etapa diferencial (ver Figura 8).

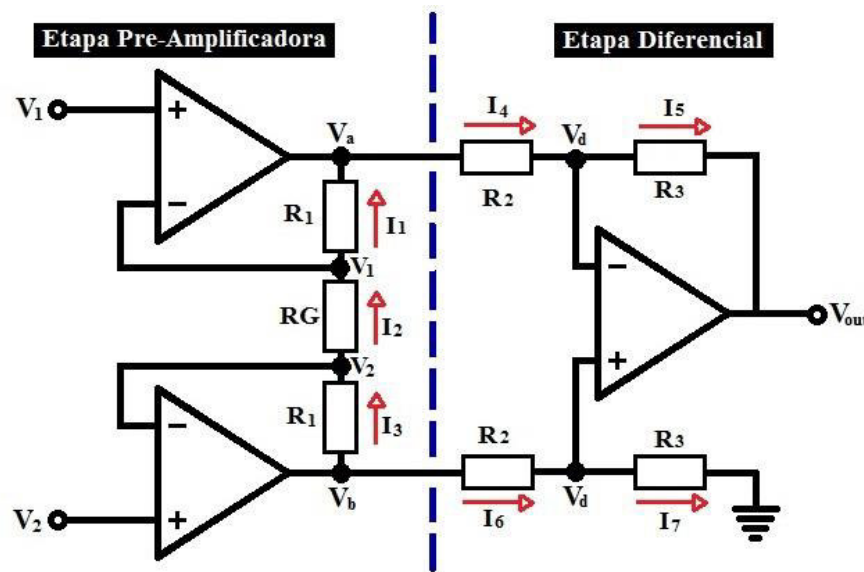


Figura 8. Diagrama interno de un amplificador de instrumentación.

La primera etapa es de pre-amplificación, esta aumenta la impedancia de entrada del conjunto y gracias a su configuración no-inversora, iguala la impedancia del circuito a la del A.O. Analizando esta parte del circuito y suponiendo que los amplificadores operacionales son ideales, se obtienen las siguientes expresiones:

$$I_1 = \frac{V_1 - V_a}{R_1} \quad [2.11]$$

$$I_2 = \frac{V_2 - V_1}{R_G} \quad [2.12]$$

$$I_3 = \frac{V_b - V_2}{R_1} \quad [2.13]$$

Donde  $I_1$  es la corriente generada entre  $V_1$  (señal de entrada) y  $V_a$  (voltaje de salida del primer amplificador),  $I_2$  es la corriente generada entre  $V_2$  (señal de referencia) y  $V_1$ ; e  $I_3$  es la corriente entre  $V_b$  (voltaje de salida del segundo amplificador) y  $V_2$ . Aplicando tanto las reglas de los amplificadores operacionales, como las leyes de Kirchhoff para las corrientes, se tiene que:

$$I_1 = I_2 = I_3 \quad [2.14]$$

De manera que:

$$\frac{V_1 - V_a}{R_1} = \frac{V_2 - V_1}{R_G} = \frac{V_b - V_2}{R_1} \quad [2.15]$$

Resolviendo la ecuación para  $V_a$  y  $V_b$  en función de  $V_1$  y  $V_2$ , además de restar ambas expresiones, se obtiene:

$$V_b - V_a = (V_2 - V_1) \left( 1 + \frac{2R_1}{R_G} \right) \quad [2.16]$$

Observar que el paréntesis representa la ganancia diferencial de la etapa pre-amplificadora, y que, variando la resistencia de ganancia  $R_G$ , se puede variar la ganancia. La segunda etapa es un circuito diferencial, aplicando las leyes de Kirchhoff para su análisis, se obtienen las expresiones de las siguientes corrientes:

$$I_4 = \frac{V_a - V_d}{R_2} \quad [2.17]$$

$$I_5 = \frac{V_d - V_{out}}{R_3} \quad [2.18]$$

$$I_6 = \frac{V_b - V_d}{R_2} \quad [2.19]$$

$$I_7 = \frac{V_d - 0}{R_3} \quad [2.20]$$

Donde  $V_d$  es el voltaje de entrada del tercer amplificador y  $V_{out}$  el voltaje de salida del amplificador instrumental. Aplicando tanto las reglas de los amplificadores operacionales, como las leyes de Kirchhoff para las corrientes, se tiene que:

$$I_4 = I_5 \quad [2.21]$$

$$I_6 = I_7 \quad [2.22]$$

De manera que dichas ecuaciones se pueden escribir de la siguiente forma:

$$\frac{V_a - V_d}{R_2} = \frac{V_d - V_{out}}{R_3} \quad [2.23]$$

$$\frac{V_b - V_d}{R_2} = \frac{V_d - 0}{R_3} \quad [2.24]$$

Se despeja  $V_{out}$  de la primera expresión y  $V_d$  de la segunda, sustituyendo en la primera.

$$V_{out} = \frac{R_3}{R_2} (V_b - V_a) \quad [2.25]$$

Por último, se sustituye la expresión  $(V_b - V_a)$  conseguida en la etapa pre-amplificadora en la ecuación anterior:

$$V_{out} = \frac{R_3}{R_2} (V_2 - V_1) \left( 1 + \frac{2R_1}{R_G} \right) \quad [2.26]$$

Observar que con  $R_G$  se puede ajustar la ganancia. Aun así, hay que tener en cuenta que el ajuste no es lineal, ya que  $R_G$  está en el denominador.

Por otra parte, ante las exigencias de medida que imponen los sensores, estos circuitos deben cumplir los siguientes requisitos generales:

- Ganancia: seleccionable, estable y lineal.
- Entrada diferencial: con una alta razón de rechazo al modo común.
- Error despreciable debido a las corrientes y tensiones de offset.
- Impedancia de entrada alta.
- Impedancia de salida baja.

Dadas estas características, estos dispositivos se emplean en aparatos que trabajan con señales muy débiles, tales como equipos médicos (por ejemplo, el electrocardiógrafo), además, se utilizan para minimizar el error de medida, como parte de circuitos para proporcionar alimentación a corriente constante, en fuentes de alimentación, adquisición de datos y por supuesto para acondicionar la señal de salida de un puente de Wheatstone.

### 2.3.2.5 Procesamiento e interfaz

La mayoría de los instrumentos biomédicos son dispositivos electrónicos y por lo tanto deben tener algún tipo de señal eléctrica como entrada. En otros casos, se utilizará un transductor para convertir un estímulo o parámetro físico no eléctrico, tal como fuerza, presión, temperatura, etc. a una señal eléctrica analógica proporcional al valor o magnitud del parámetro o estímulo original. Para procesar estas señales analógicas por medios digitales es necesario convertirlas a un formato digital es decir, utilizar un convertidor analógico digital (analog-to-digital converter, ADC).

Un convertidor ADC es un dispositivo electrónico capaz de convertir una señal analógica, ya sea de tensión o corriente, en una señal digital mediante un cuantificador y codificándose en muchos casos en un código binario en particular. Donde cada valor numérico binario hace corresponder a un solo valor de tensión o corriente. En la cuantificación de la señal se produce pérdida de la información que no puede ser recuperada en el proceso inverso, es decir, en la conversión de señal digital a analógica y esto es debido a que se truncan los valores entre niveles de cuantificación, mientras mayor cantidad de bits mayor resolución y por lo tanto menor información pérdida. Para evitar las pérdidas se requiere aumenta la resolución del convertidor. Ya que la resolución es el número de bits a utilizar para convertir una señal análoga a una digital, por ejemplo si se tiene un convertidor con una resolución de 3 bits, tenemos  $2^3=8$  divisiones, si se requiere mejorar la resolución se utilizará un convertidor análogo a digital de 16 bits, donde los 16 bits significarán  $2^{16}=65536$  divisiones.

La resolución y el rango de medición del dispositivo determinan cual es el cambio mínimo detectable en la señal de entrada. El error de incertidumbre se define como el cambio mínimo detectable, este se puede calcular con la ecuación 1.27. Entre más pequeño sea el error de incertidumbre, más exactas son las medidas tomadas.

$$Error_{Incertidumbre} = \frac{Rango\ del\ dispositivo}{2^{resolución}} \quad [2.27]$$

Para realizar la interfaz entre este y el usuario una vez obtenida la digitalización del instrumento de medición es necesario, se requiere de una pantalla. La pantalla de cristal líquido (liquid crystal display, LCD) es una pantalla delgada y plana formada por un número de píxeles en color o monocromos colocados delante de una fuente de luz o reflectora, que muestran información o datos de manera muy clara. A menudo se utilizan en dispositivos electrónicos de pilas, ya que utiliza cantidades muy pequeñas de energía eléctrica, como los celulares u ordenadores palm (interfaz gráfica de pantalla táctil), GPS (sistema de posicionamiento global), y en muchos otros aparatos electrónicos como los electrodomésticos o pequeños dispositivos electrónicos portátiles.

### 2.3.3 Óptica

La óptica, es la rama de la física que se encarga de analizar las características y las propiedades de la luz, es decir, la ciencia que estudia los orígenes, la propagación y la detección de la luz, proporcionara el estudio del comportamiento del biosensor de acuerdo a una de sus propiedades ópticas. Los biosensores de fibra óptica se basan en los fenómenos físicos que produce la interacción de la luz sobre un material, como son la transmitancia, reflectancia, dispersión, fluorescencia, etc., ver Figura 9.

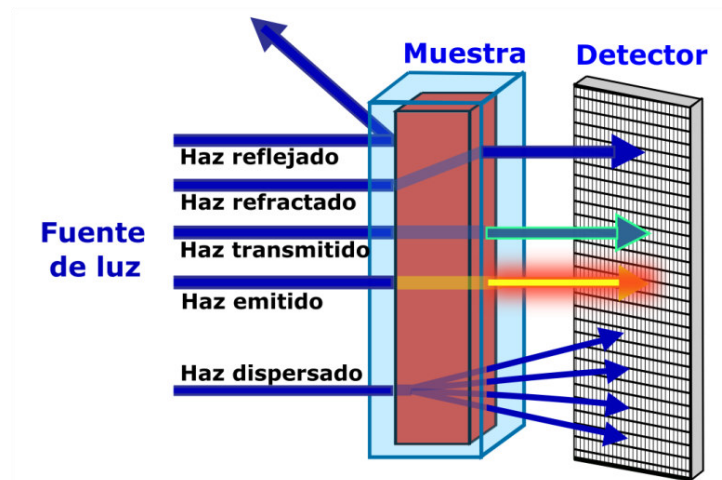


Figura 9. Propiedades ópticas de la luz.

### 2.3.3.1 Propiedades ópticas de la materia

Las propiedades ópticas de la materia tienen que ver con los cambios que sufre la propagación de la luz cuando incide o se propaga a través. Algunos de los fenómenos que son estudiados por la óptica, se explican brevemente a continuación:

**Reflexión.-** Es el cambio que se produce en la dirección de propagación de un rayo de luz, cuando incide en la interface que separa a dos medios, lo que hace que se regrese al medio inicial. Es decir es el ángulo de reflexión formado por el rayo reflejado y la normal, expresándose en grados [77, 78, 79].

**Refracción.-** Es la alteración de dirección cuando un rayo de luz deja un medio y pasa a otro con diferente índice de refracción, originando el cambio de velocidad de propagación de la onda. Es decir, es el ángulo de refracción formado por el rayo refractado y la normal, expresándose en grados [80, 81].

**Difracción.-** Es un fenómeno característico de las ondas que se basa en la desviación de éstas al encontrar un obstáculo o al atravesar una rendija, expresa en candela [82, 83].

**Luminiscencia.-** Es la propiedad que tienen ciertos cuerpos de emitir luz tras haber absorbido energía de otra radiación (principalmente ultravioleta) sin elevar su temperatura [84, 85, 86]. Es decir, es el flujo luminoso por metro cuadrado (lux). La fluorescencia o fosforescencia son un tipo de luminiscencia que poseen algunas sustancias, al reflejar la luz con mayor longitud de onda que la luz de la fuente de excitación luminosa recibida [87]. Según el estado energético de la desactivación de electrones donde se emita el fotón de luz, es fluorescencia o bien fosforescencia (Los tiempos de permanencia de la molécula en el estado excitado son mucho mayores en este). Si la especie excitada se forma en el transcurso de una reacción química el fenómeno se conoce como quimio o bioluminiscencia [88, 89, 90].

**Índice de refracción.-** Es la relación entre la velocidad de propagación de la onda en un medio de referencia y su velocidad en el medio del que se trate ( $n=c/v$ ). Es siempre adimensional y mayor que la unidad, expresada como constante característica de cada medio [27, 91, 92].

**La transmitancia (%T).-** Es la fracción del rayo de luz incidente transmitida fuera de la solución ( $\%T=(I/I_0)*100$ ), es decir, es la cantidad de luz que atraviesa la muestra y se expresa en % de transmitancia [93, 25, 94].

**La absorbancia (A).-** Es la cantidad de luz absorbida por una muestra y se define como la relación logarítmica entre la intensidad de la luz que incide sobre una muestra y la intensidad de esa misma luz que es transmitida a través de esa muestra, es decir, es la cantidad de luz que permanece dentro de la muestra y se expresa como una razón (ley de Lambert Beer,  $A= \log(I_0/I) = -\log(T)$ ).

Debido a que la interacción que ocurre entre el analito y la enzima de reconocimiento, generan un cromógeno con la propiedad óptica de absorber en el espectro visible. Para fines prácticos la concentración del analito se determina vía porcentaje de transmitancia. La cual se medirá por medio de la espectroscopia de absorción o transmitancia.

La espectroscopia de transmitancia o absorción es un método que mide la intensidad de luz después de haber sido transmitida a través de un medio, en cualquier estado gaseoso, líquido o sólido [95]. No existen los medios perfectamente transparentes que permitan a la radiación electromagnética pasar a través de ellos sin ningún tipo de interacción. A parte de las posibles dispersiones que puede sufrir la luz, la materia absorbe energía de alguna zona del espectro dependiendo de la naturaleza del medio transmisor [96]. El empleo de fibras ópticas hizo posible que varios fenómenos ópticos distintos pudieran combinarse para la transducción de la señal proveniente del elemento de reconocimiento, dando lugar a los denominados optrodos. Los sensores de fibra óptica utilizan a menudo los métodos luminiscentes debido a la gran sensibilidad y selectividad pero ya que están limitados a un número de especies capaces de emitir luminiscencia, los basados en absorción de luz son



más utilizados [97]. En la Figura 10 se muestra la forma en la que se mide la absorbancia y la luminiscencia, con respecto a la colocación de la fuente de luz y el detector.

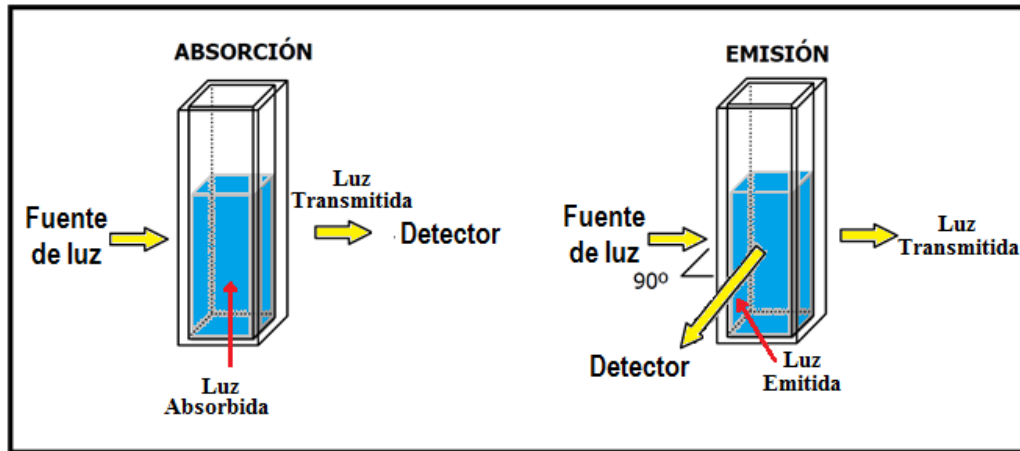


Figura 10. Forma de medir absorbancia y luminiscencia.

### 2.3.3.2 Guía de onda

Una guía de onda es cualquier estructura física que guía ondas electromagnéticas (luz visible, ondas de radio, televisión, telefonía, etc). Las guías de onda se basan en el confinamiento de la luz, efecto que se logra mediante el uso de dos medios con índice de refracción diferente. El medio con índice de refracción mayor (núcleo) se embebe en el medio con índice de refracción menor (revestimiento o cubierta); la luz queda confinada en el medio el núcleo debido a reflexión total interna [98]. La geometría de las guías de onda puede ser plana (slab, strip) o cilíndrica, siendo esta última la más utilizada (fibras ópticas), ver la Figura 11.

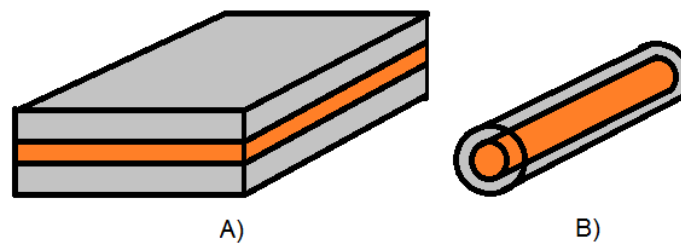


Figura 11. Guía de ondas ópticas.

Las aplicaciones de este tipo de elementos van desde el desarrollo de sistemas que permitan llevar la luz a lugares de difícil acceso, hasta el desarrollo de dispositivos ópticos miniaturizados (sensores) y opto electrónicos que requieran confinar un haz de luz para

realizar una función definida. De acuerdo al concepto anterior, podemos definir las fibras ópticas como guías de ondas cilíndricas (ver Figura 12).

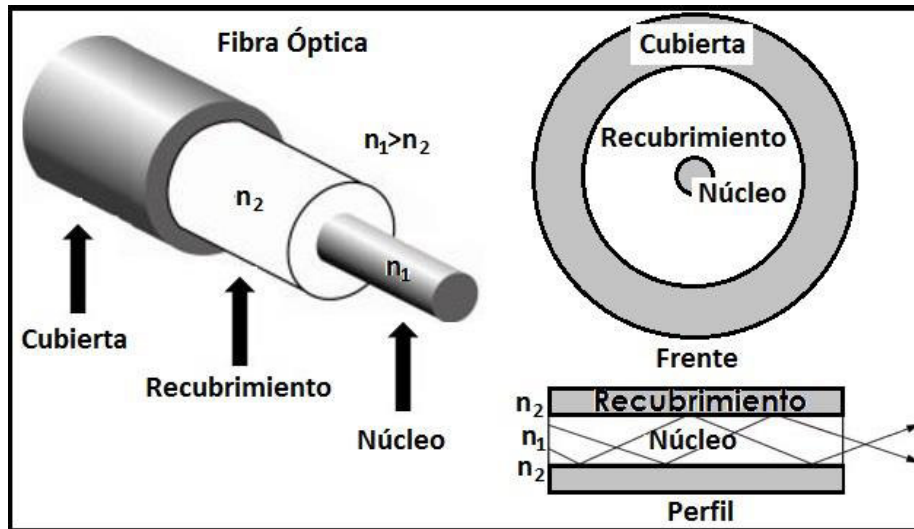


Figura 12. Fibra Óptica.

La principal ventaja de las guías cilíndricas a las planas es que tiene dos dimensiones. Por lo cual realizaremos los optrodos con esta guía cilíndrica, ya que además mediante análisis de óptica de rayos se puede obtener las condiciones bajo las cuales se propaga un haz de luz dentro de una fibra óptica. Como en las guías de onda dieléctricas, la condición de propagación se establece mediante la reflexión total interna. Así, en los optrodos puede llegar a éste a través de una única fibra, una fibra doble o un haz de fibras [99], ver configuraciones en la Figura 13. Debido a que el análisis es vía espectroscopia de absorción utilizaremos la configuración de fibra única con sentido único.

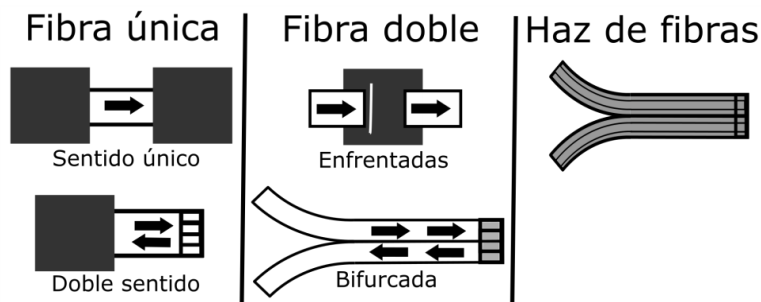


Figura 13. Configuración de fibra óptica terminal de optrodos.

### 2.3.4 Química

Los procesos químicos son operaciones químicas o físicas que derivan en la modificación de una sustancia, a partir de un cambio de estado, de composición o de otras condiciones. Obteniendo al final otra sustancia cuyas propiedades o funcionalidad, han cambiado. Un proceso químico dentro del biosensor a desarrollar es el método de inmovilización de las enzimas de colesterol dentro de una membrana, por medio del proceso sol-gel. El cual es inerte, característica importante para no afectar el principal proceso químico, que es la interacción de la enzima inmovilizada con el analito, proceso en el cual las propiedades ópticas cambien y con ello se puede realizar la cuantificación del analito.

#### 2.3.4.1 Proceso de inmovilización

Este proceso consiste en el confinamiento físico de una enzima o célula en una determinada región (soporte/matriz) no esencial para su actividad, de manera que se retiene su actividad catalítica y pueda reutilizarse continuamente. Un soporte para inmovilización debe tener la mayoría de las siguientes propiedades:

- Elevada resistencia mecánica, química y biológica
- Insolubilidad
- Hidrofilicidad
- Elevada razón área/volumen
- Regenerabilidad
- Bajo costo

Los tipos de soporte para realizar el confinamiento del elemento biológico son:

**Inorgánicos.-** Los soportes inorgánicos tienen mayor resistencia, mayor regenerabilidad y propiedades físicas controlables (porosidad).

- Naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.)
- Materiales manufacturados (óxidos de metales, vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.)

*Orgánicos.*- Estos soportes presentan buena relación área/volumen, flexibilidad en su configuración y bajo costo en algunos casos.

- Polímeros naturales
  - polisacáridos (almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, chitosan, etc).
  - proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc).
  - Biológicos (celulosa, quitosano, etc.)
  
- Polímeros sintéticos: divididos en:
  - Poliolefinas (como el poliestireno)
  - Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.)
  - Otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc).

Para llevar a cabo la inmovilización, se tiene que tomar en cuenta los siguientes aspectos: Costo de la enzima, Grado de purificación requerido de la enzima, costo del proceso, estabilidad de la enzima, efectos de inhibición y envenenamiento.

Las ventajas que otorga este tipo de proceso se pueden destacar el aumento de la estabilidad de la enzima, la posible reutilización del derivado, el cual disminuye los costos, uso repetitivo del catalizador, alta estabilidad y resistencia al esfuerzo cortante y a la contaminación. Sin embargo también tiene su parte de inconvenientes como la alteración de la conformación de la enzima, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte, pérdida de actividad de la enzima durante la etapa de inmovilización.

Para el desarrollo del biosensor, puesto que se trabajara con la guía de onda cilíndrica (fibra óptica) esta misma servirá como soporte, además de proporcionar flexibilidad y bajo costo.

### 2.3.4.2 Métodos de inmovilización

La inmovilización del material biológico es un proceso mediante el que se confina el bioreceptor (elemento biológico que interactúan con moléculas o productos para producir cambios en la función del organismo) sobre el optrodo, para dar formas solubles que retienen su actividad. Es el proceso más importante en la construcción del biosensor, ya que las características de sensibilidad y tiempo de vida dependen del método utilizado.

En general, los métodos de inmovilización para elementos biológicos, se clasifican en dos grandes grupos; Retención física (atrapamiento, encapsulamiento) y unión química (adsorción, unión covalente y entrecruzamiento), ver Figura 14. Los de retención física en principio son reversibles y unen el soporte al indicador a través de fuerzas electrostáticas, de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, etc. Y en los de retención química la unión soporte e indicador es por medio de enlaces moleculares, lo cual los hace más idóneos para la elaboración de optrodos. Sin embargo, los reactivos y las matrices poliméricas no siempre poseen en su estructura grupos funcionales que faciliten el enlace [100, 101].

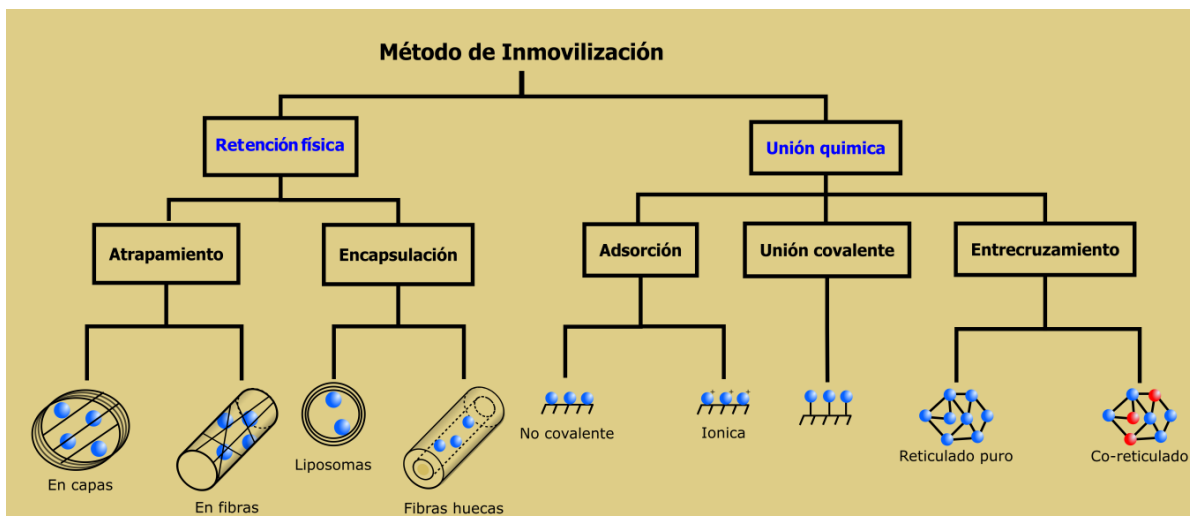


Figura 14. Métodos de inmovilización.

A continuación se realiza breve explicación de las técnicas convencionales para la inmovilización de bioreceptores.

**El método de inmovilización de adsorción.-** Es un proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de un material (interfase). La adsorción es el proceso mediante el cual un sólido poroso (a nivel microscópico) es capaz de retener partículas de un fluido o gas en su superficie tras entrar en contacto con éste, sin existir una penetración física de una fase en la otra. Existen dos tipos la adsorción, física (fuerzas de van der Waals,  $\Delta H \sim 20$  KJ/mol, reversible, formación de multicapas) y química (atracción entre iones opuestos o covalentes,  $\Delta H \sim 200$  KJ/mol, irreversible formación de monocapas) [102]. Esta técnica es de fácil preparación, bajo costo, tiene el inconveniente de que los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánica, la unión al soporte es débil y sólo se puede monitorear la reacción en periodos cortos. También tiene una alta tasa de fuga del biocatalizador, enlace inestable, no es posible controlar lo anterior y por lo tanto tiene un índice de reproducibilidad bajo.

La adsorción se define como un fenómeno superficial que involucra la acumulación de una sustancia en una superficie o interface. Las fuerzas intermoleculares desequilibradas que existen en la superficie de un sólido como el carbón activado, provocan la atracción o repulsión de las moléculas que se encuentran en la interfase entre una solución líquida y la superficie de un sólido. De esta forma las moléculas que tienen cierta afinidad por el sólido se acumulan en la superficie del sólido y a este fenómeno se le conoce como adsorción.

La adsorción física es un fenómeno reversible, que resulta de las fuerzas intermoleculares de atracción débiles tipo Van der Waals entre los complejos de la superficie del sólido y las moléculas del compuesto que se adsorbe (adsorbato). Las moléculas no se adsorben sobre un sitio específico en la superficie y se pueden mover libremente en la interfase. Esta adsorción ocurre a bajas temperaturas y se caracteriza por ser exotérmica con un calor de adsorción muy similar al calor latente de condensación/evaporación.

La adsorción química se debe a una interacción química entre los complejos superficiales específicos del adsorbente y las moléculas del adsorbato, se caracteriza porque generalmente ocurre a altas temperaturas ( $>200^\circ\text{C}$ ); involucra enlaces químicos y por lo general, es irreversible; el calor de adsorción es alto y muy similar al calor de una reacción

química. Además, este tipo de adsorción es muy específica ya que ocurre solamente sobre cierto tipo de sitios activos de la superficie del adsorbente.

Los principales factores que influyen en la adsorción, son:

- El pH del medio: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido.
- La fuerza iónica: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína;
- El diámetro de poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima;
- La presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado.

**La técnica de atrapamiento.**- Se basa en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por pre-polímeros o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, etc. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras. Esta inmovilización es sencilla, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos, además, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. Sin embargo, este proceso requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, para que el tamaño del poro sea suficientemente grande para permitir la entrada del analito pero sin que se produzca el lavado de la sonda, así como la baja reproducibilidad en la fabricación de los terminales.

**La inmovilización por unión covalente.**- Consiste en el entrecruzamiento de la enzima y el material del soporte produciendo un enlace fuerte y estable. La unión es normalmente formada entre los grupos funcionales presentes en la superficie del soporte y los grupos funcionales pertenecientes a los residuos de aminoácidos en la superficie de la enzima. Los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina

y el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente. Este método tiene la ventaja de que la manipulación de los derivados inmovilizados es la forma más adecuada y sencilla para evitar el lavado de la sonda, es decir, la carga de enzima permanece constante después de la inmovilización.

Esta inmovilización también presenta una serie de inconvenientes, como es conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos, el proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo y por último la inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc. Esta unión requiere la presencia de grupos funcionales adecuados en el polímero inmovilizador como en el indicador, por lo que no siempre es factible.

**La inmovilización por medio del entrecruzamiento o reticulado (cross-linking).**- Se debe a la formación de una gran estructura tridimensional compleja entre las mismas moléculas de la enzima por medios físicos o químicos. Por lo general en los métodos químicos se forman enlaces de unión covalente empleando ciertos agentes como el glutaraldehído, ácido dicarboxílico, etc. Por métodos físicos se utilizan agentes floculantes como poliaminas, polietilenamina, sulfonatos de poliestireno, fosfatos, etc. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

Las aplicaciones más importantes de las enzimas inmovilizadas se pueden clasificar en:

- Aplicaciones analíticas: biosensores
- Aplicaciones médicas: tratamientos con enzimas inmovilizadas
- Aplicaciones industriales: en la industria química, farmacéutica, alimentaria y de tratamiento de residuos.



En la Tabla 3, se puede apreciar algunos ejemplos de los distintos métodos de inmovilización en biosensores. De entre todas estas variedades de técnicas de inmovilización empleadas, usaremos el método de sol-gel dado que tiene la ventaja de que es un material que tiene gran estabilidad, es decir, no cambia o no se deteriora. Tiene una alta no toxicidad, ya que es un material poroso permite la incorporación del elemento biológico.

Tabla 3. Ejemplos de métodos de inmovilización

<b>Método</b>	<b>Ejemplo</b>	<b>Referencias</b>
Atrapamiento	Avidin/streptavidin, oligonucleótidos-protein fusions, materiales biocatalíticos, silicones/silicatos/sol-gel	[21] [103] [104] [8] [105]
Encapsulación	Geles poliméricos, liposomas, otras bicapas	[106] [107] [108]
Adsorción	Intercambio iónico, hidrofobicidad	[109] [110] [111] [112]
Unión covalente	Glutaraldehido, ácidos cíclicos, Carbodimidias	[113] [114] [115]
Entrecruzamiento	Hydrogel, polímeros de geles	[116] [117] [11]

Una vez realizada la inmovilización esta puede ocasionar cambios significativos en el comportamiento de las enzimas, es decir, la actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse por diversas razones. Uno de estos cambios se ve alterado por factores de tipo difusión (proceso físico irreversible), estérico (impedimento de una reacción química debido a una molécula) y del entorno, debido a los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.). Por ejemplo la unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido, los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima, la inmovilización puede originar un cambio estructural que da lugar a una forma inactiva, las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

La técnica de inmovilización implementada es la de atrapamiento, debido a que la retención física no altera la estructura de la enzima a encapsular, se puede atrapar en soportes como la fibra óptica y además la matriz generada es porosa, con lo cual se logra la interacción del analito y el elemento de reconocimiento.

#### **2.3.4.3 Técnica sol-gel**

Uno de los métodos de inmovilización más utilizados para la construcción de optrodos en los últimos años es el de sol-gel. Estos vidrios porosos de sílice, obtenidos a partir de la hidrólisis y condensación de tetraalcoxisilanos ( $\text{Si}(\text{OR})_4$ ) en disoluciones hidroalcohólicas, permiten el atrapamiento en su interior de moléculas indicadoras [118, 119].

La técnica sol-gel se dio a conocer en 1846, por Ebelmen con la síntesis de gel de sílice [120]. Posteriormente en 1864 Graham funda la ciencia de los coloides [121]. El estudio de soles cerámicos coloidales se incrementó, estudiando los factores que influyen en su formación. En 1931, el secado hipercrítico para la obtención de aerogeles es introducido por Kistler [122]. En 1956 el tamaño de partícula pudo controlarse a través de sales inorgánicas [123]. Desde 1970, el número de publicaciones en geles y coloides, aumentó debido al interés en aplicaciones de cerámicos de alta tecnología, hasta llegar al uso de la técnica sol-gel para la creación de biosensores.

Avances recientes en la tecnología de cerámicas han hecho posible moldear la sílice y otros óxidos metálicos a temperatura ambiente, mediante la técnica sol-gel, y además, se ha demostrado la posibilidad de atrapar compuestos orgánicos en matrices inorgánicas al introducir el compuesto deseado con los precursores del sol-gel [124]. Esta técnica se ha extendido también a compuestos biológicos.

La técnica sol-gel permite la síntesis de cerámicas homogéneas tanto de grano fino como de grano grueso y ofrece control de pureza química y cristalina [125]. Dicho proceso también permite, a partir del gel, la preparación de productos en diversas formas físicas tales como fibras ópticas, revestimientos, aislamiento térmico, sensores químicos, membranas de cerámica, abrasivos, selladores y rellenos dentales [126]. Ver Figura 15.



Figura 15. Técnica sol-gel para sintetizar diferentes productos.

Este método de inmovilización tiene los siguientes beneficios o ventajas:

- Bajo costo
- Baja temperatura de proceso
- Control de heterogeneidad, sobre impurezas y de cristalinidad
- Preparación de cerámicas de grano fino o grueso
- Obtención de especies ópticamente limpias
- Elevado rendimiento
- Simplicidad de proceso
- Mínima infraestructura necesaria
- Gran versatilidad
- Mínima generación de residuos
- Manufactura de piezas de formas especiales sin la utilización de maquinaria

Sin embargo este método también tiene sus desventajas o factores que pueden ocasionar inconvenientes al momento de su uso, como son:

- Drástico encogimiento en el secado, provocando la aparición de microfisuras.
- Largo tiempo de duración de la etapa de hidrólisis.
- Gran cantidad de solvente utilizado.
- Desprendimiento de agua formada en la policondensación.
- Dificil control de la porosidad.

Aún con estos pequeños inconvenientes, los cuales se pueden controlar, las ventajas son enormes adicionando que la estructura que se tiene es inerte, es ideal para el desarrollo del biosensores.

#### **2.3.4.4 Proceso de la técnica sol-gel**

La técnica sol-gel permite obtener un compuesto sólido a partir de una solución líquida. Recibe este nombre debido a que durante el proceso se lleva el cambio de un sol (partículas sólidas muy finas dispersa en un líquido) a un gel mediante la condensación del sol. El desarrollo de la técnica sol-gel ha sido enfocado hacia la obtención de óxidos, es un método donde uno o varios elementos son usados en la forma de sol y/o gel, con el fin de obtener un sólido homogéneo, principalmente policristalino amorfo.

En términos generales, el proceso de formación de un material sol-gel empieza con la hidrólisis de un precursor líquido (sol) y al condensarse gradualmente produce un gel (Figura 16). Este gel es un sistema coloidal bifásico, ya que contiene una fase líquida (solvente) y una sólida (la red del polímero porosa). Posteriormente la proporción del líquido es reducida, para entallar las propiedades materiales del sólido [127, 128]. Un desarrollo más descriptivo de esta técnica se describe a continuación con cada uno de las siguientes etapas.

**Sol.-** Se lleva a cabo la suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido.

**Hidrólisis.-** Se lleva a cabo la descomposición de sustancias orgánicas e inorgánicas complejas por acción de agua.

**Condensación.-** Comienza antes de finalizar la hidrólisis.

Los procesos de hidrólisis y condensación pueden llevarse a cabo a través de catalizadores en un medio ácido o básico. En medio ácido la hidrólisis es más lenta, formando cadenas lineales ocasionalmente entrecruzadas, pero en una catálisis básica la hidrólisis es rápida,

generando esqueletos de sílice. En ambos casos, la interconexión de enlaces  $\text{Si}_2\text{O}$  forman partículas coloidales, que con el tiempo se transforman en redes tridimensionales.

**Gelificación.-** Las reacciones de hidrólisis y condensación del proceso anterior, conducen a la formación de agregados (grupos), que se enlazan hasta formar un único conjunto gigante denominado gel. En el momento de formación de gel hay muchos grupos en el sol que se unen entre sí para formar una red sólida, responsable de la elasticidad, y ocurre un cambio abrupto de la viscosidad.

**Envejecimiento.-** Luego de la gelificación el sistema continúa reaccionando, produciendo cambios químicos y estructurales, mediante acoplamientos covalentes y evolución estructural con cambios en el tamaño de los poros y las fuerzas de las paredes de dichos poros.

**Polimerización.-** Es el proceso químico por el cual, mediante calor, la luz o un catalizador se unen varias moléculas de un compuesto para formar una cadena de múltiples eslabones de estas y obtener una macromolécula. Durante este proceso, aumenta la interconexión del esqueleto sólido, en consecuencia aumenta la densidad y la resistencia mecánica del sólido.

**Síntesis.-** Es la contracción del esqueleto sólido del gel, acompañada de la expulsión de la fase líquida contenida en los poros.

**Crecimiento.-** Este proceso se debe a la disolución y precipitación producida por la diferencia de solubilidad entre las partículas.

**Secado y tratamiento térmico.-** El secado en la fase líquida, constituye la mayor parte (70-90%) del volumen del gel húmedo y cuando ésta se evapora se observa una contracción acompañada de endurecimiento del gel. Esto se traduce en la pérdida de agua, alcohol y otros componentes volátiles. Cuando el proceso de secado para la eliminación del disolvente es por evaporación se obtienen xerogeles y por condiciones supercrítica se originan aergeles.

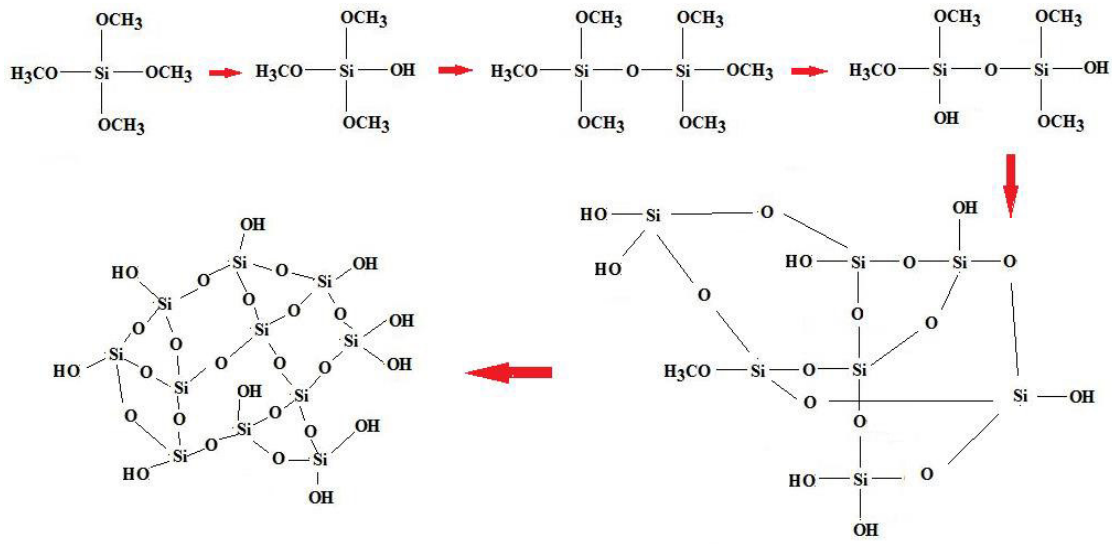


Figura 16. Proceso de formación de un material sol-gel.

Algunos inconvenientes es que el sol-gel tiene tendencia a agrietarse durante las primeras etapas de formación, debido a las tensiones originadas en la interfase sólido-líquidos [129]. Para evitar esto se pueden añadir agentes químicos que modifiquen la tensión superficial del líquido. Por otro lado, el tamaño del poro depende de la temperatura del proceso de elaboración del sol-gel. A mayor temperatura se obtienen vidrios no porosos, mientras que al contrario al disminuir la temperatura el tamaño de poro aumenta. También presentan una baja reproducibilidad, tanto en las medidas como en la construcción del terminal sensible, además de la disminución del tiempo de vida útil, ya que con el tiempo se van cerrando sus poros impidiendo el acceso del analito hasta el elemento de reconocimiento.

### 2.3.5 Dispositivos de análisis y caracterización

Para fortalecer o certificar los resultados obtenidos del sistema, se utilizan herramientas de análisis, como lo son el microscopio óptico, el microscopio electrónico de barrido, el analizador de espectros ópticos y espectroscopio infrarrojo por transformada de Fourier, los cuales otorgan información de alta calidad.

### 2.3.5.1 Microscopio óptico

El microscopio óptico (Motic BA310, trinocular), mostrado en la Figura 17, es un instrumento óptico que amplifica la imagen de un objeto pequeño o no visible a simple vista. Mediante un sistema de lentes que manipula el paso de los rayos de luz entre el objeto y los ojos, se puede hacer visible un objeto microscópico. Los microscopios pueden aumentar de 100 a cientos de miles de veces el tamaño original.



Figura 17. Microscopio óptico.

Este instrumento ha sido de gran utilidad, sobre todo en los campos de la ciencia en donde la estructura y la organización microscópica es importante, incorporándose con éxito a investigaciones dentro del área de la química (en el estudio de cristales), la física (en la investigación de las propiedades físicas de los materiales), la geología (en el análisis de la composición mineralógica y textural de las rocas) y, por supuesto, en el campo de la biología (en el estudio de estructuras microscópicas de la materia viva), entre otras.

### 2.3.5.2 Analizador de espectros óptico

El analizador de espectros óptico OSA (HR4000CG-UV-NIR, ocean optics), mostrado en la Figura 18, es un instrumento de análisis, que se utilizan para realizar medidas de potencia óptica en función de la longitud de onda. Su principal aplicación es la caracterización de fuentes de luz (LED, láser, LD) en cuanto a su distribución de potencia y pureza espectral (anchura espectral); así como la medida de la característica en transmisión de componentes ópticos pasivos. Además de estas aplicaciones, también se utiliza para la medición y monitoreo agrícolas, análisis de calidad (alimentos, aire, agua, etc.), diagnóstico médico, entre otros.



Figura 18. Analizador de espectro óptico.

Este dispositivo electrónico se aplicara, para llevar a cabo la caracterización de la fuente de luz del biosensor. El parámetro característico que se van a determinar a partir de la medida del espectro de emisión del LED será, la longitud de onda en el pico de emisión, es decir, la longitud de onda a la cual se produce el pico del espectro del LED.

Otro factor importante para el uso de este instrumento, es que proporciona la caracterización de los componentes pasivos, que se realiza mediante el modo de operación estímulo-respuesta, es decir, se excita el dispositivo a caracterizar mediante el espectro de emisión de una fuente de luz y se mide su característica de transmisión en potencia. La medida lógicamente dependerá de la fuente de luz utilizada por lo que deberá ser normalizada.

### 2.3.5.3 Espectroscopía IR por transformada de Fourier

El espectroscopio infrarrojo por transformada de Fourier FTIR (IRPrestige-21, Shimadzu), mostrado en la Figura 19, es un dispositivo que se utiliza para obtener un espectro infrarrojo de absorción o emisión de un sólido, líquido o gas. Este espectrómetro FTIR recoge simultáneamente datos espectrales de alta resolución en un amplio intervalo espectral de  $900\text{-}5000\text{ cm}^{-1}$ . Esta técnica proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas, por lo cual es posible realizar una identificación de los materiales.





Figura 19. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.

El funcionamiento esencial de este instrumento, consiste en hacer que la radiación IR pase a través de una muestra, parte de la radiación infrarroja es absorbida por la muestra y parte de ella la traspasa. El espectro resultante representa la absorción molecular y la transmisión, es decir, la creación de una huella digital molecular de la muestra. Al igual que la huella dactilar de las personas, no hay dos estructuras moleculares únicas, que producen el mismo espectro infrarrojo. Esto hace que la espectroscopia infrarroja útil para varios tipos de análisis, como lo son:

- Identificar materiales desconocidos.
- Determinar la calidad o la consistencia de una muestra.
- Determinar la cantidad de componentes de una mezcla.

Algunas de las ventajas de FTIR son la velocidad debido a que todas las frecuencias se miden al mismo tiempo y la sensibilidad tanto porque los detectores empleados son mucho más sensibles, como por el rendimiento óptico que es mucho más alto (niveles de ruido mucho más bajos). Por lo tanto, una técnica muy fiable para identificación de cualquier muestra. La sensibilidad permite la identificación del más pequeño de los contaminantes. Por lo cual el FTIR es una herramienta invaluable para garantía de calidad.

**2.3.5.4 Microscopio de fuerza atómica**

El microscopio de fuerza atómica AFM (dimension 3000, digital instruments/veeco), mostrado en la Figura 20, es un dispositivo que proporciona imágenes tridimensionales que permiten cuantificar la profundidad y morfología de las muestras, mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica [130]. La formación de imágenes de fase muestra la homogeneidad del recubrimiento sin tener en cuenta la rugosidad de la superficie original de alúmina. Esto no se puede ver desde la formación de imágenes de altura.

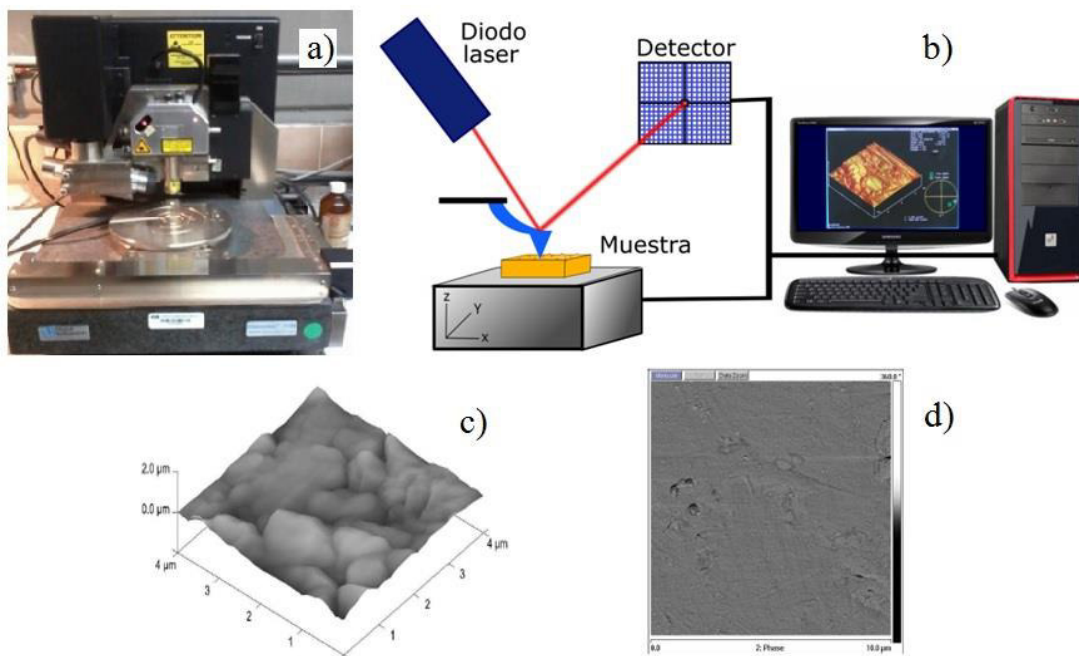


Figura 20. a) AFM, b) Elementos y análisis: c) morfológico y d) contraste de fases.

Los parámetros de rugosidad más usada en ingeniería son la rugosidad promedio  $R_a$  y la rugosidad  $R_{rms}$ . La  $R_a$  es el promedio aritmético de los valores absolutos de las alturas  $y(x)$  medidas a partir de la línea central. Matemáticamente se define como:

$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L |y(x)| dx \tag{2.28}$$

Donde L es la longitud de muestreo. A su vez  $R_{rms}$  se define como:

$$R_a = \sqrt{\frac{1}{L} \int_0^L |y(x)|^2 dx} \tag{2.29}$$

Donde  $R_{\text{rms}}$  representa el promedio de las desviaciones cuadráticas respecto a la altura media, es la desviación estándar de la distribución estática de la varianza o segundo momento respecto a la media.

### 2.3.5.5 Microscopio Electrónico de Barrido

El microscopio electrónico de barrido SEM (Sigma HD VP, Zeiss) mostrado en la Figura 21, es un dispositivo no destructivo que permite el estudio de superficies a alta resolución mediante imagen [131]. Así como determinar paralelamente, mediante microanálisis de emisión de líneas rayos X, (ver Apéndice A), los elementos químicos presentes en la muestra, cuantificarlos y plasmar en la imagen la distribución de los mismos en la superficie de la muestra [132].



Figura 21. Microscopio Electrónico de Barrido.

En este capítulo, se presentó un resumen acerca de los sensores, biosensores y como están conformados. De forma complementaria se muestran los aspectos importantes a considerar para el desarrollo del biosensor, como lo son la estructura, los métodos para su elaboración, la instrumentación, los dispositivos ópticos y electrónicos para su procesamiento, adicionando los dispositivos de análisis que nos servirán de apoyo para la caracterización de los optrodos. Con la ayuda de esto, en el capítulo siguiente, se realizan el desarrollo de los optrodos, por medio de los dos métodos de deposición de la enzima aplicando la técnica de inmovilización de sol-gel, realizándoles estudios de morfología, rugosidad superficial y caracterización de curvas, para analizar que método de deposición es el más adecuado para el desarrollo del biosensor.

### 3. Análisis y caracterización del sistema

Aplicando los conocimientos del capítulo anterior, en este capítulo se presenta el desarrollo de los optrodos, inmovilizando la enzima por medio de los dos métodos de deposición propuestos, utilizando la metodología de la técnica de inmovilización de sol-gel. Sometiendo los optrodos realizados por ambos métodos de deposición a pruebas de análisis y caracterización para evaluar cual método es el adecuado para el desarrollo del biosensor.

#### 3.1 Reactivos para la técnica de inmovilización de sol-gel.

Todas las soluciones se prepararon utilizando reactivos de calidad analítica sin purificación adicional. Los reactivos utilizados son: El alcohol etílico (96%, impurezas  $\leq 0.005\%$  acidas como  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) y agua destilada adquiridos en Karal (México), El Tetraetilortosilicato (TEOS) grado 98%, ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) y el nafiión (tetrafluoretileno sulfonatado basado en un fluorpolímero-copolímero [133, 134]) comprados en Sigma-Aldrich (Alemania) y el reactivo de colesterol enzimático de Stanbio-Labs (EUA, Ref. 1011) [135, 136].

#### 3.2 Metodología

En la fabricación de optrodo, se utilizó la técnica de sol-gel para realizar la inmovilización de la enzima de colesterol en el extremo de la fibra óptica, la cual queda confinada dentro de la estructura del gel (Figura 22). Este método de sol-gel es un gran valor por ser una alternativa tecnológica inerte.

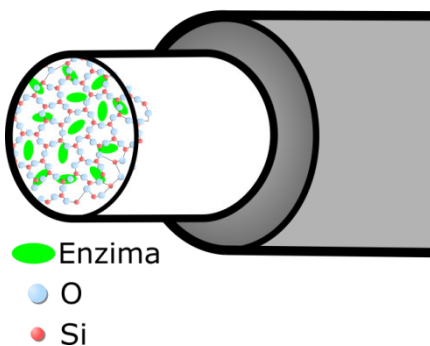


Figura 22. Enzima de colesterol encapsulada dentro la estructura del sol-gel.

### 3.2.1 Preparación del material sol-gel/colesterol

Una solución base de sol-gel se preparó mezclando 1 ml de TEOS, 0.5 ml de etanol y 0.78 ml del reactivo de colesterol enzimático respectivamente (estas cantidades se determinaron por medio estudios realizados, utilizando las que mejor resultado nos entregaron), en un vaso precipitado con un volumen de 25 ml, la solución se mezcló a 250 rpm con un agitador magnético a temperatura constante de 55°C por 15 min. Posteriormente, se añadieron 0.2 ml de agua destilada, 0.1 ml de nafión (como protección para disminuir la degradación de la enzima) y 5µl de ácido nítrico, a las mismas condiciones durante 15 min. Finalmente, la solución se deja enfriar hasta temperatura ambiente, ver Figura 23.

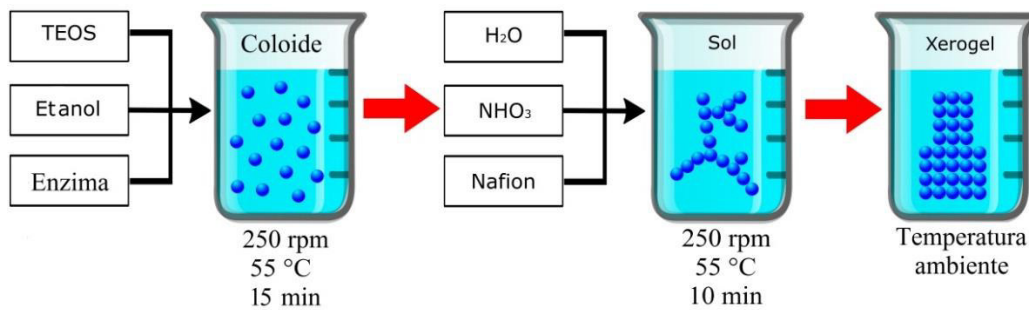


Figura 23. Síntesis del material sol-gel/colesterol.

### 3.3 Proceso de elaboración de optrodos

La preparación del optrodo en forma resumida es la siguiente: como soporte se seleccionó una fibra óptica plástica (Thorlabs FP600URT) con un diámetro de 600 µm del núcleo y 630 µm de revestimiento, una apertura numérica de 0.50 y material del núcleo/revestimiento de sílice puro/polímero duro. Primero, se corta la fibra 1.5 cm de longitud usando una navaja de rasurar, realizando un corte vertical; luego se retira 0.5 cm de recubrimiento de un extremo de la fibra, enseguida se pule para tener una superficie más uniforme (plano) sin rayones, después, se limpia con acetona y agua destilada. Posteriormente, se activan los grupos de OH de la superficie de la fibra limpiándola con ácido nítrico para una mejor adhesión de la película de sol-gel. Finalmente, la solución base de sol-gel se depositó en el extremo de la fibra (ver Figura 24) con su respectivo método de deposición.

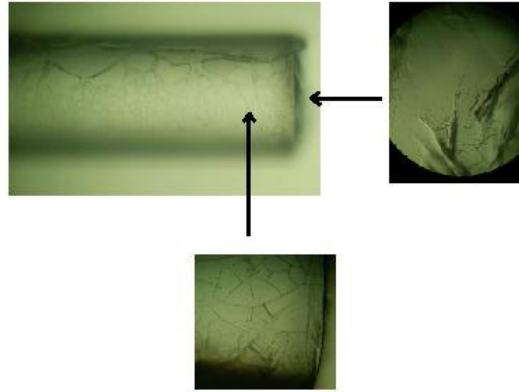


Figura 24. Fibra preparada.

### 3.3.1 Métodos de deposición

La deposición de la película de sol-gel/colesterol sobre el extremo de la fibra, se lleva a cabo por dos métodos (Figura 25), el primero consiste en la deposición de la película por el proceso de inmersión-emersión de un sustrato a partir de una solución acuosa, utilizando el Dip-coating (Model DC-mono, NIMA technology) [135, 136, 137, 138]. Este equipo puede controlar el espesor y la uniformidad de la deposición de la película, con diferentes parámetros como el número de inmersiones, tiempo de espera (dentro/ fuera de la solución sol/gel), velocidad de movimiento, etc. En cambio, en el segundo método simplemente se deja sumergida la fibra óptica dentro de la solución de sol-gel, esperando al que solvente (etanol y agua) de la mezcla se evapore y se logre la deposición [139]. Después de la deposición de cada método, el optrodo se deja secar durante una semana a temperatura ambiente.

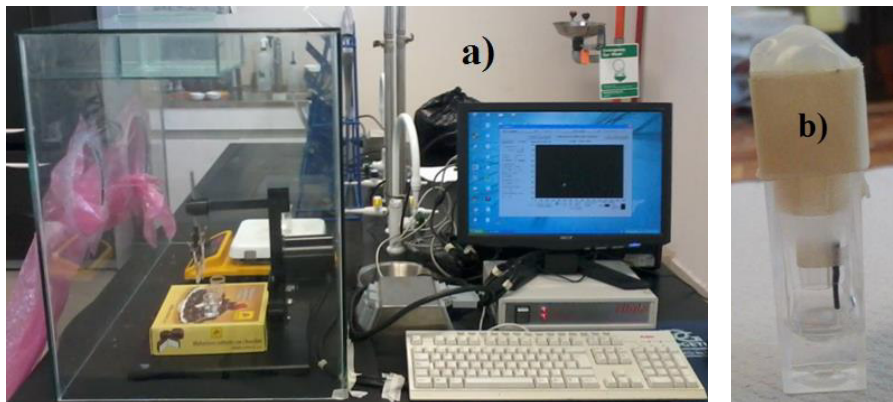


Figura 25. Métodos de deposición: a) Dip-coating y b) Immerse.

### 3.4 Análisis del encapsulamiento de la enzima de colesterol

La determinación de los grupos funcionales de las películas de sol-gel se realizó con la ayuda de un espectro FTIR (IRPrestige-21, Shimadzu). En la Figura 26 se pueden apreciar los elementos presentes en el sol-gel. Los picos correspondientes a la solución nombrados en la literatura son el pico  $798\text{ cm}^{-1}$  y  $1120\text{ cm}^{-1}$  atribuidos a la simetría Si-O-Si. El pico en la banda  $963\text{ cm}^{-1}$  debido a Si-OH, El  $1390\text{ cm}^{-1}$  del grupo C-H ( $-\text{CH}_3$ ), los picos  $2900\text{ cm}^{-1}$  y  $2975\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la unión CH, el pico  $3354\text{ cm}^{-1}$  muestra la unión OH y finalmente los picos comprendidos entre  $1400\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  presentan el  $\text{SiO}_4$  [140].

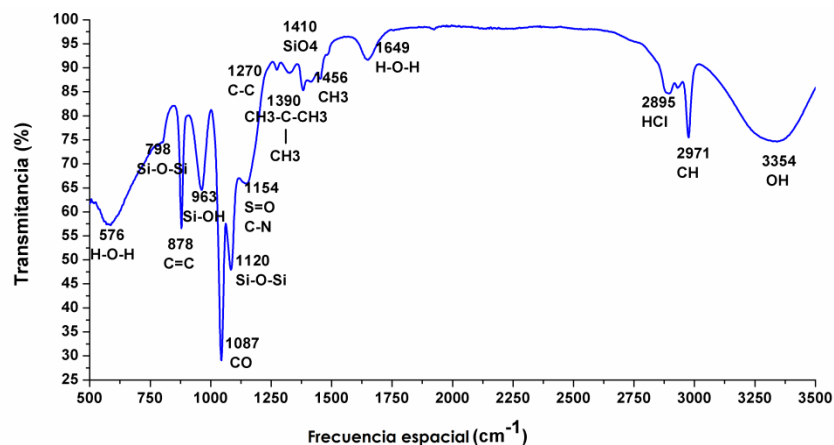


Figura 26. Espectro de absorción de la película sol-gel.

Para poder corroborar que la enzima de colesterol se encuentra atrapada dentro de la estructura de sol-gel, también se realizó el espectro de la enzima, caracterizando los puntos más importantes de esta (Figura 27).

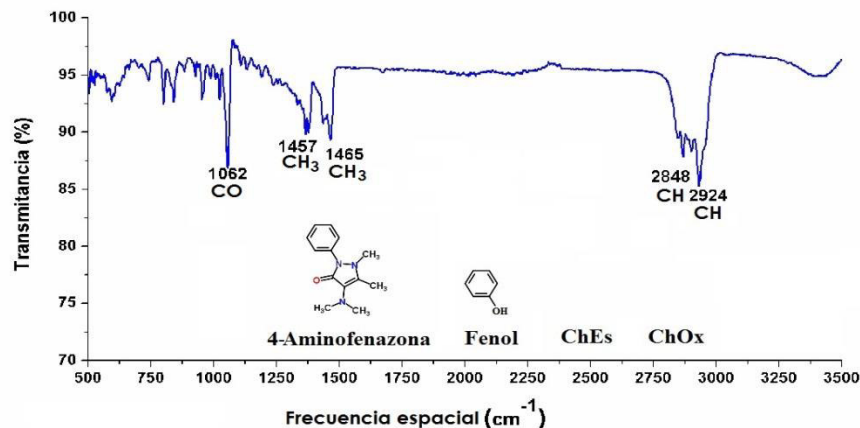


Figura 27. Espectro de absorción de la enzima de colesterol.

Encontrando que al comparar el espectro de la enzima con respecto a la diferencia de los espectros de la película de sol-gel con y sin enzima (Figura 28), la enzima de colesterol está confinada dentro de la estructura de sol-gel, debido a que ambos espectros presentan los picos similares en  $1065\text{ cm}^{-1}$  C-O y  $2900\text{ cm}^{-1}$  C-H, los otros picos como el  $1457\text{ cm}^{-1}$  CH<sub>3</sub>, no aparecen debido a que la concentración de enzima, en comparación a los demás elementos de la síntesis del sol-gel son casi inapreciables.

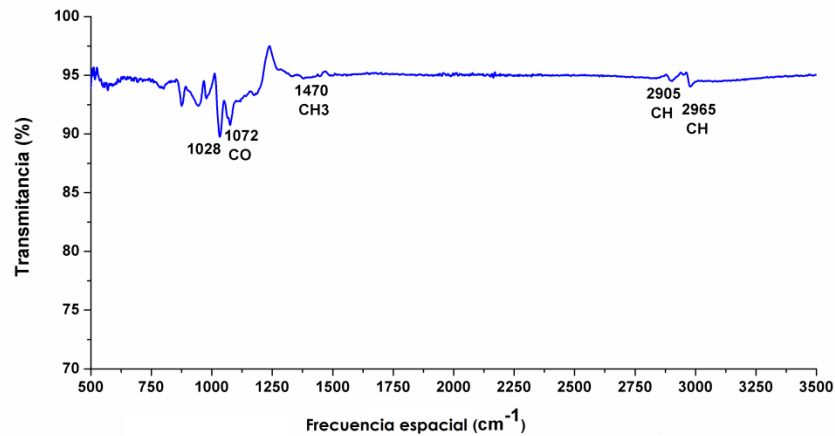


Figura 28. Comparativa entre los espectros de absorción del sol-gel: con y sin enzima.

### 3.5 Análisis morfológico de las películas de sol-gel

Los resultados de los estudios morfológicos sobre película de sol-gel se muestran en la Figura 29. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio óptico (Motic BA310, trinocular). Con estas imágenes, se pueden observar el acabado de las películas de sol-gel depositadas con ambos métodos, la diferencia entre estos dos métodos es visible, en la deposición del método “Immerse” se genera una película con más irregularidades y más agrietada que la deposición del método Dip-coating.

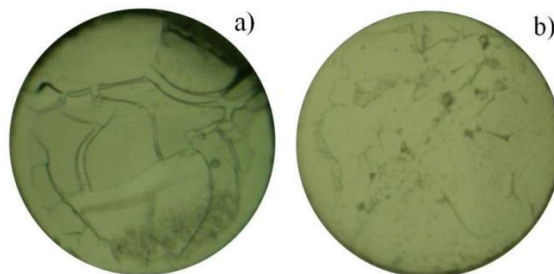


Figura 29. Optrudo de Sol-Gel/colesterol, Vista frontal, a) Immerse y b) Dip-coating.



Por otra parte, la rugosidad superficial promedio ( $R_a$ ) se examinó para ambas películas usando un AFM (Dimension 3000, digital instruments/veeco). En la Figura 30, se observó que la rugosidad superficial media de la película fue relativamente mayor en 96.7 nm en el método de “Immerse”. Es evidente que mediante el “Dip-coating”, el valor de rugosidad superficial media disminuye a 5.71 nm, lo que es más apropiado para aplicaciones ópticas que el “Immerse”.

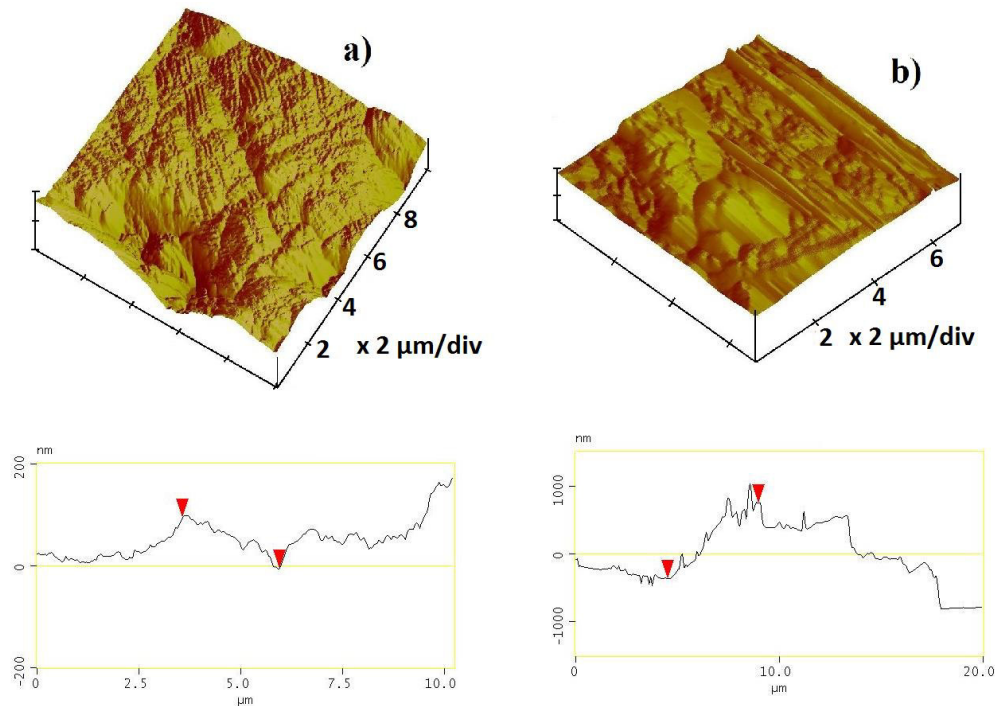


Figura 30. Análisis morfológico con AFM, a) Dip-coating y b) Immerse.

El microscopio electrónico de barrido se utilizó para llevar a cabo el estudio morfológico de superficies a alta resolución mediante la captura de las películas inmovilizadas del sol-gel. Utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen ampliada de la superficie de la muestra. Por lo que las muestras a ser analizadas al SEM deben estar secas y ser conductoras. En caso de no ser conductora la muestra necesita recubrirse con un material que la haga conductora (el método de “sputtering” de oro) y permita su observación en el microscopio.

En la Figura 31, se muestra la superficie de la deposición del sol-gel para ambos métodos, en comparativa a una fibra sin película (Figura 31b), en esta se puede observar claramente la deposición de las películas con respecto a la fibra sola, en la primera deposición (Figura 31a) se puede observar diferentes capas en la película pero con abundantes grietas a comparación de la segunda (Figura 31c) que se percibe una película uniforme y escasas de grietas.

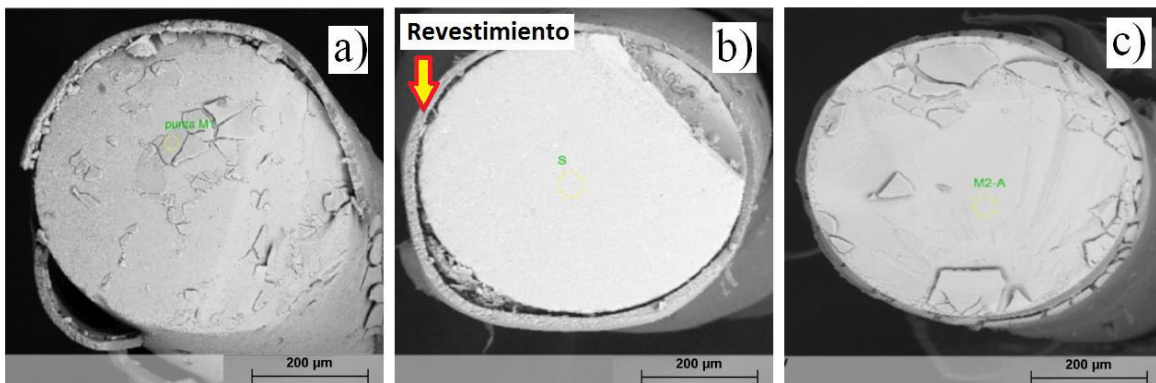


Figura 31. Morfología de optrodos: a) Immerse, b) fibra óptica sola y c) Dip-coating.

### 3.6 Principio de funcionamiento

El analito (colesterol) al interactuar con el elemento de reconocimiento (enzima inmovilizada), realiza el siguiente proceso mostrado en la Figura 32. El colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol para obtener colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre se oxida en presencia de colesterol oxidasa para dar colesteno y peróxido de hidrógeno. Un cromógeno de quinoneimina (con absorción en el espectro visible [141]) ocurre cuando el peróxido de hidrógeno reacciona con el fenol y con el 4-aminofenazona en presencia de peroxidasa (obteniendo un tono rojo). Debido a la tonalidad final de proceso químico, usamos un LED de 633nm (emisión roja) como fuente de luz en lugar del láser (He-Ne, 632.8 nm) porque es barato, eficiente y un tamaño ideal para realizar un sistema portable.

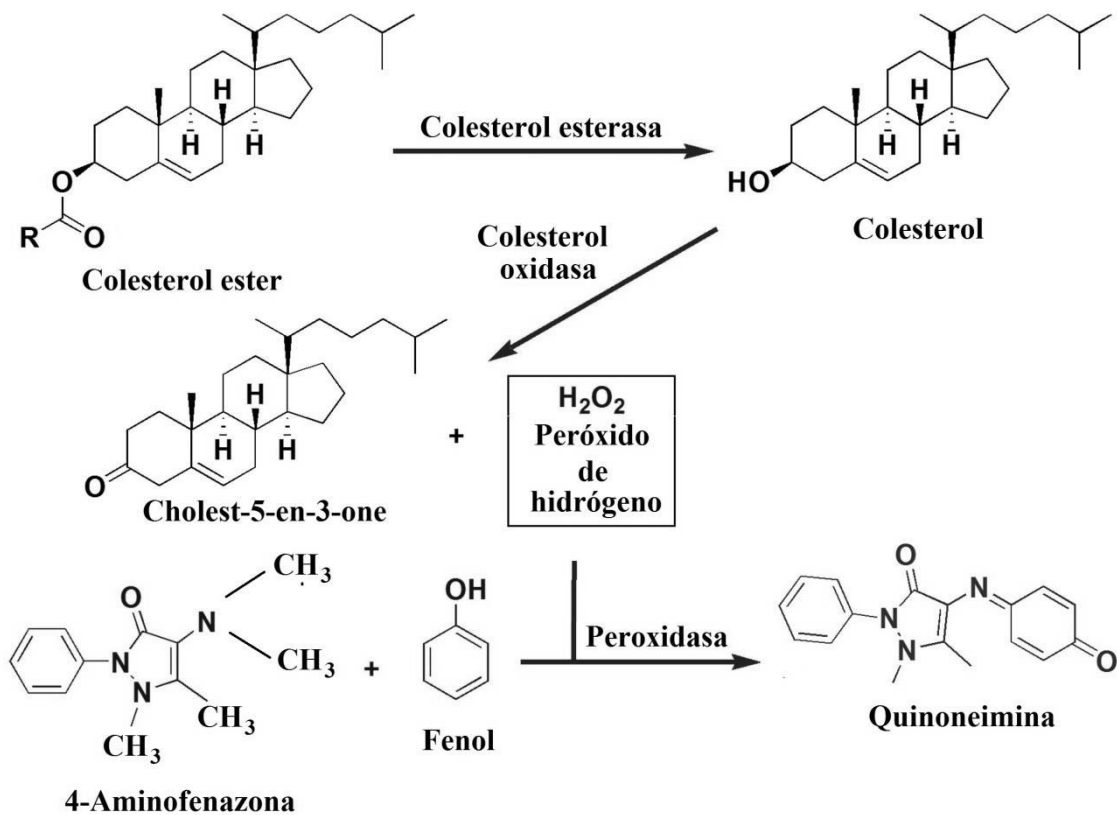


Figura 32. Proceso de interacción entre analito y elemento de reconocimiento.

### 3.7 Caracterización de los optrodos

Para llevar a cabo la caracterización y análisis del biosensor se utilizó una disolución estándar de colesterol equivalente a 200 mg/dl (BE10130030, DIASYS). La cual tiene la ventaja de que no se presentan interferencias por Bilirrubina hasta 15 mg/dl ni por Hemoglobina hasta 200 mg/dl. Esta se diluyó obteniendo soluciones con diferentes concentraciones conocidas, para utilizarlas en la caracterización de los optrodos. La degradación se realizó mediante la siguiente ecuación y los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 4.

$$\text{Concentracion} = Cds \frac{V_i}{V_f} = Cds \frac{V_i}{V_a + V_i} \quad [3.1]$$

Donde  $Cds$  es la concentración de la disolución estándar,  $V_i$  es el volumen inicial,  $V_f$  el volumen final y  $V_a$  el volumen adicional (solvente). Despejando el volumen adicional, se obtiene:

$$V_a = \left[ \frac{Cds}{Concentración} - 1 \right] V_i = Z * V_i \quad [3.2]$$

Tabla 4. Dilución de la concentración del colesterol estándar.

Concentración (mg/dl) (mM)		Z (%)	$V_i$ (ml)	$V_a$ ( $\mu$ l)	Comprobación (mg/dl)
200	5.20	00.00	0.5	000.0	200.000
190	4.91	05.26	0.5	026.3	190.005
180	4.65	11.11	0.5	055.55	180.001
170	4.40	17.64	0.5	088.2	170.010

Las curvas características obtenidas con el OSA (HR4000CG-UV-NIR, ocean optics) de los optrodo para ambos métodos se muestran en la Figura 33. Las pruebas proporcionan una relación entre la cantidad de luz que pasa a través de la optrodo (% de transmitancia) y la concentración de colesterol (en mg/dl) presente en la muestra. Los resultados obtenidos se midieron con buffer de colesterol (Stanbio Laboratory) ya conocidos (comprendido entre 170 a 200 mg/dl). Antes de la medición, la película sol-gel de optrodo se empapa previamente con la muestra sintética de concentración de colesterol.

Se puede observar que en el método de “Immerse” de la Figura 33 tiene un mayor sensibilidad, sin embargo, el ajuste lineal es menor al 95%, mientras que en la curva del método de Dip-coating Figura 34 se tiene un alcance menor pero un ajuste del 98.8%, por lo cual este método al tener un comportamiento más lineal los resultados serían más exactos. Por lo que el método de deposición de Dip-coating es la mejor opción.

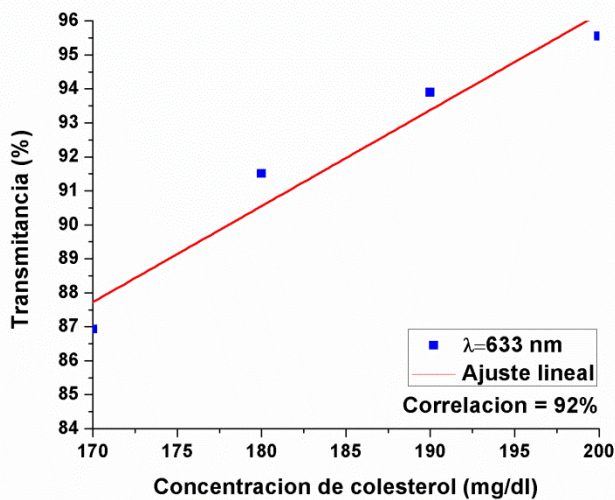


Figura 33. Caracterización lineal con el OSA para optrodo con Immerse.

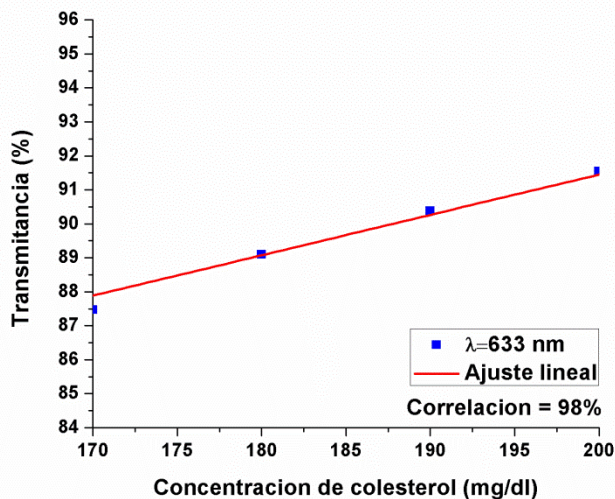


Figura 34. Caracterización lineal con el OSA para optrodo con Dip-coating

En el presente capítulo, se presentó el proceso de elaboración de optrodos, haciendo una comparativa entre dos métodos de deposición, teniendo como resultado que el optrodo realizado con el método de deposición Dip-coating es el adecuado para realizar el biosensor. En el siguiente capítulo se realiza y explicará el desarrollo del biosensor.

## 4. Desarrollo del biosensor y resultados

Una vez realizado el estudio y análisis de optrodos acerca del biosensor, se desarrollará el sistema del biosensor óptico de fibra óptica para determinar la concentración de colesterol vía % transmitancia.

### 4.1 Diseño del biosensor

Para realizar el diseño del dispositivo electrónico de sensado mostrado en la Figura 35, se tomó en consideración los trabajos previos del grupo de optoelectrónica de DICIS y los que se han desarrollado en el transcurso de este estudio. El primer trabajo implementado consistía en la determinación del pH basado en la técnica sol-gel, utilizando como soporte la fibra óptica [142]. Los trabajos posteriores continuaron con el método de sol-gel, añadiendo nanotubos de carbono para fortalecer la membrana inmovilizada, además del estudio de pH, se empezó a realizar un detector de glucosa [143, 144]. En el siguiente trabajo se cambió la fibra óptica plástica por una de cristal fotónica, con el motivo de ver si existía una mejoría [145]. Se empezó el estudio para la determinación del colesterol, además de mejorar el proceso de elaboración de los optrodos, controlando las variables que interfieren en la inmovilización de enzimas, utilizando la técnica sol-gel [146, 147].

En la Figura 35 se muestra una representación del arreglo experimental del biosensor de colesterol que consiste en una fuente de luz (LED, 633nm) enfocada al optrodo por una lente. La luz se propaga a través del optrodo y la variación de intensidad de luz se mide mediante un fotodetector. La señal de salida del detector se convierte en una señal medible (tensión); esta señal es directamente proporcional a la concentración de colesterol en la muestra. Este voltaje es amplificado y procesado para su interpretación. La concentración de colesterol se da en mg/dl (mM). Antes de la medición, la película sol-gel / colesterol del optrodo se empapa previamente en la muestra.

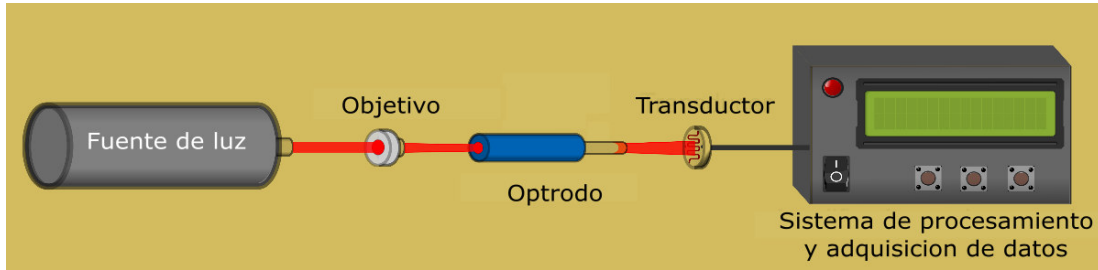


Figura 35. Arreglo experimental del biosensor a desarrollar.

## 4.2 Desarrollo del biosensor

Para realizar el sistema de sensado a partir de la elaboración del optrodo, se requiere realizar un proceso de caracterización, medición y adquisición de datos, para ello el dispositivo de sensado se dividió en un sistema de posicionamiento mecánico XYZ y un sistema electrónico para el procesamiento de los datos.

### 4.2.1 Sistema mecánico.

El sistema mecánico elaborado, se muestra en la Figura 36c, este sistema sirve para la alineación de la fuente de luz con el optrodo, una montura mecánica con tres ejes de desplazamientos lineales Figura 36a y b, los cuales ayudan en la alineación del haz de luz en sus tres ejes, además se adaptaron piezas para el soporte del optrodo, objetivo, fuente de luz y el detector.

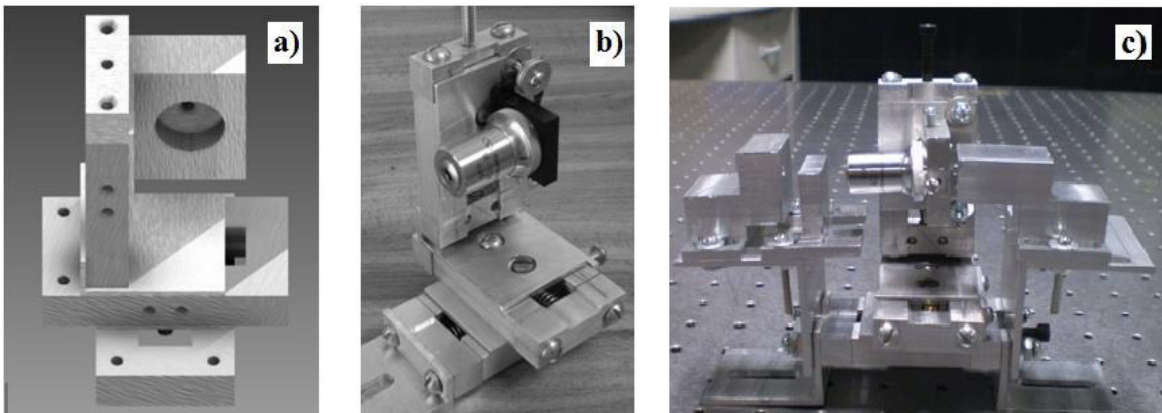


Figura 36. Sistema mecánico: a) modelo XYZ, b) real y c) Completo.

### 4.2.2 Sistema electrónico

El sistema electrónico se realizó con el fin de realizar un prototipo portable, este sistema consiste en el diseño de la fuente de alimentación y la parte de la adquisición de datos, procesamiento e interfaz con el usuario.

#### 4.2.2.1 Diseño del sistema de detección

Para que el sistema de sensado tenga un buen desempeño, se lleva a cabo un proceso de análisis para el sistema de detección, determinando las resistencias del puente de wheatstone y la ganancia del amplificador instrumental. Para ello caracterizamos primero las resistencias  $R_1$  y  $R_3$  de la Figura 37 como un divisor de voltaje, considerando la resistencia  $R_3$  igual a la resistencia variable de la fotorresistencia ( $R_x$ ).

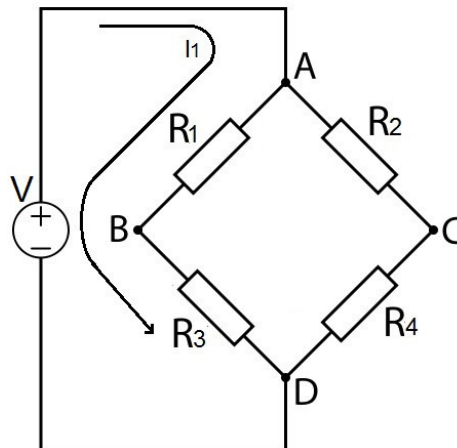


Figura 37. Caracterización del puente de wheatstone.

Graficando las curvas de  $R_x$  mínima, máxima y su diferencia entre ellas, variando  $R_1$  ( $R_{x\min}=10\Omega$  y  $R_{x\max}=1000\Omega$ ), se puede observar en la Figura 38 que entre el rango de ambas resistencias mínima y máxima, la separación entre ambas es mayor que cuando  $R_1$  es menor a  $R_{x\min}$  o mayor a  $R_{x\max}$ .



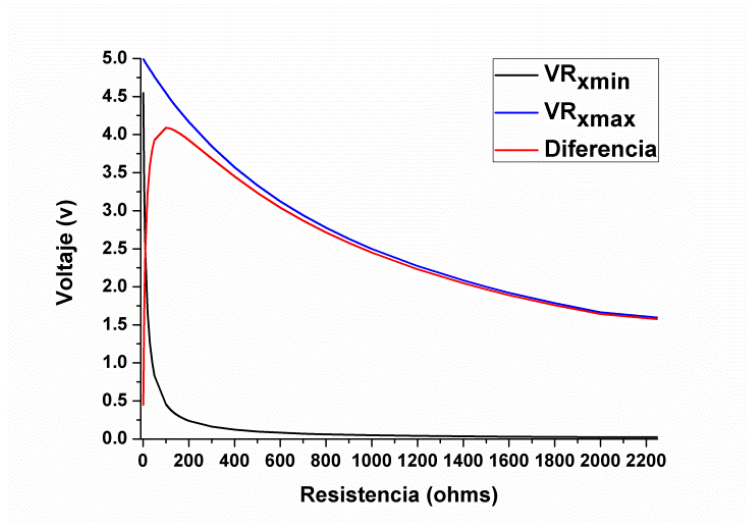


Figura 38. Curva característica de la fotorresistencia variando R<sub>1</sub>.

Por lo que se procedió hacer un análisis de la curva característica de varios valores de R<sub>1</sub> entre el rango comprendido entre R<sub>xmin</sub> y R<sub>xmax</sub>, esta vez variando la resistencia R<sub>x</sub> (Figura 39), además se procedió a sacar su ajuste lineal (Tabla 5), con ambos análisis se puede observar que entre más se acerca la resistencia R<sub>1</sub> al valor de la resistencia R<sub>xmax</sub>, el comportamiento es más lineal y debido a que el ajuste lineal de los últimos tres valores son muy cercanos, pero en R<sub>1</sub>= 600 Ω de la curva anterior el rango es mucho más grande, se consigue un equilibrio entre mayor alcance y linealidad, por lo que se optó por este valor como el indicado.

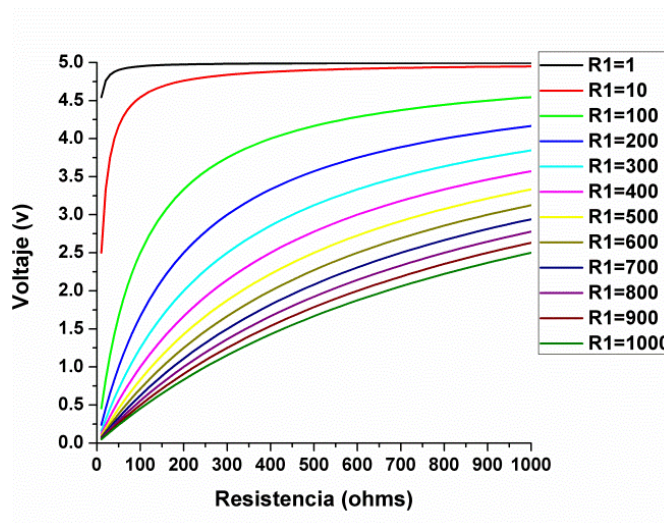


Figura 39. Curva característica de R<sub>1</sub> variando R<sub>x</sub>.

Tabla 5. Ajuste lineal para diferentes valores de la resistencia  $R_1$ .

Resistencia	Ajuste
100	0.71
200	0.82
400	0.90
600	0.94
800	0.95
1000	0.96

Considerando el valor de  $R_1$  como  $600\Omega$  el voltaje en el punto B de la Figura 7 varía entre 0.45V y 4.54V, para evitar valores negativos entre la diferencia de voltaje entre el punto B y C. El voltaje en el punto C debe ser igual al valor máximo del punto B, por lo que la Resistencia  $R_2$  es igual a  $R_1$  y la resistencia  $R_4$  es igual a  $R_{x\max}$ . Por lo cual el rango entre la diferencia de voltaje entre B y C al variar  $R_x$  es de 0.0V a 4.09V. Para lograr que el rango sea entre 0.0V y 5.0V, se tiene que tener una ganancia de 1.22 en el amplificador, por lo que considerando las resistencias  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  del amplificador igual a  $10K\Omega$ , la resistencia  $R_G$  es igual a 90K.

#### 4.2.2.2 Diseño electrónico

Para realizar el diseño electrónico, se propone un esquema teórico y posteriormente se realiza su análisis, primero en simulación y luego de forma física en una plantilla de experimento. Una vez que el sistema trabaja bien, se pasa al diseño y desarrollo de la placa (Figura 40a y b). Luego, se procede a la colocación de los elementos electrónicos. Por último, se realiza la parte estética del aparato (Figura 40c).

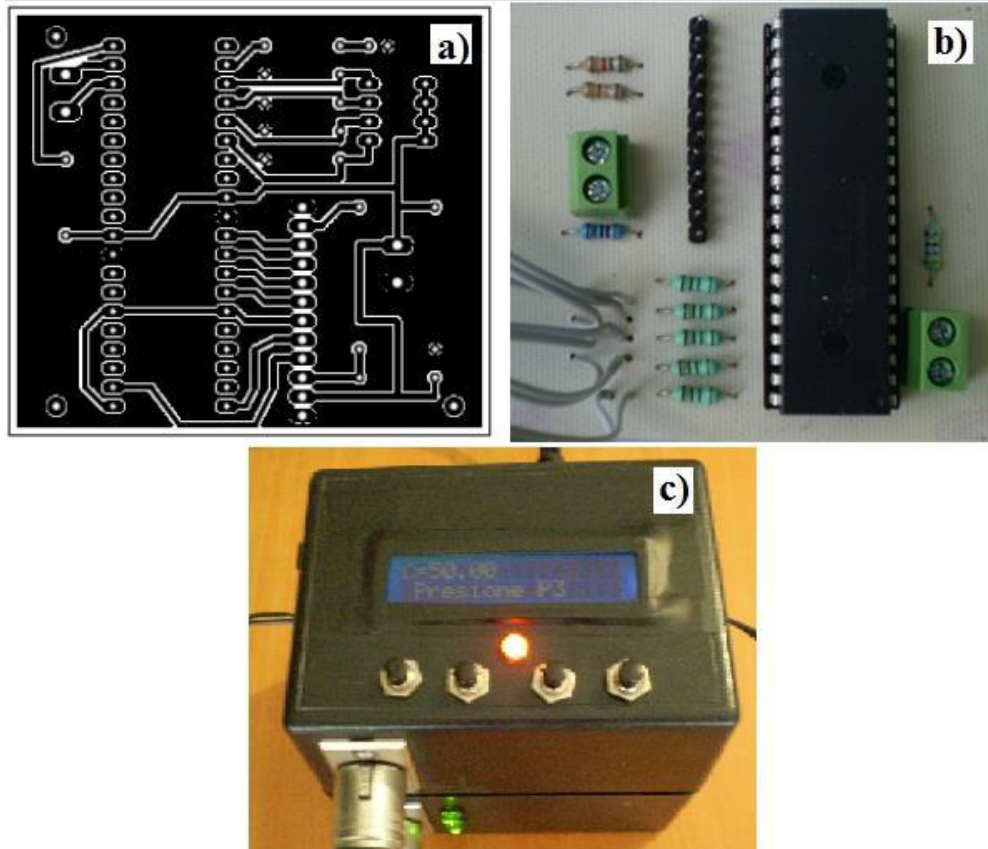


Figura 40. Sistema electrónico.

#### 4.2.2.3 Sistema de adquisición de datos

El sistema de adquisición y procesamiento de datos (DAPS) se muestra en el diagrama de la Figura 41. La señal de entrada está compuesta por dos valores; la primera corresponde a la medida del optrodo y la segunda a la señal de referencia. La diferencia entre estas dos señales se amplifica. El resultado es interpolado con la curva característica de optrodo, obteniendo las mediciones de nivel de colesterol. Por último, este valor se muestra en un LCD (Liquid Crystal Display).

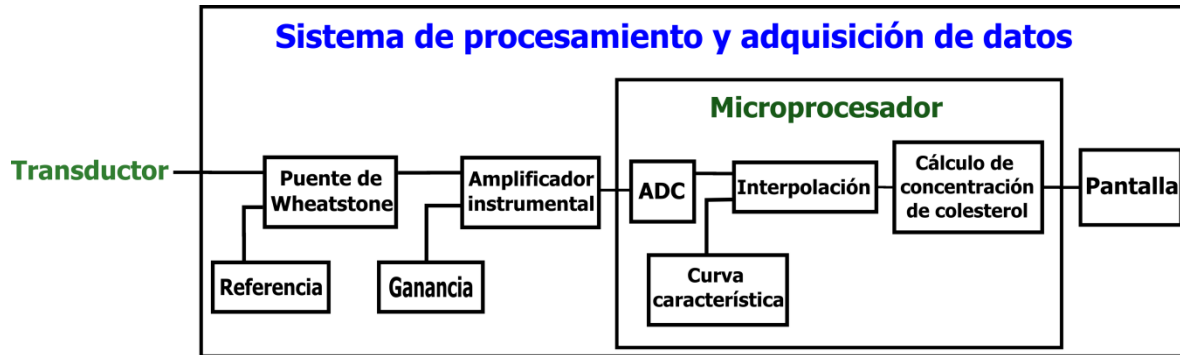


Figura 41. Acondicionamiento de la señal del optrodo.

### 4.3 Dispositivo final de sensado

Una vez realizado la parte mecánica y electrónica, acoplamos estos dos sistemas para llevar a cabo la caracterización y sensado del optrodo, esta asociación nos entregan el prototipo completo del sistema de medición, es decir, el biosensor óptico portátil utilizando optrodos para determinar la concentración de colesterol presentes en una muestra. El sistema del biosensor del colesterol fue desarrollado usando la fuente de luz de un LED (633 nm) acoplada al optrodo con un objetivo. La variación de intensidad se mide con un fotodetector conectado a DAPS, y se convierte en señal eléctrica. La señal eléctrica es proporcional a la concentración de colesterol (mg/dl o mM). Usando la curva de caracterización, es posible mostrar la concentración de colesterol en LCD (Figura 42).

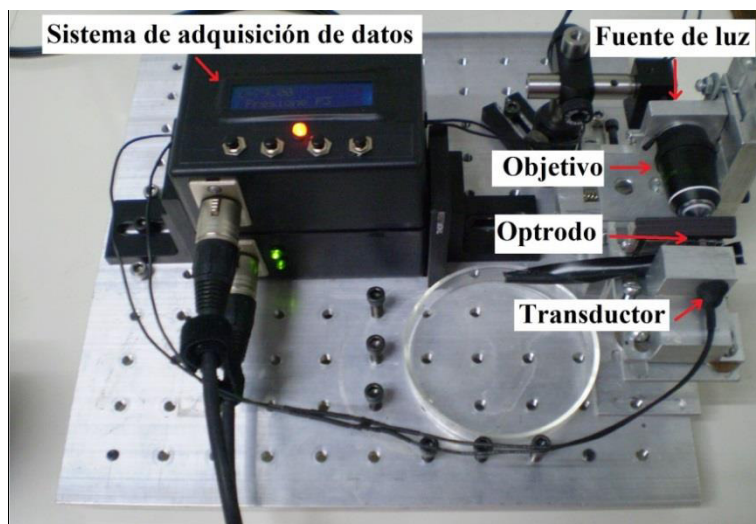


Figura 42. Biosensor óptico final.

#### 4.4 Análisis de funcionalidad del prototipo

Dado los resultados anteriores que favorecen el método de deposición por el dispositivo Dip-coating, este método es el más apropiado para la realización de los optrodos del biosensor óptico de colesterol. Por lo que se realiza un comparativo entre las curvas características del analizador de espectro óptico y las del dispositivo electrónico desarrollado (Figura 43 y Figura 44). Los dos sistemas de medición tienen un comportamiento similar con un ajuste lineal superior al 95%. Por lo tanto, nuestro dispositivo puede reemplazar el analizador de espectro óptico manteniendo su eficiencia y así reducir costos.

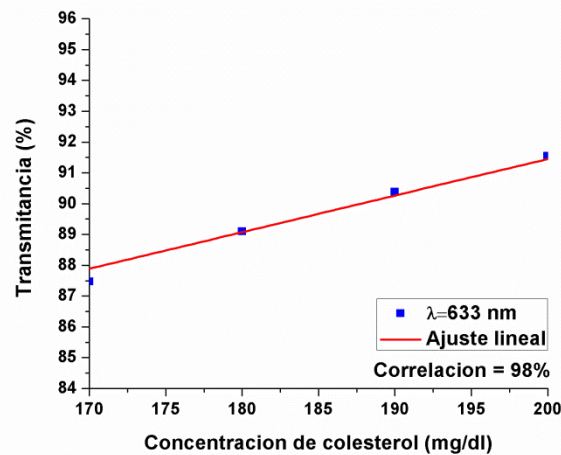


Figura 43. Caracterización de optrodos (Dip-coating) con el OSA.

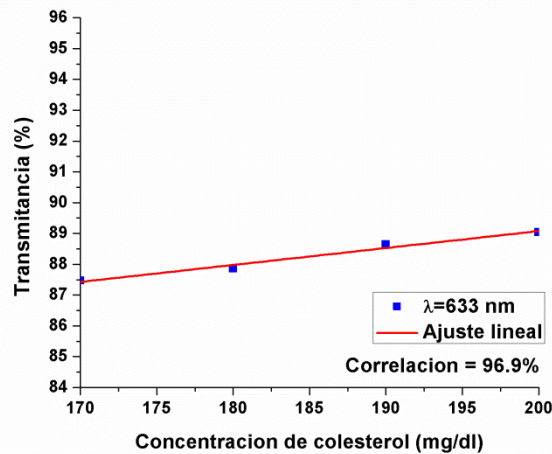


Figura 44. Caracterización de optrodos (Dip-coating) con nuestro biosensor.

#### 4.5 Curva característica

El ajuste de curvas se utiliza cuando se tiene una serie de datos medidos y se desea conocer valores intermedios no conocidos, o simplificar estos datos por medio de una función que se ajuste a ellos, para determinar nuevos valores. Para ello, existen numerosas leyes físicas en las que dos magnitudes “x” e “y” se relacionan a través de una ecuación, donde cada punto se encuentra definido por la variable “x” (variable independiente, generalmente concentración del analito de interés) y la variable “y” (variable dependiente, generalmente respuesta instrumental).

Un procedimiento muy utilizado en análisis cuantitativo es la construcción de una “curva característica”. Esta curva característica es la representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito, dentro de un determinado intervalo de trabajo.

La etapa de ajuste analítico se realiza mediante un modelo en el intervalo lineal que consiste en encontrar la recta de calibrado que mejor ajuste a la serie puntos experimentales, la recta de calibrado se encuentra definida por una ordenada (*b*) y una pendiente (*m*), mediante la ecuación.

$$\bar{Y} = mX + b \quad [4.1]$$

A partir de la curva característica (conjunto de concentraciones que describen el intervalo en el cual se deberá cuantificar el compuesto por analizar) y a fin de asegurar que la recta encontrada con los puntos experimentales se ajuste correctamente al modelo matemático de la ecuación se calculan los valores de la ordenada al origen, la pendiente y el coeficiente de determinación (*r* - correlación) por medio de las siguientes ecuaciones.

$$m = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{n \sum X^2 - (\sum X)^2} \quad [4.2]$$

$$b = \frac{n \sum X^2 \sum Y - \sum X \sum XY}{n \sum X^2 - (\sum X)^2} \quad [4.3]$$

$$r = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{\sqrt{n \sum X^2 - (\sum X)^2} \sqrt{n \sum Y^2 - (\sum Y)^2}} 100 \quad [4.4]$$

Para el biosensor desarrollado, la curva característica se obtiene de la parte lineal (de 4.4 a 5.2 mM) de los datos experimentales mostrados en la Figura 45, la curva característica se presenta en la Tabla 6.

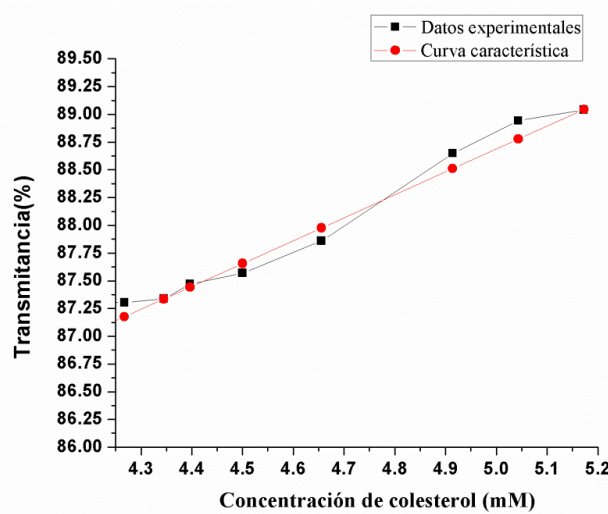


Figura 45. Caracterización del biosensor.

Tabla 6. Curva característica

Curva Característica	Intercepción		Pendiente		Correlación Ajuste cuadrático
	Valor	Error	Valor	Error	
Y=	78.37128	1.09824	2.06296	0.22884	0.96397

#### 4.6 Características de desempeño

Los métodos analíticos (denominados características del desempeño analítico) son establecidos por instituciones nacionales o internacionales que proporcionan procedimientos y características del método y que concluyen con indicadores de calidad que suelen incluir: precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad, etc.

#### 4.7 Validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico desarrollado es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método o procedimiento analítico cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas [37, 148, 149]. Las características analíticas en la validación del método son:

- LC-Límite crítico
- LOD-Límite de Detección
- LOQ-Límite de cuantificación

Los límites de validación son parámetros importantes en la calibración de la curva característica, estos términos son usados para describir la más pequeña concentración de un analito que puede medirse de forma fiable mediante un procedimiento analítico (Figura 46). Los protocolos más comunes para la estimación de los límites de validación están en la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry) y la organización internacional estandarizada (ISO: International Standardization organization).

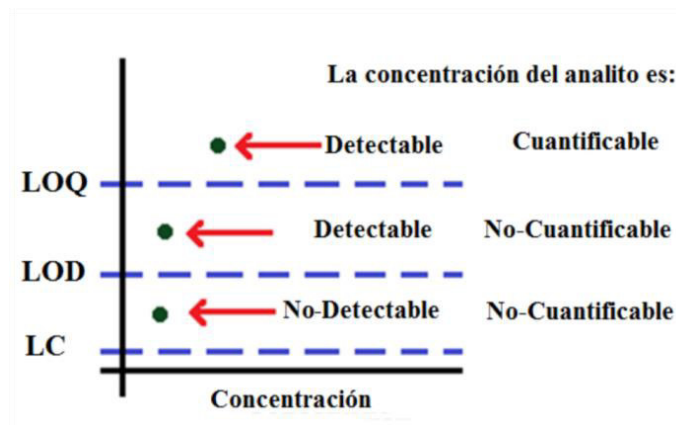


Figura 46. Características analíticas de validación.

El valor crítico o límite de decisión.- Es el nivel de analito significativamente diferente de cero (1.65% del nivel máximo de la desviación estándar (SD) aceptable), es decir, es la concentración de analito aparente más alta que se espera que se encuentre cuando se prueban las repeticiones de una muestra que no contenga ningún analito. Aunque las



muestras ensayadas para definir LC carecen de analito, una muestra en blanco (cero) puede producir una señal analítica que de otro modo podría ser consistente con una baja concentración de analito. LC se estima midiendo las repeticiones de una muestra en blanco y calculando el resultado medio y la desviación estándar. Suponiendo una distribución Gaussiana de las señales analíticas en bruto de las muestras en blanco, El LC representa el 95% de los valores observados. (Nota: los analizadores clínicos modernos típicos no muestran rutinariamente la señal analítica real sino que la convierten automáticamente a un valor de concentración. La señal analítica bruta es preferible para establecer LC ya que los analizadores pueden reportar todos los valores de señal por debajo de cierto límite fijo como "cero concentración"). El 5% restante de los valores en blanco representa una respuesta que podría ser producida realmente por una muestra que contiene un valor muy bajo de concentración de analito. Estadísticamente, esta falsa positividad (asegura que el analito está presente cuando no lo está) se conoce como un error Tipo I. A la inversa, aunque se espera que una muestra que contenga realmente analito supere la LC, también debe reconocerse que una proporción de muestras de muy baja concentración producirá respuestas menores que la LC, lo que representa el error de tipo II, falso negativo (asegurar que el analito no está cuando sí lo está). Por lo tanto, por lo que la superposición de las respuestas analíticas de en blanco y baja concentración es una realidad estadística, y utiliza LC como un punto de partida razonable para la estimación de la LOD.

Aunque algunas muestras pueden indicar que una prueba tiene un rango dinámico que se extiende desde la concentración cero hasta algún límite superior, normalmente una prueba no es capaz de medir con precisión las concentraciones de analito hasta cero. Debe estar presente suficiente concentración de analito para producir una señal analítica que puede distinguirse de forma fiable de "Ruido analítico" (señal producida en ausencia de analito).

El límite de detección o valor mínimo detectable.- Es la concentración más baja del analito que puede ser detectado por el instrumento que sea confiable y distinguido de LC, aunque no necesariamente cuantificable, bajo las condiciones del experimento indicado (Figura 48).

Un método típico para estimar LOD consiste en medir réplicas de un calibrador cero o una muestra en blanco, determinando con el valor medio y la desviación estándar (SD), ya que la SD para la muestra en blanco es aproximadamente el equivalente a la SD para cualquier finito. Calculando LOD como la media +3 SD [150]. La suposición es que, si el analito está presente, producir una señal mayor que el ruido analítico en ausencia de analito. Este es un método simple y rápido. Sin embargo, no hay evidencia objetiva que pruebe que una baja concentración de analito producirá una señal distinguible de una muestra en blanco (concentración cero). Es decir, es la capacidad de medir nada". Así, las pruebas de límite confirman simplemente que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un cierto nivel de confianza especificado (3% del nivel máximo de SD aceptable)

Un enfoque alternativo es el empírico ya que utiliza el análisis de muestras que contienen concentraciones pequeñas pero conocidas de la sustancia de interés (ya sea un fármaco, una hormona u otro analito). La ventaja de este enfoque empírico es que se utilizan datos objetivos para comparar la respuesta analítica de muestras en blanco y de baja concentración para determinar de manera concluyente qué concentración de analito es necesaria para distinguir su presencia de su ausencia. Se pueden aplicar varias especificaciones analíticas (por ejemplo, una relación señal/ruido mínima para un método cromatográfico Figura 47 o un requisito de absorbancia mínima para un procedimiento espectrofotométrico) para asegurar que la LOD es significativa y claramente distinguible de una muestra negativa o en blanco.

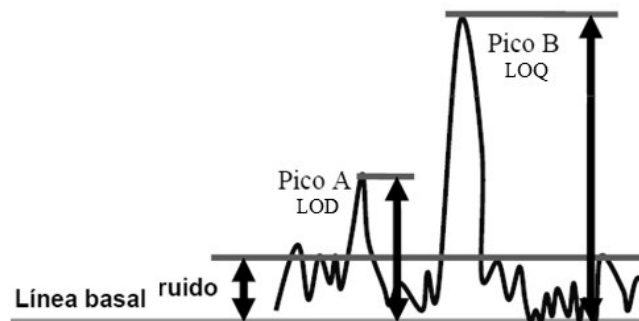


Figura 47. Gráfico empírico de la relación de señal/ruido.

En resumen los métodos para calcular el LOD son tres:

1. Mediante evaluación visual.
2. Basado en la relación S/N (3:1). Aplicable a los procedimientos, que muestran ruido en la línea de base o baja concentración del analito se compara con el blanco.
3. Basado en SD de respuesta y pendiente.

$$LOQ=3SD/m$$

m -> Pendiente de la curva característica.

SD de respuesta; puede obtenerse mediante, desviación estándar de la respuesta en blanco, desviación estándar residual de la línea de regresión, desviación estándar de la intersección y de la línea de regresión  $Sy/x$ , es decir error estándar de estimación.

El límite de cuantificación.- Es la menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse con precisión y exactitud bajo las condiciones del experimento establecidas, en el cual el desempeño es aceptable (confiable), para una aplicación típica (10% del nivel máximo de SD aceptable) (ver Figura 48). Para ello se establece un nivel más alto o igual a la concentración del LOD; en el método estadístico, es +10SD por encima del valor medio en blanco, presentando así una mayor probabilidad de que un valor en el LOQ sea "Real" y no sólo una fluctuación aleatoria del espacio en blanco.

En resumen los métodos para calcular el LOQ son tres:

1. Mediante evaluación visual
2. Basado en la relación S/N (10:1). Aplicable a los procedimientos, que muestran ruido en la línea de base o baja concentración del analito se compara con el blanco.
3. Basado en SD de respuesta y pendiente

$$LOQ=10SD/m$$

m -> Pendiente de la curva característica.

SD de respuesta; puede obtenerse mediante, desviación estándar de la respuesta en blanco, desviación estándar residual de la línea de regresión, desviación estándar de la intersección y de la línea de regresión  $Sy/x$ , es decir error estándar de estimación.

El rango dinámico.- Se considera que va desde la menor concentración detectable (LOD) hasta la pérdida de relación entre respuesta y concentración (ver Figura 48), también se le conoce como el rango de aplicabilidad de la técnica. En la zona de pérdida de la linealidad, podría aplicarse, en principio, un método de regresión polinómica para la calibración (o algún otro de naturaleza no lineal), de modo que nada impide que dicha zona sea utilizada con propósitos predictivos.

El Rango Lineal.- Es el intervalo analítico de la concentración del analito en que el analito puede ser determinado mediante la utilización de la curva característica, se considera que es el comprendido entre el límite de cuantificación hasta la concentración en la cual se pierde la linealidad de la curva (ver Figura 48), con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

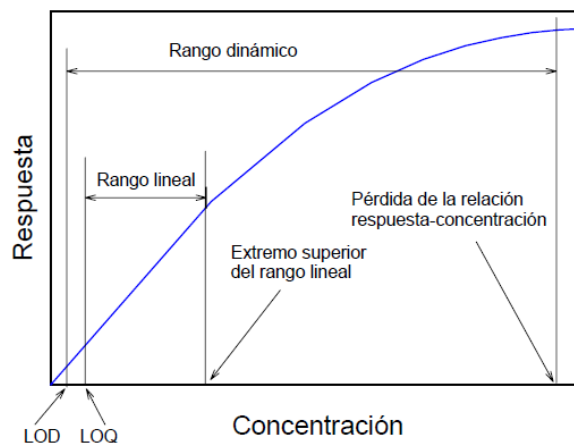


Figura 48. Características de desempeño de un sensor.

#### 4.8 Determinación de las características de desempeño

En esta sección describimos el cálculo de LC, LOD y LOQ por dos métodos; empírico y teórico (en términos de la concentración del analito).

Método empírico.- Consiste en analizar una serie de muestras que contienen cada vez más concentraciones de analito. Se realizó una serie de mediciones en un rango de concentraciones restringidas y cerca del LOD esperado (3.9-4.4 mM) [150]. Obteniendo como resultado un LC=4.355 mM, LOD=4.375 mM y un LOQ=4.4mM, como se muestran en la Figura 49.

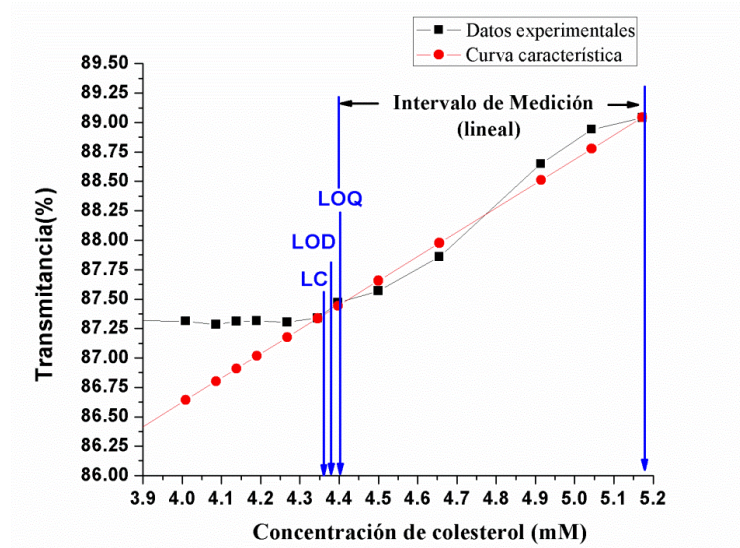


Figura 49. Límites de desempeño por método empírico.

Método teórico.- Considerando la curva característica del biosensor de la Tabla 6. Se determinó los límites de validación por medio de las ecuaciones.

$$LC = \frac{Blanco_{promedio} + 1.65S_{x/y} - b}{m} \quad [4.5]$$

$$LOD = \frac{Blanco_{promedio} + 3S_{x/y} - b}{m} \quad [4.6]$$

$$LOQ = \frac{Blanco_{promedio} + 10S_{x/y} - b}{m} \quad [4.7]$$

Donde,  $m$  es la pendiente de la curva,  $b$  la ordenada de la curva  $S_{x/y}$  es la desviación estándar de la regresión del blanco (cuan inexacta podría ser la medición) y el  $Blanco_{promedio}$  es el promedio de las mediciones del blanco.

Considerando el blanco ó referencia uno de las siguientes definiciones:

- Muestra con las mismas especies pero sin analito, para el colectorol (con lipemia, hemólisis y bilirubina; sin colesterol).
- Punto de linealidad del nivel más bajo.
- Gráfico de calibración.

La desviación estándar de la regresión se determinó con la ecuación 4.7 y la información de la Tabla 7.

$$SD = S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}{n-2}} \quad [4.7]$$

Tabla 7. Datos estadísticos

X [mM]	Y	$\bar{Y}$	Y- $\bar{Y}$	(Y- $\bar{Y}$ ) <sup>2</sup>
3.87948	87.31496	87.30648667	0.008473333	7.17974E-05
4.00879	87.31253	87.30648667	0.006043333	3.65219E-05
4.08638	87.28351	87.30648667	0.022976667	0.000527927
4.13811	87.31	87.30648667	0.003513333	1.23435E-05
4.18984	87.31378	87.30648667	0.007293333	5.31927E-05
4.26743	87.30414	87.30648667	0.002346667	5.50684E-06
<b>Sumatoria</b>				<b>0.013297458</b>

Con la desviación estándar obtenidas y las ecuaciones descritas, se determina los límites de desempeño LC, LOD y LOQ, expresados en la Tabla 8.

Tabla 8. Límites de desempeño

$S_{x/y} =$	0.013297458	
LC=	4.341422512	mM
LOD=	4.350156591	mM
LOQ=	4.395277293	mM

El método estadístico funciona teóricamente bien si la respuesta analítica es lineal en el extremo inferior de la prueba (entre el LOD y el origen) y si la intercepción está bien definida. Los métodos de evaluación visual (métodos empíricos) y de señal a ruido son los enfoques más apropiados para la determinación de LC, LOD y LOQ [148].

#### 4.9 Resultados en muestras de suero humano

Con el fin de evaluar el rendimiento del biosensor, se realizó la cuantificación de la concentración de colesterol en suero humano. Las muestras de suero se usaron sin ningún tratamiento previo. La concentración de colesterol se estimó en muestras de suero usando los respectivos optrodos y las correspondientes curvas características (Figura 45), como se muestra en la Tabla 9. Se calculó la desviación estándar relativa (RSD) para cada muestra por medio de cuatro mediciones individuales (Ec. 4.9). Se encontró que los valores de RSD son 3.35%. Los resultados coinciden con los datos obtenidos del método clínico tradicional de un hospital local. Por lo tanto, el biosensor es fiable para la determinación del colesterol en muestras de suero humano.

$$RSD = 100 \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}{n-1}}{\bar{Y}} \quad [4.9]$$

Tabla 9. Detección de concentración de colesterol en muestras de suero humano.

Muestras	Medición por el método clínico (mM)	Medición con el biosensor (mM)	% RSD (n=4)
1	4.34558	4.33998	0.28945
2	4.50078	4.45792	2.03783
3	4.55251	4.60361	3.35217

En este capítulo, se presentó el diseño, desarrollo y calibración del biosensor óptico para determinar la concentración de colesterol, caracterizado con muestras sintéticas y evaluando su rendimiento con muestra biológicas (suero humano), obteniendo resultados satisfactorios comparado con un método clínico. Por último en el siguiente capítulo se realizara el análisis final de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este proyecto.

## 5. Conclusión

### 5.1 Logros del trabajo

En este trabajo, se ha desarrollado un optrodo sol-gel basado en biosensor de colesterol. Se ha demostrado que la enzima colesterol puede inmovilizarse sobre la estructura sol-gel del optrodo. Después del análisis realizado sobre ambos métodos de deposición, se encontró que el método de recubrimiento por Dip-Coating proporcionó mejores resultados. La gama de funcionamiento lineal del sistema para la determinación de la concentración de colesterol está entre 170 a 200 mg/dl (4.4-5,2 mM). El biosensor desarrollado es práctico y fácil de usar. Sólo sumergimos la punta optrodo en la muestra y luego, se introduce en el sistema para el procesamiento y la adquisición de datos.

El biosensor de colesterol presentado ha sido comparado con otros sensores reportados en la literatura, encontrando que nuestro instrumento es más compacto, portátil y no requiere equipo y materiales adicionales. En particular, nuestro biosensor requiere una fuente, el optrodo, el detector y el sistema de procesamiento (costo aproximado US\$ 54), mientras que otros sensores utilizan espectrofotómetros, fluorómetros, galvanómetros o potenciómetros que aumentan el costo (US\$ 212 a US\$ 648) [104, 140, 151, 152, 153, 154, 155]. Otras ventajas de nuestro biosensor es que tiene un tiempo de respuesta de 120s, que es más rápido que los obtenidos por X. J. Wu [104] and S. Singh [140] respectivamente, una sensibilidad de  $2.0629 \%T/mM^{-1}$  mejor que la obtenida por P. Solanki [154] de  $1.16 \times 10^{-2} mA/(mg/dl)$ , el porcentaje de precisión de 3.4% mayor que los alcanzados por M. D. Marazuela [152] de 4% y B. Wang [151] de 5.03% en sus respectivos artículos. Los valores obtenidos al analizar el suero humano muestran ligeras diferencias entre nuestro biosensor y un método clínico tradicional; por lo tanto, el biosensor puede ser un sistema de detección de colesterol alternativo para análisis en muestras de suero humano. Además, nuestro biosensor requiere valores pequeños de suero (6 $\mu$ l), mientras que otros requieren una mayor cantidad de suero 500 $\mu$ l [152].



### **5.2 Ideas relevantes**

El sistema puede ser de multi-análisis, ya que se pueden realizar otros optrodos con la capacidad de reconocer otros analitos como el pH y la glucosa (trabajos previos), colocarlo en el sistema de biosensado y se calibra para realizar la medición de la otra variable.

### **5.3 Limitantes**

Una limitante de nuestro sistema es en la parte estructural, debido a que la parte donde se coloca el optrodo no está aislada de la luz ambiente donde se realiza la prueba, ya que las mediciones que se realizaron fueron hechas en un cuarto oscuro.

La reproducibilidad debido a que no controlamos todas las variables que involucran el medio donde se desarrolla el biosensor.

Otro factor a mejorar sería el rango de operación, ya que entre más amplio sea es mejor.

### **5.4 Recomendaciones**

Para poder obtener optrodos con una mejor reproducibilidad, es necesario controlar las variables del ambiente donde se desarrollan los optrodos como lo son la temperatura y la humedad, factores que afectan al proceso de secado de la técnica sol-gel.

---

## 6. Trabajos

- D. A. Razo-Medina, M. Trejo-Durán and E. Alvarado-Méndez, *Cholesterol biosensor based on a plastic optical fibre with sol-gel: structural analysis and sensing properties*, Journal of Modern Optics, vol. 65 (3), pp. 348-352, 2018.  
<http://www.tandfonline.com/eprint/WmBxHPHXjGb4mVUCb8Wj/full>
- D. A. Razo-Medina, E. Alvarado-Méndez y M. Trejo-Durán, “*Plastic optical fiber with sol-gel film for pH detection*”. Procedia Technology, vol. 27, pp. 271–273, 2017.
- M. C. Moreno-Bondi, *Desarrollo de elementos de reconocimiento selectivo, basado en polímeros de impronta molecular (MIPs), para el desarrollo de sensores ópticos*, Estancia de investigación. Universidad Complutense de Madrid, 2016.
- J. A. Saavedra-García, D. A. Razo-Medina, M. Trejo-Durán y E. Alvarado-Méndez, “*Characterization of thin films of pH in plastic optical fiber*”. (Presentado en el congreso Photonics North 2016).
- D. A. Razo-Medina, E. Alvarado-Méndez y M. Trejo-Durán, “*Plastic optical fiber with sol-gel film for pH detection*”. Congress Biosensors 2016.
- D. A. Razo-Medina, O. Ortiz-Jiménez, E. Alvarado-Méndez y M. Trejo-Durán “*Control de deposición de una película delgada en una fibra óptica utilizando el dip-coater para detectar el pH*”, Acta Universitaria, Fotónica y Óptica, vol. 26, pp. 20-23, 2016.
- D. A. Razo-Medina, E. Alvarado-Méndez y M. Trejo-Durán, “*Thin film of sol-gel deposited in photonic crystal fiber for cholesterol detection*”, SPIE, vol. 9434, pp. 943417\_1-943417\_6, 2015.
- O. Ortiz-Jimenez, D. A. Razo-Medina, M. Trejo-Durán, E. Alvarado-Méndez, R. I. Mata-Chávez y M. Martínez Rosales, “*Minimum parameters necessary for grow a thin film with a sol-gel method*”, MACROMEX, vol. 2014, pp. 354-358, 2014.
- D. A. Razo-Medina, O. Ortiz-Jiménez, E. Alvarado-Méndez y M. Trejo-Durán, “*Control of preparation process to form a sol-gel membrane deposited in plastic fiber optic for pH detection*”, MACROMEX, vol. 2014, pp. 344-348, 2014.

---

## 7. Bibliografía

- [1] «Enfermedades producidas por exceso de Carbohidratos – Rosmery Campos /Química y Biología,» 01 08 2015. [En línea]. Available: <https://rosmerycampos.wordpress.com/2015/08/01/enfermedades-producidas-por-exceso-de-carbohidratos/>.
- [2] «Enfermedades por exceso de grasa | Cambiatufisico,» 27 02 2015. [En línea]. Available: <https://www.cambiatufisico.com/enfermedades-exceso-grasa/>.
- [3] «TOP 10 Enfermedades Por Falta De Vitaminas - La Guía de las Vitaminas,» 02 08 2017. [En línea]. Available: <https://laguiadelasvitaminas.com/enfermedades-por-falta-de-vitaminas/>.
- [4] R. M. White, «A Sensor Classification Scheme,» *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics and frequency control*, vol. 34, n° 2, p. 134, 1987.
- [5] W. Bolton, «Sensores y transductores,» de *Mecatrónica - sistemas de control electrónico en la ingeniería mecánica y eléctrica*, Alfaomega, 2013, p. 17\_50.
- [6] «Sensores,» 28 06 2017. [En línea]. Available: <http://www.pce-iberica.es/instrumentos-de-medida/sistemas/sensores.htm>.
- [7] A. Grazia Mignaniy y F. Baldini, «Biomedical sensors using optical fibres,» *Rep. Prog. Phys.*, vol. 59, pp. 1-28, 1996.
- [8] R. Doong y H. Shih, «Glutamate optical biosensor based on the immobilization of glutamate dehydrogenase in titanium dioxide sol-gel matrix,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 185-191, 2006.
- [9] B. Deboux, E. Lewis, P. Scully y R. Edwards, «A Novel Technique for Optical Fiber pH Sensing Based on Methylene Blue Adsorption,» *Journal of lightwave technology*, vol. 13, n° 7, pp. 1407-1414, 1995.
- [10] M. Marazuela y M. Moreno Bondi, «Fiber-optic biosensors – an overview,» *Anal Bioanal Chem*, vol. 372, pp. 664-682, 2002.
- [11] A. Mateescu, Y. Wang, J. Dostalek y U. Jonas, «Thin Hydrogel Films for Optical Biosensor Applications,» *Membranes*, vol. 2, pp. 40-69, 2012.

- [12] M. Espinosa-Bosch, A. J. Ruiz-Sánchez, F. Sánchez-Rojas y C. Bosch-Ojeda, «Recent Development in Optical Fiber Biosensors,» *Sensors*, vol. 7, pp. 797-859, 2007.
- [13] T. Basu, P. Solanki y B. D. Malhotra, «Recent Advances in Carbon Nanotubes Based Biosensors,» *Sensors*, vol. 8, pp. 1-34, 2008.
- [14] L. Dornelles Mello y L. Tatsuo Kubota, «Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and,» *Food Chemistry*, vol. 77, pp. 237-256, 2002.
- [15] L. C. Clark y C. Lyons, «Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery,» *Annals of the New York Academy of sciences*, vol. 102, pp. 29-45, 1962.
- [16] D. W. Lubbers y N. Optiz, «The pC 02-/p02-0pt0de: A New Probe for Measurement of pC 02 or p 0 2 in Fluids and Gases,» *Z. Naturforsch C: Biosci*, vol. 130, pp. 532-533, 1975.
- [17] M. Shichiri, R. Kawamori, i. Y. Yamasak, N. Hakui y H. Abe, «Wearable Artificial Endocrine Pancreas with needle-type glucose sensor,» *Lancet*, vol. 2, n° 8308, pp. 1129-1131, 1982.
- [18] J. Wang, G. Rivas, X. Cai, E. Palecek, P. Nielsen, H. Shiraish, N. Dontha, D. Luo y e. al., «DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring,» *Analytica chimica acta*, vol. 347, pp. 1-8, 1997.
- [19] S. Lee, B. Aneeshkumar, P. Radhakrishnan y C. Vallabhana, «A microbent fiber optic pH sensor,» *Optics Communications*, vol. 205, pp. 253-256, 2002.
- [20] E. Vaiopoulou, P. Melidis, E. Kampragou y A. Aivasidis, «On-line load monitoring of wastewaters with a respirographic microbial sensor,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, pp. 365-371, 2005.
- [21] M. A. Alonso-Lomillo, J. Gonzalo-Ruiz y F. J. Muñoz-Pascual, «Biosensor based on platinum chips for glucose determination,» *Analytica Chimica Acta*, vol. 547, pp. 209-214, 2005.
- [22] X. Yang y L. Wang, «Fluorescence pH probe based on microstructured polymer optical fiber,» *Optics express*, vol. 15, n° 25, pp. 16478-16483, 2007.
- [23] J. Wang, «Electrochemical Glucose Biosensor,» *Chem. Rev.*, vol. 108, pp. 814-825,

2008.

- [24] E. Yoo y S. Lee, «Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice,» *Sensors*, vol. 10, pp. 4558-4576, 2010.
- [25] M. Morisawa y S. Muto, «Plastic Optical Fiber Sensing of Alcohol Concentration in Liquors,» *Journal of Sensors*, vol. 2012, pp. 1-5, 2012.
- [26] N. Atar, T. Eren y M. Yola, «A molecular imprinted SPR biosensor for sensitive determination of citrinin in red yeast rice,» *Food Chemistry*, vol. 184, pp. 7-11, 2015.
- [27] L. Marques, F. U. Hernandez, S. W. James, S. P. Morgan, M. Clark, R. P. Tatam y S. Korposh, «Highly sensitive optical fibre long period grating biosensor anchored with silica core gold shell nanoparticles,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 75, pp. 222-231, 2016.
- [28] R. Knopp, «Drug treatment of lipid disorders,» *N Engl J Med*, vol. 311, pp. 498-511, 1999.
- [29] P. Barter, A. M. Gotto, D. Phil, J. C. LaRosa, J. Maroni, M. Szarek, S. M. Grundy, J. Kastelein, V. Bittner y J. C. Fruchart, «HDL Cholesterol, Very Low Levels of LDL Cholesterol, and Cardiovascular Events,» *N Engl J Med*, vol. 357, pp. 1301-1310, 2007.
- [30] A. V. Khera, M. Cuchel, M. Llera-Moya, A. Rodrigues, M. F. Burke, K. Jafri, B. C. French, J. A. Phillips, M. L. Mucksavage, R. L. Wilensky, E. R. Mohler, G. Rothblat y D. J. Rader, «Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis,» *N Engl J Med*, vol. 364, pp. 127-135, 2011.
- [31] W. E. Boden, J. L. Probstfield, T. Anderson y B. R. Chaitman, «Niacin in Patients with Low HDL Cholesterol Levels Receiving Intensive Statin Therapy,» *N Engl J Med*, vol. 365, pp. 2255-2267, 2011.
- [32] S. J. Hur, B. Min, K. C. Nam, E. J. Lee y D. U. Ahn, «Effect of Dietary Cholesterol and Cholesterol Oxides on Blood Cholesterol, Lipids, and the Development of Atherosclerosis in Rabbits,» *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, pp. 12593-12606, 2013.
- [33] J. Wilson, «Sensor Fundamentals,» de *Sensor Technology Handbook*, United States of America, ELSEVIER, 2005, pp. 1-20.
- [34] A. Hulanicki, S. Geab y F. Ingman, «Chemical sensors definitions and

- classification,» *Pure & Appl. Chem.*, vol. 63, n° 9, pp. 1247-1250, 1991.
- [35] N. Nise, «Funcion de transferencia,» de *Sistemas de control para ingenieria*, compañía editorial continental, 2004, pp. 49-52.
- [36] C. Pérez Conde, «Parametros de calidad,» de *Sensores opticos*, Valencia, Universidad de valencia, 1996, pp. 33-36.
- [37] K. Murray, R. Boyd, M. Eberlin, G. Langley, L. Li y Y. Naito, «Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013),» *Pure Appl. Chem.*, vol. 85, n° 7, pp. 1515-1609, 2013.
- [38] J. Gu, M. Meng, A. Cook y M. Faulkner, «Micro sensor based eye movement detection and neural network based sensor fusion and fault detection and recovery,» *Electrical and Computer Engineering*, vol. 1, pp. 518-522, 2000.
- [39] I. Karubey y Y. Nomura, «Enzyme sensors for environmental analysis,» *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 10, n° 1, pp. 177-181, 2000.
- [40] X. Huang, N. Hu, L. Zhang, L. Wei, H. Wei y Y. Zhang, «The NH<sub>3</sub> sensing properties of gas sensors based on aniline reduced graphene oxide,» *Synthetic Metals*, vol. 185, pp. 25-30, 2013.
- [41] C. Chai, J. Lee y P. Takhistov, «Direct Detection of the Biological Toxin in Acidic Environment by Electrochemical Impedimetric Immunosensor,» *Sensors*, vol. 10, pp. 11414-11427, 2010.
- [42] L. D. Mello y L. T. Kubota, «Review of the use of biosensors as analytical tool in the food and drink industries,» *Food Chemistry*, vol. 77, n° 2, pp. 237-256, 2002.
- [43] A. Garinei y R. Marsili, «Measurement of pressure distribution on a membrane of a pump for biomedical applications through capacitive film sensors,» *Measurement*, vol. 55, pp. 110-116, 2014.
- [44] P. I. Hilditch y M. J. Green, «Disposable electrochemical biosensors,» *Analys*, vol. 116, n° 12, pp. 1217-12290, 1991.
- [45] C. Henry, «Getting under the skin: Implantable glucose sensors,» *Analytical chemistry*, vol. 70, n° 17, pp. 594A-598A, 1998.
- [46] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Voros y E. Reimhult, «Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures,» *Sensors*, vol. 8, pp. 1400-1458, 2008.

- [47] Y. Zheng, X. Dong, C. C. Chan, S. P. P. y H. Su, «Optical fiber magnetic field sensor based on magnetic fluid and microfiber mode interferometer,» *Optics Communications*, vol. 336, pp. 5-8, 2015.
- [48] M. Dolores-Marazuela y M. C. Moreno-Bondi, «Fiber-optic biosensors – an overview,» *Anal Bioanal Chem*, vol. 372, pp. 664-682, 2002.
- [49] P. N. Patel, V. Mishra y A. S. Mandloi, «Optical biosensors: fundamentals & trends,» *Journal of Engineering Research and Studies*, vol. 1, pp. 15-34, 2010.
- [50] C. Jiménez y D. E. León, «Biosensors: implementation and outlook in the control and quality and foodstuffs,» *Revista de la facultad de química farmaceutica*, vol. 16, n° 1, pp. 144-154, 2009.
- [51] F. Long, A. Zhu, C. Gu y H. Shi, «Recent Progress in Optical Biosensors for Environmental Applications,» *InTechOpen*, pp. 1-28, 2013.
- [52] F. Ricci, G. Volpe, L. Micheli y G. Palleschi, «A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis,» *Analytica chimica acta*, vol. 605, n° 2, pp. 111-129, 2007.
- [53] M. P. Marco y S. Gee, «Immunochemical techniques for environmental analysis I. Immunosensors,» *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 14, n° 7, pp. 341-350, 1995.
- [54] G. E. Badini, K. T. V. Irattan, A. W. Palmer y A. C. C. Tseung, *Optical Fiber Sensors*, Springer Proceedings in Physics, vol. 44, Koblenz, Germany: Springer Verlag, 1989, pp. 436-442.
- [55] S. Cagnin, M. Caraballo, C. Guiducci, P. Martini, M. Ross, M. SantaAna, D. Danley, T. West y G. Lanfranchi, «Overview of Electrochemical DNA Biosensors: New Approaches to Detect the Expression of Life,» *Sensors*, vol. 9, pp. 3122-3148, 2009.
- [56] J. Xu, X. Wang, K. L. Cooper, G. R. Pickrell y A. Wang, «Miniature Temperature-Insensitive Fabry-Pérot Fiber-Optic Pressure Sensor,» *IEEE Photonics technology letters*, vol. 18, n° 10, pp. 1134-1136, 2006.
- [57] K. S. Lion, «Transducers: Problems and Prospects,» *IEEE Transactions on industrial electronics and control instrumentation*, vol. 16, n° 1, pp. 2-5, 1969.
- [58] C. Jiménez y D. E. Leon, «Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios,» *VITAE*, vol. 16, n° 1, pp. 144-154,

2009.

- [59] L. C. L. Chin, W. M. Whelan y I. A. Vitkin, «Optical Fiber Sensors for Biomedical Applications,» de *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue*, Toronto, Canada, Springer, 20011, pp. 661-708.
- [60] C. Kurzawa, A. Hengstenberg y W. Schuhmann, «Immobilization Method for the Preparation of Biosensors Based on pH Shift-Induced Deposition of Biomolecule-Containing Polymer Films,» *Anal. chem.*, vol. 74, pp. 355-361, 2002.
- [61] P. Scully, L. Betancor, J. Bolyo, S. Dzyadevych, J. M. Guisan, R. Fernández-Lafuente, N. Jaffrezic- Renault, G. Kuncová, V. Matějec, B. O'Kenned, O. Podrazky, K. Rose, L. Sasek y J. S. Young, «Optical fibre biosensors using enzymatic transducers to monitor glucose,» *Measurement Science and Technology*, vol. 18, pp. 3177-3186, 2007.
- [62] R. Pinto y M. Lopez, «Photonic crystal fibers for sensing applications,» *Journal of Sensors: Hindawi publishing corporation*, vol. 2012, pp. 598178\_1-598178\_21, 2012.
- [63] G. F. C. Andrade, M. Fan y A. G. Brolo, «Multilayer silver nanoparticles-modified optical fiber tip for high performance SERS remote sensing,» *Biosensors and bioelectronics*, vol. 25, p. 2270–2275, 2010.
- [64] R. L. Boylestad y L. Nashelsky, *Electronica: teoría de circuitos y dispositivos electrónicos*, México: Pearson Pretice Hall, 1989.
- [65] J. Millman y C. C. Halkias, *Electronica integrada: Circuitos y sistemas analógicos y digitales*, Barcelona, España: Hispano Europea, 1976.
- [66] «Microsoft PowerPoint - CO5\_0607\_T2\_transmisor.ppt - CO5\_0809\_T2\_transmisor\_1tpp.pdf,» 30 09 2008. [En línea]. Available: [https://grupos.unican.es/gif/co5/CO5\\_0809\\_T2\\_transmisor\\_1tpp.pdf](https://grupos.unican.es/gif/co5/CO5_0809_T2_transmisor_1tpp.pdf).
- [67] J. García Fernandez, «Lámparas incandescentes,» 05 09 2017. [En línea]. Available: <http://recursos.citcea.upc.edu/llum/lamparas/lincan.html>.
- [68] «Glosario: Lámparas compactas fluorescentes (CFL),» GreenFacts, 28 10 2017. [En línea]. Available: <https://www.greenfacts.org/es/glosario/jkl/lamparas-compactas-fluorescentes.htm>.



- [69] E. Hierro, «El laser tiene 3 características: la coherencia(misma longitud de onda), la amplitud y la fase - bombeo\_coherente.pdf,» 14 10 2005. [En línea]. Available: [http://sgpwe.izt.uam.mx/pages/cbi/mfg/laseres1/contenido/bombeo\\_coherente.pdf](http://sgpwe.izt.uam.mx/pages/cbi/mfg/laseres1/contenido/bombeo_coherente.pdf).
- [70] «B\_T5 - B\_T3.pdf,» 11 11 2008. [En línea]. Available: [https://www.uv.es/=esanchis/cef/pdf/Temas/B\\_T3.pdf](https://www.uv.es/=esanchis/cef/pdf/Temas/B_T3.pdf).
- [71] ZHONGZHOU, «ZZ-GY-S0001B,ZL-503RCA2.pdf,» 27 12 2016. [En línea]. Available: <http://www.casadelled.com.ar/ZZ-GY-S0001B,ZL-503RCA2.pdf>.
- [72] E. sanchis y J. Ejea, «B\_T4 - B\_T2.pdf,» 11 11 2008. [En línea]. Available: [https://www.uv.es/~esanchis/cef/pdf/Temas/B\\_T2.pdf](https://www.uv.es/~esanchis/cef/pdf/Temas/B_T2.pdf).
- [73] «C3-Detectores - C3-Detectores.pdf,» 07 08 2012. [En línea]. Available: <http://profesores.fi-b.unam.mx/NATANAEL/docs/notas/C3-Detectores.pdf>.
- [74] kitronik, «How an LDR (Light Dependent Resistor) Works | Kitronik,» 30 12 2017. [En línea]. Available: <https://www.kitronik.co.uk/blog/how-an-ldr-light-dependent-resistor-works/>.
- [75] «LDR - Fotorresistencia - fotorresistor - Electrónica Unicrom,» 18 11 2015. [En línea]. Available: <https://unicrom.com/ldr-fotorresistencia-fotorresistor/>.
- [76] «C-2795.PDF - CE-C2795.pdf,» 14 02 2012. [En línea]. Available: <http://www.electan.com/datasheets/cebek/CE-C2795.pdf>.
- [77] D. Axelrod, T. P. Burghardt y N. L. Thompson, «Total internal reflection fluorescence,» *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, vol. 13, n° 1, pp. 247-268, 1984.
- [78] J. Fahrenfort, «A new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds,» *Spectrochimica Acta*, vol. 17, n° 7, pp. 698-709, 1961.
- [79] M. Consales, A. Cutolo, M. Penza, P. Aversa, M. Giordano y A. Cusano, «Fiber optic chemical nanosensors based on engineered single-walled carbon nanotubes,» *Journal of Sensors*, vol. 936074, pp. 1-29, 2008.
- [80] C. R. Zamarreño, M. Hernáez, I. Villar, C. Fernandez-Valdivielso, F. J. Arregui y I. R. Matias, «Optical fiber pH sensor fabrication by means of indium tin oxide coated optical fiber refractometers,» *Phys. Status Solidi C*, vol. 7, n° 11-12, pp. 2705-2707,

2010.

- [81] Y. C. Seow, S. P. Lim, B. C. Khoo y H. P. Lee, «An optofluidic refractive index sensor based on partial refraction,» *Sensors and Actuators B*, vol. 147, pp. 607-611, 2010.
- [82] S. Sainov, «Optical sensor based on total internal reflection diffraction grating,» *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 45, n° 1, pp. 1-6, 1994.
- [83] R. P. Feynman, R. B. Leighton y M. Sands, «Diffraction,» de *In The Feynman Lectures on Physics*, California, Basic Books, 1977, p. 30.1\_30.18.
- [84] O. Maury, A. Aleo, A. Picot, S. Brasselet, P. L. Baldeck, F. Chaput, S. Parola y C. Andraud, «Two-photon excited luminescence of lanthanide complex in monolithic sol-gel hybrid material,» *Journal of Luminescence*, vol. 133, pp. 175-179, 2013.
- [85] R. Reisfeld, V. Levchenko, T. Saraidarov, M. Behrendt, B. Kuklinski y M. Grinberg, «Fluorescence intensification of Rhodamine 6G in Zirconia-Glymo glasses,» *Optical Materials*, vol. 34, pp. 2021-2024, 2012.
- [86] M. Quaranta, S. M. Borisov y I. Klimant, «Indicators for optical oxygen sensors,» *Bioanal Rev.*, vol. 4, pp. 115-157, 2012.
- [87] J. C. Pickup, F. Hussain, N. D. Evans, O. J. Rolinski y D. J. S. Birch, «Fluorescence-based glucose sensors,» *Biosensors and bioelectronics*, vol. 20, pp. 2555-2565, 2005.
- [88] J. Liu, L. Lu, A. Li, J. Tang, S. Wang, S. Xu y L. Wang, «Simultaneous detection of hydrogen peroxide and glucose in human serum with upconversion luminescence,» *Biosensors and bioelectronics*, vol. 68, p. 204-209, 2015.
- [89] C. R. Taitt, G. P. Anderson y F. S. Ligler, «Evanescent wave fluorescence biosensors,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 2470-2487, 2005.
- [90] S. Tang, Q. Zhao y Y. Tu, «A sensitive electrochemiluminescent cholesterol biosensor based on Au/hollowed-TiO<sub>2</sub> nano-composite pre-functionalized electrode,» *Sensors and Actuators B*, vol. 237, pp. 416-422, 2016.
- [91] K. Bremer y B. Roth, «Fibre optic surface plasmon resonance sensor system designed for smartphones,» *Optics express*, vol. 23, n° 13, pp. 17179-17184, 2015.
- [92] K. Yuksel, «Optical fiber sensor system for remote and multi-point refractive index measurement,» *Sensors and Actuators A*, vol. 250, pp. 29-34, 2016.

- [93] M. Morisawa, Y. Amemiya, H. Kohzu, C. X. Liang y S. Muto, «Plastic optical fibre sensor for detecting vapour phase alcohol,» *Meas. Sci. Technol.*, vol. 12, pp. 877-881, 2001.
- [94] S. Muto, O. Suzuki, T. Amano y M. Y. Morisawa, «A plastic optical fibre sensor for real-time humidity monitoring,» *Meas. Sci. Technol.*, vol. 14, pp. 746-750, 2003.
- [95] S. Kim, S. M. Nam, G. S. Byun, S. Y. Yun y S. Hong, «Determination of Cholesterol by a Diode Laser/Fiber Optic Colorimetric Spectrometer,» *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 21, n° 4, pp. 389-392, 2000.
- [96] L. Changchun, «Optical fiber temperature sensor used in biomedicine,» *Proc SPIE*, vol. 2976, pp. 57-61, 1997.
- [97] O. Ben-David, E. Shafir, I. Gilath, Y. Prior y D. Avnir, «Simple Absorption Optical Fiber pH Sensor Based on Doped Sol-Gel Cladding Material,» *Chem. Mater.*, vol. 9, pp. 2255-2257, 1997.
- [98] O. S. Wolfbeis, «Fibre-optic sensors in biomedical sciences,» *Pure & Appl. Chem.*, vol. 59, n° 5, pp. 663-672, 1987.
- [99] B. Kuswandi, R. Andres y R. Narayanaswamy, «Optical fibre biosensors based on immobilised enzymes,» *Analyst*, vol. 126, pp. 1469-1491, 2001.
- [100] J. Sánchez-Ramírez, J. L. Martínez-Hernández, E. P. Segura-Ceniceros, J. C. Contreras-Esquivel, M. A. Medina-Morales, C. N. Aguilar y A. Iliná, «Inmovilización de enzimas ignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas,» *Quim. Nova*, vol. 37, n° 3, pp. 504-512, 2014.
- [101] R. Fajardo-Ochoa, J. A. Osuna-Castro, C. V. Velázquez-Mendoza, P. Escalante-Minakata y V. Ibarra-Junquera, «Inmovilización de cédulas y enzimas,» *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, vol. 3, n° 6, pp. 42-56, 2011.
- [102] B. D. Gupta y D. K. Sharma, «Evanescent wave absorption based fiber optic pH sensor prepared by dye doped sol-gel immobilization technique,» *Optics Communications*, vol. 140, pp. 32-35, 1997.
- [103] R. Gupta, S. Mozumdar y N. K. Chaudhury, «Fluorescence spectroscopic studies to characterize the internal environment of tetraethyl-orthosilicate derived sol-gel bulk and thin films with aging,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 1358-1365, 2005.

- 
- [104] X. J. Wu y M. M. F. Choi, «Hydrogel Network Entrapping Cholesterol Oxidase and Octadecylsilica for Optical Biosensing in Hydrophobic Organic or Aqueous Micelle Solvents,» *Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 4019-4027, 2003.
- [105] S. Donga, M. Luo, G. Peng y W. Cheng, «Broad range pH sensor based on sol-gel entrapped indicators on fibre optic,» *Sensors and Actuators B*, vol. 129, pp. 94-98, 2008.
- [106] S. Liu y Y. Sun, «Co-immobilization of glucose oxidase and hexokinase on silicate hybrid sol-gel membrane for glucose and ATP detections,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 905-911, 2007.
- [107] H. Ciftci, Y. Oztekin, U. Tamer, A. Ramanaviciene y A. Ramanavicius, «Electrochemical biosensor based on glucose oxidase encapsulated within enzymatically synthesized poly(1,10-phenanthroline-5,6-dione),» *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, vol. 123, pp. 685-691, 2014.
- [108] M. P. Marco, S. Gee y B. D. Hammock, «Immunochemical techniques for environmental analysis I. Immunosensors,» *trends in analytical chemistry*, vol. 14, n° 7, pp. 341-350, 1995.
- [109] K. Balasubramanian y M. Burghard, «Biosensors based on carbon nanotubes,» *Anal Bioanal Chem*, vol. 385, pp. 452-468, 2006.
- [110] S. Zhang, G. Wright y Y. Yang, «Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction,» *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 15, pp. 273-282, 2000.
- [111] H. K. Al-Hakeim, M. M. Kareem y E. A. Grulke, «Synthesis a New Magnetic Nanoparticles and Study the Interaction with Xanthine Oxidase,» *American Journal of Nanomaterials*, vol. 2, n° 2, pp. 13-20, 2014.
- [112] J. G. Ortega-Mendoza, F. Chávez, P. Zaca-Morán, C. Felipe, G. F. Pérez-Sánchez, G. Beltran-Pérez, O. Goiz y R. Ramos-Garcia, «Selective photodeposition of zinc nanoparticles on the core of a single-mode optical fiber,» *Optics express*, vol. 21, n° 5, pp. 6509-6518, 2013.
- [113] P. R. Solanki, A. Kaushik, A. A. Ansari, A. Tiwari y B. D. Malhotra, «Multi-walled carbon nanotubes/sol-gel-derived silica/chitosan nanobiocomposite for total cholesterol sensor,» *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 137, pp. 727-735, 2009.
-

- 
- [114] K. M. Millan, A. J. Spurmanis y S. K. Mikkelsen, «Covalent Immobilization of DNA onto Glassy Carbon Electrodes,» *Electroanalysis*, vol. 4, pp. 929-932, 1992.
- [115] A. M. Azevedo, D. M. Prazeres, J. M. Cabral y L. P. Fonseca, «Ethanol biosensors based on alcohol oxidase,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, pp. 235-247, 2005.
- [116] C. Jiménez, J. Bartrol, N. F. Rooij y M. Koudelka-Hep, «Use of photopolymerizable membranes based on polyacrylamide hydrogels for enzymatic microsensor construction,» *Analytica Chimica Acta*, vol. 351, pp. 169-176, 1997.
- [117] S. S. Wong y L. J. C. Wong, «Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes,» *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 14, pp. 866-874, 1992.
- [118] M. A. Aegerter y M. Mennig, «Basic principles of sol-gel chemistry,» de *Sol-gel technologies for glass producers and users*, Saarbrücken, Germany, Springer science + Business media, 2004, pp. 3-10.
- [119] H. Dislich y P. Hinz, «History and principles of the sol-gel process, and some new multicomponent oxide coatings,» *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 48, pp. 11-16, 1982.
- [120] M. Ebelmen, «Sur les combinaisons des acides borique et silicique avec les éthers.,» *Annales de Chimie et de Physique*, vol. 1, n° 8, pp. 129-166, 1846.
- [121] T. Graham, «On the properties of silicic acid and other analogous colloidal substances,» *J. Chem. Soc.*, vol. 17, pp. 318-327, 1864.
- [122] S. S. Kistler, «Coherent expanded aerogels and jellies,» *Nature*, vol. 127, p. 741, 1931.
- [123] R. Roy, «Aids in hydrothermal experimentation: II, Methods of making mixtures for both “Dry” and “Wet” phase equilibrium studies.,» *Amer. Ceram. Soc.*, vol. 39, n° 4, pp. 145-146, 1956.
- [124] R. Ciriminna, M. Sciortino, G. Alonzo, A. Schrijver y M. Pagliaro, «From Molecules to Systems: Sol-Gel Microencapsulation in Silica-Based Materials,» *Chem. Rev.*, vol. 111, pp. 765-789, 2011.
- [125] A. Chiappini, A. Chiasera, S. Berneschi, C. Armellini, A. Carpentiero, M. Mazzola, E. Moser, S. Varas, G. C. Righini y M. Ferrari, «Sol-gel-derived photonic structures: fabrication, assessment, and application,» *J Sol-Gel Sci Technol*, vol. 60, pp. 408-
-

425, 2011.

- [126] S. VIDHYA y B. .. M. MURAR, «SOL-GEL THIN FILM BASED SENSORS AND BIOSENSORS,» *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, vol. 7, n° 1, pp. 297-310, 2016.
- [127] C. J. Brinker y G. W. Sherer, *Sol-gel science, the physics and chemistry of sol-gel processing*, Boston, San Diego, New York: Academic Press. Inc., 1990.
- [128] L. L. Hench y J. K. West, «The sol-gel process,» *Chem. Rev.* , vol. 90, pp. 33-72, 1990.
- [129] R. Ashiria, A. Nemati y M. S. Ghamsari, «Crack-free nanostructured BaTiO<sub>3</sub> thin films prepared by sol-gel dip-coating technique,» *Ceramics International*, vol. 40, pp. 8613-8619, 2014.
- [130] S. Sakka, «Processing of thin films,» de *Sol-gel science and technology, processing characterization and applications*, Suita, Osaka, Japon, Kluwer Academic Publishers, 2005, pp. 247-283.
- [131] H. Nguyen, L. Miao, S. Tanemura y M. Tanemura, «Structural and morphological characterization of anatase TiO<sub>2</sub> coating on  $\alpha$ -Alumina scale fiber fabricated by sol-gel dip-coating method,» *Journal of crystal growth*, vol. 271, pp. 245-251, 2004.
- [132] S. Islam, N. Bidin, S. Riaz, G. Krishnan y S. Naseem, «Sol-gel based fiber optic pH nanosensor: Structural and sensing properties,» *Sensors and Actuators A*, vol. 238, pp. 8-18, 2016.
- [133] C. Steven, «firm installs fuel cell,» *The News Journal*, p. B7, 2006.
- [134] R. Mercado y F. Moussy, «In vitro and in vivo mineralization of Nafion membrane used for implantable glucose sensors,» *Biosens Bioelectron*, vol. 13, n° 2, pp. 133-145, 1998.
- [135] W. Stober y A. Fink, «Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range,» *Journal of colloid and interface science* , vol. 26, pp. 62-69, 1968.
- [136] K. Tadanaga, K. Morita, K. Mori y M. Tatsumisago, «Synthesis of monodispersed silica nanoparticles with high concentration by the Stober process,» *J Sol-Gel Sci Technol*, vol. 68, pp. 341-345, 2013.

- [137] M. A. Aegerter y M. Mennig, «DIP COATING TECHNIQUE,» de *Sol-gel technologies for glass producers and users*, Saarbrucken, Germany, Springer science + Business media, 2004, pp. 37-47.
- [138] L. C. Klein, «Coating, Thin films and surface treatment,» de *Sol-gel technology for thin films, fibers, preforms, electronics and specialty shapes*, Park ridge, New Jersey, USA, Noyes publications, 1988, pp. 49-54.
- [139] T. Rezayi y M. H. Entezari, «Achieving to a superhydrophobic glass with high transparency by a simple sol-gel-dip-coating method,» *Surface & Coatings Technology*, vol. 276, pp. 557-564, 2015.
- [140] J. Liu, S. Wang, P. Li, M. Feng y X. Yang, «A modified dip-coating method to prepare BN coating on SiC fiber by introducing the sol-gel process,» *Surface & Coatings Technology*, vol. 286, pp. 57-63, 2016.
- [141] T. Mendivil-Reynoso, R. Ochoa-Landín, L. P. Ramírez-Rodríguez, K. Gutierrez-Acosta, B. R. Ramírez-Bon y S. J. Castillo, «PbSe films by ion exchange of synthetic plumbonacrite layers immersed in a selenium ionic solution,» *Journal of crystal growth*, vol. 443, pp. 20-24, 2016.
- [142] S. Singh, R. Singhal y B. D. Malhotra, «Immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase onto sol-gel films for application to cholesterol biosensor,» *Anal Chim Acta*, vol. 582, n° 2, pp. 335-343, 2007.
- [143] A. M. Kamelska, B. Jarmołowska y K. Bryl, «A simplified enzymatic method for total cholesterol determination in Milk,» *International Dairy Journal*, vol. 50, pp. 50-57, 2015.
- [144] E. Alvarado-Méndez, R. Rojas-Laguna, J. Andrade-Lucio, D. Hernández-Cruz, L. A. Lessard y J. G. Aviña-Cervantes, «Design and characterization of pH sensor based on Sol-Gel silica layer on plastic optical fiber,» *Sensors and Actuators B*, vol. 106, pp. 518-522, 2005.
- [145] E. Alvarado-Méndez, M. Trejo-Durán, R. Rojas-Laguna, D. Hernández-Cruz y M. Vázquez-Guevara, «Optrodes of Fiber Optic Plastic Doped with Carbon Nanotubes (CNTs) for Glucose Sensing,» de *Biosensor*, 2012.
- [146] E. Alvarado-Méndez, S. D. Flores-Rangel, D. Hernández-Cruz, M. Trejo-Durán, J. A. Andrade-Lucio, R. Rojas-Laguna, J. M. Estudillo-Ayala, E. Vargas-Rodríguez y R. I. Mata Chávez, «PH biosensor with plastic fiber optic doped with carbone nanotubes

- used sol-gel technique,» *SPIE*, vol. 7839, pp. 78391C\_1-78391C\_4, 2010.
- [147] A. Rendón-Romero, M. Peña-Gómar y E. Alvarado-Méndez, «Optrodes of Photonic Fiber Optic to pH Sensor,» *SPIE*, vol. 8412, p. 841201\_1, 2012.
- [148] D. A. Razo-Medina, O. Ortiz-Jiménez, E. Alvarado-Méndez y M. Trejo-Durán, «Control of preparation process to form a sol-gel membrane deposited in plastic fiber optic for pH detection,» *MACROMEX*, vol. 2014, pp. 344-348, 2014.
- [149] D. A. Razo-Medina, E. Alvarado-Méndez y M. Trejo-Durán, «Thin film of sol-gel deposited in photonic crystal fiber for cholesterol detection,» *SPIE*, vol. 9434, pp. 943417\_1-943417\_6, 2015.
- [150] U. Sengul, «Comparing determination methods of detection and quantification limits for aflatoxin analysis in hazelnut,» *Journal of food and drug analysis*, vol. 24, pp. 56-62, 2016.
- [151] J. Mocak, A. M. Bond, S. Mitchell y G. Schollary, «A Statistical Overview of Standard (IUPAC and ACS) and New Procedures for Determining the Limits of Detection and Quantification: Application to Voltammetric and Stripping,» *Techniques. Pure Appl. Chem.*, vol. 69, pp. 297-328, 1997.
- [152] D. A. Arinbruster, M. D. Tillman y L. M. Hubbs, «Limit of Detection (LOD)/Limit of Quantitation (LOQ): Comparison of the Empirical and the Statistical Methods Exemplified with GC-MS Assays of Abused Drugs,» *Clin. Chem.*, vol. 40, n° 7, pp. 1233-1238, 1994.
- [153] B. Wang, J. Huang, M. Li y X. Zhou, «Multifunctional sensing film used for fiber optic cholesterol sensor,» *Proc. SPIE*, vol. 7278, pp. 72780Q 1-12, 2009.
- [154] M. D. Marazuela, B. Cuesta, M. C. Moreno-Bond y A. Quejido, «Free cholesterol fiber-optic biosensor for serum samples with simplex optimization,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 12, n° 3, pp. 233-240, 1997.
- [155] S. Xiao-Ting, Y. Zhang, Z. Dong-Hua, Y. Shuai, Y. Chun-Guang y X. Zhang-Run, «Multitarget sensing of glucose and cholesterol based on Janus hydrogel microparticles,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 92, pp. 81-86, 2017.
- [156] P. R. Solanki, S. K. Arya, S. P. Singh, M. K. Pandey y B. D. Malhotra, «Application of electrochemically prepared poly-N-methylpyrrole-p-toluene sulphonate films to cholesterol biosensor,» *Sensors and Actuators B*, vol. 123, pp. 829-839, 2007.



- [157] M. Yuniarto, A. N. Permata, D. Eka, D. Ariningrum, S. Wahyuningsih y A. Marzuki, «Design of a Fiber Optic Biosensor for Cholesterol Detection in Human Blood,» *Conf. Series: Materials Science and Engineering*, vol. 176, n° 12014, pp. 1-5, 2017.
- [158] «Quantum processes,» 09 11 2016. [En línea]. Available: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/mod5.html>.